



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Ema Sofia Trindade Rodrigues da Fonseca

**METODOLOGIA ANALÍTICA PARA ANÁLISE
DE GLUCOSAMINA POR HPLC E ANÁLISE
FÍSICO-QUÍMICA DE EDULCORANTES E
AÇÚCARES**

Relatório de Estágio no âmbito do Mestrado em Bioquímica, orientado pela
Doutora Cátia Pinto e pela Professora Doutora Paula Veríssimo e
apresentado ao Departamento de Ciências da Vida da Faculdade de Ciências
e Tecnologia da Universidade de Coimbra

Julho de 2022

Faculdade de Ciências e Tecnologia
da Universidade de Coimbra

Metodologia analítica para análise de glucosamina por HPLC e análise físico-química de edulcorantes e açúcares

Ema Sofia Trindade Rodrigues da Fonseca

Relatório de Estágio no âmbito do Mestrado em Bioquímica, apresentado ao Departamento de
Ciências da Vida da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra

Cátia Teixeira Pinto
Paula Cristina Veríssimo Pires

Julho de 2022



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Agradecimentos

Este Relatório de Estágio simboliza o culminar do meu percurso académico enquanto estudante da Universidade de Coimbra. Um percurso que me fez crescer imenso tanto a nível profissional como a nível pessoal e que não seria possível sem alguns dos intervenientes a quem aproveito para deixar o meu mais sincero obrigado.

Aos meus pais, irmã, avó e restante família, por apoiarem incondicionalmente as minhas decisões, por acreditarem sempre em mim quando eu própria não acredito. Agradeço e reconheço tudo o que fazem por mim e espero que estejam orgulhosos daquilo que juntos alcançámos.

À Professora Doutora Paula Veríssimo, enquanto minha orientadora, agradeço todo o apoio, disponibilidade e compreensão demonstrados ao longo deste percurso. Obrigada por me ter ajudado e aconselhado sempre da melhor forma.

À chefe do Controlo de Qualidade, Cátia Pinto, agradeço a oportunidade que me proporcionou de integrar a equipa do CQ da Labialfarma. Agradeço também o conhecimento transmitido e toda a disponibilidade demonstrada para me orientar e ajudar na realização do estágio.

A toda a equipa do Controlo de Qualidade por me terem acolhido tão bem, por me terem ensinado tanto e por todos os momentos divertidos que pudemos partilhar.

À comunidade Labialfarma pela fantástica integração e por me ter dado a conhecer algumas pessoas que passaram a ter um lugar na minha vida.

À minha colega de casa Ana, agradeço toda a preocupação demonstrada, companheirismo, amizade e ajuda que me deu ao longo destes meses. Obrigada, miga.

Agradeço também a todos os amigos que a cidade de Coimbra me deu e que sei que ficarão para a vida. Obrigada por estarem sempre do meu lado nos bons e nos maus momentos. Obrigada por todas as histórias vividas nesta cidade tão especial.

A todas as pessoas que foram cruzando o meu caminho e que de alguma forma contribuíram para a pessoa que sou hoje.

Por último, mas não menos importante, agradeço a mim própria por ter tido a coragem de reingressar no mestrado e por ter voltado a acreditar que sou capaz de cumprir o que quer que seja a que me proponha.

Resumo

Este relatório surge no âmbito do Estágio Curricular em Bioquímica e ocorreu em contexto laboratorial no Controlo de Qualidade (CQ) da Labialfarma, indústria farmacêutica e nutracêutica pertencente ao Ferraz Group.

Neste trabalho foram analisadas diferentes matérias-primas por métodos físico-químicos e cromatográficos. Foram escolhidas 8 matérias-primas distintas, das quais 3 são edulcorantes (sacarina sódica, manitol e maltitol), 2 são açúcares (lactose monoidratada e frutose) e as restantes são 3 fórmulas moleculares distintas de glucosamina. Todas elas foram analisadas por métodos físico-químicos, tais como a análise da solubilidade, a determinação do teor de água, a identificação por espectroscopia FTIR, entre outras técnicas que serão esclarecidas em detalhe ao longo do trabalho. O teor de glucosamina das 3 classes moleculares diferentes de glucosamina foi determinado por HPLC, utilizando um padrão de referência para a quantificação e seguindo condições cromatográficas definidas pelo CQ.

As matérias-primas são analisadas segundo procedimentos internos do laboratório que são elaborados de acordo com as monografias descritas nas Farmacopeias (europeia, americana ou britânica) para cada matéria-prima e que ditam os intervalos ou limites de aceitação em que se podem encontrar os resultados obtidos.

Todas as matérias-primas analisadas se encontraram dentro das especificações estipuladas para cada um dos ensaios realizados e, por isso, todas estavam em conformidade. Isto significa que foram aprovadas pelo CQ e que seguiram para serem usadas na produção de suplementos e/ou medicamentos.

Abstract

This report was written in the scope of the Curricular Internship in Biochemistry and had place in Labialfarma's Quality Control (QC) laboratory. Labialfarma is a pharmaceutical and nutraceutical company, being a member of Ferraz Group.

Different raw materials were analyzed by physicochemical and chromatographic methods. Eight different raw materials were selected, being that 3 were sweeteners (saccharin sodium, mannitol and maltitol), 2 were sugars (lactose monohydrate and fructose) and the other three were distinct molecular forms of glucosamine. All of them were assessed using physicochemical methods like solubility test, water content determination, identification by FTIR spectroscopy, among other techniques that will be discussed in detail along the next chapters.

The glucosamine content of the different molecular forms was determined by HPLC following chromatographic conditions established by QC and using a reference standard for the analyte quantification.

The laboratory internal procedures that were applied to analyze the raw materials were developed in compliance with the Pharmacopeial monographs that establish the acceptance criteria for the experimental results for each compound.

All of the analyzed compounds complied with the established specification for each performed assay and therefore were considered in accordance, meaning that all of the raw materials were approved by the QC and followed its natural course to the production zone where they will be used to manufacture supplements or drugs.

Índice

Agradecimentos	3
Resumo	4
Abstract.....	5
Lista de Abreviaturas.....	10
Índice de Figuras.....	11
Índice de Tabelas	14
Capítulo I - Introdução.....	16
1. Contextualização do estágio	17
1.1. A empresa.....	17
1.2. Controlo de Qualidade da Labialfarma.....	17
2. Doenças articulares	19
2.1. Glucosamina	20
2.1.1. Caracterização química e biológica.....	20
2.1.2. Utilizações terapêuticas	21
2.1.3. Utilização terapêutica como agente condroprotetor	23
2.1.4. Benefícios no cuidado da pele	25
3. Edulcorantes.....	26
3.1. Sacarina	27
3.1.1. Aplicações da Sacarina	27
3.2. Manitol.....	27
3.2.1. Edulcorantes como excipientes de formulações farmacológicas.....	28
3.3. Maltitol.....	29
4. Açúcares.....	31
4.1. Lactose · H ₂ O.....	31
4.2. Frutose	32
5. Objetivos.....	33
Capítulo II – Métodos e Reagentes.....	34
1. Análises físico-químicas	35
1.1. Teste de solubilidade	35
1.2. Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)	36
1.3. Potenciometria	38
1.3.1. Titulação Potenciométrica Automática.....	39
1.4. Determinação do teor de água.....	41
1.4.1. Perda por secagem.....	42

Metodologia analítica para análise de glucosamina por HPLC e análise físico-química de edulcorantes e açúcares

1.4.2. Titulação por Karl Fischer.....	42
1.5. Cinzas sulfúricas	45
2. Cromatografia líquida	46
2.1. Cromatografia líquida de alta eficiência – HPLC.....	46
2.1.1. A fase móvel	47
2.1.2. A fase estacionária	48
2.1.3. O cromatograma – Identificação e Quantificação	50
3. Soluções e Reagentes	54
Capítulo III – Resultados e Discussão	58
1. Edulcorantes e Açúcares.....	59
1.1. Aspeto da matéria-prima.....	59
1.1.1. Procedimento experimental e resultados	59
1.2. Solubilidade.....	60
1.2.1. Procedimento experimental e resultados	60
1.3. Aspeto da solução	61
1.3.1. Procedimento experimental e resultados	61
1.4. Identificação por Espectroscopia FTIR.....	61
1.4.1. Procedimento experimental, instrumentação e resultados.....	61
▪ Sacarina sódica · 2H ₂ O	62
▪ Manitol	63
▪ Maltitol	64
▪ Lactose · H ₂ O	65
1.5. Teor de água	67
1.5.1. Procedimento experimental, instrumentação e resultados.....	67
1.6. Cinzas sulfúricas	68
1.6.1. Procedimento experimental e resultados	68
1.7. Doseamento da sacarina sódica	69
1.7.1. Procedimento experimental e resultados	69
2. Glucosamina.....	71
2.1. Aspeto da matéria-prima.....	71
2.1.1. Procedimento experimental e resultados	71
2.2. pH.....	71
2.2.1. Procedimento experimental, instrumentação e resultados.....	71
2.3. Identificação por Espectroscopia FTIR.....	72
2.3.1. Procedimento experimental, instrumentação e resultados.....	72
2.4. Identificação do grupo funcional Cloreto	76
2.4.1. Procedimento experimental e resultados	76

Metodologia analítica para análise de glucosamina por HPLC e análise físico-química de
edulcorantes e açúcares

2.5. Identificação de grupos funcionais e iônicos.....	77
2.5.1. Cloridrato de Glucosamina – Sulfato	77
2.5.1.1. Procedimento experimental e resultados.....	77
2.5.2. Sulfato de D-glucosamina 2KCl – Potássio	78
2.5.2.1. Procedimento experimental e resultados.....	78
2.5.3. Sulfato de Glucosamina NaCl – Sódio	80
2.5.3.1. Procedimento experimental e resultados.....	80
2.6. Teor de sulfato	81
2.6.1. Procedimento experimental e resultados	81
2.7. Cinzas sulfúricas.....	82
2.7.1. Procedimento experimental e resultados	82
2.8. Perda por secagem.....	83
2.8.1. Procedimento experimental e resultados	83
2.9. Doseamento do teor de glucosamina por HPLC	84
2.9.1. Procedimento experimental.....	84
2.9.1.1. Preparação de soluções.....	84
2.9.1.1.1. Solução Padrão de Referência	84
2.9.1.1.2. Soluções problema matéria-prima.....	84
2.9.1.2. Condições cromatográficas	85
2.9.1.3. Sequência de injeção.....	85
2.9.2. Instrumentação	86
2.9.3. Resultados.....	86
• Cloridrato de Glucosamina.....	86
• Sulfato de D-Glucosamina 2KCl.....	89
• Sulfato de Glucosamina NaCl.....	91
Capítulo IV – Conclusão	94
Capítulo V – Referências bibliográficas.....	97
Capítulo VI – Informação suplementar	102

Metodologia analítica para análise de glucosamina por HPLC e análise físico-química de
edulcorantes e açúcares

Lista de Abreviaturas

AR – Artrite reumatoide

CQ – Controlo de Qualidade

FTIR – *Fourier Transform Infrared*

GC – *Gas Chromatography*

GMP - *Good Manufacturing Practice*

HPLC – *High Performance Liquid Chromatography*

IL-1 - Interleucina-1

IPC – *In Process Control*

IV - Infravermelho

KF – Karl Fischer

MMP – Metaloproteinases da matriz

MP – Matéria-prima

OA – Osteoartrite articular

TNF- α – *Tumor Necrosis Factor- α*

Índice de Figuras

Figura 1 – Comparação entre cartilagem saudável, com artrite reumatoide e com osteoartrite. Adaptado de [10].	19
Figura 2 – Potenciais utilizações terapêuticas da glucosamina. Adaptado de [4].	21
Figura 3 – Fórmulas moleculares da molécula de Glucosamina e respetiva massa molar (MM).	24
Figura 4 – Categorização de edulcorantes. Retirado de [31].	26
Figura 5 – Transmitância característica de diferentes grupos funcionais em espectroscopia FTIR. Retirado de [55].	37
Figura 6 – Representação de um sistema típico de espectroscopia FTIR. Adaptado de [56].	38
Figura 7 – Curva de potencial elétrico em função do volume de titulante adicionado (a); primeira derivada da curva de potencial elétrico, para cálculo do volume correspondente ao pico de potencial (b). Retirado de [60].	40
Figura 8 – Representação esquemática de um titulador automático. Retirado de [59].	40
Figura 9 – Esquema de um sistema de titulação KF. Retirado de [66].	44
Figura 10 – Principais componentes de um sistema de HPLC. Adaptado de [73].	47
Figura 11 – Representação simplificada da separação cromatográfica de duas substâncias (1 e 2). Retirado de [57]. Ver texto abaixo para o significado dos símbolos apresentados.	50
Figura 12 – Relação sinal/ruído de um pico cromatográfico. Retirado de [57].	53
Figura 13 – Espectro obtido por FTIR para a Sacarina Sódica · 2H ₂ O.	62
Figura 14 – Espectro obtido por FTIR do padrão de referência.	62
Figura 15 – Comparação dos espectros obtidos por FTIR.	63
Figura 16 – Espectro obtido por FTIR para o manitol.	63
Figura 17 – Espectro obtido por FTIR do padrão de referência.	63
Figura 18 – Comparação dos espectros obtidos por FTIR.	64
Figura 19 – Espectro obtido por FTIR para o maltitol.	64
Figura 20 – Espectro obtido por FTIR do padrão de referência.	64
Figura 21 – Comparação dos espectros obtidos por FTIR.	65
Figura 22 – Espectro obtido por FTIR para a lactose · H ₂ O.	65
Figura 23 – Espectro obtido por FTIR do padrão de referência.	65
Figura 24 – Comparação dos espectros obtidos por FTIR.	66
Figura 25 – Espectro obtido por FTIR para o Cloridrato de Glucosamina.	72
Figura 26 – Espectro obtido por FTIR do padrão de referência.	73
Figura 27 – Comparação dos espectros obtidos por FTIR.	73
Figura 28 – Espectro obtido por FTIR para o Sulfato 2KCl de Glucosamina.	73
Figura 29 – Espectro obtido por FTIR do padrão de referência.	74
Figura 30 - Comparação dos espectros obtidos por FTIR.	74

Figura 31 – Espectro obtido por FTIR para o Sulfato de Glucosamina NaCl.	74
Figura 32 – Espectro obtido por FTIR do padrão de referência.	75
Figura 33 – Comparação dos espectros obtidos por FTIR.	75
Figura 34 – À esquerda, é possível observar a formação de precipitado branco pela adição de nitrato de prata. À direita, é apresentada a solução límpida que resulta da dissolução do precipitado. Os gobelés contém a matéria-prima pela ordem em que aparecem na tabela 14.	76
Figura 35 – Comparação da opalescência da solução padrão (à esquerda) com a solução que contém cloridrato de glucosamina (à direita).	78
Figura 36 – Ensaio da identificação do potássio: à esquerda é possível observar as preparações das reações A e B antes de haver formação de precipitado. À direita é possível observar a formação de precipitado tanto para a reação A, como para a B.	79
Figura 37 – Formação de precipitado sódico para o sulfato de glucosamina NaCl.	80
Figura 38 – Captura de ecrã da janela de utilizador do software Empower 3. Seleção do método instrumental e da sequência cromatográfica a utilizar.	85
Figura 39 – Cromatograma de glucosamina obtido pela solução do padrão de referência.	87
Figura 40 – Cromatograma obtido pela solução problema A1 (injeção 1) da matéria-prima cloridrato de glucosamina.	87
Figura 41 – Sobreposição dos cromatogramas de glucosamina obtidos pelo padrão de referência e pelas soluções problema do cloridrato de glucosamina.	88
Figura 42 – Cromatograma de glucosamina obtido pela solução do padrão de referência.	89
Figura 43 - Cromatograma obtido pela solução problema A1 (injeção 1) da matéria-prima do sulfato de D-glucosamina 2KCl.	90
Figura 44 - Sobreposição cromatogramas de glucosamina obtidos pelo padrão de referência e pelas soluções problema.	90
Figura 45 – Cromatograma de glucosamina obtido pela solução do padrão de referência.	91
Figura 46 - Cromatograma obtido pela solução problema A1 (injeção 1) da matéria-prima do sulfato de glucosamina NaCl.	92
Figura 47 - Sobreposição cromatogramas de glucosamina obtidos pelo padrão de referência e pelas soluções problema.	92

Metodologia analítica para análise de glucosamina por HPLC e análise físico-química de
edulcorantes e açúcares

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Características químicas de edulcorantes naturais. Retirado de [30].....	30
Tabela 2 – Tabela de Solubilidades. Adaptada de [53].....	36
Tabela 3 – Especificação e resultados Descrição/Aspetto.....	59
Tabela 4 – Especificação e resultado do teste de solubilidade.....	60
Tabela 5 – Resultados da observação do aspeto da solução.....	61
Tabela 6 – Espectroscopia FTIR.....	62
Tabela 7 – Especificação e resultados do teor de água.	67
Tabela 8 – Especificação e resultados cinzas sulfúricas.	68
Tabela 9 – Massa (mg) e Volume de titulante (V_T) para cada amostra de matéria-prima.	69
Tabela 10 – Resultado doseamento sacarina sódica $\cdot 2H_2O$	69
Tabela 11 – Especificação e resultados Descrição /Aspetto.....	71
Tabela 12 – Determinação do pH a concentração 20 mg/ml.....	71
Tabela 13 – Espectroscopia FTIR.	72
Tabela 14 – Cloretos.....	76
Tabela 15 – Identificação de grupos funcionais e iónicos (Sulfato).....	77
Tabela 16 - Identificação de grupos funcionais e iónicos (Potássio).	79
Tabela 17 – Identificação de grupos funcionais e iónicos (Sódio).	80
Tabela 18 – Especificação e resultados teor de sulfato.	81
Tabela 19 – Resultados Cinzas sulfúricas.	82
Tabela 20 – Resultados da perda por secagem.....	83
Tabela 21 – Preparação da solução de referência para cada uma das matérias-primas.....	84
Tabela 22 – Preparação das soluções problema para cada uma das matérias-primas.....	84
Tabela 23 – Resultados da determinação do teor de glucosamina por HPLC.	86
Tabela 24 – Resultados da análise por HPLC do cloridrato de glucosamina.	86
Tabela 25 - Resultados da análise por HPLC do Sulfato de D-glucosamina $2KCl$	89
Tabela 26 - Resultados da análise por HPLC do sulfato de glucosamina $NaCl$	91
Tabela 27 – Resultados obtidos por KF para a Sacarina sódica $\cdot 2H_2O$	103
Tabela 28 – Resultados obtidos por KF para o maltitol.	103
Tabela 29 – Resultados obtidos por KF para a lactose $\cdot H_2O$	103
Tabela 30 – Resultados obtidos por KF para a frutose.....	103
Tabela 31 – Pesagens intermédias cinzas sulfúricas (Açúcares).	104
Tabela 32 – Pesagens intermédias cinzas sulfúricas (Glucosamina).....	104
Tabela 33 – Resultados doseamento por titulação automática para a sacarina sódica.....	104
Tabela 34 – Soluções de glucosamina para a medição do pH.	105
Tabela 35 – Pesagens do filtro para cálculo do teor de sulfato.....	105

Metodologia analítica para análise de glucosamina por HPLC e análise físico-química de
edulcorantes e açúcares

Tabela 36 – Pesagens intermédias da perda por secagem da glucosamina.	105
Tabela 37 – Áreas e tempo de retenção para cada injeção de padrão.....	106
Tabela 38 – Áreas, tempo de retenção e teor de glucosamina para cada injeção de amostra.....	106
Tabela 39 - Áreas e tempo de retenção para cada injeção de padrão.	107
Tabela 40 - Áreas, tempo de retenção e teor de glucosamina para cada injeção de amostra.	107
Tabela 41 - Áreas e tempo de retenção para cada injeção de padrão.....	108
Tabela 42 - Áreas, tempo de retenção e teor de glucosamina para cada injeção de amostra.	109

Capítulo I - Introdução

Introdução

1. Contextualização do estágio

1.1. A empresa

O presente relatório de estágio foi concretizado no âmbito da unidade curricular Estágio em Bioquímica que constitui o segundo e último ano letivo do Mestrado em Bioquímica. O referido estágio foi realizado no Controlo de Qualidade da Labialfarma, empresa farmacêutica de produção de medicamentos, suplementos e dispositivos médicos.

A Labialfarma é uma empresa comercializadora de produtos farmacêuticos e nutracêuticos, fundada em 1981 e sediada em Mortágua, Portugal. Desde então, tem vindo a expandir-se, estando em constante crescimento.

1.2. Controlo de Qualidade da Labialfarma

O Controlo de Qualidade (CQ) da Labialfarma encontra-se dividido em diferentes áreas de análise que comunicam entre si para um objetivo final. É a entidade interna responsável por amostrar, testar e aprovar as matérias-primas que serão utilizadas na produção de um medicamento ou suplemento, bem como responsável por garantir que durante esses processos não há inconformidades. Tem também como obrigação verificar a qualidade e a segurança do produto final antes deste chegar ao consumidor, que somos todos nós.

O controlo de qualidade encontra-se dividido em 5 áreas de trabalho:

- O material de embalagem é responsável por verificar o material de acondicionamento primário e secundário. O material primário é tudo o que está em contacto direto com o produto, como por exemplo frasco, ampolas, blisters, entre outros. Já o material de acondicionamento secundário integra todo o material externo ao produto final, tal como rótulos, bulas, caixas, entre outros.
- Outra área do controlo de qualidade é a microbiologia. Esta fração, por ser bastante suscetível a contaminação biológica, está mais separada do resto do laboratório e é nesta área do controlo que se procede ao estudo da presença ou ausência de microrganismos em matérias-primas e produto acabado, em várias fases do processo de produção e embalagem. Também é a microbiologia que realiza o controlo ambiental de toda a infraestrutura de produção na empresa, garantindo a qualidade do ar e avaliando se a higienização dos espaços está a ser feita de forma correta. É também do seu encargo realizar

a análise microbiológica dos diversos pontos de água purificada, assegurando a qualidade desta.

- A análise físico-química de matérias-primas é outra área do laboratório do controlo de qualidade. Aqui procede-se a toda a análise das mesmas através dos mais variados métodos existentes no laboratório. Também é da sua responsabilidade monitorizar a qualidade da água purificada que é usada em toda a empresa (produção e CQ), complementando a análise microbiológica da água purificada.
- O IPC (*in process control*) faz parte do CQ, apesar de se movimentar pela produção. Este é responsável por garantir que o produto, enquanto está a ser produzido, se encontra de acordo com as especificações de produto intermédio e/ou acabado.
- A cromatografia analítica, onde se realizam análises por HPLC e GC, dedica-se à análise de matérias-primas, produto acabado e leva a cabo estudos de estabilidade. São realizados doseamentos aos princípios ativos, bem como as substâncias aparentadas relacionadas com os mesmos.

O controlo de qualidade de uma empresa é uma parte essencial da mesma, ele garante que todo o produto que sai para ser comercializado esteja em condições perfeitas, bem como atesta que as matérias-primas e materiais de embalagem utilizados na produção dos produtos finais estão conforme a sua especificação. Para além de tudo isto, a Labialfarma encontra-se certificada em GMP (*good manufacturing practice*) o que eleva ainda mais a fasquia em termos de garantir a qualidade do produto.

A função de um analista do controlo de qualidade é analisar todos os produtos que lhe chegam, cumprindo os procedimentos internos a que os produtos estão sujeitos. Os procedimentos internos são métodos internos do controlo de qualidade da empresa que podem ser baseados nas farmacopeias (americana, europeia ou britânica), método do fornecedor ou do cliente, bem como uma junção de um ou mais destes componentes.

2. Doenças articulares

A osteoartrite (OA) é uma doença degenerativa da cartilagem que afeta 10 a 15% da população mundial [1], [2]. Manifesta-se numa degradação progressiva da cartilagem que reveste as articulações, caracterizando-se pela fibrilação e erosão da superfície articular (figura 1). Esta degradação da camada celular protetora resulta numa diminuição da elasticidade da cartilagem, podendo ser severa ao ponto de se dar a sua completa erosão e haver exposição da estrutura óssea [1], [3]–[5].

Uma cartilagem saudável representa um dos tecidos mais duráveis do corpo humano e é constituída por condrócitos (5%) e matriz extracelular (95%). Os condrócitos são as células presentes nas lacunas do tecido conjuntivo responsáveis por segregar componentes importantes da matriz extracelular, como colagénio, ácido hialurónico, glucosamina e glicoproteínas que mantêm e sustentam a cartilagem articular [3]. Os condrócitos são essenciais na segregação e manutenção da matriz extracelular, mas é a própria matriz que confere longevidade e fornece à cartilagem as suas propriedades mecânicas [6]. A matriz extracelular consiste numa rede de glicoproteínas e polissacarídeos, tais como os proteoglicanos e os glicosaminoglicanos que amortecem stress mecânico de tensão e compressão, protegendo as estruturas celulares e ósseas [3], [6]–[8].

A OA é uma doença para a qual não existe cura que reduz a mobilidade funcional, tendo um grande impacto na qualidade de vida dos afetados, causando dor e desconforto [4], [6], [9]. Apesar de não se perspetivar uma cura para a OA, estão a ser desenvolvidos e estudados mecanismos que atenuem os sintomas e a dor que a doença causa. O objetivo da comunidade científica tem sido encontrar um tratamento sintomático para a OA utilizando para isso agentes condroprotetores que estimulem a regeneração da cartilagem desgastada [6], [7].

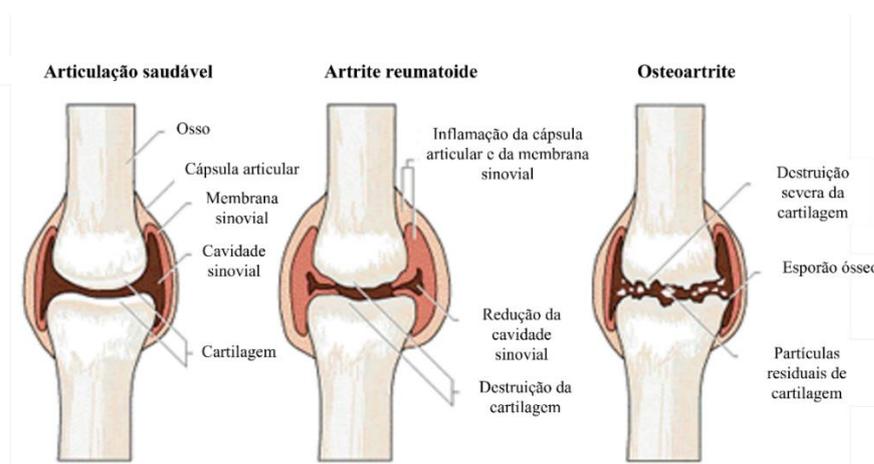


Figura 1 – Comparação entre cartilagem saudável, com artrite reumatoide e com osteoartrite. Adaptado de [10].

Paralelamente à osteoartrite, a artrite reumatoide (AR) também é uma doença a que afeta as articulações. Neste caso, a degradação da cartilagem articular acontece devido à inflamação da articulação sinovial (figura 1). O líquido sinovial, responsável por lubrificar as articulações móveis, contém mediadores moleculares que induzem a sinovite, inflamando a membrana que reveste a articulação, causando dor e desconforto articular [11], [12].

Na tentativa de amenizar os sintomas destas duas doenças e melhorar a qualidade de vida dos afetados, têm sido desenvolvidos suplementos que, apesar de não tratarem a doença, apresentam melhorias significativas dos sintomas que esta causa. Um exemplo é a preparação de formulações que contêm glucosamina, cujo objetivo é aumentar a concentração e, conseqüentemente, a biodisponibilidade desta molécula endógena que participa em processos cruciais de regeneração da matriz extracelular [8], [11], [13], [14].

2.1. Glucosamina

2.1.1. Caracterização química e biológica

A glucosamina é um amino-monossacarídeo que ocorre endogenamente, em animais e seres humanos, pela aaminação da glucose. É um derivado amínico da glicose que combina a glicose e a glutamina, sendo um importante e natural substrato para a síntese de glicoproteínas, proteoglicanos e glicosaminoglicanos, componentes cruciais de uma matriz extracelular saudável [4], [13]–[20].

A glucosamina pode ser encontrada na maioria dos tecidos do corpo humano, sendo mais abundante em tecido conjuntivo e cartilagens [20]. Esta desempenha um papel fundamental na formação e manutenção deste tipo de tecido, estando presente em tendões, ligamentos e na matriz extracelular das cartilagens.

A importância da glucosamina deve-se ao facto de ser um precursor da unidade dissacarídica dos glicosaminoglicanos [7], [19], [21] que, ligados a uma proteína nuclear originam os proteoglicanos que, basicamente, funcionam como blocos de construção da cartilagem articular, fornecendo suporte estrutural. Os glicosaminoglicanos ligam moléculas de água e cationes à sua estrutura para formar uma camada elástica e viscosa que serve de lubrificante natural às cartilagens, protegendo-as do stress mecânico. É a esta camada elástica que também se liga o colagénio e, simultaneamente, se dá a construção e reconstrução da cartilagem. Uma das condições fulcrais deste processo é a disponibilidade endógena de glucosamina que pode não se verificar devido a algumas doenças ou condições [8], [14]–[16].

