BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Curso de Pós-Graduação em
Fármaco e Medicamentos
Área de Produção e Controle Farmacêuticos

DOSEAMENTO DA VITAMINA B₆
POR ESPECTROFOTOMETRIA DERIVADA
NO ULTRAVIOLETA

VLADI OLGA CONSIGLIERI

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:

Prof. Tit. João Fernandes Magalhães

São Paulo

1992

15.464

VLADI OLGA CONSIGLIERI

DOSEAMENTO DA VITAMINA B₆ POR
ESPECTROFOTOMETRIA DERIVADA NO ULTRAVIOLETA

COMISSÃO JULGADORA

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE

Presidente e Orientador

2º examinador

3º examinador

São Paulo, de

de 1992.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor João Fernandes Magalhães pela orientação e incentivo constantes.

Às colegas Telma M. Sakuda, Sílvia Storpirtis, Mitsuko T. Ohara e Maria Valéria R. Velasco pela colaboração e amizade.

Aos funcionários do setor de Farmacotécnica, Regina do Nascimento, Regina Célia, Fátima Morashashi e Jamil Enéas.

Aos Professores Jorge Luiz S. Martins, Érika Rosa Maria Kedor e João Haikal Helou pelo apoio durante a realização deste trabalho.

À Farmalândia pelas amostras fornecidas.

À Fundação do Remédio Popular (FURP) pelas substâncias químicas de referência e matérias-primas cedidas.

À A.W.A pela editoração eletrônica do texto e impressão a laser.

À Moema R. dos Santos pela revisão das referências bibliográficas.

Aos demais colegas dos Setores de Farmacotécnica e Controle de Qualidade.

Aos meus amigos Alexander, Walter e André pela paciência, apoio e incentivo.

Aos meus pais, Dante e Elsa, por todo amor.

A todas as pessoas que direta e indiretamente colaboraram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

1 - Introdução	5
2 - Revisão da literatura	9
2.1 - Generalidades sobre vitaminas do complexo B	10
2.2 - Propriedades físico-químicas do cloridrato de piridoxina	12
2.3 - Principais aspectos farmacológicos do cloridrato de piridoxina	13
2.4 - Metodologia analítica para determinação da vitamina B6	15
2.5 - Espectrofotometria derivada	22
2.5.1 - Histórico	22
2.5.2 - Alguns aspectos gerais da espectrofotometria derivada	25
2.5.3 - Principais aplicações da espectrofotometria derivada	26
2.5.3.1 - Análise qualitativa	27
2.5.3.2 - Análise quantitativa	28
2.5.3.3 - Aplicações da espectrofotometria derivada	29
3 - Proposição	32
4 - Materiais e procedimentos	34
4.1 - Materiais	35
4.1.1 - Solventes e reagentes	35
4.1.2 - Substâncias químicas de referência	35
4.1.3 - Amostras	37
4.1.4 - Equipamentos	40
4.2 - Procedimento analítico	41
4.2.1 - Escolha da concentração de leitura	41
4.2.2 - Estudo da interferência dos demais constituintes das fórmulas multivitamínicas	42
4.2.3 - Determinação das retas de calibração	44
4.2.4 - Teste de recuperação	45
4.2.5 - Aplicação do método proposto na análise das amostras simuladas e comerciais	49
4.2.6 - Comparação do método desenvolvido com o método da Farmacopéia Americana XXII revisão	50
5 - Resultados	51
5.1 - Padronização do método analítico	52
5.2 - Estudo da interferência dos demais componentes da fórmula	57
5.3 - Determinação das retas de calibração	65
5.4 - Teste de recuperação	74
5.5 - Aplicação do método proposto na análise de amostras	75
5.6 - Comparação do método desenvolvido com o método oficial da Farmacopéia Americana XXII revisão	78
6 - Discussão	79
7 - Conclusão	89
ADENDO I	91
8 - Referências bibliográficas	99
9 - Resumo	114
10 - Summary	116

1. INTRODUÇÃO

As vitaminas são nutrientes essenciais ao organismo humano, atuando como coenzimas de reações enzimáticas, devendo ser ingeridas diariamente. Em geral, uma dieta equilibrada é suficiente na manutenção de taxas mais adequadas de vitaminas no organismo, entretanto, quando uma ou mais vitaminas estão abaixo do nível normal, quer por ingestão insuficiente, absorção prejudicada ou necessidades aumentadas, esses compostos devem ser repostos sob a forma de medicamentos (24,73,106).

Os produtos vitamínicos, nas áreas de medicamentos e de alimentos, são empregados há muito tempo e, desde então, inúmeros esforços têm sido concentrados para a detecção e determinação quantitativa dessa classe de compostos.

Os primeiros métodos analíticos propostos foram desenvolvidos com base nos efeitos produzidos pelas vitaminas em animais de laboratório. Embora apresentem a vantagem de serem muito sensíveis e seletivos, tornam-se impraticáveis nas indústrias de medicamentos pois são onerosos, demorados e induzem a grandes margens de erro (86).

Outras técnicas analíticas desenvolveram-se paralelamente, como as microbiológicas, ainda usadas para a determinação da maioria das vitaminas do complexo B. Os métodos microbiológicos apresentam vantagens sobre os biológicos quanto à sua aplicação prática, porém possuem as mesmas desvantagens anteriores.

Métodos químicos e físico-químicos surgiram para o controle da qualidade das vitaminas hidrossolúveis, contudo persistem várias dificuldades na análise desses produtos uma vez que há limitações devido à baixa seletividade dos métodos analíticos e à influência de vários fatores que interferem na sua aplicação.

Em função das características particulares dos medicamentos, por exemplo, as diferentes formas farmacêuticas para uma mesma formulação, as limitações analíticas são mais evidentes.

Existem inúmeros métodos propostos que geralmente incluem uma técnica para a separação das vitaminas e outra para posterior análise individual. A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) tem sido amplamente explorada nesse sentido, geralmente acoplada a outras técnicas de detecção, desde as mais simples às altamente sofisticadas (análise enzimática, técnicas eletroquímicas, de absorbância), sempre visando a análise simultânea de um grupo de vitaminas.

Mesmo nos códigos oficiais, vários métodos são propostos, contudo, a maioria das vitaminas ainda carece de métodos mais adequados para aplicação rotineira nos laboratórios de controle de qualidade. Os melhores métodos, incluindo os farmacopeicos, são onerosos e nem sempre podem ser aplicados em função dos interferentes presentes (5,24).

Resulta daí o interesse no estudo de métodos alternativos para a análise dessas vitaminas, visando uma metodologia rápida e simples, ao mesmo tempo sensível e seletiva.

A espectrofotometria derivada (ED) surgiu como uma perspectiva bastante favorável tendo em vista suas mais recentes evoluções. Essa técnica já era conhecida na década de 50, entretanto, devido à sua dificuldade de aplicação na época, foi empregada com restrição. Atualmente, com o desenvolvimento tecnológico e a informatização dos equipamentos, a ED vem sendo amplamente desenvolvida como técnica alternativa na análise de medicamentos, sobretudo nas interações entre fármacos e adjuvantes farmacotécnicos, tendo como principais vantagens a seletividade e a praticidade (9,20,26,33,78⁸⁰).

Vários trabalhos preconizam a aplicação da espectrofotometria derivada em estudos de estabilidade enfatizando sua seletividade.

A piridoxina, um dos elementos do complexo B, é um exemplo de vitamina cujos procedimentos oficiais de análise envolvem extrações, reações químicas seguidas de titulação ou determinação espectrofotométrica, e ainda, métodos cromatográficos. Essas técnicas são trabalhosas e devem ser aplicadas na vitamina já isolada. Mesmo o

método proposto na última revisão da Farmacopéia Americana apresenta grande variabilidade, sobretudo em função da reação da vitamina com 2,6-dicloroquinona cloroimida, resultando em composto colorido muito instável.

Por outro lado, até 1987, nenhum dos métodos descritos, cromatográficos ou não, satisfaz plenamente aos requisitos para o controle da estabilidade de preparações multivitamínicas. Alguns trabalhos foram divulgados nesse sentido, a maioria por CLAE, apresentando limitações quanto ao custo e tempo de análise (5,24,102).

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. GENERALIDADES SOBRE AS VITAMINAS DO COMPLEXO B

As vitaminas do complexo B são componentes comuns em fórmulas de medicamentos multivitamínicos. Incluem-se no complexo B a tiamina (vitamina B₁), riboflavina (vitamina B₂), piridoxina (vitamina B₆) e cianocobalamina (vitamina B₁₂), que fazem parte das vitaminas classificadas como hidrossolúveis e constituem um grupo de substâncias não correlacionadas estruturalmente (5,24).

Vitamina B₆, por sua vez, é um termo coletivo que designa um grupo de piridinas de ocorrência natural, interligadas metabolicamente e funcionalmente: piridoxina (I), piridoxal (II) e piridoxamina (III). Estas substâncias são convertidas *in vivo* em fosfato de piridoxal (IV) que é a molécula biologicamente ativa. A piridoxina é a forma mais estável de vitamina B₆ e por isso contribui para maior atividade vitamínica na dieta. Provavelmente por estes motivos, a piridoxina tem sido escolhida entre as três formas de vitamina B₆ para compor a maioria das formulações medicamentosas (43,75,106).

A ação biológica da vitamina B₆ está relacionada com o metabolismo de proteínas, gorduras e carboidratos e nas crianças é crítica para o desenvolvimento normal do sistema nervoso central. Sua maior participação é como coenzima de transaminases e descarboxilases no metabolismo de proteínas e aminoácidos. As reações de transaminação estão envolvidas na utilização da cadeia carbonada dos aminoácidos para a neoglicogênese e para a produção de energia e ainda na biossíntese de aminoácidos não essenciais a partir de derivados da glicose como o piruvato, oxalacetato e α -cetoglutarato. A descarboxilação não oxidativa produz aminas biogênicas (serotonina, noradrenalina, histamina, GABA, etc.) a partir de aminoácidos (13,57,75,106).

Não há descrição de uma síndrome clássica desenvolvida em humanos decorrente da falta de vitamina B₆, possivelmente por ser amplamente distribuída na natureza (carnes, vegetais e cereais inteiros, ovos, nozes, leite). Entretanto, sabe-se que é essencial no crescimento do homem e animais. Alguns sintomas de sua deficiência são a queda de cabelo, lesões na pele, edema, degeneração nervosa causando alterações de comportamento e crises convulsivas. A taxa dietária de piridoxina recomendada pela *Food and Nutrition Board* para adolescentes e adultos é de 1,6 a 2,5 μ g diários (34,75).

Os medicamentos contendo piridoxina são ministrados principalmente para o fornecimento da vitamina em casos de deficiência. Entretanto, terapias baseadas na administração desta vitamina têm sido eficientes como adjuvantes nos casos de lesões renais, desarranjos mentais (esquizofrenia, por exemplo), depressão, neuropatias, doenças oculares, gravidez, lactação e trombose. Tópicamente é empregada em cosméticos para combater a seborréia e a oleosidade excessiva (28,34).

2.2 PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DO CLORIDRATO DE PIRIDOXINA

O cloridrato de piridoxina é um pó cristalino branco ou quase branco, de sabor salino amargo. Apresenta peso molecular de 205,64 e nome químico 5-hidroxi-6-metil-3,4-piridinadimetanol.

É solúvel em água (1:5) e em álcool (1:100-115), praticamente insolúvel em acetona, clorofórmio e éter. Uma solução aquosa contendo 5% de cloridrato de piridoxina tem pH de 2,3 a 3,5 e uma solução isosmótica da vitamina contém 3,04% do sal. É sensível à luz e passível de oxidação ao ar (57,75).

2.3. PRINCIPAIS ASPECTOS FARMACOLÓGICOS DA PIRIDOXINA

A piridoxina tem baixa toxicidade e não são observadas importantes ações farmacodinâmicas após sua administração oral ou parenteral. Doses elevadas de 2 a 6 g/Kg produzem convulsões e morte em camundongos, sendo que doses menores podem ser diariamente ministradas sem causar efeitos evidentes. Em seres humanos, as doses de 1000 mg/dia por via oral não causam reações adversas, entretanto, em pessoas que consomem cronicamente mais de 2000 mg diários foi descrita uma neuropatia sensorial tóxica. Em pacientes tratados com 200 mg diários foram observados sintomas de dependência após suspensão da vitamina (14,35,83).

A piridoxina interfere no metabolismo de outros fármacos e vice-versa. A isoniazida combina-se com o fosfato de piridoxal formando hidrazonas, inibindo a enzima piridoxal cinase que ativa as diversas formas de vitamina B₆ transformando-as em fosfato de piridoxal. A isoniazida também aumenta a excreção urinária de piridoxina. Por esses motivos, a piridoxina é ministrada profilaticamente em pacientes que fazem uso da isoniazida como forma preventiva do aparecimento de neurite crônica (35).

Constatou-se que, em mulheres que usam anticoncepcionais orais contendo estrogênios, a concentração sanguínea de fosfato de piridoxal é reduzida. Há vários relatos de depressão e evidências bioquímicas devidas à falta da vitamina nesses casos, tendo sido recomendada a administração diária de 50 mg de piridoxina (2).

A vitamina B₆ aumenta a descarboxilação periférica da levodopa reduzindo sua eficácia em pacientes portadores da doença de Parkinson (35).

No Brasil, a vitamina B₆ está disponível nas preparações farmacêuticas comerciais sob a forma de cloridrato de piridoxina, tendo sido encontrados 59 produtos, com 77 apresentações, provenientes de 28 laboratórios farmacêuticos (23).

Os produtos contendo a vitamina distribuídos pela rede oficial da Central de Medicamentos (CEME) são em número de 4, com 6 apresentações, conforme pode ser visto no Quadro 1.

Quadro 1. Medicamentos contendo piridoxina distribuídos pela rede oficial CEME.

Produto	Forma Farmacêutica	Apresentação	Conteúdo em piridoxina
Polivitaminas Vitamina B6 Vitaminas do complexo B	Solução oral	Frasco 150mL	2mg/5mL
	Comprimidos	<i>Strip</i> c/10cps	50mg/cp.
	Solução oral	Frasco 30 mL	3 mg/mL
	Comprimidos	<i>Strip</i> c/10cps	3mg/cp.
Vitaminas e sais minerais	Injetável	Ampola de 1mL	5mg/mL
	Cápsulas	<i>Strip</i> c/10cps	5mg/cáps

Fonte: Memento Terapêutico CEME 89/90 (60).

2.4. METODOLOGIA ANALÍTICA PARA DETERMINAÇÃO DA VITAMINA B₆

Numerosas publicações têm surgido na quantificação de cada vitamina do complexo B, usando vasta e variada quantidade de métodos físicos, químicos e microbiológicos. Esses métodos foram desenvolvidos tanto para controle de produção das vitaminas, puras ou em preparações farmacêuticas, em escala industrial, ou ainda, para determinação de pequenas quantidades como nos estudos de farmacocinética e bioavaliação dessas vitaminas.

A análise individual de cada vitamina do complexo B está descrita na maioria das farmacopéias, mas apenas algumas apresentam sua determinação em preparações farmacêuticas e somente a Farmacopéia Americana descreve métodos para a análise de medicamentos contendo mais de uma vitamina.

Na determinação de vitamina B₆, a Farmacopéia Americana nas revisões XIX, XX, XXI e XXII (97,98,99,100) recomenda o método espectrofotométrico no visível após extração e reação com 2,6-dicloroquinona cloroimida, para as preparações farmacêuticas solução injetável e comprimidos de cloridrato de piridoxina e para o produto Decavitamin (preparação multivitamínica). Para a matéria-prima, a revisão XXII preconiza o método da cromatografia líquida de alta eficiência, enquanto as demais revisões empregam a volumetria em meio não aquoso com ácido perclórico. Este último método é também adotado para a análise da matéria-prima pelas farmacopéias Brasileira III ed. (30), Internacional III ed. (90), Alemã XIX ed. (22), Britânica (15), Japonesa XI ed. (73) e Italiana VII ed. (29).

