



Universidade do Algarve
Faculdade de Ciências e Tecnologias

**Comparação de métodos analíticos na quantificação do teor
de Gabapentina em diversas cápsulas de diversos laboratórios**

Dissertação

Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

Frederico Guerreiro Fonseca

Trabalho efetuado sob a orientação de:

Prof. Doutora Ana Rosa Garcia

2014

Comparação de métodos analíticos na quantificação do teor de Gabapentina em diversas cápsulas de diversos laboratórios



Universidade do Algarve

Faculdade de Ciências e Tecnologias

Comparação de métodos analíticos na quantificação do teor de Gabapentina em diversas cápsulas de diversos laboratórios

Dissertação

Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

Frederico Guerreiro Fonseca

Trabalho efetuado sob a orientação de:

Prof. Doutora Ana Rosa Garcia

2014

Declaração de autoria de trabalho:

Declaro ser o autor deste trabalho, que é original e inédito. Autores e trabalhos consultados estão devidamente citados no texto e constam da listagem de referências incluída.

Copyright© Frederico Guerreiro Fonseca

A Universidade do Algarve tem o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicitar este trabalho através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, de o divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Agradecimentos

Em primeiro lugar gostaria de agradecer profundamente à Professora Doutora Ana Rosa Garcia, orientadora da presente monografia, pela orientação, incentivo, pela ajuda no desenvolvimento desta dissertação, revelando sempre uma enorme disponibilidade no esclarecimento de dúvidas e apoio sempre que necessário.

A toda a minha família, pelo carinho, confiança, apoio que me permitiram chegar onde estou hoje.

Aos meus amigos e colegas, pela amizade, apoio, incentivo e ajuda nalguns momentos.

Às auxiliares de laboratório Dr. Catarina Pires, Dr. Maria Rosário Lopes e Eugénia Silvestre pelo apoio em todos os momentos, disponibilidade e prontidão para disponibilizar todo o material.

A todos, um muito obrigado.

Resumo

A presente monografia possui um elevado conteúdo experimental e pretende abordar a aplicabilidade de vários métodos analíticos na quantificação de gabapentina em formulações farmacêuticas sólidas. O seu principal objetivo é a comparação dos métodos, utilizando parâmetros de avaliação analítica. A aplicação destes métodos na quantificação da gabapentina em cápsulas foi também discutida tendo em conta o teor médio obtido por laboratório. Para atingir os objetivos propostos, o doseamento da gabapentina foi efetuado por volumetria, espectroscopia de absorção e espectroscopia de emissão (fluorimetria).

O doseamento de gabapentina por medição da quantidade de radiação absorvida na gama espectral UV-vis (ao máximo de absorção) foi feito por análise de soluções de gabapentina: aquosa (método Direto, análise a 192 nm), etanólica (método Etanol/Água, análise a 194 nm) e em meio ácido (método HCl 0,1 M, análise a 206 nm). Numa tentativa de aumentar a sensibilidade e especificidade da análise, por métodos espectrofotométricos, foram utilizadas técnicas de derivatização, em que foi promovida a reação da gabapentina com um agente derivatizante. Foram induzidas as reações da gabapentina com *p*-benzoquinona (produto da reação com máximo de absorção a 350 nm), Vanilina (produto analisado a 392 nm) e Hipoclorito (absorção máxima a 588 nm). O doseamento por fluorescência foi possível após reação da gabapentina com 4-cloro-7-nitrobenzo-2-oxo-1,3-diazole (NBD-Cl), uma vez que a molécula não apresenta fluorescência intrínseca. O produto da reação foi analisado utilizando ao comprimento de onda de excitação de 464 nm e de emissão 542 nm. Os métodos volumétricos usados na determinação da gabapentina foram a titulação com NaOH e HCl.

Os métodos volumétricos obtiveram recuperações relativas às cápsulas de gabapentina entre 94,95 e 106,71 %. Os métodos espectrofotométricos apresentaram gamas de linearidade diferentes, o método Hipoclorito foi o que apresentou maior gama dinâmica (nomeadamente 14,85), apresentando linearidade entre 2,50 e 73,68 ppm. A sensibilidade de cada método foi discutida tendo por base o declive das respetivas retas de calibração, tendo-se concluído que o método com maior sensibilidade é o método NBD-Cl, com valor de declive da reta de calibração de $1,77_9 \pm 0,04_0$ ppm⁻¹. Por último os métodos espectroscópicos obtiveram recuperações para as cápsulas de gabapentina entre $97,9 \pm 2,1$ e $101,5 \pm 1,1$ %, tendo o melhor método (o método NBD-Cl) obtido uma recuperação média de $100,0 \pm 1,1$ %.

Palavras-chave

Gabapentina, quantificação, métodos analíticos, cápsulas, comparação, derivatização.

Abstract

The proposed monograph has a high experimental content and it tends to show the application of a few analytical methods in the gabapentin quantification in solid pharmaceutical formulas. The main goal is the comparison of the methods, using important analytical parameters. The application of these methods in gabapentin's quantification was also discussed relatively to the recovery results for the different capsules. In order to reach the proposed goals, techniques as volumetry, absorption spectroscopy and emission spectroscopy (fluorimetry) were used in the quantification of gabapentin in capsules.

Spectroscopic methods in ultraviolet and visible range of radiation included the analysis of gabapentin's solutions: aqueous solution (Direct method, analysis at 192 nm), ethanolic solution (Ethanol/Water method, analysis at 194 nm) and acid solution (HCl 0,1 M method, analysis at 206 nm). In order to increase the analysis's specificity and sensibility, derivatization techniques were applied, using the reaction of gabapentin with derivatization reagents: the reaction of gabapentin with *p*-benzoquinone (analyzed at 350 nm), vanillin (analyzed at 392 nm) and hypochlorite (maximum absorption at 588 nm). The reaction of gabapentin with 4-chloro-7-nitrobenzo-2-oxo-1,3-diazole (NBD-Cl) was used on its fluorimetric determination, since the molecule doesn't present fluorescence by itself. The derivatization's product was analyzed at 464 nm for excitation and 542 nm for emission. NaOH and HCl titration were the two volumetric methods used on the determination of gabapentin in capsules.

The volumetric methods obtained satisfactory recoveries values for gabapentin capsules, between 94,95 e 106,71 %. The spectroscopic methods present different linearity, the Hypochlorite method showed the largest dynamic range (14,85) and it was linear over the concentration range 2,50 e 73,68 ppm. Method's sensibilities were evaluated based on calibration curve's slope and NBD-Cl method obtained the largest sensibility, with a slope of $1,779 \pm 0,040 \text{ ppm}^{-1}$. Spectroscopic methods obtained

Comparação de métodos analíticos na quantificação do teor de Gabapentina em diversas cápsulas de diversos laboratórios

recoveries for gabapentin capsules between $97,9 \pm 2,1$ e $101,5 \pm 1,1$ % and the closest to the reference value was obtained for NBD-Cl method, $100,0 \pm 1,1$ %.

Key- Words

Gabapentin, quantification, analytical methods, capsules, comparison, derivatization.

Índice

Índice figuras	X
Índice de quadros	XIV
Lista de abreviaturas	XVII
1. Introdução.....	1
1.1. Contextualização da epilepsia.....	1
1.2. Mecanismo patológico da epilepsia	2
1.3. Classificação da epilepsia.....	2
1.4. Fármacos Antiepiléticos	3
2. Gabapentina	5
2.1. Farmacodinâmica e Mecanismo de ação	5
2.2. Farmacocinética	6
2.2.1. Absorção e Distribuição	7
2.2.2. Metabolismo e Eliminação	7
2.3. Reações adversas e Interações da Gabapentina	8
2.4. Regime posológico.....	10
2.5. Propriedades químicas da gabapentina.....	11
3. Avaliação de um método analítico	12
3.1. Definições e objetivos da validação analítica	13
3.2. Parâmetros de avaliação de métodos de análise.....	14
3.2.1. Sensibilidade e Especificidade/Seletividade.....	14
3.2.2. Linearidade/Gama de trabalho.....	15
3.2.3. Robustez e Estabilidade	16
3.2.4. Limites de detecção e quantificação	16
3.2.5. Exatidão.....	17
3.2.6. Precisão	19

Comparação de métodos analíticos na quantificação do teor de Gabapentina em diversas cápsulas de diversos laboratórios

4. Desenvolvimento dos métodos	20
4.1. Material	20
4.2. Equipamento.....	20
4.3. Reagentes	20
4.4. Amostras.....	21
4.5. Protocolos experimentais	21
4.6. Tratamento estatístico dos dados	22
5. Métodos volumétricos de análise.....	23
5.1. Titulação com NaOH	25
5.2. Titulação com HCl.....	29
5.3. Curva de titulação teórica.....	32
6. Métodos espectroscópicos de análise.....	34
6.1. Métodos sem derivatização da gabapentina	35
6.1.1. Método Direto.....	35
6.1.2. Método Etanol/Água	45
6.1.3. Método HCl 0,1 M.....	48
6.2. Métodos com derivatização da gabapentina	51
6.2.1. Método <i>p</i> -benzoquinona.....	53
6.2.2. Método Vanilina	55
6.2.3. Método Hipoclorito.....	63
7. Métodos espectralfluorimétricos de análise	71
7.1. Método NBD-Cl	71
8. Comparação dos Métodos Efetuados	80
8.1. Comparação dos Parâmetros da Reta dos Métodos	80
8.2. Comparação da Precisão e Exatidão dos Métodos.....	82
8.3. Comparação da aplicabilidade dos métodos às cápsulas.....	84
8.4. Comparação dos teores de gabapentina por método	85
8.5. Comparação dos Custos associados aos métodos	89

Comparação de métodos analíticos na quantificação do teor de Gabapentina em diversas cápsulas de diversos laboratórios

8.6. Métodos de referência Vs métodos desenvolvidos.....	92
8.7. Comparação com outros estudos descritos	93
9. Conclusão.....	95
10. Bibliografia.....	98

Índice de figuras

Figura 2.1- Estrutura química da gabapentina	12
Figura 3.1- Figura ilustrativa dos parâmetros da reta.....	16
Figura 5.1- Curvas de titulação da cápsula Gabamox [®] com NaOH 0,09619 M e respectivos gráficos da segunda derivada.....	25
Figura 5.2- Curvas de titulação da cápsula Neurotin [®] com NaOH 0,09619 M e respectivos gráficos da segunda derivada.....	26
Figura 5.3- Curvas de titulação da cápsula Ratiopharm com NaOH 0,09619 M e respectivos gráficos da segunda derivada.....	26
Figura 5.4- Curvas de titulação da cápsula Teva com NaOH 0,09619 M e respectivos gráficos da segunda derivada	26
Figura 5.5- Curvas de titulação da cápsula Generis com NaOH 0,09619 M e respectivos gráficos da segunda derivada	26
Figura 5.6- Curvas de titulação da cápsula Gabamox [®] com HCl 0,10056 Me respectivos gráficos da segunda derivada	29
Figura 5.7- Curvas de titulação da cápsula Neurotin [®] com HCl 0,10056 Me respectivos gráficos da segunda derivada	30
Figura 5.8- Curvas de titulação da cápsula Ratiophamr com HCl 0,10056 Me respectivos gráficos da segunda derivada	30
Figura 5.9- Curvas de titulação da cápsula Teva com HCl 0,10056 Me respectivos gráficos da segunda derivada	30
Figura 5.10- Curvas de titulação da cápsula Generis com HCl 0,10056 Me respectivos gráficos da segunda derivada	30
Figura 5.11- Curva teórica de titulação da solução de uma cápsula de gabapentina com NaOH e HCl.....	33
Figura 5.12- Diagrama de frações molar teórico da titulação da solução de gabapentina	34
Figura 6.1- Espetro de uma solução aquosa de gabapentina de concentração $64,1 \pm 1,1$ ppm	36

Comparação de métodos analíticos na quantificação do teor de Gabapentina em diversas cápsulas de diversos laboratórios

Figura 6.2- (A) -Curva de calibração de gabapentina em solução aquosa correspondente à absorvência a 192 nm; (B)- Evolução dos residuais em função da concentração de gabapentina para o método Direto	36
Figura 6.3- (A) - Reta de calibração da gabapentina em solução aquosa a 192 nm; (B) - Residuais do método Direto após remoção do outlier.....	38
Figura 6.4- Evolução da absorvência dos padrões ao longo do tempo: (A) - Padrões 2, 4, 6, 8 e 10, de concentrações $14,24 \pm 0,44$, $28,48 \pm 0,60$, $42,72 \pm 0,73$, $56,97 \pm 0,97$ e $71,2 \pm 1,3$ ppm; (B) – Padrão 11, de concentração $142,4 \pm 1,7$ ppm	39
Figura 6.5- Evolução da reta de calibração durante 120 horas de análise para o método Direto	40
Figura 6.6- Relação entre a concentração de gabapentina recuperada e fortificada para o método Direto	43
Figura 6.7- Declive método reta de calibração e adição de padrão pelo método Direto	44
Figura 6.8- Espectro de absorção de uma solução padrão de concentração $483,0 \pm 5,1$ ppm de gabapentina para o método Etanol/Água.....	46
Figura 6.9- (A) - Curva de calibração de gabapentina em solução alcoólica a absorvência a 194 nm; (B) - Evolução dos residuais em função da concentração de gabapentina	46
Figura 6.10- (A) - Reta de calibração para o método Etanol/Água a 194 nm; (B) - Residuais do método Etanol/Água após a remoção do outlier	47
Figura 6.11- Espectro solução de $487,0 \pm 5,2$ ppm de gabapentina em HCl 0,1 M.....	49
Figura 6.12- (A) -Curva de calibração da solução ácida de gabapentina a 206 nm; (B) - Evolução dos residuais em função da concentração de gabapentina	49
Figura 6.13- (A) Reta de calibração para o método HCl 0,1 M a 206 nm; (B) - Residuais para o método HCl 0,1 M após a remoção do outlier	50
Figura 6.14- Reação da <i>p</i> -benzoquinona com a gabapentina	53
Figura 6.15- Espectro de absorção de uma solução com o produto da derivatização de gabapentina com <i>p</i> -benzoquinona de concentração $217,3 \pm 2,0$ ppm	54
Figura 6.16- (A) -Curva de calibração do método <i>p</i> -benzoquinona a 350 nm; (B) - Evolução dos residuais em função da concentração de gabapentina	54
Figura 6.17- (A) Reta de calibração do método <i>p</i> -benzoquinona a absorvência a 350 nm; (B) - Residuais do método <i>p</i> -benzoquinona após remoção dos outliers.....	55

Comparação de métodos analíticos na quantificação do teor de Gabapentina em diversas cápsulas de diversos laboratórios

Figura 6.18- Reação da Vanilina com a gabapentina.....	56
Figura 6.19- Espectro de absorção de uma solução padrão do método Vanilina de concentração $712,1 \pm 7,6$ ppm de gabapentina.....	57
Figura 6.20- (A) -Curva de calibração do método Vanilina a 392 nm; (B) - Evolução dos residuais em função da concentração de gabapentina.....	57
Figura 6.21- (A) Reta de calibração do método Vanilina a 392 nm; (B) - Residuais do método Vanilina após remoção dos outliers	58
Figura 6.22- Evolução da absorvência dos padrões ao longo do tempo: (A) - Padrões 2, 4, 6 e 8, de concentrações $47,5 \pm 1,5$, $94,9 \pm 2,0$, $142,4 \pm 3,9$ e $189,9 \pm 3,9$ ppm; (B) - Padrão 11, de concentração $356,0 \pm 4,3$ ppm.....	59
Figura 6.23- Evolução das retas de calibração ao longo do tempo para o método Vanilina	60
Figura 6.24- Relação entre a concentração de gabapentina recuperada e fortificada para o método Vanilina	62
Figura 6.25- Reação do reagente de Hipoclorito com gabapentina	64
Figura 6.26- Espectro de absorção de uma solução padrão do método Hipoclorito de concentração de gabapentina de concentração $49,12 \pm 0,54$ ppm.....	65
Figura 6.27- (A) - Curva de calibração correspondente ao método Hipoclorito a 588 nm; (B) – Evolução dos residuais em função da concentração de gabapentina	65
Figura 6.28- (A) - Reta de calibração do método Hipoclorito a 588 nm; (B) - Residuais do método Hipoclorito após remoção do outlier.	66
Figura 6.29- Evolução da absorvência dos padrões ao longo do tempo: (A) - Padrões 2, 4, 6 e 8, de concentração $3,07 \pm 0,11$, $9,82 \pm 0,21$, $24,56 \pm 0,31$ e $49,12 \pm 0,54$ ppm; (B) - Padrão 9, de concentração $73,68 \pm 0,81$ ppm.....	67
Figura 6.30- Evolução das retas de calibração ao longo do tempo para o método Hipoclorito...	68
Figura 6.31- Relação entre a concentração de gabapentina recuperada e fortificada para o método Hipoclorito	70
Figura 7.1- Reação da gabapentina com o reagente NBD-Cl.....	72
Figura 7.2- Espectro de emissão de uma solução padrão $11,05 \pm 0,22$ ppm de gabapentina pelo método NBD-Cl.....	72

Comparação de métodos analíticos na quantificação do teor de Gabapentina em diversas cápsulas de diversos laboratórios

Figura 7.3- (A) - Curva de calibração correspondente a Intensidade de Fluorescência em função da concentração de gabapentina pelo método NBD-Cl; (B) - Evolução dos residuais em função da concentração de gabapentina	73
Figura 7.4- (A) - Reta de calibração obtida para o método NBD-Cl; (B) - Residuais do método NBD-Cl após remoção dos outliers	74
Figura 7.5- Evolução da intensidade de fluorescência dos padrões ao longo do tempo: (A) – Padrões 2, 4, 6 e 8, de concentrações $2,45_6 \pm 0,07_6$, $4,91 \pm 0,11$, $7,37 \pm 0,21$ e $19,6_5 \pm 0,4_1$ ppm; (B) Padrão 10, de concentração $49,1_2 \pm 0,5_3$ ppm.....	75
Figura 7.6- Evolução da reta de calibração no primeiro e último dia de análise para o método NBD-Cl	76
Figura 7.7- Relação entre a concentração de gabapentina recuperada e fortificada para o método NBD-Cl	78
Figura 7.8- Declive da reta pelo método reta de calibração e adição de padrão pelo método NBD-Cl	79
Figura 8.1- Representação gráfica médias das recuperações e correspondente desvio-padrão ...	83
Figura 8.2- Representação gráfica dos teores médios obtidos por método e correspondente desvio-padrão	86
Figura 8.2- Representação gráfica dos teores médios obtidos por cápsula e correspondente desvio-padrão	86

Índice de tabelas

Tabela 1.1 - Classificação tipos de crises epiléticas	3
Tabela 2.1 - Resumo das propriedades farmacocinéticas da Gabapentina	8
Tabela 2.2 - Reações adversas da Gabapentina	9
Tabela 2.3 - Ajuste terapêutico da dose de gabapentina a doentes com função renal comprometida	11
Tabela 2.4 - Propriedades físico-químicas da gabapentina	12
Tabela 3.1 - Limites de aceitação das recuperações de acordo com a concentração de analíto .	19
Tabela 3.2 - Limites de aceitação dos coeficientes de variação de acordo com a concentração de analíto.....	20
Tabela 5.1 - Volume NaOH gasto até ao ponto de equivalência, concentração de gabapentina na amostra, teor de gabapentina por cápsula, coeficiente de variação e erro relativo	28
Tabela 5.2-Recuperações obtidas para as diferentes cápsulas, valores críticos e tabelados de <i>t-student</i> e <i>Fisher</i> para o método titulação NaOH 0,1M	29
Tabela 5.3-Volume HCl gasto até ao ponto de equivalência, concentração de gabapentina na amostra, teor de gabapentina por cápsula, coeficiente de variação e erro relativo	32
Tabela 5.4 – Recuperações obtidas para as diferentes cápsulas, valores críticos e tabelados de <i>t-student</i> e <i>Fisher</i> para o método titulação HCl 0,1 M	33
Tabela 6.1 – Parâmetros da reta para o método Direto	39
Tabela 6.2 – Variação da equação da reta de calibração ao longo do tempo para o método Direto	41
Tabela 6.3 – Coeficiente de variação e erro relativo do método Direto para análises efetuadas no mesmo dia e em dias alternados.....	43
Tabela 6.4 – Média dos ensaios de recuperação do método Direto	44
Tabela 6.5 – Recuperações obtidas para as diferentes cápsulas para o método Direto.	46
Tabela 6.6 – Parâmetros da reta para o método Etanol/Água (1:1).	48
Tabela 6.7 – Parâmetros da reta para o método HCl 0,1 M	51
Tabela 6.8– Reagentes de derivatização para os diferentes grupos funcionais	53

Comparação de métodos analíticos na quantificação do teor de Gabapentina em diversas cápsulas de diversos laboratórios

Tabela 6.9 – Parâmetros da reta para o método <i>p</i> -benzoquinona	56
Tabela 6.10 – Parâmetros da reta para o método Vanilina	59
Tabela 6.11- Variação da equação da reta ao longo do tempo para o método Vanilina	61
Tabela 6.12 – Coeficientes de variação e erro relativo obtidos para o método Vanilina para análises efetuadas no mesmo dia e em dias alternados	62
Tabela 6.13- Média dos ensaios de recuperação para o método Vanilina.....	63
Tabela 6.14– Recuperações obtidas para as diferentes cápsulas pelo método Vanilina	64
Tabela 6.15– Parâmetros da reta para o método Hipoclorito	67
Tabela 6.16– Variação da equação da reta ao longo do tempo para o método Hipoclorito	69
Tabela 6.17– Coeficientes de variação e erro relativo para o método Hipoclorito para análises efetuadas no mesmo dia e em dias alternados	70
Tabela 6.18– Média dos ensaios de recuperação para o método Hipoclorito.....	71
Tabela 6.19 – Recuperações obtidas para as diferentes cápsulas para o método Hipoclorito	72
Tabela 7.1 – Parâmetros da reta para o método NBD-Cl.....	75
Tabela 7.2 – Variação da equação da reta ao longo do tempo para o método NBD-Cl.....	77
Tabela 7.3 – Coeficiente de variação e erro relativo do método NBD-Cl para análises efetuadas no mesmo dia e em dias alternados.....	78
Tabela 7.4 – Média de recuperações obtidas para os diferentes métodos	79
Tabela 7.5 – Recuperações obtidas para as diferentes cápsulas para o método NBD-Cl.....	80
Tabela 8.1 – Parâmetros da reta dos métodos de análise efetuados	82
Tabela 8.2 – Coeficientes de variação erro relativo obtido em análises efetuadas no mesmo dia e em dias alternados para os métodos efetuados	83
Tabela 8.3 – Resumo dos ensaios de recuperação para os diferentes métodos.	84
Tabela 8.4 – Médias das recuperações obtidas para as diferentes cápsulas e métodos	85
Tabela 8.5 – Teste- <i>t</i> e teste- <i>F</i> , usando os diferentes métodos experimentais como métodos de referência.....	89
Tabela 8.6 – Análise de custos dos métodos efetuados experimentalmente	91
Tabela 8.7 – Comparação entre métodos de referência e métodos elaborados	93

Comparação de métodos analíticos na quantificação do teor de Gabapentina em diversas cápsulas de diversos laboratórios

Tabela 8.8 – Métodos alternativos de quantificação de gabapentina em cápsulas e seus parâmetros94

Lista de abreviaturas

A ⁻	Forma mais desprotonada da gabapentina
AMPA	Ácido α -amo-3hidroxi-5 metil-4-isoxazol propiónico
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
Apogen	Associação Portuguesa de Medicamentos Genéricos
AUC	Área sob a curva
BF ₃	Trifluoreto de boro
BSA	Bis(trimetilsilil) acetamida
BSTFA	Bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida
CCDV	Canais de cálcio sensíveis à voltagem
CEN	Comité Europeu de Normalização
CH	2,3,5,6-tetracloro-1,4-benzoquinona
CH ₃ CO ₂ (O)	Ácido acético anidro
DDQ	2,3-dicloro-5,6-diciano-1,4-benzoquinona
DHBA	2,5-dihidroxibenzaldeído
DMF	N,N-dimetilformamido
2,4-DNP	2,4-dinitrofenol
EEG	Encefalograma
EN	Norma Europeia
FDA	Food And Drug Administration
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GBP	Gabapentina
GD	Gama dinâmica
HA	Forma neutra da gabapentina
HCl	Ácido clorídrico
HClO ₄	Ácido perclórico
HFBI	Heptafluorobutiril imidazol
HMDS	Hexametildisilazano
HPLC	High performance liquid chromatography
H ₂ A ⁺	Forma mais protonada da gabapentina
ICH	International Conference on Harmonisation
IEC	International Electrotechnical Commission

Comparação de métodos analíticos na quantificação do teor de Gabapentina em diversas cápsulas de diversos laboratórios

IF	Intensidade de fluorescência
ILAE	International League Against Epilepsy
IPQ	Instituto Português da Qualidade
ISO	International Organization for Standardization
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
LAT	Sistema transportador L-aminoácido
LD _{Sb}	Limite de deteção sinal dos brancos fortificados
LD _{Sr}	Limite de deteção pelo sinal do instrumento
LL	Limite de linearidade
LQ _{Sb}	Limite de quantificação sinal dos brancos fortificados
LQ _{Sr}	Limite de quantificação sinal do instrumento
MBTFA	N-Metil-bis(trifluoro acetamida)
mGluR1	Recetor 1 metabotrópico do glutamato
mGluR5	Recetor 5 metabotrópico do glutamato
MRC	Material de referência certificado
MSTFA	N-metil-trimetilsilil trifluoroacetamida
MTBSTFA	N-metil-N-butil dimetilsilil trifluoroacetamida
NaOH	Hidróxido de sódio
NBD-Cl	4-cloro-7-nitrobenzofurazano
NBD-F	4-fluoro-7-nitrobenzofurazano
nm	Nanómetros
NMDA	Recetores N-Metil-D-Aspartato
NP	Norma Portuguesa
NQS	1,2-naftoquinona-4-sulfonato
N ₂ CH ₂	Diazometano
OPA	<i>o</i> -ftalaldeído
PA	2,4,6-trinitrofenol
PBQ	<i>p</i> -benzoquinona
PFAA	Anidrido ácido pentafluoro propiónico
PFBBr	Brometo de pentafluoro benzil
PFPI	Pentafluoro propani limidazole
PFPOH	Pentafluoropropanol
RE	Erro relativo

Comparação de métodos analíticos na quantificação do teor de Gabapentina em diversas cápsulas de diversos laboratórios

RSD	Coeficiente de variação
RSD _H	Coeficiente de variação de Horwitz
SD	Desvio padrão
TBH	Hidróxido de tetrabutílamônio
TCNE	Tetracianoetileno
TCNQ	7,7,8,8-tetracianoquinodimetano
TFAA	Anidrido trifluoro acético
TFAI	Trifluoro acetil imidazole
TMCS	Trimetil clorosilano
TMSI	Trimetilsilil imidazol
T _{1/2}	Tempo de semi-vida
USP	Us Pharmacopeia
Uv-Vis	Ultravioleta-Visível

1 Introdução

O objetivo deste trabalho de investigação foi a avaliação e comparação de métodos analíticos no doseamento de um fármaco antiepilético, a gabapentina, em cápsulas. Para tal foram usadas como amostras cápsulas de gabapentina de cinco laboratórios, Neurotin[®], Gabamox[®], Ratiopharm, Teva e Generis. As técnicas analíticas utilizadas para comparação foram a volumetria de neutralização, a espectroscopia de absorção Uv-Vis e a fluorescência.

Para a técnica volumétrica foram efetuadas titulações das soluções de amostra de gabapentina com NaOH e HCl 0,1 M. Dentro dos métodos espectroscópicos foram aplicados métodos por análise direta da gabapentina usando diversos solventes, água (Método Direto), solução alcoólica (Método Etanol/Água) e solução ácida (Método HCl 0,1 M) e métodos por métodos de derivatização da gabapentina com *p*-benzoquinona, Vanilina, Hipoclorito e NBD-Cl.

A comparação dos métodos foi feita tendo em conta não só os vários parâmetros de desempenho dos mesmos (limites de deteção e quantificação, sensibilidade, gama linear, precisão, recuperação, entre outros), mas também a o teor de gabapentina obtido para as diferentes cápsulas e a economia dos métodos. Esta comparação foi efetuada entre os métodos desenvolvidos na presente monografia e entre mesmos e os respetivos métodos de referência Foi também efetuada uma pequena comparação entre os métodos analisados e outros métodos distintos utilizados no doseamento da gabapentina.

1.1 CONTEXTUALIZAÇÃO DA EPILEPSIA

A epilepsia é uma doença crónica caracterizada pela presença de crises epiléticas recorrentes resultantes de uma atividade anormal e excessiva dos neurónios. Trata-se de um transtorno neurológico caracterizado por crises de descargas neuronais periódicas que afeta cerca de 50 milhões de pessoas a nível mundial. Este termo engloba todo o conjunto de transtornos do foro neurológico que se caracterizam por episódios súbitos e transitórios de fenómenos anormais de origem motora, sensorial, autónoma e psíquica.¹

As crises epiléticas estão sempre associadas a descargas anormais e excessivas de neurotransmissores a nível cerebral. Estas podem ser facilmente detetadas e

registadas por eletroencefalograma (EEG), sendo que essa hiperatividade neuronal de duração variável pode estar circunscrita a uma determinada área cerebral ou então propagar-se e estender-se pelas áreas vizinhas.¹

1.2 MECANISMO PATOLÓGICO DA EPILEPSIA

O controlo do potencial de membrana está intimamente associado a homeostasia de iões de sódio e potássio a nível neuronal. Em condições normais a concentração destes iões é controlada pela bomba Na^+/K^+ . A normal polarização da célula é assegurada pela concentração dos iões K^+ no meio intracelular e pela concentração de Na^+ no meio extracelular.² Quando a permeabilidade destes iões na célula neural é afetada podem ocorrer fenómenos de despolarização ou repolarização celular, promovendo uma crise epilética.² Caso ocorra um estímulo a nível do sistema nervoso central ocorre a despolarização, isto é, ocorre a alteração da permeabilidade da célula ao ião Na^+ . Este ião entra na célula tornando o seu interior mais positivo, impulsionando a abertura dos canais de K^+ e a repolarização da membrana. Caso ocorra a entrada dos iões de K^+ de forma abrupta existe a hiperpolarização celular.² Uma crise epilética ocorre então quando um destes mecanismos é despoletado, sendo responsáveis pela inibição dos recetores ácido gama-aminobutírico (GABA), ativação dos recetores N-Metil-D-Aspartato (NMDA) e a libertação de neuromoduladores, que potenciam o estado de excitação celular.³ A despolarização sem razão externa pode também influenciar as crises, resultando na libertação de acetilcolina, verificando-se a diminuição dos níveis de K^+ e Ca^{2+} . Se a hiperpolarização não ocorrer, ocorre uma crise epilética, quer por inibição dos canais de Ca^{2+} ou Na^+ ou pela ativação dos canais NMDA. Assim, a hiperpolarização acaba por ser o processo chave, uma vez que finaliza a excitação da célula. O controlo desta fase está dependente da abertura prolongada dos canais de K^+ , da ativação dos recetores GABA, da libertação de neurotransmissores que estão associados aos canais de Cl^- , entre outros fatores.^{2,3}

1.3 CLASSIFICAÇÃO DA EPILEPSIA

De acordo com o padrão de classificação oficial da *International League Against Epilepsy* (ILAE) as crises epiléticas podem ser organizadas em três grupos diferentes, de acordo com manifestações clínicas, perfil encefalográfico, podendo ser classificadas em parciais, generalizadas e não classificadas.⁴

As crises parciais são caracterizadas por episódios que se originam num local concreto e restrito do cérebro, num determinado hemisfério, sem que ocorra propagação para outros locais do cérebro. Este tipo de crise divide-se em duas classes distintas: as simples, caracterizadas por não se observar perda de consciência e as complexas onde ocorrem perdas de consciência, mesmo que instantâneas.⁴ As crises generalizadas, por sua vez, são caracterizadas pela ativação neural em ambos os hemisférios do cérebro de forma generalizada ou difusa, podendo ser convulsivas (tónico-clónicas ou mioclónicas) ou não convulsivas (ausências). As crises epiléticas são qualificadas como não classificadas quando as características das crises dão insuficiente informação para determinar o tipo de crise.⁴ Na **Tabela 1.1** está resumida a informação acerca da classificação das crises de epilepsia por parte da ILAE.

Tabela 1.1- Classificação tipos de crises epiléticas (de acordo com ILAE)⁴

1. Crises Parciais	1.1 Crises parciais simples
	1.2 Crises parciais complexas com diminuição do nível de consciência Parciais simples, seguidas de parciais complexas Parciais complexas desde o início
	1.3 Crises parciais complexas que evoluem para crises generalizadas secundárias
2. Crises Generalizadas	2.1. Não convulsivas Ausências Crises atónicas
	2.2. Convulsivas Crises generalizadas tónico-clónicas Crises tónicas Crises mioclónicas

No final dos anos oitenta foi introduzido um novo esquema de classificação das crises epiléticas que englobava também síndromes epiléticas e distúrbios relacionados.⁴ Nesta nova classificação são considerados fatores como os resultados do eletroencefalograma, sinais e sintomas, mecanismos fisiopatológicos e etiológicos, evolução clínica, bem como a data de início de sintomas.^{4,5} Assim, a nova classificação por parte de ILAE, divide as crises em idiopáticas, sintomáticas e criptogénicas, significando no caso da primeira que contém com uma etiologia genética, no caso da segunda que a etiologia seja conhecida como uma lesão cerebral, e no caso da terceira quando a etiologia é desconhecida mas é sintomática.^{4,5}

1.4 FÁRMACOS ANTIEPILEPTICOS

O principal objetivo no tratamento da epilepsia é o controlo do número e severidade das crises, favorecendo a qualidade de vida do paciente sem induzir

toxicidade e interferir com a sua função cognitiva, minimizando os efeitos adversos associados à medicação, muitas vezes crônica. O maior desafio na terapêutica da epilepsia é assegurar um balanço positivo entre a eficácia e tolerabilidade.⁶ Para que isto aconteça com sucesso, a identificação do tipo de crise é essencial. O controlo das crises epiléticas faz-se com recurso a medicação antiepilética, sendo que cerca de 30 % das crises, mesmo quando o paciente é tratado em terapia múltipla, são ineficazes nesse controlo e provocam um vasto leque de efeitos adversos.⁶

Uma vez que as crises epiléticas ocorrem devido à inibição dos canais de Ca^{2+} ou Na^+ dependentes de voltagem ou mesmo pela ativação dos canais NMDA, o mecanismo de ação dos fármacos antiepiléticos vai estar relacionado com a modelação destes canais iónicos, responsáveis por reduzir a excitabilidade das membranas celulares e consequentemente as descargas epiléticas, sincronização e propagação das crises.⁶ O seu mecanismo de ação pode também estar relacionado com o controle dos sistemas de excitação sináptica, o bloqueio de recetores de excitatórios de glutamato, tanto ionotrópicos (tipo NMDA, AMPA e cainato) como metabotrópicos (tipo mGluR1 e mGluR5) ou pode estar relacionado com a ativação dos sistemas de inibição sináptica, aumentando a concentração de neurotransmissores inibitórios como a glicina, adenosina, GABA e neuropéptidos (peptídeos opióides, galanina).⁶

Podem-se considerar duas gerações de fármacos usados na prevenção de crises epiléticas; os fármacos de primeira geração correspondem à terapêutica clássica e convencional da epilepsia entre os quais se distingue a carbamazepina, fenitoína, ácido valpróico, primidona, entre outros e os de segunda geração, que surgiram na tentativa de substituição dos fármacos de primeira geração, devido a problemas relacionados com o controlo das crises epiléticas, tolerabilidade, interações medicamentosas, efeitos secundários. Assim surgiram novos fármacos no controlo de crises epiléticas, designadamente a vigabatrina, gabapentina, lamotrigina, oxcarbazepina, topiramato, felbamato.^{6,7} Estes novos fármacos demonstram na sua maioria metabolismo não oxidativo, pelo que a nível de interações medicamentosas estes fármacos constituem uma grande mais-valia. A maioria destes fármacos possui a sua atividade antiepilética através do controlo dos canais de Na^+ , Ca^{2+} , ativação dos recetores GABA e inibição de aminoácidos excitatórios, tal como o glutamato.⁶

A gabapentina tem como mecanismo de ação a modelação dos canais iónicos dependentes de voltagem, ou seja, restringe-se principalmente ao controlo dos canais de

cálcio e ativação dos recetores GABA como vai ser explicado de seguida nesta monografia.^{6,7}

2 Gabapentina

A gabapentina foi descoberta há cerca de 40 anos no Japão, categorizada inicialmente como fármaco antiespasmódico e relaxante muscular. O fármaco foi posteriormente vendido à Parke-Davis, parte integrante da empresa farmacêutica Pfizer, que descobriu as suas capacidades farmacológicas na terapêutica da epilepsia e que detém atualmente a patente do Neurotin[®].⁸ Em Dezembro de 1993 a gabapentina foi aprovada pela *Food and Drug Administration*, FDA, como medicação adjuvante para o controlo de crises epiléticas e comercializado para esse mesmo fim em Fevereiro de 1994. Apenas em Maio de 2002 a FDA aprovou a gabapentina para o tratamento da dor neuropática. Este fármaco sintetizado pela primeira vez em 1977 por Gerhardt Satzinger Manfred, um químico que é parte integrante da companhia farmacêutica Alemã Göedecke AG.^{8,9}

A gabapentina surgiu na tentativa de desenhar um fármaco que mimetizasse a ação do neurotransmissor ácido γ -aminobutírico que inibisse a sua degradação no cérebro e mostrasse igualmente capacidade de penetrar a barreira hematoencefálica. Muitas das moléculas sintetizadas posteriormente como agonistas dos recetores GABA mostraram-se inativas, tendo-se demonstrado por *ligand-binding assay* que não havia ligação entre o fármaco e os recetores.^{8,9}

2.1 FARMACODINÂMICA E MECANISMO DE AÇÃO

A farmacodinâmica é o estudo dos efeitos bioquímicos e fisiológicos dos fármacos e dos seus mecanismos de ação, relacionando a concentração do fármaco no local de ação e a extensão dos seus efeitos.¹⁰

A gabapentina é atualmente classificada como um fármaco anti convulsionante e o seu mecanismo de ação não se encontra completamente descrito, sendo por isso alvo de bastantes estudos de com o intuito de se entender melhor a sua forma de atuação. Sabe-se contudo que a sua estrutura é análoga à do neurotransmissor GABA (ácido γ -aminobutírico). As suas indicações terapêuticas incluem o tratamento da epilepsia e alívio da dor neuropática periférica (dor provocada por lesões nos nervos).^{7,10}

Apesar do seu mecanismo de ação não estar completamente elucidado, existem várias hipóteses para o mesmo. Alguns trabalhos apontam para que o seu mecanismo pode estar relacionado com a inibição irreversível da enzima GABA-transaminase que é responsável pela diminuição da degradação do neurotransmissor GABA na fenda sináptica. Contudo é conhecido que a sua ação não é devida à ligação aos recetores GABA_A, GABA_B, glutamato, glicina ou benzodiazepínicos nem afeta o metabolismo e recaptação endógena de GABA, portanto a sua ação não é bloqueada por antagonistas destes recetores. Sabe-se também que não altera a recaptação de neurotransmissores como a dopamina, noradrenalina ou serotonina. Estudos demonstram contudo que o local de ligação da gabapentina ocorre a nível do neocórtex e hipocampo cerebral.⁷ É no entanto conhecido que a sua ação não é a nível do neurotransmissor GABA, mas sim a nível dos canais de cálcio sensíveis à voltagem (CCDV) do tipo T, sendo bastante específica e bloqueando-os, nomeadamente à sua subunidade $\alpha_2\delta$, inibindo assim a libertação de vários neurotransmissores responsáveis pela excitabilidade neuronal. Assim a gabapentina bloqueia a entrada de cálcio através dos CCDV pré-sinápticos, diminuindo os recetores AMPA e a libertação de noradrenalina, o que provoca a diminuição da libertação de glutamato.¹¹ Contudo, alguns autores consideram também que a gabapentina poderá ter o seu efeito a nível da inibição da libertação de neurotransmissores devido à redução parcial da resposta ao agonista do glutamato, especificamente os NMDA. A gabapentina parece ser transportada pelo sistema transportador L-aminoácidos, o mesmo responsável pelo transporte de aminoácidos como L-leucina, L-valine, L-isoleucina e L-fenilalamina. Sabe-se que este fármaco aumenta a concentração de ácido nípecótico, responsável pela inibição do transportador de GABA.^{11,12} A diminuição do glutamato libertado pelo cérebro após a administração de gabapentina contribui para o seu efeito anti convulsionante pela estimulação do ácido glutâmico desidrogenase e diminuição da síntese de glutamato pela amino-transferase de aminoácidos ramificados.^{11,12}

2.2 FARMACOCINÉTICA

A farmacocinética consiste no estudo de processos de absorção, distribuição, biotransformação (metabolismo) e excreção dos fármacos, relacionando a dose, intervalo posológico e via de administração com a concentração do mesmo.¹³

2.2.1 ABSORÇÃO E DISTRIBUIÇÃO

A absorção da gabapentina a nível do intestino dá-se através da família de transportadores sistema L-aminoácido (LAT), tal como a leucina, isoleucina, fenilalanina e valina. Alguns estudos indicam que a gabapentina é apenas transportada pela LAT1.¹⁰ A biodisponibilidade da gabapentina é inversamente proporcional à sua dose, pelo que quando a dose aumenta a biodisponibilidade do fármaco diminui. Isto é resultado do seu transporte se dar por parte do sistema LAT, verificando-se a possibilidade de saturação do transportador. Deste modo o aumento da dose não aumenta a sua biodisponibilidade.¹⁰ Assim, os seus parâmetros farmacocinéticos não são lineares, contrariamente aos parâmetros farmacocinéticos de eliminação, como o $T_{1/2}$ ou a clearance renal. A biodisponibilidade absoluta das cápsulas de gabapentina é cerca de 60 % para cápsulas de 300 mg e 40 % para cápsulas de 600 mg. Apesar dos alimentos não influenciarem a absorção de gabapentina, alguns estudos obtiveram resultados superiores de concentrações plasmáticas em indivíduos com dietas ricas em aminoácidos. A concentração sistémica máxima do fármaco é $2,7 \pm 2,99$ mg/L e é obtida 2 a 3 horas após a administração de 300 mg do fármaco.^{7,10}

A gabapentina não se liga extensamente a proteínas plasmáticas, menos de 3 %, tendo um volume de distribuição de 57,7 litros, ou 0,6-0,8 L/kg. Desta forma há maior concentração nos tecidos que no plasma, sendo por isso a concentração no líquido cefalorraquidiano cerca de 20 % da concentração plasmática.^{7,10}

2.2.2 METABOLISMO E ELIMINAÇÃO

A gabapentina não é metabolizada uma vez que a mesma não interage com enzimas microsomias oxidases hepáticas de função mista, responsáveis pelo metabolismo da maioria dos fármacos, opostamente a muitos outros fármacos antiepilépticos, o que diminui significativamente o número de interações medicamentosas deste fármaco.¹⁴

A gabapentina é excretada pela urina de forma inalterada. O tempo de semi-vida do fármaco é cerca de 5 a 9 horas. Certos autores consideram 5 a 7 horas e outros 7 a 9 horas. Em doentes idosos ou com insuficiência renal o tempo de meia vida do fármaco aumenta. A clearance renal de gabapentina está diretamente e linearmente relacionada com a clearance renal de creatinina e a filtração glomerular. Na **Tabela 2.1** está apresentado o resumo das propriedades farmacocinéticas da gabapentina.^{7,10}

Tabela 2.1- Resumo das propriedades farmacocinéticas da Gabapentina.¹⁴

Parâmetro Farmacocinético	Propriedades farmacocinéticas
Absorção	Biodisponibilidade dose dependente
	70% para doses ≤ 1800 mg/dia; 35% ≥ 3600 mg/dia
Distribuição	Tempo de concentração máxima 2-3 horas
	Sem ligação significativa a proteínas plasmáticas
	Volume de distribuição 0,65-1,04 L/Kg
Metabolismo	Coeficiente de partição cerebral 0,8
	Metabolismo desconhecido
Eliminação	Sem interações com enzimas hepáticas
	$T_{1/2}$ = 5-7 horas
Interações	Excretado inalterado na urina
	Antiácidos contendo alumínio e magnésio diminuem a absorção de gabapentina
	Cimetidina diminui a excreção
Janela terapêutica	Não foram detetadas interações com outros fármacos antiepiléticos ou mesmo contraceptivos orais
	2-20 $\mu\text{g/mL}$

2.3 REAÇÕES ADVERSAS E INTERAÇÕES DA GABAPENTINA

Os principais efeitos secundários resultantes da terapêutica com gabapentina são a sedação e ataxia verificados em menor escala que nos outros fármacos antiepiléticos.¹⁴ Contudo é capaz de provocar um leque de efeitos secundários menos frequentes razoavelmente elevado, nomeadamente tonturas, vertigens, descoordenação motora, movimentos irregulares, fadiga, febre, infeção viral, visão turva, dificuldade em respirar, bem como convulsões, perda de memória, cefaleias, alterações de humor, ansiedade, aumento do peso e diminuição dos glóbulos brancos.^{12,14} Menos frequentes mas com elevada incidência, infeções respiratórias, infeções do trato urinário e pneumonia podem também ocorrer durante a terapêutica com gabapentina. Na **Tabela 2.2** estão apresentadas as principais reações adversas inerentes ao uso de gabapentina.

Tabela 2.2- Reações adversas da Gabapentina.¹⁴

Reações Adversas		
Sistemas afetados	Muito frequentes	Frequentes
Infeções	Infeção vírica	Pneumonia, infecção respiratória e urinária
Doenças do sangue e sistema linfático		Leucopenia
Doenças do sistema imunitário		Alergia a algum dos componentes
Perturbações psicológicas		Depressão, ansiedade, nervosismo, confusão, hostilidade
Doenças do sistema nervoso	Ataxia, sonolência, tonturas	Convulsões, hipercinesia, disartria, amnésia, tremor, insónias, cefaleias
Afeções oculares		Ambliopia, diplopia
Afeções ouvido e labirinto		Vertigens
Doenças respiratórias		Dispneia, bronquite, faringite, tosse, rinite.
Vasculopatias		Hipertensão, vasodilatação
Doenças Gastrointestinais		Vômito, náuseas, anomalias dentárias, gengivite, diarreia, dor abdominal,
Doenças dos órgãos genitais		Dispepsia, obstipação, boca ou garganta seca, flatulência.
Perturbações gerais	Fadiga, febre	Edema periférico ou generalizado, alteração da marcha, astenia, dor, mal-estar geral, síndrome gripal.
Exames complementares de diagnóstico		Diminuição da contagem de glóbulos brancos, aumento de peso
Afeções músculo-esqueléticas e dos tecidos conjuntivos		Artralgia, mialgia, dor lombar, espasmos.

Como já foi mencionado, a gabapentina não é metabolizada e não interage com nenhuma enzima microsomal, pelo que influencia pouco o metabolismo de outros fármacos e como tal não se verificam interações devidas ao metabolismo hepático.¹² Contudo a sua fraca ligação a proteínas plasmáticas provoca interações provenientes da competição com outros fármacos mais lipofílicos pelos locais de ligação.¹⁴

A utilização concomitante de gabapentina e de outros fármacos antiepilépticos não se mostrou problemática, não afetando as concentrações plasmáticas de carbamazepina (ou o seu metabolito epóxido), fenobarbital, fenitoína ou mesmo do valproato.¹⁰ As principais interações da gabapentina foram verificadas após a sua administração concomitante com antiácidos, que contém na sua composição alumínio e magnésio. Estudos demonstraram que esta interação provoca a diminuição da biodisponibilidade da gabapentina em cerca de 24 %.¹⁴ Assim, esses fármacos não devem ser administrados concomitantemente e o espaçamento temporal entre a toma do antiácido e gabapentina deve ser no mínimo 2 horas, diminuindo a biodisponibilidade da gabapentina em apenas 10 %.¹⁴ A morfina interage com a gabapentina provocando o aumento da sua biodisponibilidade, sendo responsável por um aumento da área sob a curva, AUC, em 44 %.¹⁴ Analogamente à gabapentina, a morfina, agrupada no grupo farmacoterapêutico dos analgésicos, pode ser utilizada para atenuar a dor neuropática periférica. Assim, estes dois fármacos podem ser utilizados em associação de forma

sinérgica e benéfica, visando diminuir a dose de morfina.¹⁵ Anti-inflamatórios não esteroides, como o ibuprofeno e naproxeno, quando usados em concomitância com a gabapentina mostram efeito sinérgico, pelo que o seu uso sinérgico na monitorização da dor neuropática periférica pode ser feito através do ajuste de doses destes dois fármacos.¹⁷ A cimetidina, por diminuir a filtração glomerular, parece alterar o perfil de clearance de gabapentina, provocando a diminuição da excreção de gabapentina em 12%.¹⁴ Muitos estudos foram feitos para identificar possíveis interações com contraceptivos orais, pelo que a administração concomitante destes fármacos não foi conclusiva. Contudo certos estudos concluíram que pode provocar ineficácia da terapêutica anticoncepcional, pelo que o seu uso concomitante é desaconselhado.¹⁶ A administração de gabapentina não afeta a concentração plasmática de Li em pacientes com função renal normal, pelo que o seu efeito sinérgico pode ser aproveitada para o tratamento do distúrbio bipolar.¹⁸ A concentração sérica de gabapentina mostrou diminuição pela ingestão crónica de álcool mas não pela sua ingestão pontual. A sua administração concomitante mostrou reverter os efeitos de abstinência do etanol, revelando potencial no tratamento do alcoolismo crónico.¹⁹

2.4 REGIME POSOLÓGICO

O esquema posológico da gabapentina, para adolescentes com idade superior a 12 anos e adultos em monoterapia, é iniciado usualmente por 300 mg do fármaco no primeiro dia, 600 mg no segundo dia, repartido em duas doses de 300 mg e 900 mg no terceiro dia, repartidas em três doses.¹⁴

No tratamento da epilepsia, o intervalo posológico eficaz está compreendido entre 900 a 3600 mg de gabapentina por dia. O início da terapêutica pode ser iniciado como anteriormente indicado ou pela administração de 300 mg três vezes ao dia até uma dose máxima de 3600 mg, atingida após um prazo mínimo de três semanas de incremento da dose.¹⁴ Caso a dose terapêutica se situe nos 2400 mg o tempo de aumento de dose são duas semanas e uma semana caso se situe nos 1800 mg.¹⁴ Para crianças com idade inferior a 6 anos, o regime posológico altera-se bruscamente, sendo a dose inicial 10 a 15 mg/kg/dia sendo esta dose aumentada para 25 a 35 mg/kg/dia, durante três dias.¹⁴

Comparação de métodos analíticos na quantificação do teor de Gabapentina em diversas cápsulas de diversos laboratórios

No tratamento da dor neuropática periférica, em adultos e adolescentes com idade superior a 12 anos, a dose terapêutica é idêntica ser feito de forma idêntica à efetuada no caso do tratamento da epilepsia.¹⁴

Em idosos a terapêutica com gabapentina deve ser efetuada com cautela devido à diminuição da função renal. Deve haver um ajuste do regime posológico para doentes com comprometimento da função renal e/ou a fazer hemodiálise. Este ajuste será efetuado proporcionalmente ao tempo de depuração da creatinina. Se a clearance de creatinina for superior a 80 mL/min a dose de gabapentina não se altera, sendo recomendada a administração em 3 tomas repartidas de uma dose diária de 900-3600 mg. Para doentes insuficientes renais, com depuração de creatinina inferior a 79 mL/min, a dose de gabapentina altera-se de acordo com os valores indicados na **Tabela 2.3**.

Tabela 2.3- Ajuste terapêutico da dose de gabapentina a doentes com função renal comprometida (adaptado de Infarmed).¹⁴

Clearance de Creatinina (mL/min)	Dose diária total (mg/dia)
>80	900-3600
50-79	600-1800
30-49	300-900
15-29	150-300
<15	150-600

Para doentes renais que apresentem depuração de creatinina inferior a 15 mL/min deve-se ajustar o regime posológico a essa clearance de forma proporcional ao indicado. Os doentes com clearance entre 15 e 49 mL/min devem fazer em dias alternados 300 mg de gabapentina por dia. Para doentes a fazer hemodiálise a dose inicial de gabapentina deve ser 300 a 400 mg por dia sendo posteriormente ajustada para 200 a 300 mg por dia após cada 4 horas de hemodiálise, com interrupção do tratamento nos dias nos quais o doente não faz hemodiálise.¹⁴

A descontinuação da gabapentina deve ser gradual durante um período mínimo de uma semana.^{10,14}

2.5 PROPRIEDADES QUÍMICAS DA GABAPENTINA

Estruturalmente análoga ao neurotransmissor inibitório γ -aminobutírico (GABA), a gabapentina é uma molécula bastante solúvel tanto em água como em soluções ácidas e básicas, sendo um pó branco e cristalino, apresentando um ponto de fusão entre 162 e 167°C.²⁰ A sua fórmula molecular é C₉H₁₇NO₂, possuindo uma massa

Comparação de métodos analíticos na quantificação do teor de Gabapentina em diversas cápsulas de diversos laboratórios

molecular de 171,24 g/mol. Este fármaco é um ácido diprótico fraco e ao pH fisiológico tem carga elevada, existindo como zwitterião. Os seus valores de pK_a são 3,68 e 10,70, para os grupos funcionais ácido carboxílico e amina, respetivamente. Estudos indicam ser bastante estável em solução aquosa à temperatura ambiente. A gabapentina é também designada por [1-(aminometil)ciclohexano ácido acético] e a sua estrutura química está representada de seguida na **Figura 2.1**.²⁰

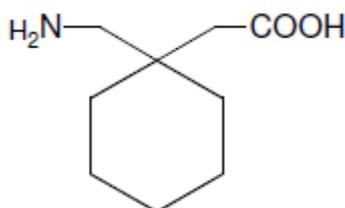


Figura 2.1- Estrutura química da gabapentina.²¹

O resumo das propriedades físico-químicas da gabapentina encontra-se apresentado de seguida, na **Tabela 2.4**.

