

B. AN. 43

UNIVERSIDADE EDUARDO MONDLANE

DEPARTAMENTO DE QUIMICA

RELATÓRIO DO TRABALHO DE LICENCIATURA

nome do estudante: ADELAIDE BELA AGOSTINHO

título do trabalho de licenciatura: ESTUDO DA CINÉTICA DE DEGRADAÇÃO
DE ALGUNS MEDICAMENTOS

4201

supervisor: DR. ENG^o. A. ALEXEEV

consultor: DR. ENRICO CASADEI.

período de execução de: AGOSTO DE 1985 A MARÇO DE 1986

data de entrega: 16/04/86

data de defesa pública: 22/04/86

Maputo

1986

CURSO DE QUÍMICA E ENS. QUÍMICA
U. E. M.
BIBLIOTECA
R. E. 4201
DATA 14 / Maio 1986
AQUISIÇÃO O. F. do Acetor
COTA E. 4 - P. 2

AGRADECIMENTO

NÃO É POSSÍVEL AGRADECER À TODOS QUE CONTRIBUÍRAM DIRECTA OU INDIRECTAMENTE PARA A REALIZAÇÃO DESTE TRABALHO. ENTRETANTO, DESEJO REGISTRAR A MINHA GRATIDÃO:

- AO L.N.H.A.A. , DO MINISTÉRIO DA SAÚDE , NA PESSOA DO DR ENRICO CASADEI , DIRECTOR DO LABORATÓRIO , PELOS SEUS ENSINAMENTOS, ESTÍMULO E APOIO TÉCNICO.
- À TÉCNICA ALINA MANGANHELA QUE SEMPRE DEMONSTROU SER UMA EXCELENTE COLEGA DE TRABALHO APOIANDO-ME TÉCNICA E MORALMENTE SEMPRE QUE PRECISEI.
- AO DEPARTAMENTO FARMACÉUTICO DO MINISTÉRIO DA SAÚDE, PELO ESTÍMULO NA REALIZAÇÃO DO TRABALHO.

R E S U M O

Na República Popular de Moçambique , devido à problemas de transporte , falta de condições à nível periférico e demora nos armazens , verifica-se uma deterioração significativa dos medicamentos . Por isso , é imperioso conhecer a sua estabilidade nas condições climáticas do nosso País . Para resolver o problema de conservação de medicamentos é necessário ensetar o estudo da estabilidade , a fim de conhecer^a resistência dos medicamentos à acção de certos factores físicos .

Neste trabalho faz-se o estudo da estabilidade acelerada de Benzilpenicilina com Procaína , Cloranfenicol , e Clortalidona . São estudadas principalmente as influências da temperatura e humidade , factores primordiais que afectam a estabilidade dos medicamentos .

Os resultados cinéticos obtidos são significativos , e testemunham que alguns medicamentos têm grande estabilidade (Cloranfenicol) não precisando de particulares cuidados . Outros, tal como a penicilina são facilmente degradados e o tempo que o princípio activo leva a atingir o valor mínimo aceitável , chamado t_{90} , porque a concentração deve ser 90% do declarado no rótulo , é cerca de 60 dias para a formulação em suspensão e 90 dias para a forma em pó, à temperatura de 30°C. O estudo da influência da humidade demonstra que a constante de velocidade de degradação da Clortalidona cresce com o aumento de humidade . O t_{90} para a Clortalidona à temperatura de 30°C e 80% de humidade relativa , considerando estes elementos como condições normais do clima moçambicano é cerca de 227 dias.

Propõe-se também uma versão modificada do método espectrofotométrico de análise da Cloroquina recomendado pela farmacopeia americana . Faz-se uma análise estatística dos resultados , comparando diferentes parâmetros . Pelos facto de que o desvio-padrão do método modificado é menor comparado com o método da farmacopeia americana considera-se a versão modificada mais precisa . A comparação dos outros parâmetros revelam que este método é mais preciso.

Í N D I C E

1.....	Introdução.....	5
2.....	Análise Bibliográfica.....	8
.1.....	Antibióticos.....	9
.1.1.....	Penicilina G.....	10
.1.1.1...	Estrutura e estabilidade.....	10
.1.1.2...	Análise de Penicilina G.....	11
.1.2.....	Cloranfenicol.....	15
.1.2.1...	Estrutura e estabilidade.....	19
.1.2.2...	Análise de Cloranfenicol.....	17
.2.....	dió Diuréticos.....	18
.2.1.....	Clortalidona.....	19
.2.1.1...	Estrutura da Clortalidona.....	19
.3.....	Anti-Maláricos.....	21
.3.1.....	estrutura da Cloroquina.....	24
3.....	Metodologia do trabalho.....	26
.1.....	Degradação de medicamentos.....	26
.2.....	Métodos de análise de Benzilpenicilina.....	26
.2.1.....	Análise quantitativa por iodometria.....	26
.2.2.....	Identificação dos derivados de Benzilpenicilina.....	29
.3.....	Análise de Cloranfenicol.....	30
.3.1	Análise quantitativa.....	30
.4.....	Clortalidona.....	30
.4.1.....	Análise quantitativa da Clortalidona segundo o método espectro- fotométrico.....	32
.4.2.....	Deteção dos produtos de degradação.....	38
4	Parte experimental.....	35
.1.....	Cinética de degradação.....	35
.1.1.....	Benzilpenicilina.....	39
.1.2.....	Clortalidona.....	48
.1.3.....	Cloranfenicol.....	52
.2.....	Modificação do método de análise de Cloroquina.....	53
.2.1.....	Análise quantitativa da Cloroquina utilizando o método espectro- fotométrico.....	54
.2.2.....	Resultados de análise dos dois métodos.....	58
.2.3.....	Análise estatística dos dois métodos.....	59
.2.3.1...	Distribuição de student.....	59
.2.3.2...	Comparação dos valores médios	60
.2.3.3...	Cálculo da exactidão do método.....	62
.2.3.4...	Cálculo do número de doseamentos a fazer para uma dada precisão. 63	
5.....	Conclusões e Recomendações.....	65
	Bibliografia.....	

1. INTRODUÇÃO

O problema da conservação dos medicamentos, é de importância capital para a situação que presentamente se vive no nosso País: A guerra não declarada, movida pelos países imperialistas, que se reflecte negativamente na economia do País, com consequências directas na compra e distribuição de medicamentos.

A estabilidade dos medicamentos, é uma questão deveras complexa, em que intervêm numerosos factores. Pode ser definida numa primeira aproximação por dois parâmetros: O de quantidade e do tempo, isto é, determinando a fracção do princípio activo, que se destroi durante uma unidade de tempo.

Factores primordiais, que influem na estabilidade de medicamentos são a temperatura e a humidade. Outros, tais como, a pressão atmosférica, a irradiação solar são de segmenos importância porque a sua influência provem da exposição directa dum produto.

As acções nefastas da temperatura-humidade sobre os medicamentos podem provocar principalmente a modificação do estado físico, intervir na velocidade de degradação e permitir o desenvolvimento acelerado dos micróbios e fungos, em preparações não estéreis. A temperatura é um factor importante de degradação e o estudo teórico da sua influência permite precisar a duração duma boa conservação dum produto.

O estudo da estabilidade dum produto pode ser feito mediante o estudo da estabilidade acelerada, quer dizer, à temperaturas elevadas, mas os resultados obtidos sobre a duração da conservação deve ser confirmado por um estudo à temperatura ambiente.

Resultados de análise de certos medicamentos recolhidos em depósitos de medicamentos dos Hospitais Gerais da cidade de Maputo, leva-nos a pensar que devido principalmente às condições de armazenamento, alguns medicamentos, se não for na sua maioria, chega ao doente com um certo nível de degradação.

A análise da tabela 1.1 em que são comparados os resultados analíticos de alguns medicamentos com a mesma data de fabrico e lote permitem-nos observar que alguns depósitos apresentam teores baixos em todos os medicamentos estudados, embora de níveis aceitáveis, enquanto outros por exemplo o Hospital da Machava podem ser considerados muito bons. A diferença nos resultados só pode ser consequência das condições de armazenamento, pois os medicamentos provêm do mesmo produtor e da mesma série. realmente, a Farmácia do Hospital Geral de Mavalane, o que apresenta resultados mais

baixos é muito iluminada, comparado com os outros. Os depósitos de armazéns estão todos à temperatura ambiente.

Tabela 1.1

Resultados de análise de alguns medicamentos
em %, relativamente ao declarado no rótulo

UNIDADE SANITÁRIA	Clortalidona	Ampicilina Injetável	Ampicilina Capsulas	Penicilina + Procaína Suspensão	Cloranfenicol
H.G. Machava	99.1	120.2	120.0	104.0	111.8
H.G. Chamanculo...	94.8	111.9	105.3	115.7	100.8
H.G. José Macamo...	93.3	96.1	106.1	98.2	98.2
H.G. Mavalane	93.7	110.3	97.9	105.0	97.3
H. Central de Maputo	98.6	120.3	-	117.1	-
C.M.A.M. Maputo....	95.4	119.9	-	92.6	-

Na tabela 1.2 são mostrados resultados de análise de clortalidona do mesmo lote retirado das unidades sanitárias em frascos selados ou em embalagens do laboratório, tentando manter as mesmas condições.

Tabela 1.2

Resultados de análise da clortalidona em %

UNIDADE SANITÁRIA	Valor médio em %
H. Central de Maputo ...	98.6 ± 0.8
H.G. de Mavalane	86 ± 1.2
H.G. José Macamo	96.3 ± 1.2
	50.7 ± 1.8

A Central de Medicamentos, Instituição responsável pelo armazenamento e distribuição no Sistema Nacional de Saúde, não dispõe de um armazém único, mas de várias unidades dispersas pela cidade. As condições nestes armazéns não são uniformes, alguns são caves, sem condições mínimas, como por exemplo, o armazém Filipe Samuel Magaia na Avenida do mesmo nome, que tem paredes rachadas e sem janelas para arejamento.

A conservação nestes armazéns não é conforme a sua estabilidade, mas segundo o espaço existente.

Alguns países adoptaram temperaturas convencionais para definir e normalizar as condições de stocagem dos medicamentos, aliadas a sua sensibilidade ao calor. Estas temperaturas estão reportadas na tabela 1.3.

Tabela 1.3

Temperaturas recomendadas para a conservação de medicamentos

Farmacopeia Europeia e Farmacopeia Francesa 1968		Farmacopeia Americana 1985	
Definição	°C	Definição	°C
Congelar	- 15 a 0	-	-
Refrigerado	0 a +6	Refrigerador	+ 2 a 8
Frescos	+ 6 a +15	Frio	+ 8 a 15
Temperatura ambiente...	+15 a 25	Temperatura ambiente Controlada	+ 15 a 25
		Temperatura ambiente	Temperatura dominan- te no trabalho

No nosso País, não existe nenhuma norma que regule a conservação de medicamentos. Estes são conservados conforme as indicações no rótulo, quando os há e quando são de fácil tradução e interpretação ou então na base da experiência acumulada de alguns técnicos de farmácia.

Perante estes problemas, pensou-se em fazer um estudo sobre a estabilidade dos medicamentos sob a influência da temperatura e humidade, factores potenciais de degradação.

Sobre a cloroquina, resolve-se o problema de análise, porque várias farmacopeias do mundo recomendam métodos diferentes. Faz-se uma tentativa de modificar o método espectrofotométrico recomendado pela farmacopeia americana.

2. ANÁLISE BIBLIOGRÁFICO

Depois da Independência e da nacionalização da Medicina, iniciou-se uma política de definição de medicamentos essenciais a serem utilizados no País. Deste modo o número de medicamentos indicados no primeiro Formulário Nacional de Medicamentos e re-examinadas em 1982 foram reduzidos para cerca de 400 e em 1985 para cerca de 350.

Para o estudo foram seleccionados medicamentos, na base duma lista elaborada pelo Departamento Farmacêutico, órgão interno do Ministério da Saúde responsável pela distribuição de medicamentos no sistema nacional de saúde. Os parâmetros de fundo para esta selecção foram:

- 1) Medicamentos cuja conservação deve ser feita em condições rigorosamente controladas.
- 2) Medicamentos utilizados no tratamento de doenças graves.
- 3) Medicamentos que alterados determinam a formação de substâncias tóxicas ou com efeitos colaterais indesejáveis.
- 4) Medicamentos utilizados na estratégia de luta contra doenças endémicas.
- 5) Difusão de medicamentos
- 6) Custos

No âmbito das capacidades actuais do Laboratório, do tempo, das informações obtidas com os pedidos e resultados da análise sobre medicamentos cuja degradação ocorre antes do tempo estabelecido no rótulo, disponibilidade de padrões e técnicas de análise e com base nos parâmetros acima indicados foram escolhidos 4 medicamentos a mencionar:

- Penicilina G e proína - um antibiótico muito utilizado no tratamento de doenças graves. A forma em suspensão degrada-se um pouco antes de terminado o prazo de validade. A sua conservação deve ser feita à temperaturas compreendida entre 2 a 8° C, mas nos armazens Moçambicanos é feita à temperatura ambiente.

- Cloranfenicol - outro antibiótico. Quimicamente é o mais estável que se conhece; muito sensível a luz e muito difundido.

- Clortalidona - É um diurético e hipertensivo muito utilizado. Representa cerca de 0,1%. É muito sensível à humidade.

- Cloroquina - Vinculado ao grupo dos anti-maláricos.

Droga de 1ª linha na estratégia de luta contra a malária e muito difundido. Da farmácia do Hospital Central Maputo, por exemplo, a cloroquina constitui cerca de 8% de total de comprimidos utilizados e cerca de 60% de todos os medicamentos.

Mozambique é um país em que a malária é uma doença endémica. O país compra e recebe em ofertas grandes quantidades de cloroquina. Se por um lado é certo que este medicamento é de grande estabilidade, podendo ser utilizado por mais de um ano, após o termino do seu prazo, também é certo que o controlo de qualidade quer à chegada ao país quer em stock nos armazéns deve ser periódico. As técnicas actualmente em vigor não são rápidas, exigem extracções sucessivas o que conseqüentemente pode levar a perdas. O estudo feito para a cloroquina foi diferente relativamente aos outros três produtos, incidindo principalmente e unicamente sobre a proposta duma técnica de análise, que seja rápida, eficaz e simples.

A inexistência duma bibliografia sobre a estabilidade de medicamentos e toxicidade dos seus produtos de degradação fez com que o Laboratório veja-se em situações de embaraço para aconselhar sobre a utilização dum medicamento com prazo de validade expirado mas em falta no país ou com outros problemas semelhantes.

Para ultrapassar estes problemas, optou-se por fazer a cinética de degradação dos 3 outros medicamentos à temperaturas e humidades definidas com o objectivo de a partir dos resultados formular orientações concretas para melhor solucionar problemas de ordem sanitária e também económica que surjam com a conservação de medicamentos.

2.1. ANTIBIÓTICOS

Antibióticos são substâncias produzidas em substractos, durante o crescimento de micro-organismos, que em baixas concentrações destroem ou inibe o crescimento de outras espécies de micro-organismos.

De um modo geral, como antibióticos, são considerados como tendo uma actividade antimicrobiana.

Ação antimicrobiana - A distinção entre antibióticos bacteriostáticos que reversivelmente inibe o crescimento de micro-organismos e antibióticos bactericidas, os que matam os organismos, é baseada nas determinações dos seus efeitos "IN VITRO" em certas espécies de micro-organismos.

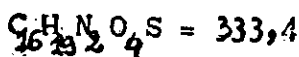
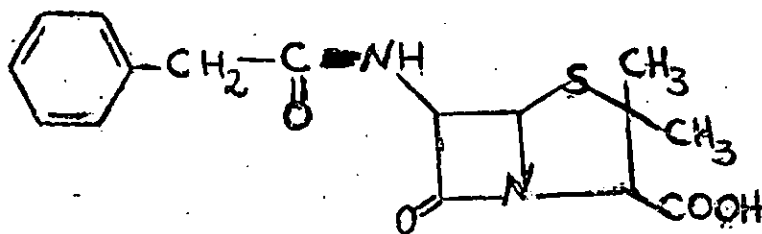
Um antibiótico que é bactericida em certas concentrações pode tornar-se bacteriostático a baixas concentrações - A manutenção do efeito bactericida depende da dosagem adequada e da penetração no tecido.

Resistência - A resistência nos micro-organismos pode ser natural ou adquirida. Espécies resistentes podem aparecer rapidamente ou lentamente dependendo do organismo, da quantidade e do tipo, bem como o meio de uso. A resistência pode desenvolver-se por selecção da espécie resistente durante o uso de um antibiótico. Pode ser adquirido devido a mutação que pode ocorrer rapidamente como um simples passo ou gradualmente. Cedo evidenciou-se que a resistência pode ser adquirida por adaptação ao ambiente e pode também ser transferido de um organismo para outro.

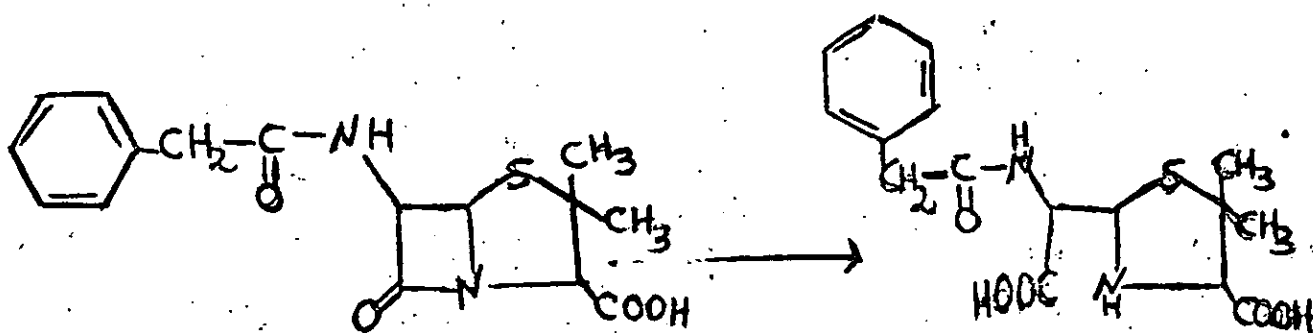
Muitos mecanismos podem ser responsáveis pela resistência de organismos aos antibióticos. A resistência intrínseca dos bacilos gram-negativos benzilpenicilinas é devido à impermeabilidade da parede da célula do antibiótico. As enzimas inativadas produzidas pelas bactérias são responsáveis pela resistência. Cloranfenicol e Aminoglicosídeos (penicilinas, Cefalosporinas) são inativas por enzimas, que hidrolizam o anel B - lactam de Penicilinas e Cefalosporinas. São produzidas por muitas bactérias incluindo estafilococos aureus, bacilos e clostridium e todos os bacilos gram-negativos (1).

2.1.1. FENICILINA G

2.1.1.1. Estrutura e Estabilidade



As penicilinas contêm tanto o anel lactam e Função Amido. Embora ambos os Grupos Lactam e Amido possam ser hidrolisados, observa-se que o grupo Lactam é mais Lábil que o Amido, aparentemente devido a tensão induzida pela fusão dos 4 membros do anel Lactam para 5 membros do anel thiazolidina. A hidrólise de benzilpenicilina é típica:



benzilpenicilina

ácido benzilpeniciloico.