A glucosamina é uma molécula pequena, com um peso molecular de 179,17 g/mol e quimicamente é considerada uma base. O grupo $-NH_2$ presente na sua estrutura, normalmente sofre uma reação de acetilação, salificação ou sulfatação. A acetilação deste grupo, origina a N-acetil glucosamina que pode ser usada como matéria-prima na suplementação e que entra na síntese de ácido hialurónico e outros constituintes da matriz extracelular. A sulfatação do grupo amina da glucosamina, origina glucosamina-6-sulfato que pode ser encontrado na natureza, mas que é instável e por isso não tem aplicação farmacológica conhecida. Por fim, temos a salificação do grupo amina, que origina as classes de glucosamina mais utilizadas na formulação de suplementos. Estes sais podem ser: o cloridrato de glucosamina, que é o sal mais facilmente obtido e também a forma mais pura da glucosamina; o sulfato de glucosamina, que é bastante instável e higroscópico, mas que facilmente se torna mais estável e útil com a adição de cloreto de sódio ou de potássio, obtendo-se então sulfato cristalino de glucosamina, que é a forma mais utilizada [19], [22].

2.1.2. Utilizações terapêuticas

Desde a sua descoberta, em 1876, por um cirurgião alemão, que a glucosamina tem sido amplamente estudada em termos de potenciais benefícios para a saúde a vários níveis [13].

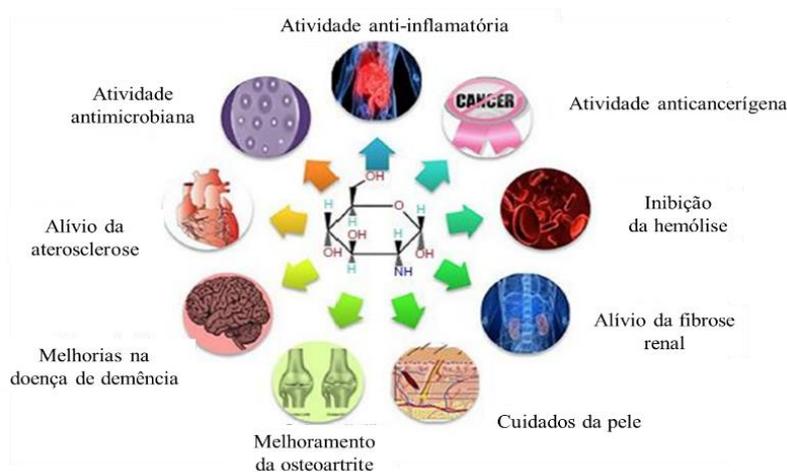


Figura 2 – Potenciais utilizações terapêuticas da glucosamina. Adaptado de [4].

Esta molécula é considerada um agente terapêutico multifuncional, podendo ser aplicada em diversas formulações suplementares com diferentes propósitos. São várias as funções biológicas que pode tomar, como está esquematizado na figura 2, mas é sobretudo administrada no tratamento da AR e OA, aliviando os efeitos da doença e diminuindo a dor do paciente [8], [11], [14].

Acredita-se que a suplementação com glucosamina pode estimular a regeneração da cartilagem, pois, apesar de, numa situação saudável, esta ser sintetizada pelos condrócitos, a sua

segregação pode ser inferior ao necessário e poderá fazer sentido a suplementação com glucosamina na tentativa de contribuir diretamente para a síntese das macromoléculas que participam na formação de matriz extracelular [5], [6], [23], [24].

Para além de estimular a regeneração da cartilagem, por promover a segregação de intervenientes da matriz extracelular, a glucosamina pode ter, também, um papel importante na diminuição da inflamação característica da artrite reumatoide. Vários estudos reconhecem as suas propriedades anti-inflamatórias ao ter efeitos supressores na produção de mediadores da inflamação como a IL-1 e o TNF- α . O TNF- α é um grupo de citocinas capaz de provocar a morte celular em células defeituosas e também de gerar uma resposta inflamatória, estimulando a produção de moléculas pro-inflamatórias que vão promover a inflamação das articulações sinoviais, agravando a doença [8], [11], [13], [14].

Alguns dos estudos efetuados, relataram que a glucosamina pode, também, ter efeito supressor na produção de metaloproteinases da matriz (MMP) pelos condrócitos e sinoviócitos do tecido conjuntivo e sinovial. As metaloproteinases promovem a degradação da matriz extracelular que reveste as articulações e devem existir em concentrações controladas para estimular a regeneração da própria matriz. No caso de doença de AR, a expressão destas metaloproteinases está aumentada e a glucosamina pode funcionar como moduladora dos níveis de expressão da MMP-3, dando mais tempo à matriz para se regenerar [13], [14], [25].

As preparações de glucosamina disponíveis no mercado, derivam da quitina encontrada em conchas de crustáceos. Estas formulações são de administração oral e contêm sulfato de glucosamina, cloridrato de glucosamina ou o análogo da glucosamina, N-acetilglucosamina [6], [22]. O mais comum, comercialmente, é encontrar suplementos de glucosamina contendo também condroitina [25].

A condroitina geralmente deriva de fontes animais, sendo a mais comum, traqueia de bovino [6]. A combinação de glucosamina e condroitina surge do facto de que a sua mistura pode originar um suplemento com efeito condroprotetor que, irá, de certa forma, proteger a articulação. Compreendeu-se que a glucosamina e a condroitina individualmente não satisfazem o que um agente condroprotetor deve ser ou ter, mas em conjunto funcionam de forma sinérgica, apresentando um grande potencial de serem utilizadas em formulações que estimulem a regeneração da matriz extracelular [25].

2.1.3. Utilização terapêutica como agente condroprotetor

Os agentes condroprotetores devem apresentar algumas características que foram definidas por Ghosh and Brooks [2], [6]:

- Aumentar a síntese de macromoléculas pelos condrócitos (como os glicosaminoglicanos, proteoglicanos, entre outras);
- aumentar a síntese de ácido hialurônico pelos componentes celulares da matriz extracelular;
- inibir a atividade e a secreção de enzimas que degradam a matriz extracelular;
- mobilizar depósitos de trombina, fibrina, lípidos e colesterol de vasos sanguíneos que rodeiam a articulação;
- amenizar a dor na articulação e reduzir a sinovite (inflamação na membrana sinovial que, numa situação saudável é responsável por produzir fluido sinovial, agente lubrificante das articulações).

Um agente condroprotetor deve então inibir o dano que a própria matriz extracelular cria nas cartilagens, como deve, em simultâneo, promover a reparação desta camada protetora [6].

A glucosamina, por si só, não pode ser considerada um agente condroprotetor. A sua maior característica condroprotetora é estimular a segregação pelos condrócitos e integrar a síntese de proteoglicanos, sendo que também apresenta alguma relevância na via metabólica dos sinoviócitos, diminuindo as concentrações de fatores inflamatórios [2], [6], [23]. Por outro lado, a condroitina, que é um dos mais abundantes constituintes da matriz extracelular das cartilagens, fica francamente diminuída em situações de degeneração da matriz extracelular das articulações, o que faz com que esta perca integridade, exponenciando a degeneração. Assim sendo, a condroitina suplementar também apresenta algum potencial condroprotetor [3], [6], [18], [25].

Não obstante, a combinação destes dois componentes apresenta bastante potencial condroprotetor e é neste nicho que se pretende atuar ao criar suplementos que apresentem estes dois constituintes. Para além disto, acredita-se que o efeito dos dois juntos é sinérgico, em vez de apenas aditivo, ou seja, existe um efeito superior ao que o que seria a adição do efeito de cada um individualmente [6], [25].

Existe ainda alguma controvérsia acerca da utilização de suplementos de glucosamina e condroitina no tratamento sintomático da OA que se prende com a quantidade de estudos clínicos e *in vitro* que foram realizados até então. No entanto, existem, também resultados que apoiam a sua utilização terapêutica, sendo que, neste momento, o que se pretende é aumentar a biodisponibilidade destas moléculas depois de serem absorvidas pelo trato gastrointestinal [6], [26].

A condroitina é uma molécula grande, com peso molecular compreendido entre 15kDa e 45kDa [6], o que naturalmente influencia a sua biodisponibilidade, que não costuma ultrapassar os 20%.

Por outro lado, a glucosamina, como é uma hexosamina, apresenta um baixo peso molecular, o que facilita a sua absorção no trato gastrointestinal e aumenta ligeiramente a sua biodisponibilidade (26%), comparativamente com a condroitina. A glucosamina absorvida no trato gastrointestinal sofre um efeito de 1ª passagem no fígado bastante significativo, o que explica a baixa biodisponibilidade das formulações orais [15], [20], [27].

A administração de diferentes formulações de glucosamina pode ter um papel importante no tratamento sintomático de doenças nas cartilagens, mas a sua utilização ainda não se encontra otimizada pois apesar de apresentar uma boa absorção pelo trato gastrointestinal, a sua biodisponibilidade é algo baixa [15], [27]. De forma a tentar ultrapassar esta limitação, têm surgido várias fórmulas químicas de glucosamina, cloridrato, sulfato, com átomos de sódio ou de potássio ligados que também podem desempenhar um papel importante na síntese dos componentes moleculares necessários à reparação da matriz celular articular [9], [28], [29].

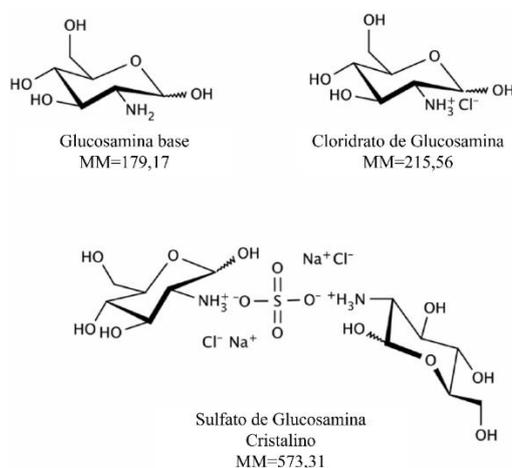


Figura 3 – Fórmulas moleculares da molécula de Glucosamina e respetiva massa molar (MM).

Atualmente, as diferenças em termos de eficácia farmacológica entre as várias formas moleculares da glucosamina não são bem conhecidas. Sabe-se que os sais de glucosamina (como o sulfato sódico e o sulfato potássico), quando administrados oralmente, se separam rapidamente dos iões de sulfato, sódio ou potássio, sendo que estes são absorvidos e acabam na corrente sanguínea, onde à partida a sua concentração já é estável, não havendo grande alteração. A glucosamina é então absorvida e fica biodisponível como base livre para ser usada pelo tecido conjuntivo como precursor para a síntese de outras moléculas [28].

Obviamente que ainda são necessários mais estudos que suportem a eficácia da suplementação com glucosamina e condroitina, mas os resultados preliminares são favoráveis [9], [25]–[28].

2.1.4. Benefícios no cuidado da pele

A literatura existente sobre as aplicações terapêuticas da glucosamina é essencialmente focada para a sua utilização no tratamento sintomático de questões articulares, o que faz sentido na medida em que ela é um interveniente importante na formação e manutenção da cartilagem articular. Não obstante, a glucosamina tem vindo a demonstrar-se relevante em diferentes áreas, sendo uma delas, ao nível do cuidado da pele [8], [14].

Os condrócitos residentes no tecido conjuntivo sintetizam e catabolizam ácido hialurónico [6], [18]. Acredita-se que o ácido hialurónico presente na pele é fundamental na cicatrização de feridas e que também tem um papel protetor da epiderme, pois, é capaz de se ligar a radicais livres existentes na pele, provenientes, por exemplo, da exposição excessiva aos raios ultravioleta (UV) [8]. Para além disso, o ácido hialurónico liga água na sua estrutura, tendo uma importante função de hidratação e estando diretamente relacionado com o mecanismo de envelhecimento da pele e o aparecimento de rugas [17].

Como já foi referido anteriormente, a glucosamina desempenha um papel precursor na síntese de ácido hialurónico e por isso, é expectável que suplementação com glucosamina, acelere a cicatrização, a hidratação e, possivelmente, apresente relevância em tratamentos antirugas [8], [17], [20].

Cada vez mais vão surgindo estudos que de alguma forma provam que a glucosamina pode ter algum benefício na pele por, indiretamente, aumentar a produção de ácido hialurónico, [8], [17]. São estudos preliminares, mas que apontam a glucosamina como um possível ingrediente em suplementos anti idade de administração oral.

3. Edulcorantes

Os edulcorantes ou adoçantes são compostos químicos que apresentam um gosto doce que varia de intensidade. Estes compostos podem ser encontrados na natureza, como também ser sintetizados quimicamente [30]. Os edulcorantes fazem parte da dieta do ser humano, quer por existirem naturalmente nos alimentos, quer por serem adicionados industrialmente e, apesar de não serem utilizados com o propósito de confirmar valor nutricional a uma mistura, são muito utilizados para modificar as propriedades químicas, físicas, biológicas ou sensoriais de uma determinada formulação, mistura ou alimento [31]–[33].

Os edulcorantes podem ser classificados mediante vários fatores: com base na sua contribuição calórica em nutritivos ou não nutritivos; com base na sua origem em naturais ou artificiais; com base no seu poder adoçante que é medido em relação à sacarose e que divide os edulcorantes em adoçantes de alta ou baixa intensidade [31].

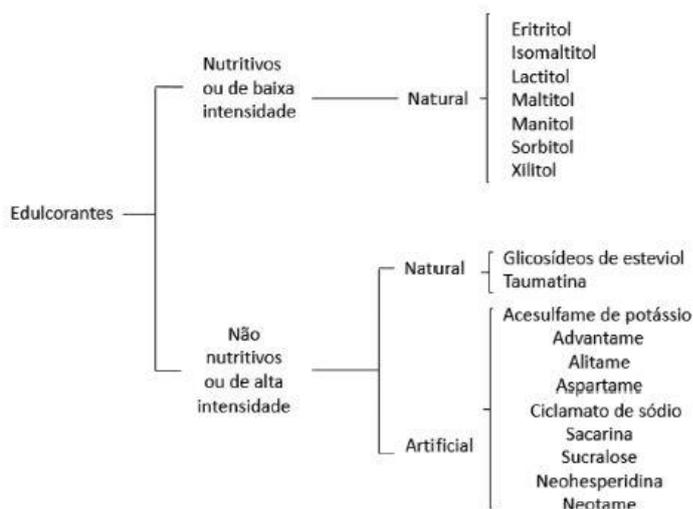


Figura 4 – Categorização de edulcorantes. Retirado de [31].

Os edulcorantes são muito utilizados na indústria farmacêutica, apresentando várias funções quando adicionados em formulações de suplementos ou medicamentos. Como conferem sabor doce, sem adicionar carga calórica a uma mistura, são utilizados em vez de açúcares em muitas formulações. Podem também ser adicionados para alterar a viscosidade ou densidade da dita mistura e também para modular propriedades que conferem estabilidade, tal como a higroscopia [30], [34], [35].

3.1. Sacarina

Um dos mais antigos e, mesmo assim, mais utilizado edulcorante é a sacarina. Este adoçante artificial foi sintetizado pela primeira vez em 1879 e desde então é bastante utilizado em substituição do açúcar. Apesar de ter um potencial adoçante de 300 a 500 vezes superior ao da sacarose, a sacarina não tem calorias [36], [37].

Quimicamente, a sacarina é um ácido orgânico pouco solúvel em água. Na sua forma de sal, ligada ao sódio, ou ao cálcio, é muito solúvel em água. É geralmente a forma de sacarina sódica que se utiliza como adoçante, tendo aplicações tanto a nível alimentar como em produtos de higiene oral [33], [35], [36].

3.1.1. Aplicações da Sacarina

A sacarina é muito utilizada na indústria farmacêutica e, também, na alimentar, principalmente na sua forma de sal, a sacarina sódica. Também conhecida por E954 [30], é capaz de adoçar uma mistura dependendo da concentração em que se encontra e também das características químicas da mistura à qual vai ser adicionada. Muitas vezes, outros adoçantes como o aspartame que também é um adoçante artificial de alta intensidade, são adicionados à mistura com a sacarina para controlar e ajustar o sabor doce [32], [36]. Outra característica interessante deste edulcorante é ser capaz de mascarar sabores desagradáveis, o que explica a sua alargada utilização na indústria farmacêutica [35].

A sua vasta utilização deriva das suas propriedades físico-químicas, sendo que este edulcorante é bastante estável a uma ampla gama de temperatura e pH [31].

A sacarina sódica é excretada na sua forma inicial, não sendo metabolizada pelo corpo humano, isso faz com que seja muito utilizada em alimentos de dieta que não contêm açúcar, mas que mantêm o sabor doce recorrendo a edulcorantes. Como não tem calorias associadas, pode ser ingerida por indivíduos que têm, por exemplo, diabetes, ou outra restrição na ingestão de açúcar [30].

3.2. Manitol

O manitol, também conhecido por E421 [30], é um poliálcool muito utilizado em substituição do açúcar. Ocorre naturalmente em algumas frutas, legumes e algas marinhas. Devido ao seu poder adoçante, é utilizado como um edulcorante que, apesar de ter origem natural é, comumente, sintetizado artificialmente a partir de um açúcar [38]. Este edulcorante é considerado

de baixa intensidade, apresentando algum valor nutricional associado e tendo metade do poder adoçante da sacarose [30], [35].

O manitol e outros poliólcoois são muito utilizados na indústria alimentar em substituição do açúcar por reduzirem o aparecimento de doenças relacionadas com o consumo excessivo de alimentos ricos em açúcar, pois conferem sabor doce, contendo poucas ou nenhuma calorias [30], [38].

O manitol é obtido pela hidrogenação da frutose ou glucose, sendo que deste processo, resulta uma mistura em partes mais ou menos iguais de sorbitol e manitol, que depois têm de ser separados [39]. O sorbitol é muito semelhante ao manitol, diferindo apenas na orientação de grupos hidroxilo e possuindo, também, utilizações alimentares e farmacêuticas [38].

Devido ao rendimento de produção do manitol não ser elevado, por ter de ser separado do sorbitol, o seu custo de produção também se torna mais alto quando comparado com outros edulcorantes e com o próprio sorbitol [38]. Apesar desta desvantagem, o manitol tem recebido muita atenção por parte dos investigadores pelo potencial que demonstra de se tornar um bom excipiente de formulações galénicas [39].

3.2.1. Edulcorantes como excipientes de formulações farmacológicas

Em 1957, os excipientes foram definidos como sendo “a substância usada como meio para dar um medicamento”, ou seja, um veículo ou um suporte inerte dos princípios ativos [40], [41]. Esta designação foi evoluindo e hoje em dia, um excipiente, também pode participar no transporte e libertação de um princípio ativo, alargando-se o conceito de excipiente para todos os componentes de uma mistura galénica para além do princípio ativo.

Um bom excipiente deve apresentar algumas propriedades físico-químicas [40]–[42]:

- Ser bem tolerado fisiologicamente e apresentar pouca toxicidade;
- Ser quimicamente inerte em relação aos princípios farmacológicos ativos;
- Apresentar sabor e sensação agradável e funcionar com um agente não pegajoso, no caso de formulações orodispersíveis ou mastigáveis [38];
- Ser compressível e fluido;
- Ser pouco higroscópico.

O manitol tem ganho cada vez mais importância e relevância como excipiente, pois é capaz de preencher todos os requisitos acima referidos do que um bom excipiente deve ser/ter. Sendo que

as suas maiores vantagens são: a sua baixa higroscopia, o facto de ser normalmente inerte perante os princípios ativos das formulações; ser bem tolerado fisiologicamente; apresentar boas características de compressibilidade e fluidez, quando usado em formulações sólidas que necessitam de compactação. [39]

3.3. Maltitol

O maltitol, também conhecido por E965, é um poliálcool de origem natural, podendo ser encontrado em folhas de chicória. Comercialmente, é produzido por hidrogenação catalítica da D-maltose, originando uma molécula de glucose ligada a uma de sorbitol [34].

O maltitol é considerado o edulcorante mais parecido com o açúcar em termos de sabor e propriedades físico-químicas. Na sua forma cristalina, exhibe uma pureza bastante alta, apresentando cerca de 90% do poder adoçante da sacarose [30], [43]. É muitas vezes denominado de adoçante de volume porque ocupa o mesmo volume do que o açúcar, isto é, a massa molecular do maltitol e do açúcar é muito semelhante, diferindo apenas em 2 g/mol. Como tem sabor e propriedades semelhantes, é o maltitol que costuma ser o eleito para substituir todo o açúcar em alimentos que vemos rotulados como não possuindo qualquer açúcar [35].

Ao contrário do açúcar de mesa, este edulcorante é menos higroscópico, o que torna a sua utilização ainda mais vantajosa comparativamente à do açúcar pois, ao ser menos higroscópico, impede que a mistura em que foi utilizado, absorva humidade do meio ambiente. Esta é uma característica importante, sendo utilizada de forma proveitosa na preservação de misturas de várias naturezas que contêm maltitol [30], [43].

Outra vantagem do maltitol em relação ao açúcar é que é francamente menos calórico, tendo um índice glicémico também inferior. O índice glicémico é uma medida baseada na concentração de glucose no sangue, depois de comer um determinado alimento, em comparação com uma referência. Funciona como um indicador da velocidade com que os açúcares presentes num alimento, chegam à corrente sanguínea, modificando a glicemia. É um dado com extrema importância para a comunidade diabética e que é tido em conta para substituir os açúcares de uma mistura por constituintes com menor índice glicémico [30], [34].

Por exemplo, o índice glicémico do açúcar é 65, contrastando com o do maltitol que é 35. Na tabela 1, podem-se observar algumas das características de açúcares e edulcorantes e é possível perceber as suas diferenças. De notar que a sacarose, também referida como açúcar de mesa, é a referência para os outros constituintes em termos de poder adoçante [30].

Metodologia analítica para análise de glucosamina por HPLC e análise físico-química de edulcorantes e açúcares

Tabela 1 – Características químicas de edulcorantes naturais. Retirado de [30].

Substance	Chemical formula	E index	Sweetness	Caloric value kcal/g	Glycemic index ^b
Sugars					
Glucose	$C_6H_{12}O_6$	-	0.75		100
Fructose	$C_6H_{12}O_6$	-	1.7		23
Sucrose	$C_{12}H_{22}O_{11}$	-	1	4	65
Maltose	$C_{12}H_{22}O_{11}$	-	0.3		105
Lactose	$C_{12}H_{22}O_{11}$	-	0.15		45
Sugar alcohols					
Erythritol	$C_4H_{10}O_4$	E968	0.6-0.8		0
Isomalt	$C_{12}H_{24}O_{11}$	E953	0.45-0.65		9
Lactitol	$C_{12}H_{24}O_{11}$	E966	0.3-0.4		6
Maltitol	$C_{12}H_{24}O_{11}$	E965	0.9	2.4	35
Mannitol	$C_6H_{14}O_6$	E421	0.5-0.7		0
Sorbitol	$C_6H_{14}O_6$	E420	0.5-0.7		9
Xylitol	$C_5H_{12}O_5$	E967	1.0		13
Other natural sweeteners					
Stevia (Steviol glycoside)	$C_{38}H_{60}O_{18}$ ^a $C_{44}H_{70}O_{23}$ ^b	E960	200	0	0
Thaumatococin (207 amino acids)	Polypeptide	E957	2000	4	0

^a stevioside

^b rebaudioside A

4. Açúcares

4.1. Lactose · H₂O

A lactose é um dissacarídeo muito abundante na natureza, composto por uma molécula de glucose e outra de galactose. Pode ser facilmente encontrada no soro de leite, sendo um subproduto da fabricação de queijo [35], [44].

A lactose é um dos mais comuns excipientes utilizados em formulações orais sólidas, estando presente em 60 a 70% de todas as formulações orais sólidas registradas. A sua grande utilização em formas sólidas tais como, comprimidos, cápsulas duras ou saquetas, reflete-se na compressibilidade que apresenta. Grande parte dos princípios ativos não são compressíveis ou fluídos o suficiente para serem compactados numa forma sólida sem que esta se desintegre antes de ser tomada. Muitos dos excipientes que se utilizam em formas sólidas, têm exatamente o propósito de auxiliar neste processo [35], [44].

A lactose representa, então, um excipiente com uma vasta gama de utilizações em formas sólidas, tendo um valor comercial algo baixo por ser um subproduto no comércio dos laticínios [44], [45].

A intolerância à lactose é uma condição algo prevalente, com cerca de 65% da população mundial a ser afetada. Consiste numa deficiência ou inexistência da enzima digestiva lactase, responsável por degradar e digerir a lactose. Esta incapacidade de digerir a lactose resulta em fortes dores abdominais, náuseas e outros sintomas. Devido à incidência da intolerância à lactose, o valor comercial desta tem vindo a baixar e as grandes quantidades originadas, são usadas para sintetizar outros derivados, como alguns poliálcoois com função edulcorante ou simplesmente desperdiçadas [46]. Apesar desta possível desvantagem da lactose enquanto excipiente, por não cumprir exatamente o primeiro ponto do que um bom excipiente deve ser, a evidência científica suporta que as baixas quantidades de lactose presentes num medicamento não são suficientes para provocar reações adversas e sintomas como os que acontecem na intolerância, mesmo por quem apresenta uma alta intolerância [44], [46]. Os estudos realizados sugerem que mesmo pacientes que não produzam nenhuma lactase, não experimentam efeitos adversos por tomar medicamentos contendo lactose como excipiente [47].

Desta forma, a lactose foi e vai continuar a ser um dos excipientes mais utilizados na indústria farmacêutica porque, para além de ter um custo reduzido, as suas propriedades de compressão são muito vantajosas comparativamente com outros excipientes que começam a ganhar relevância.

4.2. Frutose

A frutose é um monossacarídeo natural, muito comumente chamado de “açúcar da fruta”. De todos os adoçantes de origem natural, a frutose é o mais doce em comparação com a sacarose, sendo cerca de 1,7 vezes mais doce, mas apresentando as mesmas calorias do que o açúcar. Apesar de ser mais doce, a frutose tem um índice glicêmico de 23, que é inferior ao da sacarose, 65, sendo por isso um bom candidato para a substituir [30].

A frutose é muito utilizada na indústria alimentar em alimentos e bebidas devido ao seu sabor doce. Por ser muito solúvel, a sua higroscopia é bastante alta, podendo ser usada para gerir a humidade existente numa mistura e, conseqüentemente, a sua textura e viscosidade [30], [48].

A higroscopia da frutose também pode ser utilizada para ajudar na solubilização de excipientes, agentes terapêuticos e/ou princípios ativos que são hidrofóbicos ou pouco solúveis. E pode desempenhar um papel importante na alteração da osmolaridade de soluções injetáveis. [35], [49].

A frutose é um açúcar redutor e é esta característica que dá coloração acastanhada a alguns açúcares quando aquecidos. Esta particularidade pode parecer insignificante, mas na realidade é tida em conta pela indústria. No caso de formulações farmacêuticas, não se pretende que ocorra a reação de redução que dá a cor castanha ao açúcar, mas por exemplo, na indústria alimentar, esta propriedade é usada a seu favor para dar cor a certos alimentos, tornando-os mais apetecíveis e caramelizados [48], [49].

Outra característica química da frutose que pode ser proveitosa é que torna as misturas em que é adicionada mais viscosas em menos tempo do que o açúcar. Esta propriedade tem importância na indústria alimentar e também na indústria farmacêutica, no desenvolvimento de formulações líquidas como ampolas ou xaropes, em que a viscosidade e o sabor são propriedades importantes [35], [49].

5. Objetivos

Este relatório de estágio foi desenvolvido em contexto laboral, no laboratório de Controlo de Qualidade da Labialfarma, onde pude aprender e dominar várias técnicas de análise físico-química e análise instrumental que diariamente são aplicadas com a finalidade de testar e aprovar matérias-primas que serão utilizadas na produção de suplementos ou medicamentos.

O objetivo deste trabalho foi analisar diferentes matérias-primas, utilizando diferentes técnicas existentes no laboratório e perceber se estes compostos cumprem as especificações definidas pelo CQ, utilizando métodos físico-químicos e cromatográficos.

Capítulo II – Métodos e Reagentes

Métodos e Reagentes

1. Análises físico-químicas

A produção de formulações químicas como cosméticos, medicamentos ou suplementos, geralmente requer a mistura de vários componentes. Nesse aspeto, é de extrema importância ter conhecimento das características físico-químicas das substâncias constituintes e prever algumas das interações que podem ocorrer [50]. A análise de um mesmo analito através de diferentes metodologias leva a uma maior confiança nos resultados e reforça a coerência dos valores obtidos [51].

Nos tópicos seguintes, são descritas algumas das técnicas utilizadas diariamente no laboratório do CQ da Labialfarma. Estas são aplicadas de maneira a testar, identificar e quantificar a matéria-prima em estudo que, mediante os resultados obtidos, será aprovada para a produção de suplementos ou medicamentos, ou rejeitada.

1.1. Teste de solubilidade

A solubilidade de uma determinada molécula é uma característica inerente a cada matéria-prima e, apesar de ser um ensaio pouco específico, oferece alguma informação útil. Esta propriedade pode, por exemplo, influenciar a biodisponibilidade de um princípio ativo, pois, para que haja atividade farmacológica, é necessário que ocorra a absorção da molécula em causa, que deve ser solúvel nos fluidos fisiológicos [52]. Esta característica também informa sobre quais os solventes que terão de ser utilizados numa formulação farmacológica que contenha a matéria-prima.