Para formas farmacêuticas contendo somente vitamina B₆, as farmacopéias Britânica e Japonesa adotam os métodos da espectrofotometria no ultravioleta e no visível, após reação com 2,6-dibromoquinona cloroimida, respectivamente.

Entretanto, os métodos oficiais ainda são considerados onerosos e segundo

HASSAN (40), conduzem a resultados com até 5% de desvio. Este mesmo autor sugere um método de ressonância magnética protônica para a análise simultânea das vitaminas B₁ e B₆, apontando para a seletividade, rapidez e simplicidade como características vantajosas.

BRYANT et al. (16) tentaram agilizar o método oficial da Farmacopéia Americana desenvolvendo procedimento semi-automático para a análise simultânea de tiamina, riboflavina, piridoxina e niacinamida.

As características de absorção espectrofotométrica no ultravioleta da piridoxina em muito dependem do pH da solução, apresentando máxima extinção a 209 nm em pH=2 ($E_{1\text{cm}}^{1\%}=430$), sendo este, portanto, o comprimento de onda mais adequado para análise quantitativa. Segundo STOB⁶BECKER (84) esse método é apropriado para a análise sistemática, como o controle da produção, por exemplo, de soluções injetáveis e comprimidos de vitamina B₆, desde que os componentes usuais das preparações não interfiram. Como as preparações multivitamínicas em geral apresentam complexas formulações, na literatura freqüentemente são encontrados diversos recursos visando suprimir as interferências ou separar as vitaminas para posterior aplicação de métodos para a quantificação da vitamina B₆.

PARK & CHO (68) desenvolveram programas em computadores para a análise espectrofotométrica simultânea das vitaminas do complexo B por análise de regressão linear múltipla. Nessa linha, vários outros autores descrevem critérios para seleção de comprimento de onda na análise espectrofotométrica de multicomponentes (54,79) e os problemas decorrentes da sobreposição de bandas de absorção no espectro UV nesse tipo de metodologia (101).

As técnicas de separação mais usadas são as cromatográficas. PATHAN et al. (69) e ISMAIEL & YASSA (42) separaram por cromatografia em camada delgada as vitaminas do complexo B e aplicaram o método espectrofotométrico no ultravioleta para análise de soluções injetáveis. FRODYMA & LIEU (31) seguiram o mesmo processo de separação e a determinação das vitaminas foi conseguida empregando a espectrofotometria

de reflexão.

AHRENS & KORYTNIK (3) utilizando a cromatografia em camada delgada separaram e identificaram a piridoxina e seus produtos de decomposição em preparações farmacêuticas comerciais. Para tanto, empregaram placas de sílica gel HF_{254} e de celulose $\text{MN}_{300\text{G}}$, aplicando diversas fases móveis de variadas polaridades. A detecção foi feita com luz ultravioleta, reagente de GIBBS e p-nitroanilina diazotada.

JONEIDI et al. (44) determinaram simultaneamente as vitaminas B_1 , B_2 , B_6 e B_{12} de preparações farmacêuticas empregando a densitometria após separação por cromatografia em camada delgada. Os pesquisadores usaram placas com KIESELGEL DG como adsorvente e fase móvel etanol/água (2:1). A visualização dos pontos foi feita com reagente de Dragendorff e iodo, solução metanólica de 2,6-dicloroquinona cloroimida e vapor de amônia.

SACCANI et al. (78,79) aplicaram a cromatografia de troca iônica para separação da piridoxina que foi quantificada por espectrofotometria no UV. A coluna cromatográfica foi preenchida com resina ABERLITE CG 50H+ e a eluição feita com água destilada, solução de ácido bórico 4% (pH=3) e mistura de dioxano/ácido clorídrico 1N (60:40).

No método microbiológico descrito por TOEPFER & POLANSKY (93) e adotado pela *Association Official Analytical Chemists* para determinação de vitamina B_6 , a cromatografia de troca iônica foi empregada para preparação das amostras. Apesar de trabalhoso e demorado, o método microbiológico apresenta a vantagem da seletividade podendo discriminar as três formas de vitamina B_6 .

Os métodos de análise empregando a cromatografia líquida, oferecem velocidade, versatilidade, mínima purificação prévia da amostra, análise direta ou tratamento pré ou pós coluna e uma gama de detectores para recuperação dos compostos em suas formas originais (7).

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) abrange muitas técnicas alternativas (troca iônica, adsorção, partição, etc.) o que, aliado ao desenvolvimento tecnológico do instrumental, fez com que a CLAE se projetasse como uma das técnicas mais empregadas na análise de drogas em preparações farmacêuticas, vegetais e fluidos biológicos (89).

Muitos trabalhos foram encontrados na literatura descrevendo a análise das vitaminas hidrossolúveis por esse método, variando o tipo de coluna, a fase móvel e a detecção.

Como a CLAE com detecção eletroquímica é especialmente adequada para determinação de traços de compostos eletroativos em matrizes complexas, foi aplicada com sucesso para determinar pequenas quantidades de vitaminas (104).

Outros métodos ainda variam o tipo de tratamento prévio dado à amostra. LAM & LOWADE (50) fazem a conversão da riboflavina 5'-fosfato de sódio presente na mistura multivitamínica líquida em riboflavina pela reação com fosfatase alcalina. VANDERHORST et al. (102) submeteram a amostra a uma pré-coluna e a detecção da vitamina B₆ foi feita por fluorescência. No Quadro 2 pode ser visto um resumo destes métodos empregando a CLAE.

Quadro 2.Trabalhos relatando a análise de vitaminas do complexo B por CLAE .

Tipo de coluna, fase móvel e detecção.

COLUNA	FASE MÓVEL	DETECÇÃO	REFERÊNCIA
<i>Cosmosil-5 pH</i>	Solução de fosfato de sódio-heptanosulfonato de sódio/metanol	UV	85
*	metanol/cloreto de potássio 1% (30:70)	UV	107
<i>Ods</i>	metanol/água contendo trietilamina e heptano sulfonato de sódio	UV	4
*	solução de ácido hexanosulfônico 0,005M/metanol (85:15) e água/metanol(5:95)	UV	109
<i>M-Bondapak C18</i>	Tampão fosfato 0,6M; pH7/metanol (75:25) e água/metanol (80:20)	--	88
<i>Zorbax ODS</i>	Metanol 0,1M / tampão fosfato pH 6 (1:4 v/v)	amperométrica	104

* Colunas não identificadas pelos autores.

A CLAE de fase reversa, às vezes acoplada à técnica do par iônico, foi empregada na análise de preparações farmacêuticas multivitamínicas contendo vitamina B₆ por AMIN & REUSCH (5,6) e RAJU et al. (74). Ambos os grupos de pesquisadores adotaram técnicas de separação antes de submeter as amostras à CLAE. O primeiro grupo realizou extrações em um aparelho automatizado - *Aparatus de Krannch & Gottingen* (6)- onde as operações de adição de extratores, esfriamento e filtração são automaticamente executadas por controles eletrônicos. RAJU et al. separaram os componentes da amostra através de uma pré-coluna (*Sep Pak C₁₈*) e esgotaram a coluna *Novapak C₁₈* com gradiente de eluição contendo hexanosulfonato de sódio como reagente do par iônico. Ambos obtiveram boas taxas de recuperação e linearidade nas faixas de concentração de trabalho.

Vários outros autores buscaram a determinação simultânea das vitaminas hidrossolúveis com CLAE de fase reversa, empregando a técnica do par iônico usando como contra-íon, na fase móvel, hexanosulfonato de sódio (24,46), ácido octanosulfônico (12), octanosulfonato de sódio (7), 1-heptenosulfonato de sódio (63).

Segundo SWAILE et al. (89) a CLAE exibe apenas moderado desempenho e conseqüentemente não possui o poder de separação das técnicas de alta eficiência capilar como por exemplo a cromatografia gasosa capilar. Isso não representa grave problema nas análises de rotina, entretanto, para separações de compostos estruturalmente semelhantes ou para a análise completa de uma amostra farmacêutica complexa, a eficiência da CLAE não é adequada.

NISHI et al. (64) compararam o desempenho das técnicas de cromatografia líquida micelar e da eletroforese de zona capilar para as vitaminas do complexo B em medicamentos.

A cromatografia de capilaridade eletrocinética micelar é uma técnica de separação que combina muitos dos princípios operacionais e as vantagens da cromatografia líquida micelar e da eletroforese de zona capilar e foi empregada na análise de vitaminas do complexo B em amostras de urina humana (17) e sangue(89).

Entretanto, a determinação por CLAE das vitaminas em preparações farmacêuticas, alimentos e fluidos biológicos é geralmente complicada pelo excesso de ingredientes inativos e pelas baixas quantidades de vitamina presentes nessas amostras (6).

REYNOLDS (74) discute a importância da exatidão dos métodos analíticos na análise da B₆ em alimentos para os estudos de nutrição, ressaltando que, embora a CLAE tenha sido amplamente usada para esse fim, a metodologia é cara e demorada.

LEKLEM (52), estudando a vitamina B₆ na nutrição humana, indica a análise microbiológica para a sua determinação no plasma e urina. THAKKER et al. (91) estudaram a biodisponibilidade das vitaminas E, B₂ e B₆ em função da forma farmacêutica.

A CLAE com detecção fluorimétrica foi adotada para as determinações de B₆ no plasma.

Sendo um composto fenólico com estrutura hemi-acetal, a piridoxina exibe, em solução tampão de pH=7, uma fluorescência intrínseca com excitação e emissão nos comprimentos de onda de 326 e 395 nm, respectivamente.

WAMPLER & CHURCHICH (105) estudaram a fluorescência da piridoxina em função do pH e a distribuição das estruturas do piridoxal em solução aquosa por espectrofluorimetria. GAO & CHEN (32) determinaram a quantidade total de vitamina B₆ por espectrofluorimetria adotando $\lambda = 292$ nm para excitação e $\lambda = 382$ nm para emissão. A determinação simultânea da piridoxina, tiamina e riboflavina empregando essa técnica foi feita por BARARY (8). Segundo ele, o método é altamente específico e pode ser executado sem prévia extração ou separação das vitaminas. Constatou que a fluorescência é linear na faixa de 0,5 a 2,5 µg/mL.

Porém, para AYI et al. (7), o método fluorimétrico não é totalmente específico e envolve a purificação completa da amostra para remover compostos que interferem na fluorescência. Por este motivo, também empregou a cromatografia líquida de fase reversa com coluna *Spherisorb ODS* e fase móvel com fosfato de trimetil amônio 0,04M (pH=3)/ metanol/acetonitrila (85:10:5) com octanosulfonato de sódio.

Outros métodos descritos são o titulométrico, baseado na oxidação da piridoxina por cloramina T, bromamina T e bromoamina B após extração com clorofórmio (43), e potenciométrico através de eletrodos de membrana de PVC (108) e reação com n-bromo succinimida detectada com eletrodo brometo-seletivo (39).

Problemas relativos à seletividade na análise das vitaminas em preparações farmacêuticas foram apontados por MACEK (55) e estudos foram conduzidos por GUPTA & LOFGREN (37) empregando o método da Farmacopéia Americana XV rev.; SUCH et al. (87) criticam o método oficial da reação com 2,6-dicloroquinona cloroimida, para a análise de piridoxina, quanto à especificidade e afirmam que é necessária especial perícia na execução da técnica uma vez que a coloração obtida na reação é muito instável.

Os ensaios de estabilidade realizados por SUCH et al. basearam-se em técnicas de CLAE de camada delgada e espectrofotometria derivada.

2.5. ESPECTROFOTOMETRIA DERIVADA

2.5.1. Histórico

A espectrofotometria derivada (ED) é uma técnica analítica com grande capacidade de fornecer informações qualitativas e quantitativas a partir de bandas espectrais simples ou sobrepostas (59).

Quanto à denominação, devemos ressaltar que há uma certa indiscriminação no uso do termo espectrofotometria diferencial que, embora mais apropriado matematicamente para designar a ED, refere-se a uma técnica, também conhecida como espectrofotometria de precisão, empregada para melhorar a eficiência da espectrofotometria convencional no caso da análise de amostras cujas absorbâncias são altas ou baixas demais (10).

A espectrofotometria por diferença é, muitas vezes, também denominada de diferencial. Este método compensa a presença de interferentes pela diferença de leitura, em certo comprimento de onda, entre duas soluções de uma mesma amostra, porém com modificação nas propriedades físico-químicas (por exemplo pH), assumindo que não há alteração na absorção dos interferentes (20,25).

Introduzida na década de 50 para a solução de problemas analíticos específicos, a ED teve maior aceitação apenas recentemente, embora apresentasse grandes vantagens frente à espectrofotometria convencional.

Um dos principais trabalhos que precedeu o seu desenvolvimento foi o de VANDENBELT & HENRICH (101) que estudaram os efeitos da sobreposição de bandas

de absorção de dois componentes em mistura e o risco da interpretação errônea dos espectros, sobretudo no desprezo de uma leve alteração na inflexão da curva, ou ainda, a não detecção de um pequeno ombro nos perfis das bandas de absorção.

O uso da derivada de 1ª ordem do espectro de transmitância para detecção de bandas sobrepostas foi relatado primeiramente por GIESE & FRENCH (33) que avaliaram graficamente o desempenho das curvas derivadas na resolução de bandas espectrais de misturas binárias cujos picos de absorção se dão no mesmo comprimento de onda. Conforme o relato desses pesquisadores, havia pelo menos dois obstáculos contra o emprego efetivo da ED na prática analítica. O primeiro referia-se ao método de determinação das curvas derivadas, restrito ao cálculo algébrico, impossibilitando a obtenção de valores exatos em pequenos intervalos de diferenciação. Até então, a aparelhagem consistia do uso de espectrofotômetros e calculadoras simples e os autores mencionam a necessidade do desenvolvimento de instrumentos capazes de registrar a derivada da curva espectrofotométrica contra intervalos constantes de comprimento de onda. O segundo obstáculo na adoção da ED como método alternativo de análise foi a dificuldade de interpretação das curvas derivadas na detecção de bandas sobrepostas, pois com apenas a primeira derivada era difícil indicar a exata localização dessas bandas.

Em 1956, COLLIER & SINGLETON (18) empregaram a ED em análises no infra-vermelho para misturas contendo cresol, fenol mesitol e xilenol.

PEMSLER (70) relata a construção de um instrumento, em 1957, que registrava a diferença entre as transmitâncias de uma substância absorvente em dois comprimentos de onda muito próximos e cita que sua adaptação aos espectrofotômetros da época era relativamente simples. A partir dessa inovação, o pesquisador sugere um novo cálculo para a obtenção da curva derivada.

McWILLIAM (59) empregou um diferenciador de placa oscilante acoplado a um monocromador infravermelho onde o espectro derivado foi obtido colocando uma placa defletora de raio oscilante no caminho óptico do monocromador. Esta técnica foi desenvolvida na tentativa de melhorar a resolução nos casos de sobreposição muito

acentuada de bandas espectrais

SAVITSKY & GOLAY (82) na década de 60 popularizaram uma metodologia onde a diferenciação podia ser feita numericamente em computadores digitais. Foram desenvolvidos vários programas para esse fim e as derivadas de ordens pouco maiores foram obtidas. Segundo os autores os programas são simples e fáceis de serem aplicados.

O'HAYER no decorrer dos anos 70 publicou vários trabalhos, alguns com GREEN, aplicando a ED (36,65,66,67). O pesquisador referiu-se à modulação do comprimento de onda para a obtenção dos espectros derivados. Nessa técnica, o comprimento de onda no qual o monocromador ou filtro está selecionado é repetitivamente e rapidamente alterado para valores superiores e inferiores ao longo de um pequeno intervalo espectral chamado por ele de intervalo de modulação ($\Delta\lambda$). No fotodetector isto resulta em uma ondulação ou corrente alternada que pode ser isolada e medida eletronicamente. A vantagem obtida foi a melhoria da resolução do método ED.