A penicilina G ou Benzilpenicilina apresenta-se na forma de sal de sódio ou de potássio. O sal de sódio ou de potássio de ácido (62) - 6 Fenilacetamido penicilânico, é um ácido antimicrobiano, produzido por certas espécies de "Penicilina notatum" ou organismos com ela relacionados, sob condições apropriadas num meio de cultura conveniente. Ambos os sais brancos, cristalinos, higroscópicos e com calor característico. Muito solúvel em água, praticamente insolúveis em óleos fixos e parafina líquida.

É comercializado na forma de pó para injectáveis e quando em associação com a procaína pode estar na forma de suspensão. Pelo facto de que a penicilina é inactivada em meio ácido, não se produz em forma de comprimidos, cápsulas ou qualquer forma oral, sendo neste caso fabricado da forma a que possa ser administrada de modo injectável. A penicilina na forma de sais é muito solúvel em água, mas a sua actividade farmacêutica é de 6 h. Geralmente para aumentar o período de actividade, associa-se à penicilina compostos tais como benzatina ou procaína e neste caso o seu período de actividade é de 24 horas.

A estabilidade de benzilpenicilina depende principalmente do seu conteúdo em humidade. Esta é determinada pelo método de Karl Fischer e não deve ser > que 1% ; Neste caso pode ser conservado à temperatura ambiente por dois anos, sem perda de potência significativa e para máxima estabilidade, soluções aquosas devem ser tampoadas a pH 6-7 e conservadas à temperaturas baixas. Soluções diluídas são mais estáveis que as concentradas, provavelmente porque é produzido pouco ácido penicilóico na hidrólise em baixas concentrações. Os produtos de degradação das penicilinas não são tóxicos e podem ser detectados ou separados usando electroforesis de baixa-voltagem, cromatografia em camada fina e cromatografia líquido-líquido. Um estudo em gotas e pomadas mostrou que agentes anímicos aumentam a estabilidade de benzilpenicilina, enquanto os cationícos não afectam significativamente a estabilidade (3).

Em soluções aquosas benzilpenicilina hidrolisa-se pelo anel β -Lactam. O pH da máxima estabilidade é 6,75. A hidrólise do sal de sódio a pH 7,5 deu Benzilpenicilato de sódio, então a pH 7,5 Benzilpenicilina degrada-se até ácido Benzilpenicilóico (2).

2.1.1.2.

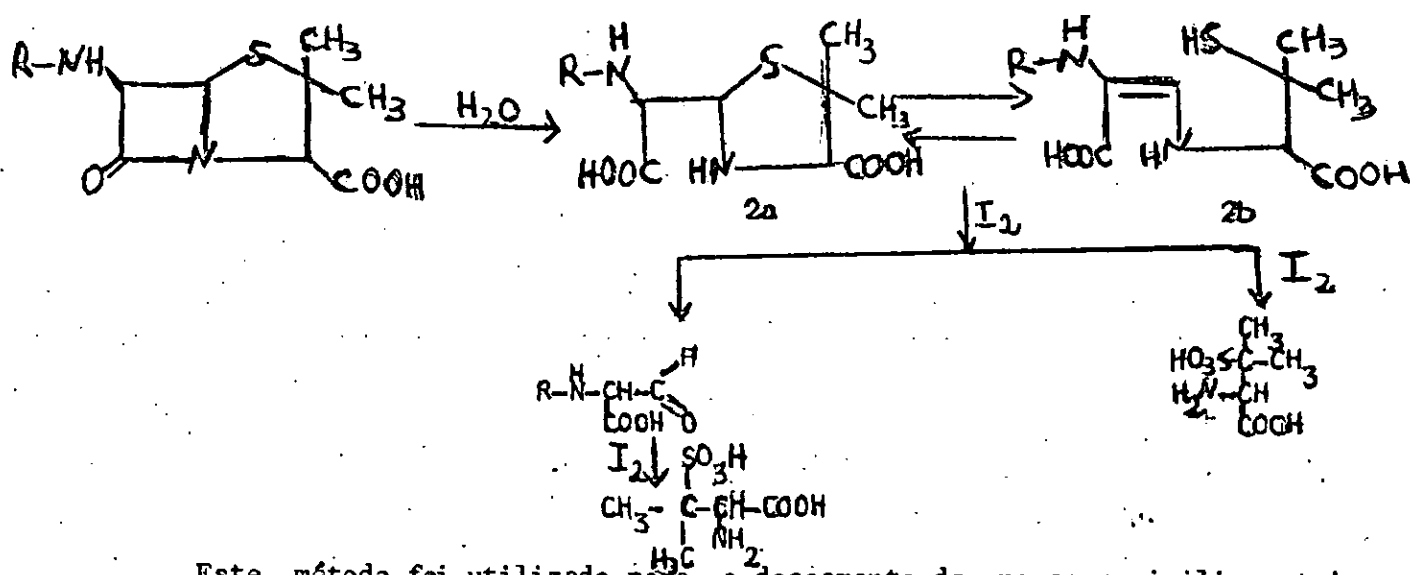
ANÁLISE DE PENICILINA

A determinação da actividade das penicilinas, pode ser feita através de métodos químicos e microbiológicos. O segundo método é mais utilizado em Laboratórios de produção. Quando se pretende avaliar a actividade das penicilinas em Laboratórios é recomendado utilizar o método químico, porque este é um método rápido apesar de ser pouco selectivo. Dos métodos químicos o mais utilizado e divulgado é o método iodométrico (a).

Outros métodos tais como o espectrofotométrico (bi e bii) são pouco utilizados. O de cromatografia em camada fina (C) e cromatografia líquido (d) além de permitir uma determinação quantitativa, permitem determinar os produtos de degradação. São métodos ultimamente muito divulgados e práticos. Os produtos de degradação das penicilinas, não são tóxicos. A sua presença pode aumentar a resistência.

a) Ensaio iodométrico de penicilinas

O método baseia-se na observação de certos produtos de inativação de penicilina, mas não a substância activa pura que mostra consumo marcado de iodo. Duas aliquotas são tomadas duma suspensão de penicilina com a concentração de 2.000 UI/ml. Uma é inactivada com uma base ou penicilinase, depois neutralizada e acidificada. A mesma quantidade de iodo é adicionado a ambas as amostras e depois de um tempo estabelecido, o excesso de iodo é titulado com tiosulfato de sódio. A diferença do consumo de iodo é uma função da quantidade de penicilina presente (4). A reacção característica que ocorre é a seguinte:



Este método foi utilizado para o doseamento de novas penicilinas tais como Fenoximetilpenicilina, Ampicilina, Cefalosporina e Ácido 6 - Aminopenicilínico. Este tem pouca ou nenhuma bioactividade quando medido contra os testes comuns de organismos, embora possua a estrutura β -Lactam comum as outras penicilinas naturais. A sua presença pode conduzir a valores falsos nos ensaios de titulação iodométrico (4).!

b) Métodos espectrofotométricos

Estes métodos são pouco divulgados, talvez porque os reagentes empregados ou são poucos estáveis ou muito específicos e pouco comuns.

Um método colorimétrico sensível e rápido foi utilizado para a determinação de penicilinas em benzilpenicilinas e procaína.

O método usa o ácido fosfomolibdico como reagente de cor, com base na reacção de complexação que ocorre, possivelmente entre o ácido fosfomolibdico e a parte glicosida pois a penicilina é um aminoglicosida. O complexo formado tem a cor azul esverdeada, é estável durante vários dias e tem um só pico de absorção à 720 nm (5).

É possível fazer análise quantitativa das penicilinas por espectroscopia de Infra vermelho.

O método baseia-se na inspecção do grupo carbonilo no espectro infra vermelho (I.V.) de penicilinas, dissolvidas em óxido de deutério ou solução de dimetilsulfóxido na medida da absorvidade da banda β -lactam à cerca de 1760 cm. A precisão do método é $\pm 2\%$ e então comparável ao do método de iodometria. Porque o espectro na região analítica é característico para cada penicilina individualmente, este método é melhor que o de iodometria, no que se refere à especificidade de penicilinas em soluções de óxido ou cloreto do deutério. Os sais comuns ou tampões geralmente não interferem nesta análise.

Pode-se efectuar, tanto a análise qualitativa como quantitativa. Alguns espectros obtidos em amostras sólidas são excelentes: impressões digitais de penicilinas individuais, dando uma elucidação da estrutura das penicilinas.

Contudo o espectro I.V. em amostras sólidas não permitem facilmente efectuar a medição quantitativa porque a absorvância das bandas em I.V. é fortemente afectada pelos efeitos de cristalinidade.

O óxido de deutério é suficientemente transparente na região do grupo carbonilo (1900-1400 cm) região chave para o grupo β -lactam. Este solvente demonstrou ser adequado para penicilinas hidrossolúveis e para as não hidrossolúveis o mais conveniente é o dimetilsulfóxido (6). Como inconvenientes estão a sensibilidade, a precisão e o facto de recomendar o uso de solventes e cuvetes muito específicos.

c) Cromatografia em camada fina

O método de cromatografia em camada fina é hoje largamente usado em análise e identificação e pureza de produtos farmacêuticos. É um método simples, rápido por quanto leva, muitas vezes, menos de duas horas, é eficiente, pois, gastam-se quantidades muito pequenas dos produtos e dá uma informação sobre a presença de produtos de degradação.

Para a identificação da penicilina G em cromatografia em camada fina J.R. Fooks e G.L. Matles, desenvolveram um método que utiliza uma placa em silicagel GF, 0,25 mm activada por aquecimento a 100°C durante 30 minutos pouco antes de uso. Como fase móvel utiliza Acetona-ácido (19:1) e seca-se em ar quente ou à seguinte fase móvel: Acetato isoamílico-Metanol-Ácido fórmico-Água (13:4:2:1) e seca-se também por aquecimento a 120°C durante 20 minutos. Examina-se placa sob lâmpada UV e depois pulveriza-se com uma solução recente duma mistura de (2:1:7) de FeCl_3 , $\text{K}_2\text{Fe}(\text{CN})_6$ a 5% - H_2SO_4 a 20% ou com uma solução de NaNO_2 0,1% e deixar ficar durante 20 minutos e pulverizar com uma solução de sulfamato de amónio a 0,5% e cloreto de N-(1-Naftil) etilenediamina 0,1%. Este método dá uma separação aos produtos de degradação e uma separação efectiva entre a penicilina com RF maior e procaína com um RF menor.

Um outro método descrito na USP 485, utiliza um sistema de solventes consistindo do tolueno, dioxano e ácido acético glacial (90:25:4) e como fase estacionária uma placa de sílica Gel. A amostra e os padrões são preparadas numa mistura de solventes formados por acetona, ácido cítrico 0,1M e citrato de sódio 0,1M (2:1:1:). Depois da fase móvel ter percorrido três quartos de comprimento da placa, esta é removida da câmara, pulverizada com uma solução de amido, seguida de solução de iodo. A penicilina G aparece como uma mancha branca num fundo purpúrico. Pulveriza-se a placa com uma solução de p-Aminobenzaldeído em metanol. A procaína aparece corada de amarelo brilhante. Este método só serve para identificar penicilinas e procaínas, mas não-nos informa sobre os produtos de degradação, porque tanto a penicilina como a procaína não migram neste meio.

Actualmente em laboratórios modernos para análise de penicilinas e seus produtos de degradação, utiliza-se o método de cromatografia líquido-líquido. Este método, utiliza um sistema de permuta iônica em HPLC capaz de separar penicilina G dos seus produtos de degradação. Os tempos de retenção são:

Penicilina potássio - 17,5 Min, DI - ácido penicilanico - 4,5 Min; Ácido Benzilpenicilóico: 7,0 a 8,0 Min; Ácido Benzilpenamaldico - 13,0 o Ácido Benzilpenílico - 22 Min. Este método é particularmente útil porque a maioria dos métodos existentes são dirigidos para identificar e quantificar penicilinas intactas. O método permite determinar a presença de produtos de degradação e é único que além de permitir identificar os produtos de degradação facilita o seu doseamento (9). É um método sensível, reproduzível e aplicável à análise quantitativa em formas de dosagem comercial.

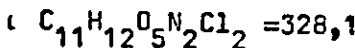
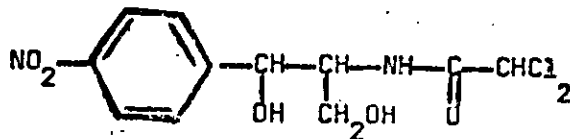
2.1.2. CLORANFENICOL

É um antibiótico obtido a partir de culturas da bactéria "streptomyces venezuelae", mas agora produzido sinteticamente.

Cloranfenicol é um dos antibióticos mais quimicamente estáveis que se conhece. Tem boa estabilidade a temperatura ambiente a pH 2-7,2, sendo de máxima estabilidade a pH 6,0. A maior causa de degradação de cloranfenicol, em meio aquoso, pode ser atribuída a cisão hidrolítica da ligação amida. A hidrólise é em geral catalizada ácido-base. Espécies catalizantes são em geral ácidos e bases presentes no tampão utilizado (10) e por isso em solução recomenda-se soluções pouco tamponadas.

Cloranfenicol é comercializado na forma de creme, pomada, drageias, cápsulas, suspensão, injectável e gotas oftálmicas.

2.1.2.1. ESTRUTURA E ESTABILIDADE



SOLUBILIDADE:

É insolúvel em água, benzeno, éteres e óleos vegetais.

Solúvel em alcoóis e glicóis.

Ponto de fusão: + 150.5°C

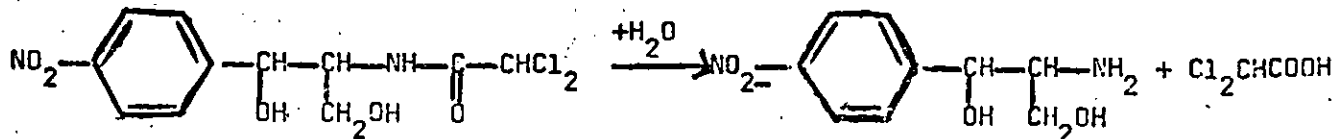
OCORRÊNCIA:

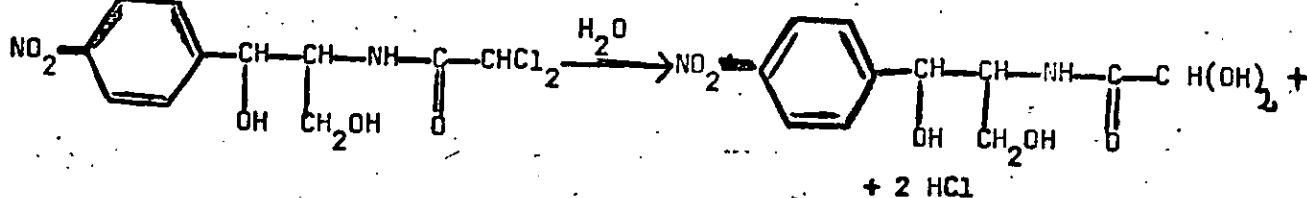
Existe na forma de agulhas ou cristais, de cor branca acinzentada, de sabor amargo e sublima a vácuo.

Uso terapêutico: Antibacteriano & Anti-rickettsias (15,11).

Cloranfenicol ocorre naturalmente como um composto nitro e de forma aromática. Sua estrutura é a de um éster e é susceptível de sofrer hidrólise amídica e hidrólise na porção de cloro como nas equações seguintes:

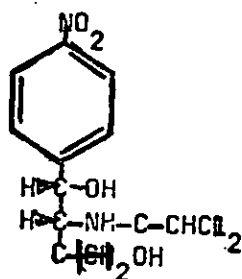
a) Hidrólise amídica do cloranfenicol.





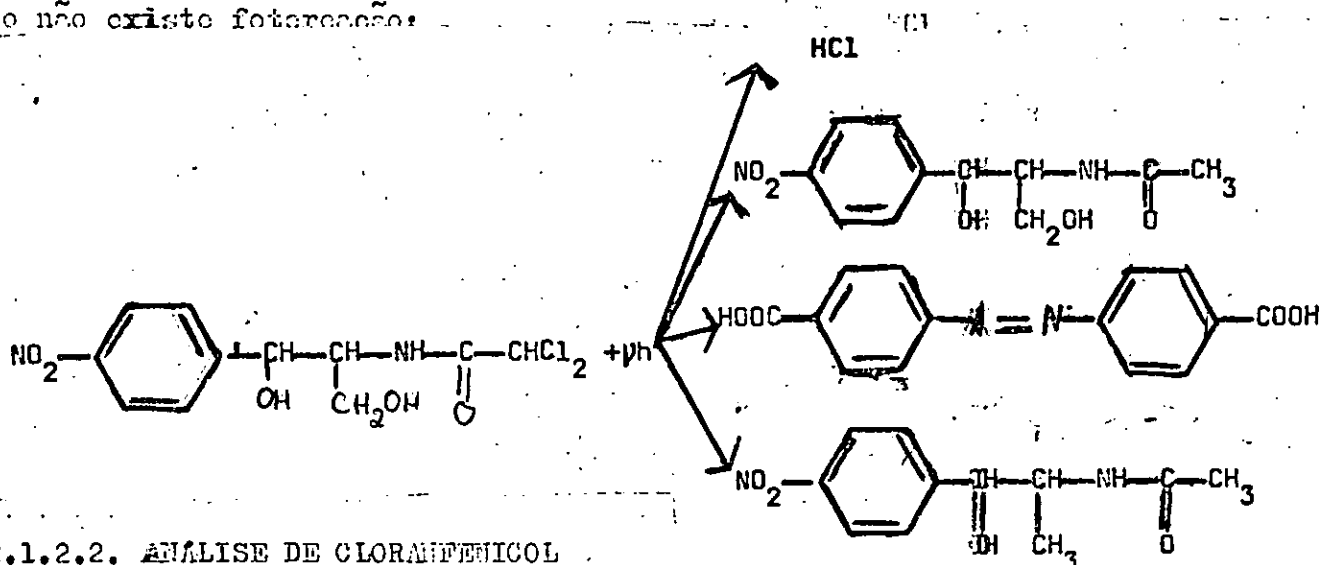
No meio alcalino a hidrólise b) ocorre primeiro, + 2 HCl, devido ao facto de que a ligação carbono hidrogénio é mais fraca do que a ligação amídica.

O espectro de ressonância magnética molecular (NMR), mostra que a única forma biologicamente activa é a forma D-(-) Threo (I) e que a sua estereoquímica é semelhante a de pirimidina-Nucleótido, que se chama fosfato de uridina, donde se conclui que o cloranfenicol tem acção inibidora no crescimento de microorganismos (10):



O principal produto de degradação é 2 - Amino - 2 (a - Nitrofenil) Propano - 1,3 - Diol. A temperatura elevada e um meio alcalino, a hidrólise é rápida e aparecem 9 derivados do tipo Azo e 4,4' - ácido benzóico que está em maior quantidade. Existe também Azo-Aldóidos, Azo-Alcoois, Azofenóis e pensa-se que a hidrólise é entre C_1 e C_2 . A formação dos derivados do tipo Azo é resultado duma desproporção e a formação dos derivados do ácido benzóico e álcool benzílico podem ser considerados como resultado duma reacção canizaro, do Nitrobenzaldeído.