Tabela 2.4- Propriedades físico-químicas da gabapentina.²⁰

Nome IUPAC	[1-(aminometil)ciclohexano ácido acético]
Fórmula química	$C_9H_{17}NO_2$
Massa molecular	171,24 g/mol
Grupo farmacoterapêutico	Antiepiléptico, anti-convulsionante, análogo do ácido γ -aminobutírico
pK_a	$pK_{a1}=3,68$; $pK_{a2}=10,70$
Coefficiente de partição	1,25
Solubilidade água	10 mg/mL

3 Avaliação de um método analítico

Atualmente a indústria farmacêutica tem a necessidade de ver todas as atividades a si inerentes normalizadas e regulamentadas de forma a uniformizar todos os procedimentos englobados no processo de produção de fármacos, através da elaboração de diretrizes, que visam a obtenção de um produto final eficaz, seguro e de qualidade. Para que estes requisitos sejam cumpridos, o controlo de qualidade torna-se imprescindível e visa a garantia da conformidade de um produto ou serviço de acordo com especificações estabelecidas. Essas diretrizes e especificações estão ao abrigo de várias entidades, como é o caso da *Organização Internacional de Normalização* (ISO), a nível internacional, o *Comité Europeu de Normalização* (CEN), a nível Europeu, e em

Portugal do *Instituto Português da Qualidade* (IPQ). Para que a garantia da qualidade seja cumprida, a validação de procedimentos analíticos torna-se um ponto-chave.^{22,23}

Na indústria farmacêutica a fiabilidade dos métodos analíticos mostra-se essencial, na medida em que existe a necessidade de avaliar a qualidade, segurança e eficácia dos fármacos. A garantia e controlo de qualidade são assegurados por uma entidade responsável que garante o cumprimento da legislação, com o objetivo de produzir produtos farmacêuticos de qualidade, assegurando-se que os fármacos não são lançados para venda até que a qualidade dos mesmos esteja garantida e verificada. Exemplos disso são a exigência de cumprimento das especificações das boas práticas de fabrico, como a necessidade de processos como calibrações e validações, entre muitos outros. Estes processos reduzem a quantidade de produtos fora das especificações e, aliado a isso verifica-se uma diminuição dos custos de produção.²² A validação de métodos analíticos é um procedimento fulcral na garantia da qualidade analítica, uma vez que é o conjunto de procedimentos que objetivam demonstrar que o método é adequado para a análise pretendida, que os parâmetros de desempenho do método atendem a critérios de aceitação predefinidos por instituições responsáveis.²³

O presente estudo não pretende de forma alguma a validação dos métodos de análise efetuados, mas sim a comparação dos mesmos, usando para isso as principais ferramentas e parâmetros avaliados na validação de métodos analíticos. Tal como descrito pela *United States Pharmacopeia*, USP XXIV, “os analistas não são obrigados a validar a sua metodologia analítica, devem verificar se ela é adequada às suas condições de uso. Porém, se não houver um método ou série de métodos devidamente adequados para a avaliação da qualidade dos produtos, o programa de validação terá valor limitado”.²⁴ A *International Conference on Harmonisation*, ICH, indica também que, para a determinação quantitativa de fármacos, não há a necessidade de avaliar todos os parâmetros de validação. No entanto, a escolha dos métodos deve-se basear na finalidade pretendida.²⁵ Não obstante, a ICH indica, opostamente, que todos os procedimentos analíticos não presentes em farmacopeias devem ser sujeitos a procedimentos de validação.²⁵

3.1 DEFINIÇÃO E OBJETIVOS DA VALIDAÇÃO ANALÍTICA

As normas NP EN ISO/IEC 17025 entendem a validação como a “confirmação através de exame e apresentação de evidência objetiva de que os requisitos específicos

para uma determinada utilização são cumpridos”.²⁶ Este termo está normalmente associado a procedimentos de verificação de aplicabilidade, confiabilidade, rastreabilidade e comparabilidade de métodos analíticos. A validação de um método analítico corresponde ao processo através do qual se pretende demonstrar que o mesmo é adequado para a análise pretendida e inclui a determinação e avaliação das características de desempenho de um método de análise, englobando, segundo a USP, a avaliação de um conjunto de parâmetros como a seletividade, gama de trabalho, limite de detecção e quantificação, linearidade, precisão, exatidão e robustez. De acordo com a ICH existe a necessidade de se avaliar a precisão intermédia separadamente da repetibilidade e segundo a FDA, a reprodutibilidade do método e estabilidade das soluções devem também ser avaliadas.^{25,27,28}

Existe uma vasta literatura e recomendações para a validação de métodos analíticos, publicadas por organizações internacionais como a *International Organization for Standardization (ISO)*, *Association of Official Analytical Chemists (AOAC)*, *International Conference on Harmonisation (ICH)* e *International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC)*, que publicam diretrizes para validação de métodos analíticos. O objetivo da validação de métodos é a demonstração que os mesmos satisfazem os critérios de aceitação fornecidos por estas entidades reguladoras.²³

3.2 PARÂMETROS DE AVALIAÇÃO DE MÉTODOS DE ANÁLISE

3.2.1 SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE/SELETIVIDADE

Sensibilidade de um método analítico é a capacidade que este tem de distinguir duas concentrações de analito muito próximas, com determinado nível de confiança, refletindo-se numa variação do sinal do instrumento causada por uma pequena variação na concentração de analito. No método da reta de calibração o declive dessa mesma curva corresponde à sensibilidade do método. Assim, quanto maior for a sensibilidade do método, mais facilmente se pode analisar duas soluções de concentração muito próximas e conseguir obter resultados distintos e rigorosos.^{25,29}

A especificidade, denominada de seletividade pela IUPAC é definida como a capacidade do método analisar especificamente o analito de interesse independentemente da complexidade da matriz, da presença ou ausência de outros interferentes, ou seja, é a capacidade do método detetar e diferenciar o analito na

presença de outras substâncias presentes na matriz.^{25,30} A razão entre os declives dos métodos da reta de calibração e adição de padrão é uma forma de avaliar a seletividade do método, devendo esta razão encontrar-se no intervalo 98-102 %, segundo a AOAC.³¹

3.2.2 LINEARIDADE/GAMA DE TRABALHO

A linearidade define-se como a capacidade de um método analítico obter sinais instrumentais diretamente proporcionais à concentração do analíto de interesse, dentro de uma gama definida, ou seja, é a gama na qual o sinal instrumental tem comportamento linear relativamente à concentração de analíto. A linearidade pode ser demonstrada pelo coeficiente de correlação da curva da reta de calibração, mas, de um modo mais rigoroso faz-se a análise dos residuais.^{25,29} Obtém-se linearidade satisfatória quando o coeficiente de correlação da reta obtida não é estatisticamente diferente da unidade, sendo o critério de aceitação valores de coeficiente de correlação próximos acima de 0,999 e residuais com perfil aleatório, não demonstrando nenhuma tendência na sua distribuição. Os residuais com maior valor absoluto deverão constituir outliers, caso façam desviar o coeficiente de variação do limite aceitável, devendo ser desprezados por diminuírem a relação linear da regressão.³¹

A gama de trabalho de um método é definida como os limites inferiores e superiores de concentrações na qual este é aplicável, sendo delimitado por um limite inferior e superior onde se observa um comportamento linear. O intervalo do método analítico corresponde à faixa do maior ao menor nível de concentrações que possa ser determinado com precisão e exatidão, usando a linearidade do método.^{25,29} Todas as amostras que são analisadas devem ter concentrações que estejam na gama de trabalho, ou seja, maior que o limite de quantificação e menor que o limite de linearidade, pelo que a concentração da amostra deve ser retirada por interpolação à reta.^{25,29}

Na **Figura 3.1** está apresentado um esquema da curva de calibração e, dentro da mesma, o que se entende por gama de trabalho, sensibilidade, limites de deteção e quantificação e ordenada na origem.

Comparação de métodos analíticos na quantificação do teor de Gabapentina em diversas cápsulas de diversos laboratórios

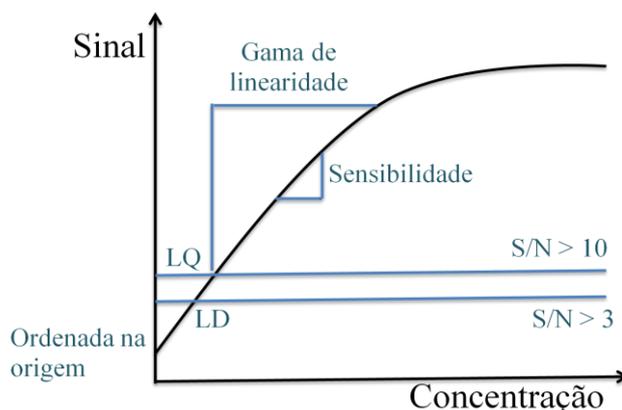


Figura 3.1- Figura ilustrativa dos parâmetros da reta. **Legenda:** LQ – limite de quantificação; LD – limite de detecção; S/N – Razão sinal/ruído.

3.2.3 ROBUSTEZ E ESTABILIDADE

Segundo a ICH, a robustez do método é a capacidade do método manter a sua qualidade e permanecer inalterado após uma alteração ao mesmo, ou seja, é a resistência do método a pequenas alterações, como pH, temperatura, comprimento de onda ao qual se faz a análise, entre outras. Mede a sensibilidade que o método apresenta face a pequenas variações. Um método diz-se robusto quando é insensível a pequenas alterações efetuadas.^{25,29}

Muitos compostos químicos podem sofrer alterações químicas durante diversas fases do processo de preparação das soluções ou mesmo durante o seu armazenamento, pelo que é essencial avaliar a sua estabilidade. A determinação deste parâmetro é essencial para estimar o tempo que se deve esperar desde a preparação das soluções até à sua análise ou o tempo máximo permitido para a análise dessas soluções desde a sua preparação.²⁵ O objetivo de verificar a estabilidade das soluções é obter informação acerca da variação da quantidade e qualidade de analíto em função do tempo, sob a influência de diferentes de fatores como a temperatura, humidade, pH, intensidade luminosa, entre outros e assim estabelecer as melhores condições de análise e armazenamento.²⁵

3.2.4 LIMITES DE DETEÇÃO E QUANTIFICAÇÃO

O limite de detecção é definido como sendo a menor concentração de analíto que o método consegue distinguir da região de resposta do branco, ou seja, é a concentração mínima ou massa mínima que pode ser detetada pelo método analítico com um determinado nível de confiança. Outra definição de limite de detecção é a concentração

de analíto que origina o sinal mínimo detetável, o menor sinal que pode ser distinguido do ruído do método.²⁹ Concentrações abaixo do limite de detecção não podem afirmar a presença de analíto, o sinal instrumental obtido pode ser devido a fatores aleatórios incontrolláveis. Neste caso a relação sinal/ruído (S/N) é de 3/1, pelo que, $LD=S_0+Ks_0$, em que K é um parâmetro estatístico e depende do nível de confiança desejado, que K assume o valor de 3. Uma abordagem mais exata do limite de detecção é descrita pela IUPAC, através da análise do desvio-padrão obtido para a análise repetida de soluções de brancos ou ligeiramente fortificados com uma concentração abaixo da concentração mínima detetável.^{29,30,32}

Limite de quantificação de um método analíto é definido como o menor nível de fortificação estudado, no qual a recuperação se encontra dentro de 80-120 % e o coeficiente de variação abaixo dos 20%, ou seja, é a concentração de analíto mínima que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis. O limite de quantificação deve ser o limite mínimo da gama de trabalho, pois é a concentração na qual o coeficiente de variação do sinal se reduziu a valores razoáveis, normalmente 10 %, ou seja, a relação sinal/ruído é de 10/1, sendo neste caso $LQ= S_0+K s_0$, em que K assume o valor de 10. O seu valor pode ser, de acordo com a IUPAC, estimado de forma idêntica ao limite de detecção.^{29,30,32}

3.2.5 EXATIDÃO

A exatidão do método é definida como o grau de concordância entre o valor médio obtido pelo método na análise da amostra e o valor real do analíto e é expressa como erro sistemático, inerente ao processo.²⁹ A exatidão de um método pode ser demonstrada pela comparação dos resultados obtidos com material de referência certificado (MRC), através da comparação do método proposto com um método de referência, validado cujo erro sistemático não é significativo, através da utilização de ensaios de recuperação ou através de estudos colaborativos ou inter-laboratoriais.²⁹ Os materiais certificados de referência são bastante importantes para avaliar a qualidade dos resultados obtidos, sendo a forma de eleição para a estimativa da exatidão do método, uma vez que estão relacionados com padrões internacionais, sendo o procedimento a efetuar a análise de um elevado número de vezes esse material e comparar os valores obtidos com o valor certificado.²⁹ Contudo, o seu elevado custo, matrizes e analítos limitados restringem o seu uso. Desta forma, para se estimar o valor da exatidão do método analítico procede-se então a ensaios de recuperação com

Comparação de métodos analíticos na quantificação do teor de Gabapentina em diversas cápsulas de diversos laboratórios

amostras de concentração rigorosamente conhecidas, ou ainda comparar a média dos valores obtidos entre laboratórios.²⁵ A recuperação está relacionada com a exatidão do método pois reflete a quantidade do analíto recuperado relativamente à quantidade realmente presente na amostra. Baixos valores de recuperação podem estar relacionados com a presença elevada de interferentes na amostra, medições pouco rigorosas ou, se for o caso, extrações com baixo rendimento. Para efetuar estas análises de recuperação procede-se à fortificação da amostra, através da adição de diferentes níveis de concentração desse mesmo analíto. A ICH recomenda a média das recuperações se situem entre 90-110 % e individualmente cada recuperação esteja dentro do limite 70-130 % do analíto recuperado.³³

Pode ser empregue o teste de hipóteses, onde se estabelece como hipótese nula (H_0) que a média obtida experimentalmente é igual à média do ensaio de referência, usando o teste *t-student* para este fim, de forma a verificar se as médias do método proposto e do método utilizado como referência podem ser consideradas estatisticamente iguais. A hipótese nula é considerada verdadeira quando $t_{\text{calculado}} < t_{\text{tabelado}}$.³⁴

Os resultados deverão satisfazer requisitos de qualidade para que sejam validados, pelo que existe a necessidade de existirem critérios de aceitação ou rejeição. Assim, o método será considerado exato quando apresentar níveis de recuperações dentro do aceitável para cada nível de concentração conforme apresentado na **Tabela 3.1**.²⁹

Tabela 3.1- Limites de aceitação das recuperações de acordo com a concentração de analíto (de acordo com AOAC)²⁹

Rácio	Limites de Recuperação (%)
1	98-102
10^{-1}	97-103
10^{-2}	95-105
10^{-3}	80-107
10^{-4}	80-110
10^{-5}	60-115
10^{-6}	40-120
10^{-7}	
10^{-8}	
10^{-9}	

3.2.6 PRECISÃO

A precisão do método é definida como a proximidade dos resultados obtidos numa série de medidas efetuadas, ou seja, o grau de concordância entre resultados obtidos por medições sucessivas, pelo que é expressa em termos de desvio padrão e desvio padrão relativo, quantificada pela reprodutibilidade e repetibilidade.²⁹ A repetibilidade expressa a precisão sob condições de análise idênticas, mesmo operador, mesmo instrumento, mesmos reagentes e condições ambientais, num determinado intervalo de tempo (não muito distante). A precisão intermediária é a expressão da precisão dentro de um mesmo laboratório em dias diferentes de análise, variando além disso o operador, os instrumentos e equipamentos.²⁹ A reprodutibilidade por si é a expressão da precisão dentro de laboratórios diferentes, ou seja, expressa o quanto o método é preciso independentemente do local onde é realizado.²⁹ No presente estudo apenas se realiza a repetibilidade, através da preparação de três amostras com diferentes níveis de concentração de analíto e três réplicas cada, sendo o método considerado preciso quando obtém valores dentro dos limites aceitáveis. Este parâmetro de validação de métodos analíticos é normalmente expresso em termos de desvio padrão e coeficiente de variação.^{25,29}

Para o cálculo do desvio padrão e o coeficiente de variação deve-se ter pelo menos cinco valores para cada nível de concentração.²⁵ A comparação de precisão entre métodos consiste na comparação entre um método previamente validado e que é utilizado como referência para a validação de outro método, com o intuito de estudar o grau de proximidade entre os valores obtidos pelos diferentes métodos e verificar se têm diferenças significativas, no que toca a precisão dos mesmos. O teste *Fisher-Snedecor* (F) permite assim, através da razão entre as variâncias do método de referência e o proposto, para verificar a concordância entre os dados, para verificar a precisão entre os dois métodos, comparar o valor de F obtido com o valor de *Fisher* tabelado, para o nível de confiança pretendido (sempre com o maior valor em numerador).³⁴ O método será considerado preciso quando apresentar níveis de variações dentro do aceitável, de acordo com a concentração de analíto, calculado pela equação de Horwitz, $2^{(1-0,5\log C)}$.³⁴ A *Association of Official Analytical Chemists* apresenta assim uma tabela que relaciona os níveis de concentração de analíto com o coeficiente de variação (RSD) máximo, apresentada na **Tabela 3.2**.

Tabela 3.2- Limites de aceitação dos coeficientes de variação (RSD) de acordo com a concentração de analito (de acordo com AOAC).²⁹

Rácio	RSD (%)
1	1,3
10 ⁻¹	1,8
10 ⁻²	2,7
10 ⁻³	3,7
10 ⁻⁴	5,3
10 ⁻⁵	7,3
10 ⁻⁶	11,0
10 ⁻⁷	15,0
10 ⁻⁸	21,0

4 Desenvolvimento dos Métodos

4.1 MATERIAL

Na elaboração desta monografia de investigação, além do material corrente de laboratório, foram usados balões volumétricos de 50,00±0,06, 20,00±0,04, 25,00±0,03, 20,00±0,02, 100,0±0,1, 200,00±0,15 mL. Utilizaram-se também várias pipetas volumétricas de 1,000±0,008, 2,00±0,01, 3,000±0,015, 5,000±0,015, 10,00±0,02 e 15,00±0,03 mL. Utilizaram-se micropipetas da Pipetman, P1000, com erro de ±0,003 até 0,2 mL, ±0,004 até 0,5 mL e ±0,008 até 1 mL. Nas titulações foram utilizadas buretas de 50,00±0,05 mL. Utilizaram-se também células de plástico e quartzo para a análise espectroscópica.

4.2 EQUIPAMENTO

No decorrer deste estudo, utilizou-se um espectrofotômetro de absorção UV-vis, *Genesys 10 Uv scanning*, da marca Thermo Scientific. Para a análise espectrofluorimétrica foi utilizado um fluorímetro da marca Agilent Technologies, modelo Cary Eclipse. Foi também usada uma balança Mettler AE260 Delta Range, cuja tolerância indicada pelo fabricante corresponde a ± 0,0001 g. Foi utilizado como medidor de pH um eletrodo de membrana de vidro da marca HANNA instruments, modelo HI 8314.

4.3 REAGENTES

Para a realização dos métodos foi usada gabapentina foi usada gabapentina (C₉H₁₇NO₂, M=171,24 g/mol) da Sigma-Aldrich, com grau de pureza <99%, 4-cloro-7-

Comparação de métodos analíticos na quantificação do teor de Gabapentina em diversas cápsulas de diversos laboratórios

nitrobenzoflurano, ($C_6H_2ClN_3O_3$, $M=199,55$ g/mol) da Sigma- Aldrich, com pureza >97 %, acetaldeído (C_2H_4O , $M=44,052$ g/mol), da Merck, de pureza >99 %, ácido clorídrico (HCl, $M=364,6$ g/mol) 37 % m/m da Panreac, tetraborato de sódio 10-hidrato ($Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$, $M=381,37$ g/mol), da Riedel-de-Haen, com pureza de 99,5 %, potássio dihidrogénio fosfato (KH_2PO_4 , $M=136,01$ g/mol), da Riedel-de-Haen e 99,5 % pureza, fosfato sódico dibásico (Na_2HPO_4 , $M= M=358,14$ g/mol), da Riedel-de-Haen, com pureza entre 99-101 %, Vanilina($C_8H_8O_3$, $M=152,15$ g/ml), da Merck com pureza >99%, *p*-benzoquinona ($C_6H_4O_2$, $M=108,1$ g/mol), da BDH Chemicals, com pureza >99%, amido solúvel ($C_6H_{10}O_5$)*n*, da Merck, de pureza p.a, ftalato ácido de potássio ($KHC_8H_4O_4$, $M=166,13$ g/mol), da Merck, com grau de pureza de 99,5 %, ácido bórico (H_3BO_3 , $M=61,83$ g/mol), da Merck, com pureza de 99,8 %, hidróxido de sódio (NaOH, $M= 39,997$ g/mol), da José M. Vaz Pereira, S.A, com grau de pureza >99 %, iodeto de potássio (KI, $M=166,01$ g/mol) , da Panreac, de pureza 99,5 %, nitrito de sódio ($NaNO_2$, $M=69,0$ g/mol), da Merck, com grau de pureza de 99 %, fosfinato de sódio monohidratado (NaH_2PO_4 , $M=105,99$ g/mol), da Merck, de pureza entre 99-103 e hipoclorito de sódio monohidratato ($NaClO$, $M = 74,44$ g/mol), da Sigma-Aldrich com 98 % pureza. Como solventes foram usados água bidestilada, etanol absoluto e metanol da Merck, ambos de pureza p.a.

4.4 AMOSTRAS

Como amostra usaram-se cápsulas de 100 mg de gabapentina da marca Gabamox[®], Neurotin[®], Ratiopharm, Teva e Generis. A constituição do conteúdo das mesmas é indicado como sendo lactose monohidratada, amido de milho e talco para as duas primeiras. As cápsulas da marca Generis e Ratiopharm possuem lactose anidra, amido de milho e talco. As cápsulas da Teva têm amido de milho e talco. O resumo de características do medicamento, providenciado pelo Infarmed, não indica a quantidade dos excipientes.

4.5 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

Os métodos desenvolvidos tiveram por base métodos de referência no doseamento do teor de gabapentina em diferentes formulações farmacêuticas ou fluídos orgânicos. Estes métodos sofreram alterações e foram adaptados para atingir os objetivos propostos, nomeadamente ajustes na gama de concentrações, concentração de

reagentes derivatizante, temperatura e pH ao qual se dá a reação, entre outros. Nas seções respectivas, as adaptações serão descritas detalhadamente.

No método de doseamento da gabapentina sem derivatização foi seguido o artigo: “*A Validated Method without Derivatization for the Determination of Gabapentin in Bulk, Pharmaceutical Formulation and Human Urine Samples*”.²¹ Os restantes métodos sem adição de agentes derivatizantes, Etanol/Água e HCl 0,1 M, foram efetuados de igual forma ao anterior com alterações a nível do solvente das soluções padrão e da gama de concentrações.

Os métodos de derivatização da gabapentina foram também efetuados de acordo com métodos que foram considerados suficientemente sensíveis para o objetivo proposto. No caso do método *p*-benzoquinona a base foi o artigo “*Colorimetric determination of gabapentin in pharmaceutical formulation*”.³⁴ Para a realização do método Vanilina foi utilizado o protocolo descrito em “*Gabapentin Determination in Human Plasma and Capsule by Coupling of Solid Phase Extraction, Derivatization Reaction, and UV-Vis Spectrophotometry*”.³⁶ O método Hipoclorito foi efetuado por adaptação do protocolo de “*Highly Sensitive Spectrophotometric Method for the Determination of Gabapentin in Capsules using Sodium Hypochloride*”.³⁷

O método NBD-Cl foi feito de acordo com o protocolo descrito em “*Spectrofluorimetric Determination of Vigabatrin and Gabapentin in Dosage Forms and Spiked Plasma Samples Through Derivatization with 4-Chloro-7-Nitrobenzo-2Oxa-1,3-Diazole*”.³⁸ Neste método foi otimizada a concentração de reagente NBD-Cl e ajustado o volume de tampão adicionado para obter linearidade na gama de concentrações adequada.

As técnicas volumétricas de neutralização foram efetuadas com base nas características químicas da molécula de gabapentina, não tendo sido seguido nenhum método descrito na literatura.

4.6 TRATAMENTO ESTATÍSTICO DOS DADOS

O tratamento estatístico de dados constitui uma poderosa ferramenta que visa auxiliar o controlo de qualidade. Na química analítica, os testes estatísticos mostram extrema importância, nomeadamente a nível da tomada de decisões e interpretação de resultados obtidos, uma vez que os mesmos apresentam variações em torno de um valor real, exibindo uma distribuição normal. A escolha do teste estatístico a ser

implementado depende do objetivo pretendido com a análise, uma vez que existem testes que se adequam mais ou menos a cada objetivo.³³ O uso de testes estatísticos adequados (*t-student*, *Fisher*, teste de hipóteses, entre outros) torna a toma de decisões mais objetiva, rigorosa e menos sujeita à interpretação subjetivos resultados.³³

O teste de hipóteses é muitas vezes utilizado não só na avaliação da precisão e exatidão de um método analítico mas também na comparação de possíveis diferenças estatisticamente significativas entre os resultados obtidos entre dois métodos, o de referência e o efetuado. Para isso é essencial definir a hipótese nula (H_0) como a ausência de diferenças estatisticamente significativas e hipótese alternativa (H_1) como a presença das mesmas entre os dois métodos. O nível de significância corresponde à probabilidade máxima de aceitação da hipótese correta com que se pretende fazer a análise. As normas ISO recomendam o uso de um intervalo de confiança de 95 %.^{34,39}

A exatidão e precisão de um método analítico podem ser avaliadas pela comparação entre o método proposto e um método de referência, previamente validado, com precisão e exatidão devidamente avaliadas e descrito por uma entidade responsável, pelo teste *t-student* e *F-Fisher*, respetivamente. Se o valor de *t-student* obtido experimentalmente estiver enquadrado no intervalo estabelecido pelo valor tabelado, para $n-1$ graus de liberdade para determinado nível de confiança, então o método será considerado exato, acontecendo o mesmo para a precisão, no caso do valor de *Fisher*.³³

Pela análise de diferentes amostras utilizando o método oficial e o método proposto, são comparadas as diferenças obtidas, num determinado nível de confiança, de forma a avaliar se essas diferenças podem ou não ser consideradas significativas. No entanto, a dificuldade de encontrar um método de referência dificulta este processo de comparação.³³

5 Métodos Volumétricos de Análise

A volumetria foi a primeira técnica analítica a ser usada na quantificação de gabapentina em cápsulas na presente monografia. A volumetria de neutralização é baseada numa reação entre o analíto e o titulante, de concentração a determinar e rigorosamente conhecida, respetivamente. O ponto de equivalência é definido como o ponto ao qual o número de equivalentes do titulante é exatamente igual ao número de equivalentes do analíto e é detetado pela variação brusca de uma propriedade física ou

Comparação de métodos analíticos na quantificação do teor de Gabapentina em diversas cápsulas de diversos laboratórios

química. O volume de titulante ao qual o ponto de equivalência ocorre é usado para determinar a concentração de analíto presente na amostra.⁴⁰

Dependendo da forma iônica em que se encontra o analíto (gabapentina), diferentes reagentes podem ser utilizados como titulantes na sua determinação. Se o mesmo estiver na forma totalmente desprotonada, de nada serve titular com uma solução básica, pois não há prótons para serem removidos, bem como se estiver na forma totalmente protonada de nada serve a sua titulação com uma solução ácida, uma vez que não haveria mais formas para protonar.

De forma a perceber com que reagentes se poderia titular uma solução de gabapentina foi necessário um olhar crítico sobre a sua estrutura química. A gabapentina possui duas extremidades ionizáveis, um grupo amina e outro grupo carboxílico, sendo então designada de ácido diprótico, podendo assumir três formas distintas, totalmente protonada, neutra ou totalmente desprotonada. Em solução aquosa esperar-se-ia que a gabapentina estivesse na forma neutra, uma vez que se trata de uma molécula anfotérica. Para se confirmar em que forma iônica se encontra a gabapentina em solução aquosa, preparou-se uma solução de concentração 0,0292 M, pela dissolução do conteúdo de uma cápsula em 20 mL de água destilada e mediu-se o pH com o auxílio de um eletrodo de membrana de vidro. Foi obtido um valor próximo de 7,19, confirmando-se desta forma que a espécie predominante da gabapentina em solução aquosa é a neutra. Assim, decidiu-se utilizar uma solução de NaOH 0,1 M para a titulação da gabapentina no sentido da perda do próton da amina ($-\text{NH}_3^+$) e a utilização de uma solução de HCl 0,1 M para a protonação da gabapentina, nomeadamente a nível do seu grupo carboxilo ($-\text{COO}^-$). Conhecendo as constantes de acidez da gabapentina, designadamente $\text{pK}_{a1} = 3,68$ (ácido carboxílico)²⁰ e $\text{pK}_{a2} = 10,70$ (amina),²⁰ pode-se aferir que este último pK_a referente à desprotonação da amina, em consequência da fraca acidez da gabapentina, resulta em variações no pH pouco significativas a nível do ponto de equivalência, o que se reflete numa difícil deteção do mesmo.

Para o doseamento do analíto através de uma titulação ácido-base é necessário aferir a concentração do titulante para que a titulação seja o mais rigorosa possível. Assim, foram determinadas de forma rigorosa as concentrações das soluções de NaOH e HCl 0,1 M. As amostras de gabapentina foram preparadas através da dissolução do conteúdo de uma cápsula em 20 mL de água destilada, tendo-se obtido uma solução de concentração aproximada de $0,0292_0 \pm 0,0001_4$ M, de acordo com a **Tabela A2**,

apresentada em anexo. Foi utilizado um eletrodo de membrana de vidro para o acompanhamento da titulação e detecção dos pontos de equivalência. De notar que antes de efetuar qualquer medição de pH o eletrodo de membrana de vidro foi calibrado com soluções tampão pH 4,00 e 7,00.

5.1 TITULAÇÃO COM NaOH

Como referido anteriormente, a técnica volumétrica requer a padronização das soluções de titulante. Através da titulação de uma solução de NaOH com ftalato ácido de potássio foi possível a aferição da solução de NaOH, que irá posteriormente ser utilizada como titulante no doseamento volumétrico da gabapentina em cápsulas. A **Tabela A1**, em anexo, contém a forma como foram preparadas as soluções de ftalato e os resultados obtidos na aferição da solução de NaOH. Assim foi obtida uma solução de NaOH de $0,09619 \pm 0,00033$ M. As amostras de gabapentina foram tituladas pela solução de NaOH, em duplicado, de forma a aumentar a reprodutibilidade estatística dos resultados, estando os valores de pH ao longo do volume de titulante adicionado apresentados na **Tabela A3** do anexo.

O tempo reduzido para a execução experimental do estudo limitou o número de ensaios feitos, uma vez que cada titulação era bastante morosa. De seguida, da **Figura 5.1** à **Figura 5.5** encontram-se apresentadas as curvas de titulação obtidas para cada cápsula dos diferentes laboratórios, nomeadamente Gabamox[®], Neurotin[®], Ratiopharm, Teva e Generis, respetivamente, bem como o gráfico da segunda derivada associado a cada titulação. A curva de titulação não é apresentada integralmente de modo a ser mais claro o volume ao qual ocorre a inflexão correspondente ao ponto de equivalência, pelo que se decidiu aumentar essa região para maior detalhe.

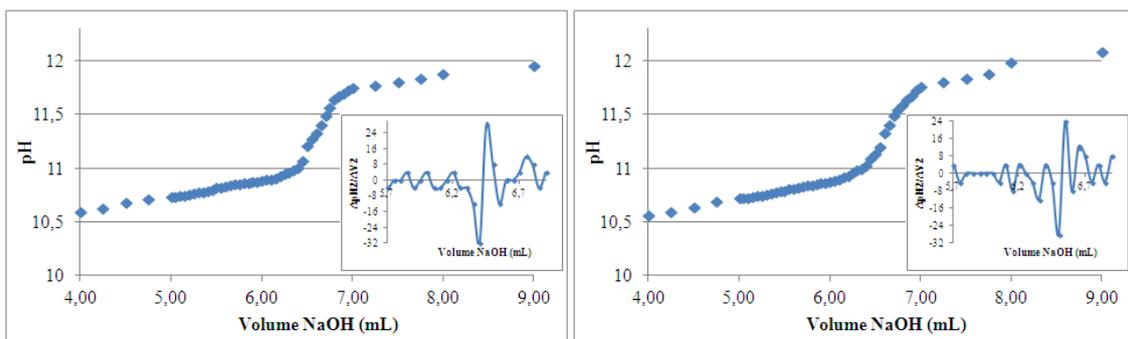


Figura 5.1- Curvas de titulação da cápsula Gabamox[®] com NaOH 0,09619 M e respetivos gráficos da segunda derivada.

Comparação de métodos analíticos na quantificação do teor de Gabapentina em diversas cápsulas de diversos laboratórios

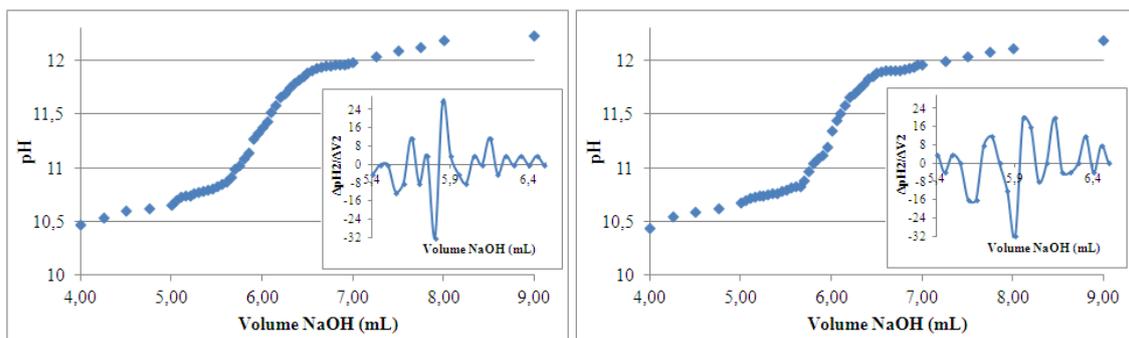


Figura 5.2- Curvas de titulação da cápsula Neurotin[®] com NaOH 0,09619 M e respectivos gráficos da segunda derivada.

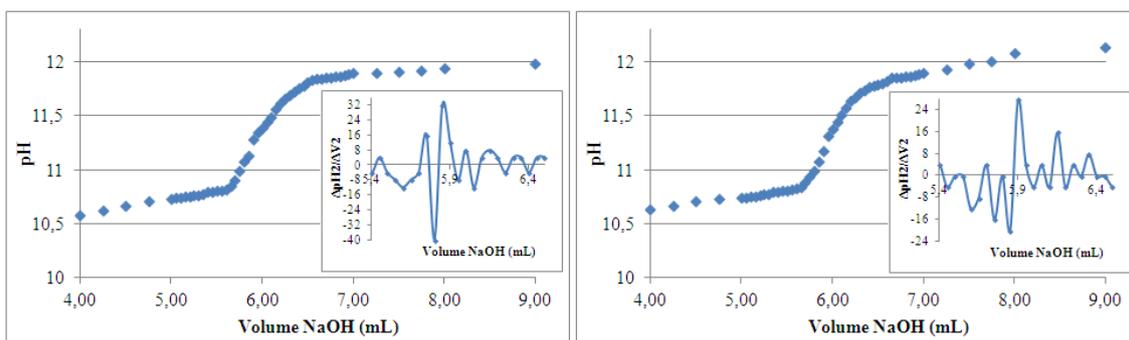


Figura 5.3- Curvas de titulação da cápsula Ratiopharm com NaOH 0,09619 M e respectivos gráficos da segunda derivada.

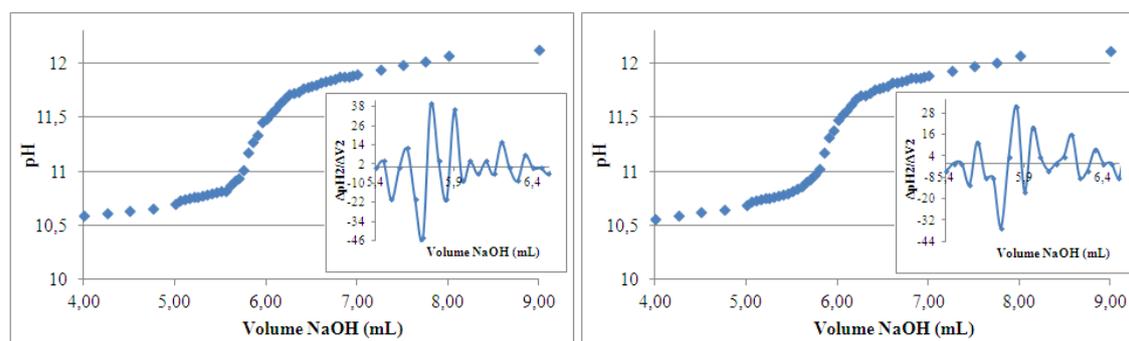


Figura 5.4- Curvas de titulação da cápsula Teva com NaOH 0,09619 M e respectivos gráficos da segunda derivada.

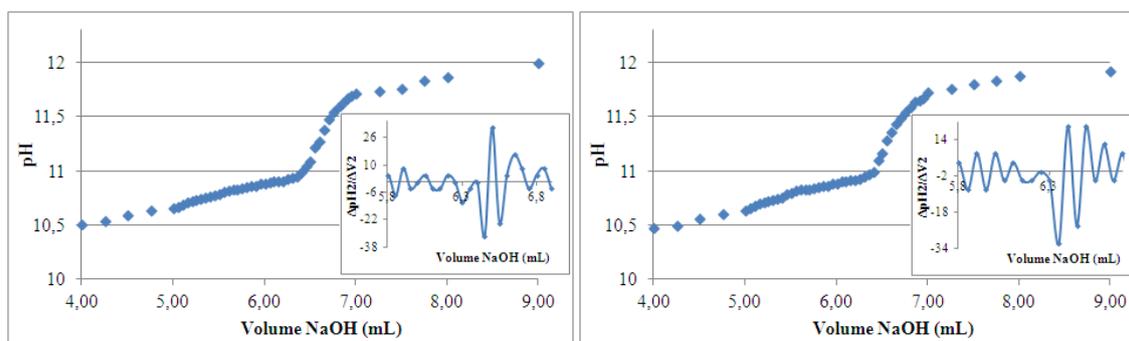


Figura 5.5- Curvas de titulação da cápsula Generis com NaOH 0,09619 M e respectivos gráficos da segunda derivada.

Comparação de métodos analíticos na quantificação do teor de Gabapentina em diversas cápsulas de diversos laboratórios

As representações anteriores mostram que o volume ao qual o valor de pH tem maior variação foi, em todos os casos, entre 5,70 e 6,50 mL. Para uma melhor detecção do ponto de equivalência foram efetuados os gráficos correspondentes à primeira e segunda derivada das curvas de titulação. O volume de titulante gasto até se atingir o ponto de equivalência pode ser verificado a partir do gráfico da primeira derivada pelo ponto máximo e a partir do gráfico da segunda derivada pela interseção com o eixo das abcissas, na qual a variação entre o valor máximo e mínimo é maior. Assim, o volume de titulante ao qual se verifica o ponto de equivalência foi calculado pelo valor de y ao qual x=0, onde se verifica a maior variação entre a segunda derivada dos valores de pH. Na **Tabela 5.1** estão apresentados os volumes gastos em cada titulação até se atingir o ponto de equivalência, calculados pelo método da segunda derivada, a concentração do analito na solução de amostra, o teor de gabapentina por cápsula, o coeficiente de variação normalizado e de Horwitz e o erro relativo.

Tabela 5.1- Volume NaOH gasto até ao ponto de equivalência, concentração de gabapentina na amostra, teor de gabapentina por cápsula, coeficiente de variação e erro relativo.

		Titulação NaOH					
	Ensaio	V _{NaOH} gasto± 0,05 (mL)*	Conc _{GBP} (M)*	Teor _{GBP} ±SD (mg)*	RSD (%)*	RSD _H (%)*	ER (%)*
Gabamox®	1	6,427	0,031	105,86	1,09	3,37	6,68
	2	6,527	0,031	107,51			
	Média		0,0311 ₅ ±0,0003 ₄	106,7±1,2			
	Ensaio						
Neurotin®	1	5,827	0,028	95,97	1,25	3,42	-3,17
	2	5,931	0,029	97,69			
	Média		0,0282 ₇ ±0,0003 ₅	96,8±1,2			
	Ensaio						
Ratiopharm	1	5,828	0,028	95,99	0,52	3,42	-3,65
	2	5,871	0,028	96,70			
	Média		0,0281 ₃ ±0,0001 ₅	96,3 ₅ ±0,5 ₀			
	Ensaio						
Teva	1	5,726	0,028	94,32	0,94	3,43	-5,05
	2	5,803	0,028	95,58			
	Média		0,0277 ₂ ±0,0002 ₆	94,9 ₅ ±0,8 ₉			
	Ensaio						
Generis	1	6,475	0,031	106,65	1,04	3,38	5,88
	2	6,381	0,031	105,10			
	Média		0,0309 ₁ ±0,0003 ₂	105,9±1,1			

*Cálculos efetuados de acordo com as expressões a), b), c), d), e) e f) do anexo de equações

Todas as cápsulas obtiveram teores de gabapentina próximos do indicado pelo fabricante, 100 mg. Obteve-se o teor de gabapentina menos discrepante do real para as cápsulas de Neurotin®, designadamente 96,8±1,2 mg, através do doseamento pelo

Comparação de métodos analíticos na quantificação do teor de Gabapentina em diversas cápsulas de diversos laboratórios

método Titulação NaOH. Para as cápsulas da Ratiopharm obtiveram-se os resultados mais concordantes com o fabricante, dentro dos laboratórios de genéricos, tendo-se obtido um teor de $96,35 \pm 0,50$ mg de gabapentina por cápsula. As cápsulas de Gabamox[®] foram as que obtiveram um teor de gabapentina mais afastado do indicado na embalagem, $106,7 \pm 1,2$ mg por cápsula.

A precisão do método foi avaliada pelo coeficiente de variação obtido nas análises efetuadas e sua comparação com o valor limitante calculado pelo coeficiente de Horwitz. O critério de aceitação são valores de coeficiente de variação abaixo de 3,70 %, segundo a AOAC, uma vez que se está a trabalhar com concentrações de analíto na ordem dos 10^{-2} e valores de coeficiente de variação abaixo dos de Horwitz.²⁹ Assim, todas as medições efetuadas através deste método volumétrico obtiveram coeficientes de variação abaixo do limite de aceitação, pelo que a precisão do método pode ser considerada aceitável pelas normas que se está a seguir. Apesar de não se ter utilizado Material de Referência Certificado, MRC, para determinar a exatidão do método, admitiu-se que o valor real era de 100 mg para o cálculo do erro relativo, de forma a se ter uma estimativa do parâmetro de avaliação. O mesmo obteve valores fora do limite aceitável, 5,00 %, nomeadamente a nível das cápsulas de Gabamox[®], Generis e Teva. Em todas as outras, o método mostrou-se exato.⁴¹

Determinou-se os valores experimentais de *t-student* e *Fisher* como forma de estimativa e comparação da exatidão e precisão do método, respetivamente, tendo por base um estudo de referência, onde foi efetuado o doseamento de gabapentina em cápsulas pela titulação com NaOH. Na **Tabela 5.2**, estão apresentados os valores obtidos para os testes implementados na comparação do método de referência e o presente método.

Tabela 5.2- Recuperações obtidas para as diferentes cápsulas, valores críticos e tabelados de *t-student* e *Fisher* para o método Titulação NaOH.

Método Proposto (N=2)		Gabomox [®]	Neurotin [®]	Ratiopharm	Teva	Generis	Método Referência (N=5) ⁴²
Titulação NaOH	Recuperação \pm SD(%) [*]	106,7 \pm 1,2	96,8 \pm 1,2	96,35 \pm 0,50	94,95 \pm 0,89	105,9 \pm 1,1	99,65 \pm 1,02
	<i>t</i> _{calculado} (95%) [*]	7,96	-3,21	-4,24	-5,67	7,15	<i>t</i> _{tabelado} (95%) [*] 12,71
	<i>F</i> _{calculado} (95%) [*]	1,31	1,41	4,14*	1,30*	1,16	<i>F</i> _{tabelado} (95%) [*] 7,71

*Cálculos efetuados de acordo com as expressões c), d), g) e h) do anexo de equações; * *F*_{tabelado}(95%)=224,58

Como se pode aferir pela tabela anterior, os valores experimentais de *t-student* e *Fisher*, para um grau de confiança de 95 %, apresentam-se, em todos os casos, abaixo

Comparação de métodos analíticos na quantificação do teor de Gabapentina em diversas cápsulas de diversos laboratórios

do valor limitante, uma vez que o valor de $t_{\text{calculado}} < t_{\text{tabelado}}$ e $F_{\text{calculado}} < F_{\text{tabelado}}$, pelo que não existem diferenças significativas relativamente à precisão e exatidão do método Titulação NaOH, relativamente ao método de referência. O valor de *t-student* obtido nunca passou os 7,96 e o valor de *Fisher* nunca foi superior a 4,14, aceitando-se desta forma a hipótese nula (H_0), podendo-se afirmar que o método obteve valores de precisão e exatidão estatisticamente semelhantes ao obtido pelo método de referência.

5.2 TITULAÇÃO COM HCl

Tal como no método anterior a aferição da solução de HCl é requerida, de forma a aumentar o rigor do subsequente método, Titulação com HCl 0,1 M. A descrição da preparação destas soluções e os resultados obtidos para a aferição da solução de HCl encontram-se em anexo, na **Tabela A4**. Obteve-se uma solução de HCl de $0,1005_6 \pm 0,0003_4$ M que irá ser usada como titulante no doseamento da gabapentina na amostra, de concentração aproximada de $0,0292_0 \pm 0,0001_4$ M (preparação apresentada na **Tabela A2** em anexo). Os valores de pH ao longo do volume de titulante adicionado estão apresentados em anexo, na **Tabela A5**. Nas **Figuras 5.6 a 5.10** estão apresentadas as curvas de titulação e o gráfico da segunda derivada, em duplicado para cada cápsula dos diferentes laboratórios, nomeadamente Gabamox[®], Neurotin[®], Ratiopharm, Teva e Generis, respetivamente.

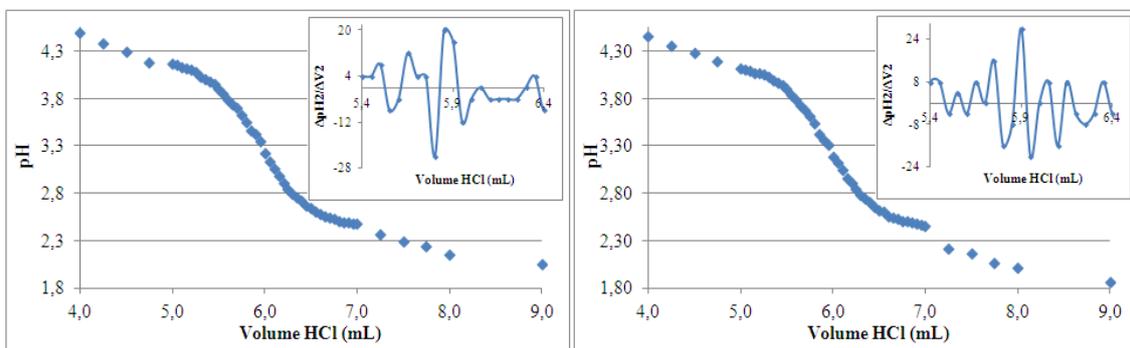


Figura 5.6- Curvas de titulação da cápsula Gabamox[®] com HCl 0,10056 M e respetivos gráficos da segunda derivada.

Comparação de métodos analíticos na quantificação do teor de Gabapentina em diversas cápsulas de diversos laboratórios

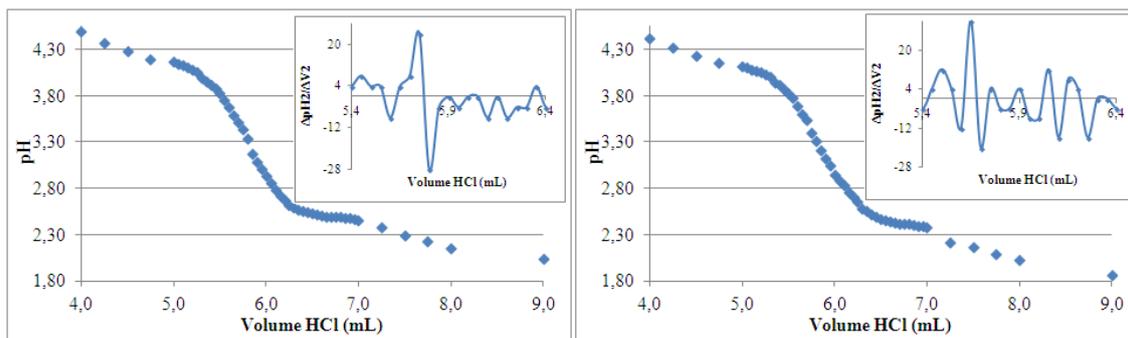


Figura 5.7- Curvas de titulação da cápsula Neurotin® com HCl 0,10056 M e respectivos gráficos da segunda derivada.

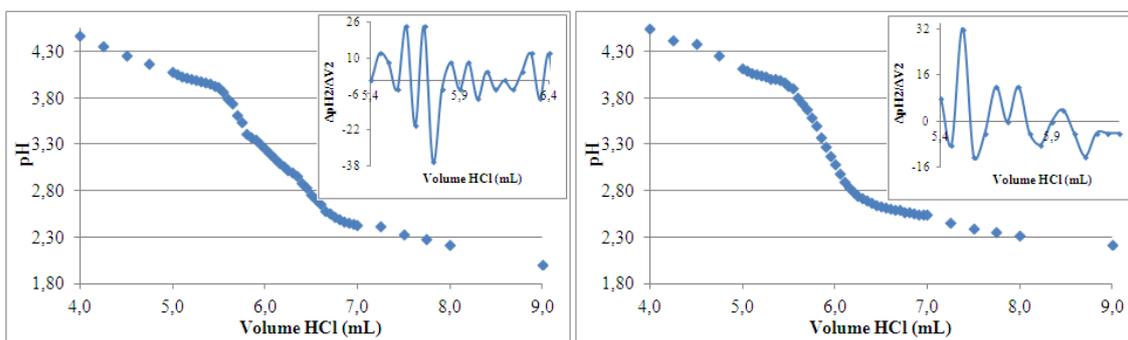


Figura 5.8- Curvas de titulação da cápsula Ratiopharm com HCl 0,10056 M e respectivos gráficos da segunda derivada.

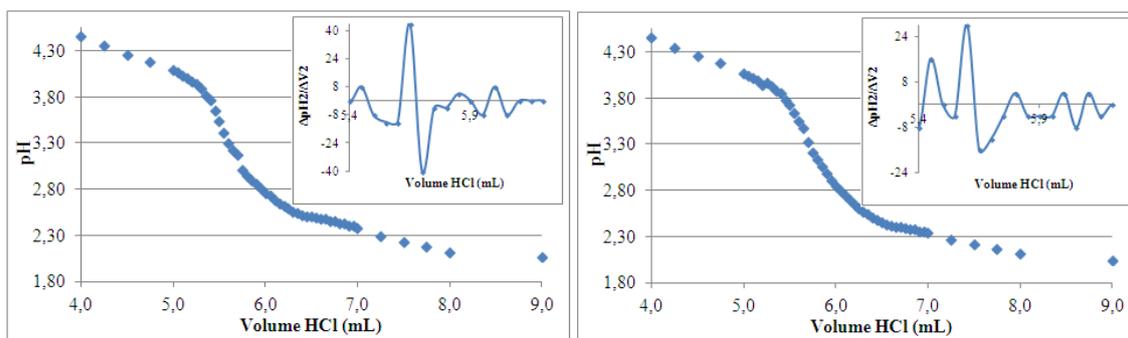


Figura 5.9- Curvas de titulação da cápsula Teva com HCl 0,10056 M e respectivos gráficos da segunda derivada.

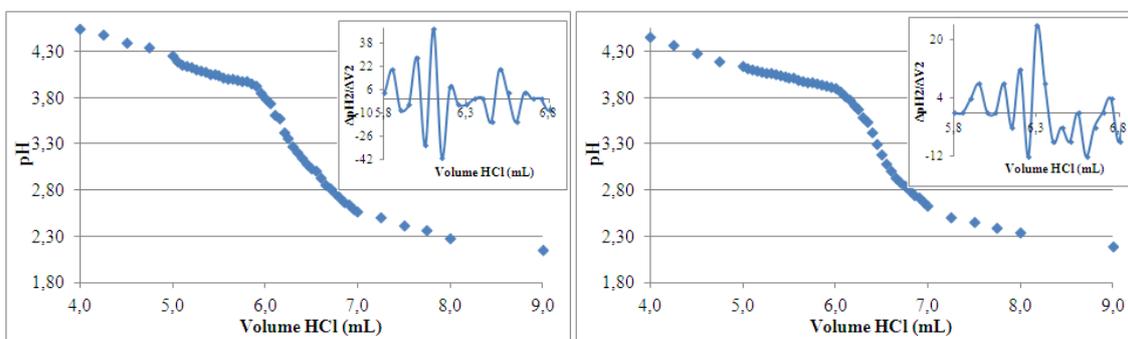


Figura 5.10- Curvas de titulação da cápsula Generis com HCl 0,10056 M e respectivos gráficos da segunda derivada.

Comparação de métodos analíticos na quantificação do teor de Gabapentina em diversas cápsulas de diversos laboratórios

As figuras anteriores mostram que o volume ao qual o pH varia de forma mais intensa foi próximo de 5,80 mL. Assim, na **Tabela 5.3** estão apresentados os volumes de HCl gastos em cada titulação até se atingir o ponto de equivalência, calculados pelo método da segunda derivada, a concentração do analíto na solução de amostra, o teor de gabapentina por cápsula, o coeficiente de variação normalizado e de Horwitz e o erro relativo.

Tabela 5.3- Volume HCl gasto até ao ponto de equivalência, concentração de gabapentina na amostra, teor de gabapentina por cápsula, coeficiente de variação e erro relativo.

		Titulação HCl					
	Ensaio	$V_{\text{NaOH}} \text{ gasto} \pm 0,05 \text{ (mL)}^*$	$\text{Conc}_{\text{GBP}} \text{ (M)}^*$	$\text{Teor}_{\text{GBP}} \pm \text{SD} \text{ (mg)}^*$	$\text{RSD} \text{ (\%)}^*$	$\text{RSD}_{\text{H}} \text{ (\%)}^*$	$\text{ER} \text{ (\%)}^*$
Gabamox®	1	5,827	0,029	100,35			
	2	5,929	0,030	102,10	1,23	3,40	1,22
	Média		$0,0295_6 \pm 0,0003_6$	$101,2 \pm 1,2$			
	Ensaio						
Neurotin®	1	5,773	0,029	99,41			
	2	5,681	0,029	97,82	1,14	3,41	-1,38
	Média		$0,0287_9 \pm 0,0003_3$	$98,6 \pm 1,1$			
	Ensaio						
Ratiopharm	1	5,720	0,029	98,50			
	2	5,536	0,028	95,34	2,31	3,42	-3,08
	Média		$0,0283_0 \pm 0,0006_5$	$96,9 \pm 2,2$			
	Ensaio						
Teva	1	5,676	0,029	97,74			
	2	5,632	0,028	96,98	0,55	3,42	-2,64
	Média		$0,0284_3 \pm 0,0001_6$	$97,3_6 \pm 0,5_4$			
	Ensaio						
Generis	1	6,127	0,031	105,51			
	2	6,267	0,032	107,91	1,59	3,37	6,71
	Média		$0,0311_6 \pm 0,0005_0$	$106,7 \pm 1,7$			

*Cálculos efetuados de acordo com as expressões a), b), c), d), e) e f) do anexo de equações

As cápsulas que apresentaram teor de princípio ativo mais próximo do indicado pelo fabricante foram as cápsulas de Neurotin®, com um teor de gabapentina de $98,6 \pm 1,1$ mg por cápsula, seguidas das cápsulas da marca Teva que obtiveram um teor de $97,3_6 \pm 0,5_4$ mg. As cápsulas que obtiveram um teor de gabapentina mais discrepante do valor indicado pelo fabricante foram as cápsulas da Generis, que obtiveram $106,7 \pm 1,7$ mg de princípio ativo por cápsula.

A precisão do método foi avaliada pelo coeficiente de variação obtido para as amostras. Como critério de aceitação tem-se valores de coeficiente de variação abaixo do valor de Horwitz indicado pela AOAC, para o nível de concentração com que se está a trabalhar, 3,70 %.²⁹ Os ensaios obtiveram coeficientes de variação entre 0,55 e 2,31

Comparação de métodos analíticos na quantificação do teor de Gabapentina em diversas cápsulas de diversos laboratórios

%, demonstrando a precisão do método Titulação com HCl. Relativamente à exatidão do método, os ensaios obtiveram erros relativos dentro do critério de aceitação, abaixo de 5,00 %, à exceção das cápsulas da Generis, que obteve 6,71 %.⁴¹ O método Titulação HCl é considerado relativamente exato no que toca ao doseamento de gabapentina em cápsulas.

A comparação do método Titulação HCl com o método de referência é essencial de forma a analisar possíveis diferenças significativas a nível da sua precisão e exatidão, pelo que foram efetuados os testes *t-student* e *Fisher* e implementado o modelo de hipóteses. Na **Tabela 5.4** estão apresentados os valores obtidos e limitante para os testes executados, para um nível de confiança de 95 %.

Tabela 5.4- Recuperações obtidas para as diferentes cápsulas, valores críticos e tabelados de *t-student* e *Fisher* para o método titulação.

Método Proposto (N=2)		Gabomox [®]	Neurotin [®]	Ratiopharm	Teva	Generis	Método Referência (N=5) ⁴²
Titulação HCl	Recuperação ±SD(%) [*]	101,2±1,2	98,6±1,1	96,9±2,2	97,36±0,54	106,7±1,7	99,65±1,02
	<i>t</i> _{calculado} (95%) [*]	1,73	-1,22	-2,44	-2,94	7,08	<i>t</i> _{tabelado} (95%) [*] 12,71
	<i>F</i> _{calculado} (95%) [*]	1,48	1,21	4,81	3,56 [*]	2,77	<i>F</i> _{tabelado} (95%) [*] 7,71

^{*}Cálculos efetuados de acordo com as expressões c), d), g) e h) do anexo de equações; ^{*} *F*_{tabelado}(95%)=224,58

Os valores de *t-student* e *Fisher* obtidos experimentalmente estiveram sempre abaixo dos valores tabelados, uma vez que os valores calculados nunca foram superiores a 7,08 e 4,81 e os valores limites eram 12,71 e 7,71, respetivamente, para um grau de confiança de 95 %. Assim a hipótese nula é verificada e pode-se afirmar que não existem diferenças estatisticamente significativas entre a precisão e exatidão do método Titulação com HCl e o método de referência.

5.3 CURVA DE TITULAÇÃO TEÓRICA

Com o objetivo de se comparar a curva de titulação teórica e a curva obtida experimentalmente foram calculados alguns pontos da curva, tanto para a titulação com HCl como para a titulação de NaOH. Neste cálculo assumiu-se que tanto a amostra como os titulantes foram preparados de forma idêntica ao que se passou experimentalmente, de forma a obter valores próximos do experimental e poder deste modo proceder a uma comparação de forma mais viável. Na **Figura 5.11** está apresentada a curva de titulação teórica de uma amostra de 0,0292 M de gabapentina com NaOH 0,0961₉±0,0003₃ M e HCl 0,1005₆±0,0003₄ M.

Comparação de métodos analíticos na quantificação do teor de Gabapentina em diversas cápsulas de diversos laboratórios

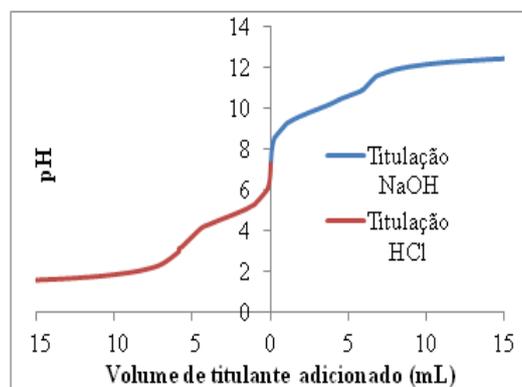


Figura 5.11- Curva teórica de titulação da solução de uma cápsula de gabapentina com NaOH e HCl.