Paralelamente, o rápido progresso da eletrônica moderna permitiu a diferenciação contínua dos sinais, simultaneamente à análise, com aparelhos de diferenciação digital e muitos trabalhos foram publicados empregando a ED (38,84,95,103).

Entretanto, segundo TALSKY et al. (90), o alto custo desse equipamento, até o fim da década de 70, incrementou o uso da diferenciação nos microcomputadores em operações pós-análise. Esses pesquisadores desenvolveram um diferenciador analógico eletrônico e demonstraram como as derivadas de ordens maiores melhoravam as informações obtidas dos espectros ultravioleta e visível.

A partir da década de 80, com a diminuição dos custos do equipamento, a ED vem sendo amplamente usada na solução de problemas analíticos quantitativos, em misturas complexas e também nos estudos de estabilidade, onde os produtos de decomposição são muito semelhantes estruturalmente aos compostos originais (47,48,49,51,58,77,80,87,92).

2.5.2. Alguns aspectos gerais da espectrofotometria derivada

Num espectro constituído por um pico simples, a derivada de 1ª ordem é representada pela diferença da absorção envolvida *versus* comprimento de onda ($dA/d\lambda$), caracterizando um ponto máximo e outro mínimo. A distância vertical entre estes pontos é a amplitude, que é proporcional à concentração da substância que originou o pico inicial. Teoricamente, o valor da derivada de 1ª ordem é igual a zero no comprimento de onda de máxima absorção (λ máx.) do espectro convencional, também denominado de espectro derivado de ordem zero. O espectro derivado de 2ª ordem ($d^2A/d\lambda$) *versus* comprimento de onda, tem dois máximos intercalados por um mínimo, no λ máx. do espectro normal. A princípio, a altura dos picos, medidos a partir de $d^2A/d\lambda = 0$, é proporcional à concentração, podendo ser utilizada para determinação quantitativa da substância em análise. Os métodos que podem ser empregados no cálculo são o método pico-pico, o da tangente e o *zero crossing* (90).

A diferenciação atua nas bandas largas, enfatizando traçados agudos de maneira que aumenta sua amplitude com o aumento da ordem da derivada pois, para bandas do tipo gaussianas ou lorentzianas, a amplitude d^n da derivada de ordem n é descrita pela n ésima potência do inverso da largura da banda W do espectro de ordem zero, ou seja,

$$d^n = (1/W)^n$$

Portanto, no caso de duas bandas, X e Y, de igual absorbância mas de diferentes larguras, a amplitude derivada da banda mais aguda é maior que a da banda mais larga, diferença esta que se acentua conforme o aumento da ordem da derivada:

$$\frac{d^n X}{d^n Y} \propto \left(\frac{W_y}{W_x} \right)^n$$

Assim sendo, o uso da derivada pode aumentar a sensibilidade na determinação de bandas espectrais menores (77).

Na análise quantitativa, se a Lei de Lambert-Beer é obedecida no espectro convencional, a concentração do composto em estudo é diretamente proporcional à derivada de acordo com a equação (53):

$$\frac{d^n A}{d\lambda^n} = \frac{d^n E}{d\lambda^n} \cdot l \cdot c$$

Onde: A = absorbância

E = absortividade molar

l = espessura da cubeta

c = concentração

n = ordem da derivada

2.5.3. Principais aplicações da espectrofotometria derivada

Nos últimos anos, a literatura especializada vem registrando um número cada vez maior de trabalhos sobre a espectrofotometria derivada. As vantagens e versatilidade desta técnica estão amplamente demonstradas na prática analítica tanto para objetivos qualitativos como para fins quantitativos.

2.5.3.1. Análise qualitativa

Os espectros obtidos no ultravioleta e visível são geralmente largos, pouco característicos e com perfis mal definidos, difíceis de serem precisamente interpretados (90).

Com o emprego da ED é possível determinar, sem ambigüidades, a posição dos máximos de absorção (correspondentes ao ponto de anulação da 1ª derivada) e dos ombros (correspondentes ao ponto de anulação da 2ª derivada). Aumentando-se a ordem das derivadas, aumentam-se as informações quanto ao número de picos máximos e mínimos e pontos de anulação. Estes elementos melhoram a definição dos espectros, fornecendo um perfil personalizado de cada substância, podendo ser comparado à região chamada de "impressão digital" do espectro infra-vermelho (53).

LAWRENCE & MACNELL (51) empregaram a ED na identificação da anfetamina, fenetilamina, efedrina e meperidina. O experimento desses pesquisadores indicou que os compostos estudados exibem espectros derivados de 2ª ordem característicos podendo ser utilizados na identificação comparativa. Como vantagens citam a simplicidade analítica e o baixo custo.

Os espectros convencionais de absorção dos metais de terras raras constituem-se de muitos picos e ombros, muitas vezes sobrepostos e de difícil determinação. SHIBATA et al. (84), empregando a ED conseguiram identificar o hólmio e o neodímio em terras raras através da determinação de seus espectros derivados de 1ª ordem, considerados característicos pelos autores. Procedimento semelhante foi adotado, pelos mesmos pesquisadores, na detecção de mistura de fenóis, tendo sido identificados no espectro derivado de 1ª ordem o 2,4-diclorofenol e o 2,4,6-triclorofenol.

A análise qualitativa de substâncias puras ou em mistura pelo método ED não se restringe apenas à espectrofotometria UV/Visível, podendo ser aplicada à espectrofluorimetria, como fizeram GREEN & O'HAVER (36) para identificação do benzopireno, ou ainda na espectrofotometria no infra-vermelho, aplicada, por exemplo, por COLLIER & SINGLETON (18) na identificação de compostos do alcatrão.

2.5.3.2. Análise quantitativa

Uma vez que a espectrofotometria derivada é uma técnica que possibilita a extração de maior número de informações a partir de um espectro convencional, torna-se evidente que as aplicações desta metodologia na análise quantitativa são inúmeras. O uso da ED permite a separação de bandas sobrepostas, facilitando a eliminação de interferentes e, portanto, permitindo a análise de muitos compostos cuja análise pelos métodos usuais é difícil ou mesmo impossível de ser realizada.

Nesse sentido, destaca-se o trabalho de TORRES et al. (94) que avaliaram o desempenho da técnica derivada na espectrofotometria e espectrofluorimetria, estudando a linearidade de resposta, seletividade frente aos interferentes e introduzindo modificações no processamento dos resultados visando o aperfeiçoamento da metodologia.

HAGER (38) considerou a ED como técnica extremamente eficiente para a análise gasosa de traços. Os procedimentos e instrumentação analíticos desenvolvidos para este fim possibilitaram a determinação de concentrações de ordem inferior a partes por bilhão. Foram estudados 13 gases (ou vapores), entre os quais óxido nítrico, dióxido de nitrogênio, ozônio, amônia.

COLLIER & SINGLETON (18) empregaram o espectro infra-vermelho derivado de 2ª ordem para a análise quali e quantitativa do alcatrão bruto e do cresol comercial. Os autores concluíram que o espectro derivado, comparado ao convencional, fornece muito mais informações e detecta quantidades menores de impurezas.

2.5.3.3. Aplicações da espectrofotometria derivada no campo farmacêutico

A ED tem sido aplicada no controle de qualidade de muitas preparações farmacêuticas, sendo particularmente vantajosa na eliminação da interferência dos excipientes.

Foi descrita por DAVIDSON & ELSHEIK ¹⁹(~~68~~) uma técnica exata e precisa para a análise de efedrina e de seu diastereoisômero pseudoefedrina em preparações farmacêuticas utilizando os espectros derivados de 2ª e 4ª ordens do ultravioleta.

A análise de fármacos aromáticos é sempre complicada pois têm fraca absorção no ultravioleta próximo. Diversas formulações de cápsulas e comprimidos envolvendo 18 compostos aromáticos foram analisadas por DAVIDSON & HASSAN (20), empregando a ED.

MORELLI (62) determinou a cefapirina e cefaruxima puras e na forma de injetável, aplicando derivadas de 1ª e 2ª ordens do espectro ultravioleta.

Conservando basicamente o mesmo princípio, muitos outros compostos ou grupos de substâncias foram analisados empregando a técnica ED por diversos pesquisadores, dentre os quais destacam-se:

BELAL et al. (9): amitriptilina e clordiazepóxido em mistura;

DUHAU et al. (26): 23 benzodiazepinas e seus metabólitos;

HASSAN & DAVIDSON (41): atropina, hioscina e benztropina em

medicamentos;

JONES & MARNHAM (45): prociclidina em comprimidos e solução injetável;

KITAMURA & MAJIMA (47), SALINAS et al. (80), MA²²XEO et al. (58): ácido acetil salicílico e ácido salicílico em preparações farmacêuticas;

TOBIAS (92): acetaminofeno e salicilato de sódio em comprimidos;

EL-YAZBI (27): hidrocortisona, dexametasona, prednisona e prednisolona em mistura;

ABDEL-KHALER et al. (1): cinarizina, fenfluramina, fentermina, feniltoloxamina, propoxifeno, e outros, em medicamentos.

Recentemente, a ED começou a ser aplicada com sucesso para a determinação de certos fármacos na presença de seus produtos de degradação, assim como na determinação dos produtos de degradação na presença da droga inalterada.

KORANY et al. (49) propuseram a metodologia ED de 1ª e 2ª ordens na análise de sete cefalosporinas e seus produtos de decomposição, obtidos por hidrólise alcalina. Os autores determinaram a taxa de degradação e a meia vida dos compostos, confirmando que as técnicas desenvolvidas podem ser empregadas em estudos de estabilidade. Como vantagens foram enumeradas a sensibilidade e a facilidade de aplicação, já que não há necessidade de extração.

Ainda KORANY et al.(48) estudaram a estabilidade do acetaminofeno e da fenacetina em comprimidos e xaropes, na presença de seus produtos de decomposição, empregando derivadas de 2ª ordem do espectro UV/Visível.

Apenas dois grupos de pesquisadores estudaram as vitaminas hidrossolúveis usando o método da ED. SUCH et al. (87), compararam o desempenho da ED com a CLAE frente a interferentes e produtos de decomposição. Estes pesquisadores estudaram misturas binárias de tiamina e piridoxina e uma fórmula de comprimido revestido contendo diazepam, além das duas vitaminas. Para a piridoxina empregaram a derivada

de 2ª ordem, método este que teve eficiência similar à CLAE, embora o mesmo não tenha ocorrido com a tiamina. Entretanto os autores afirmam que a utilização de um ou outro método depende de vários fatores entre os quais a especificidade desejada (no caso da detecção e quantificação de produtos de degradação) e dos interferentes presentes nas formulações a serem estudadas. PETIOT et al. (71) analisaram uma mistura contendo as vitaminas B₁, B₂, B₆, PP e pantotenato de cálcio pelo método da ED usando derivadas de 1ª ordem. A determinação simultânea de todas as vitaminas foi calculada empregando um programa de computador para análise de multicomponentes (*Concentration Method 4* para HP8451). Foram determinados qualitativamente alguns produtos de decomposição.

3. PROPOSIÇÃO

Tendo em vista o grande emprego de produtos farmacêuticos multivitamínicos, sobretudo em países cujas carências nutricionais são elevadas, os atributos de qualidade assumem relevante importância.

As interações das diversas vitaminas entre si e com os demais componentes da fórmula podem diminuir ainda mais sua estabilidade. Aspectos como a conservação, transporte e armazenamento devem ser considerados.

Nesse sentido, a busca da metodologia adequada para o controle da produção e da estabilidade desses produtos tem sido constante e de interesse internacional.

Com base nas informações da literatura podemos observar que embora a metodologia da espectrofotometria derivada esteja bastante difundida, praticamente nada existe com relação à vitamina B₆ em preparações multivitamínicas. Após alguns ensaios preliminares, constatamos a possibilidade de empregar esta técnica para a análise da vitamina B₆, com vantagens sobre outras técnicas.

Assim sendo, propomos o desenvolvimento do método, de acordo com as seguintes etapas:

- Levantamento dos espectros derivados das diferentes vitaminas comumente empregadas nos produtos multivitamínicos, para verificação da possibilidade de aplicação do método.
- Padronização das condições experimentais para determinação quantitativa da piridoxina.
- Estudo dos interferentes e da validade do método.
- Aplicação do método em preparações multivitamínicas simuladas e comerciais.

4. MATERIAIS E PROCEDIMENTOS

4.1. MATERIAIS

4.1.1. Solventes e reagentes

- solução de ácido clorídrico 0,1 N
- solução tampão cloreto de amônio/hidróxido de amônio⁽¹⁰⁰⁾
- solução de 2,6-dicloroquinona cloroimida em isopropanol 0,04%(p/v)
- álcool isopropílico
- dióxido de manganês
- ácido clorídrico concentrado
- solução de acetato de sódio 20% (p/v)
- solução de ácido bórico 5% (p/v)
- solução de hidróxido de sódio 1 N

Todos os solventes e reagentes empregados possuíam grau de pureza analítico.

4.1.2. Substâncias químicas de referência

Foram empregadas como substâncias químicas de referência os seguintes fármacos cedidos pela Fundação do Remédio Popular (FURP), com grau farmacêutico de pureza:

- cloridrato de piridoxina
- fosfato de riboflavina
- cloridrato de tiamina
- nicotinamida
- pantenol
- acetato de retinol, 500.000 UI/g
- acetato de tocoferol a 50%
- pantotenato de cálcio

As substâncias de referência, a seguir, foram adquiridas no comércio local:

- mononitrato de tiamina
- riboflavina
- cianocobalamina
- hidroxicobalamina
- ácido ascórbico
- ergocalciferol

4.1.3. Amostras

As amostras empregadas no trabalho de pesquisa foram:

4.1.3.1. Amostra A

Foram preparados 200 mL de amostra simulada similar à solução injetável adotada pela Rede Oficial (CEME), cujas fórmula e técnica de preparação são descritas a seguir:

Fórmula	Quantidade para uma ampola
cloridrato de tiamina	25,00 mg*
fosfato de riboflavina	5,00 mg*
cloridrato de piridoxina	5,00 mg*
nicotinamida	50,00 mg
pantenol	25,00 mg*
tetracetato de etilenodiamina dissódico	0,10 mg
cloreto de benzalcônio	0,10 mg
hidroxicobalamina	5,00 µg
água destilada q.s.p.	1,00 mL

* Componentes cujas quantidades estão adicionadas em excesso de 10%.

Técnica de preparação:

Dissolveram-se as vitaminas, separadamente, em quantidade suficiente de água destilada e transferiram-se para balão volumétrico de 200 mL. O cloreto de benzalcônio foi dissolvido em 10 mL de água destilada ligeiramente aquecida e, após resfriamento, adicionado ao balão contendo as vitaminas. A mistura foi agitada em ultrassom e o volume completado com água destilada.

4.1.3.2. Amostra B

Foram preparados 200 mL de amostra simulada multivitamínica similar à solução oral adotada pela Rede Oficial (CEME), com as seguintes fórmula e técnica de preparação:

Fórmula	Quantidade para um frasco	
mononitrato de tiamina	133,23 mg*	444,10
fosfato de riboflavina	147,95 mg*	493,17
cloridrato de piridoxina	114,85 mg*	382,83
pantenol	108,00 mg*	360,00
nicotinamida	300,00 mg	400,00
álcool etílico	0,30 mL	4,00
ácido cítrico anidro	3,00 mg	10,00
ácido benzóico	45,00 mg	150,00
essência de laranja	0,02 mL	
tetracetato de etilenodiamina dissódico	0,03 mg	
sorbitol a 70%	3000,00 mg	
sacarose refinada	6000,00 mg	
água destilada q.s.p	30,00 mL	

4.1.3.3. Amostra C

Foi preparada uma quantidade de pó equivalente ao peso de 100 cápsulas pela mistura adequada das matérias primas da fórmula abaixo, similar à adotada pela Rede Oficial (CEME), para a forma farmacêutica cápsulas.