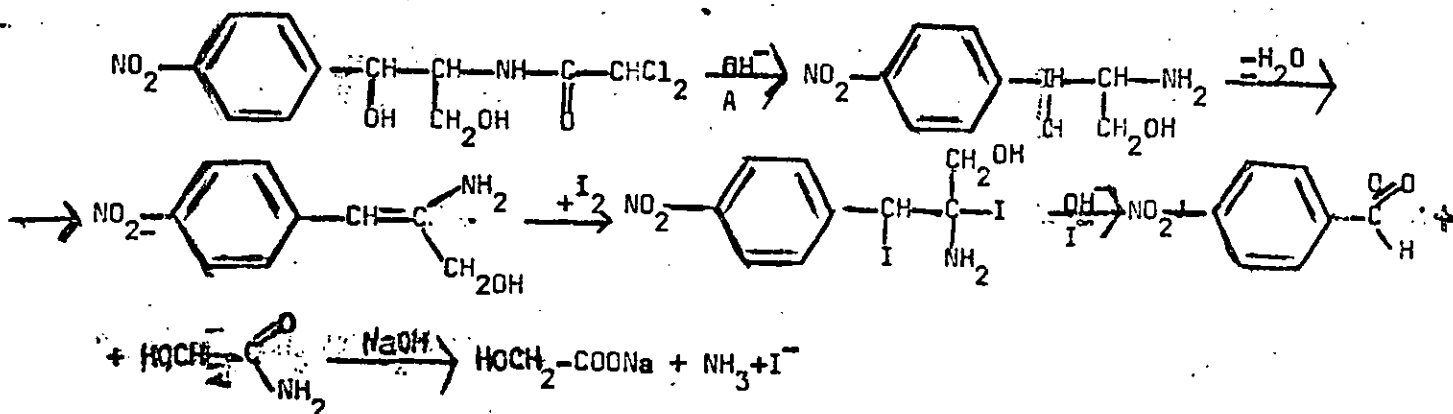
Cloranfenicol é instável à presença da luz Shih a partir de uma solução aquosa e neutra, isolou 3 a 6 produtos, incluindo o HCl. Quando em meio alcoólico ou benzênico não existe fotoreação:



2.1.2.2. ANÁLISE DE CLORANFENICOL

Dos métodos descritos para o Cloranfenicol o mais recomendado é o espectrofotométrico, no qual faz-se a determinação quantitativa por medição da absorbância a 275 nm numa solução aquosa. Este método tem a desvantagem de incluir o produto de hidrólise 2-Amino-1-(4-Nitrofenil) Propano-1-diol que é aconselhável fazer uma cromatografia em camada fina antes.

A aplicação do Cloranfenicol também é possível fazer-se por iodometria segundo Kolar I.P. 11). A amostra é fervida com solução de hidróxido de sódio, arrefecida, diluída e tratada com iodo, conservada no escuro por um período de 10 a 15 minutos. Depois é tratada com iodeto de potássio e ácido sulfúrico diluído. O iodo libertado é titulado com tiosulfato de sódio e como indicador usa-se o amido. Tudo leva a crer que este método deve ser melhor que o anterior uma vez que a experiência deve ser feita com um branco sem tratamento com NaOH. As transformações possíveis de Cloranfenicol durante o ensaio em princípio devem corresponder as seguintes reações:



O ensaio de identificação e pureza do produto pode ser levado a cabo por análise de cromatografia em camada fina; Como fase móvel pode servir um dos sistemas seguintes:

- I - Clorofórmio, Metanol e água (9:1:0,1);
- II - Tolueno, acetona (90:40);

A placa em ambos os casos é sílica Gel GF 154 e tanto a amostra como o padrão são preparados em Etanol a 96% e a 1% P/V. A revelação é feita sob lâmpada ultravioleta 254nm. (11,17). A análise utilizando o sistema II, também pode ser revelada por uma mistura em partes iguais que consiste de 0,2g de defenilcarbozina em 100ml de etanol, 2g de cloreto de mercúrio (III) em 100ml de etanol. Posteriormente a placa é pulverizada com hidróxido de potássio em Metanol. O Cloranfenicol aparece sob a forma de manchas brancas em fundo purpúreo. O sistema I apresenta ser melhor que o II, porque o *rf* é maior, que é sinónimo de boa resolução.

2.3. DIURETICOS

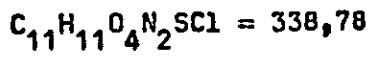
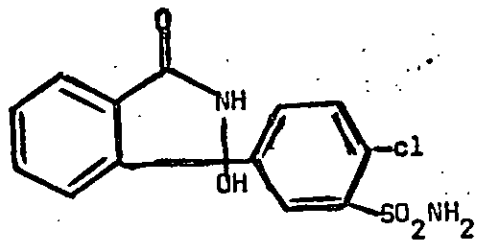
Diuréticos são drogas que provocam a excreção de água e de electrólitos pelos rins. São usados no tratamento de doentes em condições de congestão cardíaca ou em doenças hepáticas, renais e pulmonares, quando a retenção de sais e água dá origem a edemas ou ascites. São usados quer a sós, ou associados a agentes hipertensivos.

Existem 7 grupos de diuréticos e a sua classificação, além de baseada na estrutura e composição, também é na base de acção típica. O clortalidona pertence ao 1º grupo, que é das tiazidas ou benzothiadiazinas, típico das clorotiazidas que se caracterizam por inibirem a reabsorção de sódio e cloretos nos rins e promoverem a excreção do potássio; O 2º grupo é caracterizado por compostos que são ácidos carboxílicos, produzem uma diurese intensa e relativamente de curta duração. Os inibidores de anidrase carbónica, diminuem a excreção do potássio, pertencem ao 3º grupo. O 4º grupo compreende as diuréticas mercuriais, tem o grupo mersalil como característica estrutural, inibem a reabsorção do sódio e promovem a excreção do potássio. Os inibidores de anidrase carbónica são usados na redução da pressão intra-ocular nos glaucomas e estão integrados no 5º grupo pertencem os diuréticos osmóticos que reduzem o conteúdo de água no corpo meios físicos. São usados para prevenir edemas cerebrais e provocam a excreção de drogas, tais como Aspirina e Barbitúricos e por último está o grupo que diminui a excreção de potássio, são usados em associação com outros diuréticos para contrariar o efeito de eliminação do potássio.

2.3.1 CLORTALIDONA

A clortalidona é um diurético e pertence ao 12 grupo. Devido ao facto de que recebemos queixas por partes dos doentes, e uma mercadoria recebida de U EA não cumpria com as normas, a análise da fórmula de clortalidona e os métodos de análise mostram que por acção da água, este composto sofre uma hidrólise; é um medicamento muito usado, constitui cerca de 15,7% de uso em todos os diuréticos que constam no formulário e cerca de 0,21% de todos os comprimidos usados. Não existe informação bibliográfica sobre a estabilidade desta droga.

2.3.1.1 ESTRUTURA DA CLORTALIDONA

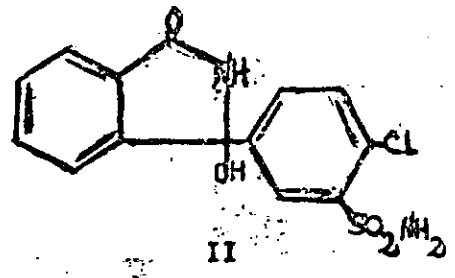
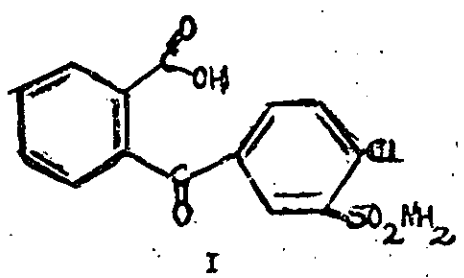


2-Cloro-5-(1-Hidróxi-3-oxo-1-Isoindolinil);

Descrição: Apresenta-se na forma de pó branco ou creme esbranquiçada-cristalina, inodoro e insípido.

Solubilidade: Praticamente insolúvel em água, pouco solúvel em éter e solúvel em álcool e em soluções básicas.

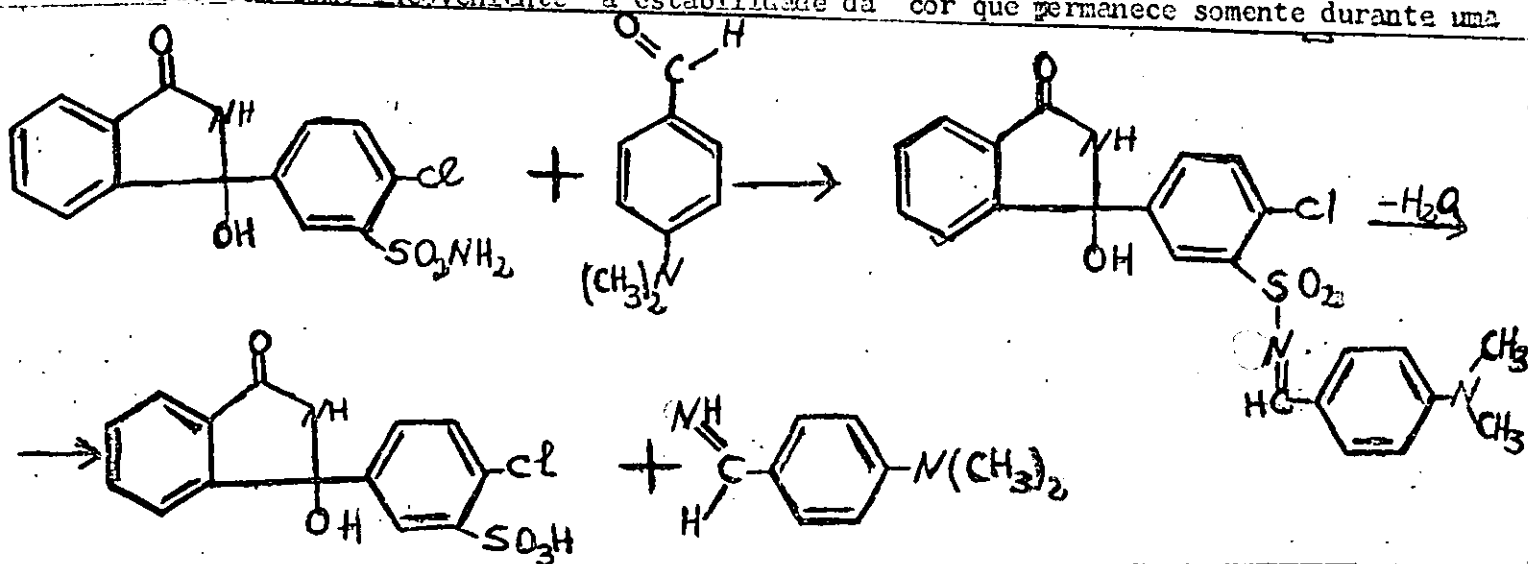
A molécula de clortalidona é formada por um anel de isoindol com grupo oxo carbono-3 e hidróxi na posição 1, associado à uma molécula de 7-cloro benzenossulfonamida. Por hidrólise clortalidona forma o ácido (4-cloro(3-sulfamoi) benzoil) benzóico (I) que é o principal produto de degradação. Outro produto que se pode formar durante a análise experimental é o 2-cloro-5-(1-Metoxi-3-oxo-1-Isoindolinil) benzossulfonamida (II).



ANÁLISE DE CLORTALIDONA

A avaliação da clortalidona pode ser feita por espectrofotometria ultravioleta em soluções metanólicas, após extração por aquecimento e sob reflexo. A medição da absorvância é a 275nm. Da avaliação feita por método revelou ser incorrecta porque os produtos de degradação da clortalidona (I e II) absorvem neste comprimento de Onda e com coeficiente de extinção maior que o do composto puro. É aconselhável preceder a análise por espectroscopia de uma análise por cromatografia em camada fina.

Shinghal D.M. e Prabitudesai, J.S. desenvolveram um método para estimação da clortalidona nas suas formulações. O método envolve a formação dum complexo entre a clortalidona e 4-Dimetilamino benzaldeído em Metanol Os reagentes são aquecidos em banho-maria fervente durante 20 minutos, e a absorvância lida a 390nm. Este método tem como inconveniente a estabilidade da cor que permanece somente durante uma



Ultimamente os métodos de análise divulgados incidem mais sobre a cromatografia líquido-líquido, já que provou-se que o método espectrofotométrico dá resultado dos errados, como consequência da degradação ácida da clortalidona durante a experiência, formando pequenas quantidades de I e II. Os três compostos podem ser separados e determinados por cromatografia líquido-líquido, numa coluna de Ubondapak e 18 acetonitrilo-acido acético 62% (3:7) como fase móvel (1,5ml/min). A detecção é a 280nm e

como standard interno usa-se 4-nitro-anililina. Sem dúvida, este é o melhor método, mas a limitação de equipamento, de momento faz com que se utilize o método espectrofotométrico para análise quantitativa.

A presença dos produtos de degradação pode ser feita por cromatografia em camada fina. Um dos métodos utiliza placa de sílica gel G F 254 e como fase móvel uma mistura de N-Butanol e Amónia 1M (15:3). As soluções da (12) amostra e dos padrões (clortalidona (I) e ácido 2-(4-cloro-(3-sulfamoyil) benzoyl)benzoico (II) são preparadas em metanol numa concentração de 1% para a amostra e padrão I e 0,01% para II. Depois de removida a placa examina-se sob lâmpada ultravioleta à 254nm. Faz-se uma comparação das manchas e as obtidas com amostras, exceptuando a principal, não devem ser mais intensas que a mancha obtida com II. Este modo de comparação dos padrões pode induzir a erros além do que o padrão II é difícil de obter (11).

Existe um outro método de cromatografia em camada fina para identificação de diuréticos em geral. A fase móvel é uma mistura de acetona, benzona e água (3:3:1). A placa, a preparação das soluções e revelação é somente ao descrito para (II) Conquanto que sejam um método para diuréticos de um modo geral este método é melhor que o primeiro.

2.4. ANTI-MALÁRICOS

As drogas utilizadas no tratamento e profilaxia da malária tem acção bem definida contra as diferentes espécies de parasitas do pludismo que afectam os animais e o homem.

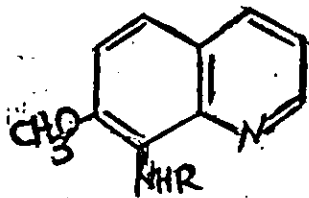
Os medicamentos antipalúdicos estão divididos em grupos segundo a sua estrutura química e actividade biológica.

ALCALOIDES DA QUINA

Obtêm-se a partir do córtex das árvores do género cinchona. Contém uma mistura de uns 10 alcaloides, mas a maioria deles não cristalizáveis e efectivamente chama-se quinoidina, termo este aplicável ao resíduo que fica depois de retirar os quatro alcaloides valiosos: Quinina, Quinidina, Cinconina e Cinconidina (16).

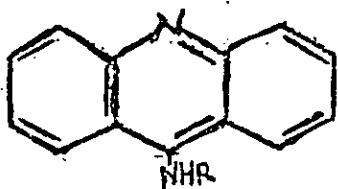
8-AMINOQUINOLEÍNAS

Pertencem a este grupo de medicamentos tais como a pamaquina, prinaquina e crinacida. Na sua estrutura é comum a presença do anel quinoléico, com um grupo metoxi posição 6 e um grupo amina primário na posição 8, e diferem entre si na composição da amina.



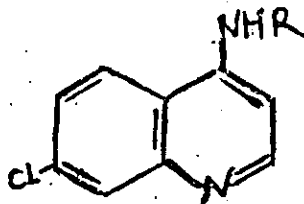
9- AMINOACRIDINAS

A descoberta de que a Pamaquina não podia substituir a Quinina, porque ela é muito activa sómente contra o paludismo aviário, levou a que as investigações continuassem. A ampliação do anel quinoleico da Pamaquina deu origem a Acridina. E se bem que esta ampliação tenha sido bastante positiva, descobriu-se que a cadeia lateral aminoalquilamínica da aminacripinas era essencial para a sua actividade. Está situado na posição 9 oposta ao átomo de nitrogénio o único medicamento que pertence a este grupo é a pacrina - que além da cadeia aminoalquilamínica tem um grupo metoxina posição - 2 e um átomo de cloro na posição 6.



4. AMINOQUINOLEINAS

A presença do anel quinoleico na estrutura da quinina e conhecidas as propriedades terapêuticas das 8 - Aminoquinoleínas, estimulou o estudo acerca dos medicamentos antipaládicos. Investigadores alemães examinaram diversos compostos e encontraram que eram promissores os que tinham cadeia lateral dialquilamino-alquílica básica na posição 4. Entre eles destacaram-se a cloroquina e a satoquina, porque além de serem muito activas eram menos tóxicas. Além dos dois mencionados pertencem a este grupo a Amodiaquina e Amopiroquina.



w

ANTIBIÓTICOS

As formas de actuar dos antibióticos são muito específicas e intervêm em três mecanismos principais: Inibição da síntese da parede bacteriana, aumento da permeabilidade da membrana citoplasma e interferência na proteína intracelular ou síntese de ácido nucleicos. Entre os antibióticos de maior uso para o tratamento do paludismo estão as tetraciclinas e cloranfenicol.

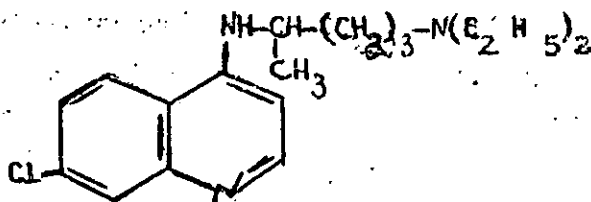
OUTROS COMPOSTOS

Existem preparados de um grande número de compostos cuja actividade contra os plasmódios foi cuidadosamente estudada. Variam desde Farmacos Antipiréticos, isolados das raízes pulverizadas de "Dicho A febrífuga", algumas guanidinas, pteridinas, piribinas, Naftoquinonas, etc.

A cloroquina, medicamento antimalárico, tem um preço relativamente baixo comparado com outras drogas e é menos tóxico, o País importa e recebe de oferta grandes quantidades de cloroquina e o seu uso está muito difundido no País dado que a malária constitui uma doença endémica em Moçambique.

Pertence ao grupo das 4-Aminoquilofinas. Sua actividade está relacionada com a aniquilação das esquizontes, em todas as fases de desenvolvimento. Não afectam os esporozitos inculados pelo mosquito ou na forma de parasitas que se desenvolve nas células de fígado humano. Portanto a cloroquina previne ou termina com os sintomas clínicos da malária suprimindo parasitas eritrocíticos. Não tem nenhuma acção em esporozitos de p.Vivax, p.Ovale e p. Malaria E. Usa-se também no tratamento de amebíase hepática, na giardíasis, na tratamento de "Lupus erithematosus", Sistémico e artrite. E bem tolerado e efeitos tóxicos a partir da dose antimalárica são raras.