A solubilidade de um composto é a capacidade deste se dissolver num solvente. A tabela 2 é uma adaptação da tabela de solubilidades que pode ser encontrada na Farmacopeia Europeia e que serve sempre de referência para a realização dos testes de solubilidade de matérias-primas [53]. Este modelo remete para a utilização de 1 g de amostra para os diferentes volumes de solvente. O solvente utilizado pode ser qualquer um, desde água purificada, etanol ou solventes orgânicos, podendo encontrar-se esta informação na especificação que acompanha a matéria-prima. Esta tabela está desenhada para matérias-primas sólidas que sejam passíveis de pesar, no entanto, quando a matéria-prima é líquida, é comum utilizar-se a categorização de miscível/imiscível que reflete, respetivamente, a capacidade de o soluto se misturar com o solvente ou a incapacidade de os dois se misturarem, formando fases [52], [53].

O procedimento experimental é simples: procede-se à pesagem da massa de amostra numa balança analítica e adiciona-se o volume conforme a designação descrita na especificação. Se for

necessário, coloca-se a mistura num recipiente apropriado num banho de ultrassons ou, através de um agitador magnético, estabelece-se agitação constante de forma a facilitar a solubilização do soluto [52], [53].

Tabela 2 – Tabela de Solubilidades. Adaptada de [53].

Termo descritivo	Volume necessário de solvente para dissolver 1 g de soluto (ml)
Muito solúvel	<1
Livremente solúvel	1 a 10
Solúvel	10 a 30
Parcialmente solúvel*	30 a 100
Ligeiramente solúvel	100 a 1000
Muito ligeiramente solúvel	1000 a 10 000
Praticamente insolúvel	>10 000

*mistura de componentes, em que apenas alguns são solúveis.

1.2. Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

A espectroscopia de absorção no infravermelho estuda a interação entre a radiação eletromagnética na região do infravermelho com a matéria. O princípio basilar deste método é que a excitação vibracional dos diferentes modos vibracionais de uma determinada molécula requer a absorção de energia, podendo esta ser detetada e quantificada [53], [54].

Este processo de absorção de energia resulta num espectro de infravermelho com bandas características que correspondem aos grupos funcionais das moléculas da amostra analisada, funcionando quase como uma “impressão digital” do analito. Este é o principal motivo para que seja uma técnica bastante utilizada na identificação de substâncias, dando informação sobre a sua estrutura química, pois cada grupo funcional apresenta uma região de número de onda onde é esperado que apareça sinal [51], [53].

A análise por FTIR é amplamente aplicada na verificação da conformidade de matérias-primas devido à rapidez com que é possível obter os dados e à precisão que apresenta [51]. Neste contexto, o interferograma da amostra a analisar é sempre comparado com um espectro da mesma matéria-prima, obtido a partir de um lote previamente aprovado e convertido num padrão interno, sendo possível comparar as zonas características dos grupos funcionais existentes na amostra com as do padrão, verificando a conformidade.

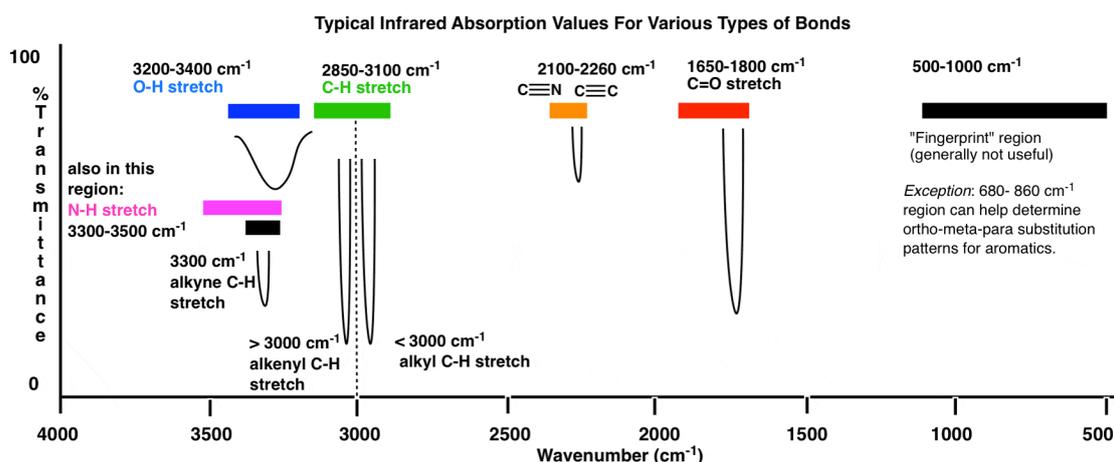


Figura 5 – Transmitância característica de diferentes grupos funcionais em espectroscopia FTIR. Retirado de [55].

Neste trabalho, utilizou-se a técnica de espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) que se caracteriza pela aplicação de um processo matemático, a transformada de Fourier, permitindo a recolha de informação numa gama espectral alargada [51], [54].

Um sistema FTIR contém um interferómetro de Michelson, que permite irradiar a amostra com diferentes comprimentos de onda através de uma única fonte de luz contínua, ao passo que sem o interferómetro, apenas é possível analisar a amostra a um comprimento de onda de cada vez. O espectro obtido é uma representação gráfica da transmitância em função do número de onda, o inverso do comprimento de onda [51], [54].

Um equipamento de espectroscopia FTIR, geralmente contém: uma fonte de luz policromática, um interferómetro, uma célula onde se coloca a amostra, um detetor e um sistema operativo que permite processar e analisar os dados obtidos [53]. A energia da fonte de radiação é dirigida para o divisor do feixe de luz originando dois percursos óticos ortogonais. Um desses feixes colide num espelho fixo e o outro num espelho móvel e ambos refletem novamente a radiação para o divisor, onde se dá a recombinação dos dois feixes. O feixe de luz recombinado gera uma interferência que se manifesta de forma óticamente construtiva ou destrutiva, dependendo do deslocamento do espelho móvel. A deslocação do espelho móvel do interferómetro dá-se num determinado espaço de tempo, originando diferentes padrões de interferência que são registados pelo detetor como bandas ou espaços negros. Assim, regista-se o interferograma que matematicamente é uma soma de funções cosseno que descrevem a intensidade da radiação em função do tempo ou do espaço percorrido [54], [56].

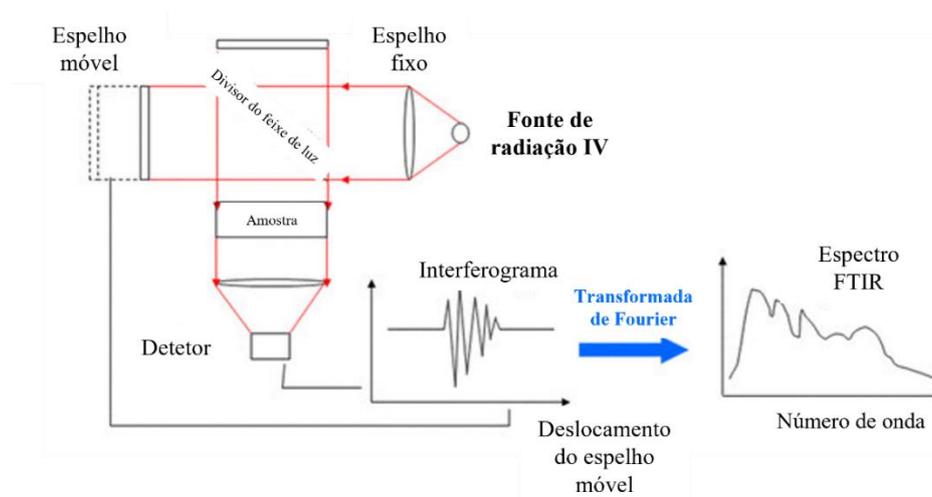


Figura 6 – Representação de um sistema típico de espectroscopia FTIR. Adaptado de [56].

1.3. Potenciometria

O pH de uma solução aquosa é definido como o logaritmo negativo da concentração de iões de hidrogénio presentes na mesma. O pH de uma solução relaciona-se com o pH de uma solução de referência (pH_{ref}), que é conhecido, e com a diferença de potencial elétrico entre ambas as soluções pela seguinte fórmula,

$$pH = pH_{ref} - \frac{E - E_{ref}}{k}$$

Em que E é o potencial, expresso em volts, da solução a examinar; E_{ref} é o potencial, expresso em volts, da solução de pH conhecido (pH_{ref}); k é a mudança de potencial por unidade de mudança no pH, expresso em Volts e que pode ser calculado pela equação de Nernst [53].

A determinação potenciométrica do pH resulta da medição da diferença de potencial, dada por dois elétrodos imersos na solução a examinar. Um desses elétrodos é o eletrodo indicador que é sensível à variação da concentração de espécies iónicas de hidrogénio e, conseqüentemente, à diferença de potencial. O outro eletrodo, é o de referência e é insensível às diferenças de potencial pois encontra-se em contacto com uma solução de referência de pH conhecido e cujo potencial se mantém constante [53], [57], [58]. Atualmente, o mais comum é que estes dois elétrodos se encontrem apenas num, isto é, um eletrodo de vidro que internamente contém um eletrodo de referência imerso numa solução de referência e um eletrodo indicador que, ao estar em contacto com a solução que se pretende analisar através da membrana de vidro, regista uma diferença de potencial em relação à referência que pode ser captada por um potenciómetro que, automaticamente, calcula o pH da solução analisada [53], [58].

A solução de referência que se encontra no interior do eléctrodo, em contacto com o eléctrodo de referência, deve ser renovada com regularidade, de forma a garantir que a sua concentração não se vai alterando, o que pode induzir desvios na medição de potencial. A solução eletrolítica onde a membrana de vidro do eléctrodo é deixada a repousar também deve ser substituída frequentemente pois existe tendência a criar precipitado, podendo impactar as medições de diferença de potencial. Para a determinação do pH, utilizou-se um potenciómetro Metrohm 691 e um eléctrodo combinado de vidro da marca Mettler Toledo com sensor de temperatura incorporado. O eléctrodo é calibrado diariamente pelos analistas do CQ.

1.3.1. Titulação Potenciométrica Automática

A titulação potenciométrica é uma titulação volumétrica que utiliza a variação da diferença de potencial eléctrico para determinar o ponto final de uma titulação e, conseqüentemente, determinar a concentração de um analito presente na solução analisada. O ponto final de uma titulação marca o ponto em que a reacção estequiométrica está completa, ou seja, o ponto em que o analito reagiu completamente com o titulante e em que é possível relacionar as concentrações e volumes do titulante e do titulado [57], [58].

É possível determinar o volume de titulante que é necessário para chegar ao ponto final de uma titulação de forma manual, ou seja, realizando uma titulação com recurso a um indicador que responde a mudanças de pH da solução mudando de cor. As titulações, manuais ou automáticas, são ensaios muito úteis pois permitem calcular a concentração desconhecida de um componente químico presente na solução [57].

Apesar de ser uma técnica muito utilizada, por ser barata e simples, apresenta algumas desvantagens, sendo a mais óbvia estar sujeita a erros humanos como por exemplo, pouca sensibilidade para adicionar pequenos volumes de titulante de cada vez através da bureta ou a incapacidade de perceber de imediato a mudança de cor do indicador. Estes fatores contribuem para que seja uma técnica pouco reprodutível. Neste aspeto, a titulação potenciométrica revela-se vantajosa, pois não depende da sensibilidade técnica do analista, sendo por isso mais reprodutível [57].

A titulação potenciométrica baseia-se no princípio de que o ponto final da titulação é alcançado quando ocorre a diferença máxima e repentina de potencial eléctrico (figura 7) [53], [57], [58]. Este sistema de titulação é, então, constituído por um eléctrodo de referência, um eléctrodo indicador e um potenciómetro para a leitura da diferença de potencial. O eléctrodo de referência encontra-se submerso numa solução que não varia muito de potencial e que é de pH conhecido, servindo de referência para o eléctrodo indicador, que se encontra mergulhado na solução cuja

concentração é desconhecida. No caso do titulador automático também se utiliza um eletrodo combinado [53], [57], [59].

Através da bureta ligada ao titulador, o titulante com concentração conhecida, vai sendo adicionado ao vaso de titulação até que o eletrodo regista a diferença máxima de potencial elétrico aquando do ponto final da titulação. Numa representação gráfica, como a da figura 7, teremos uma curva de potencial elétrico em função de volume adicionado, sendo possível determinar exatamente qual foi o volume de titulante necessário para que ocorresse a diferença de potencial máxima, pois o titulador regista cada incremento mínimo de volume [57]. Ao conhecer o volume de titulante, é possível obter a concentração de analito da amostra analisada e assim saber o grau de pureza da matéria-prima em questão.

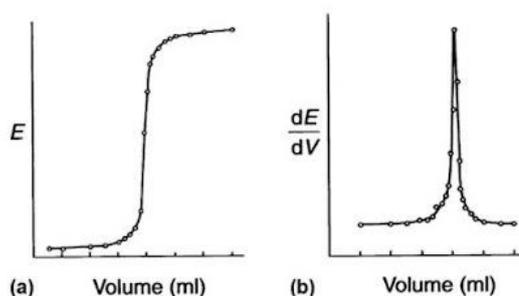


Figura 7 – Curva de potencial elétrico em função do volume de titulante adicionado (a); primeira derivada da curva de potencial elétrico, para cálculo do volume correspondente ao pico de potencial (b). Retirado de [60].

O equipamento utilizado é um titulador automático (Compact Titrator G20S) da marca Mettler Toledo equipado com um eletrodo combinado também ele da marca Mettler Toledo. Na figura 8, pode-se observar o sistema típico de um titulador automático.

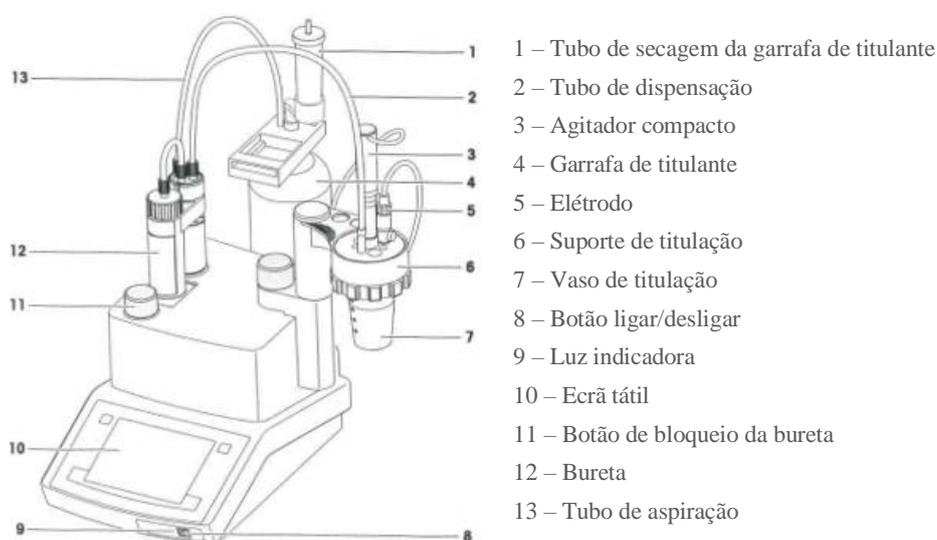


Figura 8 – Representação esquemática de um titulador automático. Retirado de [59].

A amostra a analisar é dissolvida num solvente específico de acordo com o método experimental que se utiliza e é colocada no vaso de titulação. O eletrodo combinado é responsável por registar as diferenças de potencial elétrico que acontecem ao longo da titulação e encontra-se submerso na mistura no vaso de titulação. A garrafa que contém o titulante está ligada ao vaso de titulação pelo tubo de dispensação da bureta, que adiciona pequenos volumes de titulante à mistura tendo em conta a resposta do eletrodo.

A curva de titulação do potencial elétrico medido em função do volume adicionado de titulante pode ser consultada no ecrã do equipamento em tempo real. Neste ecrã também é possível selecionar métodos para as diferentes análises que ficam gravados na memória interna do equipamento [59].

1.4. Determinação do teor de água

A presença de humidade numa mistura é um dado importante que pode influenciar a sua utilização em várias áreas de aplicação como é o caso de formulações farmacêuticas, cosméticas ou até alimentares. Algumas propriedades como a força mecânica, corrosão, atividade biológica, características de volume, entre outras, podem ser afetadas pela quantidade de moléculas de água, ou de outros componentes voláteis, presentes numa determinada mistura [61].

A quantidade de humidade de um determinado composto não significa necessariamente que se trate de água, pode incluir outros constituintes voláteis não discriminados. A humidade de materiais farmacêuticos como excipientes ou materiais de acondicionamento é um fator determinante na sua estabilidade e tempo de validade. A presença de água também pode ser um fator importante quando esta é usada como um excipiente com função de veículo, por exemplo em cremes ou géis de aplicação tópica, em que é necessário que os princípios ativos estejam dissolvidos num solvente de forma a serem absorvidos pelo organismo [61].

Não obstante às várias funções que a água pode tomar, a maioria das vezes, a sua presença é um grande interferente. Isto é, a concentração de água numa matéria-prima, pode fazer variar a concentração de analito e conduzir a erros nos resultados de um doseamento de substância [51].

Neste trabalho, são apresentadas duas formas distintas de estudar a humidade de uma determinada amostra, sendo que a perda por secagem é menos específica, pois, como foi referido anteriormente, a massa que evapora, pode não ser exclusivamente referente a água, mas também a outras moléculas voláteis [61]. Em alternativa, a determinação da quantidade de água por Titulação Karl Fischer é mais específica, quantificando apenas as moléculas de água da amostra.

1.4.1. Perda por secagem

A perda por secagem é um método fundamental, muito utilizado para determinar a humidade de amostras sólidas. Em termos práticos, pesa-se uma determinada quantidade de amostra que é colocada numa estufa de secagem durante um determinado intervalo de tempo, a uma determinada temperatura. Desta forma, é possível quantificar a massa de matéria que secou enquanto a amostra esteve na estufa [53], [61].

Os protocolos para a preparação da amostra podem variar, assim como a temperatura a que deve ser sujeita ou o tempo que deve estar na estufa de secagem [53]. Todos estes detalhes estão presentes na especificação das matérias-primas em causa ou nas monografias da Farmacopeia Europeia.

O procedimento usual, quando a especificação não refere condições particulares, é secar a amostra até massa constante, o que significa que duas pesagens consecutivas não diferem entre si em mais do que 0,5 mg [53].

A matéria-prima deve ser colocada em placas de Petri em vidro com diâmetro adequado para que a amostra fique espalhada pela superfície da placa. A referida placa deve ser previamente seca na estufa de forma a retirar qualquer humidade que possa estar retida na mesma, para que não haja interferência nos cálculos, e arrefecida num exsiccador apropriado para o efeito, a temperatura ambiente. A matéria-prima é colocada na estufa de secagem que, habitualmente se encontra a uma temperatura de 100 ± 5 °C, durante intervalos de uma hora, sendo sempre pesada depois desse intervalo, até se obter uma massa constante. O cálculo que reflete a perda que a amostra sofreu durante a secagem, é calculado em percentagem em relação à massa inicial.

$$\% (m/m) = \frac{(m_{\text{inicial da placa}} + m_{\text{amostra}}) - m_{\text{final da placa}}}{m_{\text{amostra}}} \times 100$$

1.4.2. Titulação por Karl Fischer

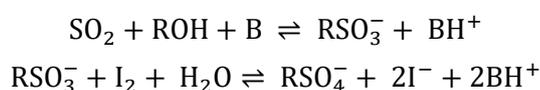
Em 1935, Karl Fischer publicou um método para determinar quantidades vestigiais de água numa dada amostra que mais tarde viria a ficar conhecido com o seu nome. Desde a sua introdução em laboratório, primeiro manual e depois automatizada, que a titulação por Karl Fischer passou a ser uma técnica de excelência, muito utilizada para conhecer o teor de água em vários tipos de substância [62]–[64].

A titulação por Karl Fischer baseia-se num doseamento volumétrico específico para moléculas de água, onde ocorre uma reação de oxidação-redução. Este método utiliza um titulante

particular que é conhecido como o Reagente Karl Fischer e consiste numa solução de iodo, dióxido de enxofre e uma base (inicialmente piridina) dissolvidos num álcool apropriado [51], [62], [64], [65]. A piridina usada originalmente neste método foi substituída pelo imidazole, não só para tornar o processo mais seguro para os analistas, pois a piridina é potencialmente carcinogénica e muito poluente, como também para acelerar a reação [64], [65].

No laboratório do CQ da Labialfarma, o reagente usado é de compra do fabricante Scharlau - Aquagent® Complet 5K. Este reagente contém imidazole, em vez de piridina, iodo e dióxido de enxofre, diluídos em éter monoetílico de dietilenoglicol. A titulação que ocorre no equipamento Karl Fischer baseia-se na reação oxidativa do dióxido de enxofre pelo iodo, na presença de água. O iodo é adicionado à solução até que a sua presença seja em excesso, sendo possível observar o ponto final da titulação que é detetado pela diferença de potencial elétrico, como acontece no titulador automático [51], [64], [66].

O mecanismo de reação é iniciado pela estabilização do dióxido de enxofre por formação de um aduto com um álcool (ROH), geralmente metanol, o que resulta na formação de um alquilsulfito que vai ser oxidado pelo iodo (I₂), quando existe água no meio reacional. O álcool estabiliza o agente redutor e tem a função de preservar a estequiometria da reação (1:1), [51], [62], [64], [67]:



O ponto final da reação ocorre quando toda a água presente no meio reacional é consumida, o que é possível observar em algumas amostras pois o meio reacional desenvolve uma coloração acastanhada que se deve ao excesso de iodo proveniente do titulante, o reagente Karl Fischer [51], [64].

No laboratório do CQ, é realizada quinzenalmente a determinação de título do titulante, ou sempre que a garrafa do mesmo é trocada. Esta determinação consiste em 3 repetições, em que a média deve estar compreendida entre (4,5 a 5,8) mg/ml com um desvio padrão relativo máximo de 3%. É esta determinação do título que vai fornecer a concentração de iodo presente no reagente KF, tornando possível o cálculo do teor de água da amostra [51], [66].

O cálculo da percentagem de água é feito automaticamente pelo equipamento, pela seguinte equação:

$$\% \text{H}_2\text{O} = 0,1 \times \left(\frac{V_t \times C_{\text{KF}}}{m} \right)$$

Em que V_i representa o volume de titulante que foi gasto em ml, C_{KF} é a concentração de I_2 presente no reagente KF (título), expresso em mg/ml e m é a massa de amostra introduzida em g [51], [66].

O titulador volumétrico Karl Fischer utilizado é da marca Mettler Toledo, modelo V10S e apresenta (figura 9):

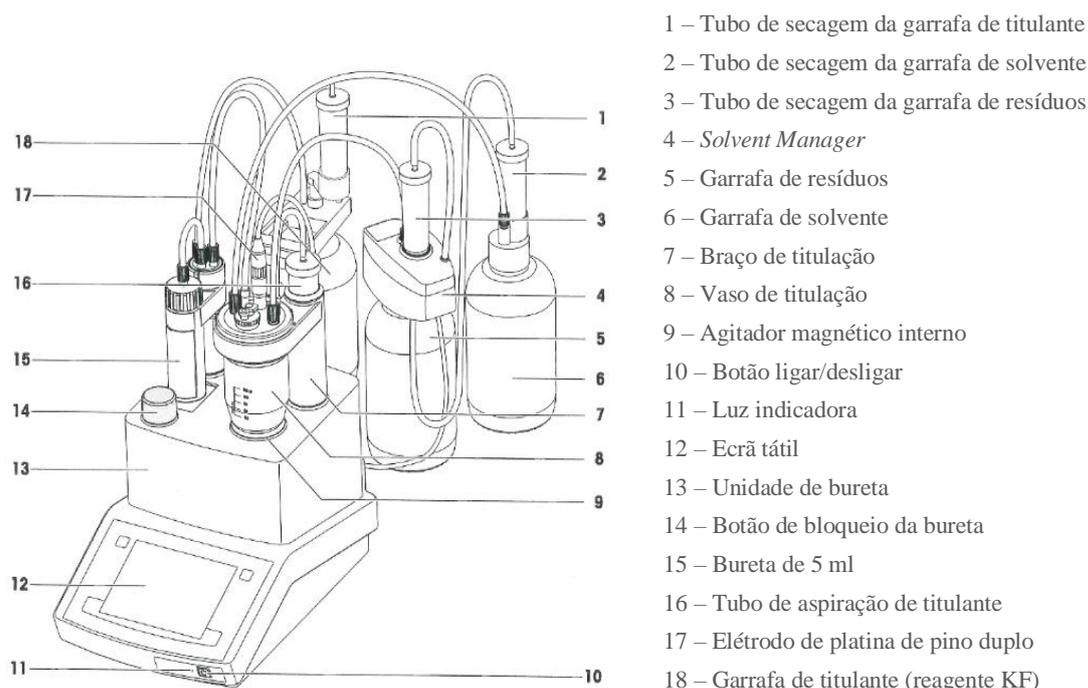


Figura 9 – Esquema de um sistema de titulação KF. Retirado de [66].

A amostra é adicionada ao vaso de titulação que contém metanol como solvente e um agitador magnético. O eléctrodo submerso no meio reacional regista as diferenças de potencial eléctrico em função do volume de reagente KF (titulante) adicionado por meio da bureta. A curva de potencial eléctrico pode ser observada no ecrã do equipamento em tempo real. Por meio do ecrã tátil do equipamento, também é possível seleccionar várias operações, tais como a introdução de dados relativos à amostra analisada, a determinação do título, aceder à bomba para descartar o conteúdo do vaso de titulação para a garrafa de resíduos, ou para o encher de novo com solvente, entre outras.

Todos os reagentes que intervêm no processo, encontram-se em garrafas ligadas a tubos de secagem, garantindo assim que a humidade residual que possam apresentar não interfere na reacção que ocorre no vaso de titulação.

1.5. Cinzas sulfúricas

O teste às cinzas sulfúricas de uma matéria-prima serve para determinar a quantidade de impurezas inorgânicas presentes na mesma. É um ensaio limite e apenas informa sobre a presença ou ausência desses compostos inorgânicos. Geralmente, a especificação que acompanha a matéria-prima, determina um limite ou um intervalo de valores entre os quais o resultado das cinzas sulfúricas pode estar [57].

O procedimento experimental consiste em pesar 1 g, ou a quantidade prescrita na especificação da matéria-prima, num cadinho de cerâmica, previamente seco na mufla a 600 ± 50 °C durante 30 minutos e pesado depois de arrefecer no exsiccador de vidro. O cadinho contendo a matéria-prima é colocado numa placa de aquecimento, na qual se vai aumentando gradualmente a temperatura à medida que, lentamente, se adicionam 2 ml de ácido sulfúrico. O ácido sulfúrico é adicionado para facilitar a destruição dos componentes orgânicos da matéria-prima e também para fixar certos metais que possam estar presentes, impedindo-os de volatilizar [53], [57].

É uma análise algo simples, mas que requer cuidado no manuseamento do ácido sulfúrico, da placa de aquecimento e da mufla. Devido aos vapores e fumos produzidos, todo o processo deve ocorrer na *hotte*.

De forma geral, é um ensaio que dá uma ideia da pureza da matéria-prima com a qual se está a lidar. Não é um teste qualitativo, não sendo possível identificar quais as substâncias que compõem as cinzas que restam do processo. Para isso seria necessária a realização de testes adicionais para tentar perceber quais os compostos inorgânicos presentes na amostra. Por vezes, para obter mais informação, procede-se a um teste de solubilidade das cinzas sulfúricas, mas é um passo adicional que não foi realizado neste trabalho, até porque os limites para a quantidade de cinzas são baixos.

O cálculo das cinzas sulfúricas dá a percentagem (m/m) de cinzas em relação à massa inicial da amostra, pela seguinte expressão:

$$\% (m/m) = \frac{m_{\text{final do cadinho}} - m_{\text{inicial do cadinho}}}{m_{\text{amostra}}} \times 100$$

2. Cromatografia líquida

A cromatografia é uma técnica de separação de componentes de uma mistura, na qual a separação depende da distribuição diferencial das espécies moleculares entre duas fases não miscíveis: a fase móvel e a fase estacionária, contida numa coluna. Os métodos cromatográficos são classificados de acordo com a natureza físico-química da fase estacionária que, conseqüentemente, dita o mecanismo de separação [51], [53], [54], [68]–[71].

Na cromatografia líquida, a fase móvel é um líquido que atravessa, por percolação, a fase estacionária numa direção definida. A eluição é o processo de escoamentos dos componentes da mistura, que são arrastados pela fase móvel ao longo da fase estacionária. Os compostos da mistura que estabelecem interações mais fortes ao longo do enchimento da coluna, são eluídos mais lentamente ao longo desta, contrariamente, os que não apresentam afinidade pela coluna, escoam mais rapidamente [54], [68], [69], [72].

A separação cromatográfica de moléculas, explora e faz uso das diferentes propriedades físico-químicas dos componentes moleculares das amostras analisadas, como por exemplo: a sua solubilidade em água ou em solventes orgânicos, a sua carga (negativa ou positiva) ou o seu tamanho molecular. Tendo em conta estas características, a separação pode ser por adsorção (fase normal), fase reversa, troca iónica ou por exclusão de tamanho, respetivamente [68]–[72].