Fórmula	Quantidade /cápsula
acetato de retinol (500.000 UI/g)	55,00 mg*
mononitrato de tiamina	13,54 mg*
riboflavina	5,50 mg*
cloridrato de piridoxina	6,69 mg*
cianocobalamina	5,50 µg*
ácido ascórbico	110,00 mg*
ergocalciferol	11,10 mg*
acetato de tocoferol 50%	11,00 mg*
nicotinamida	11,00 mg*
pantotenato de cálcio	11,00 mg*
carbonato de cálcio	180,00 mg
carbonato de magnésio	5,00 mg
sulfato de manganês	1,00 mg
sulfato de potássio	5,00 mg
sulfato de zinco	1,00 mg
talco	33,16 mg

4.1.3.4. Amostras A', B' e C'

As amostras simuladas A', B' e C' foram preparadas de maneira idêntica à das amostras A, B e C, respectivamente, exceto que a matéria prima cloridrato de piridoxina foi suprimida de suas fórmulas.

Todas as matérias primas empregadas na preparação das amostras simuladas eram de grau farmacêutico.

4.1.3.5. Amostras comerciais

Foram escolhidas quatro amostras comerciais de preparações multivitamínicas, contendo cloridrato de piridoxina, na forma farmacêutica drágeas, aqui designadas por W, X, Y e Z, provenientes de três laboratórios farmacêuticos, conforme indica o Quadro 3.

Quadro 3. Amostras comerciais de multivitamínicos, contendo cloridrato de piridoxina, na forma farmacêutica drágeas.

Amostra	Laboratório	Conteúdo declarado*	Indicação da bula
W	I	10,00 mg	Reposição de vitaminas e sais minerais
X	I	10,00 mg	Gravidez e lactação
Y	II	10,00 mg	Fadiga e astenia
Z	III	1,00 mg	Anemia ferropriva

* Conteúdo em cloridrato de piridoxina

4.1.4. Equipamentos

Além dos equipamentos normalmente usados nos laboratórios de Farmacotécnica e de Controle de Qualidade, utilizou-se o espectrofotômetro *Beckmann-DU Série 70*, provido de impressora e cubetas de 1 cm de espessura.

4.2. PROCEDIMENTO ANALÍTICO PARA PADRONIZAÇÃO DO MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DO CLORIDRATO DE PIRIDOXINA

Tendo em vista as características de solubilidade, espectro de absorção e perfil da curva derivada do cloridrato de piridoxina, fixaram-se , preliminarmente, os seguintes parâmetros:

- solvente: solução de ácido clorídrico 0,1N
- ordem das derivadas: 1ª e 2ª ordem
- delta lambda ($\Delta\lambda$): 4 e 8 nm
- velocidade de varredura do espectro de absorção: 120 nm/minuto
- assentamento das ordenadas nos gráficos: $\pm 0,020$ e $\pm 0,050$
- intervalo de varredura do espectro: 220 a 350 nm

4.2.1. Escolha da concentração de leitura

Com a intenção de escolher a concentração mais adequada para trabalho e, considerando a faixa de absorbância de menor erro experimental, prepararam-se soluções de cloridrato de piridoxina em diferentes concentrações. Tendo como base uma solução contendo 50 $\mu\text{g/mL}$ de cloridrato de piridoxina em ácido clorídrico 0,1 N. Foram obtidas quatro soluções com 5, 10, 15 e 20 $\mu\text{g/mL}$, empregando o mesmo solvente.

Após calibração do aparelho com solução de ácido clorídrico 0,1 N, determinaram-se os espectros de absorção e as curvas derivadas de 1ª e 2ª ordem, no intervalo de 220 a 350nm.

Com os resultados obtidos foi possível escolher a concentração de leitura e determinar os picos de máxima absorção para a vitamina B₆.

4.2.2. Estudo da interferência dos demais constituintes das fórmulas multivitamínicas

Para verificar a interferência das demais matérias-primas no método espectrofotométrico convencional e nas derivadas, as amostras simuladas A, B e C foram analisadas paralelamente às amostras A', B' e C'.

4.2.2.1. Preparo da solução do padrão

Pesaram-se e transferiram-se para balão volumétrico de 50 mL, 50 mg de cloridrato de piridoxina. Dissolveu-se e completou-se o volume com ácido clorídrico 0,1 N. Dessa solução foram feitas duas diluições subseqüentes a 10% com o mesmo solvente. A concentração resultante foi de 10 µg/mL de cloridrato de piridoxina.

4.2.2.2. Preparo da solução das amostras

Amostras A e A':

Foram transferidos 10 mL da amostra simulada correspondente para balão volumétrico de 500 mL e completou-se com ácido clorídrico 0,1 N. A partir desta, efetuou-se uma diluição a 10%, obtendo-se uma solução contendo 10 $\mu\text{g/mL}$ de cloridrato de piridoxina apenas para a amostra A.

Amostras B e B':

Transferiu-se uma alíquota de 10 mL da amostra simulada para balão volumétrico de 250 mL. Diluiu-se o volume com solução de ácido clorídrico 0,1 N. Desta solução, 3 mL foram transferidos para balão volumétrico de 50 mL e o volume foi completado com o mesmo solvente. A concentração de cloridrato de piridoxina obtida foi de 9,0 $\mu\text{g/mL}$ na solução da amostra B.

Amostras C e C':

Pesou-se quantidade de pó de cada amostra simulada, equivalente a cinco cápsulas e transferiu-se para balão volumétrico de 500 mL. Adicionou-se cerca de 250 mL de ácido clorídrico 0,1 N e agitou-se por 30 minutos. Após completar o volume com o mesmo solvente, a amostra foi filtrada por papel de filtro. Desprezados os primeiros 10 mL do filtrado, uma porção de 10 mL foi diluída para 50 mL, obtendo-se a concentração final de 13,48 $\mu\text{g/mL}$ de cloridrato de piridoxina em ácido clorídrico 0,1 N, para a solução da amostra C.

Após o preparo das soluções das amostras, determinaram-se os espectros no ultravioleta convencional e das derivadas de 1ª e 2ª ordem, conforme os parâmetros estabelecidos no item 4.2..

4.2.3. Determinação das retas de calibração

As retas de calibração foram obtidas preparando-se 10 soluções de cloridrato de piridoxina em ácido clorídrico 0,1 N, cujas concentrações variaram de 5 a 14 µg/mL, conforme o indicado na Tabela 1.

Para tanto, empregou-se uma solução padrão de cloridrato de piridoxina em ácido clorídrico 0,1 N contendo 50 µg/mL da vitamina, obtida dissolvendo-se 50 mg da substância de referência em 50 mL de solvente, com uma diluição subsequente a 10%.

Tabela 1. Preparação das soluções de cloridrato de piridoxina em HCl 0,1 N para obtenção das retas de calibração. As alíquotas da solução padrão foram transferidas para balões volumétricos de 50 mL.

Amostra	Volume de solução padrão (50 µg/mL) em mL	Concentração final em µg/mL
1	5	5,0
2	6	6,0
3	7	7,0
4	8	8,0
5	9	9,0
6	10	10,0
7	11	11,0
8	12	12,0
9	13	13,0
10	14	14,0

Após a preparação das soluções, determinaram-se os valores de derivada de 1ª ordem nos comprimentos de onda 302 e 308 nm e os valores de derivada de 2ª ordem a 307 nm. Calcularam-se os erros padrão e os coeficientes de correlação linear. Para os cálculos, empregou-se o método dos mínimos quadrados (21,61). A aplicação deste método está exemplificada no ADENDO I.

4.2.4. Teste de recuperação

Realizado com o objetivo de comprovar a exatidão do método. Este teste consiste em adicionar quantidades conhecidas de padrão às amostras, seguida da aplicação do método proposto (100).

4.2.4.1. Preparo da solução do padrão

Após pesagem, 50 mg de cloridrato de piridoxina foram dissolvidos em 100 mL de ácido clorídrico 0,1 N, em balão volumétrico. Dessa solução, transferiram-se 10 mL para balão volumétrico de 500 mL e diluiu-se ao volume com o mesmo solvente. A solução resultante continha 10 µg/mL de cloridrato de piridoxina.

4.2.4.2. Preparo da solução das amostras

Amostra A:

Diluíram-se 10 mL da amostra A para 500 mL, em balão volumétrico, obtendo-se a concentração de 100 µg/mL de cloridrato de piridoxina. Alíquotas dessa solução foram transferidas para balões volumétricos de 50 mL onde foi adicionada a solução padrão, conforme indicado na Tabela 2. O solvente empregado em todas as operações foi a solução de ácido clorídrico 0,1 N.

Tabela 2. Volumes de solução da amostra A e de solução padrão empregados na preparação das amostras submetidas ao teste de recuperação (C = concentração em cloridrato de piridoxina).

Amostra	Solução da amostra A (C=100µg/mL) em mL	Solução do padrão (C=10µg/mL) em mL
1	5	5
2	5	10
3	5	20
4	5	--

Amostra B:

Diluíram-se 10 mL da amostra B para 250 mL com ácido clorídrico 0,1 N, obtendo-se a concentração de 150 $\mu\text{g/mL}$ em cloridrato de piridoxina. Alíquotas de 3 mL dessa solução foram transferidas para balões volumétricos de 50 mL onde adicionou-se o padrão, conforme o indicado na Tabela 3. Todos os balões foram completados com ácido clorídrico 0,1 N.

Tabela 3. Volumes da solução da amostra B e de solução padrão empregados na preparação das amostras submetidas ao teste de recuperação (C = concentração em cloridrato de piridoxina).

Amostra	Solução da amostra B (C=150 $\mu\text{g/mL}$) em mL	Solução do padrão (C=10 $\mu\text{g/mL}$) em mL
1	3	5
2	3	10
3	3	20
4	3	--

Amostra C:

Quantidade de pó da amostra C, correspondente ao peso de cinco cápsulas foi transferida para balão volumétrico de 500 mL. Foram adicionados cerca de 250 mL de ácido clorídrico 0,1 N e a amostra foi submetida a 30 minutos de agitação. O volume foi completado e a amostra filtrada por papel. Alíquotas de 10 mL do filtrado, contendo 67 µg/mL de cloridrato de piridoxina, foram transferidas para balões volumétricos de 50 mL, para os quais foi adicionada a solução padrão, conforme a Tabela 4.

Tabela 4. Volumes de solução da amostra C e da solução padrão empregados na preparação das amostras submetidas ao teste de recuperação (C = concentração em cloridrato de piridoxina).

Amostra	Solução da amostra (C=67µg/mL) em mL	Solução do padrão (C=10µg/mL) em mL
1	10	5
2	10	10
3	10	20
4	10	--

Após o preparo do padrão e das amostras, foram feitas determinações espectrofotométricas, ajustando o aparelho para obtenção das derivadas. Com os dados obtidos, calcularam-se as concentrações. (ver anexos)

4.2.5. Aplicação do método na análise das amostras simuladas e comerciais

4.2.5.1. Preparo da solução do padrão

Pesaram-se 50 mg de cloridrato de piridoxina e transferiram-se para balão volumétrico de 50 mL. Empregou-se ácido clorídrico 0,1 N para dissolução e ajuste do volume. A partir dessa solução, foram feitas duas diluições subseqüentes a 10% com o mesmo solvente, obtendo-se a concentração de 10 µg/mL de cloridrato de piridoxina.

4.2.5.2. Preparo da solução das amostras simuladas

As amostras simuladas A, B e C foram preparadas de acordo com o procedimento descrito nos itens 4.2.2.2. .

4.2.5.3. Preparo da solução das amostras comerciais

Após remoção do revestimento, o peso médio das drágeas foi determinado em vinte unidades do mesmo lote e as amostras foram trituradas até obtenção de pó homogêneo. Pesaram-se, para as amostras W,X e Y, quantidades de pó correspondentes ao peso de duas drágeas, que foram transferidas para balões volumétricos de 200 mL. Empregando ácido clorídrico 0,1 N como solvente, completou-se o volume dos balões que foram submetidos a agitação em ultrassom por 30 minutos. Cada solução foi filtrada e procedeu-se a uma diluição a 10%, com o mesmo solvente. A solução correspondente à amostra Z

foi obtida de forma similar, pesando-se quantidade de pó equivalente ao peso de cinco drágeas que foi transferida para balão volumétrico de 100 mL. A última diluição, após filtração foi a 5%. Desta forma, obteve-se, para todas as amostras, a concentração teórica de 10 µg/mL de cloridrato de piridoxina.

Após o preparo, as amostras e o padrão foram submetidos ao método proposto, obtendo-se os valores de derivada de 1ª e 2ª ordem. Os resultados receberam tratamento estatístico, conforme o exemplificado no ADENDO I.

4.2.6. Comparação do método desenvolvido com o método da Farmacopéia Americana XXII revisão.

O método proposto, após desenvolvimento e padronização das condições de análise, teve seu desempenho comparado com o do método da Farmacopéia Americana, XXII revisão, adotado para a análise de cloridrato de piridoxina no produto Decavitamin, cápsulas e comprimidos, e na solução injetável de cloridrato de piridoxina (99,100).

Os dois métodos foram aplicados às mesmas amostras simuladas A, B e C. A descrição do procedimento adotado no método da derivada está detalhado no item 4.2.5.

5. RESULTADOS

5.1. PADRONIZAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO

Escolha da concentração de leitura

Determinaram-se os picos de máxima absorção do cloridrato de piridoxina no espectro UV convencional ($\lambda=290\text{nm}$), derivada de 1ª ordem ($\lambda=302\text{nm}$) e na derivada de 2ª ordem ($\lambda=307\text{nm}$). Os valores de absorbância e derivadas são apresentados na Tabela 5.

Tabela 5. Absorbância das soluções de cloridrato de piridoxina em HCl 0,1 N. em função da concentração e respectivas derivadas de 1ª e 2ª ordem, nos comprimentos de onda de máxima absorção e máxima amplitude de derivada.

Solução	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Absorbância a 290 nm	$dA/d\lambda$ a 302nm	$d^2A/d\lambda$ a 307nm
1	4,98	0,215	0,0143	0,0032
2	9,96	0,425	0,0294	0,0062
3	14,94	0,638	0,0460	0,0095
4	19,92	0,870	0,0595	0,0133

Para verificar a proporcionalidade entre as diferentes concentrações e seus valores de derivada, calcularam-se as constantes de proporcionalidade K , K' e K'' :

Lei de Lambert-Beer $A = a.b.c$

Onde A = absorvância

a = absortividade

b = espessura da cubeta

c = concentração

Como a e b são constantes para uma mesma substância, analisada nas mesmas condições, então:

$$a \cdot b = K$$

Portanto,

$$A = K \cdot c \quad \text{ou} \quad K = A/c$$

Analogamente, como $dA/d\lambda$ e $d^2A/d\lambda^2$ são decorrentes de A , é verdadeiro afirmar que:

$$K' = \frac{dA/d\lambda}{c} \quad \text{e} \quad K'' = \frac{d^2A}{c}$$

Na Tabela 6 estão ilustrados os valores de K , K' e K'' encontrados.

Tabela 6. Constantes de proporcionalidade calculadas para os espectros de absorção (K), derivada de 1ª ordem (K') e derivada de 2ª ordem (K'')

Solução	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	K	K'	K'' ($\times 10^{-3}$)
1	4,98	4,32	1,80	2,00
2	9,96	4,28	1,85	1,96
3	14,94	4,27	1,94	2,00
4	19,92	4,37	1,88	2,10

Os resultados também podem ser visualizados nas figuras a seguir.