2.4.1. ESTRUTURA DA CLOROQUINA



$C_{14}H_{18}Cl$ = 320,0
13 26 3 ; ; ; .../...

w

ANTIBIÓTICOS

As formas de actuar dos antibióticos são muito específicas e intervêm em três mecanismos principais: Inibição da síntese da parede bacteriana, aumento da permeabilidade da membrana citoplasma e interferência na proteína intracelular ou síntese de ácido nucleicos. Entre os antibióticos de maior uso para o tratamento do paludismo estão as tetraciclina e cloranfenicol.

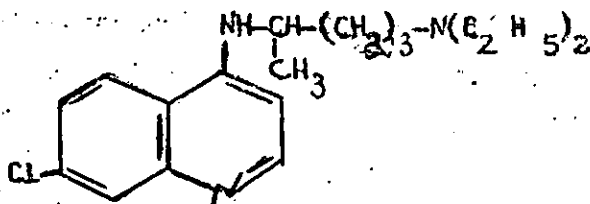
- OUTROS COMPOSTOS

Existem preparados de um grande número de compostos cuja actividade contra os plasmódios foi cuidadosamente estudada. Variam desde Farmacos Antipiréticos, isolados das raízes pulverizadas de "Dicho A febrífuga", algumas guanidinas, pteridinas, piribinas, Naftoquinonas, etc.

A cloroquina, medicamento antimalárico, tem um preço relativamente baixo comparado com outras drogas e é menos tóxico, o País importa e recebe de oferta grandes quantidades de cloroquina e o seu uso está muito difundido no País dado que a malária constitui uma doença endémica em Moçambique.!

Pertence ao grupo das 4-Aminoquinolinas. Sua actividade está relacionada com a aniquilação das esquizontes, em todas as fases de desenvolvimento. Não afectam os esporozitos inoculados pelo mosquito ou na forma de parasitas que se desenvolve nas células de fígado humano. Portanto a cloroquina previne ou termina com os sintomas clínicos da malária suprimindo parasitas criticóticos. Não tem nenhuma acção em esporozitos de p.Vivax, p.Ovale e p. Malaria E. Usa-se também no tratamento de amebíase hepática, na giardíasis, na tratamento de "Lupus erithematosus", Sistémico e artrite. É bem tolerado e efeitos tóxicos a partir da dose antimalárica são raras.

2.4.1. ESTRUTURA DA CLOROQUINA



C₁₈H₂₆N₃Cl = 320,0
; ; ; ; ; / ; ; ; ; ;

Descrição: Pó branco ou ligeiramente amarelo; É inodoro e tem sabor amargo. Geralmente está na forma parcialmente hidratada.

Solubilidade: Pouco solúvel em água, solúvel em ácidos diluídos, clorofórmio e éter; Aparece na forma de sal de fosfato, de sulfato e de cloreto de cloroquina. É comercializada na forma de solução para injectáveis, comprimidos e xaropes.

A cloroquina é um composto bastante estável, porque segundo R.H. Black e outros, no livro "quimioterapia do paludismo", a maior parte da cloroquina presente no plasma e nos tecidos permanecem na forma de composto original, mas formam-se metabolitos por degradação da cadeia lateral alquilomínica. Quando se toma diariamente, excreta-se cerca de 10% do medicamento nas fezes e 56% na urina. Nesta última o composto original sem alterações representa entre 60 a 70% de material identificável, enquanto entre 23 a 37% é constituído por aminas secundárias e aproximadamente 3% por aminas primárias, 4-aminos-7-cloroquinolína. Alguns dos metabolitos podem ser também agentes antipalúdicos activos.

3. METODOLOGIA DO TRABALHO

3.1 Degraduação dos medicamentos

O estudo da cinética de degradação dos medicamentos baseou-se em testes de estabilidade acelerada. Para o estudo foram escolhidos os seguintes medicamentos:

- Penicilina G com Procaína, suspensão, 3000000 de U.I.
- Penicilina G com Procaína, pó, 3000000 de U.I.
- Cloranfenicol, cápsulas de 250mg
- Clortalidona, comprimidos de 100mg

A escolha deveu-se ao facto de serem medicamentos muito utilizados em primeiro lugar, em segundo devido à afluência de pedidos das Províncias e por último devido à disponibilidade de técnicas e padrões no laboratório.

As amostras foram recolhidas em embalagens comerciais, e caso não fosse possível em embalagens do laboratório mantendo as mesmas condições que as comerciais e submetidas à temperatura de 50, 60 e 70°C e humidade relativa de 60, 80 e 100%. Estas humidades foram criadas em excicadores de vidro, contendo Iodeto de Potássio sólido para a humidade de 60%, Cloreto de Potássio sólido para 80% e água para humidade de 100%. As temperaturas foram criadas com uma estufa "HEMMERT" para 70°, para 60° utilizamos uma estufa "BTL" e um termostato da série "TECAN CTB". Todo o equipamento tem a precisão de $\pm 1^\circ\text{C}$.

As amostras de Penicilina não foram submetidas à variação de humidade por se encontrarem em embalagens herméticamente fechadas. Para avaliação do princípio activo e para detecção dos produtos de degradação, periódicamente foram retiradas amostras e submetidas à análise. Antes de se efectuarem as análises estas foram conservadas em excicadores de vidro contendo Pentóxido de Fósforo e guardados no frigorífico.

3.2 Métodos de análise para Benzilpenicilina

3.2.1 Análise quantitativa por iodometria

Para análise do conteúdo em penicilinas, utilizou-se o método iodométrico. Este método é indirecto e permite analisar penicilinas intactas na presença de produtos de degradação. Baseia-se no princípio de que alguns produtos de inactivação das penicilinas mostram um consumo elevado de iodo, mas não a substância pura.

Duma solução convenientemente diluída, tomam-se duas alíquotas idênticas. Uma é inactivada com penicilinase ou alcali e depois neutralizada com ácido clorídrico. Junta-se a mesma quantidade de iodo a ambas soluções e depois de um tempo estabelecido o excesso de iodo é titulado com tiosulfato de sódio. A diferença no consumo é uma função da quantidade de penicilinas presentes. Paralelamente faz-se um ensaio do padrão para o cálculo do equivalente (F) em unidades internacionais por cada ml de tiosulfato de sódio consumido pelo padrão, através da seguinte formu-

1a:

$$F = \frac{2 \cdot C \cdot P}{B - I} \quad (3.1)$$

onde:

C=concentração do padrão , mg / ml

P=potência do padrão , unidades internacionais /mg

B=volume de tiosulfato de sódio gasto pelo padrão branco ,ml

I=volume de tiosulfato de sódio gasto pelo padrão inativado, ml

Para preparação da amostra estudada , o conteúdo de um frasco de penicilina foi transferido para um balão aferido de 250ml e diluído até a marca com solução-tampão fosfato PH6,0±0,5. 2,0ml da solução anterior foram diluídos até 100ml com a solução tampão, obtendo-se uma concentração final de 2400I.U./ml.

Duas alíquotas de 2,0ml cada foram transferidos para erlenmeyers de vidro de 25ml cada com tampa de vidro. A uma das alíquotas foi adicionado 2,0ml de solução de Hidróxido de sódio 1N deixado em repouso durante 15 minutos. Em seguida juntou-se 2,0ml de ácido clorídrico 1,2N e imediatamente acrescentou-se 10,0ml de iodo 0,01N e de novo deixado em repouso durante 15 minutos. Findo este tempo , o excesso de iodo foi titulado com tiosulfato de sódio 0,01N usando o amido como indicador.

Para o cálculo do equivalente (F) foram pesados 60mg de Benzilpenicilina de sódio com a potência de 1666,7 U.I./mg dissolvidos em 5,0ml de solução tampão fosfato. 1,0ml desta solução foi diluído até 10,0ml com a solução tampão fosfato obtendo-se uma concentração final de 1,2mg /ml de benzilpenicilina. Duas alíquotas de 2,0ml cada , foram transferidos para dois erlenmeyers e submetidas ao mesmo tratamento que as amostras.

Cálculos

O conteúdo de benzilpenicilina em percentagem relativamente ao declarado no rótulo foi calculado com base na fórmula:

$$C\% = \frac{F}{2D} \cdot (B - I) \cdot 100 \quad (3.2)$$

sendo:

D=concentração final da amostra em U.I./ml

supondo que as quantidades gastas com o padrão foram:

branco

10,0ml

10,0ml

inativada

4,55ml

4,55ml

e com a amostra:

branco=9,52ml

inativada=3,05ml

Cálculo equivalente:

$$F = \frac{2.1, 2.1666, 7}{(10,80 - 4,55)} = 733,96$$

Cálculo do conteúdo da amostra:

$$F = \frac{733,96}{2.2400} (9,52 - 3,05) \cdot 100 = 99 \%$$

As amostras de Benzilpenicilina com procaína em pó, primeiro foram diluídas com solução - tampão fosfato numa quantidade de 10,0ml e depois tratadas como o descrito.

3.2.2 Identificação dos derivados de Benzilpenicilina

Adetecção dos produtos de degradação de benzilpenicilina foi feita pelo método de cromatografia em camada fina, usando placa de sílica gel G F₂₅₄ e como fase móvel uma mistura de 65ml de acetato isoamílico, 20 ml de metanol, 5 ml de ácido fórmico e 10ml de água. A amostra foi preparada dissolvendo 1ml da suspensão em 25ml de metanol obtendo-se deste modo uma concentração de 12000U.I./ml. Para o padrão na mesma concentração, pesou-se 35,7mg de Benzilpenicilina de sódio que foram dissolvidos em 5,0ml de metanol, e para a Procaína foram pesados 250mg de Cloreto de Procaína para uma concentração de 50mg/ml.

Foram depositados 2ul de cada uma das soluções. Quando o o solvente percorreu 10cm da placa, esta foi retirada e observada sob lâmpada ultra-violeta, aparecendo as manchas coradas de violeta.

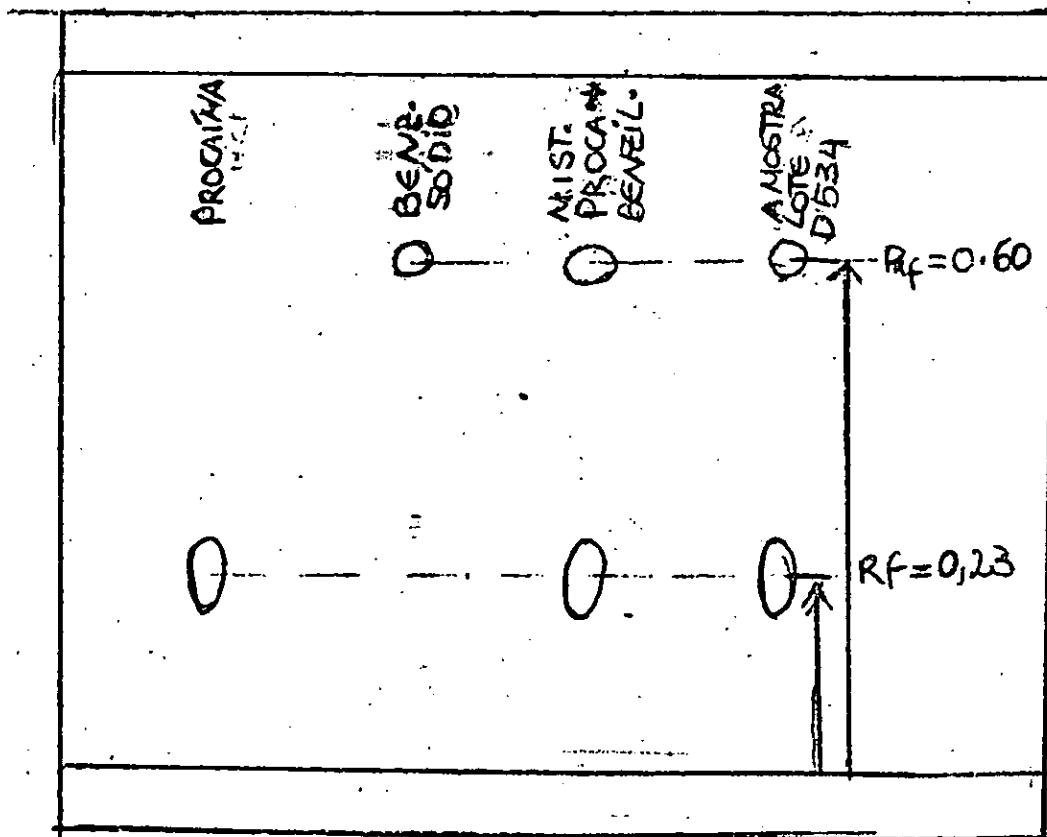


Fig.3.1 Cromatograma de Penicilina G com procaína

3.3 Análise de Cloranfenicol

3.3.1 Análise quantitativa

Para o doseamento de Cloranfenicol utilizamos o método espectrofotométrico (11). O método consiste na medição directa da absorvância da solução aquosa de Cloranfenicol à 278nm. 20 cápsulas de Cloranfenicol foram pesadas individualmente, depois foram esvaziadas e de novo pesadas. A diferença entre os pesos da cápsula cheia e vazia representa o peso do pó.

Para a análise do Cloranfenicol pesou-se pó equivalente a 0,1 g de Cloranfenicol, que foi transferidos para um balão aferido de 500ml e adicionado 400 ml de água e aquecido até a dissolução completa, e só depois preenchido até à marca com água destilada. Foram retirados 10,0 ml da solução e diluídos até 100 ml com água destilada e posteriormente a absorvância à 278 nm (veja espectro nº1). O conteúdo em percentagem de Cloranfenicol relativamente ao declarado no rótulo foi calculado com base na fórmula:

$$C \% = \frac{A_a \cdot F \cdot P_a \cdot 100}{A(1\%, 1\text{cm}) P_a \cdot Cd \cdot 0,001}$$

em que :

A_a = absorvância da amostra ;

F = factor de diluição (50);

P_a = peso médio das cápsulas, g ;

P_g = peso exacto do pó tomado para análise, g ;

Cd = conteúdo declarado no rótulo por cada cápsula, g ;

$A(1\%, \frac{1}{2}\text{cm})$ = absorvância específica (298) ;

ex:

peso do pó de cada cápsula, g			
1-0,2121	6-0,2205	11-0,2574	16-0,1937
2-0,3423	7-0,2015	12-0,3521	17-0,2600
3-0,2383	8-0,1861	13-0,1995	18-0,2611
4-0,2354	9-0,2779	14-0,2371	19-0,2193
5-0,2959	10-0,2336	15-0,1931	20-0,2176

peso médio: 0,2417 g

desvio padrão: 0,047g

peso tomado

para análise, g

0,1001

0,1034

absorvância lida

0,611

0,631

$$C_1 \% = \frac{0,631 \cdot 50 \cdot 0,2417 \cdot 100}{298 \cdot 0,1034 \cdot 250 \cdot 0,001} = 99,0\%$$

$$C_2\% = \frac{0,611.50.0,2417.100}{298.0,1001.250.0,001} = 99,0\%$$

É de salientar que todas as análises quantitativas foram precedidas duma análise de cromatografia em camada fina, para detectar a presença dos produtos de degradação, porque o 2-Amino -1-(4-Nitrofenil)Propano-1,3-diol, principal produto de degradação absorve neste comprimento de onda, constituindo assim, uma interferência. Somente perante o resultado negativo é que a amostra foi submetida à análise quantitativa.

Identificação dos produtos de degradação (11)

Na pesquisa dos produtos de degradação utilizou-se o método de cromatografia em camada fina. Tanto para o padrão como para a amostra foram preparadas soluções em etanol à 96 % e com concentração de 1 % e depositados 2ul.

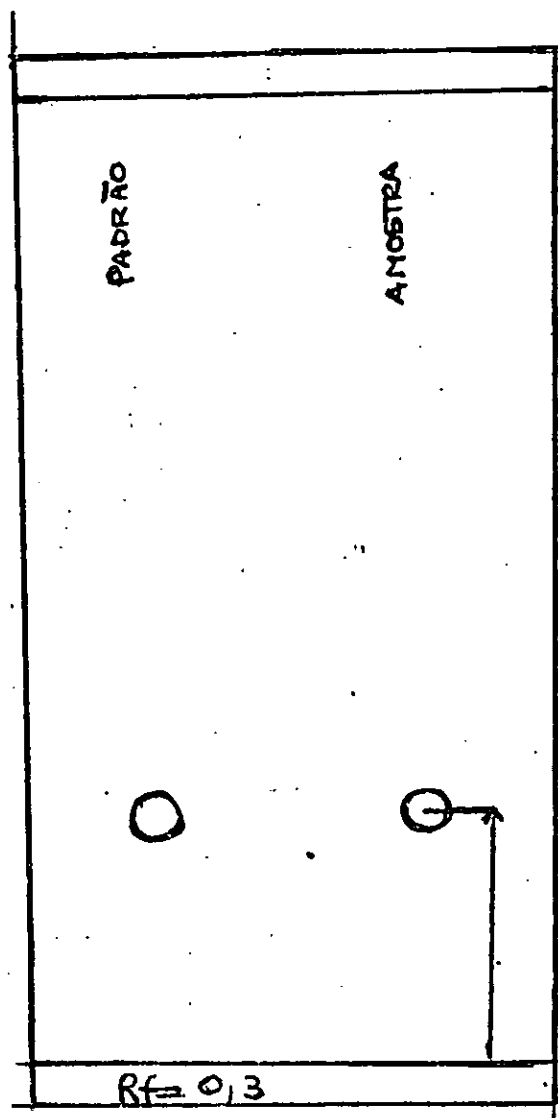
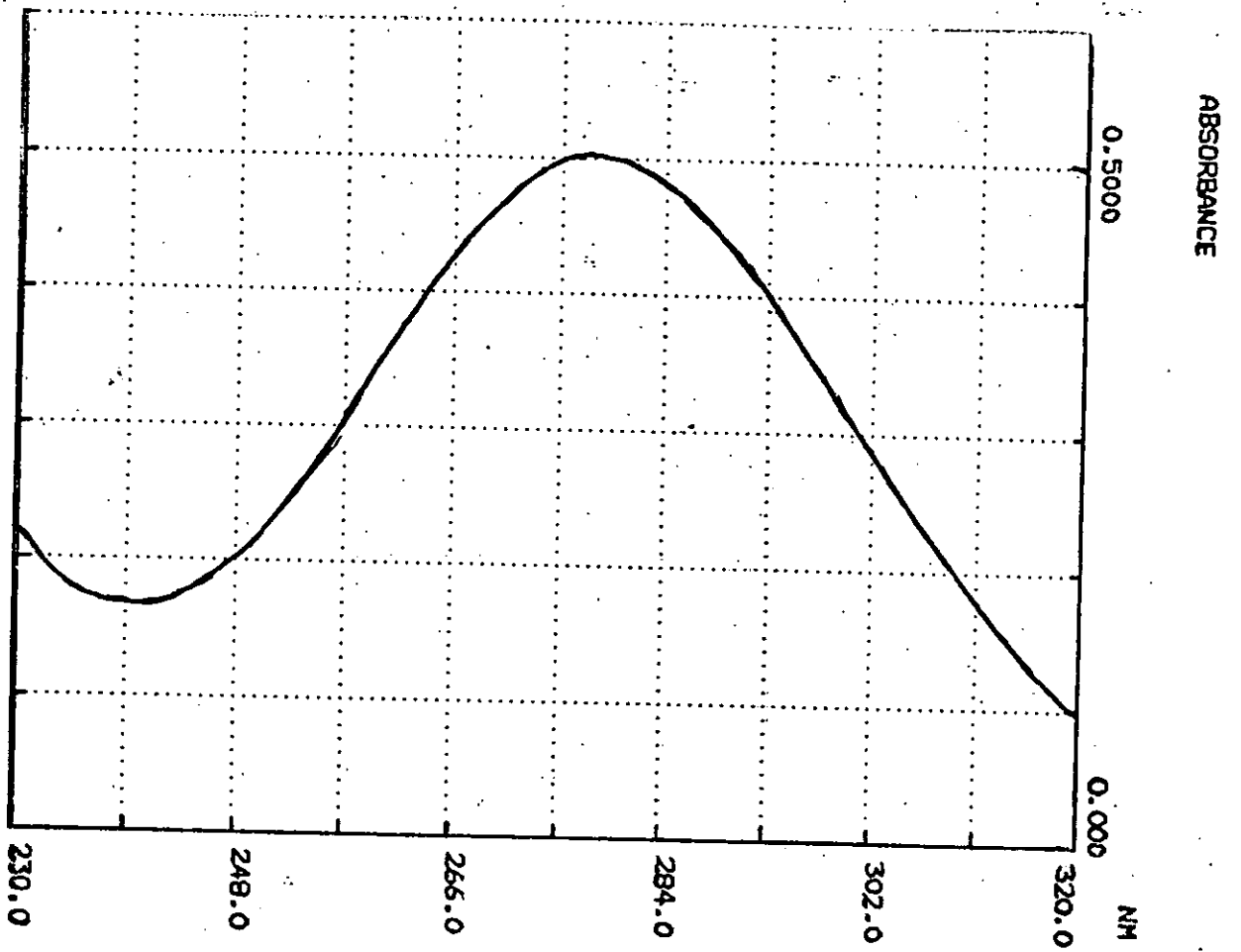


Fig. 3.2. CROMATOGRAMA DE CLORANFENICOL



ESPECTRO Nº 1 Espectro de Cloranfenicol

foi utilizada uma placa de sílica gel GF₂₅₄ e como fase móvel uma mistura consistindo de Clorofórmio, Metanol e água (80:20:0,1). Depois do solvente ter migrado 12cm a placa foi retirada seca ao ar e observada sob lâmpada ultravioleta.