2.1. Cromatografia líquida de alta eficiência – HPLC

A cromatografia líquida de alta eficiência (*High Performance Liquid Chromatography* – HPLC) surgiu na década de 60 do século XX [69] e revolucionou a técnica cromatográfica ao introduzir a utilização de colunas com diâmetro muito reduzido e empacotadas com micropartículas, o que acelerou bastante o processo de separação. A fase móvel passa a circular sob alta pressão pela coluna, com um fluxo controlado, o que resulta numa separação cromatográfica de alta eficiência. Por consequência deste aumento de pressão, o tempo de retenção dos analitos é menor, o que permite a realização de mais análises por unidade de tempo. Outra vantagem que a técnica por HPLC apresenta é o facto de utilizar menos quantidade de fase móvel, o que possibilita a realização de análises que utilizem solventes caros, raros ou com alta toxicidade [54], [72].

Um sistema de HPLC é um circuito fechado que contém quatro componentes principais [53], [54], [68]:

- um sistema de bombagem, cujo objetivo é fornecer fase móvel ao sistema com um débito constante e de alta pressão;

- um sistema de injeção, responsável por injetar pequenos volumes de amostra na fase móvel à entrada da coluna;
- a coluna cromatográfica de separação que constitui a fase estacionária;
- um detetor que é capaz de registar os dados obtidos para depois poderem ser tratados matematicamente.

Todos estes elementos estão conectados e são resistentes a altas pressões. É um método com alta resolução, sensibilidade e reprodutibilidade, mas que acarreta custos elevados, tanto de manutenção como de operação [54], [70], [71].

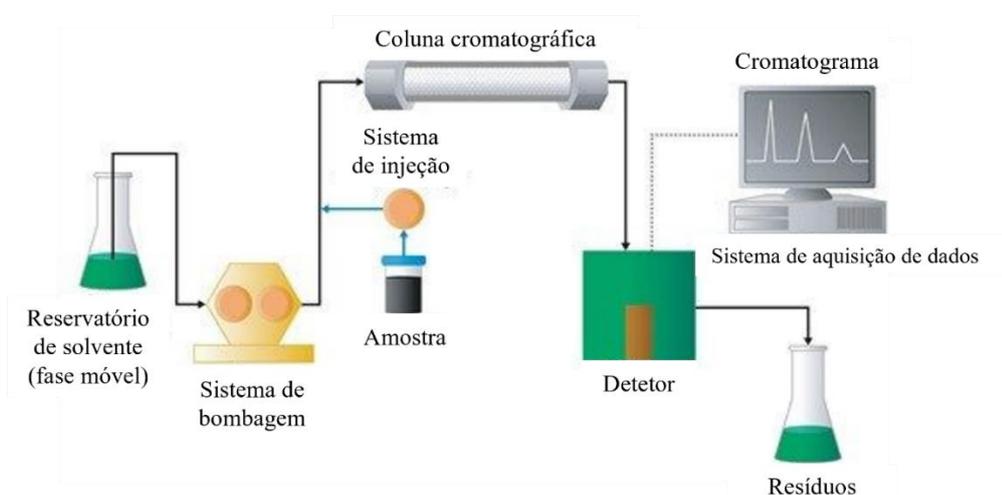


Figura 10 – Principais componentes de um sistema de HPLC. Adaptado de [73].

2.1.1. A fase móvel

A fase móvel é então o solvente, ou a mistura de solventes, que é bombeada continuamente e que transporta os analitos que vão interagir com o material que compõe a fase estacionária [54], [68].

A constituição da fase móvel pode ser constante ou variável durante o processo cromatográfico. Quando a composição da fase móvel é constante, isto é, o meio de eluição utilizado é sempre o mesmo durante a separação, estamos perante uma **eluição isocrática**. Por outro lado, alguns componentes moleculares requerem uma **eluição por gradiente**, na qual a fase móvel vai variando percentualmente em composição, alternando entre solventes orgânicos que, geralmente diferem entre si ao nível da polaridade. Apesar de parecer que a eluição por gradiente é mais competente na separação cromatográfica, também apresenta algumas desvantagens, sendo a mais aparente a de custo, pois é necessária uma bomba dotada de um misturador como também o facto de acelerar a regeneração da coluna devido à oscilação de fase móvel. Por ser um sistema com

tanta sensibilidade, os solventes utilizados devem ser sempre o mais puros possível e apresentar “grau HPLC” [68], [69], [72], [74].

Neste trabalho utilizou-se uma fase móvel preparada no momento, para ser usada em eluição isocrática e consistindo numa solução de 1 ml de ácido ortofosfórico em 2 litros de água purificada, com pH=3. Mas, em alternativa, se a especificação das matérias-primas que foram analisadas indicasse a utilização de uma fase móvel variável, os solventes contidos nos reservatórios ligados aos canais do equipamento podiam ser dispensados por meio das bombas individuais comandadas por válvulas de débito proporcional, preparando a mistura de solventes nas proporções definidas [68].

Em HPLC é imperativo adequar a fase móvel à amostra que se pretende analisar e ao equipamento que vai ser utilizado. Existem vários fatores que determinam a escolha da fase móvel, como por exemplo, a polaridade, que determina o poder de eluição, tendo em conta a polaridade da fase estacionária. A fase móvel também deve apresentar baixa viscosidade, para facilitar a sua difusão pelos elementos do sistema e pela própria coluna [68]–[71].

Os componentes da fase móvel e a própria fase móvel são geralmente filtrados para eliminar partículas de tamanho superior a 0,45 μm , garantido que não se irá dar a separação cromatográfica de substâncias contaminantes que os solventes possam ter [53], [68].

2.1.2. A fase estacionária

A fase estacionária é constituída pelas micropartículas que se encontram empacotadas dentro da coluna cromatográfica. Normalmente as colunas são de aço inoxidável e apresentam um diâmetro interno reduzido, compreendido entre 2 a 5 mm e comprimento variável, podendo ter diferentes aspetos [69]. As fases estacionárias mais utilizadas são constituídas por partículas de tamanho ínfimo, entre os 3 e os 10 μm [54]. Quanto menor for o tamanho das partículas que constituem a fase móvel, menor é a distância de contacto entre o soluto e fase móvel, ou seja, mais eficaz será a separação pois o processo de difusão das moléculas da amostra fica incrementado [68].

As características físico-químicas da fase estacionária são aspetos muito importantes a ter em conta, pois são elas que vão ditar a separação e retenção dos diferentes analitos. Estas características podem variar e são escolhidas conforme o sistema experimental [54]. Neste trabalho, foi utilizada uma coluna empacotada com partículas totalmente porosas com tamanho de 5 μm , consistindo em sílica ligada a cadeias de carbono octil, sendo, por isso designada por C8. É muito utilizada para separações em fase reversa, sendo estável num gama de pH entre 2 – 7,5.

A polaridade da fase estacionária é um dos principais fatores que influencia a separação, de tal forma que mediante este atributo, a cromatografia classifica-se por fase normal ou reversa [54], [69], [72], [75].

- Na cromatografia de **fase normal**, utiliza-se uma fase estacionária polar, geralmente sílica, para reter analitos apolares e uma fase móvel apolar ou de baixa polaridade. Neste caso, os solutos mais apolares são eluídos primeiro, apresentando um menor tempo de retenção, enquanto os polares são retidos pela coluna, sendo eluídos em último lugar e apresentando um maior tempo de retenção [53], [54], [69], [72], [75].
- Por outro lado, na cromatografia de **fase reversa**, a fase móvel é polar, muitas vezes aquosa e a fase estacionária consiste num suporte de sílica ligado a grupos funcionais apolares que interagem com os analitos polares. Os constituintes polares são eluídos primeiro e os apolares são eluídos por último [53], [54], [69], [72], [75].

O material mais utilizado como enchimento de uma coluna cromatográfica, normalmente usada em cromatografia de fase normal, é a sílica, devido ao pequeno tamanho das suas partículas e porosidade, para além de que é inerte e tendencialmente não reage com a fase móvel. O pH da fase móvel é um fator importante pois se este for superior a 8 pode resultar na dissolução da coluna [68]. Outras fases estacionárias bastante utilizadas são a grafite porosa, resinas, suportes modificados de sílica, entre outras [53], [68].

Na cromatografia de fase reversa, os compostos apolares ou pouco polares são mais fortemente retidos na fase estacionária do que na fase móvel. A retenção de um composto na fase estacionária é tanto maior quanto menor for a sua solubilidade na fase móvel [54].

Para que um soluto seja retido pelo sistema cromatográfico, este tem que ser transferido da fase móvel para a fase estacionária. Este processo pode dar-se por: partição, adsorção ou combinação dos dois. Numa separação por partição, o soluto está praticamente todo embebido na fase estacionária, já numa separação por adsorção, o soluto está apenas em contacto superficial com a fase estacionária [53], [54], [68], [72].

Não só se deve adequar a fase móvel e a fase estacionária ao ensaio, bem como é necessário garantir que o detetor utilizado é compatível e capaz de reconhecer o comprimento de onda (ou intervalo) onde é esperado encontrar sinal. O detetor encontra-se posicionado no final do circuito de HPLC, de forma a monitorizar o fluxo da fase móvel à saída da coluna e, assim, ser capaz de perceber e registar o sinal dado pela eluição de um componente [75]. O detetor deve apresentar suficiente sensibilidade para detetar pequenas quantidades de amostra; ter estabilidade mesmo

quando há variações de temperatura e de fluxo; demonstrar reprodutibilidade; deve realizar uma leitura contínua e o sinal deve manter uma relação linear com a concentração da amostra [54], [75], [76].

Os detetores mais utilizados em HPLC são os espectrofotométricos (UV/Vis; Fluorescência), condutométricos e refratométricos. Cada um deles apresenta limites de detecção distintos, bem como aplicações [76]. A função do detetor é registrar o tempo e a quantidade de substância que é eluída da coluna. O detetor percebe esta mudança de composição do eluente e converte-a num sinal elétrico que pode ser estudado e tratado num programa de análise de dados adequado ao efeito [68], [76].

2.1.3. O cromatograma – Identificação e Quantificação

Os analitos separados que são transportados pela fase móvel são interceptados como picos de sinal pelo detetor. O conjunto desses picos forma um cromatograma. Um cromatograma é uma representação gráfica da resposta de um detetor, representando a concentração de analito em função do tempo ou do volume de eluição [51], [54], [68], [70], [71]. Idealmente, um cromatograma apresenta-se como uma sequência de picos gaussianos sobre uma linha de base. Na figura 12, encontra-se um esquema geral de um cromatograma e as grandezas informativas que dele podemos retirar.

A informação qualitativa que pode ser retirada da análise é dada pelo próprio pico, pelas suas características visuais (forma, intensidade, tempo de retenção). Já a área do pico é proporcional à concentração da substância a analisar. O software de análise de dados utiliza uma função de integração para calcular área do pico, permitindo a obtenção da concentração [57], [68].

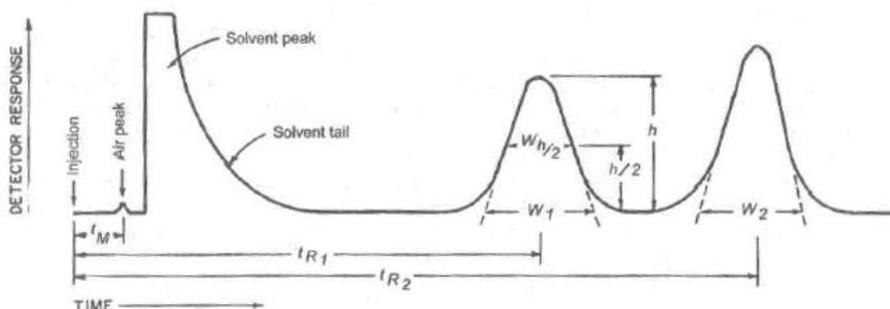


Figura 11 – Representação simplificada da separação cromatográfica de duas substâncias (1 e 2). Retirado de [57]. Ver texto abaixo para o significado dos símbolos apresentados.

Na figura 11 é possível observar alguns dos parâmetros que caracterizam a separação cromatográfica e que são passíveis de extrair do cromatograma obtido [51], [54], [57], [69]–[71], [77]:

- **t_M** : tempo morto. É o tempo que um soluto que não foi retido na coluna demora para ser eluído, isto é, um soluto que não é adsorvido pela fase estacionária;
- **t_R** : tempo de retenção. É o tempo decorrido entre a injeção da amostra e o ápice do pico cromatográfico do analito, ou seja, o tempo que um soluto demora a ser totalmente eluído da coluna. A partir do tempo de retenção pode calcular-se o volume de retenção (V_R), multiplicando-o pelo fluxo da fase móvel. O volume de retenção é então o volume de fase móvel necessário para eluir o componente;
- **h** : altura do pico;
- **$h/2$** : meia altura do pico;
- **W** : é a largura do pico na linha de base, obtida por extrapolação das laterais do pico;
- **$W_{h/2}$** : largura a meia altura do pico de eluição;
- **k'** : fator de retenção ou fator de capacidade. Corresponde ao intervalo de tempo que um soluto permanece na fase estacionária em relação à fase móvel. É dado por

$$k' = \frac{t_R - t_M}{t_M}$$

Isto é, a distribuição de substância entre a fase móvel e a fase estacionária.

- **r** : retenção relativa. É a razão entre o tempo de retenção ajustado de um componente em relação ao de outro componente, nas mesmas condições analíticas. É dado por

$$r = \frac{t_{r2} - t_M}{t_{r1} - t_M}$$

Em que t_{r2} é o tempo de retenção medido a partir do ponto de injeção do componente de interesse e t_{r1} é o tempo de retenção medido a partir do ponto de injeção do componente de referência.

- **RRT**: tempo de retenção relativo. Define o tempo de retenção de um determinado analito em relação ao tempo de retenção do mesmo analito numa outra análise, por exemplo, um padrão. Isto é, consiste no quociente entre o tempo de retenção obtido na amostra e o tempo de retenção obtido no padrão.
- **N**: número de pratos teóricos. Parâmetro que representa uma medida do desempenho da coluna, avaliando a sua eficiência. É calculado por:

$$N = 16 \times \left(\frac{t_R}{W} \right)^2 = 5,54 \times \left(\frac{t_R}{W_{h/2}} \right)^2$$

para picos gaussianos, em que t_r é o tempo de retenção da substância, W é a largura do pico na linha de base e $W_{h/2}$ é a largura do pico a meia altura. O valor de N depende da substância que se está a analisar, das condições experimentais tais como o fluxo e viscosidade da fase móvel e das características da coluna como a qualidade e uniformidade do empacotamento. Quanto maior for o valor de N , mais eficiente terá sido a separação cromatográfica.

- **A_S**: Fator de simetria (*tailing factor*). É dado por:

$$A_S = \frac{W_{0,05}}{2f}$$

em que $W_{0,05}$ é a largura do pico a uma altura de 5% e f é a distância do pico da linha central ao início do pico. Representa a medida de divergência de um sinal cromatográfico relativamente à sua forma ideal. Um pico perfeitamente simétrico e gaussiano apresentaria um fator de simetria de 1.

- **R_S**: Resolução. É a separação entre dois picos, calculada por:

$$R_S = 1,18 \times \left(\frac{t_{r2} - t_{r1}}{W_{1,h/2} + W_{2,h/2}} \right)$$

Em que t_{r2} tem de ser superior a t_{r1} ; $W_{1,h/2}$ e $W_{2,h/2}$ correspondem à largura do pico a meia altura de cada componente. Pela Farmacopeia europeia, é recomendado que a resolução seja superior a 1,5.

- **S/N:** Razão sinal/ruído. Mede a precisão da quantificação, sendo importante para avaliar a conformidade do sistema. É dado pela expressão $S/N = \frac{2H}{h}$, em que H é a altura do sinal cromatográfico e h representa a altura do ruído presente no cromatograma (figura 12).

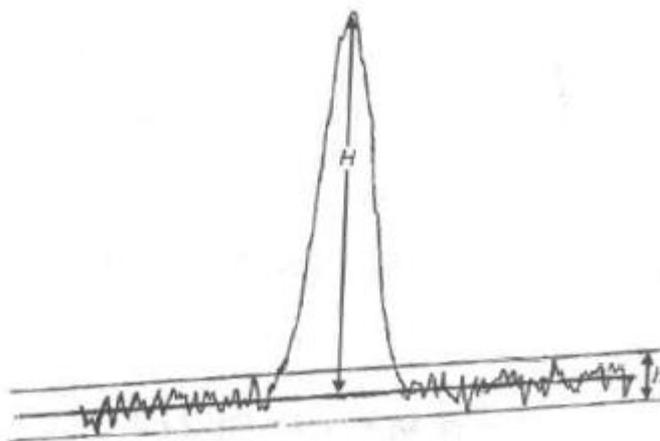


Figura 12 – Relação sinal/ruído de um pico cromatográfico. Retirado de [57].

Alguns dos parâmetros acima mencionados não informam necessariamente sobre o pico, ou a concentração da amostra a analisar, mas têm uma função de máxima importância que é garantir a conformidade do sistema (*system suitability*), isto é, avaliar se a coluna cromatográfica e outros aspectos da separação são adequados ao procedimento experimental, comprovando a veracidade, especificidade e sensibilidade da análise realizada [51], [71].

Em Controlo de Qualidade utilizam-se alguns destes parâmetros para obter valores experimentais da concentração de certos analitos, tornando possível calcular a pureza da amostra. Estes ensaios aplicam-se a matérias-primas, determinação de princípios ativos ou substâncias aparentadas de produto acabado e em testes de estabilidade. A especificação que acompanha cada amostra pode exigir um ou mais parâmetros de conformidade de sistema, como o número de pratos teóricos ou o fator de simetria, sendo que cada procedimento de análise se encontra desenhado de acordo com o objeto de estudo [68].

A identificação e quantificação dos componentes de uma amostra é feita através da comparação dos cromatogramas obtidos das amostras com os obtidos pelos padrões. Estes padrões são normalmente eluídos e preparados nas mesmas condições da amostra a ser analisada.

3. Soluções e Reagentes

As soluções utilizadas ao longo das análises efetuadas, são elaboradas de acordo com a Farmacopeia Europeia que explicita como deve ser preparada a solução em causa. É prática obrigatória no CQ da Labialfarma, registar todas as soluções que são feitas, atribuindo-lhes um lote e uma data de validade. Este registo é feito num *logbook* de soluções, sendo que existe um para as soluções gerais e outro para fases móveis. Usualmente as soluções gerais têm uma data de validade de 3 meses menos um dia relativamente à data da sua preparação, enquanto as fases móveis têm 2 meses menos um dia de validade em relação à data de preparação. As soluções são então guardadas em recipientes apropriados às suas características químicas com uma etiqueta identificativa, a menos que a Farmacopeia indique que devem ser preparadas de fresco sempre que são necessárias.

Nos cadernos de registo, é necessário escrever o nome da solução, atribuir-lhe um lote interno, registar os reagentes e a instrumentação utilizada, assinar e datar. A instrumentação utilizada é normalmente uma balança analítica, sendo que existem várias no laboratório e cada uma está identificada com um código interno de equipamento. O analista regista a massa que pesou de reagente, em que balança o fez e também a marca e o lote do reagente utilizado. Se o reagente for um líquido, regista-se, de igual forma, o volume utilizado, o lote e a marca.

A água purificada quando utilizada, também tem de ser registada, sendo que o seu lote é-lhe atribuído com base na semana do ano em que nos encontramos.

De seguida encontram-se as várias soluções que foram utilizadas neste trabalho, bem como as quantidades de reagente, a marca e o lote dos mesmos.

Solução Primária Vermelha

- 6,0320 g cloreto de cobalto hexahidratado da marca Chem-Lab, lote:28.7422901 e 2,5 ml de ácido clorídrico 37% da marca Chem-Lab, lote:29.0400401 para 100 ml de água purificada.

Solução Primária Amarela

- 4,6312 g cloreto de ferro hexahidratado da marca Chem-Lab, lote:27.8563010 e 2,5 ml de ácido clorídrico 37% da marca Chem-Lab, lote:29.0400401 para 100 ml de água purificada.

Solução Primária Azul

- 6.3385 g sulfato de cobre pentahidratado da marca Panreac, lote: 0001157961 e 2,5 ml de ácido clorídrico 37% da marca Chem-Lab, lote:29.0400401 para 100 ml de água purificada.

Solução de Ácido Clorídrico (10g/L)

Metodologia analítica para análise de glucosamina por HPLC e análise físico-química de edulcorantes e açúcares

- 2,10 ml ácido clorídrico 37% da marca Chem-Lab, lote:29.0400401 para 100 ml de água purificada.

Solução Nitrato de Prata 0,1M

- 8,5031 g cristais nitrato de prata 99,9% da marca José Manuel Gomes dos Santos, lote: LP14374 para 500 ml de água purificada.

Solução Hidróxido de Amônio 6N

- 40,56 ml hidróxido de amônio 28-30% da marca Acros Organics, lote: A0414605 para 100 ml de água purificada.

Solução Carbonato de Sódio R

- 5,3024 g carbonato de sódio da marca Scharlau, lote:19425402 para 50 ml de água purificada.

Solução Sulfureto de Sódio R

- 6,0021 g sulfureto de sódio da marca thermo scientific, lote: A0437124 e 3,92 ml Glicerol da marca Scharlau, lote: 20774601 para 50 ml de água purificada.

Solução Ácido Tartárico R (150g/L)

- 15,0089 g ácido Tartárico da marca Chem-Lab, lote:26.0650208 para 100 ml de água purificada.

Solução de Ácido Acético diluído

- 57,14 ml ácido acético glacial da marca Chem-Lab, lote: 29.7162302 para 500 ml de água purificada.

Solução de Hexanitrocobaltato de sódio (100g/L)

- 1,0087g hexanitrocobaltato de sódio da marca Chem-Lab, lote: 28.1390602 para 10 ml de água purificada.

Solução Carbonato de Potássio R (150g/L)

- 15,0017 g carbonato de potássio anidro da marca Chem-Lab, lote:27.1010304 para 100 ml de água purificada.

Solução Hidróxido de Potássio (2,5g/50ml)

- 2,5085 g hidróxido de potássio da marca Chem-Lab, lote: 28.2300903 para 50 ml de água purificada.

Solução de Hidróxido de Sódio R

- 40,0552 g hidróxido de sódio da marca Chem-Lab, lote:27.5662602 para 200 ml de água purificada.

Solução Piroantimoniato de Potássio R

- 2,0308 g piroantimoniato de potássio da marca Chem-Lab, lote:29.2390710, 50 ml de Solução de Hidróxido de Potássio e 1 ml de Solução de Hidróxido de Sódio R para 150 ml de água purificada. Esta solução é deixada a repousar durante 24 horas, depois é filtrada e perfaz-se o volume para 150 ml de água purificada.

Solução ácido clorídrico 6N

- 49,8 ml ácido clorídrico 37% da marca Chem-Lab, lote: 29.0840207 para 100 ml de água purificada.

Solução Cloreto de bário (120g/L)

- 24,0012 g cloreto de bário da marca Chem-Lab, lote:27.0760409 para 200 ml de água purificada.

Solução de Ácido Sulfúrico 0,1M

- 5,6 ml ácido sulfúrico 95-97% da marca Normax, lote: 26.0870405 para 1000 ml de água purificada.

Solução Ácido Sulfúrico 0,02N

- 10 ml de solução de ácido sulfúrico 0,1M para 100 ml de água purificada.

Solução de ácido perclórico 0,1M

- 17 ml ácido perclórico 70 % da marca Chem-Lab, lote:27.3281402, 60 ml anidrido acético da marca Panreac, lote:0001831512 para 2000 ml ácido acético glacial da marca Chem-Lab, lote:29.3912008. Esta solução é deixada a repousar durante 24 horas antes de ser utilizada.

Fase móvel Glucosamina

- 1 ml ácido ortofosfórico 85% da marca Fisher Scientific, lote:1878688 para 2000 ml de água purificada. Acerto de pH para 3,00 (com hidróxido de potássio).

Metanol da marca Chem-Lab, lote: 29.5781806

Ácido Nítrico 65% da marca Chem-Lab, lote: 26.6983007

Ácido sulfúrico 95-97% da marca Normax, lote: 26.0870405

Metodologia analítica para análise de glucosamina por HPLC e análise físico-química de
edulcorantes e açúcares

Reagente Karl Fischer (Aquagent® Complet 5K) da marca Scharlau, lote: 21984301

Ácido acético glacial 99-100% da marca Chem-Lab, lote:29.5692101

Padrão Cloridrato de Glucosamina (padrão de referência Labialfarma)

Água purificada

Capítulo III – Resultados e Discussão

Resultados e Discussão

1. Edulcorantes e Açúcares

Foram analisados 3 edulcorantes diferentes e 2 açúcares por métodos físico-químicos que diariamente são aplicados na análise de matérias-primas no laboratório do CQ. Nos seguintes tópicos são apresentados o procedimento experimental seguido para cada um dos ensaios, bem como os resultados obtidos.

A especificação e o resultado de cada ensaio são apresentados sob a forma de uma tabela, idêntica ao boletim de análise que acompanha cada matéria-prima durante a sua avaliação pelos analistas do laboratório do CQ.

Como já foi sendo referido ao longo do trabalho, o procedimento experimental e o critério de aceitação para cada ensaio são definidos internamente pelo CQ, com base nas monografias existentes nas Farmacopeias disponíveis no laboratório.

Na rotina do laboratório, o resultado de cada ensaio é considerado conforme ou não conforme, estando ou não de acordo com a especificação, respetivamente. Essa conclusão é registada no boletim da análise da matéria-prima e todos os reagentes, soluções e equipamentos utilizados pelo analista são registados no seu caderno de laboratório, remetendo sempre para a análise e matéria-prima em questão. Depois de todos os ensaios do boletim de análise estarem conforme especificação, a matéria-prima é aprovada pelo responsável do CQ, podendo ser usada de forma segura no fabrico de produtos farmacêuticos.

1.1. Aspeto da matéria-prima

1.1.1. Procedimento experimental e resultados

O procedimento de análise da descrição/aspeto consiste numa análise visual e comparativa com um lote da mesma matéria-prima anteriormente aprovado, de acordo com a especificação.

Tabela 3 – Especificação e resultados Descrição/Aspeto.

Edulcorante	Especificação	Resultado/Conclusão
Sacarina sódica · 2H₂O	Cristais incolores, eflorescentes no ar seco	Conforme
Manitol	Pó cristalino branco.	Conforme
Maltitol		Conforme

Açúcar	Especificação	Resultado/Conclusão
Lactose · H₂O	Pó cristalino branco.	Conforme
Frutose		Conforme

1.2. Solubilidade

1.2.1. Procedimento experimental e resultados

O procedimento experimental para a análise de solubilidade consiste em dissolver 1 g de soluto no volume estipulado de solvente pela Farmacopeia Europeia.

Para a Sacarina sódica · 2H₂O, dissolveu-se cerca de 1 g de amostra em 10 ml de água e 1g em 100 ml de etanol 96% e em ambos os casos pode-se observar solubilização completa do soluto.

Para o Manitol e Lactose · H₂O, dissolveu-se cerca de 1 g em 10 ml de água e 0,01g em 150 ml de etanol 96% e em ambos os casos pode-se observar que ocorreu solubilização completa do soluto.

Para o Maltitol dissolveu-se cerca de 1 g em 1 ml de água e 0,01g em 150 ml de etanol 96% e observou-se igualmente solubilização completa do soluto.

Para a Frutose, dissolveu-se cerca de 1 g em 1ml de água purificada e 1 g em 10 ml de etanol 96% e obteve-se solubilização completa do soluto.

Tabela 4 – Especificação e resultado do teste de solubilidade.

Edulcorante	Especificação	Resultado/Conclusão
Sacarina sódica · 2H₂O	Facilmente solúvel em água e parcialmente solúvel em etanol (96%).	Conforme
Manitol	Facilmente solúvel em água e praticamente insolúvel em etanol (96%).	Conforme
Maltitol	Muito solúvel em água e praticamente insolúvel em etanol (96%).	Conforme
Açúcar	Especificação	Resultado/Conclusão
Lactose · H₂O	Facilmente solúvel em água e praticamente insolúvel em etanol (96%).	Conforme
Frutose	Muito solúvel em água e solúvel em etanol (96%).	Conforme

1.3. Aspeto da solução

1.3.1. Procedimento experimental e resultados

O procedimento de análise para o aspeto da solução consiste numa análise visual, comparando a solução obtida com o solvente utilizado ou com uma solução de referência preparada no momento da análise.

Para a sacarina sódica · 2H₂O dissolveram-se cerca de 2 g de amostra em 10 ml de água purificada e, para as restantes, dissolveram-se 5 g em 50 ml de água purificada.

À exceção da solução da lactose · H₂O, todas as soluções foram comparadas em termos de opalescência, turvação e cor com o solvente utilizado. Neste caso, preparou-se uma solução de referência (BY7), onde consta uma mistura de 2,4 ml de solução primária amarela, 1,0 ml de solução primária vermelha e 0,4 ml de solução primária azul, perfazendo o volume para 10 ml com uma solução de ácido clorídrico (10g/L). De seguida, dilui-se esta solução (BY) na proporção 2,5 ml para 100 ml de ácido clorídrico (10g/L) [53].

Tabela 5 – Resultados da observação do aspeto da solução.