Após o cálculo de todos os pontos necessários para a elaboração da curva de titulação teórica pode-se verificar a existência de três pontos de inflexão, o pH inicial, antes da adição de qualquer titulante, o ponto de equivalência da titulação com NaOH e HCl. Teoricamente o valor inicial da titulação é de 7,19, pelo que nas titulações experimentais o pH está um pouco abaixo deste valor. A nível da titulação com NaOH pode-se verificar um ponto de inflexão aos 6,07 mL, com um valor de pH de 11,20. A titulação com HCl mostra um ponto de inflexão aos 5,81 mL e um pH de 2,77. Estes valores teóricos estiveram de acordo com os obtidos experimentalmente uma vez que se obteve uma média de volumes de titulante de 6,08 e 5,82 mL para a titulação com NaOH e HCl, respetivamente, havendo sobreposição na região de inflexão das curvas teórica e experimental. A nível da titulação com NaOH, a análise que obteve um ponto de equivalência mais próximo do real foi a análise do Neurotin[®], com um valor de pH de 11,21. A titulação de HCl que obteve um valor de pH no ponto de equivalência mais próximo do teórico foi a titulação de uma cápsula da marca Teva, tendo obtido um valor de 3,01.

Foi com isto possível o cálculo das frações molares de cada espécie de gabapentina presentes em solução, protonada, neutra ou desprotonada, e verificar a sua evolução com o pH. Na **Figura 5.12** está representado a evolução da fração das espécies da gabapentina em solução ao longo do pH.

Comparação de métodos analíticos na quantificação do teor de Gabapentina em diversas cápsulas de diversos laboratórios

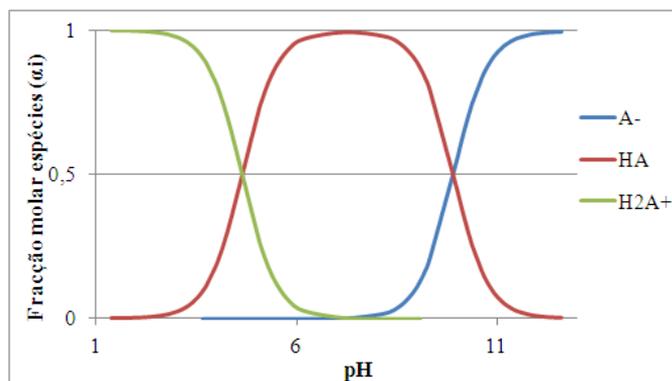


Figura 5.12- Diagrama de frações molar teórico da titulação da solução de gabapentina;
Legenda: a letra A^- representa a espécie da gabapentina menos protonada, HA representa a forma neutra da gabapentina e H_2A^+ representa a forma mais protonada da gabapentina.

Como se pode observar, quando o pH é baixo, a espécie em predominância é a espécie mais protonada da gabapentina, H_2A^+ . À medida que o pH aumenta a fração da mesma vai diminuindo consideravelmente até igualar a fração da espécie neutra, HA. Este ponto de interceção corresponde ao primeiro pK_a da gabapentina, 3,68. Quando o pH é 7,19 a fração da espécie neutra é máxima, aproximando-se muito da unidade e a fração das espécies mais e menos protonadas são próximas de zero. Este ponto é designado de ponto isoelétrico. Ao longo do pH a espécie mais protonada tende a desaparecer e a espécie menos protonada, A^- , tende a aumentar a sua fração. Assim, quando o pH aumenta além do ponto no qual a fração de HA é máxima, esta começa a diminuir para dar lugar à espécie A^- , até igualarem a sua fração dando origem a um ponto de interceção, o segundo pK_a da gabapentina, 10,70. Após este ponto, enquanto o pH aumenta, a fração da espécie neutra tende a desaparecer e a fração da espécie menos protonada torna-se mais abundante.

6 Métodos Espectroscópicos de análise

A presente monografia vai-se focar essencialmente sobre as técnicas de absorção Uv-Vis e de emissão por fluorescência, dentro das técnicas espectrofotométricas de análise. A radiação eletromagnética engloba a radiação ultravioleta e visível, de comprimentos de onda compreendida entre 100 e 800 nm. A espectroscopia Uv-Vis resulta de transições eletrónicas de um estado de menor energia (HOMO) para uma orbital molecular de maior energia (LUMO), que ocorrem devido à absorção de radiação pelos eletrões das ligações ou nos grupos funcionais do analíto. Esta técnica permite obter informação qualitativa acerca da estrutura da molécula, mas é

mais extensivamente utilizada para obter informação quantitativa. Segundo Johann Lambert e Wilhelm Beer, para um determinado comprimento de onda a absorvência de uma amostra depende tanto da concentração como do percurso ótico dessa mesma amostra, tendo em consideração a absorvidade molar do analíto, dando origem à seguinte equação $A = \log(I_0/I) = \epsilon lC$, onde A corresponde à absorvência, I_0 a intensidade de radiação monocromática que incide sobre a amostra, I a intensidade de radiação que emerge da amostra, ϵ o coeficiente de absorvidade molar, l o percurso ótico da célula (cm) e C a concentração de analíto.⁴³

A espectroscopia de fluorescência por sua vez consiste na emissão de radiação eletromagnética por uma molécula, geralmente na região Uv-Vis, ao regressar ao estado fundamental, após absorver radiação, podendo-se dividir em fluorescência e fosforescência, que diferem entre si na alteração ou manutenção da orientação do eletrão no estado excitado. No âmbito deste estudo, apenas o primeiro tipo de luminescência é relevante. Neste caso a orientação do eletrão mantêm-se quando este passa do estado excitado para o estado fundamental, mantendo o estado singuleto.⁴³

6.1 MÉTODOS SEM DERIVATIZAÇÃO DA GABAPENTINA

A análise direta de uma solução aquosa de gabapentina sem o auxílio de nenhum tipo de derivatização foi publicada e tem sido amplamente utilizada em vários estudos de doseamento do fármaco através da leitura da absorvência a cerca de 215 nm. Esta análise é válida para estudos quantitativos da gabapentina em cápsulas e outras fórmulas farmacêuticas, tendo sido publicado pela USP, sendo considerado o método oficial no doseamento da gabapentina. Este é um método simples e bastante económico com larga aplicabilidade, gamas de trabalho e limites de deteção e quantificação bastante aceitáveis, com interferências muito pouco significativas por parte dos excipientes da formulação farmacêutica em questão.²¹

6.1.1 MÉTODO DIRETO

Uma solução *Stock* foi preparada através da dissolução de gabapentina pura em água bidestilada, tendo-se obtido uma solução de concentração rigorosa $1780,2 \pm 1,9$ ppm, a qual foi posteriormente utilizada para a preparação de doze soluções padrão, numa gama de concentrações entre 0,0 e 213,6 ppm. Estas soluções padrão foram preparadas pela pipetagem de diferentes volumes da solução *Stock* anteriormente referida para balões volumétricos de 25 mL, usando água bidestilada como solvente. O plano

Comparação de métodos analíticos na quantificação do teor de Gabapentina em diversas cápsulas de diversos laboratórios

detalhado da preparação destas soluções está apresentado em anexo nas **Tabelas A6 e A7**.

Para a escolha do comprimento de onda ao qual se realizou a análise foi traçado o espectro de absorção do gabapentina. Desta de forma foi possível verificar em que região espectral existia absorção do analíto e assim restringir a análise de cada solução ao máximo de absorção garantindo a aplicabilidade da lei de Lambert-Beer. Para isso fez-se um varrimento espectral entre 200 e 400 nm, usando para isso uma solução padrão de concentração $64,1 \pm 1,1$ ppm de gabapentina, tendo a linha de base sido definida pelo branco. O máximo de absorção, como se pode observar na **Figura 6.1** ocorre a 192 nm.

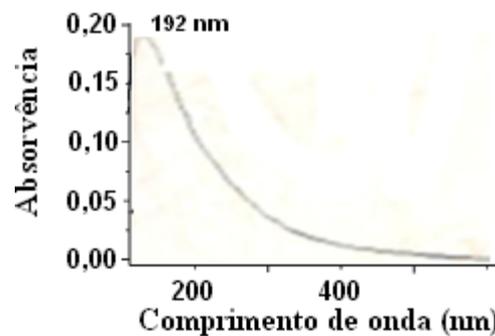


Figura 6.1 - Espectro de uma solução aquosa de gabapentina de concentração $64,1 \pm 1,1$ ppm.

Para avaliar a linearidade dos métodos foi efetuado o cálculo da regressão linear pelo método dos mínimos quadrados e calculado o valor dos residuais e o coeficiente de correlação, recomendado pela ICH.²⁵ A representação gráfica da absorvência a 192 nm em função da concentração de gabapentina e a representação dos residuais estão apresentados na **Figura 6.2 A e B**, respectivamente. Os valores de absorvência obtidos para cada padrão encontram-se em anexo na **Tabela A8**.

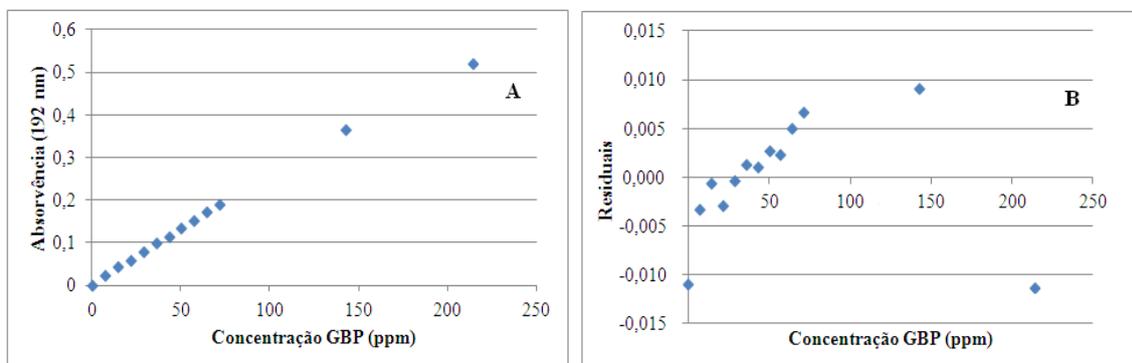


Figura 6.2- (A) - Curva de calibração de gabapentina em solução aquosa correspondente à absorvência a 192 nm; (B) - Evolução dos residuais em função da concentração de gabapentina para o método Direto.

Apesar do coeficiente de correlação estar acima do critério de aceitação, o cálculo dos residuais demonstrou a presença de possíveis outliers, soluções padrão que estariam a fazer a curva desviar-se da linearidade, diminuindo a relação linear entre a concentração de gabapentina e a sua absorvência a 192 nm. Atendendo a que os residuais são obtidos pela diferença, em valor absoluto, entre os valores obtidos e os valores previstos, o residual que possua maior diferença poderá constituir um valor limitante da linearidade, pelo que é considerado um outlier e deverá ser desprezado. Os residuais devem apresentar perfil aleatório sem nenhuma tendência óbvia, revelando a ausência de erros sistemáticos.²⁵

Para o método Direto como critérios de aceitação internos tem-se que o coeficiente de correlação deverá ser igual ou superior a 0,999 e residuais com distribuição aleatória e valor (em módulo) igual ou inferior a 0,012. Assim o padrão número 12, de concentração $213,6 \pm 2,5$ ppm, foi o outlier desprezado. O desvio padrão dos residuais é indicador da incerteza relativa à curva de calibração, tendo-se obtido um valor de 0,006 e 0,003 antes e após a remoção do padrão supramencionado. Após a remoção do padrão 12 da reta de calibração obteve-se uma reta com uma elevada linearidade. A correspondente reta de calibração e os residuais após remoção do outlier encontram-se apresentados na **Figura 6.3 A e B**. Na mesma pode-se verificar uma distribuição independente a nível dos residuais.

O valor dos limites de deteção e quantificação foram obtidos de duas formas distintas, pela estimativa através da razão entre o desvio padrão do sinal e o declive da reta e também de acordo com entidades como a IUPAC e ICH, pelo desvio padrão de brancos, ligeiramente fortificados com o analíto.^{25,30} Para esta última estimativa fizeram-se 20 leituras dos brancos fortificados e foi efetuada a razão entre o desvio padrão do sinal e o declive da reta, de acordo com a respetiva razão sinal/ruído. A **Tabela A9**, apresentada em anexo contem os valores do sinal obtido para os brancos ligeiramente fortificados, o seu desvio padrão. A **Tabela 6.1** resume os parâmetros da reta para o método Direto.

Comparação de métodos analíticos na quantificação do teor de Gabapentina em diversas cápsulas de diversos laboratórios

Tabela 6.1 - Parâmetros da reta de calibração para o método Direto.

Parâmetros da Reta	Método Direto $\lambda_{\text{análise}} 192 \text{ nm}$
Equação da reta (95 % confiança)*	$A=[2,554\pm0,048]\times 10^{-3}C_{\text{GBP}} + [0,65\pm0,28]\times 10^{-2}$
Sensibilidade (ppm^{-1})*	$(2,554\pm0,048)\times 10^{-3}$
LD_{Sr} (ppm)*	3,18
LQ_{Sr} (ppm)*	10,60
LL (ppm)*	142,42
GD*	13,44
LD_{Sb} (ppm)*	1,92
LQ_{Sb} (ppm)*	6,40

*Cálculos efetuados de acordo com as expressões contidas em k) e l) no anexo de equações

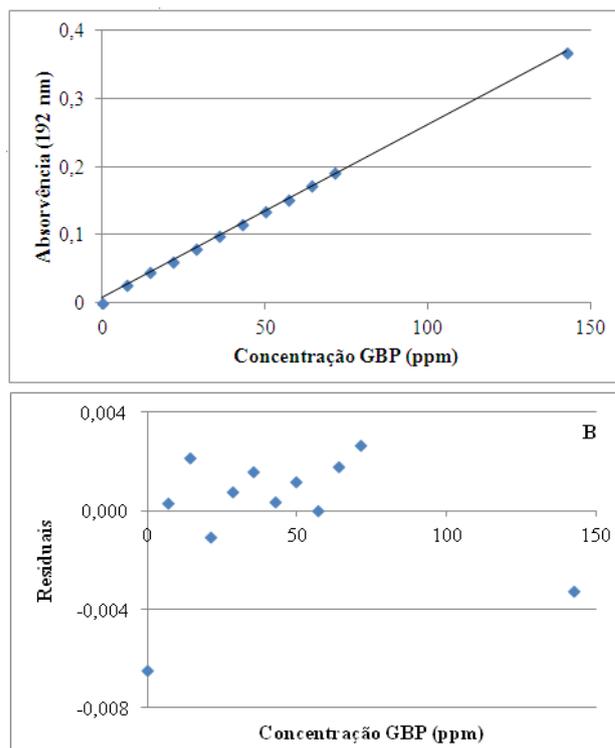


Figura 6.3 – (A) - Reta de calibração da gabapentina em solução aquosa a 192 nm; (B) - Residuais do método Direto após remoção do outlier.

O método Direto apresentou linearidade numa gama de concentrações entre 6,40 e 142,42 ppm, obedecendo à lei de Lambert-Beer nesse intervalo. Sendo esta uma função linear, a sensibilidade do método pode ser avaliada pelo declive da reta de calibração. Assim obteve-se uma sensibilidade reduzida para o método Direto, designadamente $(2,554\pm0,048)\times 10^{-3} \text{ ppm}^{-1}$. A equação da reta foi a seguinte: $A=[(2,554\pm0,048)\times 10^{-3}]C_{\text{GBP}} + [(0,65\pm0,28)\times 10^{-2}]$, para um grau de confiança de 95 % e a mesma apresentou um coeficiente de correlação muito próximo da unidade, 0,9993.

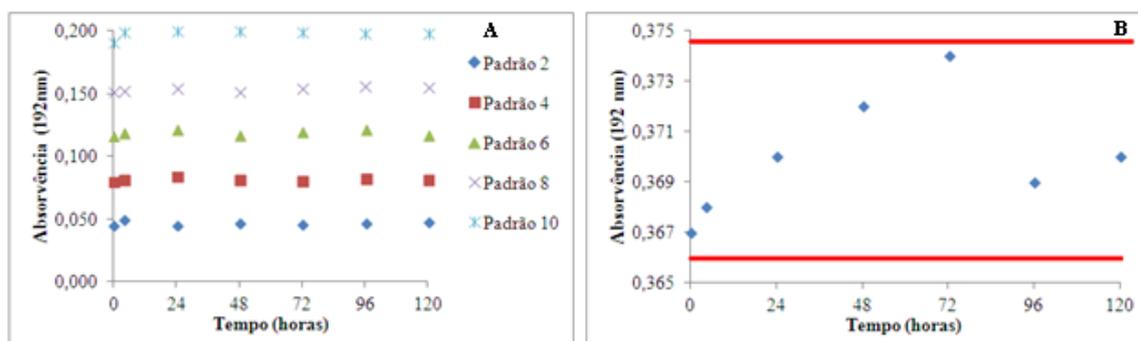
A estabilidade de produtos farmacêuticos é definida como a capacidade do produto manter as suas características iniciais, durante um determinado período de tempo e sob diversas condições, dentro de limites estabelecidos, dependendo de fatores como o pH, temperatura, humidade, fatores inerentes ao processo de fabrico, à própria formulação ou princípio ativo.²⁹

No estudo da estabilidade das soluções aquosas de gabapentina, nomeadamente das soluções padrão, foi feita a sua análise em vários momentos: imediatamente após a preparação das soluções, cerca de quatro horas após, e diariamente até 120 horas após a sua preparação, tendo sido as mesmas armazenadas num local frio e escuro durante este período de tempo. A avaliação da estabilidade foi feita a três níveis distintos: análise da

Comparação de métodos analíticos na quantificação do teor de Gabapentina em diversas cápsulas de diversos laboratórios

evolução da absorvência e concentração das soluções padrão e evolução da reta de calibração ao longo do tempo. Estes ensaios permitem determinar o tempo durante o qual as soluções preparadas podem ser armazenadas, em determinadas condições, sem que haja degradação do analíto.

As absorvências dos padrões foi analisada ao longo de 120 horas e os valores encontram-se discriminados na **Tabela A10**, em anexo. Como critério de aceitação, qualquer solução padrão que mantenha um coeficiente de variação das absorvências abaixo dos 2,00 % considera-se estável.²⁹ À exceção das soluções padrão 0,1, 2 e 3, de concentrações de gabapentina de $0,0_0 \pm 0,0_0$, $7,1_2 \pm 0,4_3$, $14,2_4 \pm 0,4_4$ e $21,3_6 \pm 0,5_9$ ppm, respetivamente, todas as soluções mantiveram o coeficiente de variação das absorvências abaixo do limite de aceitação. Isto está relacionado, não com uma grande dispersão dos resultados obtidos nos padrões 0, 1, 2 e 3, mas com o fato do valor da absorvência destes padrões ser baixo, o que, tendo em conta a expressão usada no cálculo do coeficiente de variação, origina valores acima do aceitável. A solução que mais se manteve estável foi o padrão 12, de concentração, $213,6 \pm 2,5$ ppm, tendo obtido um coeficiente de variação de 0,34 %. Foram escolhidos vários padrões para analisar a estabilidade das soluções e verificar a variação da absorvência das mesmas no período analisado, tendo sido os padrões número 2, 4, 6, 8 e 10, de concentração em gabapentina de $14,2_4 \pm 0,4_4$, $28,4_8 \pm 0,6_0$, $42,7_2 \pm 0,7_3$, $56,9_7 \pm 0,9_7$ e $71,2 \pm 1,3$ ppm, respetivamente. Nas **Figuras 6.4 A e B** estão apresentadas a evolução da absorvência para cada um desses padrões ao longo de 120 horas, a 192 nm e a evolução do padrão 11, de concentração $142,4 \pm 1,7$ ppm, respetivamente.



Comparação de métodos analíticos na quantificação do teor de Gabapentina em diversas cápsulas de diversos laboratórios

Dentro dos padrões analisados com maior rigor, o padrão 8, de concentração $56,97 \pm 0,97$ ppm e média de absorvências de 0,154 obteve o valor mais baixo de coeficiente de variação, nomeadamente 0,97 %, seguido do padrão 4 de concentração $28,48 \pm 0,60$ ppm, média de absorvências de 0,082 e coeficiente de variação de 1,57 %. Seguem-se os padrões 10, 6 e 2, que obtiveram coeficientes de variação de 1,57, 1,73 e 3,20 %, respetivamente. O padrão 2 obteve um valor de coeficiente de variação superior ao limite de aceitação, pelo motivo acima referido. Como se pode observar pela **Figura 6.4 B**, a absorvência do padrão 11 manteve-se entre 98-102 % do sinal obtido logo após a preparação do padrão.

Na **Tabela 6.2** estão apresentadas as retas de calibração obtidas para o método Direto ao longo do tempo, na sua gama linear, de forma a avaliar a estabilidade das retas de calibração do presente método. A **Figura 6.5** apresenta a reta de calibração das soluções analisadas logo após a sua preparação e 120 horas após a sua preparação.

Tabela 6.2 - Variação da equação da reta de calibração ao longo do tempo para o método Direto.

Tempo (horas)	Sensibilidade (ppm ⁻¹)*	Ordenada na origem*	Coefficiente de correlação (r ²)*
0	$(2,555 \pm 0,048) \times 10^{-3}$	$(0,65 \pm 0,28) \times 10^{-2}$	0,999
4	$(2,552 \pm 0,075) \times 10^{-3}$	$(0,93 \pm 0,43) \times 10^{-2}$	0,998
24	$(2,575 \pm 0,079) \times 10^{-3}$	$(9,13 \pm 0,46) \times 10^{-2}$	0,998
48	$(2,587 \pm 0,078) \times 10^{-3}$	$(0,83 \pm 0,45) \times 10^{-2}$	0,998
72	$(2,602 \pm 0,067) \times 10^{-3}$	$(0,75 \pm 0,39) \times 10^{-2}$	0,999
92	$(2,568 \pm 0,081) \times 10^{-3}$	$(0,94 \pm 0,47) \times 10^{-2}$	0,998
120	$(2,572 \pm 0,072) \times 10^{-3}$	$(0,85 \pm 0,42) \times 10^{-2}$	0,998

*Cálculo de acordo com expressões contidas em k) no anexo de equações

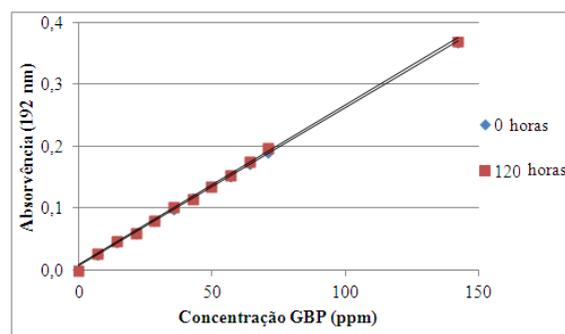


Figura 6.5 - Evolução da reta de calibração durante 120 horas de análise para o método Direto.

A reta de calibração do método Direto manteve tanto o declive como a ordenada na origem bastante estável durante o período analisado, para um nível de confiança de 95 %, mantendo desta forma a sua sensibilidade constante ao longo do período analisado. A relação entre a curva de calibração do método logo após a preparação das soluções padrão e a curva obtida ao longo do período analisado constitui uma forma de avaliar a estabilidade as soluções padrão. Segundo o *Handbook of Analytical Validation*, o critério de aceitação para esta razão encontra-se delimitado entre 98-102 %.³³ A relação entre o declive das retas encontrou-se entre 98,18 e 100,10 % quando analisadas ao longo de 120 horas, o que se encontra dentro dos limites de aceitação, podendo-se afirmar que, de um modo geral as soluções padrão mantiveram estável a sua

absorvência. A variação no seu declive foi tão baixa que para análises efetuadas imediatamente e 120 horas após a preparação das soluções havia total sobreposição das retas, pelo que apenas se representa os extremos. Usando as equações da reta obtidas para as análises efetuadas ao longo do tempo foi possível verificar a variação da concentração de gabapentina nas soluções padrão. Foram avaliadas as soluções 2, 4, 6 e 8, tendo-se obtido coeficientes de variação de 3,59, 1,32, 0,87 e 0,94 %, respetivamente, para as 120 horas de análise. O padrão 2 não manteve a concentração de gabapentina abaixo do valor de aceitação limite para ser considerado estável, 2,00 %, de forma análoga ao verificado na análise da absorvência dos padrões. A solução padrão que se manteve a sua concentração mais estável ao longo de 120 horas foi o padrão 6.³³ Assim, pode-se afirmar que as soluções aquosas de gabapentina são estáveis e mantêm a sua concentração durante, pelo menos, 120 horas a cerca de 4 °C.

Para a correta e completa estimativa da precisão do método, alguns fatores deveriam ser alterados, como o dia das análises, o analista, o laboratório, entre outros. Uma vez que os recursos eram limitados e apenas havia um analista, o único fator que se fez variar foi o dia de análise, podendo-se assim afirmar que se analisou não só a repetibilidade mas também a precisão intermédia dos métodos.²⁹ A repetibilidade foi avaliada pela realização de seis ensaios de doseamento da gabapentina pura, no mesmo dia de preparação das soluções, pelo mesmo analista e instrumentos. A precisão intermédia foi analisada pela elaboração de quatro ensaios em dias consecutivos e posteriores à preparação das mesmas. A precisão será apresentada sob a forma de coeficiente de variação (RSD) e a exatidão será apresentada por via do erro relativo (ER).

De forma a avaliar a precisão e exatidão do método Direto foram preparadas três soluções de diferentes concentrações de gabapentina, designadamente $10,6_8 \pm 0,4$, $31,1_5 \pm 0,7_4$ e $39,2 \pm 1,2$ ppm, apresentadas em anexo na **Tabela A11**. A estas soluções foram efetuadas seis análises no dia em que foram preparadas e uma análise a cada dia após a preparação das mesmas, em quatro dias consecutivos, estando na **Tabela 6.3**, apresentada a média dos resultados obtidos para cada nível de concentração. Utilizou-se para o cálculo das concentrações a reta de calibração obtida logo após a preparação dos padrões. Os resultados individuais encontram-se na **Tabela A12** e **Tabela A13**, para análises efetuadas no mesmo dia e em dias alternados, respetivamente.

Comparação de métodos analíticos na quantificação do teor de Gabapentina em diversas cápsulas de diversos laboratórios

Tabela 6.3- Coeficiente de variação e erro relativo do método Direto para análises efetuadas no mesmo dia e em dias alternados.

Método	Ensaio dentro do mesmo dia (N=6)						Ensaio em dias alternados (N=4)					
	$C_{\text{GBPesperada}} \pm e_{\text{conc}}(\text{ppm})^*$	$C_{\text{GBPobtida}} \pm ec(\text{ppm})^*$	SD*	RSD (%)*	RSD _H (%)*	RE (%)*	$C_{\text{GBPobtida}} \pm ec(\text{ppm})^*$	SD*	RSD (%)*	RSD _H (%)*	RE (%)*	
Direto	10,6 ₈ ±0,4 ₄	10,7 ₇ ±2,6 ₆	0,29	2,75	8,60	0,25	10,5 ₅ ±2,6 ₆	0,20	1,87	8,60	-1,88	
	31,1 ₅ ±0,7 ₄	31,0 ₀ ±2,5 ₅	0,59	1,90	7,32	-0,50	31,2 ₂ ±2,5 ₅	0,37	1,20	7,32	0,23	
	39,2 ₂ ±1,2	39,7 ₇ ±2,5 ₅	0,58	1,45	7,07	1,30	39,8 ₈ ±2,5 ₅	0,37	0,94	7,07	1,72	

*Cálculos feitos a partir das expressões contidas em d), e), f), j) e o) no anexo de equações

Para as análises efetuadas no mesmo dia o coeficiente de variação variou entre 1,45 e 2,75 % e para análises em dias alternados esteve entre 0,94 e 1,87 %, valores que se encontram dentro dos limites de aceitação para concentrações de analíto na ordem das dezenas de ppm de analíto, abaixo de 7,30 %, segundo a AOAC ou, de forma mais específica, coeficientes de variação abaixo dos valores de RSD_H.²⁹ Assim confirma-se a elevada precisão do método pela obtenção de valores bastante inferiores ao limite. A exatidão do método foi avaliada pelo cálculo dos valores de erro relativo. Esta forma de determinar a exatidão do método é apenas uma aproximação, uma vez que o erro relativo deveria ser calculado com recurso a um MRC e foi definido como valor real o valor indicado pelo fabricante, 100 mg. Obtiveram-se valores de erro relativo entre 0,25 e 1,30 % para as análises efetuadas no mesmo dia e 0,23 e 1,88 % para análises efetuadas em dias alternados, valores abaixo do limite de aceitação, 5,00 %.⁴¹ Assim, o método pode-se afirmar exato. Posteriormente a exatidão do método será também avaliada através de ensaios de recuperação e será feita a comparação entre os valores obtidos pelo método de referência e o método Direto efetuado na presente monografia, de forma a verificar a presença de diferenças significativas entre a precisão e exatidão.

A recuperação do método é um bom indicador da exatidão do método, ou seja, da proximidade entre o valor real da amostra e o valor teórico. Esta, segundo a ICH, deve ser obtida após estabelecidas a linearidade, especificidade e precisão do método, devendo ter um mínimo de 9 determinações de três soluções de diferentes concentrações, três réplicas cada.²⁵ Uma das maiores limitações dos ensaios de recuperação é o fato de que o analíto na solução *Stock* pode não estar na mesma forma que o analíto presente na amostra.

Para avaliar a recuperação do método Direto foram fortificadas soluções de concentração fixa de gabapentina pura com três soluções de diferentes concentrações de amostra de Neurotin[®], tendo-se obtido concentrações de 22,2₄±0,9₅, 34,2₂±1,2 e 46,2₂±1,7 ppm. A forma de preparação das soluções para os ensaios de recuperação e a sua

Comparação de métodos analíticos na quantificação do teor de Gabapentina em diversas cápsulas de diversos laboratórios

concentração encontra-se em anexo na **Tabela A14**. É assim apresentada a recuperação média para cada nível de concentração na **Tabela 6.4**, estando os resultados obtidos para cada ensaio individual apresentados em anexo, na **Tabela A15**. Na **Figura 6.6** está apresentado o gráfico da concentração de gabapentina recuperada em função da concentração da gabapentina fortificada.

Tabela 6.4 - Média dos ensaios de recuperação do método Direto.

Método	C _{GBPesperada} ±ec (ppm)*	C _{GBP} ±ec (ppm)*	Recuperação ±SD (%)*
	22,2 ₄ ±0,9 ₅	46,3 ₃ ±2,5 ₅	100,6 ₆ ±3,2 ₂
Direto	34,2 ₂ ±1,2 ₂	22,1 ₁ ±2,5 ₅	99,2 ₂ ±2,5 ₅
	46,2 ₂ ±1,7 ₇	34,2 ₂ ±2,5 ₅	99,7 ₇ ±2,7 ₇

*Cálculos efetuados de acordo com as expressões contidas em d), j), m) e o) no anexo de equações

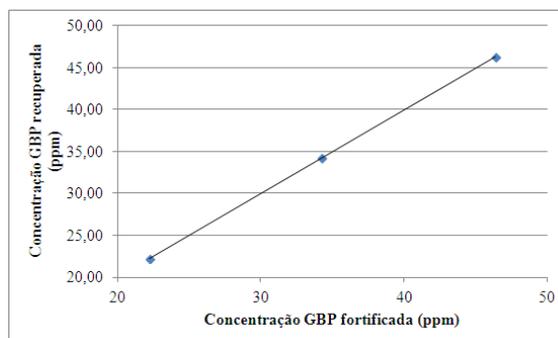


Figura 6.6 - Relação entre a concentração de gabapentina recuperada e fortificada para o método Direto.

O método Direto obteve recuperações muito próximas de 100 %, tendo obtido uma média de recuperações de 99,8₈±2,7₇ %. Estes valores encontram-se dentro dos limites de aceitação, indicados pela AOAC, para a ordem de concentrações com que se está a trabalhar, ordem das dezenas de ppm, 80-110 %.²⁹

A função concentração de analíto recuperada e fortificada possibilita a avaliação da linearidade do método de análise.⁴⁴ Pretendem-se declives e coeficientes de correlação próximos da unidade, estimando desta forma a capacidade do método se desviar linearmente da recuperação ideal, 100 %. Para o método Direto, a relação concentração de gabapentina recuperada e fortificada apresentou um declive de 0,99₈±0,04₀ ppm⁻¹ e um coeficiente de correlação de 1,000, pelo que se pode afirmar que a concentração fortificada foi estatisticamente semelhante à concentração recuperada e que o método é linear dentro da gama avaliada.⁴⁴

A especificidade de um método analítico demonstra que o mesmo não dá resposta positiva a amostras que não contém analíto, mostrando também que a matriz da amostra não interfere na análise. Os ensaios de recuperação do método Direto possibilitaram a verificação da existência de interferências por parte dos excipientes presentes nas cápsulas de gabapentina, tal como o talco, amido de milho, lactose (monohidratada ou anidra). Uma vez que se obteve para o presente método uma recuperação

Comparação de métodos analíticos na quantificação do teor de Gabapentina em diversas cápsulas de diversos laboratórios

média de $99,8 \pm 2,7$ %, pode-se aferir que a interferência dos excipientes é pouco significativa na análise quantitativa da gabapentina.

Outra forma de avaliar a especificidade do método, segundo as normas da AOAC, é a razão entre o declive das curvas para o método reta de calibração e adição de padrão, as quais devem ser paralelas e apresentar uma razão entre os declives entre 98 e 102 %. Assim, foram preparadas as soluções padrão do método Direto novamente mas com a adição de uma determinada quantidade, fixa, de amostra, o método da adição de padrão, o qual elimina efeitos da matriz.²⁹ Foram adicionados 0,45 mL da solução de amostra, feita através de uma cápsula de Neurotin[®], e igual volume de solução *Stock* relativamente ao método da reta de calibração, de acordo com a **Tabela A16**, apresentada em anexo. Na **Figura 6.7** está apresentado o declive das retas de calibração e adição de padrão.

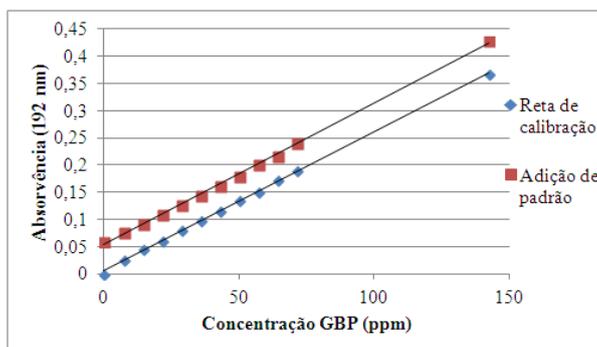


Figura 6.7 - Declive método reta de calibração e adição de padrão pelo método Direto.

A equação da reta para o método da adição de padrão foi: $A = [(2,59_9 \pm 0,06_0) \times 10^{-3}] C_{GBP} + [(5,3_9 \pm 0,3_5) \times 10^{-2}]$, para um grau de confiança de 95 %. O quociente entre o declive obtido pelo método da reta de calibração e adição de padrão foi de 98,28 %, pelo que se encontra dentro dos critérios de aceitação pela AOAC, valores entre 98-102 %.²⁹ A concentração da solução de amostra obtida pelo método da adição de padrão foi de $20,7 \pm 1,2$ ppm, de acordo com a equação n), apresentada no **Anexo de equações**, que corresponde a $103,7_0 \pm 0,3_0$ mg de gabapentina por cápsula, o que demonstra baixa interferência dos excipientes pelo método da reta de calibração.

Uma vez que o primordial objetivo deste estudo era a determinação do teor de gabapentina em cápsulas, este foi o passo seguinte. Assim, foram preparadas amostras de cada uma das cápsulas de gabapentina dos diferentes laboratórios, de forma idêntica para todas, segundo a **Tabela A17** e os valores individuais de recuperações obtidas para as cápsulas estão apresentadas na **Tabela A18**, ambas em anexo. Na **Tabela 6.5** estão

Comparação de métodos analíticos na quantificação do teor de Gabapentina em diversas cápsulas de diversos laboratórios

apresentados as recuperações médias obtidas para as diferentes cápsulas pelo método Direto.

Tabela 6.5 - Recuperações obtidas para as diferentes cápsulas para o método Direto.

Método Proposto (N=6)		Gabomox [®]	Neurotin [®]	Ratiopharm	Teva	Generis	Método Referência (N=5) ⁴⁵
Direto	Recuperação ±SD(%) [*]	99,5±1,6	98,9±2,5	97,9±2,1	98,2±1,6	101,2±2,3	99,55±1,45
	$t_{calculado}$ (95%) [*]	-0,02	-0,53	-1,50	-1,42	1,36	$t_{tabelado}$ (95%) [*] 2,57
	$F_{calculado}$ (95%) [*]	1,21	2,92	2,00	1,21	2,49	$F_{tabelado}$ (95%) [*] 6,26

^{*}Cálculos efetuados de acordo com expressões contidas em d), g), h) e o) no anexo de equações

O método Direto foi aplicado com sucesso à determinação de gabapentina nas cápsulas e os resultados obtidos foram comparados com os obtidos pelo método espectroscópico de referência, o qual obteve uma recuperação de 99,55±1,45 %, através da aplicação do teste *t-student* para a análise da exatidão e o teste *Fisher* para a análise da precisão do presente método, para 95 % de confiança.

O doseamento de gabapentina em cápsulas pelo método Direto esteve muito próximo do valor esperado, 100 mg, para todas as cápsulas de gabapentina, tendo-se obtido teores entre 97,9±2,1 e 101,2±2,3 %. O valor de *t-student* para o método Direto nunca excedeu os 1,50 em módulo e o valor de *Fisher* nunca foi superior a 2,92, sendo assim a hipótese nula (*H0*) aceite. Uma vez que os valores de *t-student* e *Fisher* obtidos experimentalmente em nenhum dos casos excederam os valores tabelados, 2,57 e 6,26, respetivamente, para 95 % de confiança, pode-se afirmar que não houve diferenças significativas entre os métodos efetuado e de referência, no que diz respeito à exatidão e precisão.

6.1.2 MÉTODO ETANOL/ÁGUA

Um dos fatores que mais afeta as propriedades de absorção de um cromóforo é o efeito da polaridade da molécula. Solventes polares como a água e álcoois têm maior tendência a diminuir o comprimento de onda máximo que solventes não polares. Além disso, o espectro de absorção de um analíto é sensível ao solvente utilizado. Assim, espera-se que o comprimento de onda máximo se altere com a modificação do solvente utilizado na preparação das soluções padrão.

Para a preparação das soluções *Stock* e *Intermédia* foi dissolvida uma determinada quantidade de gabapentina pura em água destilada, conforme apresentado na **Tabela A19**, em anexo, tendo sido obtidas concentrações de 6037±13 e 3019±19 ppm de gabapentina para as mesmas, respetivamente. As soluções *Stock* e *Intermédia* foram

Comparação de métodos analíticos na quantificação do teor de Gabapentina em diversas cápsulas de diversos laboratórios

usadas na preparação de doze soluções padrão de diferentes concentrações de analito, através da pipetagem de diferentes volumes, usando como solvente uma solução aquosa de etanol (1:1), como descrito em anexo na **Tabela A20**.

Para a escolha do comprimento de onda ao qual se realizou a análise foi feito o espectro de absorção do gabapentina a partir de uma solução de gabapentina em etanol/água (1:1), de concentração $483,0 \pm 5,1$ ppm. O máximo de absorção, como se pode observar na **Figura 6.8**, encontra-se aos 194 nm, tendo sido então a este comprimento de onda que se efetuaram as análises de todas as soluções.

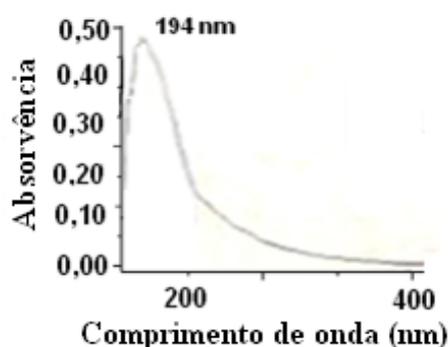


Figura 6.8 - Espectro de absorção de uma solução padrão de concentração $483,0 \pm 5,1$ ppm de gabapentina para o método Etanol/Água.

As soluções padrão foram sujeitas a uma única leitura da absorvência a 194 nm no espectrofotômetro Uv-Vis, estando os valores estão apresentados em anexo na **Tabela A21**. De forma a aumentar a linearidade da reta e assim garantir a resposta linear entre a absorvência das soluções e a sua concentração, houve a necessidade de eliminar alguns pontos da curva de calibração. Para isso calcularam-se os residuais e verificou-se a evolução do coeficiente de correlação com a eliminação dos principais outliers. As representações gráficas da curva de calibração e dos residuais para o método Etanol/Água, encontram-se ilustrados na **Figura 6.9 A e B**, respetivamente.

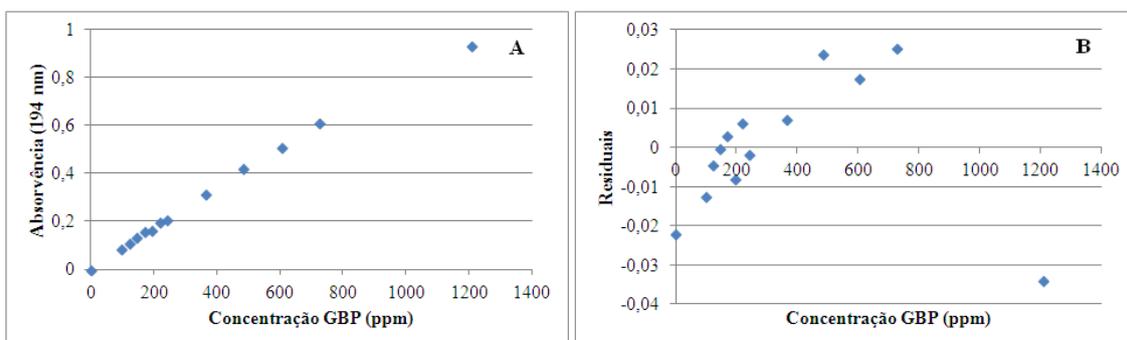


Figura 6.9 - (A) - Curva de calibração de gabapentina em solução alcoólica a absorvência a 194 nm; (B) - Evolução dos residuais em função da concentração de gabapentina.

Comparação de métodos analíticos na quantificação do teor de Gabapentina em diversas cápsulas de diversos laboratórios

As soluções padrão que obtiveram maiores valores de residual, em módulo, eram os pontos que estariam a fazer a curva desviar-se da linearidade e foram por isso desprezados. Como critérios de aceitação internos tem-se que coeficientes de correlação iguais ou superiores a 0,999 e valores de residuais inferiores a 0,034 são requeridos. Apenas o padrão número 12, de concentração $1207,4 \pm 8,2$ ppm, foi dado como outlier, tendo sido o único padrão desprezado. O desvio padrão dos residuais antes e após a remoção do padrão 12 passou de 0,017 a 0,006, respetivamente. Assim obteve-se uma reta com uma elevada linearidade entre 96,6 e 724,5 ppm, com uma distribuição independente dos residuais, como se pode observar pela análise da **Figura 6.10 A e B**.

De forma análoga ao método anterior foram calculados os parâmetros da reta para o método Etanol/Água. Os valores do sinal do branco fortificado estão representados na **Tabela A22** do anexo. O resumo destes parâmetros encontra-se apresentado na **Tabela 6.6**.

Tabela 6.6 - Parâmetros da reta para o método Etanol/Água.

Parâmetros da reta	Método Etanol/Água $\lambda_{\text{análise}} 194 \text{ nm}$
Equação da reta (95% confiança)*	$A = [(8,4_0 \pm 0,1_9) \times 10^{-4}] C_{\text{GBP}} + [(1,0_3 \pm 0,6_5) \times 10^{-2}]$
Sensibilidade (ppm^{-1})*	$(8,4_0 \pm 0,1_9) \times 10^{-4}$
LD_{Sr} (ppm)*	21,60
LQ_{Sr} (ppm)*	72,00
LL (ppm)*	724,44
GD*	10,06
LD_{Sb} (ppm)*	17,51
LQ_{Sb} (ppm)*	58,37

*Cálculos efetuados de acordo com as expressões contidas em k) e l) no anexo de equações

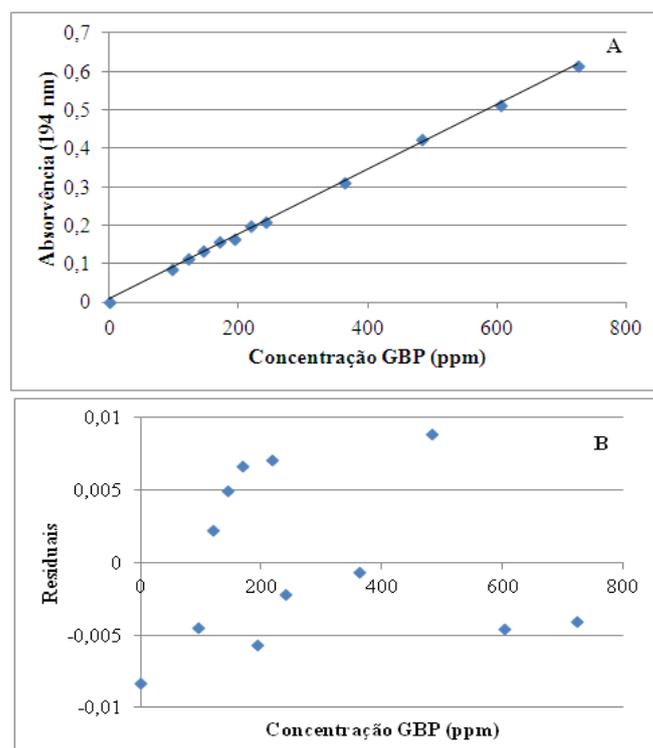


Figura 6.10 – (A) - Reta de calibração para o método Etanol/Água a 194 nm; (B) - Residuais do método Etanol/Água após a remoção do outlier.

O método Etanol/Água observou-se linear numa gama de concentrações entre 58,37 e 724,44 ppm e obteve uma sensibilidade baixa, designadamente $(8,4_0 \pm 0,1_9) \times 10^{-4} \text{ ppm}^{-1}$. A equação da reta foi a seguinte: $A = [(8,4_0 \pm 0,1_9) \times 10^{-4}] C_{\text{GBP}} + [(1,0_3 \pm 0,6_5) \times 10^{-2}]$, para 95

% de confiança, tendo a mesma obtido um coeficiente de correlação muito próximo da unidade, 0,9990. O método Etanol/Água obteve limites de detecção e quantificação bastante elevados e uma sensibilidade muito baixa para o objetivo proposto, pelo que o doseamento de gabapentina seria pouco rigoroso. Por este motivo a gabapentina em cápsulas não foi quantificada por este método, sendo apenas utilizado para comparação a nível dos parâmetros da reta.

6.1.3 MÉTODO HCL 0,1 M

O efeito da protonação da molécula de gabapentina na absorção de radiação foi avaliado, uma vez que a protonação ou desprotonação de uma molécula pode alterar o seu cromóforo, desde que este seja ionizável. Se o cromóforo da molécula for próximo do seu ponto de ionização, variações no pH vão ser responsáveis por alterações espectrais. Uma vez que a gabapentina em solução aquosa se encontra na forma neutra (grupo amina protonado e grupo carboxílico desprotonado), a adição de uma solução ácida provoca a protonação a nível deste último grupo funcional. Assim, a análise espectroscópica de uma solução ácida de gabapentina pretende verificar se a alteração do grupo ácido carboxílico (neste caso a protonação) terá influência na absorção de radiação por parte da gabapentina. Foi também testada a análise espectroscópica de uma solução básica (NaOH 0,1 M) de gabapentina, de forma a verificar se a desprotonação do grupo amina teria influência na análise espectral da gabapentina.

Foram preparadas soluções *Stock e Intermédia* de concentração de gabapentina de $4058,0 \pm 8,4$ e $202,9 \pm 1,3$ ppm, respetivamente, através da dissolução de gabapentina pura em água bidestilada, como se encontra representado na **Tabela A23**, em anexo. Prepararam-se doze soluções padrão, de diferentes concentrações de analíto e ainda o branco, com o qual se fez a linha de base, usando como solvente uma solução de HCl 0,1 M, tal como apresentado na **Tabela A24**.

Para a escolha do comprimento de onda ao qual se iria realizar a análise foi traçado um espectro de absorção de uma solução de gabapentina de concentração $487,0 \pm 5,2$ ppm numa solução de HCl 0,1 M. Como se pode observar na **Figura 6.11**, este máximo de absorção encontra-se aos 206 nm, tendo sido então a este comprimento de onda que se efetuaram as análises de todas as soluções.

Comparação de métodos analíticos na quantificação do teor de Gabapentina em diversas cápsulas de diversos laboratórios

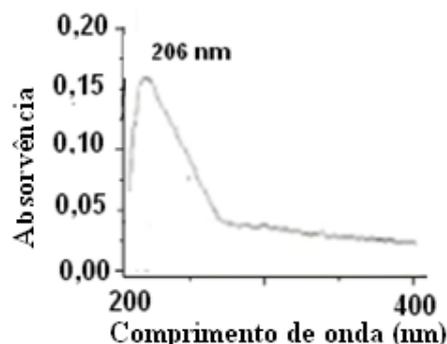


Figura 6.11 - Espectro de uma solução com $487,0 \pm 5,2$ ppm de gabapentina em HCl 0,1 M.

Uma vez que o comprimento de onda ao qual se verifica o máximo de absorção da gabapentina em solução ácida se manteve razoavelmente estável relativamente ao obtido por uma solução aquosa de gabapentina, pode-se aferir que a protonação do grupo carboxílico interfere pouco significativamente com a absorção de radiação pela gabapentina.

Como mencionado anteriormente foi também testado o método que usa uma solução de NaOH 0,1 M como solvente, o qual não apresentou nenhum máximo de absorção notável na região espectral do ultravioleta-visível. Pode-se, por este motivo e pelo fato da derivatização da gabapentina ocorrer sempre a nível do grupo amina, inferir que o grupo amina será responsável pela absorção deste analito por volta de 200 nm. Alterações a nível do grupo carboxílico não afetam a absorção de radiação por parte da gabapentina, mas quando estas ocorrem a nível do grupo amina alteram o cromóforo e deixa de haver absorção de radiação na região do visível.

Cada solução padrão do método HCl 0,1 M foi sujeita a uma única leitura da sua absorvência no espectrofotômetro Uv-Vis, a 206 nm (valores apresentados em anexo, na **Tabela A25**). A curva de calibração e os respectivos residuais estão representados pelas letras **A** e **B**, respetivamente, na **Figura 6.12**.

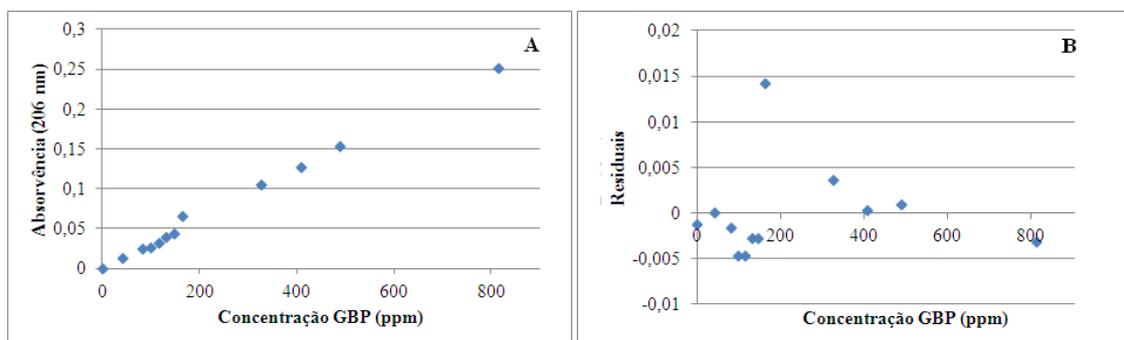


Figura 6.12- (A) - Curva de calibração da solução ácida de gabapentina a 206 nm; (B) - Evolução dos residuais em função da concentração de gabapentina.

Comparação de métodos analíticos na quantificação do teor de Gabapentina em diversas cápsulas de diversos laboratórios

A representação dos residuais em função da concentração de gabapentina mostrou distribuição aleatória. Os maiores valores de residuais em módulo foram os pontos desprezados, tendo sido o critério de rejeição qualquer valor igual ou superior a 0,014. Assim o padrão número 7, de concentração $162,3 \pm 2,7$ ppm, foi o outlier desprezado. A reta apresentou um desvio padrão dos residuais de 0,0051 antes da remoção do ponto referido e 0,0025 após a remoção do mesmo. Assim, após a remoção do outlier obteve-se uma reta com uma elevada linearidade entre 40,58 e 811,60 ppm e residuais com distribuição independente, apresentadas na **Figura 6.13 A e B**.

Posteriormente calcularam-se os parâmetros da reta para o método HCl 0,1 M, nomeadamente a equação da reta para 95 % de confiança, os limites de detecção e quantificação por ambas estimativas, estando os sinais dos brancos apresentados em anexo, na **Tabela A26**, limites de linearidade e gama dinâmica, apresentados se seguida, na **Tabela 6.7**.

Tabela 6.7 - Parâmetros da reta para o método HCl 0,1 M.

Parâmetros da reta	HCl 0,1 M $\lambda_{\text{análise}} 206 \text{ nm}$
Equação da reta (95% confiança)*	$A = [(3,135 \pm 0,077) \times 10^{-4}] C_{\text{GBP}} + [(-0,6 \pm 2,6) \times 10^{-3}]$
Sensibilidade (ppm^{-1})*	$(3,135 \pm 0,077) \times 10^{-4}$
LD_{Sr} (ppm)*	24,97
LQ_{Sr} (ppm) ⁺	83,25
LL (ppm)*	811,60
GD*	9,75
LD_{Sb} (ppm)*	25,21
LQ_{Sb} (ppm)*	84,02

*Cálculos efetuados de acordo com as expressões contidas em k) e l) no anexo de equações

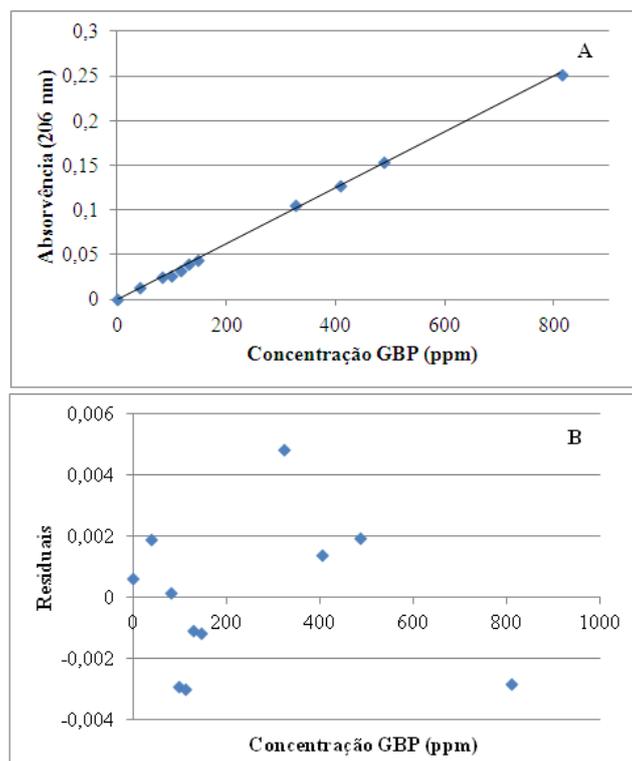


Figura 6.13 – (A) Reta de calibração para o método HCl 0,1 M a 206 nm; (B) - Residuais para o método HCl 0,1 M após a remoção do outlier.

O método HCl 0,1 M observou-se linear numa gama de concentrações entre 84,02 e 811,60 ppm e obteve uma sensibilidade bastante reduzida, $(3,135 \pm 0,077) \times 10^{-4} \text{ ppm}^{-1}$. A equação da reta foi a seguinte: $A = [(3,135 \pm 0,077) \times 10^{-4}] C_{\text{GBP}} + [(-0,6 \pm 2,6) \times 10^{-3}]$,

para um grau de confiança de 95 %, a qual apresentou um coeficiente de correlação muito próximo da unidade, 0,9990. O método HCl 0,1 M obteve limites de detecção e quantificação demasiado elevados para o objetivo proposto, quantificar a gabapentina em cápsulas, pelo que o método não foi considerado adequado e não foram efetuados mais testes.

6.2 MÉTODOS COM DERIVATIZAÇÃO DA GABAPENTINA

A derivatização é um método utilizado com o objetivo de produzir alterações na estrutura química do analito, de forma a dar origem a produtos fotometricamente ativos, em moléculas que não apresentem cromóforos ativos ou apresentem baixa absorção na região Uv-Vis. A derivatização faz-se através da alteração de um cromóforo do analito na análise por espectroscopia de absorção ou adição grupos fluorescentes para análise por espectralfluorimetria, dando origem a métodos adicionais de análise. Os objetivos dos métodos de derivatização englobam a alteração da volatilidade da amostra, redução da absorção do analito no sistema, melhoria da separação e resolução, aumento da estabilidade, eficiência e capacidade de detecção dos analitos, dependendo da técnica analítica que se utiliza, cromatografia gasosa (CG), cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e outras.⁴⁶ As técnicas de derivatização são utilizadas quando existe pouca especificidade da análise para o analito ou baixa sensibilidade do método, que por meio de reações de acilação, alquilação e sililação alteram quimicamente compostos de baixa absorção Uv-Vis produzindo moléculas altamente sensíveis. A derivatização pode ser química ou fotoquímica. Na derivatização química existe a alteração do cromóforo da molécula por meio de uma reação química. Na derivatização fotoquímica a alteração do analito é feita através da incidência de radiação específica. Esta última tem vantagens relativamente à convencional, como a redução de custos e gastos de reagentes e estabilidade das condições experimentais.⁴⁶

A escolha do reagente derivatizante baseia-se no cromóforo do analito. Grupos funcionais como aminas, ácidos carboxílicos, cetonas, aldeídos são grupos com capacidade de serem derivatizados. Alguns critérios devem ser seguidos na escolha do reagente derivatizante, por exemplo a capacidade de produzir uma reação completa com rendimentos entre 95 e 100 %, a formação de um produto de derivatização estável e sem perda de amostra durante a reação.⁴⁷

Na maioria dos aminoácidos não ocorrem transições eletrônicas, ou seja, estas moléculas não absorvem ou absorvem pouca radiação na região Uv-Vis. No entanto

alguns aminoácidos possuem um máximo de absorção e podem ser analisados entre 200 e 210 nm, ou, caso possuam na sua estrutura um anel benzénico, entre 250 e 280 nm. Contudo estas análises têm baixa seletividade e sensibilidade. Como consequência, métodos de derivatização têm sido desenvolvidos de forma a melhorar os parâmetros e o coeficiente de absorção dos métodos tradicionais, para mais fácil e rigorosa deteção. Nos aminoácidos a possibilidade derivatização dos dois grupos funcionais, ácido carboxílico e amina, aumenta bastante a gama de novos métodos de análise que são desenvolvidos e que podem ser usados na deteção destas moléculas.