3.4 CLORTLIDONA

3.4.1 Análise quantitativa da Clortalidona segundo o método espectrofotométrico

O método baseia-se na medição directa da absorvância da solução metanólica da Clortalidona à 275 nm. É um método pouco específico, porque os produtos de degradação absorvem neste comprimento de onda e com coeficiente de extinção molar superior que o da Clortalidona. Para evitar erros as amostras de Clortalidona foram submetidas primeiramente à análise de cromatografia em camada fina, para detecção dos derivados.

Foram pesados 20 comprimidos. Uma quantidade de pó equivalente à 100 mg foi fervida sob refluxo com 30 ml de Metanol durante 5 minutos. Depois da fervura foi vigorosamente agitada por 15 minutos, arrefecido até a temperatura ambiente e depois filtrada. O filtrado foi diluído até 100 ml com Metanol e a 5,0 ml desta solução juntou-se 2,0 ml de ácido clorídrico M e metanol até 50 ml em balão aferido. Em seguida procedeu-se a medição da absorvância à 275 nm e o cálculo do conteúdo percentual foi elaborado com base na fórmula seguinte:

$$C \% = \frac{A_{\lambda} \cdot F \cdot Pa \cdot 100}{A(1\%, 1\text{cm}) \cdot Pa \cdot Cd \cdot 0,001}$$

ex:

peso de cada comprimido, g:

1-0,1436	6-0,1422	11-0,1415	16-0,1433
2-0,1453	7-0,1433	12-0,1428	17-0,1422
3-0,1413	8-0,1419	13-0,1426	18-0,1451
4-0,1449	9-0,1428	14-0,1419	19-0,1410
5-0,1418	10-0,1433	15-0,0,1441	20-0,1413

peso médio : $0,1428 \pm 1,34 \cdot 10^{-3}$
 peso da amostra, g

0,1447

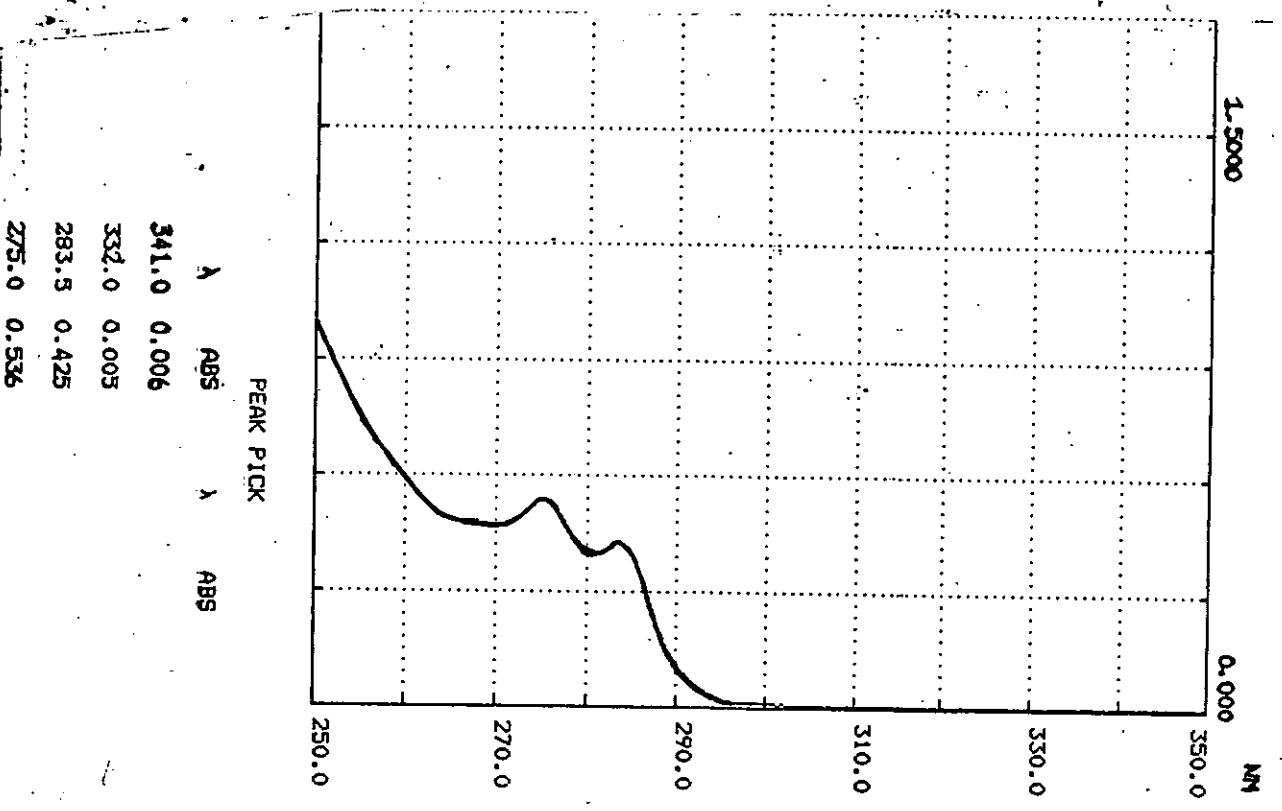
0,1430

Absorvância lida

0,543

0,539

$$C_1 \% = \frac{0,543 \cdot 10 \cdot 0,1428 \cdot 1000}{57,4 \cdot 0,1447} = 92,4$$



Esp. nº2 , espectro da clortalicóna

$$C_2 = \frac{0,539 \cdot 10,0 \cdot 1428 \cdot 10^3}{57,4 \cdot 0,1430} = 92,0 \%$$

3.4.2 Deteccão dos produtos de degradação

Experimentou-se fazer a pesquisa do produtos de degradação mediante o método da cromatografia em camada fina, usando uma placa de sílica gel GF₂₅₄ e como fase móvel uma mistura formada por benzeno, acetona e água (3:6:1); a amostra foi preparada pesando cerca de 14,5mg de pó de comprimidos de Clortalidona extraídos com 10ml de metanolcentrifugado e depositados 5ul. Para o padrão foram pesados 10,4mg de Clortalidona (substância pura de referência dissolvidos em 10,0 ml de metanol e depositados 5ul.

A placa foi retirada após que o solvente percorreu 12cm, foi seca ao ar, e observada sob lâmpada ultra-violeta. Nenhum produto de degradação foi detectado durante todo o processo analítico.

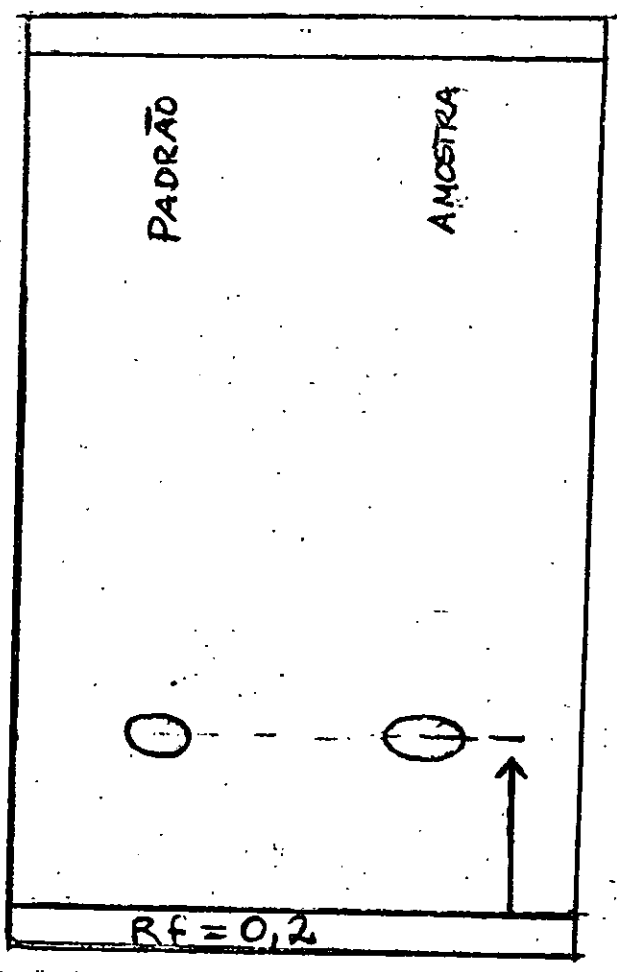


Fig.3.3 Cromatograma de Clortalidona

4.1. CINÉTICA DE DEGRADAÇÃO

O estudo teórico da influência dos factores físicos temperatura e humidade, permite precisar a duração duma boa conservação do medicamento, quer dizer, o intervalo de tempo durante o qual a droga não apresenta uma perda de actividade de mais de 10%, e esta diminuição máxima é um compromisso admissível, razoável e geralmente reconhecido sobre o qual se fundamenta para estimar o período de validade do medicamento.

Papel da cinética química e da termodinâmica aplicados aos estudos de estabilidade.

A lei que rege estes domínios abrange os três parâmetros seguintes: velocidade de reacção, tempo e temperatura.

A ordem de reacção química determina a forma da curva concentração/tempo. Neste estudo não se faz o estudo detalhado do mecanismo das reacções químicas, por isso, o sentido de ordem aqui usado é aparente. Os perfis das curvas de concentração/tempo, na zona a que corresponde a perda de 10% do princípio activo, apresentam-se como rectas, falaremos, então, sómente de reacções de ordem zero. Uma reacção de ordem zero, tem uma constante de velocidade na forma da equação 4.1, isto é, não tem nenhuma dependência com a concentração.

$$-\frac{d(D)}{dt} = K \quad (4.1)$$

Se D é a concentração no tempo t da substância intacta então $-t$ será a quantidade do produto transformado no intervalo de tempo d e k a constante de velocidade.

Um exemplo de curva concentração/tempo para uma reacção de ordem-zero está representado na fig. 4.1.

Portanto, para uma reacção de ordem zero o perfil da curva concentração "versus" tempo é linear, com uma tangente igual a constante de velocidade (K).

A velocidade duma reacção deve ser proporcional ao número de colisões por unidade de tempo. Se o número de colisões aumenta com o aumento de temperatura, espera-se que a velocidade de reacção deve aumentar com o aumento da temperatura.

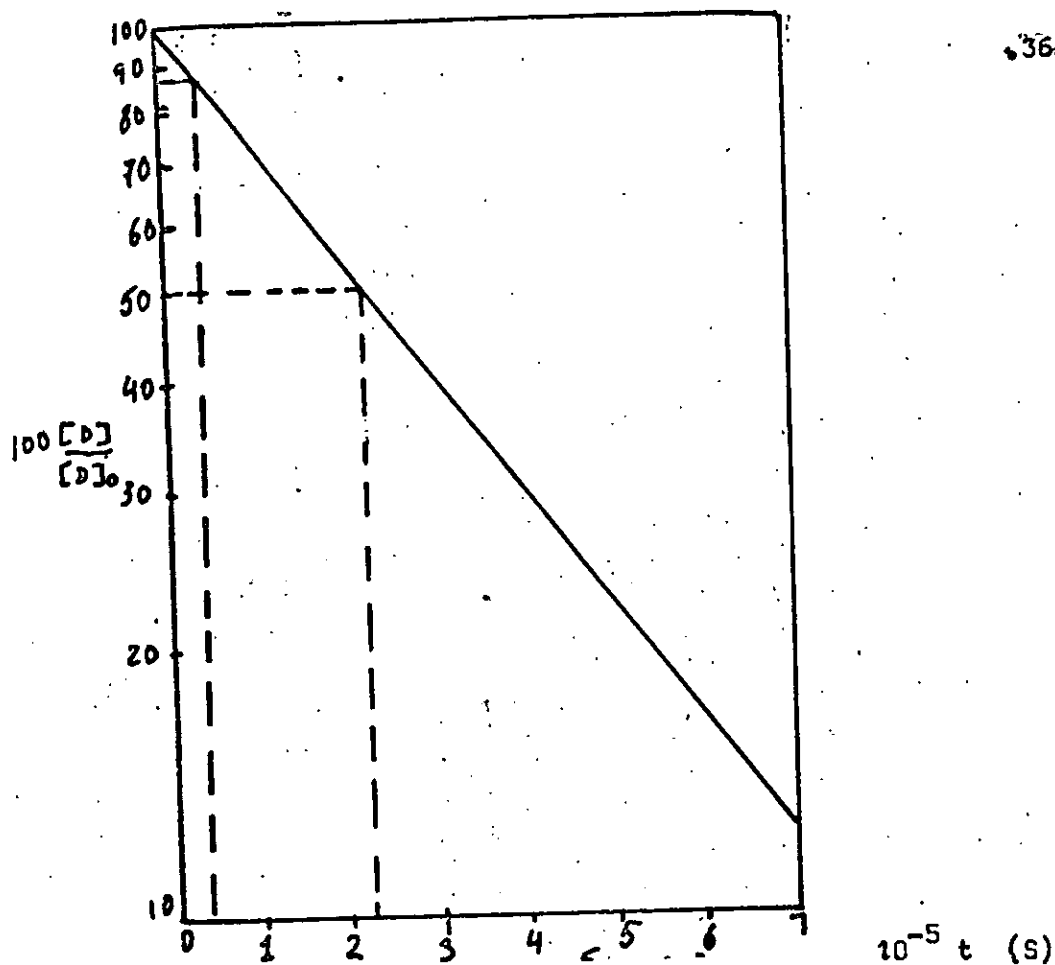


Fig.4.1 Curva de concentração/tempo para uma reacção de ordem zero. A concentração é expressa como a percentagem da concentração inicial. O tempo de meia-vida ($t_{\frac{1}{2}}$) e o tempo que leva a perder 10% do princípio activo (t_{90}) estão indicados.

Experimentalmente a constante de velocidade apresenta uma dependência exponencial em relação à temperatura:

$$K = A \cdot e^{-Ea/R} \quad (4.2)$$

Sendo K a constante de velocidade, isto é, a velocidade específica de degradação do composto estudado, R a constante dos gases perfeitos (1,987 cal./mole. $^{\circ}K$), A uma constante e Ea a energia de activação (cal.).

Esta equação, também chamada de equação de Arrhenius, (por ter sido este cientista um dos primeiros a representar as variações da constante de velocidade com a temperatura) pode ser escrita em muitas formas equivalentes:

$$\text{Log } K = \text{Log } A - \frac{E_a}{RT} \quad (4.3)$$

$$\text{Log } \left(\frac{K_2}{K_1} \right) = \frac{E_a}{2,303 R} \left(\frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2} \right) \quad (4.4)$$

Em que K_1 e K_2 são constantes de velocidade a T_1 e T_2 respectivamente.

A interpretação da energia de activação é a seguinte:

Como a reacção provém de reagentes para produtos, o sistema deve passar dum estado cuja energia é maior do que a dos reagentes iniciais. É esta energia que permite que os reagentes passem a produtos. A energia de activação é a medida desta barreira, isto é, a energia de activação é a energia necessária para fazer passar a molécula dum estado estável a um estado excitado. A equação 4.4 indica que o gráfico de $\text{Log } K/1/T$, gráfico de Arrhenius", deve ser linear com uma tangente de $-\frac{E_a}{2.303 R}$

A partir deste gráfico é possível determinar a energia de activação pela formula:

$$t_g = - \frac{E_a}{2.303 \times R} \quad (4.5)$$

Ou seja

$$E_a = -t_g \cdot 2,303 \cdot R = -t_g \cdot 4,56 \quad (4.6)$$

Utilizando a equação fundamental da teoria das velocidades absolutas de reacção e estudando a dependência da velocidade/temperatura, é possível determinar a entalpia e entropia da activação caracterizando um complexo activado. O cálculo da entropia pode ser feito a partir da relação entre constante de velocidade e entropia pela formula:

$$K = \frac{\tilde{K} \cdot T}{h} e^{\frac{\Delta S^\ddagger}{R}} e^{-\frac{\Delta H^\ddagger}{RT}} \quad (4.7)$$

Onde

\tilde{K} = constante de boltzman

T = temperatura absoluta, K

h = constante de planck

ΔS^\ddagger = Entropia no estado de transição

R = constante geral dos gases

ΔH^\ddagger = entalpia de complexo de transição.

Das equações 4.3 e 4.7 temos:

$$A = \frac{\tilde{K} \cdot T}{h} e^{-\frac{\Delta S^\ddagger}{R}} \quad (4.8)$$

Condições standards específicas são aquelas sob as quais o produto de v ser conservado, dentro das recomendações do produtor. Quando essas condições mudam, a estabilidade da droga também muda e com base na ordem de reacção obtida experimentalmente é possível estimar o tempo em que o produto leva a perder 10% do seu princípio activo, isto é, o tempo que o medicamento atinge 90% do princípio activo (90). Como já foi realçado no início deste capítulo, todas as reacções serão tratadas como sendo de ordem zero devido aos resultados obtidos experimentalmente.