Edulcorante	Especificação	Resultado/Conclusão
Sacarina sódica · 2H ₂ O	A solução é límpida e incolor.	Conforme
Manitol		Conforme
Maltitol		Conforme
Açúcar	Especificação	Resultado/Conclusão
Lactose · H ₂ O	A solução é límpida e não é mais corada do que a solução de referência BY7.	Conforme
Frutose	A solução é límpida e incolor.	Conforme

1.4. Identificação por Espectroscopia FTIR

1.4.1. Procedimento experimental, instrumentação e resultados

O espectro de infravermelho obtido é comparado com um padrão de referência.

Foi utilizado um espectrofotómetro e software para análise de dados da marca JASCO (FTIR-410) e JASCO Canvas, respetivamente.

Tabela 6 – Espectroscopia FTIR.

Edulcorante	Especificação	Resultado
Sacarina sódica · 2H ₂ O	O espectro de infravermelho da matéria-prima a analisar deve apresentar bandas no mesmo número de onda com intensidade semelhante às do espectro do padrão utilizado para fazer a comparação.	Conforme (Figuras 13, 14 e 15)
Manitol		Conforme (Figuras 16, 17 e 18)
Maltitol		Conforme (Figuras 19, 20 e 21)
Açúcar		Resultado
Lactose · H ₂ O		Conforme (Figuras 22, 23 e 24)

▪ Sacarina sódica · 2H₂O

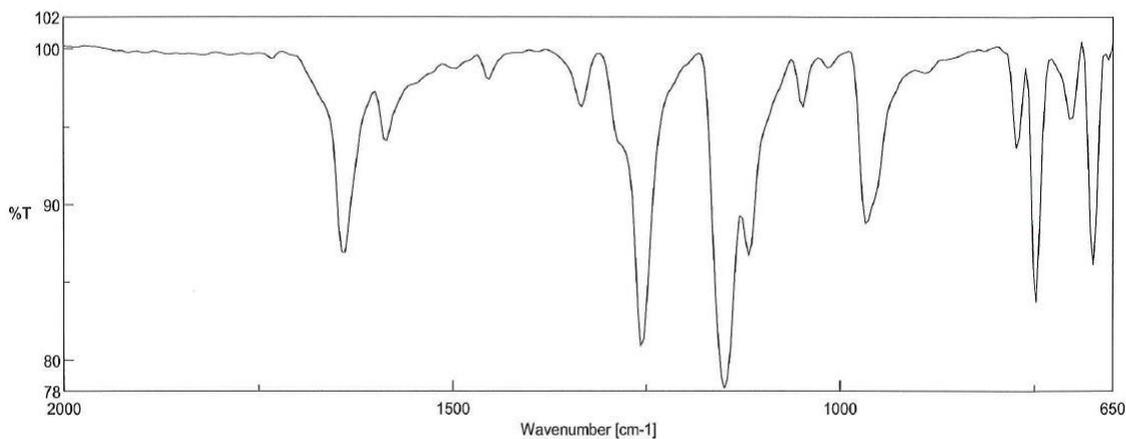


Figura 13 – Espectro obtido por FTIR para a Sacarina Sódica · 2H₂O.

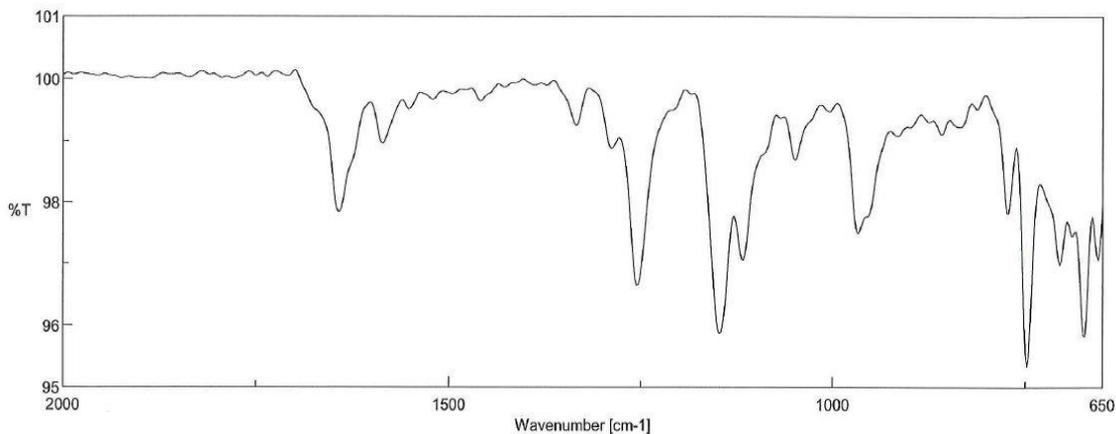


Figura 14 – Espectro obtido por FTIR do padrão de referência.

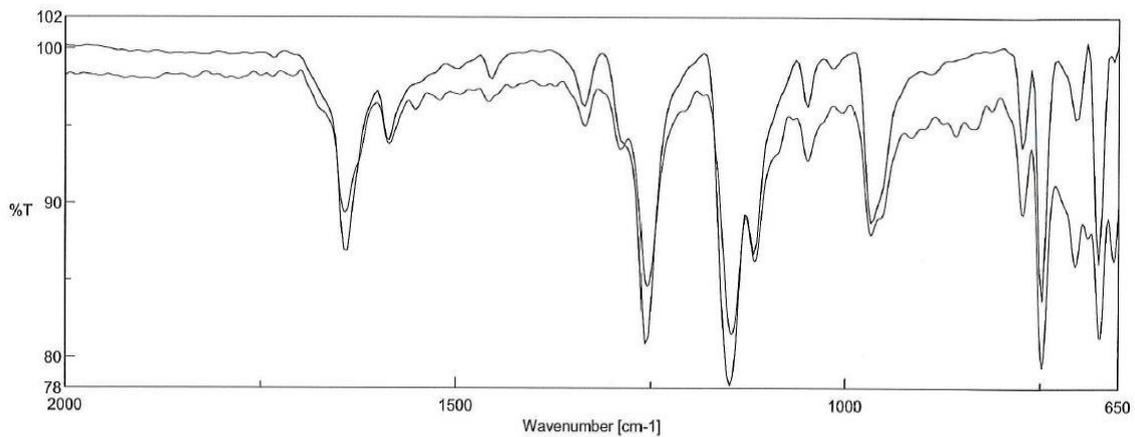


Figura 15 – Comparação dos espectros obtidos por FTIR.

Da observação da figura 15, pode-se concluir que a matéria-prima em questão revela a presença das principais bandas caracterizadoras da sacarina na mesma gama do número de onda do padrão de referência.

▪ **Manitol**

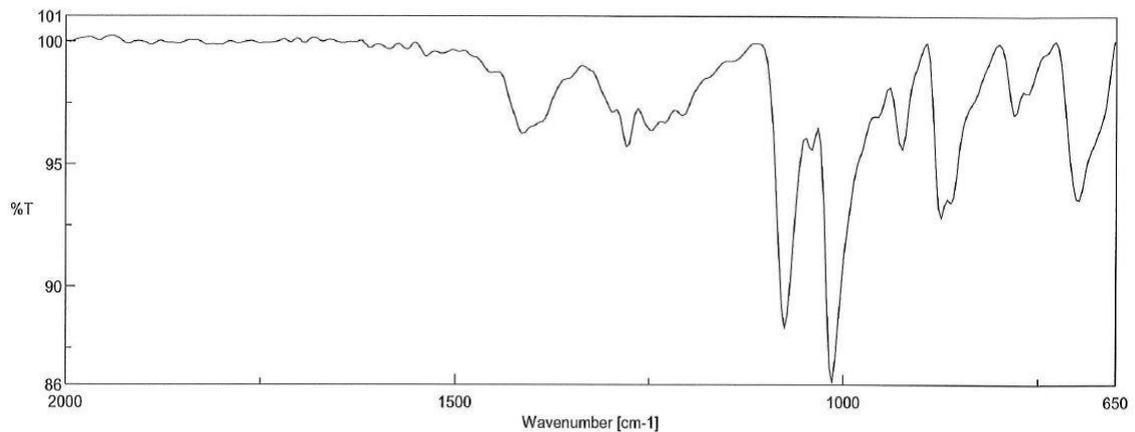


Figura 16 – Espectro obtido por FTIR para o manitol.

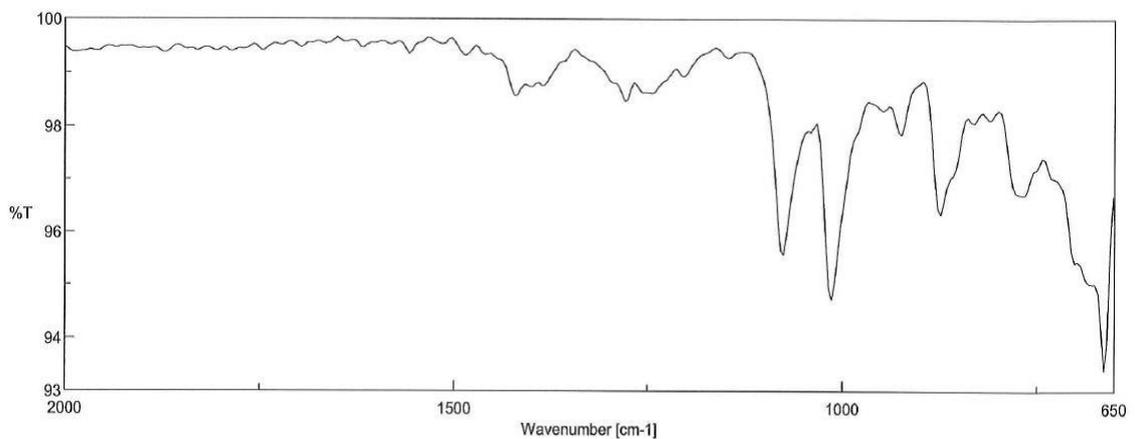


Figura 17 – Espectro obtido por FTIR do padrão de referência.

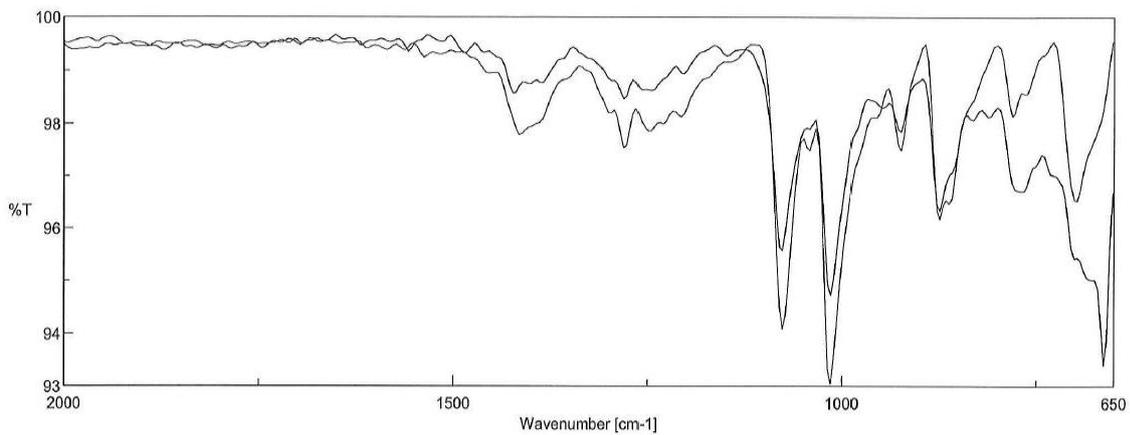


Figura 18 – Comparação dos espectros obtidos por FTIR.

Da comparação dos espectros apresentada na figura 18, conclui-se que o manitol em análise se encontra de acordo com a especificação pois o mesmo apresenta bandas ao mesmo número de onda do padrão utilizado.

▪ **Maltitol**

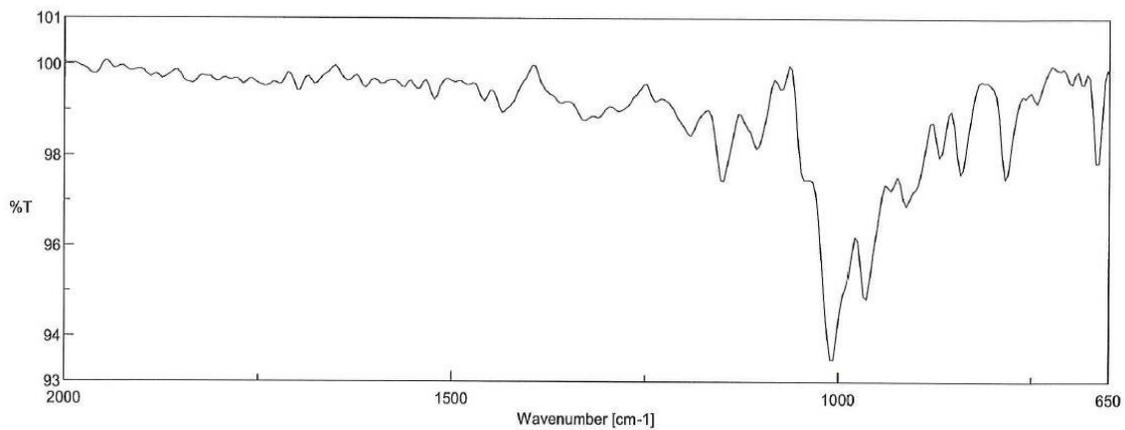


Figura 19 – Espectro obtido por FTIR para o maltitol.

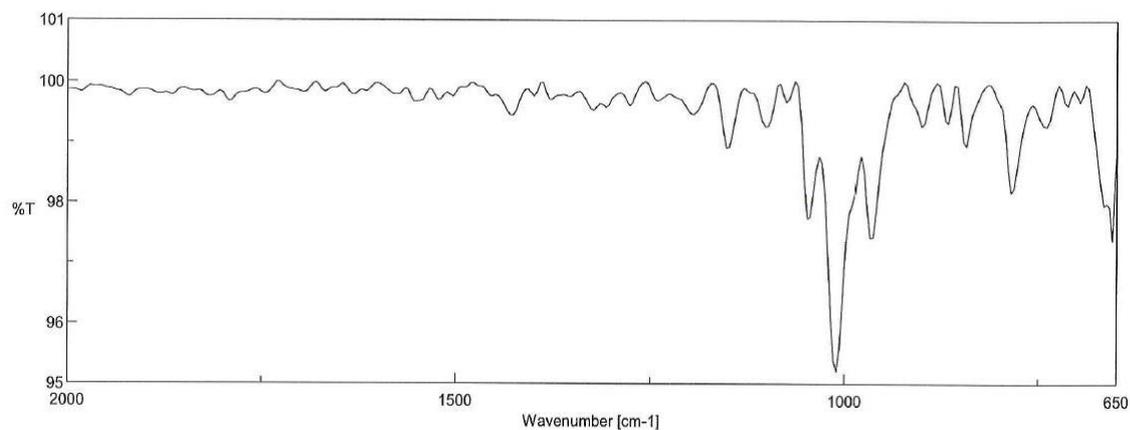


Figura 20 – Espectro obtido por FTIR do padrão de referência.

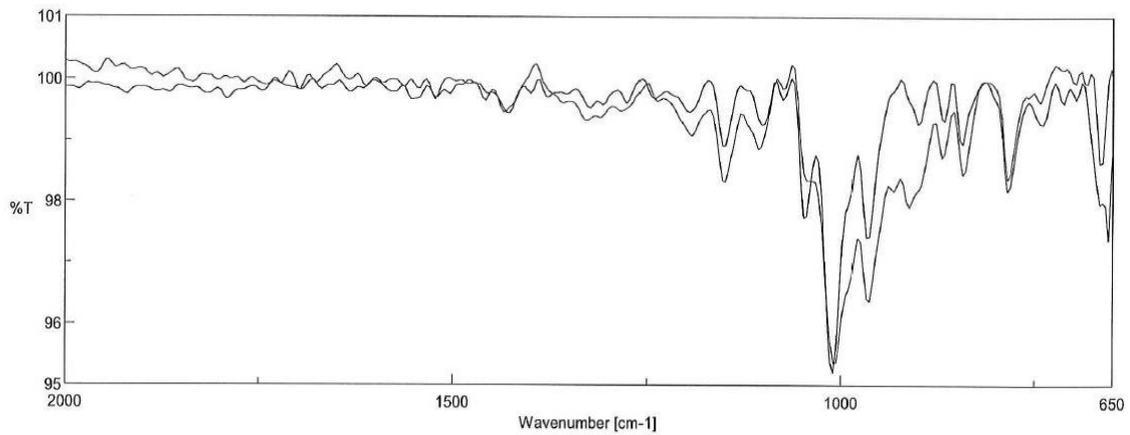


Figura 21 – Comparação dos espectros obtidos por FTIR.

Da comparação dos espectros obtidos por FTIR (figura 21) conclui-se que o maltitol se encontra de acordo com a especificação.

▪ **Lactose · H₂O**

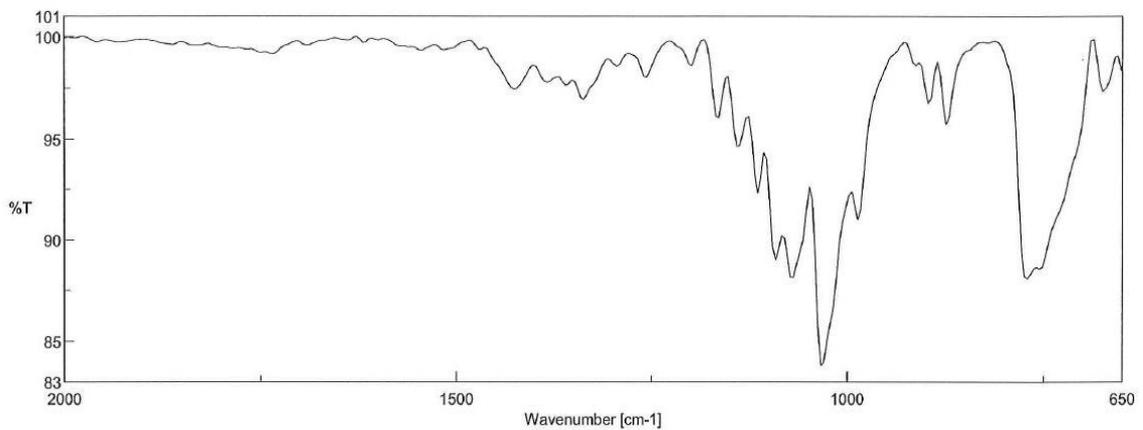


Figura 22 – Espectro obtido por FTIR para a lactose · H₂O.

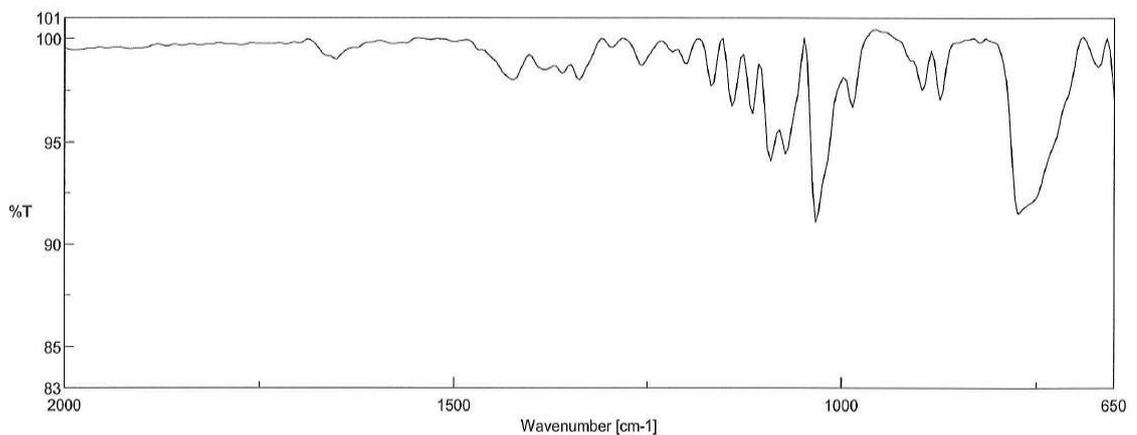


Figura 23 – Espectro obtido por FTIR do padrão de referência.

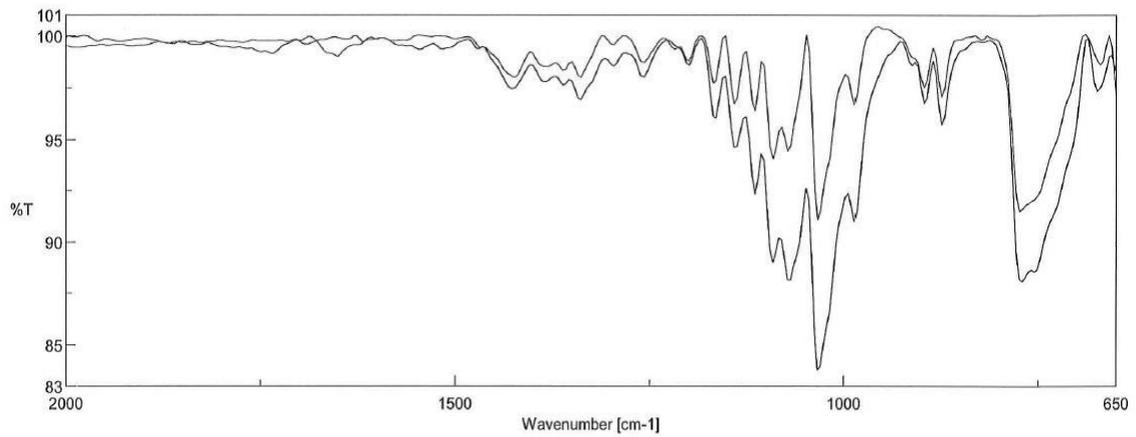


Figura 24 – Comparação dos espectros obtidos por FTIR.

Da análise da figura 24, observa-se o mesmo já discutido anteriormente, estando assim a lactose · H₂O de acordo com a especificação.

1.5. Teor de água

1.5.1. Procedimento experimental, instrumentação e resultados

Determinou-se o teor de água das matérias-primas referidas na tabela 7 por titulação volumétrica Karl Fischer. Realizaram-se 3 repetições do ensaio para cada uma delas, sendo o resultado apresentado a média das mesmas.

Dependendo da percentagem de água que é esperada para cada matéria-prima, utilizam-se massas diferentes de amostra, isto é, tendencialmente, quanto maior for o teor de água teórico da matéria-prima, menor será a massa necessária para se dar a titulação completa.

Foi usado um equipamento da marca Mettler Toledo, modelo V10S (*Volumetric KF tritator*) e uma balança analítica do mesmo fabricante.

Tabela 7 – Especificação e resultados do teor de água.

Edulcorante	Especificação	Resultado médio	Desvio-padrão σ (%)
Sacarina sódica · 2H₂O	Limite máximo de aceitação: 15%	% H ₂ O = 14,147 %	0,018 %
Maltitol	Limite máximo de aceitação: 1%	% H ₂ O = 0,011 %	0,002 %
Açúcar	Especificação	Resultado médio	Desvio-padrão σ (%)
Lactose · H₂O	Intervalo de aceitação: (4,5 – 5,5) %	% H ₂ O = 5,178 %	0,008 %
Frutose	Limite máximo de aceitação: 0,5 %	% H ₂ O = 0,036 %	0,008 %

A média obtida para os edulcorantes e açúcares em análise está dentro do critério de aceitação. O desvio-padrão preconizado pela Labialfarma é no máximo 0,2%. Estas matérias-primas apresentaram este parâmetro estatístico dentro de critério.

1.6. Cinzas sulfúricas

1.6.1. Procedimento experimental e resultados

O procedimento experimental consiste em pesar 1 g num cadinho de cerâmica, previamente seco na mufla a 600 ± 50 °C durante 30 minutos e pesado depois de arrefecer no exsiccador de vidro. O cadinho contendo a matéria-prima é colocado numa placa de aquecimento, na qual se vai aumentando gradualmente a temperatura à medida que, lentamente, se adicionam 2 ml de ácido sulfúrico.

A mistura é deixada na placa de aquecimento até à sua completa carbonização. Quando já não se verifica a libertação de fumos esbranquiçados, coloca-se o cadinho na mufla a 600 °C. O cadinho é retirado da mufla passadas duas horas e, depois de arrefecido no exsiccador, é pesado numa balança analítica. O cadinho deve ser incinerado até massa constante [53].

Tabela 8 – Especificação e resultados cinzas sulfúricas.

Açúcar	Especificação	Resultado
Lactose · H ₂ O	Limite máximo de aceitação: 0,1 %	% (m/m) = 0,069 %
Frutose	Limite máximo de aceitação: 0,1 %	% (m/m) = 0,0 %

Como se pode observar nos resultados expostos na tabela 8, Ambas as matérias-primas estão dentro do limite de especificação.

1.7. Doseamento da sacarina sódica

1.7.1. Procedimento experimental e resultados

O doseamento da sacarina sódica é feito por titulação potenciométrica no titulador automático. O mesmo consiste em dissolver cerca de 150 mg de amostra em 50 ml de ácido acético glacial. O titulante a utilizar é uma solução de ácido perclórico 0,1M padronizada. São realizadas para a análise em questão 2 amostras. Na tabela 9, são apresentadas as massas, bem como o volume de titulante gasto para cada uma das amostras.

Tabela 9 – Massa (mg) e Volume de titulante (V_T) para cada amostra de matéria-prima.

Sacarina sódica · 2H ₂ O	Massa (mg)	V _T (ml)
Amostra 1	151,5	6,238
Amostra 2	154,2	6,311

Tabela 10 – Resultado doseamento sacarina sódica · 2H₂O.

Edulcorante	Especificação	Resultado médio
Sacarina sódica · 2H₂O	(99 – 101) % para substância anidra	100,45 %

A especificação desta matéria-prima estabelece que o doseamento esteja compreendido entre 99 – 101 %, calculado em base anidra. Para tal, é necessário deduzir a contribuição das moléculas de água (utilizando o teor de água determinado no ponto 1.5., tabela 7) no teor de sacarina sódica obtido.

Desta análise obteve-se um teor médio de sacarina sódica de 100,45%. Para o calcular, recorreu-se à seguinte expressão:

$$\text{Teor (\%)} = \frac{V_T}{V_{eq \text{ titulante}} \times \text{massa}} \times \text{correspondência (mg)} \times 100 \times \frac{100}{(100 - \%H_2O)}$$

Em que V_T é o volume de titulante que foi gasto, a *correspondência*, em mg, é a massa de sacarina sódica que equivale a cada mililitro de titulante gasto (20,52 mg) e $V_{eq \text{ titulante}}$ é o ajuste que é necessário fazer ao volume de titulante. Este ajuste surge da padronização da solução de ácido perclórico 0,1M.

A padronização de uma solução é um processo necessário para calcular a concentração real da dita solução e é feito a partir da relação estequiométrica da solução com um padrão com uma concentração conhecida. No caso da solução de ácido perclórico 0,1M utiliza-se ftalato de potássio que por ser um sólido estável tanto ao ar, como em solução, fácil de pesar e com alto grau de pureza, é empregue como padrão primário.

A padronização da solução de ácido perclórico 0,1M é feita por titulação manual e está sujeita a duas repetições, seguindo o protocolo experimental descrito na Farmacopeia Europeia [53]. Depois da padronização, é calculado o fator real da solução e sempre que esta for utilizada, têm-se em conta o fator real e não o teórico. No caso do ácido perclórico 0,1M utilizado para o doseamento da sacarina sódica, o fator real era 0,102376322M, o que significa que cada mililitro teórico desta solução são, na realidade, 0,976788362 ml. Esta diferença entre os valores teóricos e práticos tem impacto nos resultados obtidos para o teor de uma matéria-prima, sendo por isso necessário corrigir o volume que foi gasto de titulante, para proceder ao cálculo do teor.

2. Glucosamina

Foram analisadas três fórmulas moleculares de glucosamina distintas: o cloridrato de glucosamina, o sulfato potássico e o sulfato sódico de glucosamina. Para as três, foram aplicados métodos físico-químicos, como os que foram usados para os edulcorantes e açúcares. A determinação do teor de glucosamina das 3 matérias-primas foi feita por HPLC, utilizando um padrão de referência. Os procedimentos de cromatografia aplicados são internos do CQ e semelhantes entre si, tendo sido usada a mesma fase móvel para as 3 e também a mesma fase estacionária.

2.1. Aspeto da matéria-prima

2.1.1. Procedimento experimental e resultados

O procedimento experimental está de acordo com o que foi utilizado para os Edulcorantes e Açúcares, como referido no ponto 1.1.1..

Tabela 11 – Especificação e resultados Descrição /Aspeto.

Glucosamina	Especificação	Resultado/Conclusão
Cloridrato de Glucosamina	Pó cristalino branco.	Conforme
Sulfato de D-Glucosamina 2KCl		Conforme
Sulfato de Glucosamina NaCl		Conforme

2.2. pH

2.2.1. Procedimento experimental, instrumentação e resultados

Preparou-se de uma solução com concentração de 20 mg/ml. Para este ensaio utilizou-se um potenciômetro Metrohm 691 com um eletrodo combinado da marca Mettler Toledo.

Tabela 12 – Determinação do pH a concentração 20 mg/ml.