Uma vez que a maioria das aminas não apresenta espetros de absorção ou emissão por si mesmas é essencial a utilização deste tipo de técnicas para a sua deteção. Os reagentes mais utilizados para a derivatização destas moléculas são a ninidrina, fluorescamina, *o*-ftalaldeído (OPA), fenilisotiocianato e cloreto de dansil. O reagente *o*-ftalaldeído tem vantagens relativamente aos outros, na medida em que diminui os limites de deteção e quantificação e a sua reação com as aminas é bastante rápida.⁴⁶

Na **Tabela 6.8**, estão apresentados os principais reagentes de derivatização para os diferentes grupos funcionais, de acordo com a reação de derivatização.

Tabela 6.8 - Reagentes de derivatização para os diferentes grupos funcionais.⁴⁸

Sililação	
Grupo funcional	Reagente de derivatização
Amina, ácido carboxílico, hidroxilo e amida	Bis(trimetilsilil) acetamida (BSA)
	Bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA)
	N-metil-trimetilsilil trifluoroacetamida (MSTFA)
	Trimetil clorosilano (TMCS)
	N-metil-N-butil dimetilsilil trifluoroacetamida (MTBSTFA)
Ácido carboxílico e Hidroxilo Hidroxilo	Trimetilsilil imidazol (TMSI)
	Hexametildisilazano (HMDS)
Acilação	
Grupo funcional	Reagente de derivatização
Amina, hidroxilo, amida	N-Metil-bis(trifluoro acetamida) (MBTFA)
	Anidrido trifluoro acético (TFAA)
	Ácido pentafluoro propiónico Anidrido (PFAA)
	Heptafluorobutiril imidazol (HFBI)
Amina, hidroxilo	Trifluoro acetil imidazole (TFAI)
Amina	Pentafluoro propani limidazole (PFPI)
Alquilação	
Grupo funcional	Reagente de derivatização
Hidroxilo e ácido carboxilo	Brometo de pentafluoro benzil (PFBBBr)
	Trifluoreto de boro (BF ₃) em metanol ou butanol
	Pentafluoro propanol (PFPOH)
Ácido carboxilo	Brometo de benzilo
	Hidróxido de tetrabutílamónio (TBH)
	Dimetilformamido (DMF)
	Diazometano (N ₂ CH ₂)

A gabapentina possui uma estrutura semelhante a um aminoácido, na medida em que possui um grupo amina e ácido carboxílico em cada uma das extremidades. Assim, a maioria dos métodos de derivatização de aminoácidos anteriormente descritos aplicam-se à mesma. Na literatura são descritas várias técnicas de derivatização para este analíto.⁴⁶

6.2.1 MÉTODO *p*-BENZOQUINONA

O reagente *p*-benzoquinona é utilizado como agente derivatizante na determinação de aminas primárias alifáticas. Este método de derivatização tem por base a reação de condensação da amina primária da gabapentina com o grupo carbonilo da benzoquinona, para formar uma imina e água. O grupo amina do analíto é sujeito a derivatização, de forma a alterar o cromóforo e formar um composto com banda de absorção na região Uv-Vis, a cerca de 369 nm, representado por (1) na **Figura 6.14**.³⁴

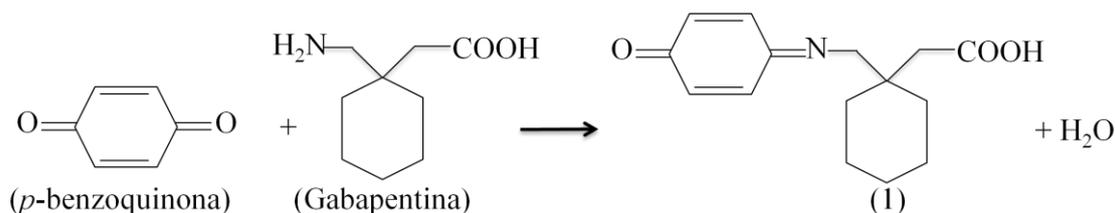


Figura 6.14 - Reação da *p*-benzoquinona com a gabapentina.³⁴

Neste método foram preparadas uma solução *Stock* de gabapentina de concentração 6037 ± 13 ppm, uma solução tampão fosfato 0,1 M e reagente *p*-benzoquinona 0,1 M em etanol. As mesmas encontram-se descritas em anexo nas **Tabelas A27** e **A8**. Prepararam-se onze soluções padrão, de diferentes concentrações de gabapentina, através da pipetagem de diferentes volumes de solução *Stock*, igual volume de tampão fosfato 0,1 M e reagente *p*-benzoquinona, seguidos de aquecimento em banho-maria a 90 °C durante cerca de 5 minutos. As concentrações dos padrões estão apresentadas em anexo na **Tabela A29**.

Na escolha do comprimento de onda ao qual se realizou a análise foi feito um varrimento espectral na região espectral entre 200 a 400 nm usando uma solução padrão de concentração de $217,3 \pm 2,0$ ppm de gabapentina. Como se pode observar na **Figura 6.15** o máximo de absorção encontra-se aos 350 nm.

Comparação de métodos analíticos na quantificação do teor de Gabapentina em diversas cápsulas de diversos laboratórios

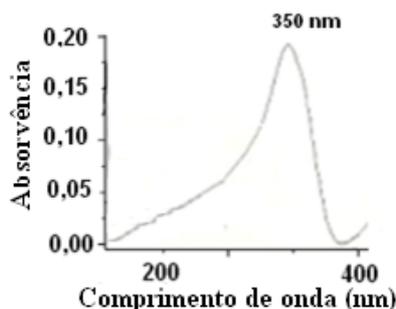


Figura 6.15 - Espectro de absorção de uma solução com o produto da derivatização de gabapentina com *p*-benzoquinona de concentração $217,3 \pm 2,0$ ppm.

A curva de calibração e os residuais para o método *p*-benzoquinona encontram-se representados pelas letras **A** e **B**, respectivamente na **Figura 6.16**, de acordo com os valores apresentados na **Tabela A30**, em anexo.

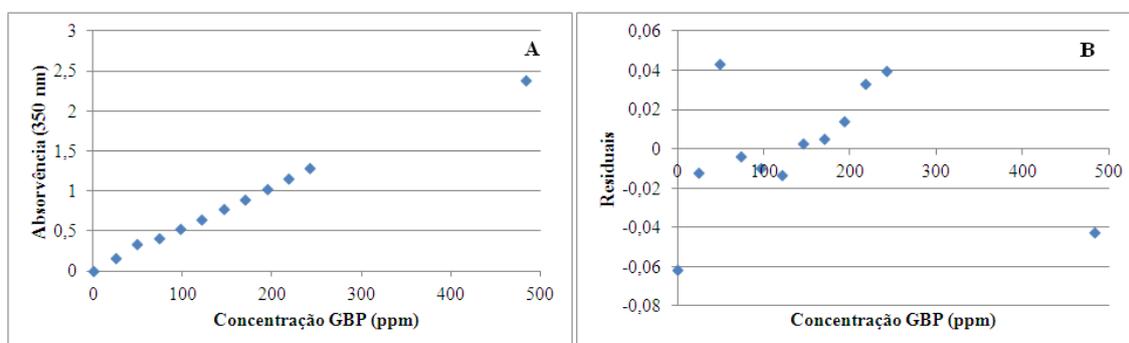


Figura 6.16 - (A) -Curva de calibração do método *p*-benzoquinona a 350 nm; (B) - Evolução dos residuais em função da concentração de gabapentina.

As soluções padrão que estariam a fazer a curva desviar-se da linearidade foram desprezados. Como critério de aceitação tem-se que a distribuição dos residuais em função da concentração de gabapentina deve ser livre de tendências, o coeficiente de correlação deve ser superior a 0,999 e qualquer valor de residual inferior a 0,042. Assim, os padrões número 2 e 11, de concentrações $48,3 \pm 1,5$ e $483,0 \pm 5,1$ ppm, respectivamente, foram os outliers desprezados. O desvio padrão dos residuais alterou-se significativamente antes e após a remoção dos padrões supramencionados, de 0,031 a 0,012. Verificou-se também haver uma dispersão aleatória dos residuais em função da concentração de gabapentina e um coeficiente de correlação de 0,9992, obtendo-se uma reta de elevada linearidade. Na **Figura 6.17 A** e **B** encontram-se apresentados a respectiva reta de calibração e a distribuição dos residuais após a remoção dos outliers que, como se pode observar, têm distribuição completamente aleatória. Os parâmetros da reta foram calculados para o método *p*-benzoquinona e estão apresentados na **Tabela**

6.9. A tabela referente ao sinal dos brancos fortificados, a partir da qual se estimou os valores dos limites de detecção e quantificação encontra-se em anexo, na **Tabela A31**.

Tabela 6.9 - Parâmetros da reta para o método *p*-benzoquinona.

Parâmetros da reta	Método <i>p</i> -benzoquinona $\lambda_{\text{análise}} 350 \text{ nm}$
Equação da reta (95% confiança)*	$A = [(5,2_3 \pm 0,1_3) \times 10^{-3}] C_{\text{GBP}} + [(2,1 \pm 1,9) \times 10^{-2}]$
Sensibilidade (ppm^{-1})*	$(5,2_3 \pm 0,1_3) \times 10^{-3}$
LD_{Sr} (ppm)*	7,38
LQ_{Sr} (ppm)*	24,59
LL (ppm)*	241,48
GD*	9,82
LD_{Sb} (ppm)*	2,19
LQ_{Sb} (ppm)*	7,30

*Cálculos efetuados de acordo com as expressões contidas em k) e l) no anexo de equações

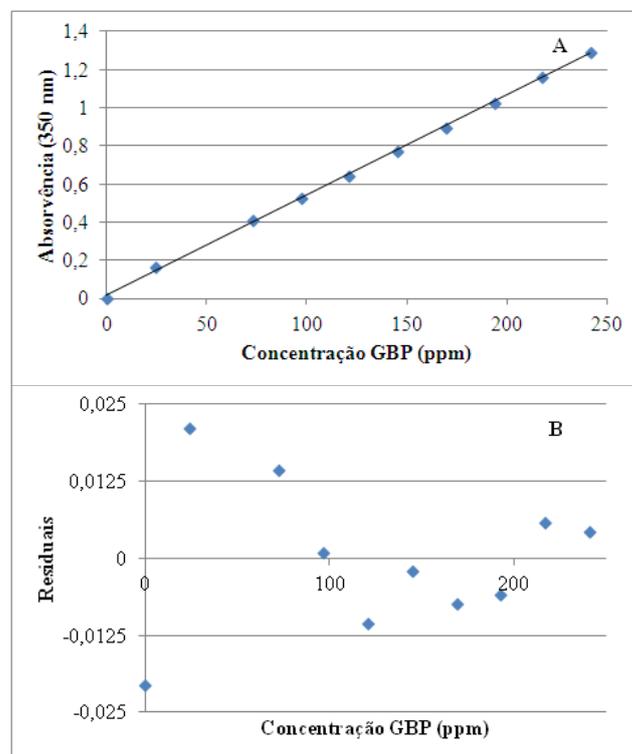


Figura 6.17 – (A) Retas de calibração do método *p*-benzoquinona a absorvência a 350 nm; (B) - Residuais do método *p*-benzoquinona após remoção dos outliers.

O método *p*-benzoquinona observou-se linear numa gama de concentrações entre 7,30 e 241,48 ppm e obteve uma sensibilidade de $(5,2_3 \pm 0,1_3) \times 10^{-3} \text{ ppm}^{-1}$. A equação da reta foi a seguinte: $A = [(5,2_3 \pm 0,1_3) \times 10^{-3}] C_{\text{GBP}} + [(2,1 \pm 1,9) \times 10^{-2}]$, para um nível de confiança de 95 %, a qual obteve um coeficiente de correlação de 0,9992. O método *p*-benzoquinona obteve limites de detecção e quantificação ajustados ao objetivo do trabalho, no entanto não foi utilizado na quantificação da gabapentina em cápsulas, uma vez que houve dificuldade em obter linearidade na reta e houve a necessidade de reproduzir várias vezes o método até se conseguir obter uma reta razoável. Assim, o método mostrou-se muito pouco robusto e bastante suscetível a variações.

6.2.2 MÉTODO VANILINA

O grupo amina primária alifática da gabapentina reage com uma vasta gama de reagentes derivatizantes, entre eles a vanilina através de uma reação de condensação com o grupo aldeído. Foram publicados vários métodos de doseamento de gabapentina

Comparação de métodos analíticos na quantificação do teor de Gabapentina em diversas cápsulas de diversos laboratórios

que utilizam como reagente derivatização a Vanilina pela capacidade que esta tem de alterar grupos amina primários, aumentando a sua absorção de radiação na região espectral do Uv-Vis. A representação da reação da Vanilina com a gabapentina está apresentada na **Figura 6.18**.³⁶

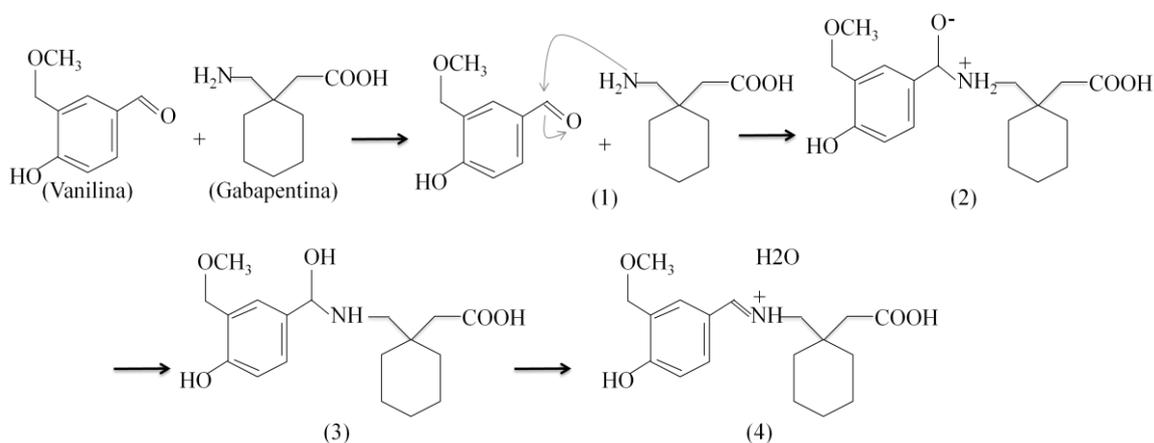


Figura 6.18 - Reação da Vanilina com a gabapentina.³⁶

A reação é desenvolvida através de catálise ácida. Os elétrons não ligantes do grupo amina vão atacar o carbono do grupo carbonilo, representado por (1), formando uma ligação entre o azoto e o carbono deixando o oxigênio negativo e o azoto positivo, representado por (2). Os pares de elétrons do oxigênio capturam o hidrogênio do grupo amina para o oxigênio, dando origem um grupo hidroxilo, de forma a deixar tanto o oxigênio como o azoto neutros e assim mais estáveis, formando um aminoalcool, representado por (3), na figura anterior. Este, na presença do ácido de Lewis tem o grupo hidroxilo protonado. O aminoalcool protonado perde uma molécula de água formando o ião imino. Por fim, os elétrons não ligantes do grupo amina formam uma ligação dupla e os elétrons ligantes do grupo hidroxilo vão formar água que se liberta. Assim forma-se um composto com cromóforo com considerável absorvência a 402 nm, representado por (4).

Para o desenvolvimento do método foram preparadas soluções *Stock* e *Intermédia* de gabapentina, solução tampão *McIlvaine* e reagente *Duquenois*, tal como se encontra apresentado em anexo, nas **Tabelas A32** e **A33**. As soluções *Stock* e *Intermédia* de concentrações 5934 ± 15 e 2967 ± 19 ppm, respetivamente, foram usadas na preparação de quinze soluções padrão, entre 0,0 e 1186,8 ppm. Estas foram preparadas através da pipetagem de diferentes volumes das soluções *Stock* e *Intermédia* e iguais volumes de tampão *McIlvaine* de pH 7,5 e reagente *Duquenois* como apresentado em

Comparação de métodos analíticos na quantificação do teor de Gabapentina em diversas cápsulas de diversos laboratórios

anexo na **Tabela A34**. As mesmas permaneceram a repousar à temperatura ambiente por um período de 30 minutos ao abrigo da luz. O tampão *McIlvaine* foi preparado através de soluções de ácido cítrico, hidróxido de sódio, ambos 0,1 M e fosfato disódico 0,2 M até se atingir um pH de 7,5. O reagente *Duquenois* consiste numa solução de Vanilina em etanol.

Para a escolha do comprimento de onda ao qual se realizou a análise foi feito o espectro de absorção do gabapentina, utilizando para isso uma solução padrão de concentração $712,1 \pm 7,6$ ppm. Na **Figura 6.19** é claro que o máximo se encontra a 392 nm, tendo sido então a este comprimento de onda que se efetuaram as análises de todas as soluções.

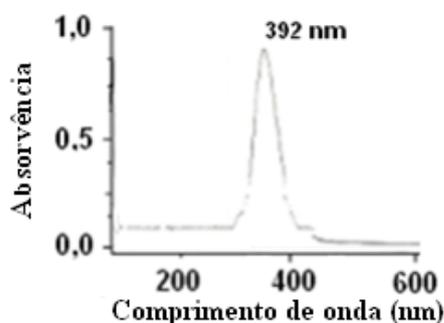


Figura 6.19 - Espectro de absorção de uma solução padrão do método Vanilina de concentração $712,1 \pm 7,6$ ppm de gabapentina.

Cada solução padrão foi sujeita a uma única leitura da sua absorvência no espectrofotómetro Uv-Vis, a 392 nm. Foram calculados os residuais, de forma a verificar quais os padrões que se desviavam de forma mais significativa da linearidade, estando os valores de absorvência e residuais apresentados em anexo, na **Tabela A35**. Na **Figura 6.20 A e B** estão apresentados a curva de calibração e os residuais obtidos para o método Vanilina.

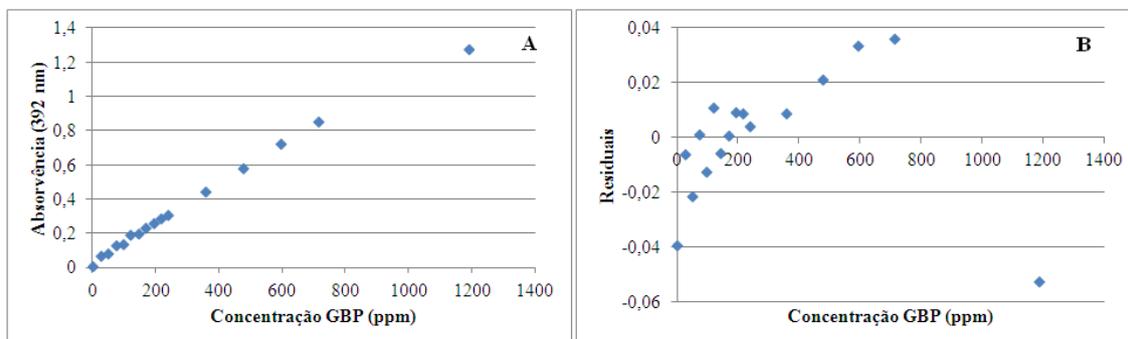


Figura 6.20 - (A) - Curva de calibração do método Vanilina a 392 nm; (B) - Evolução dos residuais em função da concentração de gabapentina.

Comparação de métodos analíticos na quantificação do teor de Gabapentina em diversas cápsulas de diversos laboratórios

Antes da remoção de qualquer outlier que mostrava fazer a curva desviar-se da linearidade, para concentrações baixas, os residuais do método Vanilina apresentaram dispersão aleatória. Contudo, para concentrações acima de 200 ppm os residuais mostraram alguma tendência, antes da remoção de qualquer ponto. O critério de rejeição foram valores de residuais iguais ou superiores a 0,039, em módulo, tendo sido os padrões número 0, e 15, de concentrações 0,0 e 1186,8 ppm, respetivamente, os outliers desprezados. Obteve-se assim uma reta com uma elevada linearidade, com um coeficiente de correlação de 0,9992. Neste método, o desvio padrão dos residuais foi 0,023 para a curva completa e 0,007 após a remoção dos padrões 0 e 15, tendo-se obtido uma reta de elevada linearidade e uma distribuição independente dos residuais, representados na **Figura 6.21 A e B**.

Na **Tabela 6.10** estão apresentados os valores dos parâmetros da reta obtidos para o método Vanilina. Os sinais obtidos para os brancos fortificados para o cálculo dos limites de deteção e quantificação estão apresentados na **Tabela A36**, em anexo.

Tabela 6.10 - Parâmetros da reta para o método Vanilina.

Parâmetros da reta	Método Vanilina $\lambda_{\text{análise}} 392 \text{ nm}$
Equação da reta (95% confiança)*	$A = [(1,14_4 \pm 0,02_1) \times 10^{-3}] C_{\text{GBP}} + [(4,5_0 \pm 0,6_7) \times 10^{-2}]$
Sensibilidade (ppm^{-1})*	$(1,14_4 \pm 0,02_1) \times 10^{-3}$
LD_{Sr} (ppm)*	19,23
LQ_{Sr} (ppm)*	64,08
LL (ppm)*	712,08
GD *	11,11
LD_{Sb} (ppm)*	10,36
LQ_{Sb} (ppm)*	34,55

*Cálculos efetuados de acordo com as expressões contidas em k) e l) no anexo de equações

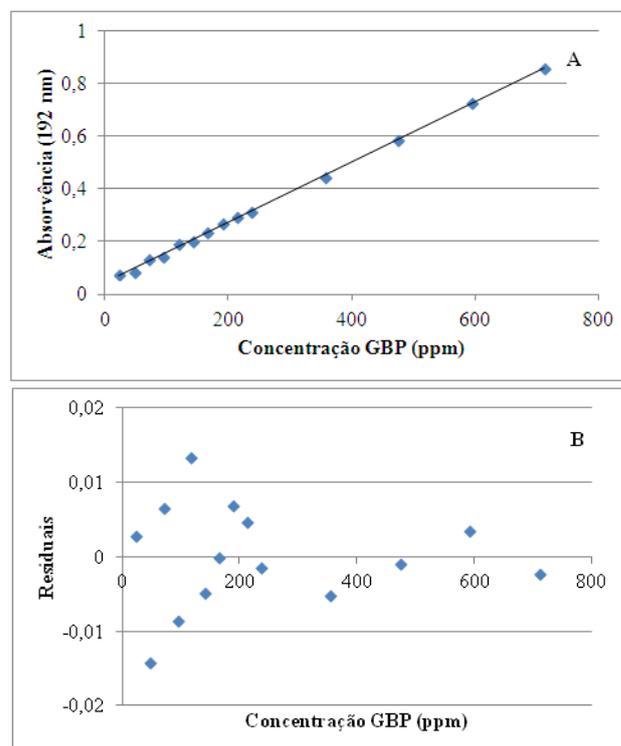


Figura 6.21 – (A) Reta de calibração do método Vanilina a 392 nm; (B) - Residuais do método Vanilina após remoção dos outliers.

O método Vanilina observou-se linear numa gama de concentrações entre 34,55 e 712,08 ppm, obedecendo neste intervalo à lei de Lambert-Beer. Obteve-se para o

Comparação de métodos analíticos na quantificação do teor de Gabapentina em diversas cápsulas de diversos laboratórios

método uma sensibilidade reduzida, $(1,14_4 \pm 0,02_1) \times 10^{-3} \text{ ppm}^{-1}$. A equação da reta obtida foi a seguinte: $A = [(1,14_4 \pm 0,02_1) \times 10^{-3}] C_{\text{GBP}} + [(4,5_0 \pm 0,6_7) \times 10^{-2}]$, para um nível de confiança de 95 %, e foi obtido um coeficiente de correlação de 0,9992.

No estudo da estabilidade das soluções padrão do método Vanilina foi feita a sua análise imediatamente após a preparação das soluções, quatro horas após e diariamente até 120 horas após a sua preparação, tendo sido as mesmas armazenadas num local frio e escuro durante este período de tempo e foram analisadas a evolução da absorvência e concentração das soluções padrão e reta de calibração ao longo do tempo. As absorvências dos padrões ao longo de tempo encontram-se em anexo na **Tabela A37**.

Nenhuma das soluções padrão manteve o seu coeficiente de variação a nível das absorvências dentro dos limites de aceitação para que se considere que se manteve estável, abaixo de 2,00 %, durante o período analisado (120 horas).²⁹ De facto, num período de 48 horas, todas as soluções padrão mantiveram a sua absorvência estável, mantendo o coeficiente de variação entre 0,13 e 1,91 %. 72 horas após a preparação dos padrões várias soluções mantiveram a sua absorvência razoavelmente constante, nomeadamente os padrões 11, 12, 13, 14 e 15, de concentrações $356,0 \pm 4,3$, $474,7 \pm 5,1$, $593,4 \pm 5,4$, $712,1 \pm 7,6$ e $1186,8 \pm 8,3$ ppm, com um coeficiente de variação de 0,70, 1,92, 1,32, 1,00 e 1,38 %, respetivamente. Relativamente à análise da estabilidade com base na absorvência das soluções, pode-se considerar que as mesmas começaram a degradar ao fim do terceiro dia de análise. As **Figuras 6.22 A e B** mostram a evolução das absorvências dos padrões 2, 4, 6 e 8, de concentrações $47,5 \pm 1,5$, $94,9 \pm 2,0$, $142,4 \pm 3,9$ e $189,9 \pm 3,9$ ppm ao longo do tempo e a evolução da absorvência do padrão 11, de concentração $356,0 \pm 4,3$ ppm, respetivamente.

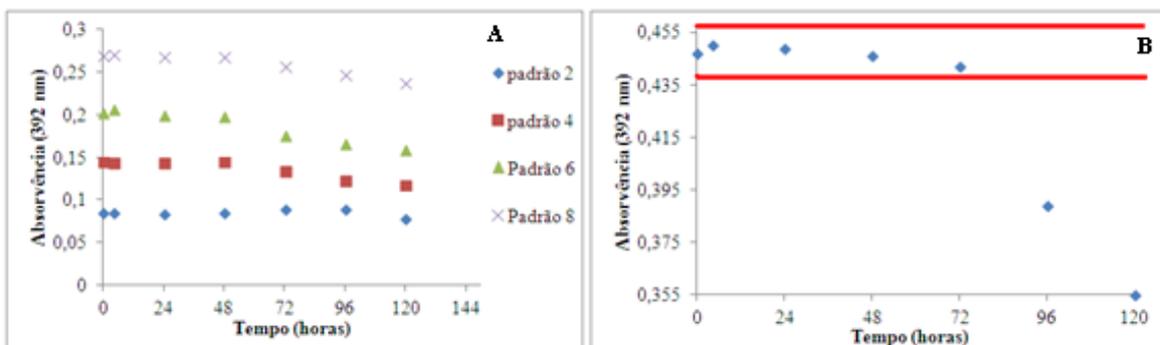


Figura 6.22 – Evolução da absorvência dos padrões ao longo do tempo: (A) - Padrões 2, 4, 6 e 8, de concentrações $47,5 \pm 1,5$, $94,9 \pm 2,0$, $142,4 \pm 3,9$ e $189,9 \pm 3,9$ ppm; (B) - Padrão 11, de concentração $356,0 \pm 4,3$ ppm.

Comparação de métodos analíticos na quantificação do teor de Gabapentina em diversas cápsulas de diversos laboratórios

Num período de 48 horas, os padrões 2, 4, 6 e 8 apresentaram todos coeficientes de variação inferiores a 2,00 %, pelo que se podem afirmar estáveis. O padrão que obteve menor valor de coeficiente de variação (0,36 %) foi o padrão 8. Os padrões 4, 2 e 6 obtiveram coeficientes de variação de 0,40, 1,14 e 1,57%, respetivamente. É notória uma diminuição das absorvências dos padrões a partir das 48 horas após a preparação das mesmas. Como se pode observar pela **Figura 6.22 B**, o padrão 11 manteve a sua absorvência no limite 98-102 % do sinal obtido logo após a preparação do padrão, ao longo de 72 horas. A maioria dos padrões apenas obteve absorvências dentro deste limite durante 48 horas.

As soluções foram analisadas em vários momentos, na gama de concentrações na qual o método se mostrou linear, 23,7 a 712,1 ppm, pelo que a evolução da equação da reta ao longo de 120 horas, se encontra apresentada na **Figura 6.23** e as respetivas equação estão apresentadas na **Tabela 6.11**.

Tabela 6.11 - Variação da equação da reta ao longo do tempo para o método Vanilina.

Tempo (horas)	Sensibilidade (ppm ⁻¹)*	Ordenada na origem *	Coefficiente de correlação (r ²)*
0	(1,14 ₄ ±0,02 ₁)x10 ⁻³	(4,5 ₀ ±0,6 ₇)x10 ⁻²	0,999
4	(1,14 ₆ ±0,02 ₃)x10 ⁻³	(4,5 ₃ ±0,7 ₂)x10 ⁻²	0,999
24	(1,14 ₅ ±0,02 ₂)x10 ⁻³	(4,4 ₀ ±0,6 ₉)x10 ⁻²	0,999
48	(1,13 ₈ ±0,02 ₃)x10 ⁻³	(4,5 ₁ ±0,7 ₂)x10 ⁻²	0,999
72	(1,14 ₀ ±0,03 ₉)x10 ⁻³	(2,2 _{±1,3})x10 ⁻²	0,997
96	(1,06 ₈ ±0,03 ₁)x10 ⁻³	(2,2 ₀ ±0,9 ₈)x10 ⁻²	0,998
120	(1,05 ₈ ±0,04 ₂)x10 ⁻³	(1,3 _{±1,4})x10 ⁻²	0,996

*Cálculos efetuados de acordo com as expressões contidas em k) no anexo de equações

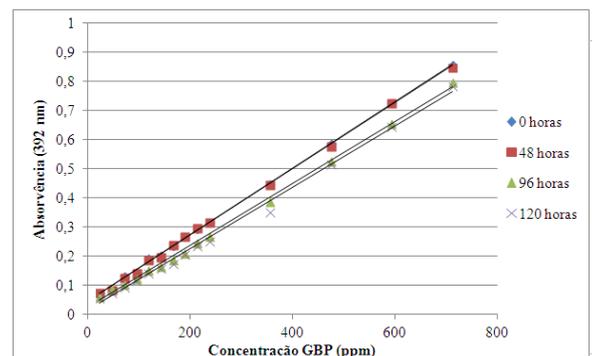


Figura 6.23 - Evolução das retas de calibração ao longo do tempo para o método Vanilina.

A razão entre a equação das retas de calibração ao longo do período de tempo é um indicador da estabilidade das soluções, considerando-se estável se esse quociente se mantiver entre 98 e 102 %.³³ A sensibilidade, a ordenada na origem e o coeficiente de correlação das leituras efetuadas ao longo das 120 horas de análise mantiveram-se relativamente estáveis, as variações mais acentuadas verificam-se a partir das 96 horas após a preparação das mesmas. A razão entre o declive da reta logo após a preparação das soluções e ao longo das horas variou entre 99,82 e 108,05 %, ao longo das 120 horas, encontrando-se fora do valor limite de aceitação. Para um período de tempo de 72 horas após a preparação dos padrões, essa razão varia entre 99,82 e 100,51 %, permitindo afirmar que a reta se manteve estável neste intervalo. A concentração das

Comparação de métodos analíticos na quantificação do teor de Gabapentina em diversas cápsulas de diversos laboratórios

soluções padrão 2, 4, 6 e 8 foi também analisada ao longo do período no qual se verificou estável a absorvência dos padrões equação da reta, 48 horas após a preparação dos mesmos. Tem-se como critério de aceitação valores de coeficiente de variação inferiores a 2,00 %.³³ Foram usadas as equações das retas de calibração obtidas para as análises efetuadas ao longo do tempo e os valores de absorvência correspondentes para avaliar a sua variação, tendo-se obtido coeficientes de variação de 1,91, 0,82, 1,61 e 0,12 %, para 48 horas após a sua preparação. A solução padrão 8 foi a que manteve a sua concentração em gabapentina mais estável, durante as 48 horas analisadas. Contudo, para um período de 72 horas, o padrão 6 foi o único que manteve a sua concentração estável, com um coeficiente de variação de 1,58 %.

Relativamente à estabilidade das soluções pode ser concluído que qualquer análise efetuada além das 48 horas após a preparação das soluções não permitiria quantificar de forma rigorosa o teor de gabapentina nas amostras, dado que o produto da derivatização da gabapentina com a vanilina só é estável na solução preparada, durante um período de 48 horas, a 4°C e a pH 7,5.

De forma a avaliar a precisão e exatidão do método Vanilina foram preparadas três soluções com diferentes concentrações de analíto a partir da solução *Stock*, designadamente 83,1±2,0, 154,3±3,9 e 201,8±3,9 ppm, como apresentado em anexo na **Tabela A38**. A estas soluções foram efetuadas seis análises no dia em que foram preparadas e uma análise a cada dia após a preparação das mesmas, em quatro dias consecutivos. Na **Tabela 6.12** estão apresentadas as médias dos resultados obtidos para cada nível de concentração, sendo que os resultados individuais se encontram em anexo nas **Tabelas A39 e A40**. De notar que o valor das concentrações foram obtidos pela equação da reta calculada logo após a preparação das soluções padrão.

Tabela 6.12 - Coeficientes de variação e erro relativo para o método Vanilina para análises efetuadas no mesmo dia e em dias alternados.

Método	Ensaio efetuado no mesmo dia (N=6)						Ensaio efetuado em dias alternados (N=4)				
	C _{GBP} esperada ±ec(ppm)*	C _{GBP} ±ec (ppm)*	SD*	RSD (%)*	RSD _H (%)*	RE (%)*	C _{GBP} ±ec (ppm)*	SD*	RSD (%)*	RSD _H (%)*	RE (%)*
Vanilina	83,1±2,0	83±1,5	1,02	1,23	6,31	0,15	83±1,5	1,10	1,32	6,31	0,24
	154,3±3,9	153±1,5	1,33	0,86	5,75	-0,54	154±1,5	1,10	0,72	5,75	-0,40
	201,8±3,9	202±1,5	0,92	0,46	5,52	-0,10	202±1,5	1,13	0,56	5,52	-0,10

*Cálculos feitos a partir das expressões contidas em d), e), f), j) e o) no anexo de equações

Como se pode observar, para as análises efetuadas no mesmo dia o coeficiente de variação variou entre 0,46 e 1,23 % e para análises em dias alternados este variou

Comparação de métodos analíticos na quantificação do teor de Gabapentina em diversas cápsulas de diversos laboratórios

entre 0,56 e 1,32 %. Assim, pode-se afirmar a precisão do método Vanilina em termos de repetibilidade e precisão intermédia, por ter obtido coeficientes de variação abaixo do limite de aceitação, 5,30 %, de acordo com a AOAC ou abaixo do valor de Horwitz.²⁹ A exatidão do método Vanilina foi avaliada pelo cálculo dos valores de erro relativo. O presente método obteve valores entre 0,10 e 0,15 % para as análises efetuadas no mesmo dia e 0,10 e 0,40 % para análises efetuadas em dias alternados, todos os valores muito abaixo do limite de aceitação, 5,00 %.⁴¹ Assim, o método pode-se afirmar bastante exato.

Os ensaios de recuperação foram realizados com três soluções, preparadas através da fortificação de uma solução de concentração fixa de gabapentina pura com diferentes concentrações de amostra de Neurotin[®], de forma a obter concentrações de $15_2 \pm 6,4$, $18_2 \pm 5,7$ e $44_2 \pm 1_3$ ppm, tal como descrito na **Tabela A41**, em anexo. A recuperação média para cada nível de concentração está apresentada na **Tabela 6.13**, sendo que os resultados obtidos para cada ensaio individual se encontram na **Tabela A42**, em anexo. Na **Figura 6.24** pode-se observar a relação entre a concentração de analíto recuperada e concentração de gabapentina fortificada.

Tabela 6.13 - Média dos ensaios de recuperação para o método Vanilina.

Método	$C_{GBP\text{esperada}} \pm ec$ (ppm)*	$C_{GBP} \pm ec$ (ppm)*	Recuperação $\pm SD$ (%)*
Vanilina	$15_2 \pm 6,4$	$15_2 \pm 1_5$	$99,7_1 \pm 0,6_0$
	$18_2 \pm 5,7$	$18_4 \pm 1_5$	$100,5 \pm 1,0$
	$44_2 \pm 1_3$	$44_1 \pm 1_5$	$98,9 \pm 1,1$

*Cálculos efetuados de acordo com as expressões contidas em d), j), m) e o) no anexo de equações

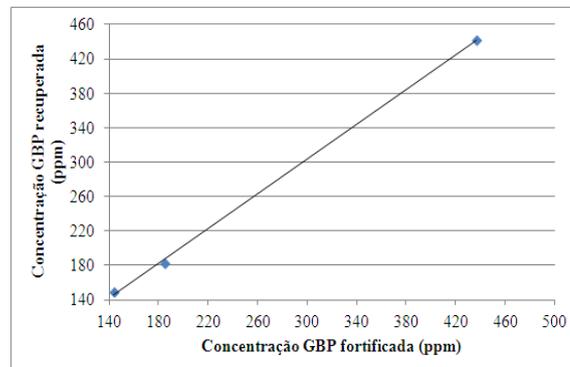


Figura 6.24 - Relação entre a concentração de gabapentina recuperada e fortificada para o método Vanilina.

O método Vanilina obteve recuperações muito próximas de 100 %, com um valor médio de $99,7 \pm 1,1$ %. Os valores encontram-se dentro do esperado e indicado pela literatura para estes níveis de concentrações, na ordem das dezenas de ppm, 80-107 %.²⁹ O declive da reta obtida pela função entre a concentração de gabapentina recuperada e concentração fortificada foi de $1,00_7 \pm 0,08_2$ ppm⁻¹ e o valor do coeficiente de correlação 0,9999, confirmando desta forma a linearidade do método, ensaios de recuperação

Comparação de métodos analíticos na quantificação do teor de Gabapentina em diversas cápsulas de diversos laboratórios

bastante aceitáveis e a ausência de interferências por parte dos excipientes na análise pelo método Vanilina, ou seja, uma elevada especificidade pelo analíto.⁴⁴

Foram preparadas amostras de cada uma das cápsulas de gabapentina dos diferentes laboratórios, de forma idêntica para todas segundo a **Tabela A43**, em anexo. Os valores obtidos individualmente estão apresentados na **Tabela A44**. Na **Tabela 6.14** encontram-se as médias das recuperações para as diferentes cápsulas obtidas pelo método Vanilina e a comparação da sua precisão e exatidão com o método de referência.

Tabela 6.14 - Recuperações obtidas para as diferentes cápsulas pelo método Vanilina.

Método Proposto (N=6)		Gabomox [®]	Neurotin [®]	Ratiopharm	Teva	Generis	Método Referência (N=5) ⁴⁵
Vanilina	Recuperação ±SD(%) [*]	99,9 ₀ ±0,7 ₇	100,3 ₄ ±0,6 ₆	100,0 ₅ ±0,6 ₄	100,0 ₅ ±0,7 ₀	101,5 ₀ ±1,1	99,5 ₅ ±1,4 ₅
	$t_{calculado}(95\%)^*$	0,52	1,20	0,76	0,75	2,56	$t_{tabelado}(95\%)^*$ 2,57
	$F_{calculado}(95\%)^*$	3,55	4,78	5,08	4,28	1,78	$F_{tabelado}(95\%)^*$ 5,19

^{*}Cálculos efetuados de acordo com expressões contidas em d), g), h) e o) no anexo de equações

Tal como se pode verificar, o teor de gabapentina, pelo método Vanilina esteve muito próximo do valor indicado pelo fabricante, 100 mg de gabapentina, para todas as cápsulas, uma vez que as recuperações obtidas estiveram compreendidas entre 99,9₀±0,7₇ e 101,5₀±1,1 %. O valor de *t-student* experimental para o método Vanilina nunca excedeu os 2,56 em módulo e o valor de *Fisher* nunca foi superior a 5,08. Uma vez que estes valores em nenhum dos casos excederam os valores tabelados, 2,57 e 5,19, respetivamente, para 95 % de confiança, a hipótese nula, *H0*, é aceite, o que indica que não se verificaram diferenças estatisticamente significativas entre o método efetuado e o método de referência, no que diz respeito a exatidão e precisão, cumprindo todos os critérios de aceitação.

6.2.3 MÉTODO HIPOCLORITO

O hipoclorito de sódio é um reagente utilizado na determinação de uma elevada gama de compostos, na qual a gabapentina está inserida.³⁷ A reação de derivatização da mesma está apresentada na **Figura 6.25**.

Comparação de métodos analíticos na quantificação do teor de Gabapentina em diversas cápsulas de diversos laboratórios

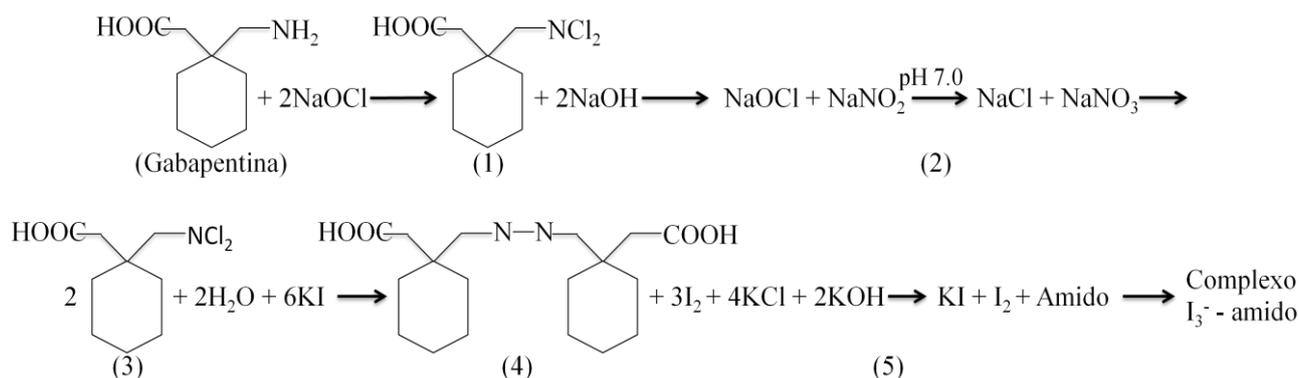


Figura 6.25 - Reação do reagente de Hipoclorito de sódio com gabapentina.³⁷

A reação de derivatização da gabapentina pelo hipoclorito pode ser dividida em três partes fundamentais. Na primeira da reação ocorre uma reação de cloração do azoto da amina primária da gabapentina com hipoclorito de sódio, na presença do tampão *Kolthoff*, converte o grupo amina a N-N-dicloro-amina, um derivado de cloro da gabapentina (representado por (1)). O segundo passo da reação é a remoção do excesso de hipoclorito pelo ião nitrito através da redução do NaNO₂ a NaNO₃ e, conseqüentemente a oxidação do NaOCl, a NaCl, como se pode observar em (2). O terceiro passo da reação é a oxidação do iodeto a iodina pelo derivado de cloro da gabapentina e produzir assim um composto de cor azulada na presença de amido, (3) e (4), pela formação de um complexo amido-triiodeto (amido-I₃⁻, apresentado em (5)), composto que apresenta um máximo de absorção a 590 nm.³⁷

Para o desenvolvimento do método Hipoclorito foram preparadas soluções *Stock* e *Intermédia* de gabapentina, tampão *Kolthoff* de pH 7,0, solução de nitrito de sódio 0,04 M, solução de hipoclorito de sódio 0,012 M e reagente amido-iodeto de potássio. Estas soluções foram preparadas de acordo com as **Tabelas A45 e A46**, apresentadas em anexo. A preparação da solução de amido-iodeto foi efetuada pela dissolução do amido em água em ebulição e posterior adição do iodeto de potássio, mantendo em ebulição por 5 minutos adicionais. As soluções *Stock* e *Intermédia* de gabapentina de concentrações de 614,0±2,3 e 307,0±2,1 ppm foram utilizadas para a elaboração de onze soluções padrão. Estas foram preparadas pela pipetagem de diferentes volumes de solução *Stock* e *Intermédia* e igual volume de tampão *Kolthoff* e das outras soluções preparadas em balões volumétricos de 25 mL, à temperatura ambiente, ao abrigo da luz. Na Tabela A47, em anexo, são apresentadas os volumes utilizados e as concentrações de cada um dos

Comparação de métodos analíticos na quantificação do teor de Gabapentina em diversas cápsulas de diversos laboratórios

padrões. O tampão *Kolthoff* consiste numa solução de fosfato monopotássico 0,2 M e bórax 0,1 M, de forma a fazer uma solução de pH 7,0.

Para a escolha do comprimento de onda ao qual se realizou a análise foi traçado o espectro de absorção de uma solução padrão de concentração $49,1_2 \pm 0,5_4$ ppm. Na **Figura 6.26** pode-se observar que o máximo de absorção se encontra aos 588 nm.

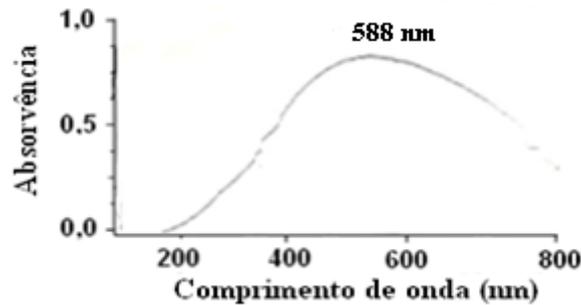


Figura 6.26 - Espectro de absorção de uma solução padrão do método Hipoclorito de concentração de gabapentina de concentração $49,1_2 \pm 0,5_4$ ppm.

Foi traçada a curva de calibração para o método Hipoclorito, a 588 nm, e verificada a presença de outliers, pelo cálculo dos residuais, representados na **Figura 6.27 A e B**, respetivamente, de acordo com os valores apresentados em anexo na **Tabela A48**.

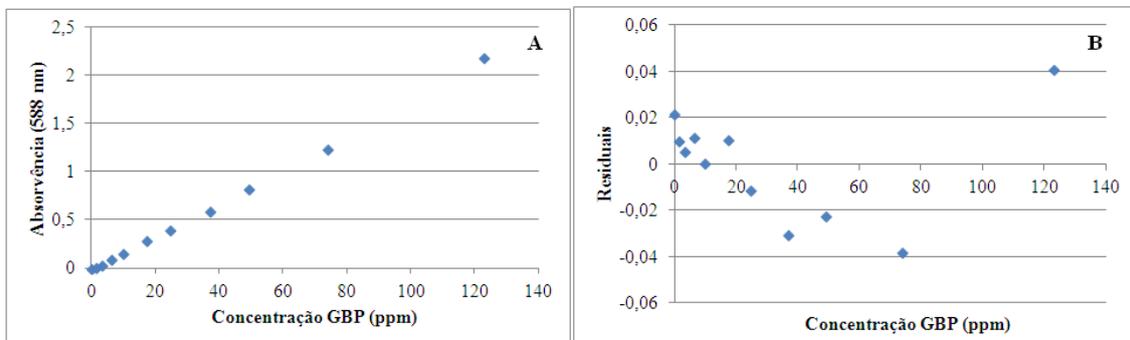


Figura 6.27 - (A) - Curva de calibração correspondente ao método Hipoclorito a 588 nm; (B) - Evolução dos residuais em função da concentração de gabapentina.

Como critério de aceitação tem-se que os residuais devem ter uma distribuição aleatória sem apresentar tendência óbvia, a reta deve apresentar coeficiente de correlação igual ou superior a 0,999 e qualquer valor de residual igual ou superior a 0,040 em módulo deverá ser desprezado. Assim, o padrão número 10, de concentração $122,8_7 \pm 0,9_3$ ppm, foi o outlier desprezado. O desvio padrão dos residuais foi de 0,024 para toda a gama de concentrações testada e 0,008 após a remoção dos outliers, tendo-se obtido uma dispersão aleatória dos residuais e uma reta de elevada linearidade, apresentada na **Figura 6.28 A e B**.

Comparação de métodos analíticos na quantificação do teor de Gabapentina em diversas cápsulas de diversos laboratórios

Os parâmetros da reta foram calculados para o método Hipoclorito e estão apresentados na **Tabela 6.15**. Os valores das leituras dos brancos estão apresentados em anexo na **Tabela A49**.

Tabela 6.15 - Parâmetros da reta para o método Hipoclorito.

Parâmetros da reta	Método Hipoclorito $\lambda_{\text{análise}} 588 \text{ nm}$
Equação da reta (95% confiança)*	$A = [(1,68_5 \pm 0,02_7) \times 10^{-2}] C_{\text{GBP}} + [(-0,9_0 \pm 0,8_5) \times 10^{-2}]$
Sensibilidade (ppm^{-1})*	$(1,68_5 \pm 0,02_7) \times 10^{-2}$
LD_{Sr} (ppm)*	1,49
LQ_{Sr} (ppm)*	4,96
LL (ppm)*	73,68
GD*	14,85
LD_{Sb} (ppm)*	0,75
LQ_{Sb} (ppm)*	2,50

*Cálculos efetuados de acordo com as expressões contidas em k) e l) no anexo de equações

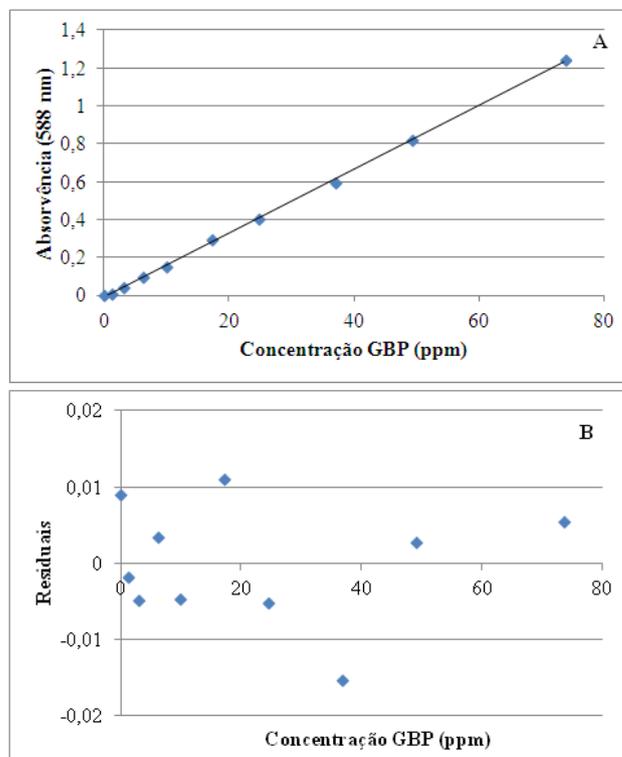


Figura 6.28 – (A) - Reta de calibração do método Hipoclorito a 588 nm; (B) - Residuais do método Hipoclorito após remoção do outlier.

A linearidade do método Hipoclorito observou-se numa gama de concentrações entre 2,50 e 73,68 ppm e obteve-se para este método uma sensibilidade de $(1,68_5 \pm 0,02_7) \times 10^{-2} \text{ ppm}^{-1}$. A equação da reta obtida foi: $A = [(1,68_5 \pm 0,02_7) \times 10^{-2}] C_{\text{GBP}} + [(-0,9_0 \pm 0,8_5) \times 10^{-2}]$, para um grau de confiança de 95 %, com um coeficiente de correlação de 0,9996.

A análise da estabilidade das soluções padrão do método Hipoclorito foi feita, analogamente aos métodos anteriores, imediatamente após a preparação das soluções, cerca de quatro horas após, e diariamente até 120 horas após a sua preparação. As mesmas foram armazenadas num local frio e escuro durante o período de tempo analisado. A tabela com os valores de absorvências dos padrões ao longo de tempo encontra-se em anexo, na **Tabela A50**.

O critério de aceitação para que se possa afirmar que as soluções mantiveram a sua absorvência estável durante o período analisado são coeficientes de aceitação abaixo

Comparação de métodos analíticos na quantificação do teor de Gabapentina em diversas cápsulas de diversos laboratórios

dos 2,00 %.²⁹ O estudo dos coeficientes de variação da absorvência dos padrões ao longo do tempo mostrou que nenhuma das soluções se manteve estável durante as 120 horas de análise. A partir das 48 horas de análise a absorvência das soluções padrão decrece drasticamente. Os padrões 3 e 4, de concentrações $6,14 \pm 0,1_1$ e $9,83 \pm 0,1_2$ ppm, respetivamente, foram as únicas soluções que se mantiveram estáveis durante um período de 48 horas, mostrando coeficientes de variação para as absorvências de 1,50 e 1,83 %, respetivamente. Mais nenhuma solução demonstrou estabilidade na sua absorvência até 24 horas após a preparação dos padrões, mas todas as soluções à exceção do branco, padrão 1 e 2 (efeito do valor baixo de absorvência), foram estáveis até 4 horas após a preparação. A evolução da absorvência das soluções padrão 2, 4, 6 e 8, de concentração de gabapentina de $3,07 \pm 0,1_1$, $9,82 \pm 0,2_1$, $24,56 \pm 0,3_1$ e $49,12 \pm 0,5_4$ ppm, respetivamente, ao longo de 120 horas e a evolução da solução padrão 9, de concentração $73,68 \pm 0,8_1$ ppm ao longo do tempo, estão apresentadas na **Figura 6.29 A e B**, respetivamente.

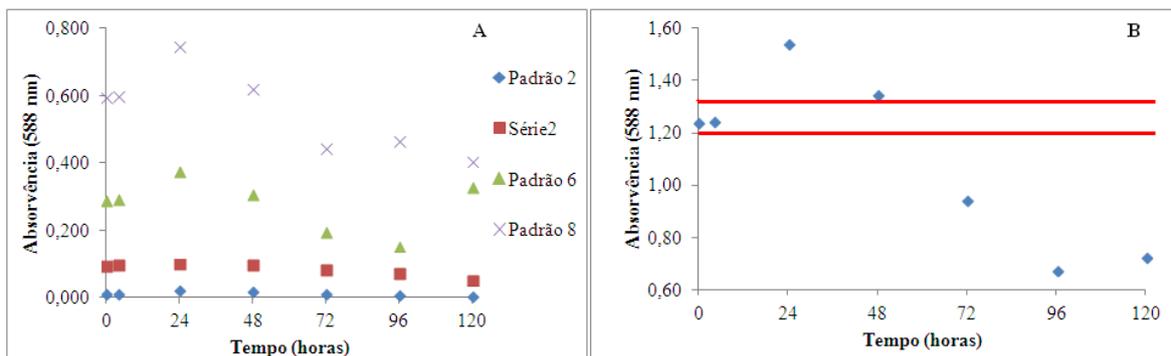


Figura 6.29 – Evolução da absorvência dos padrões ao longo do tempo: (A) - Padrões 2, 4, 6 e 8, de concentração $3,07 \pm 0,1_1$, $9,82 \pm 0,2_1$, $24,56 \pm 0,3_1$ e $49,12 \pm 0,5_4$ ppm; (B) - Padrão 9, de concentração $73,68 \pm 0,8_1$ ppm.

Os valores de absorvência das soluções padrão 6 e 8 alteraram-se de forma aleatória e bastante significativa ao longo do tempo. Os padrões 2 e 4 variaram de forma menos significativa que os anteriores. Pode-se verificar uma clara tendência de aumento das absorvências até 48 horas após a preparação dos padrões e uma tendência a diminuir as absorvências a partir das 72 horas. Na **Figura 6.29 B** pode-se verificar que a manutenção da absorvência da solução padrão 9 entre 98-102 % do sinal inicial se verificou durante um período de 4 horas.

Foi avaliada a estabilidade da reta de calibração, na gama na qual se manteve linear, ou seja, 1,23 e 73,68 ppm, através da análise variação da sensibilidade do método

Comparação de métodos analíticos na quantificação do teor de Gabapentina em diversas cápsulas de diversos laboratórios

ao longo do tempo, da sua ordenada na origem e o coeficiente de correlação, apresentados na **Tabela 6.16** e **Figura 6.30**.

Tabela 6.16 - Variação da equação da reta ao longo do tempo para o método Hipoclorito.