Integrando a equação (4.1) de $t=0$ a $t=t$

com $(D) = (D)_0$ a $t=0$ temos:

$$\int_{(D)_0}^D -d(D) = \int_{t_0}^t K dt \quad (4.9)$$

Ou seja $D = (D)_0 - Kt$

$$t = \frac{(D)_0 - (D)}{K}$$

Onde (D) = concentração no tempo t , moles/2

$(D)_0$ = concentração a $t=0$, moles/

t = tempo, segundos

K = constante de velocidade moles/L.S.

t_{90} e $t_{1/2}$ são respectivamente:

para t_{90} $(D) = 0,90 (D)_0$

$$t_{90} = \frac{(D)_0 - 0,90 (D)_0}{K} = \frac{0,1 (D)_0}{K}$$

e para $t_{1/2}$ $(D) = 1/2 (D)_0$

$$t_{1/2} = \frac{(D)_0 - \frac{1}{2} (D)_0}{K} = \frac{(D)_0}{2K} = \frac{0,5 (D)_0}{K}$$

Na figura 1, está demonstrado como calcular o t_{90} e $t_{1/2}$ em casos óptimos.

4.1.1a. BENZILPENICILINA

Em solução aquosa, benzilpenicilina sofre hidrólise do anel B-lactâmico. A hidrólise global à temperatura constante é de ordem zero, para a perda dos primeiros 10 a 20% do princípio activo, conforme testemunham as partes lineares das curvas cinéticas. Quando a reacção continua o perfil das curvas muda fig. (4.2; 4.3, 4.4). Pensamos que avariação da forma da curva está ligada à presença do inibidor, que ao destruir-se provoca a mudança do perfil da curva. Talvez o papel de inibidor é desempenhado pela procaína que formando um complexo com benzilpenicilina bloqueia o seu centro reactivo. Segundo Kenneth A. Connors e outros a presença de procaína aumenta o tempo de meia-vida de 70 para 550 dias (10). Em prol da suposta existência deste complexo, confirma o Character das curvas cinéticas à 70°C. ambos os preparados em suspensão têm curvas cinéticas lineares no diapasão até 90% de conversão. Isso significa que a 70°C o complexo de benzilpenicilina com procaína já não existe e então não ocorre inibição. Realmente constantes de velocidade experimentais a 70°C. são maiores do que devem ser por cálculos. Por exemplo para o Lotg D 523 o valor de K_{70} calculado na base de dados é $1,8 \cdot 10^{-4}$ %s e medido na experiência é $3,0 \cdot 10^{-4}$ %s.

Devido à forma complexa das curvas cinéticas é impossível aplicar uma equação matemática conhecida para a descrição das curvas do início até ao fim. Porém todas as curvas da fig. 4.2, 4.3 e 4.4 têm um caracter linear na zona dos primeiros 10 - 20% de conversão.

Segundo as pretensões legítimas de medicina a concentração do composto fisiologicamente activo num remédio deve estar $100 \pm 10\%$. Por isso, praticamente só tem importância a redução da concentração do princípio activo num medicamento até 90% e podem ser utilizadas zonas lineares das curvas cinéticas para cálculos de constantes de velocidade e outros parâmetros cinéticos.

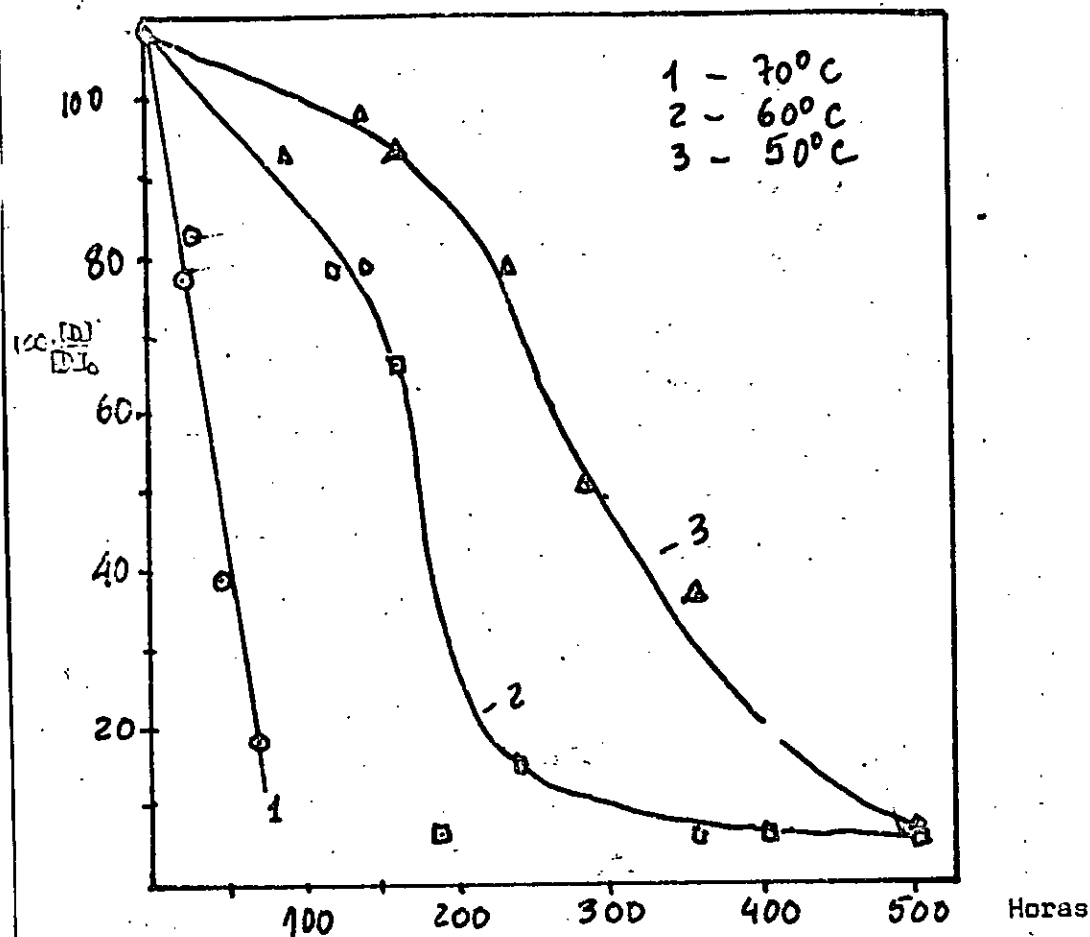


Fig. 4.2 Curvas de concentração/tempo para a reacção de degradação de Benzilpenicilina+Procaina , suspensão , lote D523

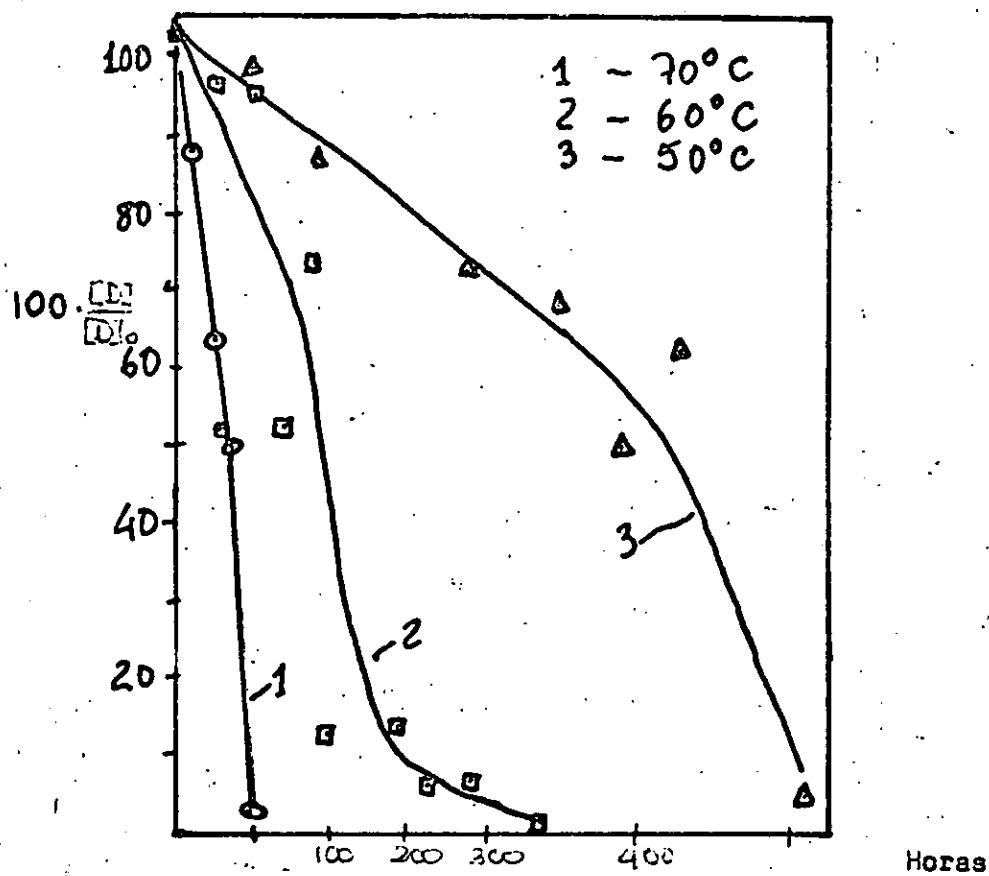


Fig. 4.3 Curvas de concentração / tempo para a reacção de degradação de Benzilpenicilina +Procaina , suspensão , lote D534

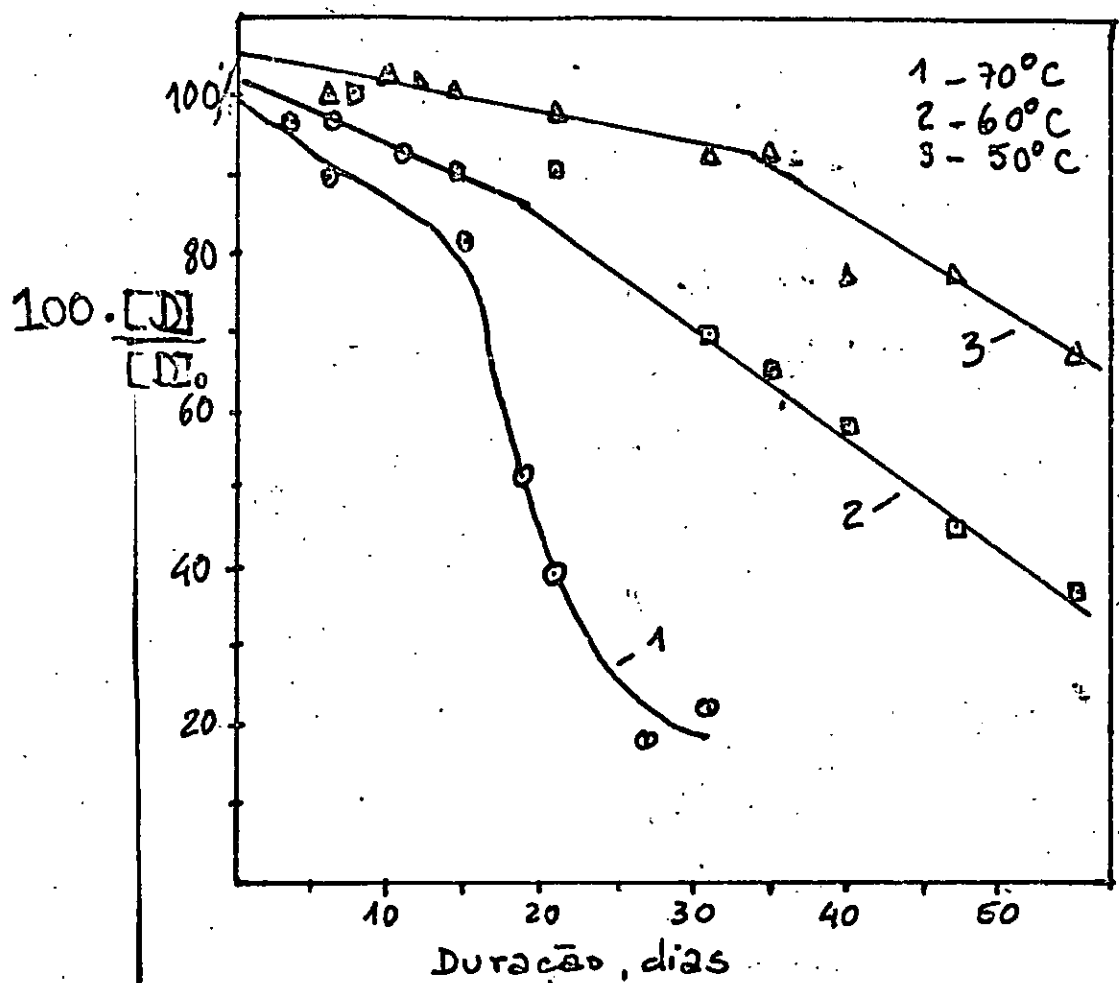


Fig. 4.4

Curvas de concentração/tempo.

Lote: 13.364 Benzilpenicilina + procaína. pó

Constantes de velocidade são calculados como tangente da recta obtida a partir da relação concentração/tempo. Analisando os dados da tabela 4.1 e curvas das Figs. 4.2, 4.3 e 4.4 é possível notar que a benzilpenicilina na forma de suspensão, reage muito mais rapidamente do que a forma de pó. Cada um dos preparados contém inibidor, mas o medicamento em pó contém pouca água. Da informação literária, sabe-se que a degradação de penicilinas acelera-se muito quando o teor de água é superior a 1% (1). Logo, o abaixamento de "K" para pó pode ser explicado por falta de agente hidrolizante - água. Praticamente reagem só moléculas que se encontram com água.

A diferença no valor de "K" (constante de velocidade) de ambos preparados em suspensão, é devido a diferença do PH. O valor mínimo da velocidade de degradação de benzilpenicilina corresponde ao PH 6,75 e cresce do lado ácido como básico. O PH em lotes D 523 é 6,12 (que é mais próximo de K mínimo) e a lote D 534 é 5,74. Segundo os dados de A. Konnors, constante de velocidade de $T = 30^{\circ}\text{C}$ no caso de D 534 deve transcender a do lote D 523, 7,9 vezes. Na nossa experiência a diferença é 1,12.

Tabela 4.1

Constantes de Velocidade (K) de Penicilinas

Medicamento	Constantes de velocidade (Mole/ .5) à temperatura			
	30°C *	50°C	60°C	70°C
Lote D 523 Suspensão	$1,80 \cdot 10^8$	$2,05 \cdot 10^7$	$5,89 \cdot 10^7$	$3,49 \cdot 10^6$
Lote D 534 Suspensão	$2,12 \cdot 10^8$	$3,84 \cdot 10^7$	$1,08 \cdot 10^6$	$4,31 \cdot 10^6$
Lote 13364 Pó	$1,22 \cdot 10^8$	$4,52 \cdot 10^8$	$7,93 \cdot 10^8$	$1,38 \cdot 10^7$

* Foram calculadas por interpolação das curvas de Arrhenius.

Para calcular energias de activação do processo de degradação foram construídas de Arrhenius utilizando os valores de log K contra inverso de temperatura. Fig. 5.

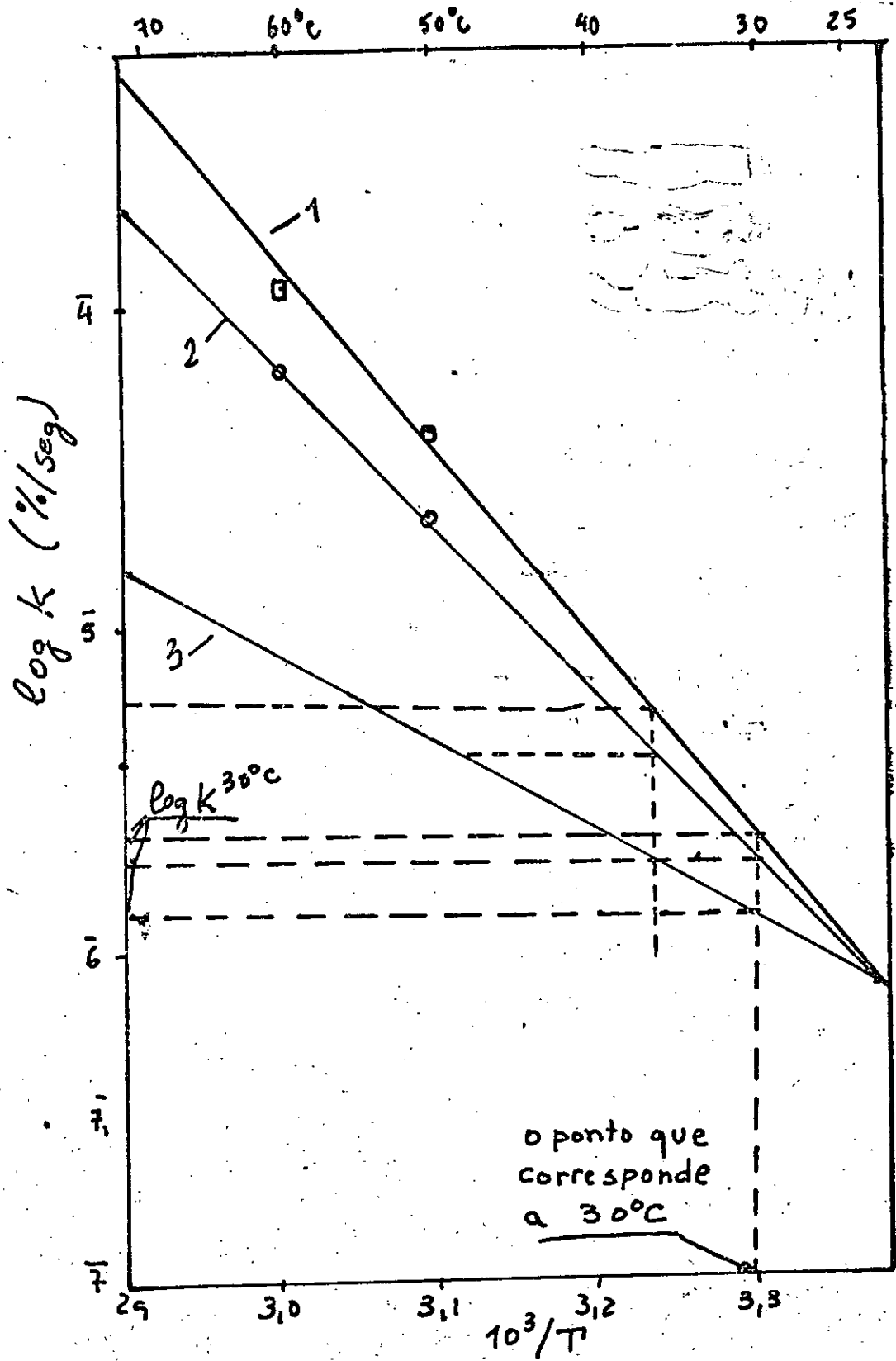


Fig. 4.5 Gráfico de Arrhenius para Penicilinas.
1- lote D-534, 2-lote D 523, 3- lote 13364

A característica destas curvas são rectas. Por extrapolação é possível deduzir a constante de velocidade à temperaturas de armazenamento por exemplo à 25°C → K_{25} .