Glucosamina	Especificação	Resultado
Cloridrato de Glucosamina	Intervalo de aceitação: (3,0 – 5,0)	4,28
Sulfato de D-Glucosamina 2KCl		4,55
Sulfato de Glucosamina NaCl		4,44

Os pH's obtidos encontram-se dentro do critério de aceitação.

2.3. Identificação por Espectroscopia FTIR

2.3.1. Procedimento experimental, instrumentação e resultados

O espectro de infravermelho obtido é comparado com um padrão de referência. Foi utilizado um espectrofotômetro e software para análise de dados da marca JASCO (FTIR-410) e JASCO Canvas, respectivamente.

Tabela 13 – Espectroscopia FTIR.

Glucosamina	Especificação	Resultado
Cloridrato de Glucosamina	O espectro de infravermelho da matéria-prima a analisar deve apresentar bandas no mesmo número de onda com intensidade semelhante às do espectro do padrão utilizado para fazer a comparação.	Conforme (Figuras 25, 26 e 27)
Sulfato de D-Glucosamina 2KCl		Conforme (Figuras 28, 29 e 30)
Sulfato de Glucosamina NaCl		Conforme (Figuras 31, 32 e 33)

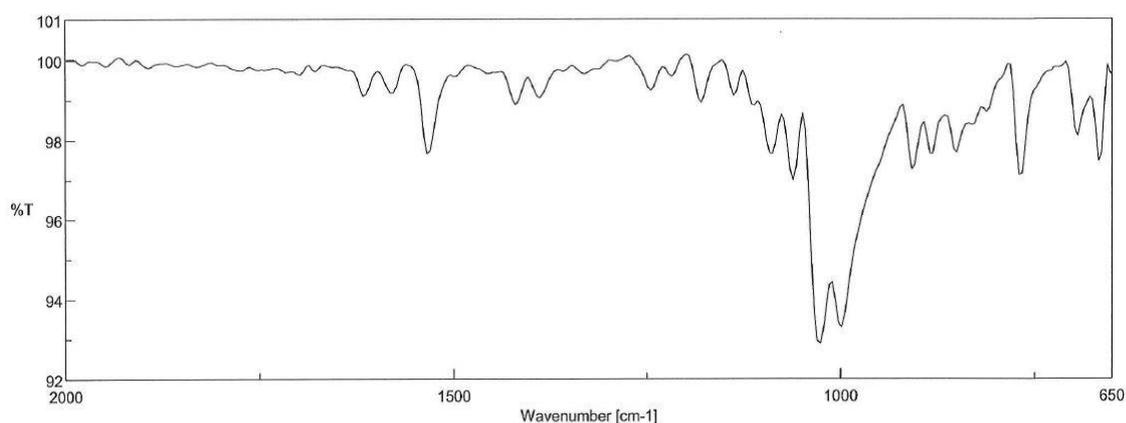


Figura 25 – Espectro obtido por FTIR para o Cloridrato de Glucosamina.

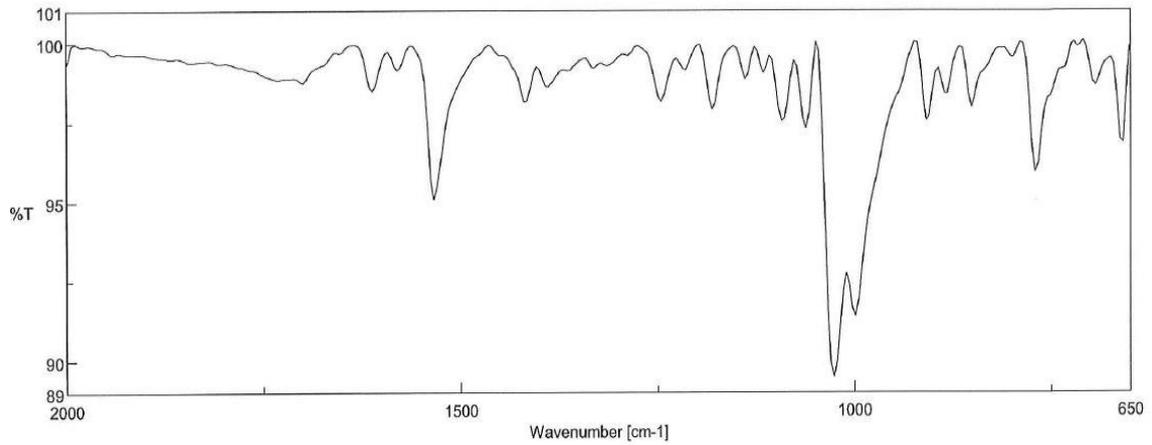


Figura 26 – Espectro obtido por FTIR do padrão de referência.

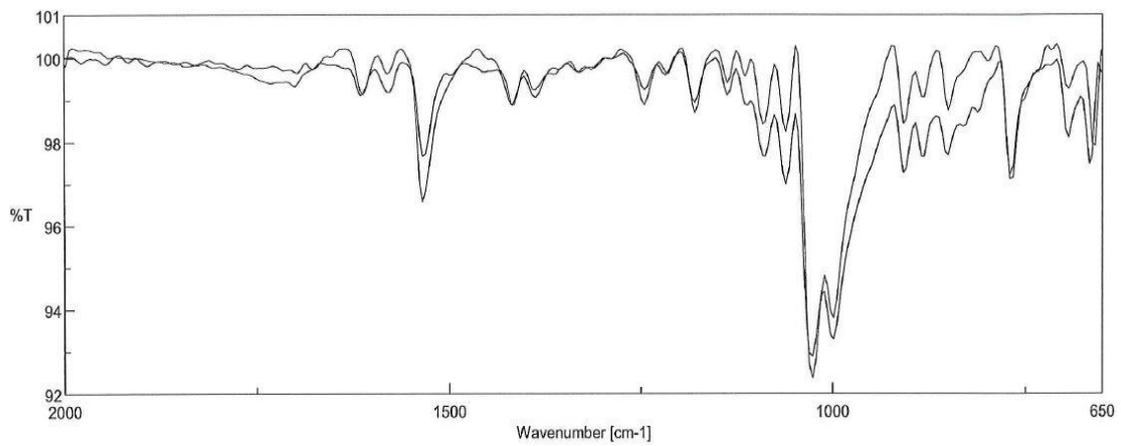


Figura 27 – Comparação dos espectros obtidos por FTIR.

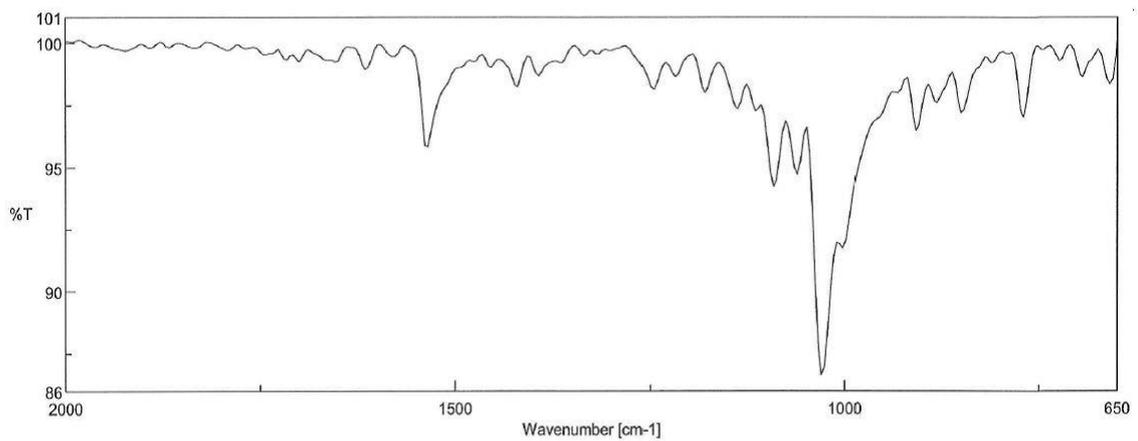


Figura 28 – Espectro obtido por FTIR para o Sulfato 2KCl de Glucosamina.

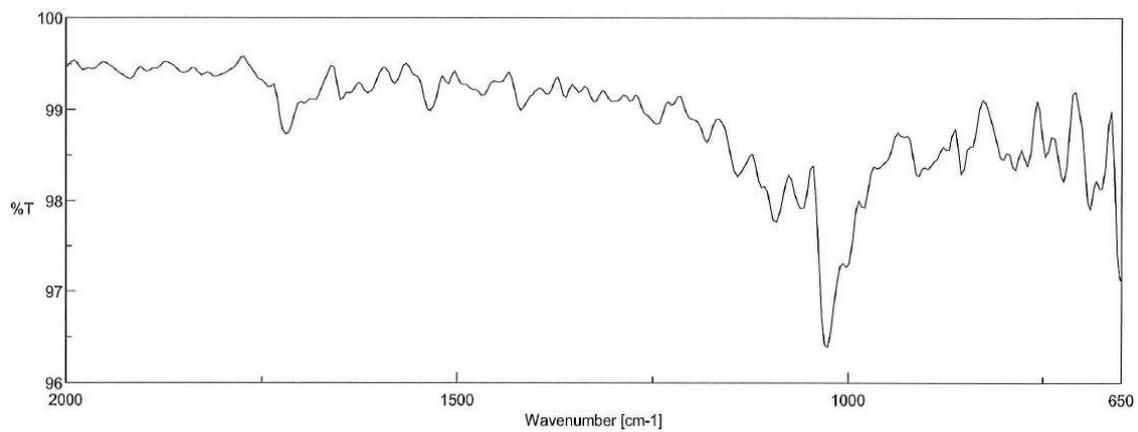


Figura 29 – Espectro obtido por FTIR do padrão de referência.

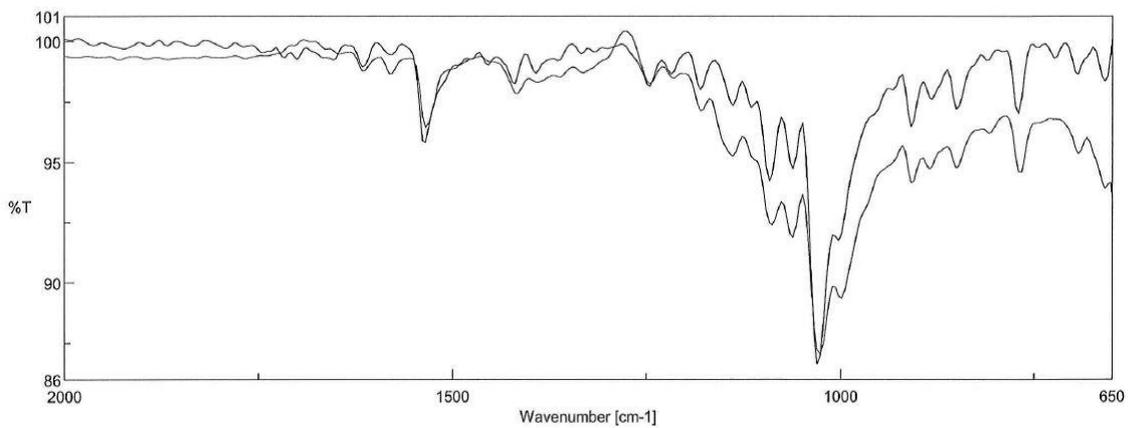


Figura 30 - Comparação dos espectros obtidos por FTIR.

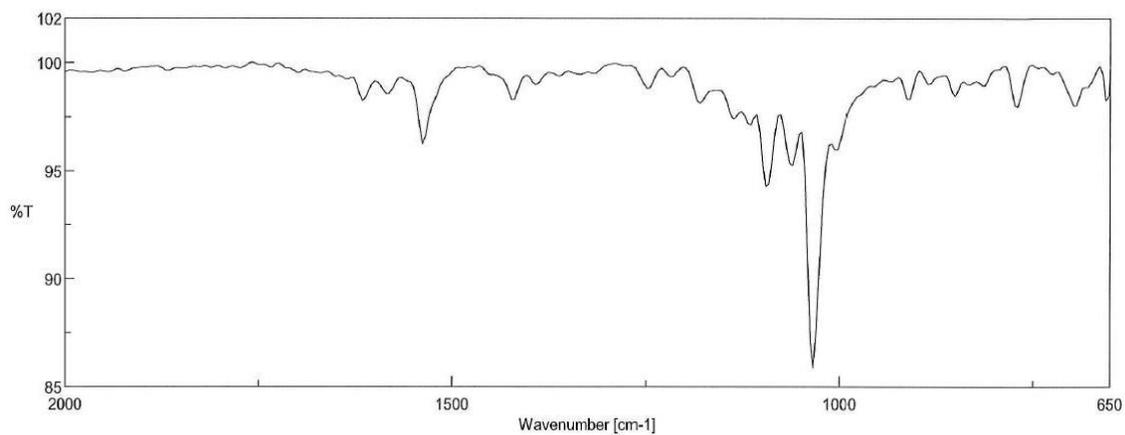


Figura 31 – Espectro obtido por FTIR para o Sulfato de Glucosamina NaCl.

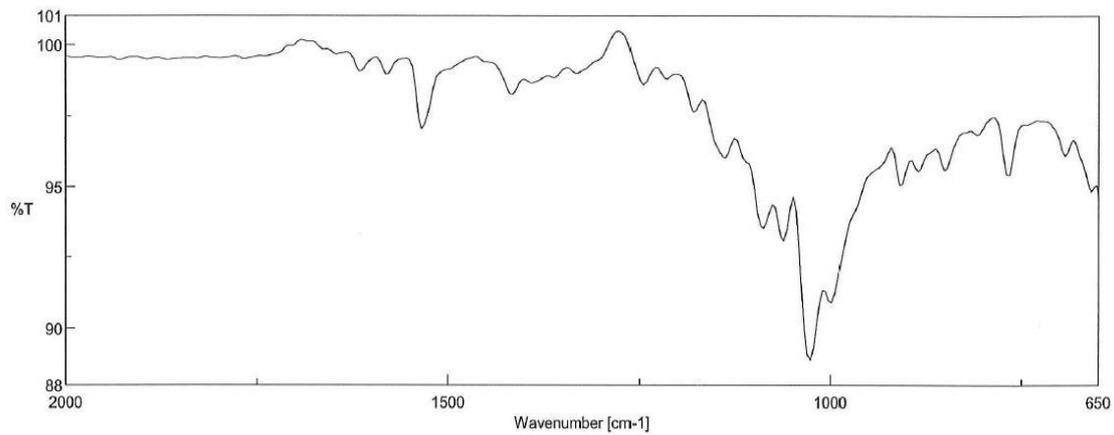


Figura 32 – Espectro obtido por FTIR do padrão de referência.

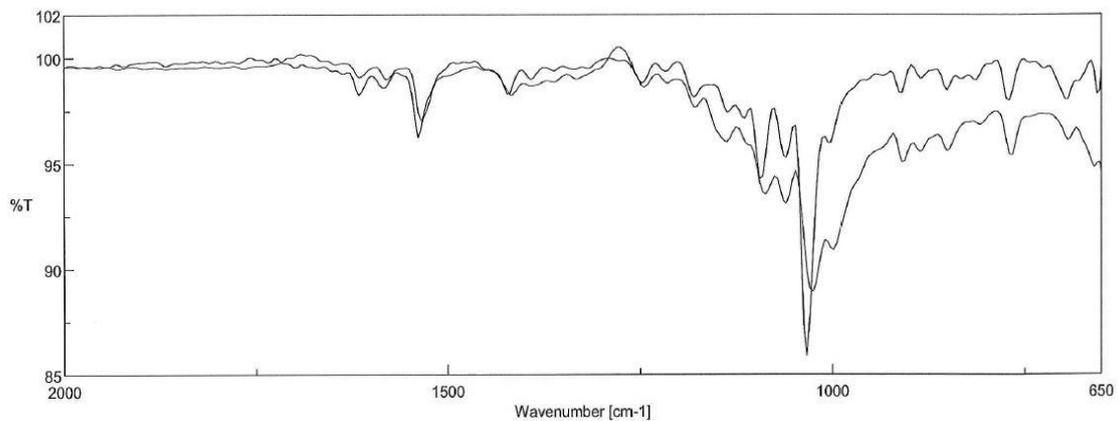


Figura 33 – Comparação dos espectros obtidos por FTIR.

Da análise de todos os espectros de FTIR apresentados anteriormente conclui-se que todas as matérias-primas em questão estão de acordo com o seu padrão de referência, encontrando-se assim dentro de especificação. De acordo com a figura 5 do Capítulo II, entre 650 e os 1000 cm^{-1} temos a zona de impressão digital correspondente a cada matéria-prima. O grupo $-\text{OH}$ do álcool secundário da glucosamina, apresenta a banda característica a um número de onda aproximado de 1100 cm^{-1} . A banda típica do radical amina NH_2 pode ser observado na zona dos 1590 cm^{-1} [78].

2.4. Identificação do grupo funcional Cloreto

2.4.1. Procedimento experimental e resultados

Adicionar Nitrato de Prata 0,1M a 1ml da solução previamente preparada para a medição do pH (20mg/ml) (ponto 2.2; tabela 34 – Informação suplementar). Forma-se um precipitado esbranquiçado que é insolúvel em ácido nítrico, mas solúvel numa solução de hidróxido de amónio 6N.

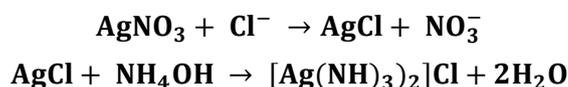
Tabela 14 – Cloretos.

Glucosamina	Especificação	Resultado
Cloridrato de Glucosamina	A matéria-prima dá a reação dos cloretos.	Conforme Figura 34
Sulfato de D-Glucosamina 2KCl		
Sulfato de Glucosamina NaCl		



Figura 34 – À esquerda, é possível observar a formação de precipitado branco pela adição de nitrato de prata. À direita, é apresentada a solução límpida que resulta da dissolução do precipitado. Os gobelés contém a matéria-prima pela ordem em que aparecem na tabela 14.

As três classes de glucosaminas analisadas apresentam grupos cloreto na sua constituição, assim é esperado que esses grupos precipitem com a adição de nitrato de prata. O precipitado esbranquiçado que se forma é um sal de cloreto de prata insolúvel. A adição de ácido nítrico tem a função de acidificar a solução para que não haja precipitação de outros sais ao reagir com o nitrato de prata. O cloreto de prata reage com o hidróxido de amónio, formando um outro sal que é solúvel em água [57].



2.5. Identificação de grupos funcionais e iônicos

Muitas vezes, diferentes matérias-primas apresentam o mesmo aspeto visual, sendo por isso imprescindível tentar distinguir e identificá-las antes de serem usadas em misturas finais. A Farmacopeia europeia apresenta vários ensaios de identificação de grupos iônicos e funcionais que possibilitam saber se estamos na presença da matéria-prima pretendida. Obviamente que este tipo de ensaio não é o suficiente para identificar matérias-primas, mas em conjunto com outros, exclui algumas dúvidas que poderão surgir acerca da matéria-prima em estudo. As três classes de glucosamina são um bom exemplo da aplicação destes testes, todas elas têm o mesmo aspeto, mas como têm grupos funcionais diferentes a si ligados, é possível provar a identidade da molécula.

2.5.1. Cloridrato de Glucosamina – Sulfato

2.5.1.1. Procedimento experimental e resultados

Dissolve-se cerca de 0,1g da amostra em 30 a 40 ml de água purificada. Nas mesmas condições, dissolvem-se 0,25ml de uma solução de ácido sulfúrico 0,02N na mesma quantidade de água para ser utilizado como padrão de referência.

Às duas preparações é adicionado 1ml de uma solução de ácido clorídrico 3N e 3ml de cloreto de bário (120g/L), perfazendo um volume total de 50 ml com água purificada. A solução padrão e a solução amostra são colocadas ao abrigo da luz durante 5 minutos. Passado esse tempo são comparadas em termos de opalescência, sendo que a solução que contém a matéria-prima não pode ser mais opalescente do que o padrão.

Tabela 15 – Identificação de grupos funcionais e iônicos (Sulfato).

Glucosamina	Especificação	Resultado
Cloridrato de Glucosamina	Sulfato A solução que contém a matéria-prima apresenta menos opalescência do que a solução padrão.	Conforme Figura 35

É possível observar da figura 35 que o padrão de referência é mais opalescente do que a solução que contém o cloridrato de glucosamina. Não havendo opalescência na solução que contém a amostra, ou sendo esta bastante inferior à do padrão, considera-se que a amostra não contém sulfatos, ou que a sua presença é residual, garantindo que não nos encontramos na presença de outra

fórmula molecular de glucosamina. Quando há presença de íons sulfato, estes reagem com o cloreto de bário, formando um precipitado esbranquiçado (sulfato de bário), tal como acontece no padrão de referência, pela seguinte equação:

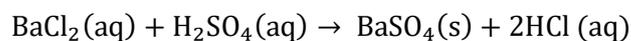


Figura 35 – Comparação da opalescência da solução padrão (à esquerda) com a solução que contém cloridrato de glucosamina (à direita).

2.5.2. Sulfato de D-glucosamina 2KCl – Potássio

2.5.2.1. Procedimento experimental e resultados

Para a identificação do potássio, efetuam-se duas reações, A e B, em que a primeira se caracteriza pela formação de um precipitado branco e a segunda pela formação de um precipitado avermelhado.

A: A uma solução da matéria-prima contendo 0,1 g em 2 ml de água purificada, adiciona-se 1 ml de uma solução de carbonato de cálcio 15% e 50 μl de uma solução de sulfureto de sódio. Aquece-se esta preparação, verificando que continua límpida e sem precipitado. Ao adicionar 2 ml de uma solução de ácido tartárico (150g/L), enquanto a preparação arrefece é possível observar a formação de um precipitado cristalino branco.

B: A uma solução da amostra contendo 40 mg em 1 ml de água purificada, adiciona-se 1 ml de uma solução de ácido acético diluído e 1 ml de uma solução de hexanitrocobaltato de sódio (100g/L), e forma-se de imediato um precipitado avermelhado.

Tabela 16 - Identificação de grupos funcionais e iônicos (Potássio).

Glucosamina	Especificação	Resultado
Sulfato de D-Glucosamina 2KCl	Potássio A: Formação de um precipitado branco B: Formação de um precipitado avermelhado	Conforme Figura 36

O ensaio da identificação realizou-se para o sulfato de D-glucosamina 2KCl de forma a garantir que se está na presença desta fórmula molecular da matéria-prima e não na presença de outra semelhante em aspeto, mas diferente em composição. Da reação ocorrida em A, podemos observar a presença de um precipitado cristalino branco (tartarato de potássio) que surge após arrefecimento, fazendo com que esta identificação esteja dentro do critério de aceitação.

Da identificação B, os iões de potássio presentes na solução da amostra reagem com o hexanitrocobaltato de sódio, dando origem a cloreto de sódio e um outro sal, hexanitrocobaltato de sódio dipotássico que é pouco solúvel em meio aquoso e apresenta uma coloração amarela/alaranjada, como tal corresponde à especificação determinada para o efeito.

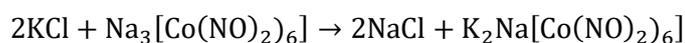


Figura 36 – Ensaio da identificação do potássio: à esquerda é possível observar as preparações das reações A e B antes de haver formação de precipitado. À direita é possível observar a formação de precipitado tanto para a reação A, como para a B.

2.5.3. Sulfato de Glucosamina NaCl – Sódio

2.5.3.1. Procedimento experimental e resultados

A uma solução de matéria-prima contendo 0,1g/2ml, adicionam-se 2 ml de uma solução de carbonato de potássio a 15% e ferve-se a preparação durante uns minutos numa placa de aquecimento. Depois de arrefecer verificar que a solução continua límpida e sem precipitados. Adicionam-se 4 ml de uma solução de piroantimoniato de potássio. Esta solução é então arrefecida em banho de gelo e, gradualmente, é possível observar a formação de cristais de sódio.

Tabela 17 – Identificação de grupos funcionais e iónicos (Sódio).

Glucosamina	Especificação	Resultado
Sulfato de Glucosamina NaCl	Sódio A solução que contem a matéria-prima dá a reação do sódio, formando cristais brancos	Conforme Figura 37

Estes resultados são semelhantes aos anteriores, sendo que aqui o ião de interesse é o sódio. Formou-se um precipitado esbranquiçado (figura 37) como seria expectável, aquando da adição de piroantimoniato de potássio.



Figura 37 – Formação de precipitado sódico para o sulfato de glucosamina NaCl.

2.6. Teor de sulfato

2.6.1. Procedimento experimental e resultados

Dissolver 1g da amostra a analisar em 100 ml de água. Adicionar 4 ml de uma solução de ácido clorídrico 6N e aquecer a preparação até esta ferver em agitação constante.

De seguida, é adicionada uma solução de cloreto de bário (120g/L) até ocorrer precipitação completa do sulfato. A mistura é então levada durante uma hora a um banho de água e depois filtrada. O filtrado é lavado com água purificada quente até que não se forme precipitado pela reação do sobrenadante com uma solução de nitrato de prata 0,1M. O filtro contendo o precipitado é colocado a secar na estufa, até massa constante.

Tabela 18 – Especificação e resultados teor de sulfato.

Glucosamina	Especificação	Resultado
Sulfato de D-Glucosamina 2KCl	Intervalo de aceitação: (15,5 – 16,5) %	16,25%
Sulfato de Glucosamina NaCl	Intervalo de aceitação: (16,3 – 17,3) %	16,59%

O ião bário proveniente da solução de cloreto de bário liga-se ao sulfato, precipitando-o num sal branco insolúvel em água, BaSO₄.

A massa molecular do bário é 137,33 g/mol e a do grupo sulfato a ele ligado é 96,06 g/mol, o que confere ao precipitado uma massa molecular de 233,38 g/mol.

A partir do quociente entre a massa molecular do precipitado (BaSO₄) e a massa molecular do grupo sulfato, obtemos a contribuição do grupo sulfato no precipitado, 0,4116, valor que vai ser multiplicado à percentagem de resíduo apresentado por cada amostra.

$$\text{Teor de sulfato (\%)} = \frac{\text{massa}_{\text{filtro final}} - \text{massa}_{\text{filtro inicial}}}{\text{massa}_{\text{amostra}}} \times 0.4116 \times 100$$

Desta forma, os resultados obtidos encontram-se na tabela 18, dentro do critério de aceitação.

2.7. Cinzas sulfúricas

2.7.1. Procedimento experimental e resultados

O método aplicado é o mesmo que foi usado para os Edulcorante e Açúcares, descrito no ponto 1.6.1..

Tabela 19 – Resultados Cinzas sulfúricas.

Glucosamina	Especificação	Resultado
Cloridrato de Glucosamina	Limite máximo de aceitação: 0,1%	0,0 %
Sulfato de D-Glucosamina 2KCl	Intervalo de aceitação: (26,5 – 31,0) %	27,60 %
Sulfato de Glucosamina NaCl	Intervalo de aceitação: (22,5 – 26,0) %	23,72 %

As três fórmulas moleculares de glucosamina analisadas apresentam uma percentagem de cinzas sulfúricas dentro do limite ou intervalo de aceitação.

De notar que o limite de aceitação máximo para o cloridrato de glucosamina é inferior ao das duas outras fórmulas, pois, tanto o sulfato sódico, como o sulfato potássico de glucosamina, apresentam metais na sua constituição (figura 3 do capítulo I). O sódio e potássio não são incinerados durante o processo, compondo grande parte da percentagem de impurezas orgânicas.

2.8. Perda por secagem

2.8.1. Procedimento experimental e resultados

Secar 1g da matéria-prima a analisar numa estufa de secagem a 105°C, até massa constante, como descrito no ponto 1.4.1. do capítulo II – Métodos e Reagentes.

Tabela 20 – Resultados da perda por secagem.

Glucosamina	Especificação	Resultado
Cloridrato de Glucosamina	Limite máximo de aceitação: 1 %	0,0 %
Sulfato de D-Glucosamina 2KCl		0,01 %
Sulfato de Glucosamina NaCl		0,26 %

As três matérias-primas analisadas apresentaram percentagens de perda por secagem dentro do limite de aceitação. Estes resultados são utilizados no cálculo do teor de glucosamina que é apresentado no próximo ponto, uma vez que este é dado em base anidra.

2.9. Doseamento do teor de glucosamina por HPLC

2.9.1. Procedimento experimental

Para cada uma das fórmulas moleculares de glucosamina são preparadas duas soluções problema que são designadas por A1 e A2. Nas mesmas condições e para cada uma das matérias-primas, é preparado um padrão de referência utilizando cloridrato de glucosamina, o analito de interesse.

2.9.1.1. Preparação de soluções

2.9.1.1.1. Solução Padrão de Referência

Tabela 21 – Preparação da solução de referência para cada uma das matérias-primas.

Padrão de Referência – Cloridrato de glucosamina					
Matéria-prima	Pureza	Teor de água (%)	Massa (mg)	Volume (ml)	Concentração final (mg/ml)
Cloridrato de Glucosamina	1,005	0,16	100,7	100	1,0104
Sulfato de D-Glucosamina 2KCl			123,2	50	2,4724
Sulfato de Glucosamina NaCl			125,7		2,5225

A concentração final do padrão de referência é dada pela seguinte expressão:

$$C_{\text{Pad}} = \frac{\text{massa (mg)} \times \text{Pureza} \times (100 - \%H_2O)}{100 \times \text{Volume (ml)}}$$

2.9.1.1.2. Soluções problema matéria-prima

Tabela 22 – Preparação das soluções problema para cada uma das matérias-primas.