Tempo (horas)	Sensibilidade (ppm ⁻¹)*	Ordenada na origem*	Coefficiente correlação (r ²)*
0	(1,68 ₅ ±0,02 ₇)x10 ⁻²	(-0,9 ₀ ±0,8 ₅)x10 ⁻²	0,999
4	(1,69 ₄ ±0,02 ₉)x10 ⁻²	(-0,7 ₈ ±0,9 ₃)x10 ⁻²	0,999
24	(2,08 ₇ ±0,05 ₅)x10 ⁻²	(-0,6±1,8)x10 ⁻²	0,999
48	(1,80 ₄ ±0,05 ₈)x10 ⁻²	(-1,3±1,9)x10 ⁻²	0,998
72	(1,3 ₂ ±0,1 ₂)x10 ⁻²	(-1,1±3,6)x10 ⁻²	0,990
96	(0,9 ₅ ±0,1 ₇)x10 ⁻²	(-0,2±5,4)x10 ⁻²	0,955
120	(1,1 ₀ ±0,2 ₆)x10 ⁻²	(1,8±8,2)x10 ⁻²	0,926

*Cálculos efetuados de acordo com as expressões contidas em k) no anexo de equações

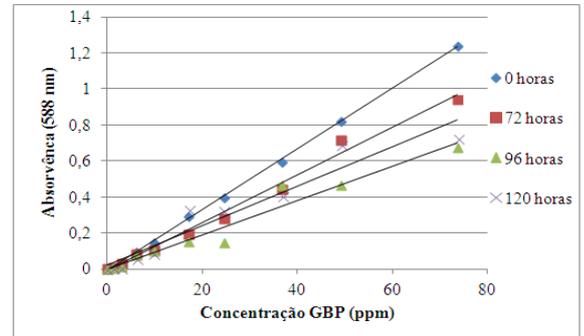


Figura 6.30 - Evolução das retas de calibração ao longo do tempo para o método Hipoclorito.

Pode-se verificar que o coeficiente de correlação vai diminuindo ao longo do tempo, a sensibilidade do método é bastante variável, bem como a ordenada na origem. O quociente entre o declive das retas entre o primeiro e último dia de análise esteve entre 80,79 e 176,71 %, assumindo valores bastante acima dos critérios de aceitação (98-102 %).³³ Apenas até 4 horas após a preparação das soluções se verificou a manutenção da razão dentro desse intervalo, com uma razão de 99,56 %. Foi analisada a variação da concentração dos padrões 2, 4, 6 e 8 ao longo de 120 horas, usando para isso as equações das retas obtidas para cada dia. Assume-se como critério de aceitação coeficientes de variação da concentração dos padrões inferiores a 2,00 %.³³ O padrão 8 manteve a sua concentração de gabapentina estável durante um período de 72 horas, com um coeficiente de variação de 1,95 %. Para um período de 48 horas, o padrão 6 também manteve a sua concentração estável, obtendo um coeficiente de variação de 1,28 %. Apenas o padrão 2 não manteve a sua concentração de analíto estável para um período de 4 horas após a sua preparação, com uma variação de 2,78 %. Os padrões 4, 6 e 8 obtiveram valores de 0,41, 0,12 e 0,21 %, respetivamente. Assim, pelo método Hipoclorito a análise das soluções padrão e amostras de gabapentina deve ser efetuada imediatamente após a preparação dos mesmos para prevenir a degradação e alteração das mesmas. O tempo máximo que se deve esperar desde a preparação dos padrões até à sua análise são 4 horas, a 4°C e a pH 7,0.

De forma a avaliar a precisão e exatidão do método foram preparadas três soluções de concentração de gabapentina de 7,3₇±0,2₀, 24,5₆±0,4₀ e 49,1₂±0,5₁ ppm,

Comparação de métodos analíticos na quantificação do teor de Gabapentina em diversas cápsulas de diversos laboratórios

como apresentado em anexo, na **Tabela A51**. A estas soluções foram efetuadas seis análises no dia em que foram preparadas e uma análise a cada dia após a preparação das mesmas, em quatro dias consecutivos, estando na **Tabela 6.17** apresentadas as médias dos resultados obtidos para cada nível de concentração. Os resultados obtidos individualmente encontram-se em anexo, nas **Tabelas A52 e A53**. De notar que os valores de concentrações foram calculados pela reta obtida logo após a preparação dos padrões.

Tabela 6.17 - Coeficientes de variação e erro relativo para o método Hipoclorito para análises efetuadas no mesmo dia e em dias alternados.

Método	Ensaio efetuado no mesmo dia (N=6)						Ensaio efetuado em dias alternados (N=4)					
	$C_{GBP\pm ec}$ (ppm)*	$C_{GBP\pm ec}$ (ppm)*	SD*	RSD (%)*	RSD _H (%)*	RE (%)*	$C_{GBP\pm ec}$ (ppm)*	SD*	RSD (%)*	RSD _H (%)*	RE (%)*	
Hipoclorito	7,37±0,20	7,5±1,3	0,07	0,96	9,09	1,65	7,5±1,3	0,08	1,02	9,09	1,78	
	24,56±0,40	24,4±1,3	0,06	0,25	7,58	-0,65	24,5±1,3	0,05	0,20	7,58	-0,28	
	49,12±0,51	49,9±1,3	0,07	0,14	6,83	1,45	49,8±1,3	0,05	0,10	6,83	1,29	

*Cálculos feitos a partir das expressões contidas em d), e), f), j) e o) no anexo de equações

Para as análises efetuadas dentro do mesmo dia, o coeficiente de variação variou entre 0,14 e 0,96 % e para análises em dias alternados este variou entre 0,10 e 1,02 %, pelo que os mesmos se encontram dentro dos limites de aceitação segundo a AOAC, 7,30 %, para níveis de concentração na ordem das dezenas de ppm de analíto ou coeficientes de variação inferiores ao coeficiente de Horwitz.²⁹ Confirma-se assim a elevada precisão do método Hipoclorito.

O erro relativo é uma estimativa da exatidão do método, quando este é comparado com um material de referência certificado. Na impossibilidade de obter este MRC assumiu-se como valor exato 100 mg, o indicado pelo fabricante. O erro relativo para o método Hipoclorito variou entre 0,65 e 1,65 % para as análises efetuadas dentro do mesmo dia e 0,28 e 1,78 %, para análises efetuadas em dias alternados. Uma vez que o erro relativo está abaixo de 5,00 %, valor indicado como critério de aceitação, o método pode ser considerado exato.⁴¹

Para a elaboração dos ensaios de recuperação para o método Hipoclorito, foram fortificadas soluções de concentração fixa de gabapentina pura com diferentes concentrações de solução de amostra de Neurotin[®], tendo-se obtido concentrações de gabapentina de 7,68±0,78, 15,7±1,4 e 39,7±3,3 ppm. As soluções e a sua forma de preparação encontram-se em anexo, na **Tabela A54**. A recuperação média para cada nível de concentração e as mesmas estão apresentadas na **Tabela 6.18**, sendo que os resultados obtidos para cada ensaio individual se encontram na **Tabela A55** em anexo.

Comparação de métodos analíticos na quantificação do teor de Gabapentina em diversas cápsulas de diversos laboratórios

Na **Figura 6.31** observa-se a relação linear entre a concentração de analito recuperado e fortificado.

Tabela 6.18 - Média dos ensaios de recuperação para o método Hipoclorito.

Método	C _{GBPesperada} ±ec (ppm)*	C _{GBP} ±ec (ppm)*	Recuperação ±SD (%)*
Hipoclorito	7,6 ₈ ±0,7 ₈	7,7±1,3	99,8±1,7
	15,7±1,4	15,7±1,3	100,0±1,7
	39,7±3,3	39,7±1,3	100,2±2,8

*Cálculos efetuados de acordo com as expressões contidas em d), j), m) e o) no anexo de equações

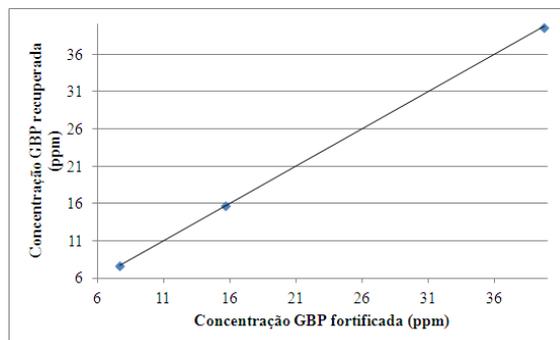


Figura 6.31 - Relação entre a concentração de gabapentina recuperada e fortificada para o método Hipoclorito.

O método Hipoclorito obteve percentagens de recuperação bastante próximas de 100 % para cada nível de fortificação. O limite de aceitação para a ordem de concentrações com que se está a trabalhar (dezenas de ppm) é, segundo a AOAC, recuperações entre 80 e 110 %.²⁹ Obteve-se para o método uma recuperação média de 100,0±2,0 %, o que se encontra dentro do limite supramencionado, indiciando fraca interferência dos excipientes, elevada especificidade do método pelo analito e boa exatidão do método. A função da concentração de gabapentina recuperada e fortalecida obteve um declive de 0,999₆±0,001₁ ppm⁻¹, para 95% de confiança e o coeficiente de correlação obtido foi 1,000, o que indica forte linearidade do método e elevada recuperação do mesmo.⁴⁴

Foram preparadas amostras de cada uma das cápsulas de gabapentina dos diferentes laboratórios, segundo a **Tabela A17**, em anexo. Na **Tabela 6.19** estão apresentadas as médias das recuperações para as diferentes cápsulas pelo método Hipoclorito, pelo que os resultados obtidos individualmente se encontram apresentados em anexo na **Tabela A56**.

Tabela 6.19 - Recuperações obtidas para as diferentes cápsulas para o método Hipoclorito.

Método Proposto (N=6)	Gabomox [®]	Neurotin [®]	Ratiopharm	Teva	Generis	Método Referência (N=5) ⁴⁵
Recuperação ±SD(%)*	101,0 ₀ ±0,5 ₂	100,9 ₀ ±0,4 ₈	100,6 ₁ ±0,5 ₂	99,6 ₂ ±0,4 ₆	101,1 ₅ ±0,7 ₈	99,5 ₅ ±1,4 ₅
t _{calculado} (95%)*	2,30	2,17	1,68	0,11	2,34	t _{tabelado} (95%)* 2,57
F _{calculado} (95%)*	4,01	4,61	4,01	5,13	1,77	F _{tabelado} (95%)* 5,19

*Cálculos efetuados de acordo com expressões contidas em d), g), h) e o) no anexo de equações

Tal como se pode verificar, o teor de gabapentina obtido no doseamento das cápsulas, pelo método Hipoclorito esteve muito próximo do indicado na embalagem, 100 mg. As recuperações estiveram entre $99,62 \pm 0,46$ e $101,15 \pm 0,78$ %. O valor de *t-student* experimental para o presente método nunca excedeu os 2,34 em módulo e o valor de *Fisher* nunca foi superior a 5,13, ambos inferiores aos valores tabelados, 2,57 e 5,19, respetivamente, para 95 % de confiança, o que indica que não houveram diferenças significativas entre o método Hipoclorito e o método de referência, no que diz respeito a exatidão e precisão, cumprindo todos os critérios de aceitação.

7 Métodos Espectrofluorimétricos de análise

A fluorescência ocorre quando uma molécula absorve um fotão, normalmente na região espectral Uv-Vis, provocando a emissão de outro fotão, com comprimento de onda superior.⁴³ Algumas moléculas têm fluorescência por si mesmas, outras, não produzindo naturalmente fluorescência, podem ser analisadas por fluorimetria se for possível induzi-la através da reação com agentes de derivatização. Estes reagentes com capacidade de induzir fluorescência em compostos não fluorescentes são designados de fluorogénicos. Alguns exemplos são a fluorescamina, 4-cloro-7-nitrobenzofurazano, que reagem com os grupos amina dos aminoácidos, isocianatos e tiocianatos, para originar produtos de ureia e tioureia. Outros reagentes fluorogénicos como o *o*-ftaldialdeído e piridoxal originam bases de Schiff.³³

Nas técnicas espectroscopias de emissão, as reações de derivatização têm os mesmos objetivos que nos métodos espectroscópicos de absorção, aumentar a sensibilidade, seletividade, limites de deteção e quantificação, induzindo a fluorescência em moléculas não fluorescentes. Em geral, os métodos espectrofluorimétricos são mais seletivos e com menores limites que a derivatização para a técnica de absorção em Uv-Vis.

7.1 MÉTODO NBD-CL

O reagente 4-cloro-7-nitrobenzofurazano (NBD-Cl) é utilizado na análise fluorimétrica de variadas moléculas de estrutura semelhantes a aminoácidos, pelo que é usado na determinação da gabapentina.³⁸ A reação de derivatização da gabapentina com este reagente encontra-se esquematizada na **Figura 7.1**.

Comparação de métodos analíticos na quantificação do teor de Gabapentina em diversas cápsulas de diversos laboratórios

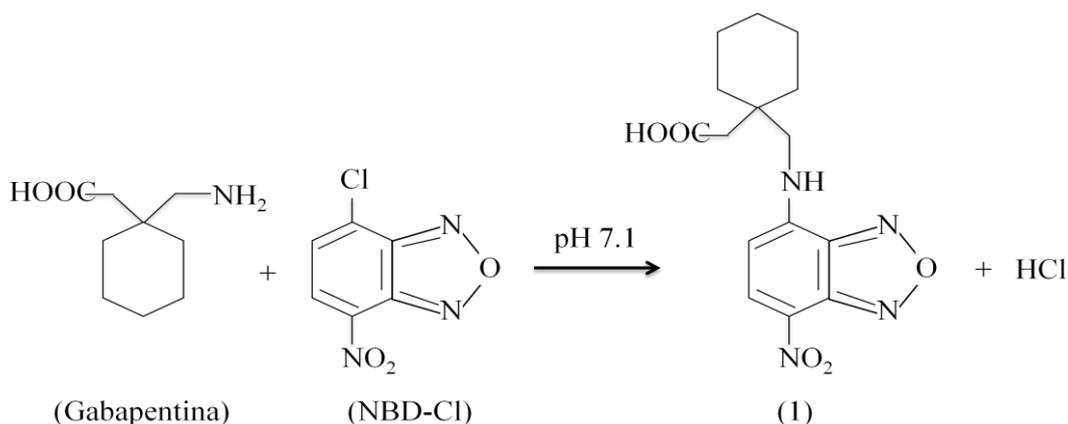


Figura 7.1 - Reação da gabapentina com o reagente NBD-Cl.³⁸

A reação de derivatização ocorre entre a amina alifática primária da gabapentina e o NBD-Cl, a pH 7,1, para formar um complexo de *Meisenheimer*, representado por (1), um complexo de cor amarelada e considerável fluorescência, exibindo um máximo de emissão e absorção a 532 e 465 nm, respectivamente.³⁸

Para o método NBD-Cl foram preparadas soluções *Stock* e *Intermédia*, de concentrações $614,0 \pm 2,3$ e $307,1 \pm 2,1$ ppm, bem como o tampão borato 7,1 e reagente NBD-Cl 0,8 mg/mL em metanol, de acordo com as **Tabelas A57** e **A58**, apresentadas em anexo. Doze soluções padrão foram preparadas pela pipetagem de diferentes volumes das soluções *Stock* ou *Intermédia* e iguais volumes do tampão e reagente NBD-Cl. Antes de se perfazer as soluções até aos 25 mL com água bidestilada as soluções padrão foram aquecidas a cerca de 70°C por 30 minutos. As mesmas foram posteriormente acondicionadas à temperatura ambiente e ao abrigo da luz e completou-se o volume até à marca, como descrito em anexo, na **Tabela A59**.

Foi traçado o espectro de fluorescência, usando para isso uma solução padrão de concentração $11,0_5 \pm 0,2_2$ ppm de gabapentina. A mesma exibiu um máximo de excitação e emissão de 464 e 542 nm, respectivamente, como apresentado na **Figura 7.2**.

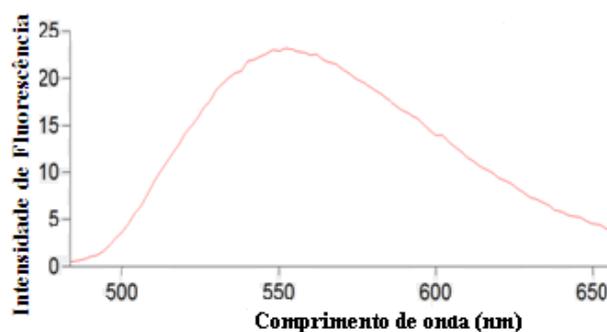


Figura 7.2 - Espectro de emissão de uma solução padrão $11,0_5 \pm 0,2_2$ ppm de gabapentina pelo método NBD-Cl.

A **Figura 7.3 A e B** contém a curva de calibração para o método NBD-Cl, bem como o valor dos residuais em função da concentração de gabapentina, de acordo com os valores apresentados em anexo na **Tabela A60**.

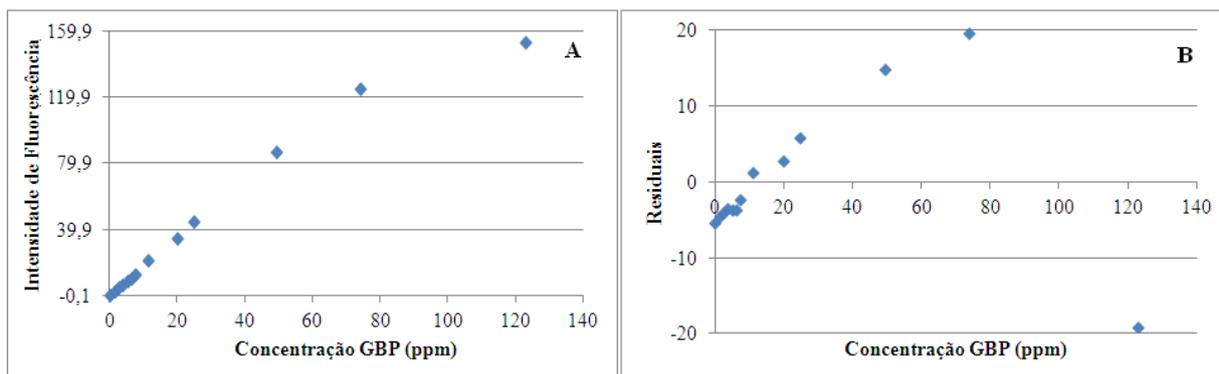


Figura 7.3 - (A) - Curva de calibração obtida para o método NBD-Cl; (B) - Evolução dos residuais em função da concentração de gabapentina.

Os residuais da curva de calibração apresentam uma distribuição algo tendenciosa, pelo que houve a necessidade de remover alguns padrões. Para o método NBD-Cl o critério de rejeição foram valores de residuais iguais ou superiores a 18,99 unidades, em módulo, tendo sido assim os padrões número 11 e 12 de concentrações $73,6_8 \pm 0,8_0$ e $122,8_0 \pm 0,8_9$ ppm, respetivamente, os padrões desprezados. Um coeficiente de correlação superior a 0,999 era de igual forma requerido. O desvio padrão dos residuais foi de 9,69 para a reta completa e 0,77 para a gama linear, após remoção dos outliers. Obteve-se assim uma reta de elevada linearidade que apresenta residuais de distribuição independente, apresentados na **Figura 7.4 A e B**. Os parâmetros da reta para o método NBD-Cl encontram-se na **Tabela 7.1** e os valores do sinal dos brancos para a estimativa dos limites de deteção e quantificação estão apresentados na **Tabela A61** em anexo.

Comparação de métodos analíticos na quantificação do teor de Gabapentina em diversas cápsulas de diversos laboratórios

Tabela 7.1 - Parâmetros da reta para o método NBD-Cl.

Parâmetros da reta	Método NBD-Cl λ excitação 464 nm λ emissão 542 nm
Equação da reta (95% confiança)*	$IF=(1,77_9\pm 0,04_0)C_{GBP} + (0,1_9\pm 0,7_3)$
Sensibilidade (ppm^{-1})*	$1,77_9\pm 0,04_0$
LD_{Sr} (ppm)*	1,37
LQ_{Sr} (ppm)*	4,56
LL (ppm)*	49,12
GD *	10,77
LD_{Sb} (ppm)*	0,56
LQ_{Sb} (ppm)*	1,86

*Cálculos efetuados de acordo com as expressões contidas em k) e l) no anexo de equações

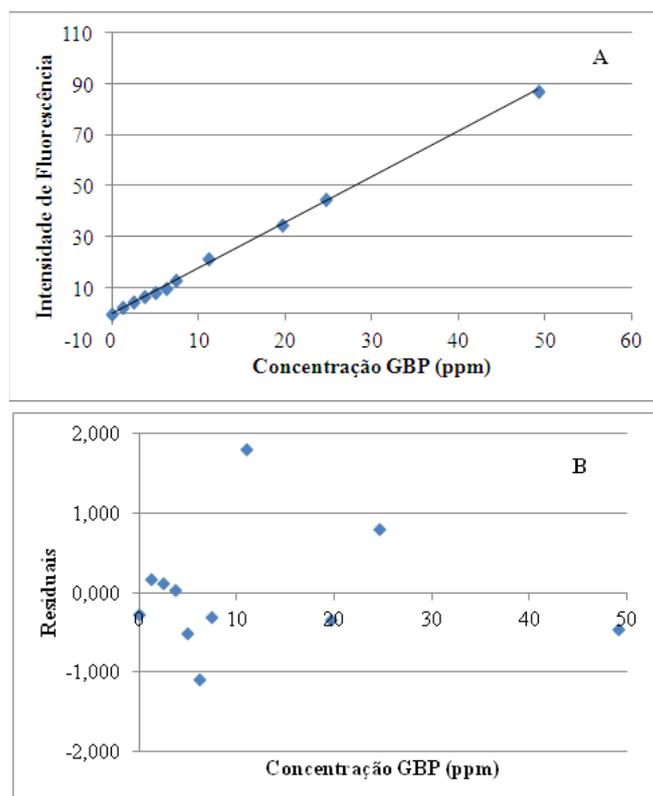


Figura 7.4 – (A) - Reta de calibração obtida para o método NBD-Cl; (B) - Residuais do método NBD-Cl após remoção dos outliers.

O método NBD-Cl observou-se linear numa gama de concentrações entre 1,86 e 49,15 ppm e obteve uma sensibilidade elevada, $1,77_9\pm 0,04_0 \text{ ppm}^{-1}$. A equação da reta obtida foi: $IF=(1,77_9\pm 0,04_0)C_{GBP} + (0,1_9\pm 0,7_3)$, para um grau de confiança de 95 % e o coeficiente de correlação foi próximo da unidade, 0,9993.

A estabilidade do método foi analisada em termos da análise da variação da intensidade de fluorescência dos padrões, retas de calibração ao longo do tempo e concentração de gabapentina dos padrões ao longo de 120 horas. As soluções foram armazenadas num local frio e escuro durante o período de tempo analisado. A tabela com os valores de intensidade de fluorescência dos padrões ao longo de tempo encontra-se em anexo, na **Tabela A62**.

Como critérios de aceitação tem-se que valores de coeficiente de variação das fluorescências e concentrações dos padrões abaixo de 2,00 % e manutenção do declive da reta dentro de 98-102 %, relativamente à obtida logo após a preparação dos padrões.³³

Comparação de métodos analíticos na quantificação do teor de Gabapentina em diversas cápsulas de diversos laboratórios

Os padrões 0, 1, 2 e 5, de concentrações 0, $1,22_8 \pm 0,07_5$, $2,45_6 \pm 0,07_6$ e $3,6_8 \pm 0,1_1$ ppm, respectivamente, foram os únicos que não se mantiveram estáveis durante 120 horas, tendo obtido valores de coeficiente de variação das medidas ligeiramente superiores a 2,00 %. Todas as outras soluções mantiveram a sua absorvência estável com coeficientes de variação inferiores a 2,00 %, ao longo de 120 horas.

As soluções que obtiveram maior estabilidade foram os padrões número 10, 11, de concentrações $49,1_2 \pm 0,5_3$ e $73,6_8 \pm 0,8_0$ ppm, com coeficientes de variação de 0,49% e 0,44 %, respectivamente. A evolução da intensidade de fluorescência das soluções padrão 2, 4, 6 e 8 ao longo do tempo está apresentada na **Figura 7.5 A** e na **Figura 7.5 B** encontra-se a evolução da intensidade de fluorescência da solução padrão 10 de concentração $49,1_2 \pm 0,5_3$ ppm.

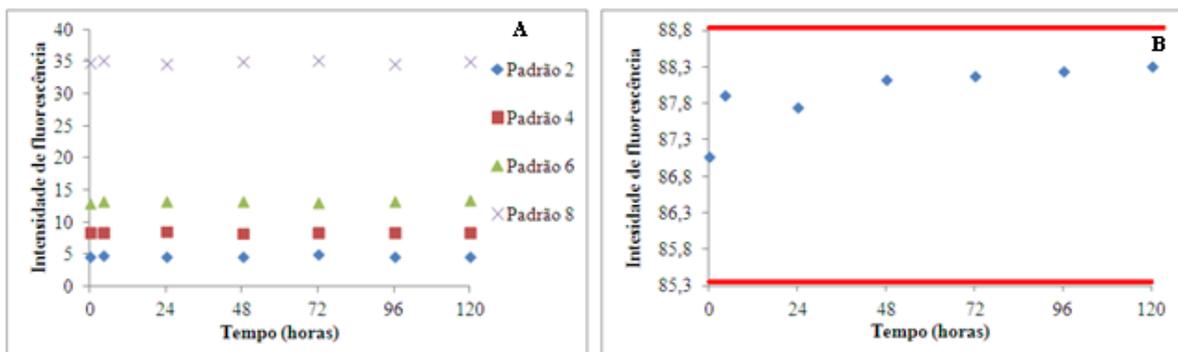


Figura 7.5 – Evolução da intensidade de fluorescência dos padrões ao longo do tempo: (A) - Padrões 2, 4, 6 e 8, de concentrações $2,45_6 \pm 0,07_6$, $4,91_0 \pm 0,1_1$, $7,37_0 \pm 0,2_1$ e $19,6_5 \pm 0,4_1$ ppm; (B) - Padrão 10, de concentração $49,1_2 \pm 0,5_3$ ppm.

Foram entretanto analisados de forma mais exaustiva os padrões 2, 4, 6 e 8, tendo apenas o padrão 2 não cumprido os limites de coeficiente de variação para ser designado de estável, uma vez que obteve 3,33% para as 120 horas, sendo que neste período o padrão que se manteve mais estável foi o padrão 8 com 0,68 %, seguido do 4 e 6 com valores de 0,90 e 1,13 %, respectivamente. Não se verifica nenhuma tendência para diminuir ou aumentar a intensidade de fluorescência, pelo que se pode considerar relativamente estável ao longo do tempo de análise. Pode-se observar pela **Figura 7.5 B** que o padrão 10 manteve a sua absorvência dentro do intervalo 98-102 % ao longo das 120 horas, assim como a maioria das soluções padrão.

A variação das retas de calibração ao longo do tempo, dentro da gama de concentrações na qual o método NBD-Cl se mostrou linear, foi avaliada e a sua representação encontra-se apresentada na **Figura 7.6**. As respetivas equações da reta encontram-se na **Tabela 7.2**.

Comparação de métodos analíticos na quantificação do teor de Gabapentina em diversas cápsulas de diversos laboratórios

Tabela 7.2 - Variação da equação da reta ao longo do tempo para o método NBD-Cl.

Tempo (horas)	Sensibilidade (ppm ⁻¹)*	Ordenada na origem*	Coefficiente de Correlação (r ²)*
0	1,77 ₈ ±0,04 ₀	0,1 ₉ ±0,7 ₃	0,999
4	1,79 ₂ ±0,04 ₉	0,4 ₄ ±0,9 ₀	0,999
24	1,78 ₇ ±0,04 ₁	0,2 ₄ ±0,7 ₄	0,999
48	1,79 ₅ ±0,03 ₃	0,1 ₄ ±0,6 ₀	0,999
72	1,79 ₅ ±0,03 ₃	0,2 ₄ ±0,5 ₉	0,999
96	1,79 ₉ ±0,04 ₀	0,1 ₈ ±0,7 ₃	0,999
120	1,79 ₈ ±0,03 ₅	0,2 ₁ ±0,6 ₄	0,999

*Cálculos efetuados de acordo com as expressões contidas em k) no anexo de equações

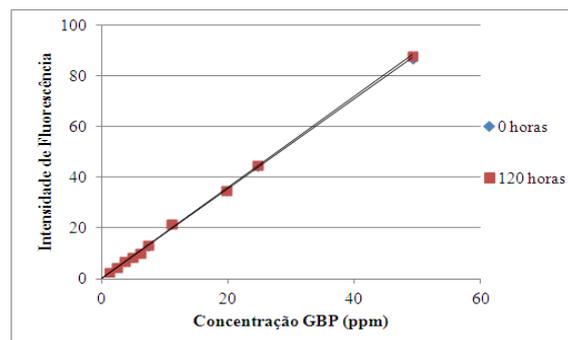


Figura 7.6 - Evolução da reta de calibração no primeiro e último dia de análise para o método NBD-Cl.

A sensibilidade do método mantém-se razoavelmente constante, bem como a ordenada na origem, mantendo sempre linearidade muito próxima de 1,00. As razões entre os declives das retas logo após a preparação das soluções padrão e ao longo de 120 horas de análise estiveram dentro dos limites de aceitação (98-102 %), tendo-se verificado estar entre 98,84 e 99,52 %.³³ Foi analisada a variação da concentração de gabapentina dos padrões 2, 4, 6 e 8 ao longo de 120 horas. Para o cálculo da concentração foram usadas as retas de calibração obtidas ao longo do tempo, tendo-se obtido coeficientes de variação de 2,51, 1,03, 1,23 e 0,66 %, respetivamente. O padrão 2 obteve um valor acima do limite de aceitação (2,00 %), pelo que não se pode considerar que a sua concentração se manteve estável. No entanto, todas as outras mantiveram a concentração de gabapentina constante durante as 120 horas de análise. Verifica-se que as retas não apresentam diferenças significativas a nível do seu declive, havendo completa sobreposição das mesmas, pelo que as soluções de gabapentina preparadas são estáveis durante 120 horas, a 4 °C ao abrigo da luz.

De forma a avaliar a precisão e exatidão do método foram preparadas três soluções de diferentes concentrações de analíto, designadamente, 4,9₁±0,1₅, 19,6₆±0,4₁ e 36,8₆±0,4₅ ppm, preparadas a partir da solução *Stock* e *Intermédia*, de acordo com a **Tabela A63**, apresentada em anexo. A estas soluções foram efetuadas seis análises no dia em que foram preparadas e uma análise a cada dia após a preparação das mesmas, em quatro dias consecutivos, estando na **Tabela 7.3** apresentadas as médias dos resultados obtidos para cada nível de concentração. Os resultados obtidos individualmente se encontram em anexo nas **Tabelas A64** e **A65**. De notar que as concentrações calculadas foram obtidas a partir da reta de calibração obtida para a análise dos padrões efetuada logo após a sua preparação.

Comparação de métodos analíticos na quantificação do teor de Gabapentina em diversas cápsulas de diversos laboratórios

Tabela 7.3 - Coeficiente de variação e erro relativo do método NBD-CI para análises efetuadas no mesmo dia e em dias alternados.

Método	Ensaio efetuado no mesmo dia (N=6)						Ensaio efetuado em dias alternados (N=4)				
	C_{GBP} esperada \pm ec(ppm)*	$C_{GBP\pm ec}$ (ppm)*	SD*	RSD (%)*	RSD _H (%)*	RE (%)*	$C_{GBP\pm ec}$ (ppm)*	SD*	RSD (%)*	RSD _H (%)*	RE (%)*
NBD-CI	4,9 ₁ \pm 0,1 ₅	5,0 \pm 1,1	0,04	0,84	9,66	2,19	5,1 \pm 1,1	0,01	0,13	9,66	3,21
	19,6 ₅ \pm 0,4 ₁	19,8 \pm 1,1	0,20	0,99	7,84	0,96	19,9 \pm 1,1	0,08	0,40	7,84	1,43
	36,8 ₄ \pm 0,4 ₅	37,4 \pm 1,3	0,13	0,33	7,13	1,57	37,1 \pm 1,3	0,18	0,48	7,13	0,71

*Cálculos feitos a partir das expressões contidas em d), e), f), j) e o) no anexo de equações

Para as análises efetuadas no mesmo dia o coeficiente de variação variou entre 0,33 e 0,99 % e para análises em dias alternados este variou entre 0,13 e 0,48 %, pelo que se encontram dentro dos valores limitantes indicados na literatura pela AOAC, 7,30 %, para os níveis de concentrações na ordem das dezenas de ppm de analíto ou abaixo dos valores de RSD de Horwitz.²⁹ Assim confirma-se a elevada precisão do método pela obtenção de valores bastante inferiores ao limite. A exatidão do método foi também avaliada, pelo cálculo dos valores de erro relativo, pelo que se obtiveram valores entre 0,96 e 2,19 % para as análises efetuadas no mesmo dia, e 0,71 e 3,21%, para análises efetuadas em dias alternados, valores muito abaixo do limite de aceitação. Assim, o método pode-se afirmar bastante exato, uma vez que o erro relativo deve estar abaixo dos 5,00 %.⁴¹

De forma a avaliar a recuperação do método NBD-CI foram preparadas três soluções de concentração fixa de gabapentina pura fortificadas com três soluções de diferente concentração de amostra de Neurotin[®], de forma a obter soluções de concentração 7,6₈ \pm 0,5₂, 15,6₈ \pm 0,6₁ e 41,7 \pm 1,4 ppm. As soluções e a sua forma de preparação encontram-se em anexo na **Tabela A66**. A recuperação média para cada nível de fortificação encontra-se apresentada na **Tabela 7.4**, estando os resultados obtidos para cada ensaio individual apresentados em anexo na **Tabela A67**. A **Figura 7.7** mostra a linearidade entre a concentração de gabapentina recuperada e fortificada.

Comparação de métodos analíticos na quantificação do teor de Gabapentina em diversas cápsulas de diversos laboratórios

Tabela 7.4 - Média dos ensaios de recuperação para o método NBD-Cl.

Método	$C_{GBP\text{esperada}} \pm ec$ (ppm)*	$C_{GBP} \pm ec$ (ppm)*	Recuperação $\pm SD$ (%)*
	7,6 ₈ ± 0,5 ₂	7,7 ± 1,1	99,5 ± 1,1
NBD-Cl	15,6 ₈ ± 0,6 ₁	15,7 ± 1,1	99,2 ± 1,5
	41,7 ± 1,4	41,7 ± 1,3	101,1 ± 2,3

*Cálculos efetuados de acordo com as expressões contidas em d), j), m) e o) no anexo de equações

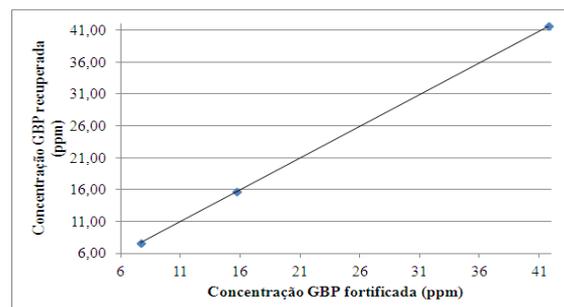


Figura 7.7 - Relação entre a concentração de gabapentina recuperada e fortificada para o método NBD-Cl.

O método NBD-Cl obteve resultados bastante razoáveis para os ensaios de recuperação, com uma média de recuperação de 99,7 ± 1,7 %. O critério de aceitação para as recuperações eram valores abaixo do indicado pela AOAC para os níveis de concentração com as quais se está a trabalhar, entre 80-110 %.²⁹ A linearidade do método e a sua capacidade de recuperação foram estimadas pelo declive e coeficiente de correlação da função concentração de gabapentina recuperada e fortificada, tendo-se obtido valores de 0,998₁ ± 0,007₈ ppm⁻¹ e 1,00, respetivamente, confirmando-se desta forma a elevada linearidade do método.⁴⁴

A recuperação média do método NBD-Cl foi 99,7 ± 1,7 %, o que sugere uma interferência dos excipientes pouco significativa na determinação de gabapentina. Para estimar a especificidade do método NBD-Cl na análise de gabapentina em cápsulas e verificar a extensão da interferência dos excipientes na análise, foi também utilizado o método da adição de padrão. A razão entre as retas obtidas por este método e o método da reta de calibração é considerado um método adicional na estimativa da especificidade. Para isso foram adicionados 0,50 mL da solução de amostra de uma cápsula de Neurotin[®] e igual volume aos padrões da reta de calibração, descrita em anexo na **Tabela A68**, bem como as absorvências lidas para cada padrão. Na **Figura 7.8** encontram-se apresentadas as retas obtidas para o método da reta de calibração e adição de padrão, para o presente método de determinação da gabapentina.

Comparação de métodos analíticos na quantificação do teor de Gabapentina em diversas cápsulas de diversos laboratórios

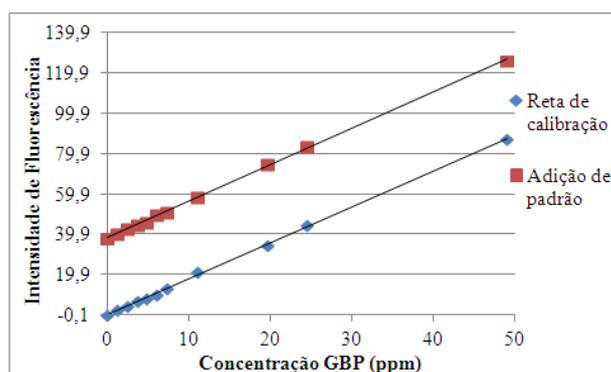


Figura 7.8 - Declive da reta pelo método de calibração e adição de padrão pelo método NBD-Cl.

A equação da reta obtida para o método de adição de padrão do método NBD-Cl para um nível de confiança de 95 % foi: $IF=(1,80_9\pm 0,03_4)C_{GBP} + (38,0_9\pm 0,6_2)$, tendo sido a razão entre os declives das retas do método de calibração e adição de padrão 98,32 %, valor que está dentro dos limites aceitos pela AOAC (98-102 %), o que sugere elevada especificidade do método NBD-Cl pela gabapentina em cápsulas.²⁹ Na **Figura 7.8** pode-se verificar que as mesmas são totalmente paralelas. A concentração da solução de amostra obtida pelo método de adição de padrão foi $21,0_6\pm 0,6_7$ ppm, calculada pela expressão n) presente no **Anexo de equações**, e o correspondente teor das cápsulas foi $105,2_8\pm 0,3_0$ mg de gabapentina.

Utilizando a reta de calibração na análise e amostras de cada uma das cápsulas de gabapentina dos diferentes laboratórios, preparadas segundo a **Tabela A17**, em anexo. Os valores de recuperação obtidos individualmente para as diferentes marcas de laboratórios, pelo método NBD-Cl, estão apresentados em anexo na **Tabela A69**, estando na **Tabela 7.5** apresentadas as médias obtidas nesta análise.

Tabela 7.5 - Recuperações obtidas para as diferentes cápsulas para o método NBD-Cl.

Método Proposto (N=6)		Gabomox [®]	Neurotin [®]	Ratiopharm	Teva	Generis	Método Referência (N=5) ⁴⁵
	Recuperação \pm SD(%)*	100,5 ₁ \pm 0,7 ₃	99,6 ₈ \pm 0,8 ₇	100,3 ₅ \pm 0,6 ₆	98,6 \pm 1,3	101,3 \pm 1,1	99,5 ₅ \pm 1,4 ₅
NBD-Cl	$t_{calculado}(95\%)*$	1,43	0,18	1,21	-1,16	2,35	$t_{tabelado}(95\%)*$ 2,71
	$F_{calculado}(95\%)*$	3,99	2,81	4,85	1,18	1,66	$F_{tabelado}(95\%)*$ 5,19

*Cálculos efetuados de acordo com expressões contidas em d), g), h) e o) no anexo de equações

O teor de gabapentina obtidos pelo método NBD-Cl esteve muito próximo do valor esperado, 100 mg, para todas as cápsulas, uma vez que as recuperações obtidas estiveram compreendidas entre 98,6 \pm 1,3 e 101,3 \pm 1,1 %. Os valores de *t-student* para o

método experimental foram iguais ou inferiores a 2,35 em módulo e os valores de *Fisher* nunca foram superiores a 4,85. Uma vez que estes valores em nenhum dos casos excederam os valores tabelados, 2,57 e 5,19, respectivamente, para 95 % de confiança, pode-se aferir que não houve diferenças significativas entre o presente método e o método de referência, no que diz respeito a exatidão e precisão, cumprindo os critérios de aceitação. Todas as concentrações de gabapentina foram retiradas da reta por interpolação e com elevado rigor, uma vez que se encontraram acima dos limites de detecção e quantificação e abaixo do limite de linearidade.

8 Comparação dos Métodos Efetuados

A escolha de um método de análise baseia-se fundamentalmente na finalidade da análise, envolvendo fatores como a estrutura química, características físico-químicas do analito, grau de pureza, disponibilidade de amostra, equipamentos, reagentes, custos ou mesmo parâmetros inerentes ao próprio método, como os limites, a sensibilidade, precisão, exatidão, entre outros. As principais diretrizes usadas na comparação de dois métodos analíticos a nível da sua exatidão e precisão podem ser encontradas nas normas ISO 5725-6:1994.³⁴ A comparação de métodos é essencial para que seja selecionado o mais adequado para a finalidade pretendida, com capacidade de atingir os objetivos propostos de forma rigorosa.

Um dos objetivos deste estudo é a comparação, a vários níveis, de métodos analíticos na quantificação da gabapentina em cápsulas, nomeadamente a nível de parâmetros das retas, exatidão, precisão, teor de gabapentina nas cápsulas e custos dos métodos. A comparação foi feita não só entre os métodos elaborados no presente estudo mas também entre os mesmos e os seus métodos de referência e métodos alternativos na quantificação de gabapentina.

8.1 COMPARAÇÃO DOS PARÂMETROS DA RETA DOS MÉTODOS

A comparação dos diferentes métodos analíticos no doseamento da gabapentina em cápsulas a nível de alguns parâmetros de avaliação torna-se importante, de forma a verificar se os mesmos são ideais para o objetivo que o método visa cobrir, pelo que na **Tabela 8.1** estão apresentados os principais parâmetros das retas de calibração para os métodos efetuados.

Comparação de métodos analíticos na quantificação do teor de Gabapentina em diversas cápsulas de diversos laboratórios

Tabela 8.1 - Parâmetros das retas de calibração dos métodos efetuados para a quantificação de gabapentina em cápsulas.

Método	λ (nm)	Gama trabalho (ppm)	Equação reta (95% confiança)*	LD _{Sb} (ppm)*	LQ _{Sb} (ppm)*	LL (ppm)*	GD*
Direto	192	6,40-142,42	$A=[(2,55_4 \pm 0,04_8) \times 10^{-3}]C_{GBP} + [0,6_5 \pm 0,2_8] \times 10^{-2}$	1,92	6,40	142,42	13,44
Etanol/Água	194	58,37-724,44	$A=[(8,4_0 \pm 0,1_9) \times 10^{-4}]C_{GBP} + [(1,0_3 \pm 0,6_5) \times 10^{-2}]$	17,51	58,37	724,44	10,06
HCl 0,1 M	206	84,02-811,60	$A=[(3,13_5 \pm 0,07_7) \times 10^{-4}]C_{GBP} + [(-0,6 \pm 2,6) \times 10^{-3}]$	25,21	84,02	811,60	9,75
PBQ	350	7,30-241,48	$A=[(5,2_3 \pm 0,1_3) \times 10^{-3}]C_{GBP} + [(2,1 \pm 1,9) \times 10^{-2}]$	2,19	7,30	241,48	9,82
Vanilina	392	34,55-712,08	$A=[(1,14_4 \pm 0,02_1) \times 10^{-3}]C_{GBP} + [(4,5_0 \pm 0,6_7) \times 10^{-2}]$	10,36	34,55	712,08	11,11
Hipoclorito	588	2,50-73,68	$A=[(1,68_5 \pm 0,02_7) \times 10^{-2}]C_{GBP} + [(-0,9_0 \pm 0,8_5) \times 10^{-2}]$	0,75	2,50	73,68	14,85
NBD-Cl	464 excitação 542 emissão	1,86-49,12	$IF=(1,77_9 \pm 0,04_0)C_{GBP} + (0,1_9 \pm 0,7_3)$	0,56	1,86	49,12	10,77

*Cálculos efetuados de acordo com expressões contidas em k) e l) no anexo de equações

A técnica espectrofluorimétrica de análise, método NBD-Cl, foi, como era de esperar, a que apresentou maior sensibilidade, $1,77_9 \pm 0,04_0$ ppm⁻¹ e menores limites de detecção e quantificação, 0,56 ppm e 1,86 ppm, respetivamente, tendo sido linear numa gama de concentrações entre e 1,86-49,12 ppm. Dentro da técnica espectroscopia de absorção, o método que obteve melhores resultados a nível dos parâmetros dos métodos analíticos foi o método Hipoclorito, obtendo a melhor sensibilidade $(1,68_5 \pm 0,02_7) \times 10^{-2}$ ppm⁻¹ e menores limites de detecção e quantificação, 0,74 e 2,50 ppm, tendo tido comportamento linear do sinal instrumental relativamente à concentração de gabapentina dentro da gama 2,50-73,68 ppm. O método Direto foi, dentro dos métodos sem derivatização da gabapentina, que obteve os melhores parâmetros da reta de calibração, apresentando também melhores resultados que a maioria dos métodos de derivatização, nomeadamente menores valores de limites de detecção e quantificação que os métodos *p*-benzoquinona e Vanilina, tendo apresentado linearidade numa gama de concentrações entre 6,40-142,42 ppm, sensibilidade de $(2,55_4 \pm 0,04_8) \times 10^{-3}$ ppm⁻¹ e limites de detecção e quantificação de 1,92 e 6,40 ppm, respetivamente. Contudo, o método *p*-benzoquinona refletiu maior valor de sensibilidade, $(5,2_3 \pm 0,1_3) \times 10^{-3}$ ppm⁻¹. Os métodos Etanol/Água e HCl 0,1 M obtiveram parâmetros da reta bastante elevados para o objetivo proposto e as menores sensibilidades entre todos os métodos.

8.2 COMPARAÇÃO DA PRECISÃO E EXATIDÃO DOS MÉTODOS

A comparação da precisão dos métodos avaliados será feita com base nos valores de coeficiente de variação e a comparação da exatidão, com base no erro relativo e ensaios de recuperação. Na **Tabela 8.2** encontra-se o resumo dos coeficientes de variação e erro relativo para cada método e concentração.

Tabela 8.2 - Coeficientes de variação erro relativo obtido em análises efetuadas no mesmo dia e em dias alternados para os métodos efetuados.

Método	Análises efetuadas no mesmo dia (N=6)						Ensaio efetuados em dias alternados (N=4)				
	C _{GBP} esperada ±ec(ppm)*	C _{GBP} ±ec (ppm)*	SD*	RSD (%)*	RSD _H (%)*	RE (%)*	C _{GBP} ±ec (ppm)*	SD*	RSD (%)*	RSD _H (%)*	RE (%)*
Direto	39,2±1,2	39,7±2,5	0,58	1,45	7,07	1,30	39,8±2,5	0,37	0,94	7,07	1,72
	31,1 ₅ ±0,7 ₄	31,0±2,5	0,59	1,90	7,32	-0,50	31,2±2,5	0,37	1,20	7,32	0,23
	10,6 ₈ ±0,4 ₄	10,7±2,6	0,29	2,75	8,60	0,25	10,5±2,6	0,20	1,87	8,60	-1,88
Vanilina	201,8±3,9	202±1,5	0,92	0,46	5,52	-0,10	202±1,5	1,13	0,56	5,52	-0,10
	154,3±3,9	153±1,5	1,33	0,86	5,75	-0,54	154±1,5	1,10	0,72	5,75	-0,40
	83,1±2,0	83±1,5	1,02	1,23	6,31	0,15	83±1,5	1,10	1,32	6,31	0,24
Hipoclorito	49,1 ₂ ±0,5 ₁	49,9±1,3	0,07	0,14	6,83	1,45	49,8±1,3	0,05	0,97	6,83	1,29
	24,5 ₆ ±0,4 ₀	24,4±1,3	0,06	0,25	7,58	-0,65	24,5±1,3	0,05	0,20	7,58	-0,28
	7,3 ₇ ±0,2 ₀	7,5±1,3	0,07	0,96	9,09	1,65	7,5±1,3	0,08	1,02	9,09	1,78
NBD-Cl	36,8 ₄ ±0,4 ₅	37,4±1,3	0,13	0,33	7,13	1,57	37,1±1,3	0,18	0,48	7,13	0,71
	19,6 ₅ ±0,4 ₁	19,8±1,1	0,20	0,99	7,84	0,96	19,9±1,1	0,08	0,40	7,84	1,43
	4,9 ₁ ±0,1 ₅	5,0±1,1	0,04	0,84	9,66	2,19	5,1±1,1	0,01	0,13	9,66	3,21

*Cálculos feitos a partir das expressões contidas em d), e), f), j) e o) no anexo de equações

Os métodos Direto, Hipoclorito e NBD-Cl apresentam valores de coeficientes de variação entre 0,14 e 2,75 %, bastante inferiores ao limite de aceitação para a gama de concentrações com que se está a trabalhar, 7,30 % (segundo a equação de Horwitz para concentrações na ordem das dezenas de ppm).²⁹ Os métodos anteriores afirmam-se precisos em termos de repetibilidade, tendo sido o método Hipoclorito o mais preciso e o método Direto o que apresentou menor precisão, em termos de repetibilidade.

A nível da precisão intermédia, ou seja, para análises efetuadas em dias alternados, o método NBD-Cl foi o que apresentou maior precisão e consequentemente menores valores de coeficiente de variação, entre 0,13 e 0,48 %. O método Direto foi o que apresentou novamente a menor precisão, com valores de coeficiente de variação entre 0,94 e 1,87 %.

O limite de aceitação para os coeficientes de variação, segundo a AOAC, são valores inferiores a 5,30 %, uma vez que se está a trabalhar com concentrações na ordem das centenas de ppm.²⁹ Para as análises efetuadas no mesmo dia e em dias alternados foram obtidos valores de coeficiente de variação abaixo do limite, de 0,46 a

Comparação de métodos analíticos na quantificação do teor de Gabapentina em diversas cápsulas de diversos laboratórios

1,23 e de 0,56 a 1,32 %, respetivamente. Pode-se desta forma afirmar que o método Vanilina é preciso em termos de repetibilidade e precisão intermédia.

Relativamente ao erro relativo dos métodos, deve-se encontrar abaixo dos 5,00 %, o que se verificou em todos os métodos e níveis de concentração.⁴¹ O menor valor de erro relativo observou-se para o método Vanilina com 0,10 % para a concentração 201,8±3,9 ppm. O erro relativo obteve um valor máximo para a solução de concentração 4,91±0,15 ppm do método NBD-Cl, com 2,19 % para análises efetuadas no mesmo dia e 3,21 % para o método NBD-Cl para medições efetuadas em dias alternados.

Na **Tabela 8.3** estão resumidas as médias dos resultados obtidos nos ensaios de recuperação para cada método. A recuperação do método pode ser considerada uma estimativa da exatidão do mesmo, pelo que se torna essencial a comparação dos métodos efetuados a este nível. A representação gráfica encontra-se apresentada na **Figura 8.1**.

Tabela 8.3 - Resumo dos ensaios de recuperação para os diferentes métodos.

Método	C _{GBPesperada} ±ec(ppm)*	C _{GBP} ±ec(ppm)*	Recuperação ±SD (%)*	Média ± SD(%)*
Direto	46,2±1,7	34,2±2,5	99,7±2,7	99,8±2,7
	34,2±1,2	22,2±2,5	99,2±2,5	
	22,24±0,95	46,3±2,5	100,6±3,2	
Vanilina	44,2±1,3	44,1±1,5	98,9±1,1	99,7±1,1
	18,2±5,7	18,4±1,5	100,5±1,0	
	15,2±6,4	15,2±1,5	99,71±0,60	
Hipoclorito	39,7±3,3	39,7±1,3	100,2±2,8	100,0±2,0
	15,7±1,4	15,7±1,3	100,0±1,7	
	7,68±0,78	7,7±1,3	99,8±1,7	
NBD-Cl	41,7±1,4	41,7±1,3	101,1±2,3	99,7±1,7
	15,68±0,61	15,7±1,1	99,2±1,5	
	7,68±0,52	7,7±1,1	99,5±1,1	

*Cálculos efetuados de acordo com as expressões contidas em d), j), m) e o) no anexo de equações

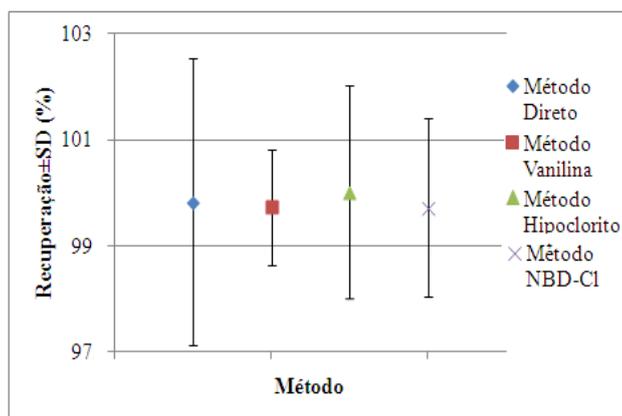


Figura 8.1 - Representação gráfica médias das recuperações e correspondente desvio-padrão.

Todos os métodos obtiveram recuperações muito próximas de 100 % e dentro do limite de aceitação descrito pela AOAC, 80-110 %, para os métodos Direto, Hipoclorito e NBD-Cl e 80-107 % para o método Vanilina.²⁹ Estes valores encontram-se também dentro dos limites de aceitação indicados pela ICH, que limita o valor da média de recuperações entre 90-110 % e individualmente entre que 70 % e 130 %, independentemente da concentração de analíto.³³ Os métodos que obtiveram melhores ensaios de recuperação foram os métodos Hipoclorito e Direto, com recuperações de 100,0±2,0 e 99,8±2,7 %, seguidos dos métodos Vanilina e NBD-Cl, com recuperações de

Comparação de métodos analíticos na quantificação do teor de Gabapentina em diversas cápsulas de diversos laboratórios

99,7±1,1 e 99,7±1,7 %, respectivamente. Todos os métodos se mostraram bastante seletivos para o analito.

8.3 COMPARAÇÃO DA APLICABILIDADE DOS MÉTODOS ÀS CÁPSULAS

Foram comparadas as recuperações obtidas para as cápsulas de gabapentina pelos diferentes métodos, de forma a verificar quais os que obtiveram recuperações mais concordantes com os métodos de referência respectivos, estando estes valores apresentados na **Tabela 8.4**.

Tabela 8.4 - Médias das recuperações obtidas para as diferentes cápsulas e métodos.

Método Proposto (N=6)		Gabomox [®]	Neurotin [®]	Ratiopharm	Teva	Generis	Método Referência (N=5)
Direto	Recuperação±SD(%) [*]	99,5±1,6	98,9±2,5	97,9±2,1	98,2±1,6	101,2±2,3	99,5±1,4 ⁴⁵
	<i>t</i> _{cal} (95%) [*]	-0,02	-0,53	-1,50	-1,42	1,36	<i>t</i> _{tab} (95%) [*] 2,57
	<i>F</i> _{cal} (95%) [*]	1,21	2,92	2,00	1,21	2,49	<i>F</i> _{tab} (95%) [*] 6,26
		Gabomox [®]	Neurotin [®]	Ratiopharm	Teva	Generis	
Vanilina	Recuperação±SD(%) [*]	99,9 ₀ ±0,7 ₇	100,3 ₄ ±0,6 ₆	100,0 ₅ ±0,6 ₄	100,0 ₅ ±0,7 ₀	101,5±1,1	99,5±1,4 ⁴⁵
	<i>t</i> _{cal} (95%) [*]	0,52	1,20	0,76	0,75	2,56	<i>t</i> _{tab} (95%) [*] 2,57
	<i>F</i> _{cal} (95%) [*]	3,55	4,78	5,08	4,28	1,78	<i>F</i> _{tab} (95%) [*] 5,19
		Gabomox [®]	Neurotin [®]	Ratiopharm	Teva	Generis	
Hipoclorito	Recuperação±SD(%) [*]	101,0 ₀ ±0,5 ₂	100,9 ₀ ±0,4 ₈	100,6 ₁ ±0,5 ₂	99,6 ₂ ±0,4 ₆	101,1 ₅ ±0,7 ₈	99,5±1,4 ⁴⁵
	<i>t</i> _{cal} (95%) [*]	2,30	2,17	1,68	0,11	2,34	<i>t</i> _{tab} (95%) [*] 2,57
	<i>F</i> _{cal} (95%) [*]	4,01	4,61	4,01	5,13	1,77	<i>F</i> _{tab} (95%) [*] 5,19
		Gabomox [®]	Neurotin [®]	Ratiopharm	Teva	Generis	
NBD-Cl	Recuperação±SD(%) [*]	100,5 ₁ ±0,7 ₃	99,6 ₈ ±0,8 ₆	100,3 ₅ ±0,6 ₆	98,6±1,3	101,3±1,1	99,5±1,4 ⁴⁵
	<i>t</i> _{cal} (95%) [*]	1,43	0,18	1,21	-1,16	2,35	<i>t</i> _{tab} (95%) [*] 2,57
	<i>F</i> _{cal} (95%) [*]	3,99	2,81	4,85	1,18	1,66	<i>F</i> _{tab} (95%) [*] 5,19
		Gabomox [®]	Neurotin [®]	Ratiopharm	Teva	Generis	
Titulação NaOH	Recuperação±SD(%) [*]	106,7±1,2	96,8±1,2	96,3 ₅ ±0,5 ₀	94,9 ₅ ±0,8 ₉	105,9±1,1	99,6 ₅ ±1,0 ₂ ⁴²
	<i>t</i> _{cal} (95%) [*]	7,96	-3,21	-4,24	-5,67	7,15	<i>t</i> _{tab} (95%) [*] 12,71
	<i>F</i> _{cal} (95%) [*]	1,31	1,41	4,14*	1,30*	1,16	<i>F</i> _{tab} (95%) [*] 7,71
		Gabomox [®]	Neurotin [®]	Ratiopharm	Teva	Generis	
Titulação HCl	Recuperação±SD(%) [*]	101,2±1,2	98,6±1,1	96,9±2,2	97,3 ₆ ±0,5 ₄	106,7±1,7	99,6 ₅ ±1,0 ₂ ⁴²
	<i>t</i> _{cal} (95%) [*]	1,73	-1,22	-2,44	-2,94	7,08	<i>t</i> _{tab} (95%) [*] 12,71
	<i>F</i> _{cal} (95%) [*]	1,48	1,21	4,81	3,56*	2,77	<i>F</i> _{tab} (95%) [*] 7,71

*Cálculos efetuados de acordo com expressões contidas em d), g), h) e o) no anexo de equações; * *F*_{tabelado}(95%)=224,58

Como referência foram usados métodos devidamente avaliados e validados, nos quais se obteve, para a análise espectroscópica do Neurotin[®] 100 mg, uma recuperação de 99,5±1,4⁴⁵ % e para a quantificação por volumetria uma recuperação de 99,6₅±1,0₂

Comparação de métodos analíticos na quantificação do teor de Gabapentina em diversas cápsulas de diversos laboratórios

%.⁴² Estes foram utilizados para verificar a existência de diferenças significativas entre média e o desvio padrão do valor obtido pelo método de referência e os métodos efetuados no presente estudo, através da aplicação do teste de hipóteses. Em todos os casos, para as diferentes cápsulas e métodos confirmou-se a hipótese nula, pelo que os métodos se podem considerar precisos e exatos, comparativamente com o método de referência específico.