Na tabela 4.2 estão reportadas as energias de activação para benzilpenicilinas. Como se pode ver a energia de activação para benzilpenicilinas estão mais altas do que as reportadas na bibliografia para suspensões aquosas de benzilpenicilina (21-22/ccal/mole A PH 4,5 e 9,5 e 18/ccal/mole a 6,75). Este aumento em energia de activação pode ser explicado pela presença do inibidor (procaína) em medicamentos investigados. Para destruir o complexo formado com benzilpenicilina é preciso uma energia excessiva.

Tabela 4.2

Parametros cinéticos da reacção de degradação de penicilinas

Medicamentos	Coefficiente de Temperaturas	Energia de Activação kcal/mole	Entropia de Actividade* joule/mole.°K	Tempo de perda de 10% de actividade a 30°C ± 90 dias
Lote D 523	3,0	97.0	+ 60	65
Lote D 534	3,4	113.0	+ 126	51
Lote 13364 (1 Pó)	1,8	51.6	- 92	93

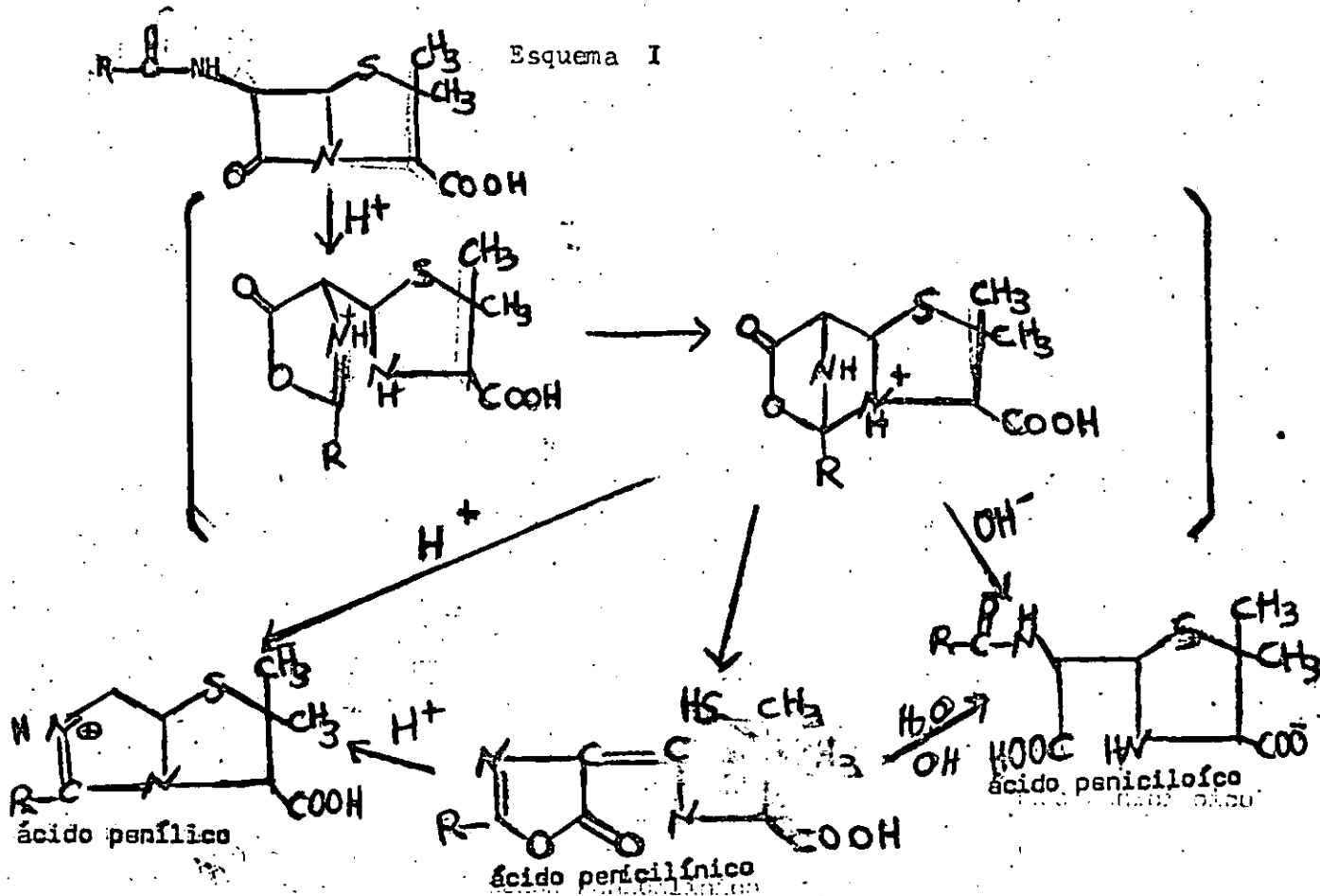
* Foi calculado à temperatura de 50°C.

Comparando os valores de ΔH^\ddagger e ΔS^\ddagger de benzilpenicilinas calculados com base na equação 4.3 que estão representados na tabela 4.4, podemos afirmar que na forma de suspensão prevalecem os processos dissociativos devido aos valores altos de ΔH^\ddagger e altos de ΔS^\ddagger . Aqui é possível concluir que a etapa limitante da reacção de degradação ocorre a dissociação da ligação C-N na molécula de benzilpenicilina com a formação de um ião intermediário (1 ou 2 no esquema II). Ocorre uma reacção monomolecular. Pelo contrário, o processo de degradação em pó caracteriza-se pela entropia de activação negativa e tem entalpia de activação relativamente baixa. Este facto indica ordenação alta do estado de transição que pode ser o resultado do mecanismo bimolecular quando a cisão da ligação velha e a formação da ligação nova ocorrem sincronizados. Tendo em vista a falta de água no estado seco do medicamento, podemos observar que a etapa limitante na forma de pó é a protonização de benzilpenicilina que exige a ordenação alta do estado de transição.

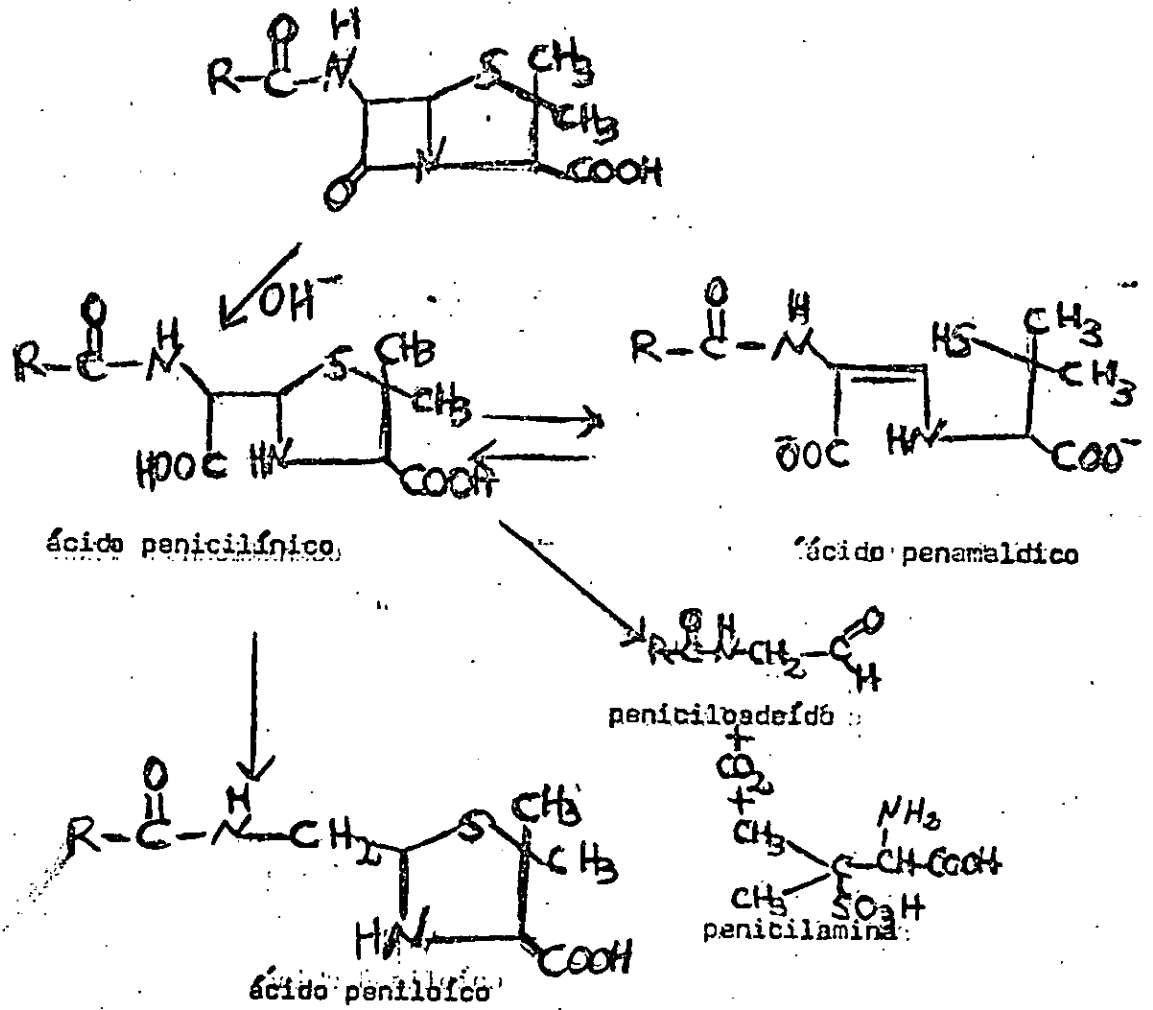
Todos os produtos de degradação de benzilpenicilina resultam de rotura do anel β -Lactâmico. Dependendo das condições de reacção podem ser formados uma variedade de produtos.

Durante o período de conservação o processo de degradação ocorre segundo o esquema I. A análise da cromatografia em camada fina (veja fig. 4.7) ilustra este facto ao revelar 2 produtos de degradação. Como o ácido peniciloico e o ácido penicilínico têm 2 grupos carboxílicos, podem ter a mesma adsorção, pois eles aparecerão com o mesmo Rf. O outro produto de degradação com a mobilidade mais alta deve ser o ácido penicilénico. Em prol da formação do ácido peniciloico, diz a diminuição gradual do PH da suspensão de penicilina durante a degradação. Por exemplo para o lote D 523, às concentrações de 98.0, 76.5, 38.6 e 18.2%, corresponde o PH de 6.12, 5.89, 5.75 e 5.50, respectivamente, o que é sinónimo de uma grande concentração de ácidos, facto este que permite uma variação sensível do PH, se atendermos de que as penicilinas são tamponadas. Na tabela 4.2 estão reportados os resultados cinéticos experimentais das penicilinas. Pelo perfil das curvas (fig. 4.2, 4.3 e 4.4) é impossível extrapolar ou calcular o tempo de meia-vida.

Informações de fontes bibliográficas, dizem-nos que os $t_{1/2}$ à PH 6.75, 6.5 e 6.1 são respectivamente 38, 220 e 550 dias respectivamente. O aumento de estabilidade é devido predominantemente à baixa solubilidade do sal e a hidrólise da penicilina pode ocorrer somente quando a penicilina está em solução.



Esquema II



O processo representado pelo esquema I, corresponde ao de degradação durante o processo de análise quantitativa pelo método iodométrico.

Com base na equação 4.8 foram calculados os valores de t_{90} para Benzilpenicilinas. Os resultados revelam que o t_{90} para uma região de $30 \pm 5^{\circ}\text{C}$ varia de 33 a 125 dias para a formulação em suspensão (lote D 523) e de 33 a 133 dias para o pó (lote 13364) respectivamente. Portanto, a variação de $\pm 5^{\circ}\text{C}$ pode afectar muito a estabilidade da droga principalmente para a forma em suspensão, que sem contestações é a forma mais instável. Por outro lado, verifica-se que à temperaturas mais baixas (25°) o t_{90} pouco difere entre as duas formas (cerca de 8 dias). Podemos, então aconselhar que a conservação de Penicilina com procaína nas duas formas estudadas seja feita à temperaturas inferiores à 20°C .

Na tabela 4.2 estão reportados os resultados cinéticos experimentais das penicilinas. Pelo perfil das curvas (Fig. 4.2, 4.3, 4.4) é impossível extrapolar ou calcular o tempo de meia-vida. Informações de fontes bibliográficas dizem que os tempos de meia-vida à pH 6,75; 6,50 e 6,10 são respectivamente 38, 220 e 550 dias. O aumento de estabilidade é devido predominantemente à baixa solubilidade do sal e a hidrólise da penicilina ocorre só quando ela encontra-se em solução.

4.1.2.

CLORTALIDONA

A Clortalidona encontra-se na forma de comprimidos. Além das reacções de oxidação que pode sofrer devido ao contacto com o ar, esta de pouca importância porque o medicamento encontra-se embalado, outras fontes de alteração é formada pela temperatura e humidade, factores estes que podem ser condicionados. Por isso para formulações em comprimidos e cápsulas fez-se também o estudo da influência da humidade na degradação dos medicamentos na forma sólida, além da temperatura.

Os perfis das curvas concentração/tempo demonstra que a perda do princípio activo em 10% corresponde a reacção de ordem zero, facto este que é testemunhado pelas linhas rectas das curvas cinéticas fig. 4.8, 4.9 e 4.10

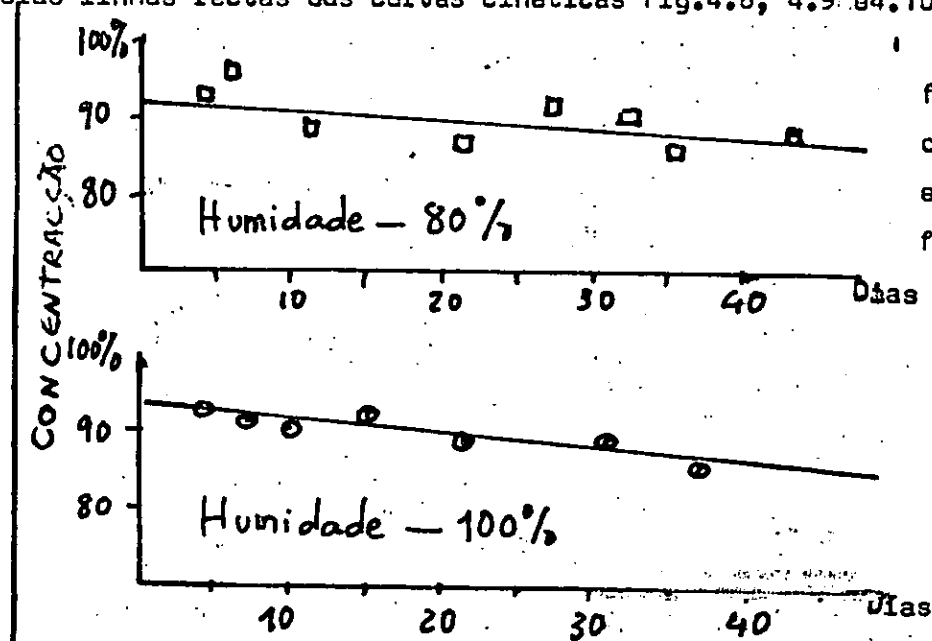


fig. 4.8 Curvas concentração/tempo de clortalidona em comprimidos à 50°C e diferentes humidades

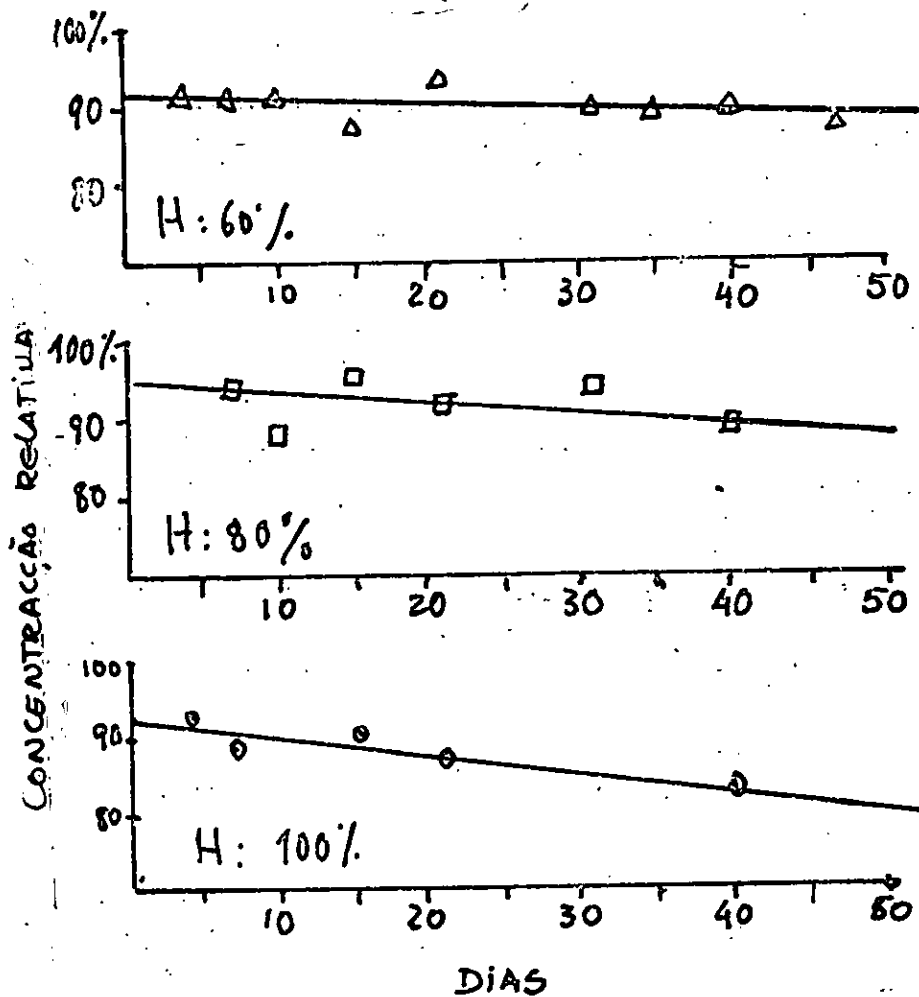


Fig. 4.9 Curvas de concentração/tempo de Clortalidona em comprimidos à 60°C e diferentes humidades .