Matéria-prima	Solução Problema	Massa (mg)	Volume (ml)	Concentração teórica (mg/ml)
Cloridrato de Glucosamina	A1	101,1	100	1,0110
	A2	101,4		1,0140
Sulfato de D-Glucosamina 2KCl	A1	125,3	50	2,5057
	A2	126,2		2,5237
Sulfato de Glucosamina NaCl	A1	125,1	50	2,4955
	A2	127,1		2,5354

A concentração teórica da solução problema é dada por:

$$C_A = \frac{\text{massa (mg)}}{\text{Volume (ml)}}$$

2.9.1.2. Condições cromatográficas

- Fase móvel Glucosamina (descrita no ponto 3. do capítulo Métodos e Reagentes)
- Fluxo: 1,0 ml/minuto
- Tempo de corrida: 6 minutos
- Volume de injeção: 10 µl
- Número de injeções: 3 por solução
- Temperatura: 30 °C
- $\lambda = 195 \text{ nm}$

2.9.1.3. Sequência de injeção

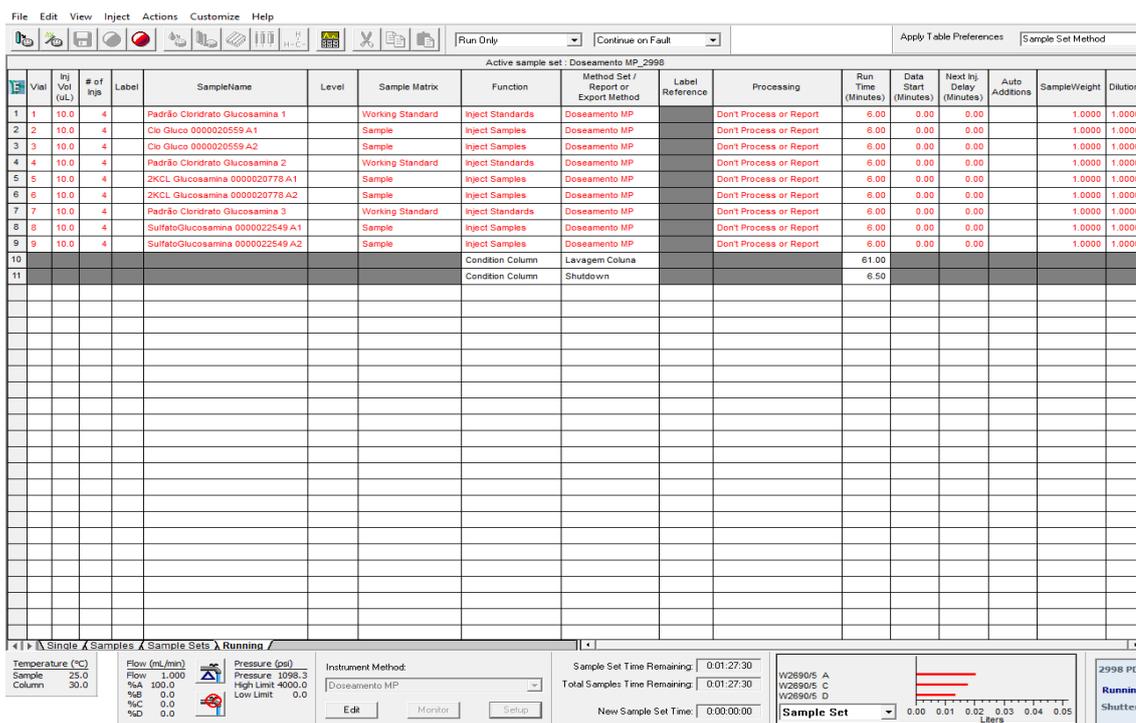


Figura 38 – Captura de ecrã da janela de utilizador do software Empower 3. Seleção do método instrumental e da sequência cromatográfica a utilizar.

Na figura 38, é possível observar a sequência desenhada para a análise das três classes de glucosamina e as condições cromatográficas. Para cada matéria-prima, a sequência é iniciada pela análise do padrão, seguida da injeção de cada uma das soluções problema (A1 e A2). É possível escolher qual a natureza da amostra analisada em “sample matrix”, definir o método instrumental, bem como o tempo de análise.

2.9.2. Instrumentação

Foi utilizado um HPLC da marca Waters e2695 e um detetor 2998 PDA.

A coluna cromatográfica utilizada foi a Lichrospher 100 RP-8 (5 μ m), da marca Merck (Sigma-Aldrich).

O software de aquisição e processamento de dados utilizado é o Empower 3.

2.9.3. Resultados

Tabela 23 – Resultados da determinação do teor de glucosamina por HPLC.

Glucosamina	Especificação	Resultado médio
Cloridrato de Glucosamina	Intervalo de aceitação: (98 – 102) %	101,7 %
Sulfato de D-Glucosamina 2KCl	Intervalo de aceitação: (98 – 102) %	101,85 %
Sulfato de Glucosamina NaCl	Limite mínimo de aceitação: 95 %	100,9 %

- Cloridrato de Glucosamina

Tabela 24 – Resultados da análise por HPLC do cloridrato de glucosamina.

Solução	t _r médio (min)	Área média do pico de glucosamina (mAU)	Teor de glucosamina (%)
Padrão	2,762	423387	
A1	2,762	429854	101,5
A2	2,766	432949	101,9

Metodologia analítica para análise de glucosamina por HPLC e análise físico-química de edulcorantes e açúcares

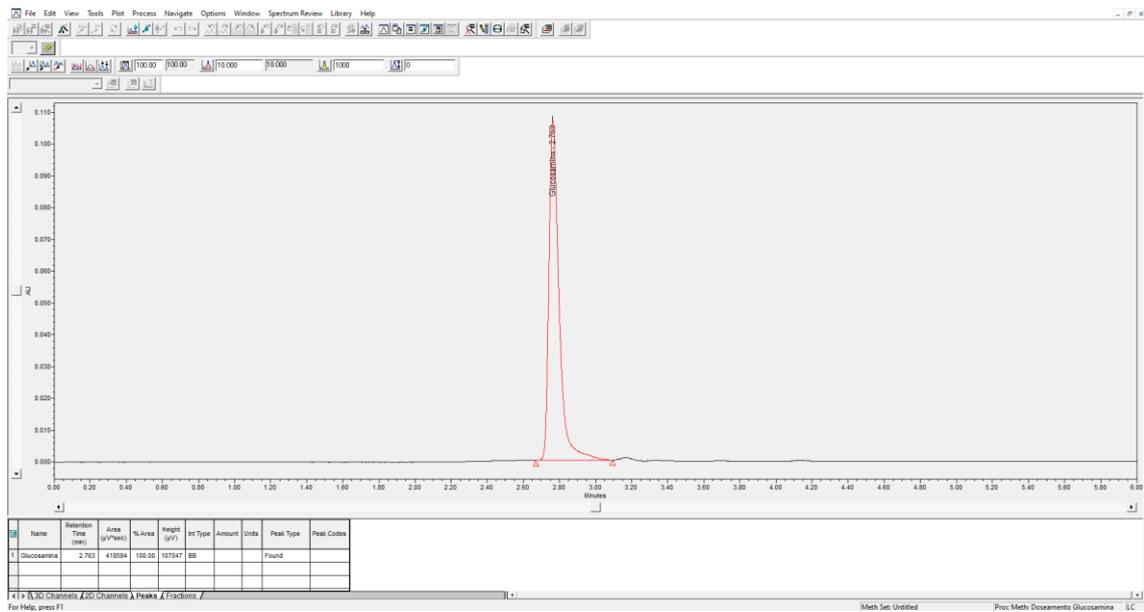


Figura 39 – Cromatograma de glucosamina obtido pela solução do padrão de referência.

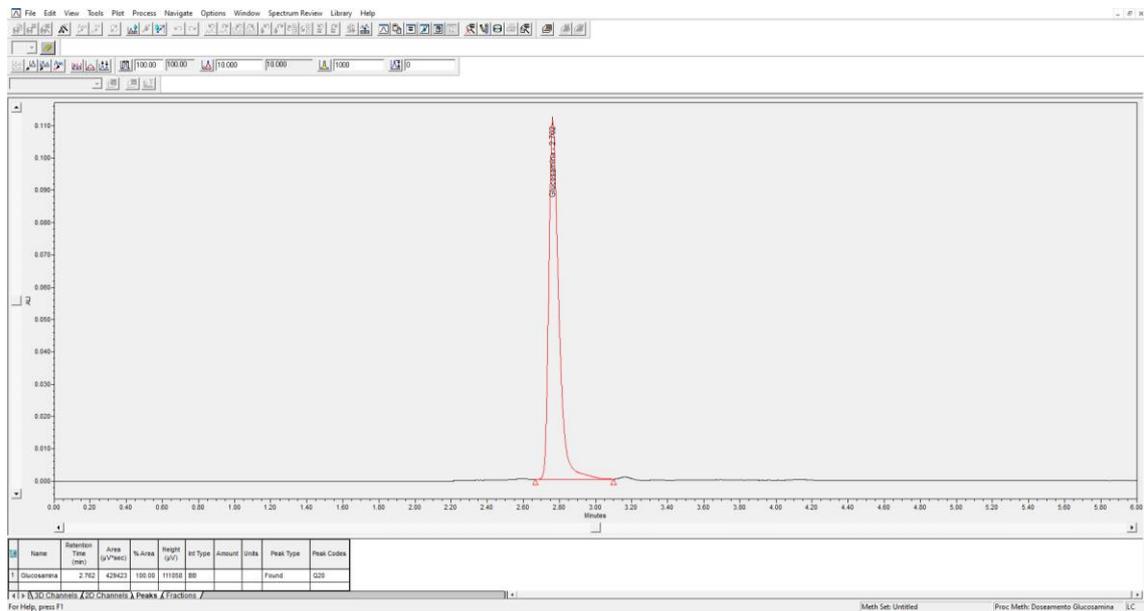


Figura 40 – Cromatograma obtido pela solução problema A1 (injeção 1) da matéria-prima cloridrato de glucosamina.

Metodologia analítica para análise de glucosamina por HPLC e análise físico-química de edulcorantes e açúcares

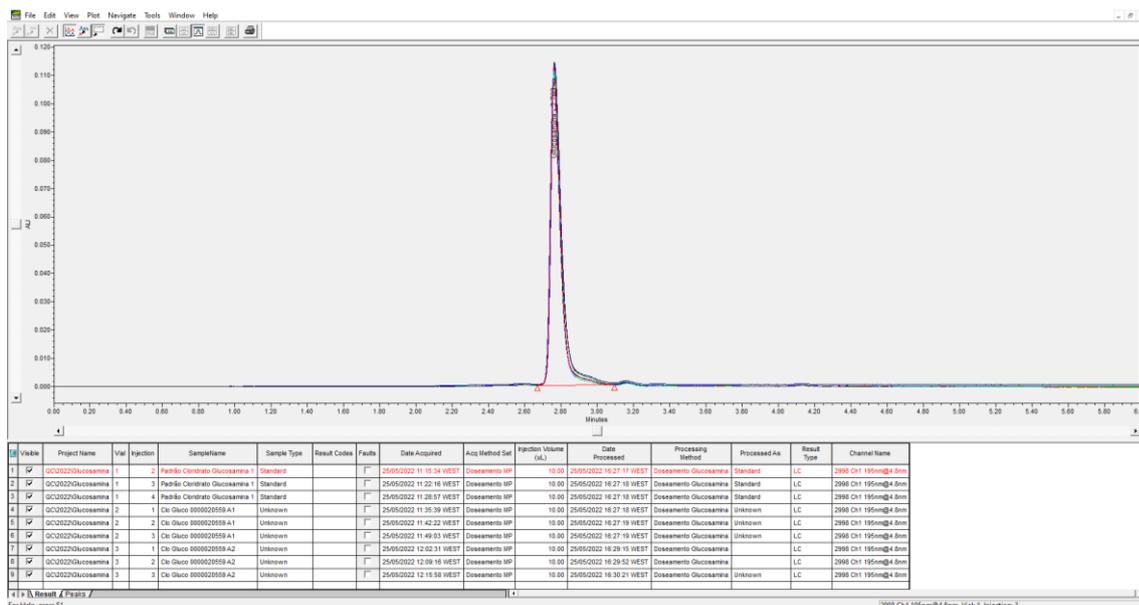


Figura 41 – Sobreposição dos cromatogramas de glucosamina obtidos pelo padrão de referência e pelas soluções problema do cloridrato de glucosamina.

Da sobreposição (figura 41) dos picos obtidos pelas injeções do padrão e dos picos obtidos pelas injeções de cada uma das soluções problema, é possível observar que o pico de glucosamina foi registado no mesmo tempo de retenção e com intensidade de sinal semelhante tanto para o padrão, como para as amostras, sendo assim expectável à partida que a percentagem de glucosamina presente na matéria-prima esteja dentro do critério de aceitação.

A média do teor de glucosamina das duas amostras analisadas foi de 101,7%, encontrando-se no intervalo de aceitação imposto pela especificação. Recorreu-se à seguinte expressão para calcular o teor:

$$\text{Teor de glucosamina (\%)} = \frac{A_A}{A_{Pad}} \times \frac{C_{Pad}}{C_A} \times 100 \times \frac{100}{100 - \%H_2O}$$

Em que A_A é a área do pico obtido pela solução problema da amostra, A_{Pad} é a área do pico obtido pela solução do padrão de referência, C_{Pad} é a concentração real da solução que contem o padrão e C_A é a concentração teórica da solução problema. Como este é um doseamento em base anidra, é necessário descontar a contribuição das moléculas de água presentes no analito. Para isso, utilizam-se os valores da perda por secagem obtidos no ponto 8.

- Sulfato de D-Glucosamina 2KCl

Tabela 25 - Resultados da análise por HPLC do Sulfato de D-glucosamina 2KCl.

Solução	t _r médio (min)	Área média do pico de glucosamina (mAU)	Teor de glucosamina (%)
Padrão	2,769	1078826	
A1	2,780	793128	101,8
A2	2,779	798939	101,9

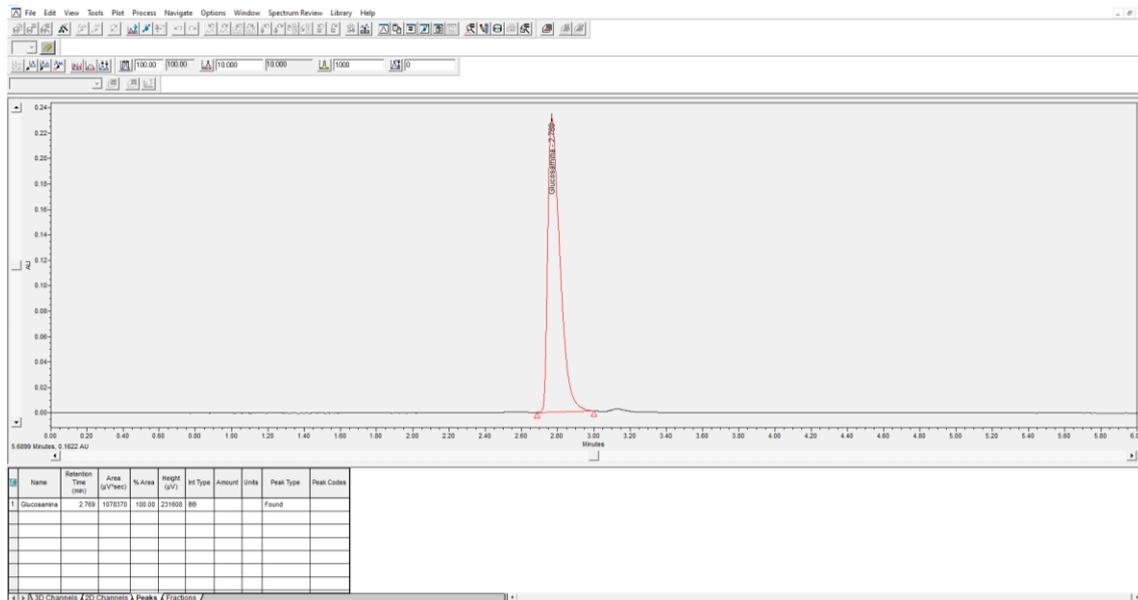


Figura 42 – Cromatograma de glucosamina obtido pela solução do padrão de referência.

Metodologia analítica para análise de glucosamina por HPLC e análise físico-química de edulcorantes e açúcares

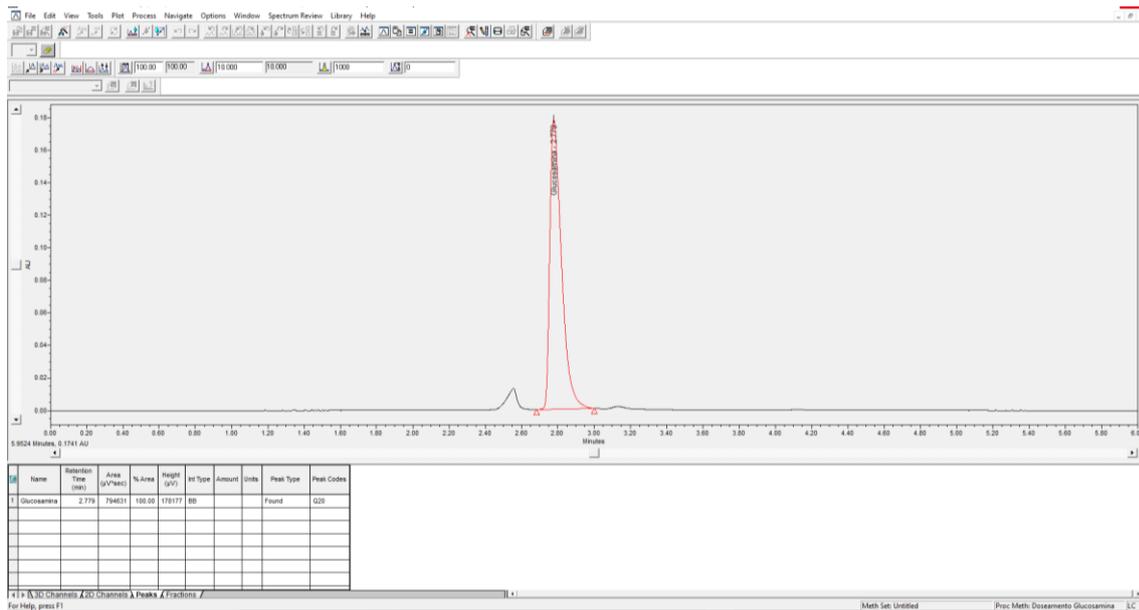


Figura 43 - Cromatograma obtido pela solução problema A1 (injeção 1) da matéria-prima do sulfato de D-glucosamina 2KCl.

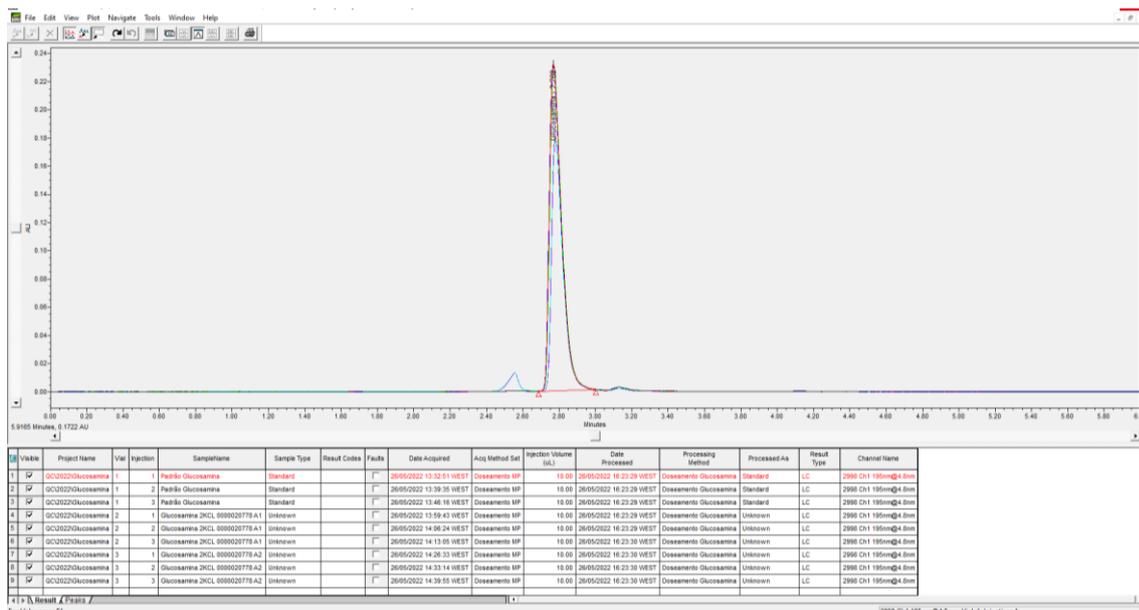


Figura 44 - Sobreposição cromatogramas de glucosamina obtidos pelo padrão de referência e pelas soluções problema.

O cálculo do teor de glucosamina recorre a uma expressão semelhante à que foi usada para o cloridrato de glucosamina, sendo que a diferença consiste em multiplicar o valor obtido pela contribuição real do cloridrato de glucosamina, que é o analito que foi quantificado pelo padrão. Desta forma, é necessário ter em conta o peso molecular dos componentes que não são quantificados nesta análise.

Portanto, o sulfato de glucosamina 2KCl tem a seguinte fórmula molecular: $(C_6H_{14}NO_5)_2SO_4 \cdot 2KCl$ e um peso molecular de 605,52 g/mol. O que se pretende quantificar é o cloridrato de glucosamina: $C_6H_{13}NO_5 \cdot HCl$, cuja massa molecular é de 179,17 g/mol.

Para isto, calcula-se a contribuição do cloridrato de glucosamina pelo quociente do peso molecular do sulfato de glucosamina 2KCl (605,52 g/mol) e duas vezes peso molecular do cloridrato de glucosamina, obtendo-se a seguinte expressão:

$$\text{Teor de glucosamina (\%)} = \frac{A_A}{A_{\text{Pad}}} \times \frac{C_{\text{Pad}}}{C_A} \times \frac{605,52}{431,26} \times 100 \times \frac{100}{100 - \%H_2O}$$

A média do teor de glucosamina obtida foi de 101,85%, encontrando-se assim dentro do intervalo de especificação.

- Sulfato de Glucosamina NaCl

Tabela 26 - Resultados da análise por HPLC do sulfato de glucosamina NaCl.

Solução	t _r médio (min)	Área média do pico de glucosamina (mAU)	Teor de glucosamina (%)
Padrão	2,764	1055799	
A1	2,775	775159	98,7
A2	2,776	822823	103,1

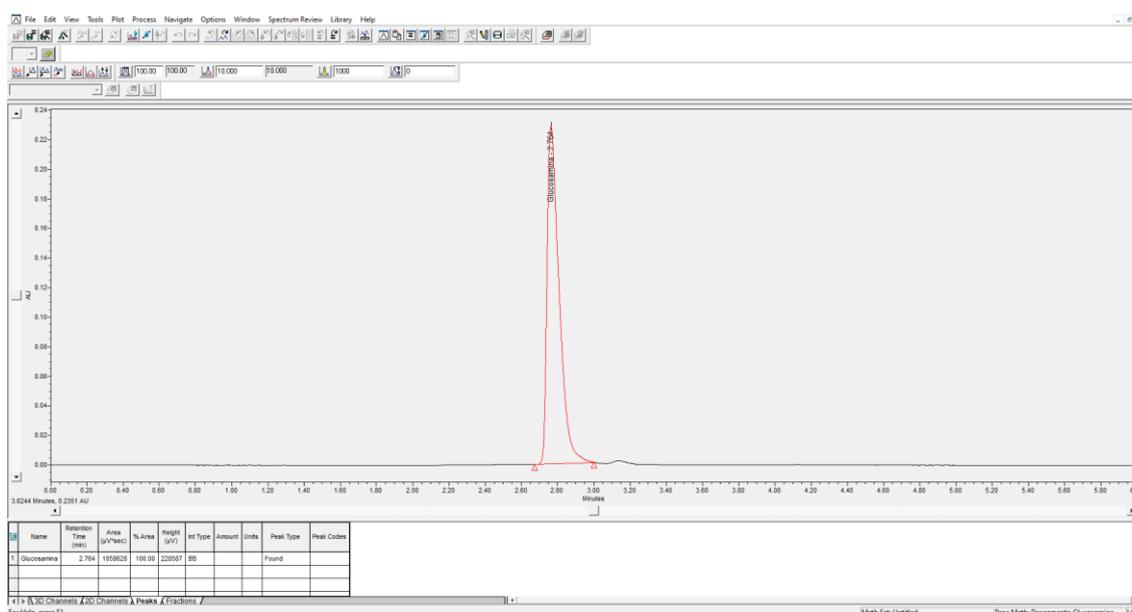


Figura 45 – Cromatograma de glucosamina obtido pela solução do padrão de referência.

Metodologia analítica para análise de glucosamina por HPLC e análise físico-química de edulcorantes e açúcares

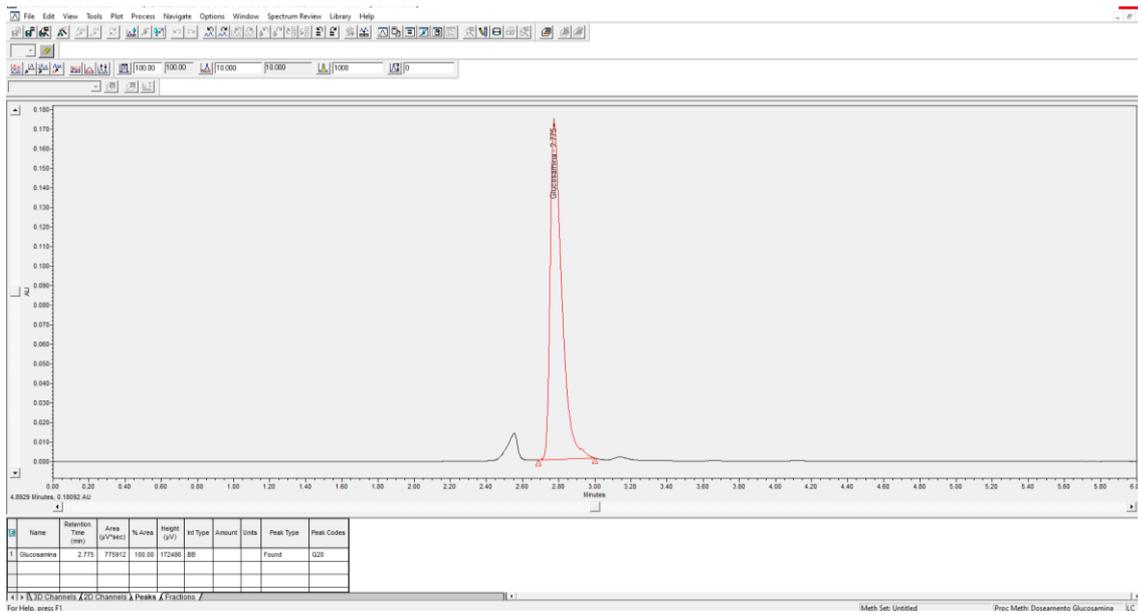


Figura 46 - Cromatograma obtido pela solução problema A1 (injeção 1) da matéria-prima do sulfato de glucosamina NaCl.

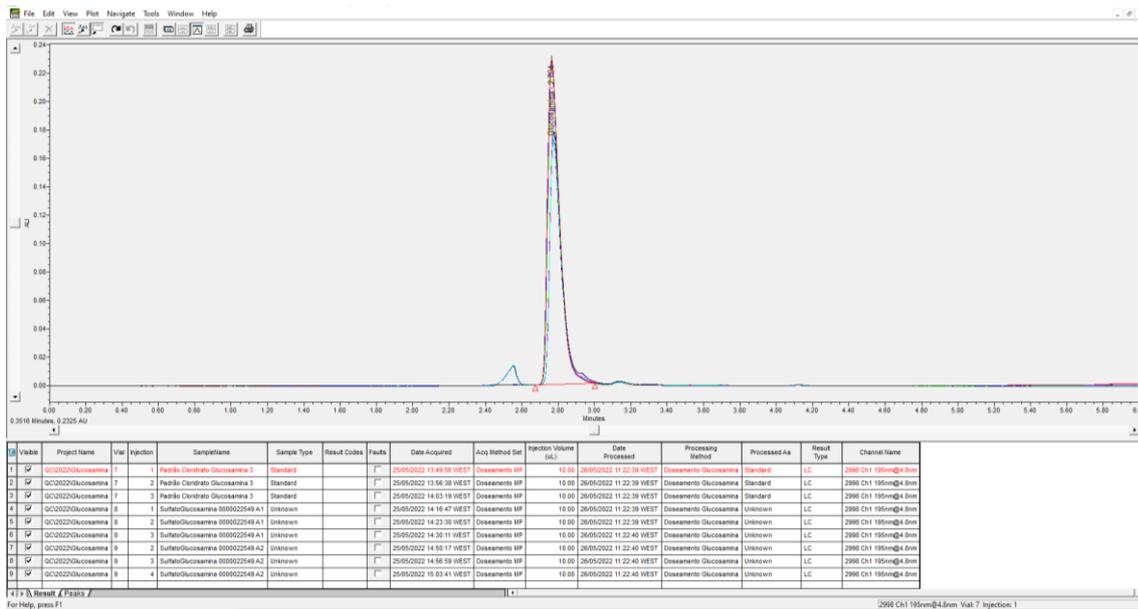


Figura 47 - Sobreposição cromatogramas de glucosamina obtidos pelo padrão de referência e pelas soluções problema.