Figura 1. Espectro convencional da absorção no UV de soluções contendo 5, 10, 15 e 20 µg/mL de cloridrato de piridoxina em HCl 0,1 N. (a, b, c e d - Concentrações de cloridrato de piridoxina: 5, 10, 15 e 20 µg/mL, respectivamente).

Figura 2. Espectro da derivada de 1ª ordem de soluções contendo 5, 10, 15 e 20 mg de cloridrato de piridoxina em HCl 0.1N. (a, b, c e d - Concentrações de cloridrato de piridoxina: 5, 10, 15 e 20 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente).

Figura 3. Espectro da derivada de 2ª ordem de soluções contendo 5, 10, 15 e 20 $\mu\text{g/mL}$ de cloridrato de piridoxina em HCl 0,1 N.(a, b, c e d - Concentrações de cloridrato de piridoxina: 5, 10, 15 e 20 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente).

5.2. ESTUDO DA INTERFERÊNCIA DOS DEMAIS COMPONENTES DA FÓRMULA

Neste experimento, as amostras simuladas A, B e C foram analisadas simultaneamente com seus respectivos placebos A', B' e C' em diversos comprimentos de onda a fim de que a interferência devida aos demais constituintes da fórmula fosse eliminada.

Como pode ser visto nos espectros ultravioleta convencionais das amostras C e C' sobrepostos (Figura 4), embora haja diferença nos perfis das curvas, não há possibilidade de análise da vitamina B₆. Entretanto, nas derivadas de 1ª e 2ª ordem verifica-se a separação dos picos de absorção da piridoxina dos demais componentes, até determinados comprimentos de onda (entre 304-308nm) onde a absorção do placebo é anulada ao passar pelo ponto zero (Figuras 5 e 6).

O mesmo comportamento pode ser observado para as amostras A e B e seus placebos A' e B', Figuras de 7 a 9.

Figura 4. Espectros convencionais no ultravioleta de soluções das amostras simuladas C e C' em HCl 0,1 N. A concentração analítica de cloridrato de piridoxina é de 13,82 $\mu\text{g/mL}$.

Figura 5. Derivadas de 1ª ordem de soluções das amostras simuladas C e C' e da solução-padrão (P) de cloridrato de piridoxina. A concentração da vitamina nessas soluções foi de 13,48;0,0 e 10,0 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente.

Figura 6. Derivadas de 2ª ordem das soluções das amostras simuladas C e C' e da solução padrão (P) contendo 13,48 ; 0,0 e 10,0 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, em ácido clorídrico 0,1 N.

Figura 7. Derivadas de 1ª ordem das soluções das amostras simuladas A e A' e da solução do padrão (P), contendo , respectivamente, 10,0 ; 0,0 e 10,0 $\mu\text{g/mL}$ de cloridrato de piridoxina em HCl 0.1 N.

Figura 8. Derivadas de 2ª ordem das soluções das amostras simuladas A e A' em HCl 0,1 N, contendo, respectivamente, 10,0 e 0,0 $\mu\text{g/mL}$ de cloridrato de piridoxina

Figura 9. Derivadas de 1ª ordem das soluções das amostras simuladas B e B' e da solução padrão (P), contendo, respectivamente, 9,2; 0,0 e 10,0 $\mu\text{g/mL}$ de cloridrato de piridoxina em HCl 0,1N.

Os resultados, representados por médias de dez determinações, são apresentados na Tabela 7. Verifica-se que a 308 nm da derivada 1ª, praticamente não há interferência dos placebos, o que não ocorre a 302 nm (valor máximo de amplitude da derivada) e a 307nm para a derivada 2ª.

Tabela 7. Valores de derivadas de 1ª e 2ª ordem das soluções das amostras simuladas e seus placebos em diferentes comprimentos de onda.

Amostra	Concentração μg/mL	Derivada 1ª		Derivada 2ª
		302nm	308nm	307nm
A	10,00	0,0335	0,0171	0,0036
A'	0,00	0,0029	0,0000	0,0001
B	9,20	0,0301	0,0156	0,0033
B'	0,00	0,0011	0,0000	0,0001
C	13,48	0,0440	0,0233	0,0048
C'	0,00	0,0029	0,0001	0,0000
Padrão	10,00	0,0309	0,0174	0,0033

5.3. DETERMINAÇÃO DAS RETAS DE CALIBRAÇÃO

Com base no estudo dos interferentes, escolheram-se os comprimentos de onda mais adequados, calcularam-se suas equações e traçaram-se as retas de calibração. Os dados obtidos foram submetidos a tratamento estatístico a fim de calcular o erro padrão e o coeficiente de correlação linear, veja o ADENDO I.

Finalmente, foram escolhidas as retas de calibração, construídas em intervalos de concentração em que as absorbâncias (derivadas) obedecem às Leis de Lambert-Beer. Os resultados obtidos podem ser vistos nas Figuras de 10 a 13 e nas Tabelas de 8 a 11.

Tabela 8. Valores da derivada de 1ª ordem, em função da concentração de cloridrato de piridoxina, a 302 nm.

Amostra	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	$dA/d\lambda$ (302nm)
1	5,0	0,0158
2	6,0	0,0190
3	7,0	0,0218
4	8,0	0,0252
5	9,0	0,0284
6	10,0	0,0307
7	11,0	0,0340
8	12,0	0,0364
9	13,0	0,0401
10	14,0	0,0430

Figura 10. Sobreposição das derivadas de 1ª ordem de diferentes concentrações de cloridrato de piridoxina em HCl 0,1 N. (a - 7,0; b - 8,0; c - 9,0; d - 10,0; e - 11,0; f - 12,0 $\mu\text{g/mL}$)

Tabela 9. Valores das derivadas de 1ª ordem de soluções contendo cloridrato de piridoxina em HCl 0,1 N, em função da concentração.a 308 nm.

Amostra	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	$dA/d\lambda$ (308nm)
1	5,0	0,0087
2	6,0	0,0102
3	7,0	0,0117
4	8,0	0,0137
5	9,0	0,0152
6	10,0	0,0168
7	11,0	0,0185
8	12,0	0,0202
9	13,0	0,0218
10	14,0	0,0238

Figura 11. Reta de calibração do cloridrato de piridoxina em HCl 0,1 N, para valores da derivada de 1ª ordem a 302 nm. Ordenadas: $dA/d\lambda$ = derivada de 1ª ordem, abcissas: C = concentração em $\mu\text{g/mL}$.

Tabela 10. Valores das derivadas de 2ª ordem de soluções contendo cloridrato de piridoxina em HCl 0,1 N, em função da concentração, a 307 nm.

Amostra	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	$d^2A/d\lambda$ (307nm)
1	6,05	0,0040
2	7,26	0,0047
3	8,47	0,0052
4	9,68	0,0062
5	10,89	0,0068
6	12,11	0,0078
7	13,31	0,0087
8	14,52	0,0094
9	15,73	0,0101
10	16,94	0,0108

Figura 12. Reta de calibração do cloridrato de piridoxina, em HCl 0,1 N, para valores de derivada de 1ª ordem a 308 nm. Ordenadas: $dA/d\lambda$ = derivada de 1ª ordem, abcissas: C = concentração em $\mu\text{g/mL}$.

Tabela 11. Resumo da análise estatística dos dados obtidos nas derivadas de 1ª e 2ª ordem, para o cálculo das retas de calibração do cloridrato de piridoxina.

λ (nm)	a ($\times 10^{-3}$)	b ($\times 10^{-3}$)	Se ($\times 10^{-3}$)	Se _R (%)	r	t
Derivada de 1ª ordem						
302	1,0	3,0	0,3	0,81	0,99994	s
308	0,2	1,7	0,0	0,88	0,99997	ns
Derivada de 2ª ordem						
307	0,04	0,6	0,0	0,01	1,24	s

s = significativo / ns = não significativo

Equação de reta: $y = a + bx$

a = intersecção da reta em x

b = coeficiente angular

Se = erro padrão da estimativa

Se_R = erro padrão da estimativa relativo

r = coeficiente de correlação linear

t = teste de significância de α

Figura 13. Reta de calibração do cloridrato de piridoxina em HCl 0,1 N, para valores de derivada de 2ª ordem a 307 nm. Ordenadas: $d^2A/d\lambda$ = derivada de 2ª ordem ,
C = concentração em $\mu\text{g/mL}$.

5.4. TESTE DE RECUPERAÇÃO

Os resultados do teste de recuperação estão representados na Tabela 12.

Tabela 12. Resultados do teste de recuperação das amostras simuladas A, B e C. Os valores encontrados representam a média de três determinações.

Amostra	Q_a	Q_t	Q_r	P (%)
A	1,00	11,02	10,82	98,2
	2,00	12,02	11,96	99,5
	4,00	14,02	14,05	100,2
B	1,00	10,12	10,22	100,9
	2,00	11,12	11,32	101,8
	4,00	13,12	13,36	101,8
C	1,00	15,11	14,93	98,8
	2,00	16,11	16,07	99,8
	4,00	18,11	18,13	100,1

Q_a = Quantidade de padrão adicionada ($\mu\text{g/mL}$)

Q_t = Quantidade total de cloridrato de piridoxina ($\mu\text{g/mL}$)

Q_r = Quantidade total de cloridrato de piridoxina recuperada ($\mu\text{g/mL}$)

P = Porcentagem de recuperação

Na Figura 14 estão traçados os perfis das curvas derivadas de 1ª ordem obtidas nos testes de recuperação para as amostras simuladas A, B e C.

Figura 14. Espectros das derivadas de 1ª ordem das amostras simuladas A, B e C.

- a. soluções da amostra sem adição de padrão
- b. soluções da amostra com adição de 10% de padrão
- c. soluções da amostra com adição de 20% de padrão
- d. soluções da amostra com adição de 40% de padrão
- e. solução padrão contendo 10 $\mu\text{g/mL}$ de cloridrato de piridoxina

5.5 APLICAÇÃO DO MÉTODO PROPOSTO NA ANÁLISE DE AMOSTRAS

5.5.1. Amostras simuladas

Os resultados decorrentes da aplicação do método desenvolvido para as amostras simuladas A, B e C encontram-se relacionados na Tabela 13.

Tabela 13. Resultados da análise pelo método proposto das amostras simuladas A, B e C, contendo cloridrato de piridoxina.

Amostra	Valor teórico*	Valor encontrado*	Porcentagem
A	4,95 mg/mL	4,92 mg/mL	99,4%
B	3,84 mg/mL	3,74 mg/mL	97,4%
C	8,19 mg/cáps.	8,13 mg/cáps.	99,3%

* valor em cloridrato de piridoxina

Os dados apresentados foram calculados a partir da média de 10 determinações.

A análise estatística dos resultados foi realizada conforme o descrito no ADENDO I, determinando-se o desvio padrão, o coeficiente de variação e o intervalo de confiança.

O resumo do estudo estatístico é apresentado na Tabela 14.

Tabela 14. Resultados das análises das amostras simuladas A, B e C, pelo método da Espectrofotometria Derivada, acompanhados de resumo do tratamento estatístico.

Amostra	Concentração*	S	CV	IC
A	4,92 mg/mL	0,035	0,71%	4,92 ± 0,03
B	3,74 mg/mL	0,011	0,28%	3,74 ± 0,01
C	8,13 mg/cáps	0,062	0,76%	8,13 ± 0,05

* Concentração em cloridrato de piridoxina

S = desvio padrão

CV = coeficiente de variação

IC = intervalo de confiança

5.5.2. Amostras comerciais

Os resultados obtidos na aplicação do método para análise das amostras comerciais estão apresentados na Tabela 15 e o resumo do tratamento estatístico na Tabela 16.

Tabela 15. Resultados da análise pelo método proposto das amostras comerciais W, X Y e Z.

Amostra	Valor declarado*	Valor encontrado*	Porcentagem
W	10,00 mg/drg	15,73 mg/drg.	157,3%
X	10,00 mg/drg	16,88 mg/drg	168,8%
Y	10,00 mg/drg	11,41 mg/drg	114,1%
Z	1,00 mg/drg	1,31 mg/drg	131,0%

*Valor em cloridrato de piridoxina

Os dados apresentados foram calculados a partir da média de dez determinações.

Tabela 16. Resultados da análise das amostras comerciais pelo método da Espectrofotometria Derivada acompanhados de resumo do tratamento estatístico.

Amostra	Concentração*	S	CV	IC
W	15,73 mg/drg	0,125	0,79%	15,73±0,04
X	16,87 mg/drg	0,236	1,40%	16,88±0,17
Y	11,41 mg/drg	0,280	2,45%	11,41±0,20
Z	1,31 mg/drg	0,017	1,35%	1,31±0,01

* Concentração em cloridrato de piridoxina

S = desvio padrão

CV= coeficiente de variação

IC= intervalo de confiança

5.6. COMPARAÇÃO DO MÉTODO DESENVOLVIDO COM O MÉTODO OFICIAL DA FARMACOPÉIA AMERICANA

O método oficial apresentou considerável variação nos resultados, principalmente com relação à amostra simulada A (solução injetável), o que pode ser observado na Tabela 17.

Tabela 17. Aplicação do método do método oficial da Farmacopéia Americana XXII ed. e do método desenvolvido (ED) nas amostras simuladas A, B e C.

Amostra	Método Oficial (USP XXII rev.)*	Método ED (1ª ordem)*
A	85,1%	99,4%
B	97,1%	97,4%
C	92,7%	99,3%

* Porcentagem de cloridrato de piridoxina obtida no método em função do valor teórico

Os resultados obtidos foram calculados a partir de três determinações.

6. DISCUSSÃO

Para a determinação quantitativa da piridoxina em medicamentos, a maioria dos métodos analíticos farmacopeicos não é adequada para o controle de qualidade rotineiro de produtos multivitamínicos. Há dificuldades práticas diversas que incluem aspectos técnicos e econômicos.

A baixa especificidade exibida pelo método da volumetria em meio não aquoso (15,22,45,72,73), embora recomendado apenas na análise da matéria-prima, requer a execução de outros testes de qualidade a fim de detectar impurezas de síntese ou produtos de decomposição. Somente uma farmacopéia (100) adota método mais seletivo (CLAE).

No mercado brasileiro, a vitamina B₆ apresenta-se nas preparações medicamentosas, sempre associada a outros fármacos (exceção feita a um dos produtos distribuídos pela CEME, veja Quadro 1.) e, na maioria dos casos, constitui complexas formulações. Este fato impossibilita a aplicação da maioria das técnicas farmacopeicas, visto que apenas na Farmacopéia Americana XXII ed. está prevista a presença da piridoxina em preparações multivitamínicas. Esta farmacopéia recomenda o método espectrofotométrico no visível, após reação com 2,6-dicloroquinona cloroimida. A interferência devida a aminas e compostos fenólicos é contornada pela adição de ácido bórico que seleciona a piridoxina. Mesmo assim, vários pesquisadores criticaram essa metodologia por ser trabalhosa, pouco seletiva e sujeita a variações em virtude da baixa estabilidade do composto colorido formado (24,87).

Além dos oficiais, grande parte dos métodos encontrados na literatura apresenta muitas operações (extrações, separações cromatográficas, reações químicas seguidas de determinações espectrofotométricas e fluorimétricas) o que induz a erros e perdas, dificultando a rotina nas determinações (40).

O elevado custo dos solventes, reagentes e equipamentos envolvidos na CLAE, o tempo de análise dispendido nas técnicas químicas mais complexas e nas microbiológicas são fatores importantes a serem considerados, sobretudo nas indústrias

farmacêuticas.