O método Vanilina foi, dentro da espectroscopia com derivatização da gabapentina, o que obteve resultados de exatidão significativamente mais concordantes com o método de referência, com valores de teste *t-student* entre 0,52 e 2,56 e o método NBD-Cl foi o que obteve valores de precisão mais concordantes, com valores de *Fisher* entre 1,66 e 4,85. O método Direto foi, dentro dos métodos sem derivatização da gabapentina, o que obteve menores diferenças a nível da exatidão e precisão, relativamente ao método de referência, com valores de teste *t-student* entre 0,02 e 1,50 e valores de teste *Fisher* entre 1,21 e 2,92, para 95 % de confiança. Este método foi o que obteve resultados mais semelhantes relativamente ao método de referência.

O método Titulação com HCl foi, dentro da técnica volumétrica, o que obteve valores estatisticamente mais semelhantes em termos de exatidão relativamente ao método de referência, com valores de *t-student* entre 1,22 e 7,08, para 95 % de confiança. No entanto, o método Titulação com NaOH mostrou precisão significativamente mais próxima do método de referência, com valores de *Fisher* entre 1,17 e 4,09.

8.4 COMPARAÇÃO DOS TEORES DE GABAPENTINA POR MÉTODO

A determinação do teor de gabapentina nas cápsulas foi efetuada para os métodos que se achou relevante, pelos parâmetros da reta, reprodutibilidade e dificuldade de execução dos mesmos. Nas **Figuras 8.2 e 8.3** encontram-se os valores das médias dos teores de gabapentina e o seu desvio padrão obtidos por método e cápsula, de acordo com a **Tabela A70**, apresentada em anexo, com o intuito de os comparar relativamente à proximidade do valor indicado pelo fabricante e à proximidade dos valores entre si, pela aplicação do teste de hipóteses.

Comparação de métodos analíticos na quantificação do teor de Gabapentina em diversas cápsulas de diversos laboratórios

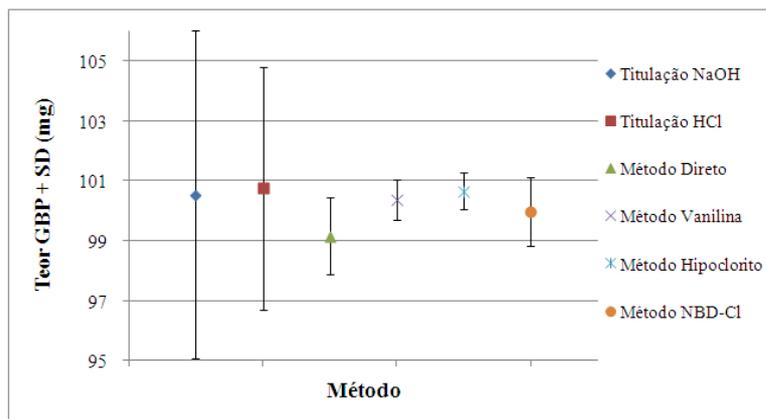


Figura 8.2 - Representação gráfica dos teores médios obtidos por método e correspondente desvio-padrão.

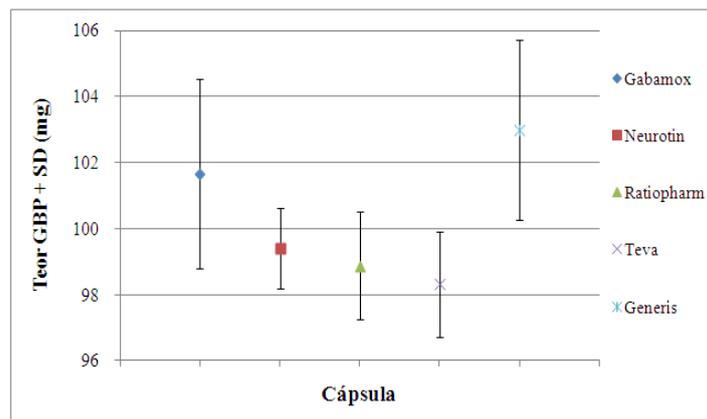


Figura 8.3 - Representação gráfica dos teores médios obtidos por cápsula e correspondente desvio-padrão.

A comparação do teor de gabapentina nas diferentes cápsulas pelos diferentes métodos possibilitou além disso comparar os métodos relativamente à proximidade do teor obtido experimentalmente e indicado pelo fabricante e analisar as possíveis interferências dos diferentes excipientes da formulação na análise espectral. Segundo a Associação Portuguesa de Medicamentos Genéricos (Apogen), medicamento genérico é definido como um medicamento com a mesma composição qualitativa e quantitativa em princípio ativo, relativamente ao medicamento de referência, a mesma forma farmacêutica, podendo ser considerados equivalentes terapêuticos.⁴⁹ No entanto a composição e teor em excipientes pode ser variável, induzindo diferentes interferências na análise espectroscópica do fármaco.

Para a determinação do teor de gabapentina nas cápsulas, foram preparadas amostras de uma cápsula de cada laboratório, como apresentado em anexo, na **Tabela A17** para os métodos Direto, Hipoclorito e NBD-Cl, **Tabela A43**, para o método Vanilina e **Tabela A2**, para os métodos volumétricos. Assumindo que os 100 mg indicado pelos fabricantes é o real teor de gabapentina nas cápsulas, o método que obteve valores mais próximos foi o método NBD-Cl, uma média de $100,0 \pm 1,1$ mg para as diversas cápsulas, seguido dos métodos Vanilina, Hipoclorito e Direto, que obtiveram, respetivamente $100,37 \pm 0,66$, $100,66 \pm 0,61$ e $99,1 \pm 1,3$ mg. Os métodos que mais se afastaram do valor real foram os métodos volumétricos, que obtiveram uma média de teores de gabapentina nas diferentes cápsulas de $100,1 \pm 5,7$ e $100,2 \pm 4,0$ mg para a titulação com NaOH e HCl, respetivamente.

As cápsulas que verificaram resultados mais próximos de 100 mg foram as cápsulas de Neurotin[®] com um teor médio de $99,2 \pm 1,4$ mg, quando quantificadas pelos

Comparação de métodos analíticos na quantificação do teor de Gabapentina em diversas cápsulas de diversos laboratórios

diferentes métodos. As cápsulas Generis obtiveram o teor de gabapentina menos concordante com o valor indicado, $102,9 \pm 2,6$ mg. Apesar das cápsulas da Generis possuírem qualitativamente uma composição de excipientes semelhante às outras, quantitativamente, o teor dos mesmos na formulação farmacêutica pode ser variável (uma vez que não é especificado pelos fabricantes), o que induz diferentes níveis de interferências quando analisadas espectralmente. Assim, as recuperações ligeiramente superiores obtidas para as cápsulas da marca Generis podem estar relacionadas com diferentes composições de excipientes das cápsulas, relativamente às outras marcas.

Globalmente, o método e cápsulas que obteve valores mais próximos de 100 mg foi o método Vanilina para as cápsulas da Ratiopharm e Teva, ambas com um teor de $100,05 \pm 0,29$ mg, seguidas das cápsulas de Gabamox[®], quando quantificadas pelo método Vanilina, com um teor de $99,90 \pm 0,29$ ppm e do método NBD-Cl para as cápsulas da Neurotin[®], com teor de $99,68 \pm 0,29$ ppm. As cápsulas que mais se afastaram do valor indicado pelo fabricante foram as da Generis, quando analisadas pelas técnicas volumétricas de análise, com teores de $105,9 \pm 1,1$ e $106,7 \pm 1,7$ mg, para a titulação com NaOH e HCl, respetivamente. De igual forma, as cápsulas de Gabamox[®] pela técnica volumétrica com NaOH, obteve $106,7 \pm 1,2$ mg, um valor bastante discrepante, relativamente ao esperado. Segundo a *Farmacopeia Portuguesa VII*, no estudo da uniformidade de teor, o limite de aceitação para fórmulas farmacêuticas como as cápsulas de massa de princípio ativo até 300 mg são variações de 10 % no teor indicado pelo fabricante.⁵⁰ Assim, assumido que a análise efetuada era exata, apesar do teor obtido ser diferente do indicado, o teor das cápsulas encontra-se dentro do limite de aceitação.

As cápsulas da marca Teva não contêm na sua composição um excipiente presente em todas as outras cápsulas, a lactose. Obteve-se para as mesmas o menor teor de gabapentina, $98,1 \pm 1,8$ ppm. Poder-se-ia assim concluir que a lactose poderia ser um interferente na análise espectral da gabapentina e desta forma ter aumentado os teores obtidos para as outras cápsulas. No entanto, verificou-se anteriormente, pelos ensaios de recuperação, a baixa interferência destes componentes da formulação na análise, podendo ter sido apenas uma coincidência ou pode estar relacionado com o fato do teor de excipientes ser desconhecido. Verifica-se que as cápsulas de Gabamox[®] quando quantificadas pelo método Titulação com NaOH obtiveram um teor

Comparação de métodos analíticos na quantificação do teor de Gabapentina em diversas cápsulas de diversos laboratórios

relativamente elevado quando comparado com a quantificação das mesmas cápsulas por qualquer outro método. Não havendo razão aparente para tal, uma vez que as amostras foram preparadas de forma idêntica, esta diferença possivelmente foi devida a algum erro (não identificado) que ocorreu durante a análise ou interferência e que influenciou a determinação do ponto de equivalência. Assim, este método necessitava de ter um estudo mais aprofundado para elucidar este efeito.

Foi verificado, através do teste de hipóteses, se havia diferenças estatisticamente significativas relativamente ao teor médio de gabapentina e ao seu desvio padrão entre os métodos efetuados na presente monografia. Na seguinte tabela, **Tabela 8.5** estão apresentados os valores de teste *t-student* e *Fisher* para os métodos desenvolvidos, para verificar a existência de valores discordantes a nível da exatidão e precisão.

Tabela 8.5 – Teste *t-student* e *Fisher*, usando os diferentes métodos experimentais como métodos de referência.

<i>F</i> calculado (95%)***							
Método Referência	Método Direto*	Método Vanilina*	Método Hipoclorito*	Método NBD-Cl*	Titulação NaOH**	Titulação HCl**	<i>F</i> tabelado (95%)***
Método Direto*	NA	3,89	4,44	1,62	19,15	9,69	5,05
Método Vanilina*	3,89	NA	1,14	2,40	74,56	24,72	
Método Hipoclorito*	4,44	1,14	NA	2,74	85,06	43,06	
Método NBD-Cl*	1,62	2,40	2,74	NA	31,03	15,71	
NaOH 0,1M**	19,15	74,56	85,06	31,03	NA	1,98	6,61
HCl 0,1M**	9,69	37,74	43,06	15,71	1,98	NA	
Método Referência	<i>t</i> calculado (95%)***						<i>t</i> tabelado (95%)***
Método Direto*	NA	2,07	2,38	1,47	1,58	1,36	2,57
Método Vanilina*	2,07	NA	0,46	0,49	1,08	0,69	
Método Hipoclorito*	2,38	0,46	NA	0,84	1,01	0,59	
Método NBD-Cl*	1,47	0,49	0,84	NA	1,17	0,82	
Titulação NaOH**	1,58	1,08	1,01	1,17	NA	0,47	
Titulação HCl**	1,36	0,69	0,59	0,82	0,47	NA	

*N = 6; **N = 2; ***Expressões contidas em e) e f) no anexo de equações; NA – Não aplicável

A nível da proximidade dos valores médios dos teores de gabapentina, o limite máximo obtido experimentalmente para o valor de *t-student* foi de 2,38, estando abaixo do valor tabelado para 95 %, 2,57. Pode-se assim concluir que todos os métodos obtiveram teores de gabapentina próximos entre si o suficiente para afirmar que não houve diferenças estatisticamente significativas. No entanto, os métodos que mais se aproximaram, a nível do teor médio de gabapentina, foram os métodos Hipoclorito e

Vanilina, com um valor de teste *t-student* de 0,46 e os métodos que mais se afastaram foram os métodos Hipoclorito e Direto.

A nível da concordância da precisão entre os métodos avaliados pode-se afirmar que os métodos espectroscópicos não possuem diferenças estatisticamente significativas entre si, pois o valor de teste *Fisher* calculado é sempre inferior ao *F* tabelado, para 95 % de confiança. O mesmo se verifica entre os métodos volumétricos. No entanto, a comparação entre os métodos volumétricos e espectroscópicos mostrou a existência de diferenças significativas a nível da precisão, sendo a hipótese nula rejeitada, uma vez que apresentou valores de *Fisher* bastante superiores aos tabelados.

Na comparação de métodos espectroscópicos separadamente dos volumétricos, os métodos Hipoclorito e Direto foram os que obtiveram precisão menos concordante, com um valor de teste de *Fisher* de 4,44 e os métodos Vanilina e Hipoclorito foram os que obtiveram valores mais concordantes, com valor *Fisher* de 1,14. Dentro dos métodos volumétricos, na comparação da precisão dos métodos Titulação com NaOH e HCl, obteve-se um teste de *Fisher* de 1,98, para 95% de confiança, pelo que os métodos se podem considerar estatisticamente semelhantes em termos de precisão.

8.5 COMPARAÇÃO DOS CUSTOS ASSOCIADOS AOS MÉTODOS

A análise de custos de métodos analíticos prende-se a premissas de avaliação do custo-efetividade, ou seja, não deve ser apenas olhado aos custos do método mas também à capacidade de obter resultados reprodutíveis e rigorosos. A comparação dos métodos de análise a nível económico torna-se um ponto essencial, na medida em que, segundo a atual conjuntura do País e a grave situação financeira na qual este se encontra, a necessidade de retenção de custos das empresas é inevitável. Daí advém a necessidade de avaliar os custos dos métodos de análise, de forma a optar pelo mais económico, caso demonstrem igual aplicabilidade para o objetivo que visam cobrir. Com o objetivo de obter resultados confiáveis de forma sustentável, foram comparados os custos dos métodos analisados a nível do tempo despendido, quantidades e o preço dos reagentes e o equipamentos usado na análise, estando os resultados obtidos apresentados na **Tabela 8.6**. Nesta análise económica não foi considerada a necessidade de efetuar várias análises para obter resultados estatísticos reprodutíveis, foi feito o cálculo por ensaio.

Comparação de métodos analíticos na quantificação do teor de Gabapentina em diversas cápsulas de diversos laboratórios

Tabela 8.6 - Análise de custos dos métodos efetuados experimentalmente.

Titulação com HCl					
Reagentes	Instrumento	Massa/Volume	Preço*	Preço gasto (€)	Tempo despendido (Min)
Gabapentina		90 mg	46,8 €/g	4,212	
HCl Concentrado	Potenciómetro	8,4 mL	79 €/2,5 L	0,265	120
Total				4,477	
Titulação com NaOH					
Reagentes	Instrumento	Massa/Volume	Preço*	Preço gasto (€)	Tempo despendido (Min)
Gabapentina		90 mg	46,8 €/g	4,212	
NaOH	Potenciómetro	2000 mg	35,5 €/kg	0,071	120
Total				4,283	
Método Direto					
Reagentes	Instrumento	Massa/Volume	Preço*	Preço gasto (€)	Tempo despendido (Min)
Gabapentina		90 mg	46,8 €/g	4,212	
Total	Uv-vis			4,212	60
Método p-benzoquinona					
Reagentes	Instrumento	Massa/Volume	Preço*	Preço gasto (€)	Tempo despendido (Min)
Etanol		100 mL	64,7 €/2,5L	2,588	
p-benzoquinona		1081 mg	134,5 €/kg	0,145	
Na ₂ HPO ₄		3580 mg	135 €/kg	0,483	
NAH ₂ PO ₄	Uv-vis	1199,8 mg	238,5 €/kg	0,286	180
NaOH		800 mg	35,5 €/kg	0,028	
Gabapentina		90 mg	46,8 €/g	4,212	
Total				7,743	
Método Vanilina					
Reagentes	Instrumento	Massa/Volume	Preço*	Preço gasto (€)	Tempo despendido (Min)
Vanilina		2000 mg	96,9 €/500g	0,388	
Na ₂ HPO ₄		3580 mg	135 €/kg	0,483	
Ácido cítrico		1920 mg	30,9 €/kg	0,059	
NaOH		800 mg	35,5 €/kg	0,028	
Gabapentina	Uv-vis	300 mg	46,8 €/g	14,04	180
		Volume (mL)	Preço	Preço gasto (€)	
Acetaldeído		0,3 mL	34,8 €/L	0,010	
Etanol		100 mL	64,7 €/2,5L	2,588	
Total				17,597	
Método Etanol/Água					
Reagentes	Instrumento	Massa/Volume	Preço*	Preço gasto (€)	Tempo despendido (Min)
Gabapentina		90 mg	46,8 €/g	4,212	
Etanol	Uv-vis	300 mL	64,7 €/2,5L	7,764	60
Total				11,976	
Método HCl 0,1 M					
Reagentes	Instrumento	Massa/Volume	Preço*	Preço gasto (€)	Tempo despendido (Min)
Gabapentina		90 mg	46,8 €/g	4,212	
HCl Concentrado	Uv-vis	8,4 mL	79 €/2,5L	0,265	60
Total				4,477	

* Preço calculado de acordo com o catálogo da Sigma-Aldrich 2014

Comparação de métodos analíticos na quantificação do teor de Gabapentina em diversas cápsulas de diversos laboratórios

Tabela 8.6 (continuação)

Método Hipoclorito					
Reagentes	Instrumento	Massa/Volume	Preço *	Preço gasto (€)	Tempo despendido (Min)
Amido	Uv-vis	750 mg	131,5 €/kg	0,099	300
KI		1500 mg	192 €/500g	0,576	
Nitrito sódio		276 mg	47,6 €/500g	0,026	
KH ₂ PO ₄		1361 mg	238 €/kg	0,324	
Borax		953 mg	49,1 €/kg	0,047	
Gabapentina		20 mg	46,8 €/g	0,936	
Hicloreto de sódio		3 mL	61,3 €/500mL	0,00037	
Total					
Espetrofluorimetria					
Método reagente NBD-Cl					
Reagentes	Instrumento	Massa/Volume	Preço *	Preço gasto (€)	Tempo despendido (Min)
NBD-Cl	Espetrofluorímetro	80 mg	200,5 €/2,5L	6,416	180
Gabapentina		300 mg	46,8 €/kg	0,014	
Ácido bórico		1240 mg	146 €/kg	0,181	
Tetraborato Sódio		1900 mg	49,1 €/kg	0,093	
Metanol		100 mL	48,1 €/2,5L	1,924	
Total					

* Preço calculado de acordo com o catálogo da Sigma-Aldrich 2014

O método Hipoclorito apesar de ser o método que requer a maior quantidade de reagentes mostrou-se o mais económico a nível financeiro. No entanto é o método que mais tempo requer e preparação de maior quantidade de soluções. O método Direto demonstrou-se bastante económico relativamente à quantidade de reagentes utilizados e a nível do tempo despendido na preparação do mesmo, uma vez que apenas se utilizou gabapentina pura e água bidestilada para a sua elaboração. Este mostrou ser bastante sensível e obteve limites de deteção e quantificação bastante baixos. Assim, o método Direto poderá ser considerado, a nível económico, o método de eleição no doseamento de gabapentina em cápsulas, uma vez que uma hora é suficiente para a preparação do método da reta de calibração e adição de padrão e proceder à leitura das soluções. Os métodos volumétricos de análise são também bastante económicos financeiramente. No entanto, requerem bastante tempo para os efetuar e possuem uma baixa reprodutibilidade. Apesar do método Vanilina se ter demonstrado o método menos económico para a quantificação da gabapentina, as suas soluções demonstraram ser relativamente estáveis e de fácil preparação.

8.6 COMPARAÇÃO DOS MÉTODOS DESENVOLVIDOS E DE REFERÊNCIA

Os parâmetros da reta de calibração dos métodos efetuados na presente monografia e seus métodos de referência foram também comparados, tal como se pode analisar na **Tabela 8.7**.

Tabela 8.7 - Comparação entre métodos de referência e métodos elaborados.

Método	λ (nm)	Gama trabalho (ppm)	Limite Deteção (ppm)	Limite quantificação (ppm)	Recuperação (%)	Sensibilidade (ppm ⁻¹)
Estudos de referência						
Titulação NaOH ⁴²	NA	NA	NA	NA	100,1±0,59	NA
Direto ²¹	210	0,25-3,5	0,044	0,133	99,997±0,104	0,1005
PBQ ³⁴	369	80-320	NE	NE	99,59±0,65	0,0027
Vanilina ³⁶	402	10-90	0,25	0,80	85,5-91,1	0,0061
Hipoclorito ³⁷	590	0,2-5,0	0,04	0,12	101,5±0,82	0,0034
NBD-Cl ³⁸	465 nm excitação 532 nm emissão	1,7-8,5	0,97	NE	100,00 ±1,32	0,46
Presente estudo						
Titulação NaOH	NA	NA	NA	NA	100,1±5,7	NA
Titulação HCl	NA	NA	NA	NA	100,2±4,0	NA
Direto	192	6,40-142,42	1,92	6,40	99,1±1,3	0,0026
PBQ	350	7,30-241,48	2,19	7,30	NA	0,0052
Vanilina	394	34,55-712,08	10,36	34,55	100,37±0,6 ₆	0,0008
Hipoclorito	588	2,50-73,68	0,74	2,50	100,6 ₆ ±0,6 ₁	0,0169
NBD-Cl	464 nm excitação 542 nm emissão	1,86-49,12	0,56	1,86	100,0 ₀ ±1,1	1,779

NA – Não aplicável; NE – Não encontrado

Nalguns casos os métodos de referência mostraram-se superiores aos métodos efetuados no presente estudo, a nível das sensibilidades, como é o caso dos métodos Direto e Vanilina. Não obstante, vários métodos efetuados experimentalmente obtiveram valores de sensibilidades superiores aos seus métodos de referência, como é o caso dos métodos *p*-benzoquinona e Hipoclorito. O método *p*-benzoquinona foi o único que obteve uma gama de linearidade inferior à do método de referência, todos os outros obtiveram gamas superiores. Os limites de deteção e quantificação dos métodos de referência mostraram-se em todos os casos inferiores aos obtidos experimentalmente. A nível das recuperações médias obtidas para as cápsulas, o método Vanilina obteve resultados melhores, quando comparados com o método de referência, tal como o método Hipoclorito. O comprimento de onda máximo ao qual se fez a análise não se alterou de forma significativa nos métodos de referência e nos métodos efetuados na presente monografia. O método espectrofluorimétrico efetuado experimentalmente

obteve menor valor de limite de detecção e maior sensibilidade, tendo sido no entanto linear numa gama de concentrações bastante superior.

8.7 COMPARAÇÃO COM OUTROS ESTUDOS DESCRITOS

Vários métodos de doseamento da gabapentina na urina ou no plasma foram descritos e publicados na literatura, utilizando diversos reagentes de derivatização fluorogénicos como 5-(4,6-diclorotriazinil)aminofluoresceína, **Erro! A origem da referência não foi encontrada.** *o*-ftaldialdeído,⁵⁰ fluorescamina,⁵³ 2,4,6-trinitrobenzeno ácido sulfónico,⁵⁴ NBD-Cl54 e reagentes de derivatização por espectroscopia de absorção Uv-Vis, como 4-nitrofenilisotiocianato,⁵⁵ entre outros. Outros métodos de doseamento de gabapentina em formulações farmacêuticas foram descritos, usando técnicas como cromatografia líquida de alta eficiência, HPLC, eletroforese capilar, espectroscópicos Uv-Vis, fluorimétricos, quimioluminescentes, potenciômetros, condutimétricos, entre outras. A **Tabela 8.8** sintetiza a informação dos principais parâmetros de avaliação de outros métodos no doseamento de gabapentina em formulações farmacêuticas, derivados de várias técnicas analíticas como a volumetria de neutralização e precipitação, espectroscopia de absorção Uv-Vis, espectralfluorimetria e quimioluminescência, nomeadamente gama de trabalho, limites de detecção e quantificação e recuperações.

Tabela 8.8 - Métodos alternativos de quantificação de gabapentina em cápsulas e seus parâmetros.

Reagente de derivatização	λ (nm)	Gama trabalho (ppm)	Limite detecção (ppm)	Limite de quantificação (ppm)	Recuperação (%)
Ninidrina ³⁷	568	2-30	0,150	0,454	97,12-102,10
Ninidrina ⁵⁷	580	2-22	0,32	0,96	99,23-100,80
Ninidrina em NaOH ⁵⁸	575	10-30	0,13	0,04	98,3-101,4
Ninidrina em (DMF) ³⁷	569	40-280	NE	NE	NE
Ninidrina em (DMF) ³⁷	405	50-300	NE	NE	100,43±0,15
Ninidrina ⁵⁹	566	8-50	2,0	5,0	99,8±1,10
Laranja de metil ⁵⁷	464	12-96	0,96	2,92	98,02-100,31
Acido cloranílico ⁶⁰	314	6-30	0,09	0,30	98,22-101,1
Acido cloranílico ³⁷	535	60-200	7,59	25,30	100,05±1,39
TCNE ⁶⁰	335	6-30	0,20	0,06	99,73-100,46
TCNE ⁵⁷	340	40-360	0,68	2,06	99,32-101,82
TCNE ⁶¹	412	40-140	3,54	11,80	100,36±1,56
TCNQ ³⁷	439	4-30	0,04	0,13	99,31-100,88
TCNQ ³⁷	842	8-24	0,48	1,60	100,04±0,66
(ácido picrico PA) ⁶²	415	1,25-15,0	0,23	0,71	99,42±2,05
(ácido picrico PA) ⁵⁷	342	15-135	0,41	1,23	99,93-101,15

NA – Não aplicável; NE – Não encontrado

Comparação de métodos analíticos na quantificação do teor de Gabapentina em diversas cápsulas de diversos laboratórios

Tabela 8.8 (continuação)

Reagente de Derivatização	λ (nm)	Gama Trabalho (ppm)	Limite detecção (ppm)	Limite de quantificação (ppm)	Recuperação (%)
2,4-DNP ⁶²	420	2,0-18,0	0,75	2,28	98,56±2,43
Acetilacetona e formaldeído ⁴⁵	415	20-140	0,1	NE	98,05±0,53
1-fluoro-2,4-dinitrobenzeno ⁶²	360	10-500	NE	NE	NE
NQS ⁶³	495	7,5-75,0	NE	NE	NE
NQS ⁵⁹	540	5-25	1,0	3,0	100,0±1,32
NQS ³⁷	480	0-150	9,8	NE	NE
Quinalizarina ⁶⁴	571	0,4-8,0	NE	NE	NE
DHBA ⁶¹	445	2,57-37,25	0,330	0,996	99,36-100,02
Cloranilo ³⁷	521	40-120	3,33	11,10	99,57±0,95
Cloreto de cobre ⁶⁵	246	40-95	1,179	3,890	98,98±1,05
Azul de bromotimol ⁶⁵	411	100-800	1,44	4,75	100,13±1,172
Verde bromocresol ⁶⁵	411	10-150	1,61	5,30	100,08±1,308
Azul de bromotimol ⁶⁶	421	40-90	10,86	32,91	99,27±0,28
Verde bromocresol ⁶⁶	416	10-120	2,90	8,77	100,6±0,93
DDQ ⁶⁰	304	2-40	0,08	0,25	99,42-100,52
DDQ ³⁷	456	12-36	1,20	3,99	99,92±1,08
DDQ ⁵⁷	315	32-80	0,15	0,44	98,46-100,64
CH ⁶⁰	230	16-70	0,44	1,33	98,5-100,7
Hipocloreto ⁶¹	360	6-30	0,39	1,60	99,29 ±0,66
Hipocloreto ⁶⁷	450	21,2 – 159,0	NE	NE	99,99-100,01
Direto (Etanol/água) ⁶⁸	265	2-10	1,20	3,96	99,11-99,91
Direto (Metanol/Água) ⁶⁹	240	1-9	1,00	3,33	99,94-100,06
Fluorescência					
Fluorescamina ⁷⁰	472 nm excitação 390 nm emissão	0,1-1,0	0,06	NE	99,61±0,98
NBD-F ⁷¹	458 nm excitação 521nm emissão	0,010-0,100	0,00043	0,00130	100,51-100,68
NBD-F ⁷²	458 nm excitação 537nm emissão	0,005-0,050	0,00085	0,00255	100,28±0,51
Volumetria					
Titulação com HClO ₄ ⁷³	NA	NA	NA	NA	102,81±1,04
Titulação com CH ₃ CO ₂ (O) ⁷³	NA	NA	NA	NA	101,90±1,63
Precipitação AgNO ₃ ⁷⁴	NA	NA	NA	NA	100,1±0,59
Condutimétrico Cloreto cobre ⁴²	NA	1-15mg	NA	NA	100,02±0,404
Quimioluminescência					
Luminol-hipocloreto ⁷⁵	NA	60-350 mmol/mL	40 mmol/mL	NA	95,0-104,0

NA – Não aplicável; NE – Não encontrado

Os métodos espectrofluorimétricos, como era de esperar, apresentam limites inferiores aos métodos de absorção Uv-Vis. O método com menores limites é o método de derivatização da gabapentina com NBD-F, seguido do método de derivatização com

NBD-Cl e fluorescamina. Utilizando a técnica de absorção Uv-Vis, o método de derivatização da gabapentina com Ninidrina é o que apresenta melhores resultados a nível de limites, seguido dos métodos de derivatização com TCNQ, DDQ e ácido clorânico. O método com menor gama de linearidade é o método da Ninidrina, seguido do método Quinalizarina, ácido pícrico e DNP. O método quimioluminescente, luminol-hipocloreto, obteve um intervalo de recuperação superior a todos os outros métodos. Os métodos que obtiveram os maiores resultados a nível das recuperações das cápsulas, superiores a 100 % foi a titulação com HClO_4 e $\text{CH}_3\text{CO}_2(\text{O})$.

9 Conclusão

Nesta monografia pretendeu-se demonstrar a aplicabilidade de alguns métodos analíticos no doseamento de gabapentina em cápsulas, comparando os métodos a nível dos seus limites, parâmetros, precisão, exatidão, recuperações e, em última instância comparar o teor de gabapentina nas cápsulas existentes no mercado.

A gabapentina foi analisada por espectroscopia de absorção Uv-Vis, sem derivatização, pelo método Direto (análise a 192 nm), Etanol/Água (194 nm) e HCl 0,1 M (206 nm), tendo obtido linearidade na gama de concentrações 6,40-142,42, 58,37-724,44 e 84,02-811,60 ppm, respetivamente. Foram usados métodos de derivatização da gabapentina, analisados também por absorção UV-vis, o método *p*-benzoquinona (análise a 350 nm) foi linear numa gama de concentrações 7,30-241,48 ppm, o método Vanilina (392 nm) foi linear numa gama de concentrações 34,55-712,08 ppm, o método Hipoclorito (588 nm) foi linear numa gama de concentrações 2,50-73,68 ppm. Por fim o método fluorimétrico, de derivatização da gabapentina com NBD-Cl, foi analisado a um comprimento de onda de excitação de 464 nm e emissão de 542nm, tendo apresentado linearidade numa gama de concentrações 1,86-49,12 ppm.

O método com maior sensibilidade foi o método fluorimétrico de derivatização da gabapentina com NBD-Cl, seguido do método Hipoclorito, com sensibilidade $1,77_9 \pm 0,04_0$ e $(1,68_5 \pm 0,02_7) \times 10^{-2} \text{ ppm}^{-1}$ (95 % de confiança). Os métodos *p*-benzoquinona e Hipoclorito obtiveram valores de sensibilidade superiores aos respetivos métodos de referência. O método HCl 0,1 M foi o método menos sensível, tendo obtido $(3,13_5 \pm 0,07_7) \times 10^{-4} \text{ ppm}^{-1}$.

Comparação de métodos analíticos na quantificação do teor de Gabapentina em diversas cápsulas de diversos laboratórios

O método espectrofluorimétrico obteve também melhores resultados a nível dos limites de detecção e quantificação relativamente aos métodos de espectroscopia de absorção, 0,56 e 1,86 ppm, respetivamente. Comparando os métodos de absorção, o método Hipoclorito foi o que obteve limites mais baixos, nomeadamente 0,56 e 2,50 ppm, respetivamente para o limite de detecção e quantificação, enquanto que o método HCl 0,1 M foi novamente o que apresentou piores resultados com limites de detecção e quantificação de 25,21 e 84,02 ppm.

Os métodos NBD-Cl e Direto mostraram elevada estabilidade das soluções padrão, com uma razão entre o declive das retas ao longo de 120 horas, a 4°C e ao abrigo da luz, entre 98,84- 99,52 e 98,18-100,10 %, respetivamente. O método Vanilina mostrou estabilidade das soluções ao longo de 72 horas com uma razão entre 99,82-100,51 % e o método Hipoclorito obteve estabilidade das mesmas durante apenas 4 horas com uma razão de 99,56 % entre as retas de calibração, nas mesmas condições.

A precisão dos métodos verificou-se pela repetibilidade e precisão intermédia. O método Hipoclorito mostrou melhor precisão no que toca à avaliação da repetibilidade, com coeficientes de variação entre 0,14 e 0,96 %, e o método NBD-Cl mostrou-se mais preciso quando se alterava o fator dia (avaliação da precisão intermédia), com coeficientes de variação entre 0,13 e 0,48 %.

A exatidão dos métodos foi avaliada pelo erro relativo e ensaios de recuperação. Tendo em conta o erro relativo, o método Vanilina foi o que obteve melhores valores, entre 0,10 e 0,54 %, para análises efetuadas no dia de preparação das soluções e 0,10 a 0,40 % para ensaios efetuados nos dias seguintes. Relativamente aos ensaios de recuperação, o método Hipoclorito mostrou-se o mais específico para a gabapentina, tendo obtido uma recuperação média de $100,0 \pm 2,0$ %.

As recuperações obtidas para as cápsulas de gabapentina mostram que o método Direto tem exatidão e precisão estatisticamente mais próxima do método de referência no doseamento espectroscópico, com valores de *t-student* e *Fisher* entre 0,02 e 1,50 e 1,21 e 2,92, respetivamente, para 95 % de confiança. O método Titulação com HCl foi o que obteve exatidão mais próxima do método de referência no doseamento volumétrico, com valores de teste *t-student* entre 1,22 e 7,08. No entanto, o método Titulação com NaOH foi o que obteve precisão mais concordante com o método de referência, com valores de teste *Fisher* entre 1,16 e 4,14 (95 % de confiança).

Comparação de métodos analíticos na quantificação do teor de Gabapentina em diversas cápsulas de diversos laboratórios

O teor de gabapentina obtido por método e cápsula provou que o método espectrofluorimétrico (método NBD-Cl) foi o método que mais se aproximou do valor indicado pelo fabricante, com um teor médio de $100,0 \pm 1,1$ mg. Nos métodos espectroscópicos de absorção, os métodos com derivatização da gabapentina foram os que obtiveram teores mais próximos do valor de referência, com teores médios de $100,37 \pm 0,66$ e $100,66 \pm 0,61$ mg, para os métodos Vanilina e Hipoclorito, respectivamente, seguidos do método sem derivatização (Direto), que obteve um teor médio de $99,1 \pm 1,3$ mg. Os métodos volumétricos foram os que mais se afastaram do valor de referência, com teores médios de $100,2 \pm 4,0$ e $100,1 \pm 5,7$ mg, para o método Titulação com HCl e NaOH, respectivamente.

A cápsula que mais aproximou o valor obtido experimentalmente e o valor indicado pelo fabricante foram as cápsulas de Neurotin[®] e as cápsulas da Generis as que mais se afastaram desse valor, tendo obtido uma média de $99,4 \pm 1,2$ e $103,0 \pm 2,7$ mg, respectivamente.

Todos os métodos espectroscópicos obtiveram exatidão considerada estatisticamente concordante, no que toca à comparação dos métodos efetuados experimentalmente entre si, com valores de teste *t-student* entre 0,46 e 2,38, para 95 % de confiança, tendo sido os métodos mais semelhantes a este nível, os métodos Vanilina e Hipoclorito. A comparação da precisão dos métodos efetuados mostrou diferenças significativas entre os métodos espectroscópicos e os métodos volumétricos. Entre as diferentes técnicas os métodos mostraram diferenças na precisão não estatisticamente significativas, com valores de teste de *Fisher* entre 1,16 e 4,42, tendo os métodos Vanilina e Hipoclorito obtido a maior concordância.

O método com menos custos de reagentes foi o método Hipoclorito, com o custo de apenas 2,008 € por método, sendo no entanto necessário um tempo de análise bastante elevado. Considerando ambos os custos (reagentes e tempo de análise) e os resultados obtidos, o método Direto foi aquele que mostrou maior potencial de aplicabilidade.

10 Bibliografia

1. Neil, S., Epidemiology: The complexities of epilepsy. *Nature* **2014**, 51, 883-890.
2. Dekker, P., *Epilepsy- A Manual for Medical and Clinical Officers in Africa*. 2 ed.; World Health Organization: Geneva, 2002.
3. Darnell, J.; Lodish, H.; Baltimore, D., *Nerve Cells and the Electric Properties of Cell Membranes*. 2 ed.; Scientific American Books: Nova Iorque, 1990, Vol. 20: p763-814.
4. Engel, J., ILAE Classification of Epilepsy Syndromes. *Epilepsy Research* 2006, 70, 5-10.
5. Rudzinski, A. L.; Shish, J. J., The Classification of Seizures and Epilepsy Syndromes. *Epilepsy* **2010**, 16(3), 15-35.
6. Esteves, A., *Antiepilépticos*. 3 ed.; Porto Editora: Porto, 1994, Vol. 19, p 250-262.
7. Bockbrader, H. N.; Wesche, D.; Miller, R.; Chapel, S.; Janiczek, N.; Burger, P., A Comparison of the Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Pregabalin and Gabapentin. *Clinical Pharmacokinetics* **2012**, 49(10), 661-669.
8. Johnson, D. S.; Li, J. J.; *The Art of Drug Synthesis*. 1 ed.; John Wiley & Sons, Inc: New Jersey, 2007.
9. Gee, S. N.; Brown J. P.; Dissanayake, V. U.; Offord, J.; Thurlow, R.; Woodruff G. N., The Novel Anticonvulsant Drug, Gabapentin (Neurontin), Binds to the Subunit of a Calcium Channel. *Journal of Biomolecular Chemistry*. **1996**, 271(10), 5768-5776.
10. McLean, M. J., Clinical Pharmacokinetics of gabapentin. *Neurology* **1994**, 44(6), 17-22.
11. Striano, P.; Striano, S., Gabapentin: a Ca²⁺ channel alpha 2-delta ligand far beyond epilepsy therapy. *Drugs of Today* **2008**, 44(5), 353-368.
12. Rose, M. A.; Kam, P. C., Gabapentin: pharmacology and its use in pain management. *Anaesthesia* **2002**, 57(5), 451-462.
13. Rang, H. P.; Dale, M. M.; Ritter, J. M; Flower, R. J., *Farmacologia*. 6 ed.; Elsevier Editora Ltda: Rio de Janeiro: 2007.
14. Infarmed, Resumo das Características do Medicamento – Neurotin 100mg. Disponível em:

http://www.infarmed.pt/infomed/download_ficheiro.php?med_id=15168&tipo_doc=rcm (acedido a 30 de Julho, 2014).

15. Eckhardt, K.; Ammon, S.; Hofmann, U.; Riebe, A.; Gugeler, N.; Mikus, G., Gabapentin enhances the analgesic effect of morphine in healthy volunteers. *Anesthesia and analgesia* **2000**, *91*(1), 185-191.
16. Eldon, M. A.; Underwood, B. A.; Randinitis, E. J.; Sedman, A. J., Gabapentin does not interact with a contraceptive regimen of norethindrone acetate and ethinyl estradiol. *Neurology* **1998**, *50*(4), 1146- 1148.
17. Yoon, M. H.; Yaksh, T. L., Evaluation of Interaction between Gabapentin and Ibuprofen on the Formalin Test in Rats. *Anesthesiology* **1999**, *91*(4), 1006–1013.
18. Frye, M. A.; et al., Gabapentin does not alter single-dose lithium pharmacokinetics. *Journal of Clinical Psychopharmacology* **1998**, *18*(6), 461-464.
19. Roberto, M.; et al., Cellular and Behavioral Interactions of Gabapentin with Alcohol Dependence. *The Journal of Neuroscience* **2008**, *28*(22), 5762- 5771.
20. Sigma-Aldrich, Gabapentin solid. Disponível em:
<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/g154?lang=pt®ion=PT>
(acedido a 22 de Junho, 2014).
21. Gujral, R. S.; Haque, S. M., A Validated Method without Derivatization for the Determination of Gabapentin in Bulk, Pharmaceutical Formulation and Human Urine Samples. *International Journal of Biomedical Science* **2009**, *5*(2), 169-174.
22. McPolin, O., *Validation of Analytical Methods for Pharmaceutical Analysis*. United Kindom: Mourne Training Services: Warrenpoint, 2009.
23. Coordenação Geral de Acreditação Orientação Sobre Validação de Métodos Analíticos. Disponível em:
http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/Cgcre/DOQ/DOQ-Cgcre-8_04.pdf
(acedido a 30 de Julho, 2014).
24. Vollmann, K.; Souza F. S.; Wagner, T. M., Desenvolvimento de duas metodologias analíticas para o doseamento de captopril em comprimidos. *Revista Analytica* **2012**, *59*(10), 76-83.
25. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use Guideline for Good Clinical Practice. Disponível em:

<http://ora.georgetown.edu/irb/BioMedManual/AppendixV-N.pdf> (acedido a 12 Julho, 2014).

26. ISO - International Organization for Standardization. International Standard ISO/IEC 17025. Disponível em:
http://www.saba.org.ir/saba_content/media/image/2011/04/1821_orig.pdf (acedido a 16 de Julho, 2014).
27. Ajay, S.; Rohit, S., Validation of analytical procedures: A comparison of ICH VS Pharmacopeia (USP) Vs FDA. *International research journal of pharmacy* **2012**, 3 (6), 2230-8407.
28. Food and Drug Administration (Department of Health & Human Services) Guidelines for the Validation of Chemical Methods for the FDA Foods Program. Disponível em:
<http://www.fda.gov/downloads/ScienceResearch/FieldScience/UCM298730.pdf> (acedido a 12 de Agosto, 2014).
29. AOAC- Association of Official Agricultural Chemists. AOAC Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals. Disponível em:
http://www.aoac.org/imis15_prod/AOAC_Docs/StandardsDevelopment/SLV_Guidelines_Dietary_Supplements.pdf (acedido a 30 de Junho, 2014).
30. Thompson, M.; Ellison, S. L. R.; Wood, R., Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry* **2002**, 74(5), 835–855.
31. Albano, F.; Rodriguez, M. T., *Validação e Garantia da Qualidade de Ensaios Laboratoriais – Guia prático*. 1 ed.; Porto Alegre: Rio de Janeiro, 2009
32. Currie, L. A., Detection and quantification limits: origins and historical overview. *Analytical Chimica Acta* **1999**, 391(2), 127-134.
33. Swartz, M. E.; Krull I. S., *Handbook of Analytical Validation*. 1 ed.; Taylor and Francis Group: USA, 2012.
34. ISO, International Standards Organization. *ISO 5725: accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results*. Gêneve, 1994. Part 1-6.
35. Abdellatif, H. E.; Khalil, H. M., Colorimetric determination of gabapentin in pharmaceutical formulation. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2003**, 31(1), 209-214.

36. Kazemipour, M.; Fakhari, I.; Ansari, M., Gabapentin Determination in Human Plasma and Capsule by Coupling of Solid Phase Extraction, Derivatization Reaction, and UV-Vis Spectrophotometry. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research* **2013**, *12*(3), 247-253.
37. Abdulrahman, S. A. M.; Basavaiah, K., Highly Sensitive Spectrophotometric Method for the Determination of Gabapentin in Capsules using Sodium Hypochloride. *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences* **2012**, *9*(2), 113-126.
38. Hassan, E.; Belal, F.; Al-Deeb, O.; Khalil, N., Spectrofluorimetric Determination of Vigabatrin and Gabapentin in Dosage Forms and Spiked Plasma Samples Through Derivatization with 4-Chloro-7 Nitrobenzo-2-Oxa-1,3-Diazole. *Journal of AOAC International* **2001**, *84*(4), 1017-1024.
39. Boqué, R.; Maroto, A.; Riu, J.; Rius, F. X., Validation of Analytical Methods. *Grasas y Aceites* **2002**, *53*(1), 128-143.
40. Skoog, D. A.; West, D. M.; Holler, F. J.; Stanley, R.C., *Fundamentos da Química Analítica*. 8 ed.; Ed.Thomson: Canada, 2007.
41. Guia Relacre, *Validação de Métodos Internos de Ensaio em Análise Química*. Vol 13; Relacre: 2000.
42. Al-Shaalan, N. H.; Khalil, H. M., Sensitive Methods for Determination of Gabapentin in Pure Form and in Pharmaceutical Preparation. *Pharmaceutica Analytical Acta* **2011**, *2*(8), 2153-2435.
43. Owen, T., *Fundamentals of UV-visible spectroscopy*. 1 ed.; Agilent Technologies: Germany, 2000.
44. Polese, L.; Dores, E. C.; Jardim, E. G.; Navickiene, S.; Ribeiro, M. L., Determination of herbicides residues in soil by small scale extraction. *Eclética Química* **2007**, *27*.
45. Al-Zahouri, J.; Al-Madi, S.; Belal, F., Determination of the antiepileptics vigabatrin and gabapentin in dosage forms and biological fluids using Hantzsch reaction. *Arzneimittelforschung* **2001**, *51*(2), 97-103.
46. Knapp, D. R., *Handbook of Analytical Derivatization Reactions*. ed.; John Wiley & Sons: New York, 1979.
47. Sigma-Aldrich. Guide to Derivatization Reagents for GC. Disponível em: https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Supelco/Application_Notes/4537.pdf (acedido a 30 de Junho, 2014).

48. Intech. Francis Orata - Derivatization Reactions and Reagents for Gas Chromatography Analysis, *Advanced Gas Chromatography - Progress in Agricultural, Biomedical and Industrial Applications*. Disponível em: <http://www.intechopen.com/books/advanced-gas-chromatography-progress-in-agricultural-biomedical-and-industrial-applications/derivatization-reactions-and-reagents-for-gas-chromatography-analysis> (acedido a 30 de Agosto, 2014).
49. Apogen. Associação Portuguesa de Medicamentos Genéricos - O que são medicamentos genéricos. Disponível em: http://www.apogen.pt/conteudos/SystemPages/page.asp?art_id=46 (acedido a 30 de Agosto, 2014).
50. Farmacopeia Portuguesa VII: edição oficial 2002. Lisboa: Imprensa Nacional de Lisboa, 2002. p.211-215.
51. Liwei, C.; Siliu, L.; Xiaofang, T.; Jianxin, M., Determination of gabapentin in human plasma by capillary electrophoresis-laser induced fluorescence detection with and without solid-phase extraction. *Microchimica Acta* **2012**, *178*(3-4), 285-292.
52. Vermeij, T. A.; Edelbroek, P. M., Simultaneous high-performance liquid chromatographic analysis of pregabalin, gabapentin and vigabatrin in human serum by precolumn derivatization with o-phthalaldehyde and fluorescence detection. *Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* **2004**, *810*(2), 297-303.
53. Garcia, L. L.; Shihabi, Z. K.; Oles, K., Determination of gabapentin in serum by capillary electrophoresis. *Journal Chromatography B Biomedical Sciences Applications* **1995**, *669*(1), 157-162.
54. Lensmeyer, G. L.; Kempf, T.; Gidal, B. E.; Wiebe, D. A., Optimized method for determination of gabapentin in serum by high-performance liquid chromatography. *Therapeutic Drug Monitoring* **1995**, *17*(3), 251-258.
55. Bahrami, G.; Mohammadi, B., Sensitive microanalysis of gabapentin by high-performance liquid chromatography in human serum using pre-column derivatization with 4-chloro-7-nitrobenzofurazan: Application to a bioequivalence study. *Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* **2006**, *837*(1-2), 24-28.

56. Amini, M.; Rouini, M.; Asad-Paskeh, A.; Shafiee, A., A New Pre-column Derivatization Method for Determination of Gabapentin in Human Serum by HPLC Using UV Detection. *Journal of Chromatographic Science* **2010**, 48(5), 358-361.
57. Sultana, N.; Arayne, M. S.; Ali, S. N., Charge Transfer Complexes of Gamma Aminobutyric Acid-Analogue, A Neurotransmitter: Synthesis and Spectrophotometric Determination. *Journal of Bioanalysis & Biomedicine* **2013**, 5(2), 13-21.
58. Siddiqui, F. A.; Sher, N.; Shafi, N.; Shamshad, H.; Zubai, A., Kinetic and Thermodynamic Spectrophotometric Technique to Estimate Gabapentin in Pharmaceutical Formulations using Ninhydrin. *Journal of Analytical Science and Technology* **2013**, 4(17), 1-8.
59. Alarjaf, N. A.; El-Razeq S. A. A.; Al-Qahtani F. N., Spectrophotometric Determination of Gabapentin in Pharmaceutical Formulation using ninhydrin and 1,2-naphtho uinone-4-sodium sulphonate. *International Journal of Chemistry* **2010**, 20(1), 53-60.
60. Saddiqui, F. A.; et al., Spectrophotometric determination of gabapentin in pharmaceutical formulations using ninhydrin and pi-acceptors. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2010**, 45(7), 2761-2767.
61. Salem, H., Analytical study for the charge - Transfer complexes of gabapentin. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology* **2008**, 2(7), 136-144.
62. Abdulrahman, S.; Basavaiah, K., Sensitive and Selective Spectrophotometric Determination of Gabapentin in Capsules Using Two Nitrophenols as Chromogenic Agents. *International Journal of Analytical Chemistry* **2011**, 619310.
63. Abdulrahman, S. A.; Basavaiah, K., Sensitive and selective spectrophotometric assay of gabapentin in capsules using sodium 1, 2-naphthoquinone-4-sulfonate. *Drug Testing and Analysis* **2011**, 3(10), 748-754.
64. Gouda, A. A.; Malah, Z. A., Development and validations of sensitive spectrophotometric method for determination of two antiepileptics in pharmaceutical formulations. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **2013**, 105, 488-496.
65. Anis, S. M.; Hosny, M. M.; Abdellatef, H. E.; El-Balkiny, M. N., Spectroscopic and Conductometric Analysis of Gabapentin. *E-Journal of Chemistry* **2011**, 8(4), 1784-1796.

66. Patel, B.; Patel, J.; Singh, H.; Patel, B., Extractive Spectrophotometric Methods for the Determination of Gabapentin in Pharmaceutical Dosage Forms. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research* **2011**, 3(3), 197-201.
67. Gujral, R. S.; Haque, S. M.; Shanker, P., A Novel Quantitative Spectrophotometric Method for the Analysis of Gabapentin Hydrochloride. *Journal of Pharmaceutical Science and Technology* **2010**, 2(5), 222-229.
68. Chandra, D. S.; Desireddy, R. B.; Jitendrakumar, P.; Narisireddy, P.; Srimannarayana, K.; Jai, B. G., Development and Validation of UV Spectrophotometric method for Estimation of Gabapentin in Pharmaceutical dosage form. *International Journal of Chemical and Pharmaceutical Sciences* **2012**, 3(4), 60-63.
69. Pavani, D. T.; Karimulla, S. K.; Rajesh, B.; Gayatri, P.; Vasanth, P. M.; Ramesh, M., Validation of rapid and sensitive spectrophotometric method for the determination of gabapentin in tablets dosage form. *International Journal of Biological & Pharmaceutical Research* **2012**, 3(6): 800-803.
70. Belal, F.; Abdine, H.; Al-Majed, A.; & Khalil, N. Y., Spectrofluorimetric determination of vigabatrin and gabapentin in urine and dosage forms through derivatization with fluorescamine. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2002**, 27(1-2), 253-260.
71. Ulu, S. T.; Kel, E., Sensitive Spectrofluorimetric Method of Analysis for Gabapentin in Pure and Pharmaceutical Preparations. *Chinese Journal of Chemistry* **2011**, 29(3), 562-566.
72. Ulu, S. T.; Kel, E., Highly sensitive determination and validation of gabapentin in pharmaceutical preparations by HPLC with 4-fluoro-7-nitrobenzofurazan derivatization and fluorescence detection. *Journal of Chromatographic Science* **2011**, 49(6), 417-421.
73. Abdulrahman, S. A. M.; Basavaiah, K., Non-Aqueous titrimetric assay of gabapentin in capsules using perchloric acid as titrant. *Chemical Industry & Chemical Engineering Quarterly* **2011**, 17(2), 173-178.
74. Hengy, H.; Kölle, E. U., Determination of gabapentin in plasma and urine by high-performance liquid chromatography and pre-column labelling for ultraviolet detection. *Journal of Chromatography A* **1985**, 341(2), 473-478.

Comparação de métodos analíticos na quantificação do teor de Gabapentina em diversas cápsulas de diversos laboratórios

75. Manera, M.; Miró, M.; Ribeiro, M. F.; Esteva, J. M.; Cerdà, V.; Santos, J.L.; et al., Rapid chemiluminometric determination of gabapentin in pharmaceutical formulations exploiting pulsed-flow analysis. *Luminescence* **2009**, *24*(1), 10-14.

Anexo

Tabela A1- Aferição da solução NaOH 0,1 M.

Ensaio	Massa _{Ftalato} ±e _m (g)	V _{Balão} ±e _b (mL)	Moles _{Ftalato} (mol)	Volume _{NaOH gasto} ±e _{Vol} (mL)	Conc _{NaOH} (M) ^{b)}
1	0,4423±0,0001	25,00±0,03	0,002166	22,40±0,05	0,09668
2	0,4435±0,0001	25,00±0,03	0,002172	22,60±0,05	0,09609
3	0,4467±0,0001	25,00±0,03	0,002187	22,80±0,05	0,09594
4	0,4446±0,0001	25,00±0,03	0,002177	22,70±0,05	0,09591
5	0,4423±0,0001	25,00±0,03	0,002166	22,50±0,05	0,09626
6	0,4560±0,0001	25,00±0,03	0,002233	22,20±0,05	0,09625
MédiaConc_{NaOH}±SD (M)					0,0961₉±0,0003₃

Tabela A2- Preparação das amostras para os métodos volumétricos NaOH e HCl 0,1 M.

Amostra	Massa _{GBP} (mg)	V _{Pipeta} ±e _{Pipeta} (mL)	C _{GBP} ±e _{conc} (M) ⁱ⁾
Gabamox[®]	Cápsula 100 mg	20,00±0,04	0,0292 ₀ ±0,0001 ₄
Neurotin[®]	Cápsula 100 mg	20,00±0,04	0,0292 ₀ ±0,0001 ₄
Ratiopharm	Cápsula 100 mg	20,00±0,04	0,0292 ₀ ±0,0001 ₄
Teva	Cápsula 100 mg	20,00±0,04	0,0292 ₀ ±0,0001 ₄
Generis	Cápsula 100 mg	20,00±0,04	0,0292 ₀ ±0,0001 ₄

Tabela A3- Valor de pH para ao longo do volume de NaOH 0,1 M adicionado em duplicado para as diferentes cápsulas.