A análise destes resultados, determina a glucosamina pela seguinte fórmula:

$$\text{Teor de glucosamina (\%)} = \frac{A_A}{A_{\text{Pad}}} \times \frac{C_{\text{Pad}}}{C_A} \times \frac{573,31}{431,26} \times 100 \times \frac{100}{100 - \%H_2O}$$

Onde, 573,31 g/mol correspondem ao sulfato sódico de glucosamina ((C₆H₁₄NO₅)₂SO₄ · 2NaCl) e 431,26 g/mol dizem respeito ao cloridrato de glucosamina (C₆H₁₄NO₅).

O resultado médio obtido foi de 100,9%, encontrando-se assim dentro do critério de aceitação.

Todas as amostras apresentaram um RSD ≤ 2 %, tanto em tempo de retenção como em áreas. Este RSD está definido internamente como critério de aceitação de desvios e é calculado pelo quociente entre a média dos resultados e o desvio-padrão dos mesmos.

Todas as matérias-primas analisadas neste trabalho estavam conforme a especificação que as acompanhava, para cada um dos ensaios realizados. Se se desse o caso de existir alguma inconformidade, isto é, se o resultado experimental não se encontrasse dentro do critério de aceitação, numa primeira instância, o ensaio iria ser repetido. Se a inconformidade se mantivesse, todas as soluções e equipamentos utilizados iriam ser revistos no sentido de procurar alguma falha que explicasse o resultado anormal. Caso não existissem falhas passíveis de ser detetadas ao nível do equipamento ou das soluções usadas, o ensaio iria ser repetido por um analista diferente do que o que o realizou anteriormente. Na persistência da inconformidade, excluindo soluções degradadas ou erros humanos pelo analista, o responsável do CQ é informado e toma a decisão de rejeitar a matéria-prima que é impedida de seguir para produção.

Capítulo IV – Conclusão

Conclusão

A importância de analisar e confirmar se as matérias-primas estão dentro da especificação prende-se com a circunstância em que vão ser utilizadas. Isto é, são compostos que vão ser usados para produzir formulações de suplementos ou medicamentos que vão ser consumidos por seres humanos e/ou animais. É necessário ter este controlo tão apertado e ter sempre a certeza que está tudo em conformidade para certificar a qualidade e a segurança destes produtos. Neste aspeto, é responsabilidade do Controlo de Qualidade exigir e testar a qualidade de todos os intervenientes e estendê-la a todas as fases do processo de uma produção de qualquer natureza.

Os edulcorantes são utilizados como substitutos dos açúcares em várias formulações, permitindo criar produtos com teor reduzido dos mesmos. Não obstante, a utilização dos açúcares como excipientes de formulações farmacológicas continua a ser elevada devido às suas características capazes de alterar as propriedades das misturas em que se inserem. Na análise de alguns exemplos destes compostos, foram aplicadas várias técnicas físico-químicas que nos permitem concluir que as matérias-primas em questão se encontravam todas dentro do critério de aceitação definido individualmente. Como tal, todas estas matérias-primas encontram-se em condições de segurança para serem utilizadas em produção. Todos os ensaios realizados foram determinados pela Farmacopeia Europeia e permitem rastreabilidade do produto desde o início ao fim do processo. No caso de existir alguma não conformidade durante a produção, pode excluir-se que não advém da matéria-prima uma vez que todos os resultados se encontravam dentro dos parâmetros definidos. Caso exista alguma ligação à matéria-prima, teriam de ser feitos ensaios adicionais.

Dos resultados obtidos da análise cromatográfica das várias classes de glucosamina conclui-se que todas se encontram dentro dos intervalos teóricos, sendo assim espera-se que cumpram as funções a que se destinam. A glucosamina apresenta um potencial condroprotetor, podendo este ser aproveitado nas formulações desenhadas para melhorar a qualidade da cartilagem de pessoas afetadas com a doença de osteoartrite, por exemplo. Quando tomada nas doses recomendadas e juntamente com o sulfato de condroitina, pode trazer qualidade de vida.

O perfil cromatográfico apresentado é um perfil claro e com perfeita definição do pico correspondente à glucosamina, permitindo assim a sua fácil identificação. O tempo de retenção atribuído ao analito é de aproximadamente 2,7 minutos. Todos estes resultados apresentaram um $RSD \leq 2\%$, sendo este um dos parâmetros que permite aceitar ou rejeitar a análise.

Metodologia analítica para análise de glucosamina por HPLC e análise físico-química de edulcorantes e açúcares

Este método cromatográfico é utilizado em rotina pela Labialfarma, permitindo assim, pela sua facilidade, realizar a análise num curto espaço de tempo e com enorme benefício para a empresa.

No caso deste trabalho, o objetivo de analisar várias matérias-primas foi cumprido e para além disso, todas elas estavam em conformidade com a especificação que as acompanhava e por isso seguiram o seu curso para produções independentes. É interessante perceber que depois das matérias-primas serem usadas na produção, dá-se a origem do produto final, que volta para o CQ para ser testado. Mais propriamente, é doseado por HPLC verificando se a concentração, por exemplo de um princípio ativo, é a pretendida, atestando a segurança e a qualidade do produto que segue para ser comercializado.

Capítulo V – Referências bibliográficas

Referências bibliográficas

- [1] T. Neogi, “Epidemiologia da Dor Articular,” no. 11. 2007.
- [2] P. M. Brooks and P. Gosh, “Chondroprotection: myth or reality?,” *Baillière’s Clin. Rheumatol.*, vol. 4, no. 2, pp. 293–303, 1990.
- [3] H. Akkiraju and A. Nohe, “Role of Chondrocytes in Cartilage Formation, Progression of Osteoarthritis and Cartilage Regeneration,” *J Dev Biol.*, vol. 3, no. 4, pp. 177–192, 2016.
- [4] R. Braham, B. Dawson, and C. Goodman, “The effect of glucosamine supplementation on people experiencing regular knee pain,” *Br J Sport. Med.*, vol. 37, pp. 45–49, 2003.
- [5] C. Alberto-silva, F. B. M. Malheiros, and S. M. Querobino, “Fourier-transformed infrared spectroscopy, physicochemical and biochemical properties of chondroitin sulfate and glucosamine as supporting information on quality control of raw materials,” *Futur. J. Pharm. Sci.* <https://doi.org/10.1186/s43094-020-00120-3>, vol. 6, 2020.
- [6] M. W. Hungerford and D. Valaik, “Chondroprotective agents: glucosamine and chondroitin,” *Foot Ankle Clin N Am*, vol. 8, pp. 201–219, 2003.
- [7] V. H. Pomin and B. Mulloy, “Glycosaminoglycans and Proteoglycans with with,” *Pharmaceuticals*, vol. 11, pp. 1–9, 2018.
- [8] D. L. Bissett, “Glucosamine: an ingredient with skin and other benefits,” *J. Cosmet. Dermatol.*, vol. 5, pp. 309–315, 2006.
- [9] B. A. Fox and M. M. Stephens, “Glucosamine hydrochloride for the treatment of osteoarthritis symptoms,” *Clin. Interv. Aging*, vol. 2, no. 4, pp. 599–604, 2007.
- [10] Arthritis Foundation, “<https://www.arthritis.org/>.”
- [11] H. Nakamura, K. Masuko, K. Yudoh, T. Kato, T. Kamada, and T. Kawahara, “Effects of glucosamine administration on patients with rheumatoid arthritis,” *Rheumatol Int*, pp. 213–218, 2007.
- [12] C. A. Hitchon and H. S. El-gabalawy, “The Synovium in Rheumatoid Arthritis,” *Open Rheumatol. J.*, vol. 5, pp. 107–114, 2011.
- [13] K. Jamialahmadi, *Chapter 19 - Beneficial applications of glucosamine*. Elsevier Inc., 2019.
- [14] R. Dalirfardouei, G. Karimi, and K. Jamialahmadi, “Molecular mechanisms and biomedical applications of glucosamine as a potential multifunctional therapeutic agent,” *Life Sci.*, 2016.
- [15] I. Setnikar and L. C. Rovati, “Absorption , Distribution , Metabolism and Excretion of Glucosamine Sulfate A review,” *Arzneim.-Forsch./Drug Res.*, vol. 51, no. Ii, pp. 699–725, 2001.
- [16] Y. S. El-saharty and A. Abdel, “High-performance liquid chromatographic determination of nutraceuticals , glucosamine sulphate and chitosan , in raw materials and dosage forms,” *Anal. Chim. Acta*, vol. 462, pp. 125–131, 2002.
- [17] A. Gueniche and I. Castiel-Higounenc, “Efficacy of Glucosamine Sulphate in Skin Ageing: Results from an ex vivo Anti-Ageing Model and a Clinical Trial,” *Skin Pharmacol. Physiol.*, vol. 30, pp. 36–41, 2017.
- [18] M. Mende, C. Bednarek, M. Wawryszyn, P. Sauter, M. B. Biskup, and U. Schepers, “Chemical Synthesis of Glycosaminoglycans,” *Chem. Rev.*, vol. 116, pp. 8193–8255, 2016.
- [19] L. C. Rovati, F. Girolami, and S. Persiani, “Crystalline glucosamine sulfate in the management of knee osteoarthritis : efficacy , safety , and pharmacokinetic properties,” *Ther. Adv. Musculoskelet. Dis.*, vol. 4, no. 3, pp. 167–180, 2012.
- [20] J. . W. Anderson, R. J. Nicolosi, and J. F. Borzelleca, “Glucosamine effects in humans : a review of effects on glucose metabolism , side effects , safety considerations and efficacy,” *Food Chem. Toxicol.*, vol. 43, pp. 187–201, 2005.
- [21] M. Höök, “Cell-surface Glycosaminoglycans,” *Ann. Rev. Biochem.*, vol. 53, pp. 847–869, 1984.
- [22] A. S. Russell, A. L. I. Aghazadeh-habashi, and F. Jamali, “Active Ingredient Consistency of Commercially Available Glucosamine Sulfate Products,” *J. Rheumatol.*, no. Mw 605, pp.

- 2407–2409, 2002.
- [23] C. R. Byron, M. C. Stewart, A. A. Stewart, and H. C. Pondenis, “Effects of clinically relevant concentrations of glucosamine on equine chondrocytes and synoviocytes in vitro,” *AJVR*, vol. 69, no. 9, pp. 7–12, 2008.
- [24] J. N. Hathcock and A. Shao, “Risk assessment for glucosamine and chondroitin sulfate,” *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, vol. 47, pp. 78–83, 2007.
- [25] C. Bottegoni, R. A. A. Muzzarelli, F. Giovannini, A. Busilacchi, and A. Gigante, “Oral chondroprotection with nutraceuticals made of chondroitin sulphate plus glucosamine sulphate in osteoarthritis,” *Carbohydr. Polym.*, vol. 109, pp. 126–138, 2014.
- [26] J. Y. Reginster *et al.*, “Long-term effects of glucosamine sulphate on osteoarthritis progression: a randomised , placebo-controlled clinical trial,” *Lancet*, vol. 357, pp. 251–256, 2001.
- [27] T. S. Barclay, C. Tsourounis, and G. M. McCart, “Glucosamine,” *Ann Pharmacother*, vol. 32, pp. 574–579, 1998.
- [28] S. Wangroongsub, Yongsak, Tanavalee, Aree, Wilairatana, Vajara, Ngarmukos, “Comparable Clinical Outcomes between Glucosamine Sulfate-Potassium Chloride and Glucosamine Sulfate Sodium Chloride in Patients with Mild and Moderate,” *J Med Assoc Thai*, vol. 93, no. 7, pp. 805–811, 2010.
- [29] A. Aghazadeh-habashi and F. Jamali, “The Glucosamine Controversy ; A Pharmacokinetic Issue,” *J Pharm Pharm. Sci*, vol. 14, no. 2, pp. 264–273, 2011.
- [30] M. Grembecka, “Natural sweeteners in a human diet,” *Rocz Panstw Zakl Hig*, vol. 66, no. 3, pp. 195–202, 2015.
- [31] A. G. Nicoluci, Ícaro; T. Takehara, Carolina; P.A. Bragotto, “Edulcorantes de alta intensidade: Tendências de uso em alimentos e avanços em técnicas analíticas,” *Quim. Nov.*, vol. 45, no. 2, pp. 207–217, 2022.
- [32] O. Ibrahim, “High intensity sweeteners chemicals structure, properties and applications,” *J. Food Heal. Technol. Innov.*, vol. 2, pp. 100–106, 2015.
- [33] R. J. Brown, M. A. Banate, and K. I. Rother, “Artificial Sweeteners: A systematic review of metabolic effects in youth,” *Int. J. Pediatr. Obes.*, vol. 5, pp. 305–312, 2010.
- [34] B. N. L. Rozzi, “Sweet Facts about Maltitol,” *Food Prod. Des.*, vol. 17, no. 10, pp. 1–2, 2007.
- [35] R. C. Rowe, P. J. Sheskey, and S. C. Owen, *Handbook of Pharmaceutical Excipients*. 2006.
- [36] A. A. R. Mahmood and S. B. Al-Juboori, “A Review : Saccharin Discovery , Synthesis , and Applications,” *Ibn Al Haitham J. Pure Appl. Sci.*, vol. 33, no. 2, pp. 43–61, 2020.
- [37] S. A. Miller and V. P. Frattali, “Saccharin,” *Diabetes Care*, vol. 12, no. 1, pp. 75–80, 1989.
- [38] M. Chen, W. Zhang, and H. Wu, “Mannitol : physiological functionalities , determination methods , biotechnological production , and applications,” *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, p. 11, 2020.
- [39] H. L. Ohrem, E. Schornick, A. Kalivoda, and R. Ognibene, “Why is mannitol becoming more and more popular as a pharmaceutical excipient in solid dosage forms ?,” *Pharm. Dev. Technol.*, vol. 7450, pp. 1–6, 2013.
- [40] G. Pifferi, P. Santoro, and M. Pedrani, “Quality and functionality of excipients,” *Farm.*, vol. 54, pp. 1–14, 1999.
- [41] G. Pifferi and P. Restani, “The safety of pharmaceutical excipients,” *Farm.*, vol. 58, pp. 541–550, 2003.
- [42] S. P. Chaudhari and P. S. Patil, “Pharmaceutical Excipients : A review,” *Int. J. Adv. PHARMACY, Biol. Chem.*, vol. 1, no. 1, pp. 21–34, 2012.
- [43] A. Saraiva, C. Carrascosa, D. Raheem, and F. Ramos, “Maltitol : Analytical Determination Methods , Applications in the Food Industry , Metabolism and Health Impacts,” *Int. J. Environ. Res. Public Health*, vol. 17, p. 28, 2020.
- [44] G. A. Hebbink and B. H. J. Dickhoff, *Chapter 5. Application of lactose in the pharmaceutical industry*. Elsevier Inc., 2019.
- [45] S. Paul, P. Tajarobi, C. Boissier, and C. Calvin, “Tableting performance of various mannitol and lactose grades assessed by compaction simulation and chemometrical analysis,” *Int. J.*

- Pharm.*, vol. 566, pp. 24–31, 2019.
- [46] W. Zhang, J. Chen, Q. Chen, H. Wu, and W. Mu, “Sugar alcohols derived from lactose : lactitol , galactitol , and sorbitol,” *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 2, 2020.
- [47] M. Jivraj, L. G. Martini, and C. M. Thomson, “An overview of the different excipients useful for the direct compression of tablets,” *Plasma Sources Sci. Technol.*, vol. 3, no. 2, pp. 58–63, 2000.
- [48] L. M. Hanover and J. S. White, “Manufacturing, composition and applications of fructose,” *Am J Clin Nutr*, vol. 58, no. suppl, pp. 724–732, 1993.
- [49] T. Barclay, M. Ginic-markovic, P. D. Cooper, N. Petrovsky, and R. Article, “The chemistry and sources of fructose and their effect on its utility and health implications.,” *J. Excipients Food Chem*, vol. 3, no. 2, pp. 67–82, 2012.
- [50] E. Stefanis and C. Panayiotou, “A new expanded solubility parameter approach,” *Int. J. Pharm.*, vol. 426, pp. 29–43, 2012.
- [51] D. J. F. Santos, “Controlo da Qualidade ao nível de uma Indústria Farmacêutica,” Universidade de Coimbra, 2020.
- [52] S. Stegemann, F. Leveiller, D. Franchi, H. De Jong, and H. Lindén, “When poor solubility becomes an issue: From early stage to proof of concept,” *Eur. J. Pharm. Sci.*, vol. 31, pp. 249–261, 2007.
- [53] European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare (EDQM), *European Pharmacopoeia 10th Edition*, 10th ed. Strasbourg: Council of Europe, 2019.
- [54] A. R. Mendes, “Implementação e validação de uma metodologia para análise de fibra alimentar,” Universidade de Coimbra, 2011.
- [55] “https://www.masterorganicchemistry.com/2016/11/23/quick_analysis_of_ir_spectra/.”
- [56] A. Mezzetti and W. Leibl, “Time-resolved infrared spectroscopy in the study of photosynthetic systems,” *Photosynth. Res.*, 2016.
- [57] United States Pharmacopoeial Convention, *United States Pharmacopoeia (USP) USP43-NF38*. Maryland: United States Pharmacopoeial Convention, 2020.
- [58] W. Richter and U. Tinner, “Practical aspects of modern titration.”
- [59] Labialfarma, “Procedimento interno de Funcionamento - Titulador automático, Mettler Toledo G20S cq/equ0114,” 2021.
- [60] “<https://www.rdchemistry.com/2020/05/potentiometric-titration.html>.”
- [61] P. Miao, S. A. Bell, M. Rujan, G. Mugurel, and C. McIlroy, “Report on literature review of recent development in loss on drying method for moisture determination,” 2014.
- [62] K. A. Connors, “The Karl Fischer Titration of Water,” *Drug Dev. Ind. Pharm.*, vol. 14, no. 14, pp. 1891–1903, 1988.
- [63] M. E. C. F. Themudo, “Aplicação do método de Karl Fischer a materiais que só libertam água a temperaturas elevadas,” 1999.
- [64] EMD Chemicals Inc, “Karl Fischer Titration Basics,” Gibbstown, NJ.
- [65] T. Cachet and J. Hoogmartens, “The determination of water in erythromycin by Karl Fischer titration,” *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 6, no. 5, pp. 461–472, 1988.
- [66] Labialfarma, “Procedimento interno de funcionamento - Titulador Karl Fischer Volumétrico, Mettler Toledo V10S CQ/EQU0129/R01,” 2021.
- [67] M. E. C. F. Themudo, “Aplicação do método de Karl Fischer a materiais que só libertam água a temperaturas elevadas,” Universidade do Porto, 1999.
- [68] Labialfarma, “Procedimento interno - Cromatografia analítica CQ/PI0031 R05,” 2021.
- [69] J. M. R. Bélanger, J. R. J. Paré, and M. Sigouin, “High Performance Liquid Chromatography (HPLC): Principles and Applications,” *Instrum. Methods Food Anal.*, 1997.
- [70] A. F. de J. Gonçalves, “Desenvolvimento e Validação de Métodos Analíticos por HPLC de uma Formulação para Aplicação Tópica,” Universidade de Coimbra, 2014.
- [71] C. R. M. Domingos, “Validação de um método por HPLC para análise de conteúdo em comprimidos,” Universidade de Aveiro, 2011.
- [72] I. M. Bird, D. Peter, and J. Hayes, “High performance liquid chromatography: principles and clinical applications,” *Sci. Tools Med.*, vol. 299, pp. 783–787, 1989.
- [73] “<https://www.waters.com/nextgen/pt/pt/education/primers/beginner-s-guide-to-liquid->

- chromatography/how-does-high-performance-liquid-chromatography-work.html.”
- [74] S. R. N. Fernandes, “Implementação e validação de um novo método para determinação de dextrose equivalente em cereais hidrolisados enzimaticamente,” Universidade de Aveiro, 2017.
- [75] T. M. P. Figueiredo, “Validação de métodos analíticos - Determinação do teor de açúcar numa amostra de produto alimentar,” Universidade de Coimbra, 2012.
- [76] M. Swartz, “HPLC detectors: a brief review,” *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*, vol. 33, pp. 1130–1150, 2010.
- [77] A. J. Ohannesian, LenaStreeter, *Handbook of Pharmaceutical Analysis*. New York: Marcel Dekker, Inc, 2002.
- [78] M. Benavente, L. Moreno, S. Arias, and J. Martinez, “Production of Glucosamine Hydrochloride from Crustacean Shell,” *J. Pharm. Pharmacol.*, vol. 3, pp. 20–26, 2015.

Capítulo VI – Informação suplementar

Informação suplementar

- Teor de água obtido por titulação Karl Fischer

Tabela 27 – Resultados obtidos por KF para a Sacarina sódica · 2H₂O.

Sacarina sódica · 2H ₂ O	Massa (g)	Teor de água (%)	$\overline{\%H_2O}$	σ (%)
Amostra 1	0,2230	14,158		
Amostra 2	0,2279	14,157		
Amostra 3	0,2054	14,126		
			14,147	0,018

Tabela 28 – Resultados obtidos por KF para o maltitol.

Maltitol	Massa (g)	Teor de água (%)	$\overline{\%H_2O}$	σ (%)
Amostra 1	1,0837	0,012		
Amostra 2	1,0169	0,013		
Amostra 3	1,0042	0,009		
			0,011	0,002

Tabela 29 – Resultados obtidos por KF para a lactose · H₂O.

Lactose · H ₂ O	Massa (g)	Teor de água (%)	$\overline{\%H_2O}$	σ (%)
Amostra 1	0,5022	5,170		
Amostra 2	0,5022	5,185		
Amostra 3	0,5036	5,178		
			5,178	0,008

Tabela 30 – Resultados obtidos por KF para a frutose.

Frutose	Massa (g)	Teor de água (%)	$\overline{\%H_2O}$	σ (%)
Amostra 1	1,0947	0,034		
Amostra 2	1,0671	0,035		
Amostra 3	1,0191	0,038		
			0,036	0,008

- Cinzas sulfúricas

Tabela 31 – Pesagens intermédias cinzas sulfúricas (Açúcares).

Matéria-prima	m amostra (g)	m cadinho vazio (g)	m cadinho final 1ª pesagem (g)	m cadinho final 2ª pesagem (g)	Cinzas sulfúricas (%)
Lactose · H ₂ O	1,0112	45,0966	45,0973	45,0973	0,069
Frutose	5,0026	47,8763	47,9301	47,8763	0,0

Tabela 32 – Pesagens intermédias cinzas sulfúricas (Glucosamina).

Matéria-prima	m amostra (g)	m cadinho vazio (g)	m cadinho final 1ª pesagem (g)	m cadinho final 2ª pesagem (g)	m cadinho final 3ª pesagem (g)	Cinzas sulfúricas (%)
Cloridrato de Glucosamina	1,0698	30,9952	30,9959	30,9952	30,9952	0,00
Sulfato de D-Glucosamina 2KCl	1,0026	36,1119	36,3893	36,3886	36,3886	27,60
Sulfato de Glucosamina NaCl	1,0134	31,0835	31,3246	31,3239	31,3239	23,72

- Doseamento – Sacarina sódica · 2H₂O

Tabela 33 – Resultados doseamento por titulação automática para a sacarina sódica.

Sacarina sódica · 2H ₂ O	Massa (mg)	V _T (ml)	% C ₇ H ₄ NNaO ₃ S
Amostra 1	151,5	6,238	100,75 %
Amostra 2	154,2	6,311	100,15 %

- pH da solução de glucosamina com concentração aproximada 20mg/ml

Tabela 34 – Soluções de glucosamina para a medição do pH.

Matéria-prima	Massa (g)	Volume	Concentração (mg/ml)	pH
Cloridrato de Glucosamina	1,0036g	50 ml	20,072	4.28
Sulfato de D-Glucosamina 2KCl	1,0046g	50 ml	20,092	4.55
Sulfato de Glucosamina NaCl	1,0046g	50 ml	20,092	4.44

- Teor de sulfato

Tabela 35 – Pesagens do filtro para cálculo do teor de sulfato.

Matéria-prima	m amostra (g)	m inicial filtro (g)	m final filtro (g)	Teor de sulfato (%)
Sulfato de D-Glucosamina 2KCl	1,0137	0,7203	1,1204	16,25%
Sulfato de Glucosamina NaCl	1,0176	0,6958	1,1059	16,59%

- Perda por secagem

Tabela 36 – Pesagens intermédias da perda por secagem da glucosamina.

Matéria-prima	m amostra (g)	m inicial da placa (g)	m final placa (g)	Perda por secagem (%)
Cloridrato de Glucosamina	1,0088	13,6610	14,6698	0,00
Sulfato de D-Glucosamina 2KCl	1,0032	14,1346	15,1377	0,01
Sulfato de Glucosamina NaCl	1,0029	13,7042	14,7045	0,26

- Doseamento de cloridrato de glucosamina por HPLC
 - Cloridrato de Glucosamina

Tabela 37 – Áreas e tempo de retenção para cada injeção de padrão.

Padrão Cloridrato de Glucosamina	t_R (min)	Área do pico glucosamina (mAU)
Injeção 1	2,763	418594
Injeção 2	2,761	424604
Injeção 3	2,762	426964
Média	2,762	423387
Desvio-padrão (σ)	0,00	4315,60
RSD	0,04	1,02

Tabela 38 – Áreas, tempo de retenção e teor de glucosamina para cada injeção de amostra.

Cloridrato de Glucosamina A1	t_R (min)	Área do pico glucosamina (mAU)	Teor de glucosamina (%)
Injeção 1	2,762	429423	101,4
Injeção 2	2,762	430649	101,7
Injeção 3	2,763	429491	101,4
Média	2,762	429854	101,5
Desvio-padrão (σ)	0,00	689,04	0,16
RSD	0,02	0,16	0,16

Cloridrato de Glucosamina A2	t_R (min)	Área do pico glucosamina (mAU)	Teor de glucosamina (%)
Injeção 1	2,766	432817	101,9
Injeção 2	2,764	433179	102,0
Injeção 3	2,764	432850	101,9

Média	2,765	432949	101,9
Desvio-padrão (σ)	0,00	200,16	0,05
RSD	0,04	0,16	0,05

○ **Sulfato de D-Glucosamina 2KCl**

Tabela 39 - Áreas e tempo de retenção para cada injeção de padrão.

Padrão Cloridrato de Glucosamina	t_R (min)	Área do pico glucosamina (mAU)
Injeção 1	2,769	1078370
Injeção 2	2,768	1079293
Injeção 3	2,770	1078816
Média	2,769	1078826
Desvio-padrão (σ)	0,00	461,59
RSD	0,04	0,04

Tabela 40 - Áreas, tempo de retenção e teor de glucosamina para cada injeção de amostra.

Sulfato de D-Glucosamina 2KCl A1	t_R (min)	Área do pico glucosamina (mAU)	Teor de glucosamina (%)
Injeção 1	2,779	794631	102,0
Injeção 2	2,780	793807	101,9
Injeção 3	2,780	790945	101,6
Média	2,780	793128	101,8
Desvio-padrão (σ)	0,00	1934,62	0,25
RSD	0,02	0,24	0,24

Sulfato de D-Glucosamina 2KCl A2	t_R (min)	Área do pico glucosamina (mAU)	Teor de glucosamina (%)
Injeção 1	2,779	798544	101,8
Injeção 2	2,779	798441	101,8
Injeção 3	2,779	799833	102,0
Média			
	2,779	798939	101,9
Desvio-padrão (σ)	0,00	775,65	0,10
RSD	0,00	0,10	0,10

○ **Sulfato de Glucosamina NaCl**

Tabela 41 - Áreas e tempo de retenção para cada injeção de padrão.

Padrão Cloridrato de Glucosamina	t_R (min)	Área do pico glucosamina (mAU)
Injeção 1	2,764	1058628
Injeção 2	2,763	1056408
Injeção 3	2,765	1052360
Média		
	2,764	1055799
Desvio-padrão (σ)	0,00	3178,12
RSD	0,04	0,30

Metodologia analítica para análise de glucosamina por HPLC e análise físico-química de edulcorantes e açúcares

Tabela 42 - Áreas, tempo de retenção e teor de glucosamina para cada injeção de amostra.

Sulfato de Glucosamina NaCl A1	t_R (min)	Área do pico glucosamina (mAU)	Teor de glucosamina (%)
Injeção 1	2,775	775912	98,8
Injeção 2	2,775	773378	98,4
Injeção 3	2,774	776187	98,8
Média	2,775	775159	98,7
Desvio-padrão (σ)	0,00	1548,51	0,20
RSD	0,02	0,20	0,20

Sulfato de Glucosamina NaCl A2	t_R (min)	Área do pico glucosamina (mAU)	Teor de glucosamina (%)
Injeção 1	2,777	820615	102,8
Injeção 2	2,776	822406	103,0
Injeção 3	2,776	825449	103,4
Média	2,776	822823	103,1
Desvio-padrão (σ)	0,00	2443,87	0,31
RSD	0,02	0,30	0,30