Em virtude da grande sobreposição das curvas de absorção no ultravioleta do cloridrato de piridoxina e dos outros constituintes das formulações multivitamínicas estudadas (Figura 6.), não há possibilidade de análise da vitamina B₆ pelo método convencional. Métodos para a resolução de bandas sobrepostas como o de VIERORDT, que envolve o uso de equações simultâneas para a determinação de misturas binárias, ou o de VIERORDT modificado (9) não se aplicam nesse caso pois segundo MORELLI (62) fornecem resultados com pouca exatidão e baixa reprodutibilidade quando os espectros não estão suficientemente separados. WAHBI (103) afirma que, nesses casos, a ED pode substituir estes métodos com vantagens.

A ED, além da capacidade de resolução de espectros sobrepostos exibe requisitos como simplicidade, baixo custo, seletividade (9,58), que faltam à maioria dos métodos conhecidos para o doseamento da piridoxina.

Dois outros pesquisadores empregaram esta técnica na análise de vitaminas. SUCH et al. (87) determinaram quantitativamente a piridoxina e a tiamina em misturas binárias pela aplicação de derivadas de 2ª ordem. Os autores verificaram que nessas misturas só é possível separar a piridoxina no espectro normal após 325 nm e que antes de 260 nm é impossível a separação das vitaminas por haver grande sobreposição das bandas. Também estudaram medicamentos contendo as duas vitaminas em mistura com derivados benzodiazepínicos. No entanto, a análise da piridoxina só foi conseguida pela remoção prévia dos benzodiazepínicos por extração para eliminação de sua interferência.

O outro trabalho, de autoria de PETIOT et al. (71), refere-se à análise de misturas das vitaminas B₁, B₂, B₆, PP e pantotenato de cálcio e de duas formas farmacêuticas (cápsulas e solução injetável) pela ED. Os autores usaram para cálculo da concentração das vitaminas, um programa de computador pelo método de multicomponentes (*Concentration Method 4* para HP 8451). O artigo não esclarece explicitamente como foram obtidas as concentrações das vitaminas, o que indica que, para a reprodução do método, é essencial o uso do programa acima.

O planejamento foi conduzido para propiciar o uso da ED na determinação quantitativa da vitamina B₆ e, portanto, obter metodologia mais vantajosa.

Experiências preliminares foram feitas com o cloridrato de piridoxina puro e em mistura com outras vitaminas e, confrontando dados experimentais com os da literatura, começaram a ser definidos os parâmetros de análise.

Escolha do solvente

O cloridrato de piridoxina é solúvel em água (1:5), fotossensível e exibe máximo de estabilidade em meio ácido(57,71,75). Apresenta máxima extinção no ultravioleta em pH=2 (86). Por estes motivos, a solução de ácido clorídrico 0,1 N foi escolhida para solvente de todas as amostras. As determinações espectrofotométricas foram feitas imediatamente após as últimas diluições para minimizar a formação de produtos de decomposição.

Ordem das derivadas

A banda de absorção da piridoxina a 290 nm do espectro UV convencional está encoberta pelas bandas correspondentes aos demais constituintes das fórmulas A, B e C. Na Figura 4., estão sobrepostos os espectros de absorção das amostras C (fórmula completa) e C'(fórmula sem a vitamina B₆). Pode-se verificar que a pequena diferença exibida entre os dois espectros está representada pela presença de um “ombro” de 280 a 290 nm na curva C. Aplicando as derivadas de 1ª e 2ª ordem (Figuras 5 e 6), verificamos boa separação da banda proveniente da vitamina B₆, de conformidade com o descrito por GIESE & FRENCH (33) que afirmam que a presença de “ombros” é muito melhor resolvida quando se aplicam curvas derivadas *versus* o comprimento de onda que com curvas de absorbância *versus* comprimento de onda.

SANCHEZ-ROJAS et al. (77) explicam que a relação sinal/ruído piora com

o aumento da ordem da derivada. Essa relação depende da forma do espectro e foi avaliada por eles para diferentes tipos de bandas.

Como a separação da piridoxina já foi conseguida a partir da derivada de 1ª ordem e, considerando que, quanto maior a ordem da derivada, maior é a resolução, escolhemos estudar também o desempenho da derivada de 2ª ordem.

Seleção do método para medida da derivada

O'HAVER & GREEN (65,67) enumeraram os diferentes métodos para medida da derivada. Na Figura 15 estão representados os métodos pico-pico (P), método da tangente (T) e do *zero-crossing*, também denominado de ponto de anulação (Z). Os dois primeiros são classificados como métodos gráficos pois suas medidas só podem ser obtidas graficamente. Em geral, estas medidas são feitas empregando régua de precisão e são expressas em milímetros. No método *zero-crossing*, a medida é obtida pelo valor absoluto da derivada num determinado comprimento de onda que corresponde ao valor zero de derivada para a curva interferente.

Figura 15 - Definição dos métodos para a medida da derivada .

A medida pode ser expressa em milímetros ou não, entretanto, com a utilização de equipamentos externos (réguas, por exemplo), há introdução de erros e a sensibilidade é limitada a estes últimos (38). Desta forma preferimos trabalhar com o valor absoluto fornecido pelo aparelho.

O método *zero-crossing*, ainda segundo O'HAVER & GREEN é o melhor para a medida de amplitude das curvas porque é ideal na eliminação do erro sistemático. Porém, pequenas alterações na posição da banda interferente podem afetar os resultados. Pelo mesmo motivo, outro fator importante é o emprego de aparelhos que possuam boa definição do comprimento de onda. O espectrofotômetro empregado possui definição de $\pm 0,5$ nm. Neste método, quando a eliminação da interferência é total, a linearidade de resposta é obtida.

Seleção dos comprimentos de onda

Os comprimentos de onda foram selecionados para permitir a aplicação do método *zero-crossing*, com a eliminação da banda interferente. Consideramos como banda interferente aquela relativa à absorção do placebo de cada amostra. Os espectros derivados de 1ª e 2ª ordem das amostras simuladas A, B e C foram sobrepostos aos de seus respectivos placebos, A', B' e C' (Figuras de 5 a 9). As medidas foram feitas nos comprimentos de onda em que a derivada dos placebos se anula, usando os valores absolutos de derivada fornecidos pelo aparelho (308 e 307 nm, respectivamente, para as derivadas de 1ª e 2ª ordem). Foram feitas determinações também a 302 nm na 1ª derivada por ser neste comprimento de onda onde se dá a máxima amplitude de derivada. Posteriormente, porém, verificou-se que a interferência nesse comprimento de onda é significativa.

Verificamos que, a partir de 308 nm todos os placebos deixam de interferir nas curvas derivadas de 1ª ordem das amostras, apresentando $dA/d\lambda = 0$, o que pode ser

visto na Tabela 7. Na mesma tabela estão os valores absolutos de derivada, relativos ao cloridrato de piridoxina encontrados.

Escolha do Delta Lambda ($\Delta\lambda$)

O $\Delta\lambda$ é o intervalo de diferenciação em função do comprimento de onda. Experimentalmente é possível verificar que quanto maior é o $\Delta\lambda$, melhor é a definição do espectro derivado e maior é a amplitude da derivada. Quanto menor o intervalo de diferenciação, maior a quantidade de informações transpostas do espectro convencional para a curva derivada, porém é também maior o nível de ruído nesta última.

No emprego de $\Delta\lambda$ muito elevados, a resolução da curva derivada diminui. SHIBATA et al.(84) e PEMSLER (70) recomendam que o $\Delta\lambda$ não deve ser muito maior que a metade da largura da banda de absorção para que não haja perda significativa de resolução. Em outras palavras, com o uso de $\Delta\lambda$ elevados demais, apesar da maior definição do espectro derivado, há perda de informação a partir do espectro normal.

Com base nas informações acima, e observando que na prática, valores menores ou iguais a 2,0 de $\Delta\lambda$ apresentam significativo nível de ruído, fixamos valores de $\Delta\lambda = 4,0$ e $8,0$, respectivamente, para as derivadas de 1ª e 2ª ordem, pois teoricamente fornecem boa resolução e, na prática, boa definição dos espectros derivados com eliminação satisfatória de ruído.

Velocidade de varredura do espectro de absorção

Considerando que, quanto menor a velocidade de varredura do espectro ultravioleta convencional, maior a resolução da curva de absorção e, conseqüentemente, da derivada desta curva (10), foi empregada a menor velocidade oferecida pelo equipamento (120 nm/minuto).

Assentamento das ordenadas nos gráficos

Os valores das derivadas foram obtidos diretamente a partir dos cálculos do aparelho, pois, como dito anteriormente, o método *zero-crossing* permite o uso dos valores absolutos de derivada. Desta forma, o assentamento das ordenadas nos gráficos teve como objetivo principal permitir melhor visualização das curvas dos padrões e das amostras, bem como a determinação do melhor comprimento de onda para eliminação das bandas interferentes. Neste sentido, escolheram-se valores que melhor possibilitaram a ampliação dos fenômenos com o uso do recurso da sobreposição das bandas de absorção sempre que necessário.

Escolha da concentração de leitura

Uma vez que os valores de derivada são calculados a partir da absorbância medida no espectro UV convencional, determinamos experimentalmente a concentração que melhor permitiu obter valores de absorbância dentro da faixa de menor erro experimental. Ao observarmos a Tabela 5 e a Figura 1, constatamos que a concentração de leitura mais adequada dentro da faixa de 5 a 20 $\mu\text{g/mL}$ foi a de 10 $\mu\text{g/mL}$.

Ao mesmo tempo verificamos que havia boa indicação de linearidade nessa mesma faixa de concentração para prosseguir com o experimento (Tabela 6 e Figuras 2 e 3).

Determinação das retas de calibração

Foram traçadas retas de calibração a 302 e 308 nm (1ª derivada) e a 307 nm (2ª derivada) e determinadas as equações de reta. As duas primeiras retas apresentam boa linearidade (0,99994 a 302 nm e 0,99997 a 308 nm), mas a 307 nm, na segunda derivada, a linearidade obtida não foi satisfatória, indicando que a escolha das condições experimentais ou mesmo deste comprimento de onda não foi adequado. Na análise estatística apenas a reta a 308 nm passa pela origem (valor de a não significativo).

Teste de recuperação

O teste de recuperação foi realizado segundo a recomendação da AOAC (92) e as normas aceitas pelo *Food and Drug Administration* (100), com adição de 10, 20 e 40 % de substância padrão de referência às amostras A, B e C.

Os resultados da Tabela 12 mostram que o método apresentou boa exatidão, com valores compreendidos entre 98,2 a 101,8%.

Análise das amostras

Os resultados obtidos na análise das amostras simuladas foram satisfatórios indicando que as interferências devidas aos demais componentes das fórmulas foram eliminadas. Estes resultados são concordantes com aqueles obtidos através do método recomendado pela última revisão da Farmacopéia Americana, o que comprova a exatidão do método.

Na análise das amostras comerciais, entretanto, apenas os valores encontrados para as amostras Y e Z se aproximaram dos valores declarados pelos fabricantes. Isto pode ser explicado, em primeiro lugar, por não termos conhecimento de qual o conteúdo real de cloridrato de piridoxina na amostra, uma vez que é prática comum a adição de excesso, sobretudo em multivitamínicos, de pelo menos 10% do teor.

Em segundo lugar, por se tratar de fórmulas de composição diversa das estudadas, com o agravante de desconhecemos a constituição dos excipientes e veículos. Desta forma, não pudemos aplicar o método *zero-crossing* diretamente com a sobreposição das curvas das amostras e de seus respectivos placebos. A análise foi realizada supondo que a 308nm as derivadas dos placebos fossem iguais a zero.

Estes fatos confirmam, portanto, que a aplicação do método *zero-crossing* é fundamental no isolamento da banda correspondente à vitamina B₆ e na eliminação das interferências, e conseqüentemente para o sucesso da técnica.

Outras considerações

O método oficial da Farmacopéia Americana XXII ed. apresentou grande variabilidade quando aplicada às amostras simuladas, sobretudo na amostra A. Cada amostra analisada apresentou tempos diferentes na estabilidade do composto colorido formado, sendo que na amostra A, devido à sua rápida decomposição, quase não foi possível a análise. O método é trabalhoso e demorado.

A aplicação da metodologia desenvolvida na rotina de controle de qualidade é perfeitamente viável e desejável para a simplificação de procedimentos e diminuição dos custos.

7. Conclusões

- 7.1. A piridoxina pode ser determinada quantitativamente aplicando a espectrofotometria derivada no ultravioleta. A determinação da piridoxina é possível empregando curvas derivadas de 1ª ordem, onde a resposta é linear à concentração da vitamina.
- 7.2. Com o emprego do método *zero-crossing* na quantificação da vitamina B₆, foram eliminadas as interferências devidas a excipientes, veículos e dos outros fármacos presentes nas fórmulas estudadas.
- 7.3. A análise de regressão linear das curvas derivadas *versus* concentração revelou que a relação entre a derivada de 1ª ordem e a concentração de cloridrato de piridoxina é diretamente proporcional, com coeficiente de linearidade de 0,99997.
- 7.4.. A técnica ED comprovou ser de simples aplicação e de baixo custo, permitindo a análise do cloridrato de piridoxina em complexas formulações multivitamínicas sem prévia separação da vitamina.
- 7.5. O método desenvolvido substitui com vantagens o da Farmacopéia Americana XXII ed. podendo ser empregado para qualquer preparação multivitamínica com exelente exatidão, precisão e seletividade.
- 7.6. O método oficial acima nem sempre pode ser aplicado com êxito na determinação de cloridrato de piridoxina em prepações multivitamínicas complexas em virtude da grande variabilidade nas determinações espectrofotométricas de certas amostras após reação com solução de 2,6-dicloroquinona cloroimida.

ADENDO I

Análise estatística dos resultados

1. Cálculo das retas de calibração

O método aplicado para o cálculo das retas de calibração foi o dos mínimos quadrados ou, também denominado, cálculo da linha de regressão de y (ordenada) em x (abscissa). Neste trabalho, x representa os valores de concentração de cloridrato de piridoxina presente na série de dez soluções preparadas e, portanto, conhecidos. y é a variável dependente de x , representando os valores de derivada encontrados para cada valor de x .

A aplicação deste método tem por objetivo calcular a reta de calibração onde a influência dos erros experimentais seja mínima.

A seguir apresentamos o roteiro do cálculo da reta de calibração do cloridrato de piridoxina para a derivada de 1ª ordem, a 308 nm. Foram empregados os resultados da Tabela 9.

dA/dλ	Concentração (μg/mL)			
y	x	y ² (x10 ⁵)	x ²	xy
0,0087	5,0	7,569	25	0,0435
0,0102	6,0	10,404	36	0,0612
0,0117	7,0	13,689	49	0,0819
0,0137	8,0	18,769	64	0,1096
0,0152	9,0	23,104	81	0,1368
0,0168	10,0	28,224	100	0,1680
0,0185	11,0	34,225	121	0,2035
0,0202	12,0	40,804	144	0,2424
0,0218	13,0	47,524	169	0,2834
0,0238	14,0	56,644	196	0,3332
Σy	Σx	Σy ²	Σx ²	Σxy
0,1606	95,0	280,956	985	1,6635

Calcularam-se, a seguir, os seguintes valores:

$$\Sigma x \cdot \Sigma y = 15,257$$

$$(\Sigma x)^2 = 9025$$

$$(\Sigma y)^2 = 0,0257923$$

$$\bar{y} = 0,01606$$

$$\bar{x} = 9,5$$

Equação da reta de calibração:

$$y = a + bx$$

1.1 Cálculo do valor de b (inclinação da reta)

$$b = \frac{n \sum xy - \sum x \sum y}{n \sum x^2 - (\sum x)^2} \quad \begin{array}{l} n = \text{número de pontos empregados na} \\ \text{construção da reta} \end{array}$$

$$b = \frac{(10 \cdot 1.6635) - 15.257}{(10 \cdot 985) - 9025} = 0,0016703$$

1.2. Cálculo do valor de a (intersecção da reta):

$$a = \bar{y} - b\bar{x}$$

$$a = 0,01606 - (0,0016703 \cdot 9,5) = 0,00019212$$

1.3. Cálculo do erro padrão da estimativa (Se):

-Obtido através da expressão

$$Se = \sqrt{\frac{\sum (y - \hat{y})^2}{n-2}} \quad \text{onde: } \hat{y} = a + bx$$

Portanto,

$$Se = \sqrt{\frac{0,16 \cdot 10^{-6}}{10 - 2}} = 0,14 \cdot 10^{-3}$$

1.4. Cálculo do erro padrão da estimativa relativo (Se_r):

$$Se_r = \frac{100 \cdot Se}{\bar{y}} = \frac{100 \cdot 0,14 \cdot 10^{-3}}{0,01606}$$

$$Se_r = 0,88\%$$

1.5. Teste de significância de a . Aplicação do teste t :

$$t = \left| \frac{a}{Sa} \right|$$

$$Sa = Se \sqrt{\frac{\sum x^2}{n \sum x^2 - (\sum x)^2}} = 15,453 \cdot 10^{-5}$$

$$t = 1,24$$

Para $P = 95\%$ e $n = 10$, o valor de t tabelado é de 2,26. Obteve-se t calculado menor que o tabelado, portanto, conclui-se que a é não significativo, conseqüentemente, a reta pode ser considerada como passando pela origem.