V _{NaOH} ±0,05 (mL)	Gabamox [®]		Neurotin [®]		Ratiopharm		Teva		Generis	
	pH±0,01		pH±0,01		pH±0,01		pH±0,01		pH±0,01	
	Ensaio1	Ensaio2	Ensaio1	Ensaio2	Ensaio1	Ensaio2	Ensaio1	Ensaio2	Ensaio1	Ensaio2
0,00	5,89	5,99	6,44	6,22	6,11	6,03	6,22	6,33	6,01	5,99
0,05	6,03	6,21	8,27	6,90	6,33	6,19	8,57	8,55	6,21	6,19
0,10	6,49	6,43	8,97	7,89	6,78	6,30	8,99	8,94	6,52	6,47
0,15	7,11	7,16	9,40	8,83	7,45	6,64	9,43	9,24	7,52	6,73
0,20	7,65	7,83	9,54	9,31	8,23	7,45	9,56	9,40	8,18	7,41
0,25	8,55	8,85	9,66	9,55	8,89	8,73	9,69	9,56	8,84	8,68
0,30	8,99	9,13	9,78	9,65	9,15	9,06	9,80	9,69	9,10	9,01
0,35	9,32	9,30	9,83	9,78	9,36	9,28	9,86	9,84	9,31	9,23
0,40	9,54	9,44	9,92	9,88	9,48	9,41	9,94	9,90	9,43	9,36
0,45	9,58	9,54	9,97	9,94	9,58	9,52	10,00	9,99	9,53	9,47
0,50	9,66	9,62	10,04	9,97	9,67	9,61	10,06	10,04	9,62	9,56
0,55	9,72	9,69	10,07	10,01	9,73	9,69	10,10	10,09	9,68	9,64
0,60	9,79	9,75	10,08	10,05	9,79	9,76	10,12	10,11	9,74	9,71
0,65	9,85	9,79	10,09	10,10	9,85	9,87	10,14	10,13	9,80	9,82
0,70	9,90	9,86	10,11	10,11	9,89	9,90	10,15	10,14	9,83	9,83
0,75	9,95	9,90	10,13	10,13	9,92	9,95	10,17	10,15	9,86	9,86
0,80	9,99	9,94	10,15	10,15	9,97	9,99	10,18	10,15	9,90	9,90
0,85	10,03	9,98	10,17	10,17	10,00	10,03	10,19	10,16	9,94	9,90
0,90	10,07	10,01	10,18	10,18	10,05	10,07	10,19	10,17	9,96	9,91
0,95	10,09	10,05	10,19	10,19	10,07	10,11	10,20	10,17	10,01	9,97
1,00	10,16	10,10	10,19	10,19	10,11	10,18	10,21	10,18	10,05	10,00
1,25	10,23	10,19	10,20	10,20	10,18	10,22	10,23	10,22	10,15	10,11
1,50	10,25	10,22	10,21	10,21	10,22	10,28	10,27	10,26	10,17	10,12
1,75	10,30	10,28	10,23	10,23	10,28	10,33	10,32	10,31	10,24	10,20
2,00	10,34	10,32	10,27	10,25	10,33	10,38	10,37	10,35	10,28	10,24
2,50	10,39	10,36	10,32	10,30	10,38	10,44	10,44	10,42	10,31	10,26
3,00	10,45	10,42	10,37	10,34	10,44	10,53	10,48	10,46	10,38	10,34
3,50	10,55	10,51	10,44	10,39	10,53	10,59	10,54	10,52	10,46	10,41
4,00	10,60	10,56	10,48	10,45	10,59	10,64	10,60	10,57	10,52	10,48
4,25	10,63	10,60	10,54	10,55	10,64	10,68	10,62	10,60	10,55	10,50
4,50	10,68	10,64	10,60	10,60	10,68	10,72	10,64	10,63	10,60	10,56

Tabela A3 (continuação)

$V_{NaOH \pm 0,05}$ (mL)	Gabamox®		Neurotin®		Ratiopharm		Teva		Generis	
	pH±0,01		pH±0,01		pH±0,01		pH±0,01		pH±0,01	
	Ensaio1	Ensaio2	Ensaio1	Ensaio2	Ensaio1	Ensaio2	Ensaio1	Ensaio2	Ensaio1	Ensaio2
4,75	10,71	10,69	10,63	10,63	10,72	10,74	10,67	10,66	10,65	10,61
5,00	10,73	10,72	10,66	10,68	10,74	10,75	10,71	10,70	10,67	10,64
5,05	10,74	10,72	10,70	10,71	10,75	10,75	10,74	10,73	10,68	10,66
5,10	10,75	10,73	10,73	10,73	10,75	10,76	10,75	10,74	10,70	10,68
5,15	10,75	10,74	10,74	10,74	10,76	10,76	10,76	10,75	10,72	10,70
5,20	10,76	10,75	10,75	10,75	10,76	10,77	10,77	10,76	10,73	10,72
5,25	10,77	10,75	10,77	10,75	10,77	10,78	10,78	10,77	10,74	10,73
5,30	10,78	10,76	10,78	10,76	10,78	10,79	10,79	10,78	10,75	10,74
5,35	10,78	10,77	10,79	10,77	10,79	10,81	10,80	10,79	10,76	10,75
5,40	10,79	10,78	10,80	10,77	10,81	10,81	10,81	10,80	10,77	10,76
5,45	10,80	10,79	10,81	10,79	10,81	10,82	10,82	10,81	10,79	10,79
5,50	10,82	10,79	10,83	10,80	10,82	10,82	10,83	10,83	10,80	10,80
5,55	10,82	10,81	10,85	10,82	10,82	10,83	10,83	10,85	10,82	10,82
5,60	10,83	10,81	10,87	10,83	10,83	10,84	10,88	10,87	10,83	10,83
5,65	10,84	10,82	10,92	10,84	10,86	10,85	10,93	10,92	10,84	10,84
5,70	10,85	10,83	10,99	10,89	10,92	10,89	10,95	10,94	10,84	10,84
5,75	10,85	10,84	11,03	10,98	11,00	10,95	11,02	10,98	10,85	10,85
5,80	10,86	10,84	11,09	11,05	11,09	11,00	11,20	11,04	10,86	10,86
5,85	10,87	10,85	11,14	11,09	11,14	11,09	11,28	11,19	10,87	10,87
5,90	10,88	10,86	11,27	11,13	11,29	11,18	11,35	11,33	10,87	10,87
5,95	10,88	10,87	11,33	11,20	11,36	11,32	11,47	11,39	10,89	10,89
6,00	10,89	10,88	11,38	11,35	11,40	11,39	11,50	11,49	10,89	10,89
6,05	10,90	10,89	11,44	11,45	11,46	11,45	11,55	11,54	10,90	10,91
6,10	10,90	10,90	11,52	11,51	11,50	11,52	11,59	11,58	10,91	10,91
6,15	10,91	10,92	11,59	11,59	11,57	11,58	11,64	11,63	10,91	10,92
6,20	10,93	10,93	11,66	11,67	11,63	11,65	11,68	11,68	10,92	10,92
6,25	10,95	10,96	11,70	11,70	11,67	11,68	11,73	11,72	10,94	10,93
6,30	10,96	10,98	11,75	11,74	11,70	11,72	11,74	11,72	10,95	10,95
6,35	10,98	11,00	11,79	11,79	11,74	11,75	11,75	11,74	10,96	10,97
6,40	11,01	11,03	11,83	11,84	11,77	11,78	11,78	11,77	11,00	11,00
6,45	11,07	11,09	11,86	11,86	11,79	11,79	11,79	11,78	11,05	11,11
6,50	11,21	11,14	11,89	11,89	11,82	11,80	11,80	11,79	11,10	11,17
6,55	11,28	11,20	11,91	11,90	11,84	11,81	11,81	11,80	11,23	11,29
6,60	11,33	11,33	11,93	11,91	11,85	11,83	11,83	11,83	11,28	11,36
6,65	11,41	11,40	11,94	11,91	11,86	11,86	11,84	11,83	11,39	11,44
6,70	11,49	11,49	11,95	11,92	11,87	11,87	11,85	11,84	11,49	11,49
6,75	11,57	11,55	11,96	11,92	11,87	11,87	11,87	11,86	11,55	11,55
6,80	11,64	11,59	11,97	11,93	11,88	11,88	11,89	11,88	11,59	11,59
6,85	11,68	11,64	11,97	11,94	11,88	11,88	11,89	11,88	11,64	11,64
6,90	11,70	11,68	11,97	11,95	11,89	11,89	11,89	11,88	11,68	11,66
6,95	11,73	11,73	11,98	11,97	11,90	11,90	11,90	11,89	11,70	11,68
7,00	11,75	11,76	11,99	11,97	11,91	11,91	11,91	11,90	11,73	11,73
7,25	11,77	11,81	12,04	12,00	11,91	11,94	11,95	11,94	11,75	11,76
7,50	11,80	11,84	12,09	12,04	11,92	11,99	11,99	11,98	11,77	11,81
7,75	11,84	11,88	12,13	12,09	11,93	12,02	12,03	12,02	11,84	11,84
8,00	11,88	11,99	12,19	12,12	11,95	12,09	12,08	12,08	11,88	11,88
9,00	11,95	12,08	12,23	12,19	11,99	12,14	12,13	12,12	12,00	11,92
10,00	12,03	12,16	12,30	12,26	12,10	12,23	12,18	12,17	12,06	11,98
12,00	12,19	12,22	12,36	12,33	12,22	12,30	12,29	12,28	12,15	12,05
14,00	12,33	12,31	12,42	12,36	12,31	12,36	12,35	12,34	12,25	12,18
16,00	12,39	12,38	12,47	12,40	12,38	12,42	12,41	12,39	12,32	12,26
18,00	12,45	12,43	12,50	12,46	12,44	12,46	12,43	12,42	12,36	12,30
20,00	12,50	12,47	12,52	12,50	12,48	12,53	12,45	12,46	12,42	12,35
25,00	12,56	12,54	12,55	12,56	12,54	12,55	12,52	12,54	12,50	12,45

Tabela A4- Aferição da solução HCl 0,1 M.

Ensaio	Massa _{borax} ±e _m (g)	V _{Balão} ±e _b (mL)	Moles _{Ftalato} (mol)	V _{HCl gasto} ±e _{Vol} (mL)	Conc _{HCl} (M) ^{b)}
1	0,4750±0,0001	25,00±0,03	0,00125	24,70±0,05	0,10084
2	0,4790±0,0001	25,00±0,03	0,00126	25,00±0,05	0,10047
3	0,4730±0,0001	25,00±0,03	0,00124	24,70±0,05	0,10041
4	0,4760±0,0001	25,00±0,03	0,00125	24,90±0,05	0,10024
5	0,4710±0,0001	25,00±0,03	0,00123	24,60±0,05	0,10040
6	0,4680±0,0001	25,00±0,03	0,00123	24,30±0,05	0,10099
MédiaConc_{HCl} ±SD(M)^{b)}					0,1005₆±0,0003₄

Tabela A5- Valor de pH para ao longo do volume de HCl 0,1 M adicionado em duplicado para as diferentes cápsulas.

V _{HCl} ±0,05 (mL)	Gabamox®		Neurotin®		Ratiopharm		Teva		Generis	
	pH pH±0,01		pH±0,01		pH±0,01		pH±0,01		pH±0,01	
	Ensaio1	Ensaio2	Ensaio1	Ensaio2	Ensaio1	Ensaio2	Ensaio1	Ensaio2	Ensaio1	Ensaio2
0,00	6,00	6,20	6,17	6,11	6,30	6,14	5,98	6,11	6,35	6,11
0,05	5,99	6,09	6,02	5,99	6,21	6,06	5,72	5,98	6,26	6,02
0,10	5,87	6,02	5,88	5,95	6,11	6,00	5,63	5,95	6,17	5,92
0,15	5,69	5,95	5,69	5,90	6,04	5,91	5,50	5,89	6,09	5,81
0,20	5,56	5,90	5,57	5,87	5,94	5,87	5,46	5,83	5,99	5,71
0,25	5,49	5,81	5,49	5,81	5,88	5,83	5,30	5,78	5,94	5,65
0,30	5,43	5,77	5,42	5,76	5,80	5,80	5,27	5,74	5,85	5,58
0,35	5,34	5,70	5,36	5,72	5,78	5,76	5,24	5,69	5,83	5,45
0,40	5,29	5,68	5,30	5,69	5,70	5,70	5,21	5,64	5,76	5,36
0,45	5,26	5,62	5,26	5,62	5,67	5,65	5,19	5,60	5,72	5,30
0,50	5,22	5,59	5,23	5,60	5,64	5,62	5,17	5,56	5,69	5,26
0,55	5,19	5,55	5,19	5,59	5,59	5,57	5,14	5,52	5,65	5,21
0,60	5,18	5,50	5,17	5,55	5,55	5,54	5,13	5,49	5,60	5,15
0,65	5,13	5,46	5,15	5,50	5,50	5,49	5,11	5,47	5,55	5,11
0,70	5,12	5,41	5,13	5,48	5,48	5,46	5,09	5,45	5,54	5,09
0,75	5,12	5,38	5,12	5,43	5,43	5,44	5,08	5,41	5,49	5,08
0,80	5,09	5,34	5,10	5,39	5,39	5,42	5,06	5,39	5,44	5,06
0,85	5,08	5,32	5,08	5,34	5,34	5,37	5,05	5,34	5,40	5,05
0,90	5,08	5,25	5,07	5,31	5,31	5,34	5,03	5,31	5,39	5,03
0,95	5,04	5,21	5,06	5,27	5,27	5,31	5,02	5,26	5,32	5,02
1,00	5,04	5,10	5,05	5,22	5,22	5,28	5,01	5,21	5,28	5,01
1,25	4,97	5,02	4,97	5,10	5,10	5,22	4,97	5,09	5,24	4,97
1,50	4,91	4,94	4,92	5,01	5,01	5,13	4,90	5,03	5,06	4,90
1,75	4,84	4,89	4,84	4,91	4,91	5,00	4,83	4,93	4,97	4,83
2,00	4,80	4,82	4,79	4,81	4,81	4,93	4,78	4,84	4,86	4,75
2,50	4,69	4,73	4,71	4,72	4,72	4,85	4,72	4,74	4,78	4,69
3,00	4,63	4,65	4,64	4,63	4,63	4,74	4,63	4,65	4,72	4,62
3,50	4,58	4,54	4,58	4,50	4,56	4,65	4,52	4,55	4,64	4,51
4,00	4,49	4,46	4,50	4,42	4,47	4,54	4,45	4,46	4,55	4,46
4,25	4,38	4,37	4,38	4,33	4,36	4,42	4,36	4,35	4,49	4,38
4,50	4,30	4,29	4,29	4,24	4,26	4,38	4,25	4,27	4,40	4,29
4,75	4,18	4,20	4,20	4,16	4,17	4,26	4,18	4,19	4,35	4,20
5,00	4,17	4,13	4,18	4,13	4,08	4,12	4,09	4,08	4,27	4,15
5,05	4,16	4,11	4,16	4,11	4,06	4,09	4,07	4,05	4,20	4,13
5,10	4,13	4,10	4,14	4,09	4,04	4,07	4,03	4,03	4,17	4,11
5,15	4,12	4,08	4,12	4,08	4,02	4,05	4,00	4,00	4,15	4,10

Tabela A5 (Continuação)

V _{HCl} ±0,05 (mL)	Gabamox®		Neurotin®		Ratiopharm		Teva		Generis	
	pH pH±0,01		pH±0,01		pH±0,01		pH±0,01		pH±0,01	
	Ensaio1	Ensaio2	Ensaio1	Ensaio2	Ensaio1	Ensaio2	Ensaio1	Ensaio2	Ensaio1	Ensaio2
5,20	4,10	4,07	4,09	4,06	4,01	4,04	3,97	3,95	4,14	4,09
5,25	4,08	4,06	4,06	4,04	4,00	4,03	3,94	3,97	4,12	4,07
5,30	4,03	4,04	4,00	4,01	3,98	4,01	3,89	3,94	4,10	4,07
5,35	4,00	4,00	3,96	3,95	3,97	4,00	3,82	3,89	4,09	4,06
5,40	3,98	3,97	3,93	3,92	3,96	3,99	3,76	3,86	4,07	4,05
5,45	3,95	3,95	3,89	3,87	3,94	3,97	3,65	3,79	4,06	4,04
5,50	3,91	3,91	3,84	3,83	3,92	3,93	3,54	3,74	4,05	4,03
5,55	3,86	3,85	3,77	3,78	3,87	3,91	3,41	3,65	4,03	4,02
5,60	3,79	3,80	3,69	3,70	3,80	3,81	3,30	3,56	4,02	4,00
5,65	3,74	3,74	3,60	3,61	3,74	3,74	3,22	3,48	4,01	3,99
5,70	3,70	3,69	3,53	3,55	3,62	3,68	3,17	3,33	4,00	3,98
5,75	3,63	3,62	3,45	3,41	3,55	3,59	3,01	3,22	3,99	3,97
5,80	3,55	3,55	3,35	3,32	3,42	3,50	2,95	3,14	3,99	3,96
5,85	3,46	3,44	3,19	3,22	3,38	3,38	2,90	3,07	3,97	3,95
5,90	3,43	3,37	3,10	3,13	3,35	3,27	2,86	2,99	3,94	3,94
5,95	3,35	3,32	3,02	3,05	3,30	3,18	2,81	2,92	3,86	3,93
6,00	3,23	3,20	2,94	2,96	3,26	3,09	2,76	2,86	3,80	3,91
6,05	3,14	3,13	2,87	2,89	3,20	2,99	2,73	2,81	3,75	3,87
6,10	3,06	3,06	2,80	2,84	3,16	2,90	2,68	2,75	3,63	3,83
6,15	2,98	2,97	2,73	2,76	3,11	2,84	2,65	2,71	3,59	3,79
6,20	2,91	2,92	2,68	2,72	3,07	2,79	2,62	2,66	3,43	3,73
6,25	2,85	2,85	2,63	2,66	3,03	2,75	2,59	2,62	3,37	3,68
6,30	2,80	2,79	2,60	2,59	3,00	2,72	2,56	2,58	3,29	3,60
6,35	2,76	2,75	2,58	2,56	2,96	2,70	2,54	2,55	3,22	3,55
6,40	2,72	2,72	2,57	2,53	2,89	2,67	2,52	2,52	3,16	3,44
6,45	2,67	2,67	2,55	2,50	2,84	2,65	2,51	2,49	3,10	3,31
6,50	2,64	2,63	2,54	2,48	2,76	2,63	2,50	2,46	3,04	3,20
6,55	2,61	2,61	2,53	2,46	2,72	2,62	2,49	2,44	3,02	3,10
6,60	2,58	2,57	2,52	2,45	2,66	2,61	2,48	2,43	2,95	3,02
6,65	2,56	2,55	2,51	2,44	2,59	2,60	2,48	2,42	2,87	2,94
6,70	2,54	2,54	2,51	2,43	2,56	2,59	2,46	2,41	2,83	2,89
6,75	2,53	2,52	2,50	2,43	2,53	2,57	2,45	2,40	2,78	2,85
6,80	2,51	2,52	2,50	2,42	2,50	2,57	2,43	2,39	2,73	2,81
6,85	2,50	2,50	2,49	2,41	2,48	2,56	2,43	2,39	2,68	2,76
6,90	2,49	2,49	2,49	2,40	2,46	2,55	2,41	2,37	2,65	2,73
6,95	2,48	2,48	2,48	2,40	2,45	2,54	2,40	2,36	2,61	2,68
7,00	2,48	2,46	2,47	2,39	2,44	2,54	2,38	2,35	2,58	2,64
7,25	2,37	2,23	2,39	2,23	2,43	2,46	2,29	2,28	2,52	2,52
7,50	2,29	2,18	2,30	2,17	2,34	2,40	2,23	2,22	2,43	2,46
7,75	2,24	2,08	2,24	2,10	2,29	2,36	2,18	2,17	2,38	2,40
8,00	2,15	2,03	2,16	2,04	2,22	2,32	2,11	2,12	2,29	2,35
9,00	2,05	1,87	2,05	1,87	2,01	2,22	2,07	2,05	2,16	2,20
10,00	1,97	1,76	1,96	1,75	1,92	2,13	1,97	1,98	2,10	2,14
12,00	1,83	1,64	1,85	1,66	1,79	1,99	1,86	1,89	2,01	2,06
14,00	1,73	1,55	1,74	1,56	1,62	1,87	1,74	1,78	1,89	1,93
16,00	1,63	1,48	1,63	1,48	1,59	1,79	1,65	1,66	1,75	1,84
18,00	1,51	1,40	1,52	1,39	1,50	1,66	1,54	1,54	1,64	1,69
20,00	1,45	1,33	1,45	1,35	1,46	1,47	1,46	1,40	1,55	1,56
25,00	1,40	1,31	1,39	1,32	1,32	1,34	1,33	1,38	1,39	1,41

Tabela A6- Preparação das soluções *Stock* e *amostra* de Gabapentina para o método Direto.

Solução	Modo preparação		
<i>Stock</i>	Massa _{GBPpura} ±e _m (mg)	V _{Balão} ±e _{Balão} (mL)	C _{GBP} ±e _c (ppm) ^{j)}
	890,1±0,1	500,00±0,25	1780,2±1,9
<i>Amostra</i>	Massa _{GBP} ±e _m (mg)	V _{Balão} ±e _{Balão} (mL)	C _{GBP} (ppm) ^{j)}
	100,0±0,1	100,00±0,1	1000

Tabela A7- Preparação das soluções padrão para o método Direto.

Método Direto			
Soluções	V _{solução Stock} ±e _{pipeta} (mL)	V _{Balão} ±e _{Balão} (mL)	C _{GBP} ±e _c (ppm) ^{j)}
Branco	0,000±0,000	25,00±0,03	0,0±0,0 ₀
1	0,100±0,003	25,00±0,03	7,1 ₂ ±0,4 ₃
2	0,200±0,003	25,00±0,03	14,2 ₄ ±0,4 ₄
3	0,300±0,004	25,00±0,03	21,3 ₆ ±0,5 ₉
4	0,400±0,004	25,00±0,03	28,4 ₈ ±0,6 ₀
5	0,500±0,004	25,00±0,03	35,6 ₀ ±0,6 ₁
6	0,600±0,008	25,00±0,03	42,7 ₂ ±0,7 ₃
7	0,700±0,008	25,00±0,03	49,8 ₅ ±0,8 ₅
8	0,800±0,008	25,00±0,03	56,9 ₇ ±0,9 ₇
9	0,900±0,008	25,00±0,03	64,1±1,1
10	1,000±0,008	25,00±0,03	71,2±1,3
11	2,00±0,01	25,00±0,03	142,4±1,7
12	3,000±0,015	25,00±0,03	213,6±2,5

Tabela A8- Absorvência de cada solução padrão a 192 nm para o método Direto e respectivos residuais.

Padrões	C _{GBP} ±e _c (ppm) ^{j)}	Abs 192 nm	Residuais ^{p)}
Branco	0,0±0,0 ₀	0,000	-1,08x10 ⁻²
1	7,1 ₂ ±0,4 ₃	0,025	-3,15x10 ⁻³
2	14,2 ₄ ±0,4 ₄	0,045	-5,01x10 ⁻⁴
3	21,3 ₆ ±0,5 ₉	0,060	-2,85x10 ⁻³
4	28,4 ₈ ±0,6 ₀	0,080	-1,95x10 ⁻⁴
5	35,6 ₀ ±0,6 ₁	0,099	1,46x10 ⁻³
6	42,7 ₂ ±0,7 ₃	0,116	1,11x10 ⁻³
7	49,8 ₅ ±0,8 ₅	0,135	2,74x10 ⁻³
8	56,9 ₇ ±0,9 ₇	0,152	2,39x10 ⁻³
9	64,1±1,1	0,172	5,05x10 ⁻³
10	71,2±1,3	0,191	6,72x10 ⁻³
11	142,4±1,7	0,367	9,25x10 ⁻³
12	213,6±2,5	0,520	-1,12x10 ⁻²

Tabela A9- Leituras do branco fortificado para a estimativa dos limites de detecção e quantificação para o método Direto

Branco	Sinal
1	0,011
2	0,011
3	0,011
4	0,010
5	0,011
6	0,013
7	0,012
8	0,011
9	0,011
10	0,012
11	0,011
12	0,012
13	0,016
14	0,013
15	0,014
16	0,015
17	0,013
18	0,015
19	0,013
20	0,013
Desvio padrão^{d)}	0,00163
LD_{Sb} (ppm)^{l)}	1,92
LQ_{Sb} (ppm)^{l)}	6,40

Tabela A10- Absorvência das soluções padrão ao longo de 120 horas de análise para o método Direto.

Soluções	C_{GBP±e_c} (ppm)^{j)}	Método Direto						
		0 horas	4 horas	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas	120 horas
Branco	0,00±0,0 ₀	0,000	0,001	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
1	7,1 ₂ ±0,4 ₃	0,025	0,029	0,028	0,027	0,027	0,029	0,028
2	14,2 ₄ ±0,4 ₄	0,045	0,049	0,045	0,047	0,046	0,047	0,048
3	21,3 ₆ ±0,5 ₉	0,060	0,063	0,065	0,066	0,063	0,062	0,062
4	28,4 ₈ ±0,6 ₀	0,080	0,082	0,084	0,082	0,081	0,083	0,082
5	35,6 ₀ ±0,6 ₁	0,099	0,100	0,103	0,103	0,104	0,104	0,103
6	42,7 ₂ ±0,7 ₃	0,116	0,119	0,121	0,117	0,120	0,121	0,117
7	49,8 ₅ ±0,8 ₅	0,135	0,136	0,138	0,137	0,135	0,136	0,137
8	56,9 ₇ ±0,9 ₇	0,152	0,153	0,154	0,152	0,154	0,156	0,155
9	64,1 ₁ ±1,1	0,172	0,175	0,177	0,178	0,176	0,179	0,176
10	71,2 ₁ ±1,3	0,191	0,199	0,200	0,200	0,199	0,198	0,198
11	142,4 ₁ ±1,7	0,367	0,368	0,370	0,372	0,374	0,369	0,370
12	213,6 ₁ ±2,5	0,530	0,531	0,535	0,533	0,534	0,532	0,534

Tabela A11- Preparação das soluções para avaliar a precisão do método Direto.

Recuperação	V_{soluçãointermédia±e_{pipeta}} (mL)	V_{Balão±e_{Balão}} (mL)	Conc_{GBP±e_c} (ppm)^{j)}
1	0,150±0,003	25,00±0,03	10,6 ₈ ±0,4 ₄
2	0,350±0,003	20,00±0,02	31,1 ₅ ±0,7 ₄
3	0,550±0,004	25,00±0,03	39,2 ₁ ±1,2

Tabela A12- Coeficientes de variação e erro relativo para estimativa da precisão em ensaios dentro do mesmo dia para o método Direto.

Ensaio dentro do mesmo dia (N=6)						
Ensaio	$C_{GBPesperada} \pm ec$ (ppm) ^j	Abs 194nm	$C_{GBP} \pm ec$ (ppm) ^o	SD ^d	RSD (%) ^e	RE (%) ^f
1	10,68±0,4 ₄	0,034	10,8±2,6	0,295	2,752	0,254
2		0,033	10,4±2,6			
3		0,034	10,8±2,6			
4		0,033	10,4±2,6			
5		0,034	10,8±2,6			
6		0,035	11,2±2,6			
Média		0,034	10,7±2,6			
Ensaio	$C_{GBPesperada} \pm ec$ (ppm) ^j	Abs 194nm	$C_{GBP} \pm ec$ (ppm) ^o	SD ^d	RSD (%) ^e	RE (%) ^f
1	31,15±0,7 ₄	0,087	31,5±2,5	0,589	1,901	-0,500
2		0,084	30,3±2,5			
3		0,085	30,7±2,5			
4		0,087	31,5±2,5			
5		0,084	30,0±2,5			
6		0,087	31,5±2,5			
Média		0,086	31,0±2,5			
Ensaio	$C_{GBPesperada} \pm ec$ (ppm) ^j	Abs 194nm	$C_{GBP} \pm ec$ (ppm) ^o	SD ^d	RSD (%) ^e	RE (%) ^f
1	39,2±1,2	0,106	39,0±2,5	0,576	1,452	1,303
2		0,107	39,3±2,5			
3		0,108	39,7±2,5			
4		0,110	40,5±2,5			
5		0,107	39,3±2,5			
6		0,109	40,1±2,5			
Média		0,108	39,7±2,5			

Tabela A13 - Coeficientes de variação e erro relativo para estimativa da precisão em ensaios em dias alternados para o método Direto.

Ensaio em dias alternados (N=4)						
Ensaio	$C_{GBPesperada} \pm ec$ (ppm) ^j	Abs 194nm	$C_{GBP} \pm ec$ (ppm) ^o	SD ^d	RSD (%) ^e	RE (%) ^f
1	10,68±0,4 ₄	0,033	10,4±2,6	0,196	1,868	-1,884
2		0,034	10,8±2,6			
3		0,033	10,4±2,6			
4		0,033	10,4±2,6			
Média		0,033	10,5±2,6			
Ensaio	$C_{GBPesperada} \pm ec$ (ppm) ^j	Abs 194nm	$C_{GBP} \pm ec$ (ppm) ^o	SD ^d	RSD (%) ^e	RE (%) ^f
1	31,15±0,7 ₄	0,087	31,5±2,5	0,375	1,2	0,233
2		0,085	30,7±2,5			
3		0,086	23,7±2,5			
4		0,087	31,5±2,5			
Média		0,086	31,2±2,5			
Ensaio	$C_{GBPesperada} \pm ec$ (ppm) ^j	Abs 194nm	$C_{GBP} \pm ec$ (ppm) ^o	SD ^d	RSD (%) ^e	RE (%) ^f
1	39,2±1,2	0,108	39,7±2,5	0,375	0,941	1,72
2		0,109	40,1±2,5			
3		0,109	40,1±2,5			
4		0,107	39,3±2,5			
Média		0,108	39,8±2,5			

Tabela A14- Preparação das soluções para os ensaios de recuperação.

Ensaio Recuperação	V _{solução} Intermédia ± e _{pipeta} (mL)	V _{amostra} ± e _{pipeta} (mL)	V _{Balão} ± e _{Balão} (mL)	C _{GBP} ± ec (ppm) ^j
1	0,200 ± 0,003	0,200 ± 0,003	25,00 ± 0,03	22,24 ± 0,9 ₅
2	0,200 ± 0,003	0,500 ± 0,004	25,00 ± 0,03	34,2 ± 1,2
3	0,200 ± 0,003	0,800 ± 0,008	25,00 ± 0,03	46,2 ± 1,7

Tabela A15- Recuperações para cada nível de fortificação e respetivo desvio padrão.

Recuperação	C _{GBP} Esperada ± ec (ppm) ^j	Abs 192nm	C _{GBP} ± ec (ppm) ^o	Recuperação (%) ^m	SD ^d
1	34,2 ± 1,2	0,093	33,9 ± 2,5	97,38	2,702
2		0,093	33,9 ± 2,5	97,38	
3		0,095	34,7 ± 2,5	102,88	
4		0,094	34,3 ± 2,5	100,13	
5		0,095	34,7 ± 2,5	102,88	
6		0,093	33,9 ± 2,5	97,38	
Média		0,094	34,2 ± 2,5	99,67	
Recuperação	C _{GBP} Esperada ± ec (ppm) ^j	Abs 192nm	C _{GBP} ± ec (ppm) ^o	Recuperação (%) ^m	SD ^d
1	22,24 ± 0,9 ₅	0,062	21,7 ± 2,5	96,43	2,458
2		0,064	22,5 ± 2,5	101,93	
3		0,063	22,1 ± 2,5	99,18	
4		0,063	22,1 ± 2,5	99,18	
5		0,064	22,5 ± 2,5	101,93	
6		0,062	21,7 ± 2,5	96,43	
Média		0,063	22,1 ± 2,5	99,18	
Recuperação	C _{GBP} Esperada ± ec (ppm) ^j	Abs 192nm	C _{GBP} ± ec (ppm) ^o	Recuperação (%) ^m	SD ^d
1	46,2 ± 1,7	0,125	46,4 ± 2,5	101,07	3,213
2		0,124	46,0 ± 2,5	98,32	
3		0,126	46,8 ± 2,5	103,82	
4		0,126	46,8 ± 2,5	103,82	
5		0,125	46,4 ± 2,5	101,07	
6		0,123	45,6 ± 2,5	95,58	
Média		0,125	46,3 ± 2,5	100,62	

Tabela A16- Preparação do método adição de padrão, concentração e absorvência dos padrões para o método Direto.

Solução	V _{solução} Intermédia ± e _{pipeta} (mL)	V _{Amostra} ± e _{pipeta} (mL)	V _{Balão} ± e _{Balão} (mL)	C _{GBP} ± ec (ppm) ^j	Abs 192 nm
Branco	0,000 ± 0,000	0,450 ± 0,004	25,00 ± 0,03	18,0 ₀ ± 0,3 ₄	0,059
1	0,100 ± 0,003	0,450 ± 0,004	25,00 ± 0,03	25,1 ± 1,6	0,077
2	0,200 ± 0,003	0,450 ± 0,004	25,00 ± 0,03	32,2 ± 1,2	0,091
3	0,300 ± 0,004	0,450 ± 0,004	25,00 ± 0,03	39,4 ± 1,3	0,109
4	0,400 ± 0,004	0,450 ± 0,004	25,00 ± 0,03	46,5 ± 1,3	0,127
5	0,500 ± 0,004	0,450 ± 0,004	25,00 ± 0,03	53,6 ± 1,4	0,143
6	0,600 ± 0,008	0,450 ± 0,004	25,00 ± 0,03	60,7 ± 2,0	0,162
7	0,700 ± 0,008	0,450 ± 0,004	25,00 ± 0,03	67,9 ± 2,1	0,180
8	0,800 ± 0,008	0,450 ± 0,004	25,00 ± 0,03	75,0 ± 2,1	0,201
9	0,900 ± 0,008	0,450 ± 0,004	25,00 ± 0,03	82,1 ± 2,2	0,217
10	1,000 ± 0,008	0,450 ± 0,004	25,00 ± 0,03	89,2 ± 2,2	0,241
11	2,00 ± 0,01	0,450 ± 0,004	25,00 ± 0,03	160,4 ± 3,5	0,428

Tabela A17- Preparação das amostras de gabapentina para os métodos espectroscópicos Direto, Hipoclorito e NBD-Cl.

Solução Stock Amostra

Amostra	Massa _{GBP±e_m} (mg)	V _{Balão±e_{Balão}} (mL)	V _{Stockamostra±e_{pipeta}} (mL)	V _{Balão±e_{Balão}} (mL)	C _{GBPesperada} (ppm) ^{j)}
Gabomox[®]	1 cápsula	100,00±0,1	0,500±0,004	25,00±0,03	20
Neurotin[®]	1 cápsula	100,00±0,1	0,500±0,004	25,00±0,03	20
Teva	1 cápsula	100,00±0,1	0,500±0,004	25,00±0,03	20
Generis	1 cápsula	100,00±0,1	0,500±0,004	25,00±0,03	20
Ratiopharm	1 cápsula	100,00±0,1	0,500±0,004	25,00±0,03	20

Tabela A18- Teor de gabapentina nas cápsulas para o método Direto.

Gabomox [®]	Abs 192nm	C _{GBP±ec} (ppm) ^{o)}	C _{Stockamostra±e_{conc}} (ppm) ^{j)}	Teor _{GBP±e_c} (mg) ^{j)}	SD ^{d)}	RSD(%) ^{e)}
1	0,057	19,8±2,6	(0,9±0,14)×10 ³	98,88±0,28	1,598	1,605
2	0,057	19,8±2,6	(0,9±0,14)×10 ³	98,88±0,28		
3	0,058	20,2±2,5	(1,0±0,14)×10 ³	100,84±0,29		
4	0,058	20,2±2,5	(1,0±0,14)×10 ³	100,84±0,29		
5	0,058	20,2±2,5	(1,0±0,14)×10 ³	100,84±0,29		
6	0,056	19,4±2,6	(0,97±0,14)×10 ³	96,93±0,28		
Média	0,057	19,9±2,6	(1,0±0,14)×10 ³	99,54±0,29		
Neurotin [®]	Abs 192nm	C _{GBP±ec} (ppm) ^{o)}	C _{Stockamostra±e_{conc}} (ppm) ^{j)}	Teor _{GBP±e_c} (mg) ^{j)}	SD ^{d)}	RSD(%) ^{e)}
1	0,057	19,8±2,6	(0,9±0,14)×10 ³	98,88±0,28	2,476	2,504
2	0,055	19,0±2,6	(0,95±0,14)×10 ³	94,97±0,27		
3	0,056	19,4±2,6	(0,97±0,14)×10 ³	96,93±0,28		
4	0,058	20,2±2,5	(1,0±0,14)×10 ³	100,84±0,29		
5	0,058	20,2±2,5	(1,0±0,14)×10 ³	100,84±0,29		
6	0,058	20,2±2,5	(1,0±0,14)×10 ³	100,84±0,29		
Média	0,057	19,8±2,6	(0,9±0,14)×10 ³	98,88±0,28		
Ratiopharm	Abs 192nm	C _{GBP±ec} (ppm) ^{o)}	C _{Stockamostra±e_{conc}} (ppm) ^{j)}	Teor _{GBP±e_c} (mg) ^{j)}	SD ^{k)d)}	RSD(%) ^{e)}
1	0,057	19,8±2,6	(0,9±0,14)×10 ³	98,88±0,28	2,053	2,097
2	0,056	19,4±2,6	(0,97±0,14)×10 ³	96,93±0,28		
3	0,057	19,8±2,6	(0,9±0,14)×10 ³	98,88±0,28		
4	0,055	19,0±2,6	(0,95±0,14)×10 ³	94,97±0,27		
5	0,056	19,4±2,6	(0,97±0,14)×10 ³	96,93±0,28		
6	0,058	20,2±2,5	(1,0±0,14)×10 ³	100,84±0,29		
Média	0,057	19,6±2,6	(0,98±0,14)×10 ³	97,90±0,28		
Teva	Abs 192nm	C _{GBP±ec} (ppm) ^{o)}	C _{Stockamostra±e_{conc}} (ppm) ^{j)}	Teor _{GBP±e_c} (mg) ^{j)}	SD ^{d)}	RSD(%) ^{e)}
1	0,056	19,4±2,6	(0,97±0,14)×10 ³	96,93±0,28	1,598	1,627
2	0,056	19,4±2,6	(0,97±0,14)×10 ³	96,93±0,28		
3	0,057	19,8±2,6	(0,9±0,14)×10 ³	98,88±0,28		
4	0,056	19,4±2,6	(0,97±0,14)×10 ³	96,93±0,28		
5	0,058	20,2±2,5	(1,0±0,14)×10 ³	100,84±0,29		
6	0,057	19,8±2,6	(0,9±0,14)×10 ³	98,88±0,28		
Média	0,057	19,6±2,6	(0,98±0,14)×10 ³	98,23±0,28		
Generis	Abs 192nm	C _{GBP±ec} (ppm) ^{o)}	C _{Stockamostra±e_{conc}} (ppm) ^{j)}	Teor _{GBP±e_c} (mg) ^{j)}	SD ^{d)}	RSD(%) ^{e)}
1	0,059	20,6±2,5	(1,03±0,14)×10 ³	102,80±0,30	2,288	2,262
2	0,056	19,4±2,6	(0,97±0,14)×10 ³	96,93±0,28		
3	0,059	20,6±2,5	(1,03±0,14)×10 ³	102,80±0,30		
4	0,059	20,6±2,5	(1,03±0,14)×10 ³	102,80±0,30		
5	0,058	20,2±2,5	(1,0±0,14)×10 ³	100,84±0,29		
6	0,058	20,2±2,5	(1,0±0,14)×10 ³	100,84±0,29		
Média	0,058	20,2±2,5	(1,0±0,14)×10 ³	101,17±0,29		

Tabela A19- Preparação das soluções *Stock* e *Intermédia* de Gabapentina para o método Etanol/Água.

Solução	Modo preparação		
<i>Stock</i>	Massa _{GBP±e_m} (mg)	V _{Balão±e_{Balão}} (mL)	C _{GBP±ec} (ppm) ^{j)}
	603,7±0,1	100,0±0,1	603 _{7±1₃}
	V _{solução stock±e_{pipeta}} (mL)	V _{Balão±e_{Balão}} (mL)	C _{GBP±ec} (ppm) ^{j)}
<i>Intermédia</i>	10,00±0,02	20,00±0,04	301 _{9±1₉}

Tabela A20- Preparação das soluções padrão para o método Etanol/Água.

Método Etanol/Água				
Soluções	V _{solução stock±e_{pipeta}} (mL)	Solução	V _{Balão±e_{Balão}} (mL)	C _{GBP±ec} (ppm) ^{j)}
Branco	0,000±0,000	-	25,00±0,03	0,00±0,00
1	0,400±0,004	<i>Stock</i>	25,00±0,03	96,60±0,98
2	0,500±0,004	<i>Stock</i>	25,00±0,03	120,74±0,99
3	0,600±0,008	<i>Stock</i>	25,00±0,03	144,9±2,0
4	0,700±0,008	<i>Stock</i>	25,00±0,03	169,0±2,0
5	0,800±0,008	<i>Stock</i>	25,00±0,03	193,2±2,0
6	0,900±0,008	<i>Stock</i>	25,00±0,03	217,3±2,0
7	1,000±0,008	<i>Stock</i>	25,00±0,03	241,5±2,0
8	3,000±0,015	<i>Intermédia</i>	25,00±0,03	362,2±2,2
9	2,00±0,01	<i>Stock</i>	25,00±0,03	483,0±2,6
10	5,000±0,015	<i>Intermédia</i>	25,00±0,03	603,7±2,7
11	3,000±0,015	<i>Stock</i>	25,00±0,03	724,5±3,8
12	5,000±0,015	<i>Stock</i>	25,00±0,03	1207,4±4,1

Tabela A21- Absorvência de cada solução padrão a 194 nm e respectivos residuais para o método Etanol/Água.

Padrões	C _{GBP±e_c} (ppm) ^{j)}	Abs 194 nm	Residuais ^{p)}
Branco	0,00±0,00	0,002	-2,21x10 ⁻²
1	96,6±2,0	0,087	-1,25x10 ⁻²
2	120,7±2,0	0,114	-4,35x10 ⁻³
3	144,9±3,9	0,137	-2,12x10 ⁻⁴
4	169,0±4,0	0,159	2,93x10 ⁻³
5	193,2±4,0	0,167	-7,93x10 ⁻³
6	217,3±4,0	0,200	6,21x10 ⁻³
7	241,5±4,0	0,211	-1,64x10 ⁻³
8	362,2±4,4	0,314	7,06x10 ⁻³
9	483,0±5,1	0,425	2,38x10 ⁻²
10	603,7±5,4	0,513	1,75x10 ⁻²
11	724,5±7,6	0,615	2,52x10 ⁻²
12	1207,4±8,2	0,933	-3,40x10 ⁻²

Tabela A22- Leituras do branco fortificado para a estimativa dos limites de detecção e quantificação para o método Etanol/Água.

Branco	Sinal
1	0,000
2	0,002
3	-0,003
4	-0,004
5	0,003
6	-0,005
7	-0,004
8	0,009
9	0,008
10	0,005
11	-0,004
12	0,006
13	0,008
14	0,004
15	-0,002
16	0,009
17	0,007
18	0,005
19	0,006
20	-0,001
Média	0,00245
Desvio padrão^{d)}	0,00490
LD_{Sb} (ppm)^{j)}	17,51
LQ_{Sb} (ppm)^{j)}	58,37

Tabela A23- Preparação das soluções *Stock* e *Intermédia* de Gabapentina para o método HCl 0,1 M.

Solução	Modo preparação		
Stock	Massa_{GBP}±e_m (mg)	V_{Balão}±e_{Balão} (mL)	C_{GBP}±ec (ppm)^{j)}
	405,8±0,1	100,0±0,1	4058,0±8,4
	V_{solução stock}±e_{pipeta} (mL)	V_{Balão}±e_{Balão} (mL)	C_{GBP}±ec (ppm)^{j)}
Intermédia	10,00±0,02	20,00±0,03	202 ₉ ±1 ₃

Tabela A24- Preparação das soluções padrão para o método HCl 0,1 M.

Método HCl 0,1 M				
Soluções	V_{solução stock}±e_{pipeta} (mL)	Solução	V_{Balão}±e_{Balão} (mL)	C_{GBP}±ec (ppm)^{j)}
Branco	0,000±0,000	-	25,00±0,03	0,0 ₀ ±0,0 ₀
1	0,250±0,004	Stock	25,00±0,03	40,5 ₈ ±0,6 ₆
2	0,500±0,004	Stock	25,00±0,03	81,2 ₀ ±0,6 ₇
3	0,600±0,008	Stock	25,00±0,03	97,4 ₁ ±1,4 ₄
4	0,700±0,008	Stock	25,00±0,03	113,6 ₁ ±1,4 ₄
5	0,800±0,008	Stock	25,00±0,03	129,9 ₁ ±1,4 ₄
6	0,900±0,008	Stock	25,00±0,03	146,1 ₁ ±1,4 ₄
7	1,000±0,008	Stock	25,00±0,03	162,3 ₁ ±1,4 ₄
8	2,00±0,01	Stock	25,00±0,03	324,6 ₁ ±1,8 ₈
9	5,000±0,015	Intermédia	25,00±0,03	405,8 ₁ ±1,8 ₈
10	3,000±0,015	Stock	25,00±0,03	487,0 ₁ ±2,6 ₆
11	5,000±0,015	Stock	25,00±0,03	811,6 ₁ ±2,8 ₈

Tabela A25- Absorvência de cada solução padrão a 206 nm para o método HCl 0,1 M.

Padrões	$C_{GBP \pm e_c}$ (ppm) ^{j)}	Abs 206 nm	Residuais ^{p)}
Branco	0,0 ₀ ±0,0 ₀	0,000	-1,12x10 ⁻³
1	40,6±1,4	0,014	2,36x10 ⁻⁴
2	81,2±1,4	0,025	-1,41x10 ⁻³
3	97,4±2,7	0,027	-4,47x10 ⁻³
4	113,6±2,7	0,032	-4,53x10 ⁻³
5	129,9±2,7	0,039	-2,59x10 ⁻³
6	146,1±2,7	0,044	-2,64x10 ⁻³
7	162,3±2,7	0,066	1,43x10 ⁻²
8	324,6±3,5	0,106	3,71x10 ⁻³
9	405,8±3,6	0,128	4,20x10 ⁻⁴
10	487,0±5,2	0,154	1,13x10 ⁻³
11	811,6±5,6	0,251	-3,04x10 ⁻³

Tabela A26- Leituras do branco fortificado para a estimativa dos limites de detecção e quantificação para o método HCl 0,1 M.

Branco	Sinal
1	0,002
2	0,004
3	0,005
4	0,002
5	0,001
6	0,007
7	0,004
8	0,005
9	0,002
10	0,008
11	0,007
12	0,008
13	0,004
14	0,002
15	-0,001
16	0,002
17	0,003
18	0,004
19	0,008
20	0,001
Média	0,0039
Desvio padrão^{d)}	0,0026
LD_{Sb}(ppm)^{l)}	25,20
LQ_{Sb}(ppm)^{l)}	84,01

Tabela A27- Preparação da solução *Stock* para o método *p*-benzoquinona.

Solução	Modo preparação		
<i>Stock</i>	Massa _{GBP ± e_m} (mg)	V _{Balão ± e_{Balão}} (mL)	C _{GBP ± e_c} (ppm) ^{j)}
	603,7±0,1	100,0±0,1	603 ₇ ±1 ₃

Tabela A28- Preparação do tampão fosfato e Reagente *p*-benzoquinona.

Tampão Fosfato				
	Massa±e _m (mg)	V _{Balão} ±e _{Balão} (mL)	Conc (M)	pH
Na ₂ HPO ₄	3582,3±0,1	100,0±0,1	0,1	7,5
NaH ₂ PO ₄	1199,8±0,1	100,0±0,1	0,1	
NaOH	803,2±0,1	200,00±0,15	0,1	
Reagente <i>p</i>-benzoquinona				
	Massa±e _m (mg)	V _{Balão} ±e _{Balão} (mL)	Solvente	Conc (M)
<i>p</i> -benzoquinona	1081,0±0,1	100,0±0,1	Etanol	0,1

Tabela A29- Preparação das soluções padrão para o método *p*-benzoquinona.

Método <i>p</i>-benzoquinona					
Soluções	V _{solução Stock} ±e _{pipeta} (mL)	V _{Tampão} ±e _{Balão} (mL)	V _{<i>p</i>-benzoquinona} ±e _{Balão} (mL)	V _{Balão} ±e _{Balão} (mL)	C _{GBP} ±e _c (ppm) ^j
Branco	0,000±0,000	2,00±0,01	0,500±0,004	25,00±0,03	0,0 ₀ ±0,0 ₀
1	0,100±0,003	2,00±0,01	0,500±0,004	25,00±0,03	24,1±1,5
2	0,200±0,003	2,00±0,01	0,500±0,004	25,00±0,03	48,3±1,5
3	0,300±0,004	2,00±0,01	0,500±0,004	25,00±0,03	72,4±2,0
4	0,400±0,004	2,00±0,01	0,500±0,004	25,00±0,03	96,6±2,0
5	0,500±0,004	2,00±0,01	0,500±0,004	25,00±0,03	120,7±2,0
6	0,600±0,008	2,00±0,01	0,500±0,004	25,00±0,03	144,9±3,9
7	0,700±0,008	2,00±0,01	0,500±0,004	25,00±0,03	169,0±3,9
8	0,800±0,008	2,00±0,01	0,500±0,004	25,00±0,03	193,2±4,0
9	0,900±0,008	2,00±0,01	0,500±0,004	25,00±0,03	217,3±4,0
10	1,000±0,008	2,00±0,01	0,500±0,004	25,00±0,03	241,5±4,0
11	2,00±0,01	2,00±0,01	0,500±0,004	25,00±0,03	483,0±5,1

Tabela A30- Absorvências das soluções padrão a 350 nm e respectivos residuais, para o método *p*-benzoquinona.

Padrões	C _{GBP} ±e _c (ppm) ^j	Abs 350 nm	Residuais ^p
Branco	0,0 ₀ ±0,0 ₀	0,000	-6,10x10 ⁻²
1	24,1±1,5	0,168	-1,18x10 ⁻²
2	48,3±1,5	0,342	4,34x10 ⁻²
3	72,4±2,0	0,414	-3,39x10 ⁻³
4	96,6±2,0	0,527	-9,19x10 ⁻³
5	120,7±2,0	0,642	-1,30x10 ⁻²
6	144,9±3,9	0,777	3,20x10 ⁻³
7	169,0±3,9	0,898	5,40x10 ⁻³
8	193,2±4,0	1,026	1,46x10 ⁻²
9	217,3±4,0	1,164	3,38x10 ⁻²
10	241,5±4,0	1,289	4,00x10 ⁻²
11	483,0±5,1	2,395	-4,20x10 ⁻²

Tabela A31- Absorvências do branco fortificado para a estimativa dos limites de detecção e quantificação do método *p*-benzoquinona.

Branco	Sinal
1	0,009
2	0,002
3	0,003
4	0,007
5	0,004
6	0,005
7	0,012
8	0,002
9	0,004
10	0,002
11	0,003
12	0,012
13	0,008
14	0,003
15	0,007
16	0,010
17	0,012
18	0,007
19	0,010
20	0,013
Desvio padrão^{d)}	0,00381
LD_{Sb}(ppm)^{l)}	2,19
LQ_{Sb}(ppm)^{l)}	7,30

Tabela A32- Preparação das soluções *Stock* e *Intermédia* para o método Vanilina.

Solução	Modo preparação		
<i>Stock</i>	Massa_{GBPpura}±e_m (mg)	V_{Balão}±e_{Balão} (mL)	C_{GBP}±ec (ppm)^{j)}
	296,7±0,1	50,00±0,06	593 ₄ ±1 ₅
<i>Intermédia</i>	V_{solução stock}±e_{pipeta} (mL)	V_{Balão}±e_{Balão} (mL)	C_{GBP}±ec (ppm)^{j)}
	10,00±0,02	20,00±0,04	296 ₇ ±1 ₉
<i>Amostra</i>	Massa_{GBP}±e_m (mg)	V_{Balão}±e_{Balão} (mL)	C_{GBP}(ppm)^{j)}
	100,0±0,1	100,00±0,1	1000
<i>Solução amostra diluída</i>	V_{solução stock}±e_{pipeta} (mL)	V_{Balão}±e_{Balão} (mL)	C_{GBP}(ppm)^{j)}
	10,00±0,02	20,00±0,04	500

Tabela A33- Preparação do tampão *McIlvaine* e Reagente *Duquenois*.

Tampão McIlvaine					
	Massa±e_m (mg)	V_{Balão}±e_{Balão} (mL)	Conc (M)	Volume (mL)	pH
Na₂HPO₄	3583,2±0,1	50,00±0,06	0,20	35,5	7,5
Ácido cítrico	1921,7±0,1	100,0±0,1	0,10	64,5	
NaOH	801,5±0,1	200,00±0,15	0,10	-	
Reagente Duquenois					
	Massa±e_m (mg)	Vol_{acetaldéido} (mL)	V_{Balão}±e_{Balão} (mL)	Solvente	
Vanilina	2006,2±0,1	0,300±0,003	50,00±0,06	Etanol	

Tabela A34- Preparação das soluções padrão para o método Vanilina.

Método Vanilina						
Soluções	$V_{\text{solução}} \pm e_{\text{pipeta}}$ (mL)	Solução	$V_{\text{Duquenois}} \pm e_{\text{Balão}}$ (mL)	$V_{\text{Tampão}} \pm e_{\text{Balão}}$ (mL)	$V_{\text{Balão}} \pm e_{\text{Balão}}$ (mL)	$C_{\text{GBP}} \pm e_c$ (ppm) ^{j)}
Branco	0,000±0,000	-	3,000±0,015	3,000±0,015	25,00±0,03	0,00±0,00
1	0,100±0,003	<i>Stock</i>	3,000±0,015	3,000±0,015	25,00±0,03	23,7±1,5
2	0,200±0,003	<i>Stock</i>	3,000±0,015	3,000±0,015	25,00±0,03	47,5±1,5
3	0,300±0,004	<i>Stock</i>	3,000±0,015	3,000±0,015	25,00±0,03	71,2±2,0
4	0,400±0,004	<i>Stock</i>	3,000±0,015	3,000±0,015	25,00±0,03	94,9±2,0
5	0,500±0,004	<i>Stock</i>	3,000±0,015	3,000±0,015	25,00±0,03	118,7±2,0
6	0,600±0,008	<i>Stock</i>	3,000±0,015	3,000±0,015	25,00±0,03	142,4±3,9
7	0,700±0,008	<i>Stock</i>	3,000±0,015	3,000±0,015	25,00±0,03	166,2±3,9
8	0,800±0,008	<i>Stock</i>	3,000±0,015	3,000±0,015	25,00±0,03	189,9±3,9
9	0,900±0,008	<i>Stock</i>	3,000±0,015	3,000±0,015	25,00±0,03	213,6±3,9
10	1,000±0,008	<i>Stock</i>	3,000±0,015	3,000±0,015	25,00±0,03	237,4±3,9
11	3,000±0,015	<i>Intermédia</i>	3,000±0,015	3,000±0,015	25,00±0,03	356,0±4,3
12	2,00±0,01	<i>Stock</i>	3,000±0,015	3,000±0,015	25,00±0,03	474,7±5,1
13	5,000±0,015	<i>Intermédia</i>	3,000±0,015	3,000±0,015	25,00±0,03	593,4±5,4
14	3,000±0,015	<i>Stock</i>	3,000±0,015	3,000±0,015	25,00±0,03	712,1±7,6
15	5,000±0,015	<i>Stock</i>	3,000±0,015	3,000±0,015	25,00±0,03	1186,8±8,3

Tabela A35- Absorvências das soluções padrão a 392 nm e respectivos residuais para o método Vanilina.

Padrões	$C_{\text{GBP}} \pm e_c$ (ppm) ^{j)}	Abs 392 nm	Residuais ^{p)}
Branco	0,00±0,00	0,016	-3,92x10 ⁻²
1	23,7±1,5	0,075	-5,76x10 ⁻³
2	47,5±1,5	0,085	-2,13x10 ⁻²
3	71,2±2,0	0,133	1,19x10 ⁻³
4	94,9±2,0	0,145	-1,23x10 ⁻²
5	118,7±2,0	0,194	1,11x10 ⁻²
6	142,4±3,9	0,203	-5,38x10 ⁻³
7	166,2±3,9	0,235	1,09x10 ⁻³
8	189,9±3,9	0,269	9,57x10 ⁻³
9	213,6±3,9	0,294	9,05x10 ⁻³
10	237,4±3,9	0,315	4,52x10 ⁻³
11	356,0±4,3	0,447	8,90x10 ⁻³
12	474,7±5,1	0,587	2,13x10 ⁻²
13	593,4±5,4	0,727	3,37x10 ⁻²
14	712,1±7,6	0,857	3,60x10 ⁻²
15	1186,8±8,3	1,279	-5,24x10 ⁻²

Tabela A36- Absorvências do branco fortificado para estimativa dos limites de detecção e quantificação para o método Vanilina.

Branco	Sinal
1	0,004
2	0,002
3	0,005
4	0,007
5	0,004
6	0,006
7	0,008
8	0,012
9	0,011
10	0,011
11	0,011
12	0,011
13	0,012
14	0,011
15	0,012
16	0,012
17	0,013
18	0,015
19	0,014
20	0,016
Desvio padrão^{d)}	0,00395
LD_{Sb} (ppm)^{l)}	10,36
LQ_{Sb} (ppm)^{l)}	34,55

Tabela A37 – Variação da absorvência das soluções padrão do método Vanilina ao longo de 120 horas.