1.6. Cálculo do coeficiente de correlação linear (r):

$$r = \frac{\sum xy}{\sqrt{(\sum x^2) \cdot (\sum y^2)}} = \frac{1,6635}{\sqrt{985 \cdot 0,00280956}}$$

$$r = 0,99997$$

2. Cálculo do desvio padrão, coeficiente de variação e intervalo de confiança na análise das amostras simuladas

Neste cálculo foram empregados resultados, de dez determinações, da derivada de 1ª ordem a 308 nm.

O tratamento estatístico aplicado tem por objetivo avaliar a exatidão e precisão do método. A seguir, está indicado o roteiro adotado para cálculo dos resultados obtidos na amostra A.

Concentração				
Amostra	dA/dλ	(μg/mL)	(x - $\bar{x}$)	(x - $\bar{x}$) ²
1	0,0172	4,94	0,02	0,0004
2	0,0172	4,94	0,02	0,0004
3	0,0171	4,91	-0,01	0,0001
4	0,0172	4,94	0,02	0,0004
5	0,0171	4,91	-0,01	0,0001
6	0,0172	4,94	0,02	0,0004
7	0,0172	4,94	0,02	0,0004
8	0,0171	4,91	-0,01	0,0001
9	0,0168	4,83	-0,09	0,0081
10	0,0172	4,94	0,02	0,0004

Médias: $\overline{dA/d\lambda} = 0,0173$

$\bar{C}$ (concentração) = 4,92 μg/mL

$\Sigma(x - \bar{x}) = 0,0108$

A concentração foi obtida segundo a expressão:

$$C = \frac{(dA/d\lambda)_A}{(dA/d\lambda)_p} \cdot m_p \cdot d_p \cdot \frac{1}{V_A \cdot d_A}$$

onde: $(dA/d\lambda)_A$ = derivada de 1ª ordem da amostra

$(dA/d\lambda)_p$ = derivada de 1ª ordem do padrão

m_p = massa de padrão pesada em mg

d_p = diluição do padrão

d_A = diluição da amostra

V_A = volume de amostra analisado, em mL

C = concentração em mg/mL de cloridrato de piridoxina na amostra.

2.1. Cálculo do desvio padrão (S)

$$S = \sqrt{v}$$

$$v = \frac{(x - \bar{x})^2}{n - 1} = \frac{0,0108}{9} = 0,012$$

$$S = \sqrt{0,0012} = 0,035$$

2.2. Cálculo do coeficiente de variação (CV):

$$CV = \frac{100 \cdot S}{\bar{C}} = 0,71\%$$

2.3. Cálculo do intervalo de confiança (IC)

$$IC = \bar{C} \pm t.S_m$$

onde: $t = 2,262$ para 9 graus de liberdade

$$S_m = \frac{S}{\sqrt{n}}, \text{ sendo } n = 10$$

$$S_m = 0,011$$

$$IC = 4,92 \pm 0,03$$

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

*De acordo com a norma NBR6023/89 preconizada pela ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). As abreviaturas dos títulos dos periódicos seguem o CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE SOURCE INDEX (CASSI), 1990.

1. ABDEL-KHALEK, M.M., ABDEL-HAMID, M.E., MAHROUS, M.S., ABDEL-SALAM, M.A. Second-derivative spectrophotometric determination of some benzenoid drugs. *Anal.Lett.*, New York, v. 18, n. B 7, p.781-792, 1985.
2. ADAMS, P.W, WYNN,V., ROSE, D.P., SEED, M., FOLKARD, J., STRONG, R. Effect of pyridoxine hydrochloride (vitamin B₆) upon depression with oral contraception. *Lancet*, London, v. 1, p. 897-904, 1973.
3. AHRENS, H., KORYTNIK, W. Pyridoxine chemistry XXI. Thin-layer chromatography and thin-layer electrophoresis of compounds in the vitamin B₆ group. *Anal.Biochem.*, Baltimore, v.30, p. 413-420, 1969.
4. AKIMOTO, N. Analysis of vitamins in dosage forms by high-performance liquid chromatography. *Gijutsu Joho-Shizuoka-ken Eisei Kankio Senta*, v.5, n.1, p.4-6, 1987. Apud: *Chem.Abstr.*, Columbus, v.107, abstr.n. 161771v, 1987.
5. AMIN, M., REUSCH, J. High-performance liquid chromatography of water-soluble vitamins. II. Simultaneous determination of vitamins B₁, B₂, B₆, and B₁₂ in pharmaceutical preparations. *J.Chromatogr.*, Amsterdam, v.390, n.2, p.448-453, 1987.
6. AMIN, M., REUSCH, J. High-performance liquid chromatography of water-soluble vitamins. Part 3. Simultaneous determination of vitamins B₁, B₂, B₆, B₁₂ and C, nicotinamide and folic acid in capsule preparations by ion pair reversed- phase high performance liquid chromatography. *Analyst*, London, v.112, n.7, p. 989-991, 1987.
7. AYI, B.K., YUHAS, D.A., DEANGELIS, N.J. Simultaneous determination of vitamins B₂ (riboflavin) and B₆ (pyridoxine) in infant formula products by reversed phase liquid chromatography. *J.Assoc.Off.Anal.Chem.*, Washington, v.69, n.1, p.56-59, 1986.

8. BARARY, M., ABDEL-HAMID, M., HASSAN, E., ELSAYED, M. Simultaneous spectrofluorimetric determination of thiamine, pyridoxine, and riboflavine in pharmaceutical multivitamin preparations. *Pharmazie*, Berlin, v.41, n.7, p.483-485, 1986.
9. BELAL, F., IBRAHIM, F., HASSAN, S.M., ALY, F.A. Spectrophotometric determination of some psychotropic drugs in two-component mixtures. *Microchem. J.*, New York, v.41, n.3, p.305-312, 1990.
10. BENETON, S.A. *Análise do salbutamol em medicamentos por espectrofotometria derivada*. São Paulo, 1990. [Dissertação de mestrado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, USP].
11. BERSHTEIN, I.Y., MOGILNITSKY, M.M., KOMAROV, E.V. Numerical investigation of polynomial methods for differentiating absorption spectra. *Anal.Chim.Acta*, Amsterdam, v.222, n.2, p.335-346, 1989.
12. BITSCH, R., MOLLER, J. Analysis of B₆ vitamers in foods using a modified high-performance liquid chromatographic method. *J.Chromatogr.*, Amsterdam, v. 463, n.1, p.207-211, 1989.
13. BORSCHEL, M.W., KIRKSEY, A., HANNEMANN, R.E. Effects of vitamin B₆ intake on nutrition and growth of young infants. *Am.J.Clin.Nutr.*, Bethesda, v.43, n.1, p.7-15, 1986.
14. BRIN, M. Blood transketolase determination in the diagnosis of thiamine deficiency. *Herart Bull.*, v.17, p.86-89, 1968. Apud: GOODMAN e Gilman, as bases farmacológicas da terapêutica. 7.ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1987. v.2, p.1022-1023.

15. BRITISH pharmacopoeia. London: Her Majesty's Stationery, 1988. v.1, p. 480, 999.
16. BRYANT, F.J.B., HENRY, R.L., TRENK, F.B. Semiautomated simultaneous assay of thiamine, riboflavin, pyridoxine and niacinamide in multivitamin preparations. *J.Pharm.Sci.*, Washington, v.60, n.11, p.1717-1720, 1971.
17. BURTON, D.E., SEPANAİK, M.J., MASKARINEC, M.P. Analysis of B₆ vitamers by micellar electrokinetic capillary chromatography with laser-excited fluorescence detection. *J.Chromatogr.Sci.*, Niles, v.24, n.8, p.347-351, 1986.
18. COLLIER, G.L., SINGLETON, F. Infra-red analysis by the derivative method. *J.Appl.Chem.*, London, v.6, p.495-510, 1956.
19. DAVIDSON, A.G., ELSHEIKH, H. Assay of ephedrine or pseudoephedrine in pharmaceutical preparations by second and fourth derivative ultraviolet spectrophotometry. *Analyst*, London, v.107, n.1277, p.879-884, 1982.
20. DAVIDSON, A.G., HASSAN, S.M. Assay of benzenoid drugs in tablet and capsule formulations by second-derivative ultraviolet spectrophotometry. *J.Pharm.Sci.*, Washington, v.73, n.3, p.413-416, 1984.
21. DAVIS, R.B., THOMPSON, J.E., PARDUE, H.L. Characteristics of statistical parameters used to interpret least-square results. *Clin.Chem.*, Winston-Salem, v.24, n.4, p. 611-620, 1978.
22. DEUTSCHES Arzneibuch. 9. ed. Stuttgart: Deutscher Apotheker. 1986. p.1218.
23. DICIONÁRIO brasileiro de especialidades farmacêuticas. 20.ed. Rio de Janeiro: Editora de Publicações Científicas, 1991/92. 628p.

24. DONG, M.W., LEPORE, J., TARUMOTO, T. Factors affecting the ion-pair chromatography of water-soluble vitamins. *J.Chromatogr.*, Amsterdam, v.441, p.81-95, 1988.
25. DOYLE, T.D., FAZZARI, F.R. Determination of drugs in dosage forms by difference spectrophotometry. *J.Pharm.Sci.*, Washington, v.63, n.12, p.1921-1926, 1974.
26. DUHAU, L.P., LEVILLAIN, P., GALLIOT, M., BOURDON, R. Second derivative spectroscopic determination of benzodiazepines. *Analisis*, Paris, v.17, n.10, p.553-559, 1989.
27. EL-YAZBI, F.A., KORANY, M.A., ABEL-RAZEK, O., ELSAYED, M.A. Application of first derivative UV spectrophotometry to the analysis of some corticosteroids. *Alexandria J.Pharm.Sci.*, v.1, n.1, p.1-4, 1987. Apud: *Chem.Abstr.*, Columbus, v.110, abstr.n.82576u, 1989.
28. ERLEMANN, G. Vitaminas em cosméticos. *Aerosol Cosméti.*, São Paulo, v.7, n.38, p.4-11, 1985.
29. FARMACOPEA ufficiale della repubblica italiana. 7.ed. Roma: Ministero della Sanità. 1965. p.553.
30. FARMACOPÉIA brasileira, 3.ed. São Paulo: Organização Andrei, 1977. p.321-323.
31. FRODYMA, M.M., LIEU, V.T. Detection and determination by ultraviolet reflectance spectrometry of vitamins resolved on thin layer plates. *Anal.Chem.*, Washington, v.39, n.7, p.814-819, 1967.

32. GAO, H., CHEN, X. A new fluorometric method for determination of vitamin in foods. *Fenxi Huaxue*, v.18. n.4, p.377-379,1990. Apud: *Chem.Abst.*, Columbus, v.113, abstr.n. 4505r,1990.
33. GIESE, A.T., FRENCH, C.S. The analysis of overlapping spectral absorpcion bands by derivative spectrophotometry. *Appl.Spectrosc.*, New York, v.9, p.78-96, 1955.
34. GOLDRICK, E.A. The role and application of vitamins in cosmetics. *Am.Perfum.Cosmet.*, Oak Park, v.81, n.12, p.43-51, 1966.
35. GOODMAN e Gilman, as bases farmacológicas da terapêutica. 7.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1987. p.1022-1023.
36. GREEN, G.L., O'HAYER, T.C. Derivative luminescence spectrometry. *Anal.Chem.*, Washington, v.46, n.14, p. 2191-2196, 1974.
37. GUPTA, V.D., LOFGREN, F.V. Stability study of oral multivitamin liquid preparation. *J.Am.Pharm.Assoc.*, Washington, v.4, n.2, p.86-88, 1964.
38. HAGER, R.N. Derivative spectroscopy with emphasis on trace analysis. *Anal.Chem.*, Washington, v.45, n.13, p.1131A-1138A, 1973.
39. HALVATZIS, S.A., POTAMIA, MT. Kinetic-potentiometric determination of ascorbic acid, biotin, pyridoxine hidrochloride and thiamine hidrochloride with N-bromo-succinimide. *Anal.Chim.Acta*, Amsterdam, v.227, n.2, p.405-419, 1989.
40. HASSAN, S.S.M. Simultaneous determination of vitamins B₁ and B₆ by nuclear magnetic resonance spectrometry. *J.Assoc.Off.Anal.Chem.*, Washington, v.61, n.1, p.111-116, 1978.

41. HASSAN, S.M., DAVIDSON, A.G. The assay of tropane derivatives in formulations by second derivative ultraviolet spectrophotometry. *J.Pharm.Pharmacol.*, London, v.36, n.2, p.7-10, 1984.
42. ISMAIEL, S.A., YASSA, D. A. Determination of nicotinamide in some injections of B-complex vitamins by thin-layer chromatography. *Analyst*, London, v.8, p.816-818, 1973.
43. JAYARAM, B., GOWDA, N.M.M. Titrimetric determination of vitamin B₆ using chloramine-T, bromamine-T and bromamine-B. *J.Assoc.Off.Anal.Chem.*, Washington, v.69, n.1, p.47-49, 1986.
44. JONEIDI, M., KOLEVA, M., BUDEVSKY, O. Quantitative determination of drugs by means of densitometry of thin-layer chromatograms. *Pharmazie*, Berlin, v. 30, n.168, p.453-455, 1975.
45. JONES, R., MARNHAM, G. The assay of procyclidine in tablets and injections by derivative spectrometry. *J.Pharm.Pharmacol.*, London, v.33, p.458-459, 1981.
46. KIRCHMEIER, R.L., UPTON, R.P. Simultaneous determination of niacin, niacinamide, pyridoxine, thiamine and riboflavin in multivitamin blends by ion-pair high-pressure liquid chromatography. *J.Pharm.Sci.*, Washington, v.67, n.10, p.1444-1446, 1978.
47. KITAMURA, K., MAJIMA, R. Determination of salicylic acid in aspirin powder by second derivative ultraviolet spectrometry. *Anal.Chem.*, Washington, v.55, n.1, p.54-56, 1983.

48. KORANY, M., BEDAIR, M., MAHGOUB, H., ELSAYED, M. Second derivative spectrophotometric determination of acetaminophen and phenacetin in presence of their degradation products. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, Washington, v.69, n.4, p.608-611, 1986.

49. KORANY, M.A., EL-SAYED, M.A., GALAL, S.M. Utility of derivative spectrophotometry for the determination of certain cephalosporines and their alkali-induced degradation products in combination. *Anal. Lett.*, New York, v.22, n.1, p.141-157, 1989.

50. LAM, F.L., LOWADE, A. The simultaneous assay of riboflavin 5-phosphate sodium and other water-soluble vitamins in liquid multivitamin formulations by liquid chromatography. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, Oxford, v.6, n.1, p.87-95, 1988.

51. LAWRENCE, A.H., MACNELL, J.D. Identification of amphetamins and related illicit drugs by second derivative ultraviolet spectrometry. *Anal. Chem.*, Washington, v.54, n.13, p.2385-2387, 1982.

52. LEKLEM, J.E. Vitamin B₆: a status report. *J. Nutr.*, Philadelphia, v.120, n.11 suppl., p.1503-1507, 1990.

53. LEVILAIN, P., FOMPEYDIE, D. Spectrophotométrie dérivée: intérêt, limites et applications. *Analisis*, Paris, v.14, n.1, p.1-20, 1986.

54. LIANG, Y.Z., XIE, Y.L., YU, R.Q. Accuracy criteria and optimal wavelength selection for multicomponent spectrophotometric determinations. *Anal. Chim. Acta*, Amsterdam, v.222, n.2, p.347-357, 1989.

55. MACEK, T.J. Stability problems with some vitamins in pharmaceuticals. *Am.J.Pharm.*, Philadelphia, v.132, n.10, p.433-455, 1960.
56. MADDAMS, W.F. The scope and limitations of curve fitting. *Appl.Spectrosc.*, New York, v.34, n.3, p.245-267. 1980.
57. MARTINDALE, W.H. *The extra pharmacopeia*. 28.ed.London: Pharmaceutical Press, 1982. p.1642-1643.
58. MAZZEO, P., QUAGLIA, M.G., SEGNALINI, F. Determination of salicylic acid in acetylsalicylic acid by second derivative UV spectrophotometry. *J.Pharm.Pharmacol.*, London, v.34, p.1642-1643, 1982.
59. MCWILLIAM, I.G. Derivative spectroscopy and its application to the analysis of unresolved bands. *Anal.Chem.*, Washington, v.41, n.4, p.674-676, 1969.
60. MEMENTO terapêutico CEME 89/90 .2. ed. Brasília: Ministério da Saúde/Central de Medicamentos, 1989.
61. MILLER, J.C., MILLER, J.N. *Statistics for analytical chemistry*. 2. ed. Chichester: Ellis Hor88. 101-136.
62. MORELLI, B. "Zero-crossing" derivative spectrophotometric determination of mixtures of cephapirin sodium and cefuroxime sodium and cefuroxime sodium in pure form and in injections. *Analyst*, London, v.113, n.7, p.1077-1082, 1988.
63. NAKAHARA, H., OKADA, S., ISAKA, H. Paired-ion chromatographic method for the determination of compound vitamin B powder. *Iyakuhin Kenkiu* , v.19, n.1, p.84-90, 1988. Apud: *Chem.Abstr.*, Columbus, v.108, abstr.n.210278w, 1988.

64. NISHI, H., TSUMAGARI, N., KAKIMOTO, T., TERABE, S. Separation of water-soluble vitamins by micellar electrokinetic chromatography. *J.Chromatogr.*, Amsterdam, v.465, n.2, p.331-343, 1989.
65. O'HAYER, T.C. Potential clinical applications of derivative and wavelength-modulation spectrometry. *Clin.Chem.*, Winston-Salem, v.25, n.9, p.1548-1553, 1979.
66. O'HAYER, T.C. Derivative and wavelength modulation spectrometry. *Anal.Chem.*, Washington, v.51, n.1, p.91A-100A, 1979.
67. O'HAYER, T.C., GREEN, G.L. Numerical error analysis of derivative spectrophotometry for the quantitative analysis of mixtures. *Anal.Chem.*, Washington, v.48, n.2, p.312-318, 1976.
68. PARK, M., CHO, J.H. Quantitative analysis by derivative spectrophotometry III. Simultaneous quantification of vitamin B group and vitamin C by multiple linear regression analysis. *Arch.Pharmacol.Res.*, v.11, n.1, p.45-51, 1988. Apud: *Chem.Abstr.*, Columbus, v.108, abstr.n.36695p., 1988.
69. PATHAN, I.H., BARTOS, J., ZYKA, J., KAWAJA, A.M. Quantitative determination of some vitamins. *Sb. Vys. Sk. Zemed.*, v. A-44, p.259-273, 1986. Apud: *Chem.Abstr.*, Columbus, v.108, abstr.n.62544n, 1988.
70. PEMSLER, J.P. Method of obtaining derivative spectra. *Rev.Sci.Instrum.*, New York, v.28, n.4, p.274-275, 1957.
71. PETIOT, J., PROGNON, P., POSTAIRE, E., LARUE, M., LAURENCON-COURTEILLE, F., PRADEAU, D. Multicomponent analysis of hydrosoluble polyvitamins by first-derivative spectrophotometry. *J.Pharm.Biomed.Anal.*, London, v.8, n.1, p.93-99, 1990.

72. PHARMACOPOEA internationalis. 3.ed. Geneva, World Health Organization, 1981.
v.2, p.246.
73. PHARMACOPOEA of Japan. 11.ed. Tokyo: The Society of Japanese Pharmacopoeia,
1986. p.895-897.
74. RAJU, N.R., SRILANKSHMI, P., VINOLIA, G.A., GAITONE, V.D. Simultaneous
determination of water-soluble vitamins in pharmaceutical oral liquids by gradient
high performance liquid chromatography-sample preparation with reversed-phase
sep pak cartridge. *Indian drugs*, v.26, n.12, p.697-701, 1989. Apud:*Chem.Abst.*,
Columbus, v.112, abstr.n.62757s, 1990.
75. REMINGTON'S *pharmaceutical sciences*. 15.ed. Easton: Mack, 1975. p.938-963.
76. REYNOLDS, R.D. Determination of dietary vitamin B₆ intake: is it accurate?
J.Am.Diet.Assoc., Chicago, v.90, n.6, p.799-801, 1990.
77. ROJAS, F. S., OJEDA, C.B., PAVON, J.M.C. Derivative ultraviolet-visible region
spectrophotometry and its analytical applications, *Talanta*, London, v.35, n.10,
p.753-761, 1988.
78. SACCANI, F., NERI, C. Separazione e determinazione di farmaci mediante resine a
scambio ionico. Nota II. Piridossina, tiamina e cianocobalamina. *Boll.Chim.Farm.*,
Milano, v.109, p.275-277, 1970.
79. SACCANI, F., NERI, C. Separazione e determinazione di farmaci mediante resine a
scm. *Farm.*, Milano, v.109, p.344-346, 1970.

80. SALINAS, F., BERZAS, J.J.N., MANSILLA, A.E. A new spectrophotometric method for quantitative multicomponent analysis. Resolution of mixtures of salicylic and salicyluric acids. *Talanta*, London, v.37, n.3, p.347-351, 1990.
81. SASAKI, K., KANATA, S. MINAMI, S. Optimal wavelength selection for quantitative analysis. *Appl.Spectrosc.*, New York, v.40, n.2, p.185-190, 1986.
82. SAVITZKY, A., GOLAY, M.J.E. Smoothing and differentiation of data by simplified least square procedures. *Anal.Chem.*, Washington, v.36, n.8, p.1627-1638, 1964.
83. SCHAUMBERG, J., KAPLAN, J., WINDEBANK, A., VICK, N., RASMUS, S., PLEASURE, D., BROWN, M.J. Sensory neuropathy from pyridoxine abuse. A new megavitamin syndrome. *N.Engl.J.Med.*, Boston, v.309, p. 445-448, 1983.
84. SHIBATA, S., FURUKAWA, M., GOTO, K. Dual-wavelength spectrophotometry. Part IV. Qualitative and quantitative analysis by means of first-derivative spectra. *Anal.Chim.Acta*, Amsterdam, v.65, p.49-58, 1973.
85. SHIMURA, K., YAMADA, T., SAKURAI, K., MORI, Y., MASUDA, N., SHIOMI, T. High-performance liquid chromatographic analysis of water soluble vitamins. *Mie-ken Eisei Kenkyusho Nenpo*, v.32, p.105-107, 1987. Apud: *Chem.Abstr.*, Columbus, v.110, abstr.n. 121509w, 1989.
86. STROBECKER, R., HENNING, H.M. *Análisis de vitaminas*. Madrid: Paz Montalvo, 1967. 428p.
87. SUCH, V., TRAVESET, J. GONZALO, R., GELPI, E. Stability assays of aged pharmaceutical formulas for thiamine and pyridoxine by high performance thin-layer chromatography and derivative ultraviolet spectrometry. *Anal.Chem.*, Washington, v.52, n.3, p.412-419, 1980.

88. SUZUKI, M., YAGASAKI, K., KAWABATA, S. Separation of water soluble vitamins by high performance liquid chromatography. *Kansei Chuo Bunsekishoho*, v.28, p.85-88, 1988. Apud: *Chem.Abstr.*, Columbus, v.110, abstr.n. 45009r, 1989.
89. SWAILE, D.F. Pharmaceutical Analysis using micellar eletrokinetic cappillary chromatography. *J.Chromatogr.Sci.*, Niles, v.26, n.8, p.406-409. 1988.
90. TALSKY, G., MAYRING, L., KREUZER, H. High-resolution, higer-order UV/Vis derivative spectrophotometry. *Angew.Chem.Int.Ed.Engl.*, Weinhein, v.17, n.11, p.785-799, 1978.
91. THAKKER, K., SITREN, H.S., GREGORY III, J.F., SCHIDT, G.L., BAUMGARTNER, T.G. Dosage form and formulation effects on the bioavailability of vitamin E, riboflavin, and vitamin B₆ from multivitamin preparations. *Am.J.Clin.Nutr.*, Bethesda, v.45, n.6, p.1472-1479, 1987.
92. TOBIAS, D.Y. First-derivative spectroscopic determination of acetaminophen and sodium salicylate in tablets. *J.Assoc.Off.Anal.Chem.*, Washington, v.66, n.6, p.1450-1454, 1983.
93. TOEPFER, E., POLANSKY, M. Microbiological assay of vitamin B₆ and its components. *J.Assoc.Off.Anal.Chem.*, Washington, v.53, n.3, p.546-550, 1970.
94. TORRES, A., GUTIERREZ, M.C., RUBIO, S., GOMEZ-HENZ, A., PERES-BENDITO, D. Evaluation of a modified derivative method for spectrophotometric and spectrofluorometric kinetic-based determinations. *Analyst*, London, v.115, n.10, p.1377-1381, 1990.

95. TRAVESET, J., SUCH, V., GONZALO, R., GELPI, E. Derivative and grafical procedures for correction of irrelevant UV spectrophotometric absorption in changeable matrixes. *J.Pharm.Sci.*, Washington, v.69, n.6, p.629-630, 1980.
96. UNITED States pharmacopeia. 15.ed. Rockville: United Pharmacopeial Convention, 1955. p.595.
97. UNITED States pharmacopeia. 19.ed. Rockville: United Pharmacopeial Convention, 1975. p.119, 429.
98. UNITED States pharmacopeia. 20.ed. Rockville: United Pharmacopeial Convention, 1980. p.693-694.
99. UNITED States pharmacopeia. 21.ed. Rockville: United Pharmacopeial Convention, 1985. p.275-277.
100. UNITED States pharmacopeia. 22.ed. Rockville: United Pharmacopeial Convention, 1990. p.1194-1195, 1711-1712.
101. VANDENBELT, J.M., HENRICH, C. Spectral anomalies produced by the overlapping of absorption bands. *Appl.Spectrosc.*, New York, v.7, p.171-176, 1953.
102. VANDERHORST, A., MARTENS, H.J.M., DEGOEDE, P.N.F.C. Analysis of water-soluble vitamins in total parenteral nutrition solution by high-pressure liquid chromatography. *Pharm.Weekbl.*, v.11. n.5, p.169-174, 1989. Apud: *Chem.Abst.*, Columbus, v.112, abstr.n.84303t, 1990.
103. WAHBI, A.M., EBEL, S. The use of the first derivative curves of absorption spectra in quantitative analysis. *Anal.Chim.Acta*, Amsterdam, v.70, p.57-63, 1974.

104. WANG, E., HOU, W. Determination of water-soluble vitamins using high-performance liquid chromatography and electrochemical or absorbance detection. *J.Chromatogr.*, Amsterdam, v.447, n.1, p.256-262, 1988.
105. WAMPLER, J.E., CHURCHICH, J.E. Phosphofluorescence of pyridoxal. *J.Biol.Chem.*, Baltimore, v.244, n.6, p.1477-1480, 1969.
106. ZANINI, A.C., OGA, S. *Farmacologia aplicada*. 4.ed. São Paulo: Atheneu, 1989. p.603-630.
107. ZHANG, Y., CHU, H. Analysis of water-soluble vitamins by high performance liquid chromatography. *Hebeisheng Kexueyuan Xuebao*, v.1, p. 64-68, 1987. Apud: *Chem.Abstr.*, Columbus, v.107, abstr.n.141187f, 1987.
108. ZHANG, Y., LI, Y., MAO, D., COSOFRET, V.V. Sensitive membrane electrodes for the determination of vitamins B₁ and B₆. *J.Pharm.Biomed.Anal.*, v.8, n.4, p.385-388, 1990. Apud: *Chem Abstr.*, Columbus, v.113, abstr.n. 218347s, 1990.
109. ZHANG, Y., YANG, G., DING, Y. Analysis of multivitamin tablets by high-performance liquid chromatography. *Yaowu Fenxi Zazhi*, v.8, p.30-32, 1988. Apud: *Chem.Abstr.*, Columbus, v.108, abstr.n. 226925r, 1988.

8. RESUMO

Uma metodologia rápida e seletiva foi desenvolvida para a quantificação da piridoxina em medicamentos. O método foi padronizado para aplicação da espectrofotometria derivada no ultravioleta na análise direta da vitamina em preparações multivitamínicas sólidas (cápsulas) e líquidas (solução oral e injetável). As interferências do espectro UV convencional devidas aos excipientes (veículos) e demais fármacos presentes foram eliminadas. As retas de calibração foram calculadas, obtendo-se, para a derivada de 1ª ordem, o coeficiente de correlação linear de 0.99997. Os resultados foram estatisticamente estudados e determinaram-se o desvio padrão, coeficiente de variação e intervalo de confiança. O método foi empregado na análise de amostras comerciais e simuladas e os resultados, quando comparados com aqueles provenientes da aplicação do método da Farmacopéia Americana XXII rev., evidenciaram nítidas vantagens quanto à exatidão e precisão, além da facilidade operacional.

9. SUMMARY

A rapid and selective method for the determination of pyridoxine in pharmaceuticals has been described. The procedure has been developed using direct UV first-derivative spectrophotometry in solid and liquid preparations (tablets, oral solution and injection). Spectral interferences from formulation excipients and other drugs in simple UV spectrophotometric methods have been eliminated by the application of the proposed method. Calibration curves have been made and the correlation coefficient for the first-order derivative was 0,99997. Standard deviation, coefficient of variation and confidence interval were calculated. The method was applied in the analysis of commercial and simulated samples. The results when compared with those obtained by using the USP 22nd. ed. official method shows clear advantages related to accuracy, precision and practical application.

ERRATA

Na página referente aos AGRADECIMENTOS, onde se lê Prof. João Fernandes Magalhães, leia-se Prof. João Fernandes Magalhães.

Página 74: Figura 14. Na denominação dos espectros das AMOSTRAS A, B e C, onde se lê **a, b, c e d**, leia-se **d, c, b e a**.

Página 90: ítem 7.5: onde se lê exelente, leia-se excelente.

Página 109: a referência correta é: SACCANI, F.; NERI, C. Separazione e determinazione di farmaci mediante resine a scambio ionico. Nota III. Corcarbossilasi, tiamina, piridossina e cianocobalamina. **Boll.Chim.Farm.**, Milano, v. 109, p. 344-346, 1970.