Soluções	C_{GBP±e_c} (ppm)^{j)}	Vanilina						
		0 horas	4 horas	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas	120 horas
Branco	0,0 _{0±0,0₀}	0,016	0,014	0,015	0,012	0,011	0,011	0,009
1	23,7 _{±1,5}	0,075	0,072	0,074	0,075	0,072	0,062	0,056
2	47,5 _{±1,5}	0,085	0,084	0,083	0,085	0,088	0,088	0,077
3	71,2 _{±2,0}	0,133	0,129	0,130	0,128	0,116	0,106	0,095
4	94,9 _{±2,0}	0,145	0,144	0,144	0,145	0,134	0,124	0,118
5	118,7 _{±2,0}	0,194	0,193	0,192	0,189	0,143	0,153	0,142
6	142,4 _{±3,9}	0,203	0,206	0,200	0,199	0,176	0,166	0,159
7	166,2 _{±3,9}	0,235	0,238	0,235	0,239	0,199	0,189	0,177
8	189,9 _{±3,9}	0,269	0,270	0,268	0,268	0,218	0,210	0,208
9	213,6 _{±3,9}	0,294	0,301	0,296	0,298	0,257	0,247	0,237
10	237,4 _{±3,9}	0,315	0,318	0,317	0,317	0,279	0,269	0,252
11	356,0 _{±4,3}	0,447	0,450	0,449	0,446	0,442	0,389	0,355
12	474,7 _{±5,1}	0,587	0,589	0,590	0,581	0,563	0,529	0,518
13	593,4 _{±5,4}	0,727	0,728	0,726	0,728	0,706	0,656	0,646
14	712,1 _{±7,6}	0,857	0,855	0,854	0,849	0,836	0,797	0,785
15	1186,8 _{±8,3}	1,279	1,277	1,269	1,243	1,245	1,121	1,172

Tabela A38- Preparação das soluções para estimativa da precisão do método Vanilina.

Recuperação	V_{soluçãostock±e_{pipeta}} (mL)	V_{Balão±e_{Balão}} (mL)	Conc_{GBP±ec} (ppm)^{j)}
1	0,350±0,004	25,00±0,03	83,1±2,0
2	0,650±0,008	25,00±0,03	154,3±3,9
3	0,850±0,008	25,00±0,03	201,8±3,9

Tabela A39- Coeficientes de variação e erro relativo para ensaios efetuados dentro do mesmo dia para o método Vanilina.

Ensaio dentro do mesmo dia (N=6)						
Ensaio	C _{GBPesperada} ±ec (ppm) ^{j)}	Abs 392nm	C _{GBP} ±ec (ppm) ^{o)}	SD ^{d)}	RSD (%) ^{e)}	RE (%) ^{f)}
1	201,8±3,9	0,275	20 ₁ ±1 ₅	0,917	0,455	-0,102
2		0,276	20 ₂ ±1 ₅			
3		0,274	20 ₀ ±1 ₅			
4		0,275	20 ₁ ±1 ₅			
5		0,277	20 ₃ ±1 ₅			
6		0,276	20 ₂ ±1 ₅			
Média		0,276	20 ₂ ±1 ₅			
Ensaio	C _{GBPesperada} ±ec (ppm) ^{j)}	Abs 392nm	C _{GBP} ±ec (ppm) ^{o)}	SD ^{d)}	RSD (%) ^{e)}	RE (%) ^{f)}
1	154,3±3,9	0,222	15 ₅ ±1 ₅	1,326	0,864	-0,538
2		0,221	15 ₄ ±1 ₅			
3		0,220	15 ₃ ±1 ₅			
4		0,218	15 ₁ ±1 ₅			
5		0,222	15 ₅ ±1 ₅			
6		0,220	15 ₃ ±1 ₅			
Média		0,221	15 ₃ ±1 ₅			
Ensaio	C _{GBPesperada} ±ec (ppm) ^{j)}	Abs 392nm	C _{GBP} ±ec (ppm) ^{o)}	SD ^{d)}	RSD (%) ^{e)}	RE (%) ^{f)}
1	83,1±2,0	0,140	8 ₃ ±1 ₅	1,022	1,229	0,153
2		0,141	8 ₄ ±1 ₅			
3		0,142	8 ₅ ±1 ₅			
4		0,140	8 ₃ ±1 ₅			
5		0,139	8 ₂ ±1 ₅			
6		0,139	8 ₂ ±1 ₅			
Média		0,140	8 ₃ ±1 ₅			

Tabela A40- Coeficientes de variação e erro relativo para ensaios efetuados em dias alternados para o método Vanilina.

Ensaio em dias alternados (N=4)						
Ensaio	C _{GBPesperada} ±ec (ppm) ^{j)}	Abs 392nm	C _{GBP} ±ec (ppm) ^{o)}	SD ^{d)}	RSD (%) ^{e)}	RE (%) ^{f)}
1	201,8±3,9	0,276	20 ₂ ±1 ₅	1,129	0,560	-0,102
2		0,275	20 ₁ ±1 ₅			
3		0,277	20 ₃ ±1 ₅			
4		0,274	20 ₀ ±1 ₅			
Média		0,276	20 ₂ ±1 ₅			
Ensaio	C _{GBPesperada} ±ec (ppm) ^{j)}	Abs 392nm	C _{GBP} ±ec (ppm) ^{o)}	SD ^{d)}	RSD (%) ^{e)}	RE (%) ^{f)}
1	154,3±3,9	0,222	15 ₅ ±1 ₅	1,100	0,716	-0,396
2		0,219	15 ₂ ±1 ₅			
3		0,221	15 ₄ ±1 ₅			
4		0,221	15 ₄ ±1 ₅			
Média		0,221	15 ₄ ±1 ₅			
Ensaio	C _{GBPesperada} ±ec (ppm) ^{j)}	Abs 392nm	C _{GBP} ±ec (ppm) ^{o)}	SD ^{d)}	RSD (%) ^{e)}	RE (%) ^{f)}
1	83,1±2,0	0,142	8 ₅ ±1 ₅	1,100	1,321	0,241
2		0,140	8 ₃ ±1 ₅			
3		0,139	8 ₂ ±1 ₅			
4		0,140	8 ₃ ±1 ₅			
Média		0,140	8 ₃ ±1 ₅			

Tabela A41- Preparação das soluções de recuperação para o método Vanilina.

Ensaio recuperação	$V_{\text{solução stock}} \pm e_{\text{pipeta}} \text{ (mL)}$	$V_{\text{amostra diluída}} \pm e_{\text{pipeta}} \text{ (mL)}$	$V_{\text{Balão}} \pm e_{\text{Balão}} \text{ (mL)}$	$C_{\text{GBP esperada}} \pm e_{\text{Conc}} \text{ (ppm)}^j)$
1	0,600±0,008	15,00±0,03	25,00±0,03	44 ₂ ±1 ₃
Ensaio recuperação	$V_{\text{solução Stock}} \pm e_{\text{pipeta}} \text{ (mL)}$	$V_{\text{amostra}} \pm e_{\text{pipeta}} \text{ (mL)}$	$V_{\text{Balão}} \pm e_{\text{Balão}} \text{ (mL)}$	$C_{\text{GBP esperada}} \pm e_{\text{Conc}} \text{ (ppm)}^j)$
2	0,600±0,008	1,000±0,008	25,00±0,03	18 ₂ ±5,7
3	0,600±0,008	0,250±0,004	25,00±0,03	15 ₂ ±6,4

Tabela A42- Ensaios de recuperação para o método Vanilina.

Recuperação	$C_{\text{GBP esperada}} \pm e_{\text{Conc}} \text{ (ppm)}^j)$	Abs 392nm	$C_{\text{GBP}} \pm e_c \text{ (ppm)}^o)$	Recuperação (%) ^{m)}	SD ^{d)}
1	44 ₂ ±1 ₃	0,549	44 ₁ ±1 ₅	98,81	1,058
2		0,547	43 ₉ ±1 ₅	97,58	
3		0,550	44 ₂ ±1 ₅	99,43	
4		0,549	44 ₁ ±1 ₅	98,81	
5		0,548	44 ₀ ±1 ₅	98,20	
6		0,552	44 ₃ ±1 ₅	100,65	
Média		0,549	44 ₁ ±1 ₅	98,91	
Recuperação	$C_{\text{GBP esperada}} \pm e_{\text{Conc}} \text{ (ppm)}^j)$	Abs 392nm	$C_{\text{GBP}} \pm e_c \text{ (ppm)}^o)$	Recuperação (%) ^{m)}	SD ^{d)}
1	18 ₂ ±5,7	0,255	18 ₄ ±1 ₅	100,85	1,009
2		0,254	18 ₃ ±1 ₅	100,23	
3		0,257	18 ₅ ±1 ₅	102,08	
4		0,255	18 ₄ ±1 ₅	100,85	
5		0,254	18 ₃ ±1 ₅	100,23	
6		0,256	18 ₂ ±1 ₅	99,01	
Média		0,255	18 ₄ ±1 ₅	100,54	
Recuperação	$C_{\text{GBP esperada}} \pm e_{\text{Conc}} \text{ (ppm)}^j)$	Abs 392nm	$C_{\text{GBP}} \pm e_c \text{ (ppm)}^o)$	Recuperação (%) ^{m)}	SD ^{d)}
1	15 ₂ ±6,4	0,219	15 ₂ ±1 ₅	99,81	0,604
2		0,218	15 ₁ ±1 ₅	99,19	
3		0,220	15 ₃ ±1 ₅	100,42	
4		0,218	15 ₁ ±1 ₅	99,19	
5		0,220	15 ₃ ±1 ₅	100,42	
6		0,218	15 ₁ ±1 ₅	99,19	
Média		0,219	15 ₂ ±1 ₅	99,71	

Tabela A43- Preparação das amostras para o método Vanilina.

Amostra	$V_{\text{Stock amostra}} \pm e_{\text{pipeta}} \text{ (mL)}$	$V_{\text{Balão}} \pm e_{\text{Balão}} \text{ (mL)}$	$C_{\text{GBP esperada}} \text{ (ppm)}^j)$
Gabomox [®]	5,000±0,015	25,00±0,03	200
Neurotin [®]	5,000±0,015	25,00±0,03	200
Teva	5,000±0,015	25,00±0,03	200
Generis	5,000±0,015	25,00±0,03	200
Ratiopharm	5,000±0,015	25,00±0,03	200

Tabela A44 – Determinação do teor de gabapentina nas cápsulas pelo método Vanilina.

Gabomox®	Abs 392nm	C_{GBP±ec} (ppm)^o	C_{StockAmostr±ec} (ppm)^j	Teor_{GBP±ec} (mg)^j	SD^d	RSD (%)^e
1	0,276	20 _{2±1,5}	101 _{0±6,7}	100,9 _{9±0,2,9}	0,770	0,771
2	0,272	19 _{8±1,5}	99 _{2±6,7}	99,2 _{4±0,2,9}		
3	0,274	20 _{0±1,5}	100 _{1±6,7}	100,1 _{2±0,2,9}		
4	0,275	20 _{1±1,5}	100 _{6±6,7}	100,5 _{6±0,2,9}		
5	0,272	19 _{8±1,5}	99 _{2±6,7}	99,2 _{4±0,2,9}		
6	0,272	19 _{8±1,5}	99 _{2±6,7}	99,2 _{4±0,2,9}		
Média	0,274	20 _{0±1,5}	99 _{9±6,7}	99,9 _{0±0,2,9}		
Neurotin®	Abs 392nm	C_{GBP±ec} (ppm)^o	C_{StockAmostr±ec} (ppm)^j	Teor_{GBP±ec} (mg)^j	SD^d	RSD (%)^e
1	0,275	20 _{1±1,5}	100 _{6±6,7}	100,5 _{6±0,2,9}	0,663	0,661
2	0,273	19 _{9±1,5}	99 _{7±6,7}	99,6 _{8±0,2,9}		
3	0,274	20 _{0±1,5}	100 _{1±6,7}	100,1 _{2±0,2,9}		
4	0,273	19 _{9±1,5}	99 _{7±6,7}	99,6 _{8±0,2,9}		
5	0,275	20 _{1±1,5}	100 _{6±6,7}	100,5 _{6±0,2,9}		
6	0,277	20 _{3±1,5}	101 _{4±6,7}	101,4 _{3±0,2,9}		
Média	0,275	20 _{1±1,5}	100 _{4±6,7}	100,3 _{4±0,2,9}		
Ratiopharm	Abs 392nm	C_{GBP±ec} (ppm)^o	C_{StockAmostr±ec} (ppm)^j	Teor_{GBP±ec} (mg)^j	SD^d	RSD (%)^e
1	0,274	20 _{0±1,5}	100 _{1±6,7}	100,1 _{2±0,2,9}	0,644	0,643
2	0,272	19 _{8±1,5}	99 _{2±6,7}	99,2 _{4±0,2,9}		
3	0,275	20 _{1±1,5}	100 _{6±6,7}	100,5 _{6±0,2,9}		
4	0,273	19 _{9±1,5}	99 _{7±6,7}	99,6 _{8±0,2,9}		
5	0,276	20 _{2±1,5}	101 _{0±6,7}	100,9 _{9±0,2,9}		
6	0,273	19 _{9±1,5}	99 _{7±6,7}	99,6 _{8±0,2,9}		
Média	0,274	20 _{0±1,5}	100 _{0±6,7}	100,0 _{5±0,2,9}		
Teva	Abs 392nm	C_{GBP±ec} (ppm)^o	C_{StockAmostr±ec} (ppm)^j	Teor_{GBP±ec} (mg)^j	SD^d	RSD (%)^e
1	0,276	20 _{2±1,5}	101 _{0±6,7}	100,9 _{9±0,2,9}	0,701	0,700
2	0,274	20 _{0±1,5}	100 _{1±6,7}	100,1 _{2±0,2,9}		
3	0,272	19 _{8±1,5}	99 _{2±6,7}	99,2 _{4±0,2,9}		
4	0,275	20 _{1±1,5}	100 _{6±6,7}	100,5 _{6±0,2,9}		
5	0,272	19 _{8±1,5}	99 _{2±6,7}	99,2 _{4±0,2,9}		
6	0,274	20 _{0±1,5}	100 _{1±6,7}	100,1 _{2±0,2,9}		
Média	0,274	20 _{0±1,5}	100 _{0±6,7}	100,0 _{5±0,2,9}		
Generis	Abs 392nm	C_{GBP±ec} (ppm)^o	C_{StockAmostr±ec} (ppm)^j	Teor_{GBP±ec} (mg)^j	SD^d	RSD (%)^e
1	0,279	20 _{5±1,5}	102 _{3±6,7}	102,3 _{1±0,2,9}	1,086	1,070
2	0,276	20 _{2±1,5}	101 _{0±6,7}	100,9 _{9±0,2,9}		
3	0,274	20 _{0±1,5}	100 _{1±6,7}	100,1 _{2±0,2,9}		
4	0,280	20 _{5±1,5}	102 _{7±6,7}	102,7 _{4±0,3,0}		
5	0,275	20 _{1±1,5}	100 _{6±6,7}	100,5 _{6±0,2,9}		
6	0,279	20 _{5±1,5}	102 _{3±6,7}	102,3 _{1±0,2,9}		
Média	0,277	20 _{3±1,5}	101 _{5±6,7}	101,5 _{0±0,2,9}		

Tabela A45- Preparação das soluções *Stock* e *Intermédia* para o método Hipoclorito.

Solução	Modo preparação		
Stock	Massa_{GBPpura±e_m} (mg)	V_{Balão±e_{Balão}} (mL)	C_{GBP±ec} (ppm)^j
	61,4±0,1	100,0±0,1	614,0±2,3
Intermédia	V_{solução stock±e_{pipeta}} (mL)	V_{Balão±e_{Balão}} (mL)	C_{GBP±ec} (ppm)^j
	10,00±0,02	20,00±0,04	307,0±2,1

Tabela A46- Preparação do tampão *Kolthoff*, solução de nitrito de sódio, solução de hipoclorito de sódio e Reagente amido-iodeto de potássio.

Tampão Kolthoff					
	Massa±e _m (mg)	V _{Balão±e_{Balão}} (mL)	Conc (M) ⁱ⁾	Volume (mL)	pH
KH₂PO₄	1363,3±0,1	100,0±0,1	0,20	62,3	7,0
Tetraborato de sódio	953,4±0,1	50,00±0,06	0,10	37,3	
Solução de nitrito de sódio					
	Massa±e _m (mg)	V _{Balão±e_{Balão}} (mL)	Solvente	Conc (M) ⁱ⁾	
NaNO₂	276,5±0,1	100,0±0,1	Água destilada	0,04	
Solução de hipoclorito de sódio					
	Volume (mL)	V _{Balão±e_{Balão}} (mL)	Solvente	Conc (M) ⁱ⁾	
NaOCl	2,00±0,01	100,0±0,1	Água destilada	0,012	
Reagente amido-iodeto de potássio					
	Massa±e _m (mg)	V _{Balão±e_{Balão}} (mL)	Solvente		
Amido solúvel	757,2±0,1	100,0±0,1	Água destilada		
KI	1004,0±0,1				

Tabela A47- Preparação das soluções padrão para o método Hipoclorito.

Soluções	V _{solução±e_{pip}} (mL)	Solução	V _{tampão±e_{pip}} (mL)	V _{NaOCl ±e_{pip}} (mL)	V _{NaNO₂±e_{pip}} (mL)	V _{Reagente±e_{pip}} (mL)	V _{Balão±e_{Balão}} (mL)	C _{GBP±e_c} (ppm) ^{j)}
Branco	0,00±0,00	-	3,000±0,015	3,000±0,015	3,000±0,015	3,000±0,015	25,00±0,03	0,00±0,00
1	0,100±0,003	<i>Intermédia</i>	3,000±0,015	3,000±0,015	3,000±0,015	3,000±0,015	25,00±0,03	1,22 ₈ ±0,07 ₅
2	0,250±0,004	<i>Intermédia</i>	3,000±0,015	3,000±0,015	3,000±0,015	3,000±0,015	25,00±0,03	3,07±0,1 ₁
3	0,500±0,004	<i>Intermédia</i>	3,000±0,015	3,000±0,015	3,000±0,015	3,000±0,015	25,00±0,03	6,14±0,1 ₁
4	0,800±0,008	<i>Intermédia</i>	3,000±0,015	3,000±0,015	3,000±0,015	3,000±0,015	25,00±0,03	9,82±0,2 ₁
5	0,700±0,008	<i>Stock</i>	3,000±0,015	3,000±0,015	3,000±0,015	3,000±0,015	25,00±0,03	17,19±0,4 ₁
6	2,00±0,01	<i>Intermédia</i>	3,000±0,015	3,000±0,015	3,000±0,015	3,000±0,015	25,00±0,03	24,56±0,3 ₁
7	3,000±0,015	<i>Intermédia</i>	3,000±0,015	3,000±0,015	3,000±0,015	3,000±0,015	25,00±0,03	36,84±0,4 ₆
8	2,00±0,01	<i>Stock</i>	3,000±0,015	3,000±0,015	3,000±0,015	3,000±0,015	25,00±0,03	49,12±0,5 ₄
9	3,000±0,015	<i>Stock</i>	3,000±0,015	3,000±0,015	3,000±0,015	3,000±0,015	25,00±0,03	73,68±0,8 ₁
10	5,000±0,015	<i>Stock</i>	3,000±0,015	3,000±0,015	3,000±0,015	3,000±0,015	25,00±0,03	122,80±0,9 ₃
11	10,00±0,02	<i>Stock</i>	3,000±0,015	3,000±0,015	3,000±0,015	3,000±0,015	25,00±0,03	245,7±1,5

Tabela A48- Absorvências das soluções padrão a 588 nm e respectivos residuais, para o método Hipoclorito.

Padrões	C _{GBP±e_c} (ppm) ^{j)}	Abs 588 nm	Residuais ^{d)}
Branco	0,00±0,00	0,000	2,19x10 ⁻²
1	1,22 ₈ ±0,07 ₅	0,010	1,03x10 ⁻²
2	3,07±0,1 ₁	0,038	5,81x10 ⁻³
3	6,14±0,1 ₁	0,098	1,17x10 ⁻²
4	9,82±0,2 ₁	0,152	7,23x10 ⁻⁴
5	17,19±0,4 ₁	0,292	1,08x10 ⁻²
6	24,56±0,3 ₁	0,400	-1,11x10 ⁻²
7	36,84±0,4 ₆	0,597	-3,06x10 ⁻²
8	49,12±0,5 ₄	0,822	-2,21x10 ⁻²
9	73,68±0,8 ₁	1,239	-3,82x10 ⁻²
10	122,80±0,9 ₃	2,184	4,07x10 ⁻²
11	245,7±1,5	**	-

Tabela A49- Absorvências do branco fortificado para estimativa do limite de detecção e quantificação para o método Hipoclorito.

Branco	Sinal
1	-0,001
2	0,002
3	-0,003
4	0,004
5	0,006
6	0,004
7	-0,003
8	-0,004
9	-0,002
10	0,003
11	0,008
12	0,007
13	0,003
14	0,009
15	-0,002
16	0,007
17	-0,004
18	0,004
19	0,004
20	0,005
Média	0,00235
Desvio padrão^{d)}	0,0042
LD_{Sb} (ppm)^{l)}	0,74
LQ_{Sb} (ppm)^{l)}	2,48

Tabela A50 – Variação das absorvências das soluções padrão ao longo de 120 horas para o método Hipoclorito.

Soluções	C_{GBP±e_c} (ppm)^{l)}	0 horas	4 horas	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas	120 horas
Branco	0,0 ₀ ±0,0 ₀	0,000	0,001	0,002	0,000	0,001	0,001	0,000
1	1,22 ₈ ±0,07 ₅	0,010	0,012	0,020	0,017	0,011	0,007	0,003
2	3,07 ₇ ±0,1 ₁	0,038	0,039	0,039	0,038	0,030	0,011	0,007
3	6,14 ₄ ±0,1 ₁	0,098	0,099	0,102	0,101	0,087	0,075	0,055
4	9,82 ₂ ±0,2 ₁	0,152	0,154	0,211	0,162	0,111	0,099	0,087
5	17,19 ₉ ±0,4 ₁	0,292	0,295	0,376	0,309	0,198	0,155	0,332
6	24,56 ₆ ±0,3 ₁	0,400	0,402	0,523	0,421	0,284	0,145	0,323
7	36,84 ₄ ±0,4 ₆	0,597	0,599	0,746	0,622	0,445	0,467	0,405
8	49,12 ₂ ±0,5 ₄	0,822	0,831	1,004	0,852	0,721	0,466	0,691
9	73,68 ₈ ±0,8 ₁	1,239	1,244	1,539	1,345	0,942	0,673	0,723
10	122,80 ₀ ±0,9 ₃	2,184	2,230	2,992	2,193	1,643	0,955	0,653
11	245,7 ₇ ±1,5	**	**	**	**	**	1,542	2,025

Tabela A51- Preparação das soluções para estimar a precisão do método Hipoclorito.

Recuperação	V_{soluçãostock±e_{pipeta}}(mL)	V_{Balão±e_{Balão}}(mL)	Conc_{GBP±e_c} (ppm)^{l)}
1	0,300±0,004	25,00±0,03	7,37±0,2 ₀
2	1,000±0,008	25,00±0,03	24,56±0,4 ₀
3	2,00±0,01	25,00±0,03	49,12±0,5 ₁

Tabela A52- Coeficiente de variação e erro relativo para ensaios efetuados dentro do mesmo dia para o método Hipoclorito.

Ensaio dentro do mesmo dia (N=6)						
Ensaio	$C_{GBPesperada} \pm ec$ (ppm) ^{j)}	Abs 588nm	$C_{GBP} \pm ec$ (ppm) ^{o)}	SD ^{d)}	RSD (%) ^{e)}	RE (%) ^{f)}
1	7,37±0,2 ₀	0,116	7,4±1,3	0,072	0,959	1,651
2		0,118	7,5±1,3			
3		0,117	7,5±1,3			
4		0,118	7,5±1,3			
5		0,119	7,6±1,3			
6		0,116	7,4±1,3			
Média		0,117	7,5±1,3			
Ensaio	$C_{GBPesperada} \pm ec$ (ppm) ^{j)}	Abs 588nm	$C_{GBP} \pm ec$ (ppm) ^{o)}	SD ^{d)}	RSD (%) ^{e)}	RE (%) ^{f)}
1	24,56±0,4 ₀	0,404	24,5±1,3	0,062	0,255	-0,647
2		0,402	24,4±1,3			
3		0,401	24,3±1,3			
4		0,403	24,4±1,3			
5		0,402	24,4±1,3			
6		0,403	24,4±1,3			
Média		0,403	24,4±1,3			
Ensaio	$C_{GBPesperada} \pm ec$ (ppm) ^{j)}	Abs 588nm	$C_{GBP} \pm ec$ (ppm) ^{o)}	SD ^{d)}	RSD (%) ^{e)}	RE (%) ^{f)}
1	49,12±0,5 ₁	0,832	49,9±1,3	0,072	0,144	1,451
2		0,830	49,8±1,3			
3		0,832	49,9±1,3			
4		0,833	50,0±1,3			
5		0,831	49,8±1,3			
6		0,830	49,8±1,3			
Média		0,831	49,9±1,3			

Tabela A53- Coeficiente de variação e erro relativo para ensaios efetuados em dias alternados para o método Hipoclorito.

Ensaio em dias alternados (N=4)						
Ensaio	$C_{GBPesperada} \pm ec$ (ppm) ^{j)}	Abs 588nm	$C_{GBP} \pm ec$ (ppm) ^{o)}	SD ^{d)}	RSD (%) ^{e)}	RE (%) ^{f)}
Dia 1	7,37±0,2 ₀	0,116	7,4±1,3	0,077	1,021	1,785
Dia 2		0,117	7,5±1,3			
Dia 3		0,119	7,6±1,3			
Dia 4		0,118	7,5±1,3			
Média		0,118	7,5±1,3			
Ensaio	$C_{GBPesperada} \pm ec$ (ppm) ^{j)}	Abs 588nm	$C_{GBP} \pm ec$ (ppm) ^{o)}	SD ^{d)}	RSD (%) ^{e)}	RE (%) ^{f)}
Dia 1	24,56±0,4 ₀	0,404	24,5±1,3	0,048	0,198	-0,285
Dia 2		0,403	24,4±1,3			
Dia 3		0,404	24,5±1,3			
Dia 4		0,405	24,6±1,3			
Média		0,404	24,5±1,3			
Ensaio	$C_{GBPesperada} \pm ec$ (ppm) ^{j)}	Abs 588nm	$C_{GBP} \pm ec$ (ppm) ^{o)}	SD ^{d)}	RSD (%) ^{e)}	RE (%) ^{f)}
Dia 1	49,12±0,5 ₁	0,831	49,8±1,3	0,048	0,097	1,290
Dia 2		0,830	49,8±1,3			
Dia 3		0,830	49,8±1,3			
Dia 4		0,829	49,7±1,3			
Média		0,830	49,8±1,3			

Tabela A54- Preparação das soluções fortificadas para a estimativa das recuperações do método Hipoclorito.

Ensaio recuperação	V _{solução Intermedia} ±e _{pipeta} (mL)	V _{amostra} ±e _{pipeta} (mL)	V _{Balão} ±e _{Balão} (mL)	C _{GBPesperada} ±e _c (ppm) ^{j)}
1	0,300±0,004	0,100±0,003	25,00±0,03	7,68±0,7 ₈
2	0,300±0,004	0,300±0,004	25,00±0,03	15,7±1,4
3	0,300±0,004	0,900±0,008	25,00±0,03	39,7±3,3

Tabela A55- Ensaios de recuperação e respetivo desvio padrão para o método Hipoclorito.

Recuperação	C _{GBPesperada} ±ec (ppm) ^{j)}	Abs 588nm	C _{GBP} ±ec (ppm) ^{o)}	Recuperação (%) ^{m)}	SD ^{d)}
1	7,68±0,7 ₈	0,121	7,7±1,3	100,63	1,689
2		0,120	7,6±1,3	99,02	
3		0,12	7,6±1,3	99,02	
4		0,122	7,8±1,3	102,24	
5		0,121	7,7±1,3	100,63	
6		0,119	7,6±1,3	97,41	
Média		0,121	7,7±1,3	99,82	
Recuperação	C _{GBPesperada} ±ec (ppm) ^{j)}	Abs 588nm	C _{GBP} ±ec (ppm) ^{o)}	Recuperação (%) ^{m)}	SD ^{d)}
1	15,7±1,4	0,255	15,7±1,3	99,18	1,689
2		0,254	15,6±1,3	97,57	
3		0,256	15,7±1,3	100,79	
4		0,257	15,8±1,3	102,40	
5		0,256	15,7±1,3	100,79	
6		0,255	15,7±1,3	99,18	
Média		0,256	15,7±1,3	99,99	
Recuperação	C _{GBPesperada} ±ec (ppm) ^{j)}	Abs 588nm	C _{GBP} ±ec (ppm) ^{o)}	Recuperação (%) ^{m)}	SD ^{d)}
1	39,7±3,3	0,661	39,7±1,3	101,28	2,820
2		0,663	39,8±1,3	104,50	
3		0,660	39,7±1,3	99,673	
4		0,659	39,6±1,3	98,06	
5		0,661	39,7±1,3	101,28	
6		0,658	39,6±1,3	96,45	
Média		0,660	39,7±1,3	100,21	

Tabela A56 – Determinação do teor de gabapentina nas diversas cápsulas pelo método Hipoclorito.

Gabomox [®]	Abs 588nm	C _{GBP±ec} (ppm) ^{o)}	C _{StockAmostra±ec} (ppm) ^{j)}	Teor _{GBP±ec} (mg) ^{j)}	SD ^{d)}	RSD (%) ^{e)}
1	0,331	20,2±1,3	100,8±5 ₅	100,80±0,2 ₉	0,519	0,514
2	0,332	20,2±1,3	101,1±5 ₅	101,10±0,2 ₉		
3	0,329	20,0±1,3	100,2±5 ₅	100,21±0,2 ₉		
4	0,331	20,2±1,3	100,8±5 ₅	100,80±0,2 ₉		
5	0,334	20,3±1,3	101,7±5 ₅	101,69±0,2 ₉		
6	0,333	20,3±1,3	101,5±5 ₅	101,40±0,2 ₉		
Média	0,332	20,2±1,3	101,0±5 ₅	101,00±0,2 ₉		
Neurotin [®]	Abs 588nm	C _{GBP±ec} (ppm) ^{o)}	C _{StockAmostra±ec} (ppm) ^{j)}	Teor _{GBP±ec} (mg) ^{j)}	SD ^{d)}	RSD (%) ^{e)}
1	0,333	20,3±1,3	101,4±5 ₅	101,40±0,2 ₉	0,484	0,480
2	0,332	20,2±1,3	101,1±5 ₅	101,10±0,2 ₉		
3	0,331	20,2±1,3	100,8±5 ₅	100,80±0,2 ₉		
4	0,329	20,0±1,3	100,2±5 ₅	100,21±0,2 ₉		
5	0,330	20,1±1,3	100,5±5 ₅	100,51±0,2 ₉		
6	0,333	20,3±1,3	101,4±5 ₅	101,40±0,2 ₉		
Média	0,331	20,2±1,3	100,9±5 ₅	100,90±0,2 ₉		
Ratiopharm	Abs 588nm	C _{GBP±ec} (ppm) ^{o)}	C _{StockAmostra±ec} (ppm) ^{j)}	Teor _{GBP±ec} (mg) ^{j)}	SD ^{d)}	RSD (%) ^{e)}
1	0,328	20,0±1,3	99,9±5 ₅	99,92±0,2 ₉	0,519	0,516
2	0,331	20,2±1,3	100,8±5 ₅	100,80±0,2 ₉		
3	0,333	20,3±1,3	101,4±5 ₅	101,40±0,2 ₉		
4	0,330	20,1±1,3	100,5±5 ₅	100,51±0,2 ₉		
5	0,329	20,0±1,3	100,2±5 ₅	100,21±0,2 ₉		
6	0,331	20,2±1,3	100,8±5 ₅	100,80±0,2 ₉		
Média	0,330	20,1±1,3	100,6±5 ₅	100,61±0,2 ₉		
Teva	Abs 588nm	C _{GBP±ec} (ppm) ^{o)}	C _{StockAmostra±ec} (ppm) ^{j)}	Teor _{GBP±ec} (mg) ^{j)}	SD ^{d)}	RSD (%) ^{e)}
1	0,329	20,0±1,3	100,2±5 ₅	100,21±0,2 ₉	0,459	0,461
2	0,328	20,0±1,3	99,9±5 ₅	99,92±0,2 ₉		
3	0,328	20,0±1,3	99,9±5 ₅	99,92±0,2 ₉		
4	0,326	19,9±1,3	99,3±5 ₅	99,32±0,2 ₉		
5	0,325	19,8±1,3	99,0±5 ₅	99,03±0,2 ₉		
6	0,326	19,9±1,3	99,3±5 ₅	99,32±0,2 ₉		
Média	0,327	19,9±1,3	99,6±5 ₅	99,62±0,2 ₉		
Generis	Abs 588nm	C _{GBP±ec} (ppm) ^{o)}	C _{StockAmostra±ec} (ppm) ^{j)}	Teor _{GBP±ec} (mg) ^{j)}	SD ^{d)}	RSD (%) ^{e)}
1	0,331	20,2±1,3	100,8±5 ₅	100,80±0,2 ₉	0,783	0,774
2	0,334	20,3±1,3	101,7±5 ₅	101,69±0,2 ₉		
3	0,335	20,4±1,3	102,0±5 ₅	101,99±0,2 ₉		
4	0,331	20,2±1,3	100,8±5 ₅	100,80±0,2 ₉		
5	0,334	20,3±1,3	101,7±5 ₅	101,69±0,2 ₉		
6	0,328	20,0±1,3	99,9±5 ₅	99,92±0,2 ₉		
Média	0,332	20,2±1,3	101,2±5 ₅	101,15±0,2 ₉		

Tabela A57- Preparação das soluções *Stock* e *Intermédia* para o método NBD-Cl.

Solução	Modo preparação		
<i>Stock</i>	Massa _{GBPpura±e_m} (mg)	V _{Balão±eBalão} (mL)	C _{GBP±ec} (ppm) ^{j)}
	61,4±0,1	100,0±0,1	614,0±2,3
<i>Intermédia</i>	V _{solução stock±e_{pipeta}} (mL)	V _{Balão±eBalão} (mL)	C _{GBP±ec} (ppm) ^{j)}
	10,00±0,02	20,00±0,04	307,0±2,1

Tabela A58- Preparação do tampão borato e reagente NBD-Cl.

Tampão borato					
	Massa±e_m (mg)	V_{Balão±e_{Balão}} (mL)	Conc (M)ⁱ⁾	Volume	pH
Ácido bórico	1240,0±0,1	100,0±0,1	0,20	100	7,1
Tetraborato de sódio	1900,0±0,1	100,0±0,1	0,05	10	
Reagente NBD-Cl					
	Massa±e_m (mg)	V_{Balão±e_{Balão}} (mL)	Solvente	Conc (mg/mL)ⁱ⁾	
NBD-Cl	80,0±0,1	100,0±0,1	Metanol	0,8	

Tabela A59- Preparação das soluções padrão para o método NBD-Cl.

Método NBD-Cl						
Soluções	V_{solução stock±e_{pipeta}} (mL)	Solução	V_{NBD-Cl±e_{Balão}} (mL)	V_{Tampão±e_{Balão}} (mL)	V_{Balão±e_{Balão}} (mL)	C_{GBP±ec} (ppm)^{j)}
Branco	0,000±0,000	-	5,000±0,015	10,00±0,02	25,00±0,03	0,0 ₀ ±0,0 ₀
1	0,100±0,003	<i>Intermédia</i>	5,000±0,015	10,00±0,02	25,00±0,03	1,22 ₉ ±0,07 ₅
2	0,200±0,003	<i>Intermédia</i>	5,000±0,015	10,00±0,02	25,00±0,03	2,45 ₆ ±0,07 ₆
3	0,300±0,004	<i>Intermédia</i>	5,000±0,015	10,00±0,02	25,00±0,03	3,68±0,1 ₁
4	0,400±0,004	<i>Intermédia</i>	5,000±0,015	10,00±0,02	25,00±0,03	4,91±0,1 ₁
5	0,500±0,004	<i>Intermédia</i>	5,000±0,015	10,00±0,02	25,00±0,03	6,14±0,1 ₁
6	0,600±0,008	<i>Intermédia</i>	5,000±0,015	10,00±0,02	25,00±0,03	7,37±0,2 ₁
7	0,900±0,008	<i>Intermédia</i>	5,000±0,015	10,00±0,02	25,00±0,03	11,0 ₅ ±0,2 ₂
8	0,800±0,008	<i>Stock</i>	5,000±0,015	10,00±0,02	25,00±0,03	19,6 ₅ ±0,4 ₁
9	2,00±0,01	<i>Intermédia</i>	5,000±0,015	10,00±0,02	25,00±0,03	24,5 ₆ ±0,3 ₀
10	2,00±0,01	<i>Stock</i>	5,000±0,015	10,00±0,02	25,00±0,03	49,1 ₂ ±0,5 ₃
11	3,000±0,015	<i>Stock</i>	5,000±0,015	10,00±0,02	25,00±0,03	73,6 ₈ ±0,8 ₀
12	5,000±0,015	<i>Stock</i>	5,000±0,015	10,00±0,02	25,00±0,03	122,8 ₀ ±0,8 ₉

Tabela A60- Intensidade de fluorescência das soluções padrão e respectivos residuais para o método NBD-Cl.

Padrões	C_{GBP±ec} (ppm)^{j)}	IF	Residuais^{d)}
Branco	0,0 ₀ ±0,0 ₀	-0,081	-5,29
1	1,22 ₉ ±0,07 ₅	2,546	-4,33
2	2,45 ₆ ±0,07 ₆	4,674	-3,88
3	3,68±0,1 ₁	6,784	-3,44
4	4,91±0,1 ₁	8,419	-3,47
5	6,14±0,1 ₁	10,021	-3,54
6	7,37±0,2 ₁	12,995	-2,23
7	11,0 ₅ ±0,2 ₂	21,654	-0,58
8	19,6 ₅ ±0,4 ₁	34,792	-0,13
9	24,5 ₆ ±0,3 ₀	44,691	6,09
10	49,1 ₂ ±0,5 ₃	87,086	15,09
11	73,6 ₈ ±0,8 ₀	125,105	19,71
12	122,8 ₀ ±0,8 ₉	153,192	-18,99

A61- Absorvências do branco fortificado para estimativa do limite de detecção e quantificação para o método NBD-Cl.

Branco	Sinal
1	0,133
2	-0,470
3	-0,990
4	0,271
5	0,412
6	0,069
7	-0,502
8	-0,213
9	-0,314
10	0,075
11	-0,123
12	0,075
13	0,149
14	-0,169
15	-0,029
16	-0,310
17	-0,146
18	-0,012
19	0,388
20	0,082
Média	-0,0812
Desvio padrão^{d)}	0,3312
LD_{Sb} (ppm)^{j)}	0,56
LQ_{Sb} (ppm)^{j)}	1,86

Tabela A62 – Variação da absorvência das soluções padrão ao longo de 120 horas para o método NBD-Cl.

NBD-Cl								
Soluções	C_{GBP±e_c} (ppm)^{j)}	0 horas	4 horas	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas	120 horas
Branco	0,0 _{0±0,0} ₀	-0,081	-0,012	-0,015	-0,005	-0,011	-0,015	-0,009
1	1,22 _{9±0,07} ₅	2,546	2,731	2,643	2,534	2,594	2,654	2,714
2	2,45 _{6±0,07} ₆	4,674	4,973	4,623	4,673	4,985	4,635	4,685
3	3,6 _{8±0,1} ₁	6,784	6,887	6,813	6,811	6,844	6,947	6,873
4	4,91 _{±0,1} ₁	8,419	8,532	8,542	8,341	8,401	8,461	8,521
5	6,1 _{4±0,1} ₁	10,021	10,723	10,345	10,320	10,735	10,357	10,332
6	7,3 _{7±0,2} ₁	12,995	13,235	13,330	13,323	13,055	13,295	13,390
7	11,0 _{5±0,2} ₂	21,654	22,713	21,943	21,567	21,627	21,687	21,747
8	19,6 _{5±0,4} ₁	34,792	35,091	34,561	35,012	35,103	34,573	35,024
9	24,5 _{6±0,3} ₀	44,691	45,343	44,754	44,562	44,751	45,403	44,814
10	49,1 _{2±0,5} ₃	87,086	87,918	87,765	88,132	88,192	88,252	88,312
11	73,6 _{8±0,8} ₀	113,105	114,542	114,140	113,832	114,554	114,156	113,844
12	122,8 _{0±0,8} ₉	160,192	157,512	159,870	160,300	160,252	157,572	159,925

Tabela A63- Preparação das soluções para estimar a precisão do método NBD-Cl.

Recuperação	V_{soluçãostock±e_{pipeta}} (mL)	V_{Balão±e_{Balão}} (mL)	Conc_{GBP±ec} (ppm)^{j)}
1	0,200±0,003	25,00±0,03	4,9 _{1±0,1} ₅
2	0,800±0,008	25,00±0,03	19,6 _{5±0,4} ₁
Recuperação	V_{soluçãoIntermédia±e_{pipeta}} (mL)	V_{Balão±e_{Balão}} (mL)	Conc_{GBP±ec} (ppm)^{j)}
3	3,000±0,015	25,00±0,03	36,8 _{4±0,4} ₅

Tabela A64- Coeficiente de variação e erro relativo para ensaios efetuados dentro do mesmo dia para o método NBD-CI.

Ensaio realizado no mesmo dia (N=6)						
Ensaio	$C_{GBPesperada} \pm ec$ (ppm) ^{j)}	IF	$C_{GBP} \pm ec$ (ppm) ^{o)}	SD ^{d)}	RSD (%) ^{e)}	RE (%) ^{f)}
1	36,84±0,4 ₅	66,532	37,3±1,3	0,125	0,334	1,569
2		66,958	37,5±1,3			
3		66,934	37,5±1,3			
4		66,412	37,2±1,3			
5		66,846	37,5±1,3			
6		66,745	37,4±1,3			
Média		66,739	37,4±1,3			
Ensaio	$C_{GBPesperada} \pm ec$ (ppm) ^{j)}	IF	$C_{GBP} \pm ec$ (ppm) ^{o)}	SD ^{d)}	RSD (%) ^{e)}	RE (%) ^{f)}
1	19,65±0,4 ₁	35,435	19,8±1,1	0,196	0,987	0,964
2		35,578	19,9±1,1			
3		34,956	19,5±1,1			
4		35,874	20,1±1,1			
5		35,201	19,7±1,1			
6		35,776	20,0±1,1			
Média		35,470	19,8±1,1			
Ensaio	$C_{GBPesperada} \pm ec$ (ppm) ^{j)}	IF	$C_{GBP} \pm ec$ (ppm) ^{o)}	SD ^{d)}	RSD (%) ^{e)}	RE (%) ^{f)}
1	4,91±0,1 ₅	9,153	5,0±1,1	0,042	0,835	2,195
2		9,199	5,1±1,1			
3		9,174	5,1±1,1			
4		9,001	5,0±1,1			
5		9,109	5,0±1,1			
6		9,062	5,0±1,1			
Média		9,116	5,0±1,1			

Tabela A65- Coeficiente de variação e erro relativo para ensaios em dias alternados para o método NBD-CI.

Ensaio em dias alternados (N=4)						
Ensaio	$C_{GBPesperada} \pm ec$ (ppm) ^{j)}	IF	$C_{GBP} \pm ec$ (ppm) ^{o)}	SD ^{d)}	RSD (%) ^{e)}	RE (%) ^{f)}
Dia 1	36,84±0,4 ₅	65,946	37,0±1,3	0,177	0,477	0,710
Dia 2		66,587	37,3±1,3			
Dia 3		65,913	37,0±1,3			
Dia 4		66,254	37,1±1,3			
Média		66,175	37,1±1,3			
Ensaio	$C_{GBPesperada} \pm ec$ (ppm) ^{j)}	IF	$C_{GBP} \pm ec$ (ppm) ^{o)}	SD ^{d)}	RSD (%) ^{e)}	RE (%) ^{f)}
Dia 1	19,65±0,4 ₁	35,686	20,0±1,1	0,080	0,401	1,426
Dia 2		35,454	19,8±1,1			
Dia 3		35,789	20,0±1,1			
Dia 4		35,596	19,9±1,1			
Média		35,631	19,9±1,1			
Ensaio	$C_{GBPesperada} \pm ec$ (ppm) ^{j)}	IF	$C_{GBP} \pm ec$ (ppm) ^{o)}	SD ^{d)}	RSD (%) ^{e)}	RE (%) ^{f)}
Dia 1	4,91±0,1 ₅	9,221	5,1±1,1	0,006	0,127	3,207
Dia 2		9,204	5,1±1,1			
Dia 3		9,199	5,1±1,1			
Dia 4		9,195	5,1±1,1			
Média		9,205	5,1±1,1			

Tabela A66- Preparação das soluções fortificadas para a estimativa das recuperações do método NBD-Cl.

Ensaio recuperação	V _{solução} ±e _{pipeta} (mL)	V _{amostra} ±e _{pipeta} (mL)	V _{Balão} ±e _{Balão} (mL)	C _{GBPesperada} ±e _c (ppm) ^{j)}
1	0,300±0,004	0,100±0,003	25,00±0,03	7,68±0,5 ₂
2	0,300±0,004	0,300±0,004	25,00±0,03	15,68±0,6 ₁
3	0,300±0,004	0,950±0,008	25,00±0,03	41,7±1,4

Tabela A67- Ensaios de recuperação e respetivo desvio padrão para o método NBD-Cl.

Recuperação	C _{GBPesperada} ±e _c (ppm) ^{j)}	IF	C _{GBP} ±e _c (ppm) ^{o)}	Recuperação (%) ^{m)}	SD ^{d)}
1	41,7±1,4	74,345	41,7±1,3	100,31	2,260
2		74,564	41,8±1,3	103,65	
3		74,241	41,6±1,3	98,72	
4		74,325	41,7±1,3	100,00	
5		74,176	41,6±1,3	97,73	
6		74,496	41,8±1,3	102,61	
Média		74,358	41,7±1,3	100,51	
Recuperação	C _{GBPesperada} ±e _c (ppm) ^{j)}	IF	C _{GBP} ±e _c (ppm) ^{o)}	Recuperação (%) ^{m)}	SD ^{d)}
1	15,68±0,6 ₁	27,934	15,6±1,1	97,73	1,452
2		28,032	15,7±1,1	99,22	
3		27,946	15,6±1,1	97,91	
4		28,084	15,7±1,1	100,02	
5		28,187	15,7±1,1	101,59	
6		27,992	15,6±1,1	98,61	
Média		28,029	15,7±1,1	99,18	
Recuperação	C _{GBPesperada} ±e _c (ppm) ^{j)}	IF	C _{GBP} ±e _c (ppm) ^{o)}	Recuperação (%) ^{m)}	SD ^{d)}
1	7,68±0,5 ₂	13,732	7,6±1,1	98,13	1,098
2		13,824	7,7±1,1	99,53	
3		13,878	7,7±1,1	100,36	
4		13,842	7,7±1,1	99,81	
5		13,904	7,7±1,1	100,75	
6		13,735	7,6±1,1	98,17	
Média		13,819	7,7±1,1	99,46	

Tabela A68- Preparação método adição de padrão para o método NBD-Cl, concentração e intensidade de fluorescência de cada padrão.

Solução	V _{solução} ±e _{pipeta} (mL)	Solução	V _{Stock} ±e _{pipeta} (mL)	V _{Balão} ±e _{Balão} (mL)	C _{GBP} ±e _c (ppm) ^{j)}	IF
Branco	0,000±0,000	-	0,100±0,003	25,00±0,03	21,2±1,4	38,043
1	0,100±0,003	Intermédia	0,100±0,003	25,00±0,03	22,5±2,0	40,005
2	0,200±0,003	Intermédia	0,100±0,003	25,00±0,03	23,7±1,7	42,475
3	0,300±0,004	Intermédia	0,100±0,003	25,00±0,03	24,9±1,7	44,641
4	0,400±0,004	Intermédia	0,100±0,003	25,00±0,03	26,1±1,8	46,063
5	0,500±0,004	Intermédia	0,100±0,003	25,00±0,03	27,4±1,8	49,612
6	0,600±0,008	Intermédia	0,100±0,003	25,00±0,03	31,1±2,2	51,043
7	0,900±0,008	Intermédia	0,100±0,003	25,00±0,03	39,6±2,6	58,218
8	0,800±0,008	Stock	0,100±0,003	25,00±0,03	44,6±2,9	74,647
9	2,00±0,01	Intermédia	0,100±0,003	25,00±0,03	69,1±4,3	83,605
10	2,00±0,01	Stock	0,100±0,003	25,00±0,03	93,7±5,8	126,066

Tabela A69 – Determinação do teor de gabapentina nas cápsulas pelo método NBD-Cl.

Gabomox[®]	IF	C_{GBP±ec} (ppm)^o	C_{StockAmostra±ec}(ppm)^j	Teor_{GBP±ec} (mg)^j	SD^d	RSD (%)^e
1	35,714	20,1±1,2	99,9±5,1	99,87±0,2,9		
2	36,124	20,4±1,2	101,1±5,2	101,03±0,2,9		
3	35,667	19,9±1,2	99,7±5,1	99,74±0,2,9		
4	35,956	20,1±1,2	100,6±5,2	100,55±0,2,9	0,725	0,722
5	36,342	20,3±1,2	101,6±5,2	101,64±0,2,9		
6	35,832	20,0±1,2	100,2±5,1	100,21±0,2,9		
Média	35,939	20,1±1,2	100,5±5,2	100,51±0,2,9		
Neurotin[®]	IF	C_{GBP±ec} (ppm)^o	C_{StockAmostra±ec}(ppm)^j	Teor_{GBP±ec} (mg)^j	SD^d	RSD (%)^e
1	36,043	20,2±1,2	100,8±5,2	100,80±0,2,9		
2	35,379	19,8±1,2	98,9±5,1	98,93±0,2,8		
3	35,784	20,0±1,2	100,1±5,1	100,07±0,2,9		
4	35,865	20,1±1,2	100,3±5,1	100,30±0,2,9	0,864	0,867
5	35,564	19,9±1,2	99,5±5,1	99,45±0,2,9		
6	35,234	19,7±1,2	98,5±5,1	98,52±0,2,8		
Média	35,645	19,9±1,2	99,7±5,1	99,68±0,2,9		
Ratiopharm	IF	C_{GBP±ec} (ppm)^o	C_{StockAmostra±ec}(ppm)^j	Teor_{GBP±ec} (mg)^j	SD^d	RSD (%)^e
1	35,843	20,0±1,2	100,2±5,1	100,24±0,2,9		
2	35,479	19,8±1,2	99,2±5,1	99,21±0,2,9		
3	35,932	20,1±1,2	100,5±5,2	100,49±0,2,9		
4	35,832	20,0±1,2	100,2±5,1	100,21±0,2,9	0,659	0,656
5	36,164	20,2±1,2	101,1±5,2	101,14±0,2,9		
6	36,043	20,2±1,2	100,8±5,2	100,80±0,2,9		
Média	35,882	20,1±1,2	100,3±5,1	100,35±0,2,9		
Teva	IF	C_{GBP±ec} (ppm)^o	C_{StockAmostra±ec}(ppm)^j	Teor_{GBP±ec} (mg)^j	SD^d	RSD (%)^e
1	35,242	19,7±1,2	98,5±5,1	98,55±0,2,8		
2	35,873	20,1±1,2	100,3±5,1	100,32±0,2,9		
3	34,675	19,4±1,2	97,0±5,1	96,95±0,2,8		
4	35,542	19,9±1,2	99,4±5,1	99,39±0,2,9	1,334	1,354
5	34,721	19,4±1,2	97,1±5,1	97,08±0,2,8		
6	35,456	19,8±1,2	99,1±5,1	99,15±0,2,9		
Média	35,252	19,7±1,2	98,6±5,1	98,57±0,2,8		
Generis	IF	C_{GBP±ec} (ppm)^o	C_{StockAmostra±ec}(ppm)^j	Teor_{GBP±ec} (mg)^j	SD^d	RSD (%)^e
1	35,993	20,1±1,2	100,7±5,2	100,66±0,2,9		
2	36,312	20,3±1,2	101,6±5,2	101,55±0,2,9		
3	36,189	20,2±1,2	101,2±5,2	101,21±0,2,9		
4	35,899	20,1±1,2	100,4±5,2	100,39±0,2,9	1,127	1,113
5	36,966	20,7±1,2	103,4±5,2	103,39±0,3,0		
6	35,932	20,1±1,2	100,5±5,2	100,49±0,2,9		
Média	36,443	20,3±1,2	101,3±5,2	101,28±0,2,9		

Tabela A70- Médias dos teores de gabapentina obtidos para as diferentes cápsulas e métodos.

Cápsulas	Volumetria		Métodos de derivatização			Sem derivatização	Média±SD (mg)^d
	Titulação NaOH	Titulação HCl	Método Vanilina	Método Hipoclorito	Método NBD-Cl	Método Direto	
	Teor_{GBP±SD} (mg)^o	Teor_{GBP±SD} (mg)^o	Teor_{GBP±ec} (mg)^o	Teor_{GBP±ec} (mg)^o	Teor_{GBP±ec} (mg)^o	Teor_{GBP±ec} (mg)^o	
Gabomox[®]	106,7±1,2	101,2±1,2	99,90±0,2,9	101,00±0,2,9	100,51±0,2,9	99,54±0,2,9	101,5±2,6
Neurotin[®]	96,8±1,2	98,6±1,1	100,34±0,2,9	100,90±0,2,9	99,68±0,2,9	98,88±0,2,8	99,2±1,4
Ratiopharm	96,35±0,5,0	96,9±2,2	100,05±0,2,9	100,61±0,2,9	100,35±0,2,9	97,90±0,2,8	98,7±1,9
Teva	94,95±0,8,9	97,36±0,5,4	100,05±0,2,9	99,62±0,2,9	98,57±0,2,9	98,23±0,2,8	98,1±1,8
Generis	105,9±1,1	106,7±1,7	101,50±0,2,9	101,15±0,2,9	101,28±0,2,9	101,17±0,2,9	102,9±2,6
Média±SD (mg)^d	100,1±5,7	100,2±4,0	100,37±0,6,6	100,66±0,6,1	100,0±1,1	99,1±1,3	

Anexo de equações

a) $y = mx + b$, quando $y=0$, entre o valor máximo e mínimo de $\Delta pH^2 / \Delta V^2$

b) $C_a V_a = C_b V_b$

c) $\text{Teor} = \text{Conc}_{\text{GBP}} \times M_{\text{molecular}} \times V_{\text{titulante}}$

d) Desvio padrão: $s = \sqrt{\frac{\sum x_i^2 - \frac{1}{n}(\sum x_i)^2}{n - 1}}$

e) Coeficiente de variação (RSD) $\text{---} \times 100 \%$; $\text{RSD}_{\text{Horwitz}} = 2^{(1-0,5 \log C)}$

f) Erro absoluto (ER) = $\text{---} \times 100 \%$

g) $t_{\text{calculado}}: t = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{S_{X_1 X_2} \cdot \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}}$

h) $F = \frac{s_1^2}{s_2^2}$

i) Cálculo da concentração e erro associado à solução *Stock e Intermédia*:

$$\frac{\text{---}}{\text{---}}$$

j) Cálculo da concentração e erro das concentrações das soluções padrão: $C_a V_a = C_b V_b$

$$\frac{\text{---}}{\text{---}}$$

k) Expressões utilizadas para o cálculo dos parâmetros da reta pelo método dos mínimos quadrados:

$$S_{xx} = \sum (x_i - \bar{x})^2 = \sum x_i^2 - \frac{(\sum x_i)^2}{N}$$

$$S_{yy} = \sum (y_i - \bar{y})^2 = \sum y_i^2 - \frac{(\sum y_i)^2}{N}$$

$$S_{xy} = \sum (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y}) = \sum x_i y_i - \frac{(\sum x_i)(\sum y_i)}{N}$$

$$m = \frac{S_{xy}}{S_{xx}}$$

$$b = \bar{y} - m \cdot \bar{x}$$

$$s_m = \frac{s_y}{\sqrt{S_{xx}}}$$

$$s_b = s_y \cdot \sqrt{\frac{\sum x_i^2}{N \cdot \sum x_i^2 - (\sum x_i)^2}} = s_y \cdot \sqrt{\frac{1}{N - \frac{(\sum x_i)^2}{\sum x_i^2}}}$$

$$s_y = \sqrt{\frac{\sum (y_i - \hat{y}_i)^2}{N-2}} = \sqrt{\frac{S_{yy} - m^2 \cdot S_{xx}}{N-2}}$$

l) Cálculo dos parâmetros de avaliação do método:

$$L_{DSr} = \frac{3s_y}{m}; L_{Qsr} = \frac{10s_y}{m}; L_{DSb} = \frac{3s_b}{m}; L_{Qsb} = \frac{10s_b}{m}; GD = \frac{LL}{1.0};$$

$$r = \frac{S_{xy}}{\sqrt{S_{xx} \cdot S_{yy}}}$$

m) Ensaio de recuperação (%) _____ x 100 %

n) Cálculo da concentração da solução de amostra pelo método da adição de padrão e erro das concentrações:

$$\text{Conc}_{\text{amostra}} \quad \text{---}; \quad e_{\text{conc}} = s_c = \frac{s_y}{m} \sqrt{\frac{1}{N} + \frac{(x_c - \bar{y})^2}{m^2 \cdot S_{xx}}}$$

o) Cálculo da concentração da solução de amostra pelo método da reta de calibração e erro das concentrações:

$$\text{Conc}_{\text{amostra}} \quad \text{---}; \quad e_{\text{conc}} = s_c = \frac{s_y}{m} \sqrt{\frac{1}{L} + \frac{1}{N} + \frac{(x_c - \bar{y})^2}{m^2 \cdot S_{xx}}}$$

p) Residuais: $y_{\text{obtido}} - y_{\text{eta}}$