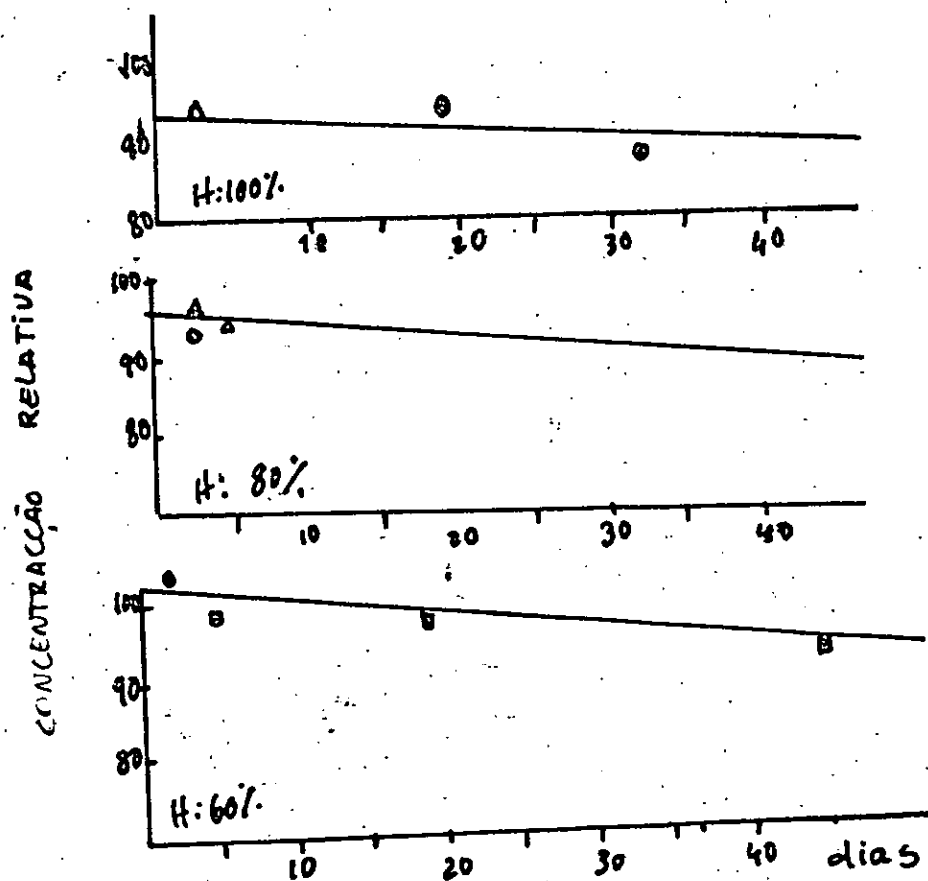


Fig. 4.10 Curvas de concentração/tempo de Clortalidona à 70°C e diferentes humidades

A energia cinética e a entropia à temperatura de 30°C e humidade relativa de 80% são 7,8 Kcal/mole e - 267 /mole respectivamente. A energia cinética é calculada a partir da curva de Arrhenius (fig. 4.11). O valor baixo de entropia revela-nos a existência dum complexo de alta ordenação, antes da reacção com água.

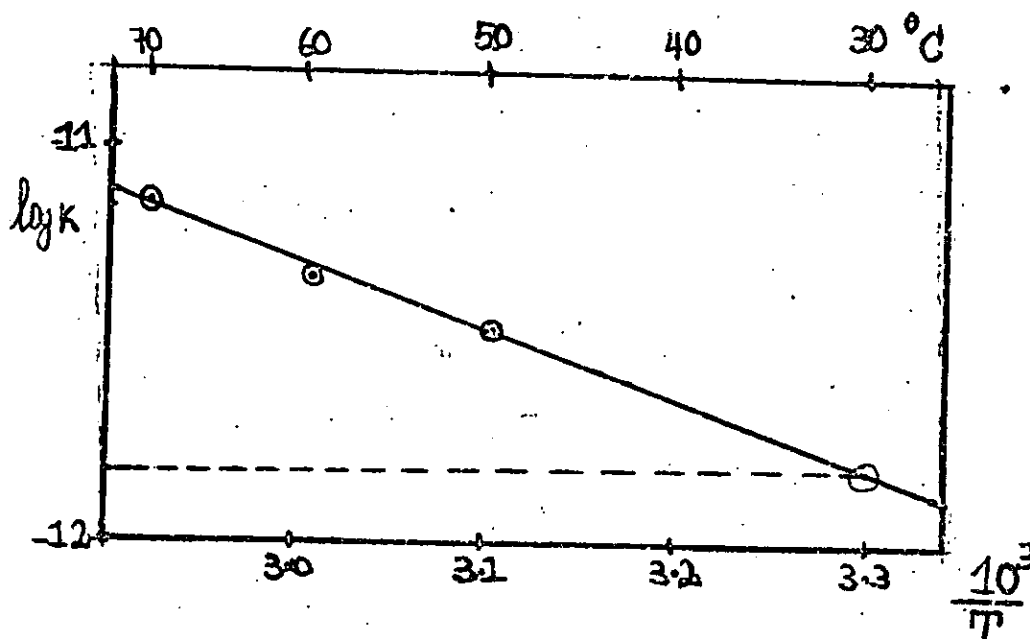


Fig. 4.11 Gráfico de Arrhenius para a humidade relativa de 80%.

O tempo relacionado com a perda de 10% do princípio activo (90) num campo de 25° a 35° e humidade relativa de 80% diminui de 286 dias a 180 dias respectivamente:

$$\begin{array}{ll} k^{25}_{80\%} = 1,2 \cdot 10^{12} & 90 = 286 \text{ dias} \\ k^{30}_{80\%} = 1,5 \cdot 10^{12} & 90 = 227 \text{ dias} \\ k^{35}_{80\%} = 1,82 \cdot 10^{12} & 90 = 180 \text{ dias} \end{array}$$

Como se pode verificar a variação de 5°C provoca uma redução de cerca de 50 dias, na estabilidade da droga.

Infelizmente não existem dados bibliográficos para comparar estes resultados.

A análise da cromatografia em camada fina, nunca revelou a existência de produtos de degradação. As possíveis explicações disto podem ser talvez que a quantidade recomendada para depositar e a sua concentração é muito pequena ou então o método não é tão específico para revelar pequenas quantidades do produto de degradação. A ausência de um padrão deste produto não permitiu confirmar nenhuma das hipóteses.

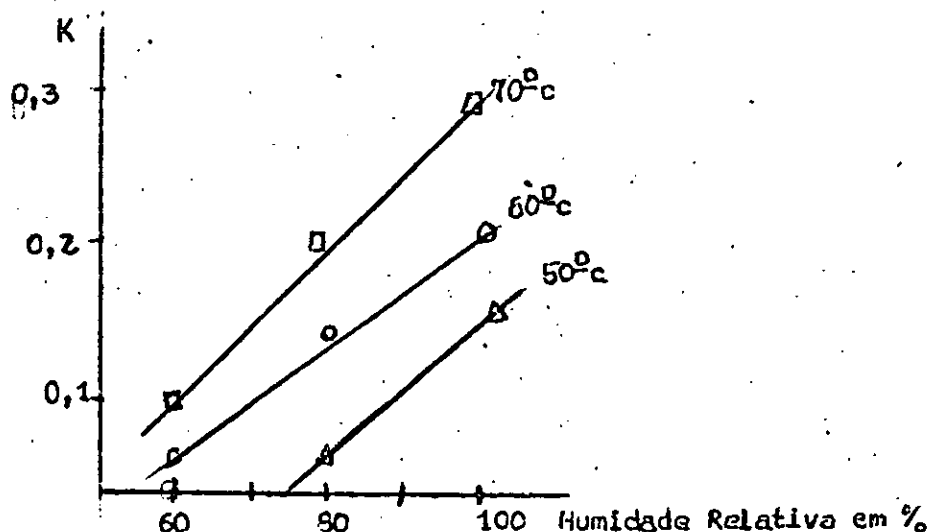


Fig. 4.11

Gráficos das constantes de velocidade/humidade dos comprimidos de clortalidona.

O perfil das curvas constantes de velocidade de degradação em relação à humidade (fig. 4.11) é linear. Deste modo, é possível construir a partir desta fig. a equação matemática da recta, em que K é a constante de velocidade, A é a uma constante, b é a tangente e H - A humidade, donde

$$K = A + BH \quad (4.10)$$

Deste modo, associando as equações 4.9 e 4.10 à uma temperatura dada, pode-se calcular t_{90} para qualquer humidade, por exemplo à 30°C a forma é a seguinte:

$$t_{90} = \frac{0,1 (0)_0}{K} = \frac{0,1(0)_0}{A+BH} = \frac{0,1 (0)_0}{-0,018+7,89 \cdot 10^{-4} H}$$

Exerce grande influência na estabilidade da clortalidona, porque pela equação 4.9 podemos ver que:

$$K^{70^\circ} = 0,2 + 0,005H$$

$$K^{60^\circ} = 0,19 + 0,004H$$

$$K^{50^\circ} = 0,27 + 0,0045H$$

$$\text{e } K^{30^\circ} = 0,018 + 0,000789H$$

Portanto quanto maior for a temperatura menor é a humidade, para o desencadeamento da reacção de hidrólise.

4.1.3 CLORANFENICOL

Cloranfenicol também foi submetido à temperatura de 70, 60 e 50°C e humidade relativa de 100, 80 e 60 %. durante 60 dias : o ensaio quantitativo não revelou alteração significativa (nos limites do erro de experiência do princípio activo.

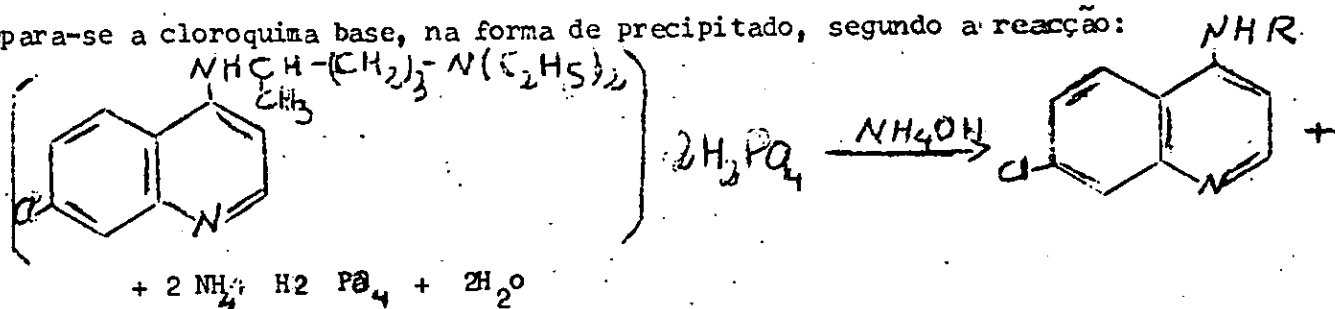
Baseando-nos nestes resultados e coeficientes de temperatura de Clortalidona que está numa forma semelhante , é possível prognosticar que durante 165 dias no mínimo , Cloranfenicol em cápsulas não sofre nenhuma degradação à 30°C.

4.2. MODIFICAÇÃO DO MÉTODO DE ANÁLISE DA CLOROQUINA

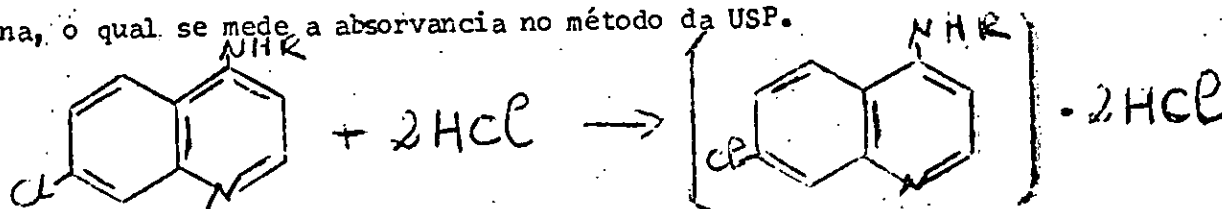
Para dosar a cloroquina nas formulações farmacêuticas, existem vários métodos analíticos. A farmacopeia Britânica de 1980 11 por exemplo recomenda o método volumétrico. Porém, a S. Pharmacopeia 18 faz a descrição do método espectrofotométrico. Em ambos os métodos a cloroquina base é extraída com cloroformio num meio básico, e depois tratada com ácido clorídrico e o excesso de ácido titulado com hidróxido de sódio ou medida a absorvância da solução ácida a 343 nm e fazendo o calculo mediante um padrão.

O princípio em ambos os métodos é o seguinte:

A partir da solução aquosa do sal de cloroquina, e na presença dum alcali, separa-se a cloroquina base, na forma de precipitado, segundo a reacção:



Posteriormente em meio de ácido clorídrico forma o dicloreto de cloroquina, o qual se mede a absorvancia no método da USP.



No método volumétrico faz-se a titulação do excesso do ácido com hidróxido de sódio. É uma titulação ácido-base.



Sem dúvida que o método espectrofotométrico é melhor. É mais específico e mais directo, que além de ser mais exacto, rápido e cómodo, não exigindo a calibração das soluções.

Por esta razão, para a análise quantitativa de alguns preparados de cloroquina em vários armazéns de Maputo foi utilizado nomeadamente, o método espectrofotométrico.

4.2.1 ANÁLISE QUANTITATIVA DA CLOROQUINA, UTILIZANDO
O MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO

Fôram pesados e pulverizados 20 comprimidos contendo cerca de 250 mg de fosfato de Cloroquina. O pó equivalente a 800 mg foi pesado e transferido para um balão volumétrico de 200 ml adicionado 100 ml de água destilada e agitado mecanicamente durante 20 minutos. Após este tempo preencheu-se com água destilada até à marca, foi misturado e filtrado, despresando os primeiros 50 ml do filtrado. Depois foram retirados 50 ml adicionados 5 ml de NH_4OH , 6N e extraído 5 vezes com porções de 25 ml de CHCl_3 . Os extractos de clorofórmio combinados foram evaporados num rotavapor "RE 120 Büchi" até cerca de 10 ml, adicionou-se em seguida 50 ml de ácido clorídrico (1:250) e mediante aquecimento evaporou-se o resto de clorofórmio.

O extracto dissolvido em ácido clorídrico foi transferido para um balão volumétrico de 200 ml e com ácido clorídrico completou-se até ao volume. 10 ml desta solução foram diluídos até 100 ml e desta última 10 ml foram diluídos até 100 ml com ácido clorídrico (1:1000).

Como padrão utilizou-se o Difosfato de Cloroquina, substância pura de referência pesando exactamente 9,78 mg que foram dissolvidos em ácido clorídrico diluído (1:1000) e 10 ml desta solução foram diluídos até 100 ml com o mesmo ácido. Tanto para o padrão como para amostra determinou-se a absorvância à 343 nm, usando uma cuvete de quartzo de 1cm e ácido clorídrico como branco.

A quantidade de Difosfato de Cloroquina, em percentagem na porção tomada para análise foi feita com base na fórmula seguinte:

$$C \% = \frac{80 \cdot C_p \cdot A_a \cdot \bar{P}_a}{A_p \cdot P_a \cdot C_d} \cdot 100 \quad (4.11)$$

sendo:

C_p = concentração do padrão, mg/ml;

A_p = absorvância do padrão;

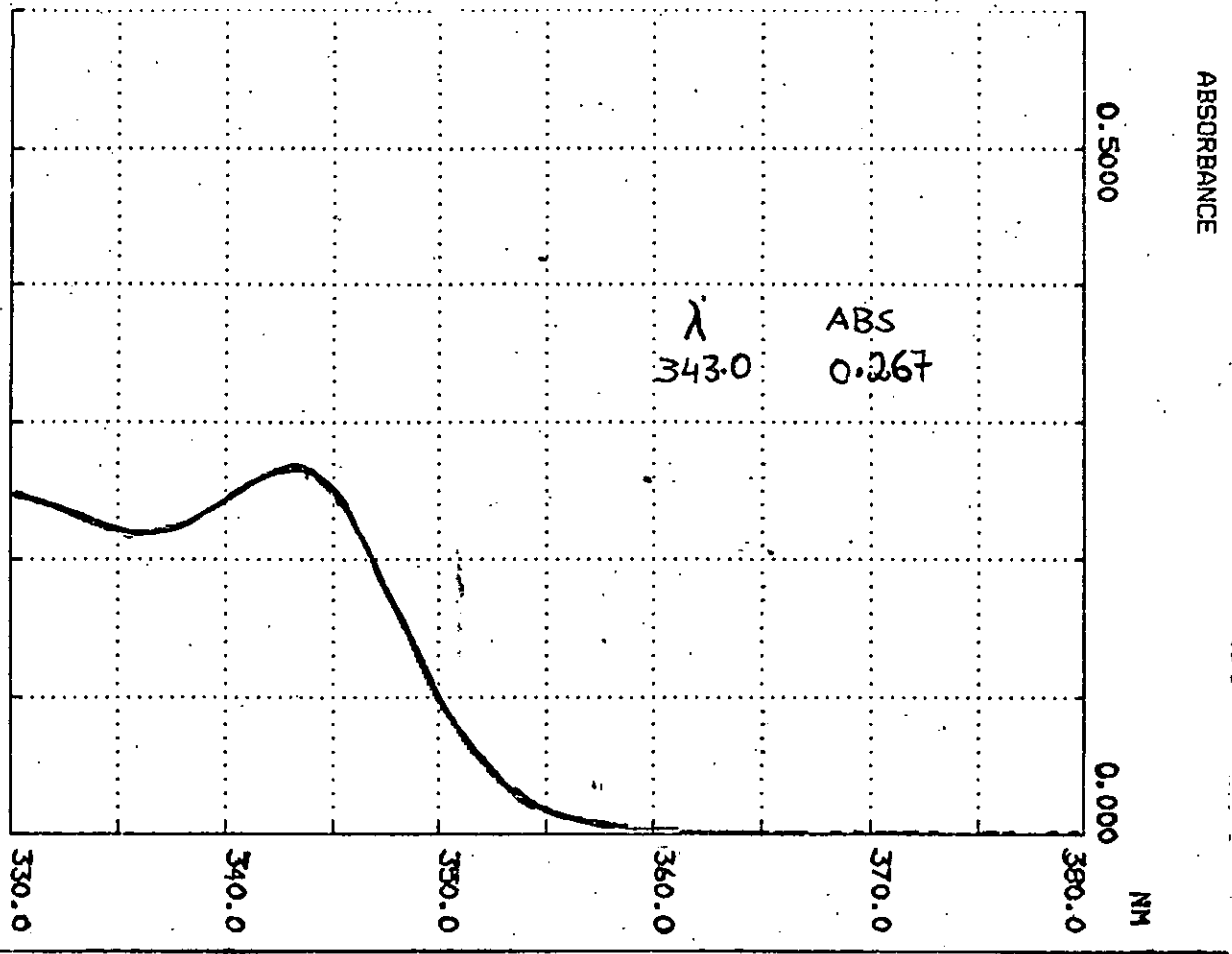
A_a = " da amostra;

\bar{P}_a = peso médio dos comprimidos, g

P_a = " da amostra tomada para análise, g

C_d = conteúdo do princípio activo declarado por comprimido, mg

80 = facto da U.S.P.



Espectro nº 3 , espectro da Cloreto de Cloroquina

É necessário notar que o método da farmacopéia americana é universal para várias formas de sais de cloroquina. Todos os sais tanto o fosfato como o sulfato transformam-se finalmente em cloretos de cloroquina cuja absorvância se mede. Com o objectivo de evitar perdas durante a extracção, gastos de solvente e constante uso de padrão, é possível modificar o método espectrofotométrico da farmacopéia americana, numa forma mais simples, sem extracção e menos morosa. Os resultados de análise (tab.4.3 e seguintes) e estudo estatístico destes resultados, testemunham que o método modificado é muito preciso.

No método modificado foi pesado pó equivalente a 200 mg de Difosfato de Cloroquina que foram extraído com HCl diluído (1:1000) e posteriormente diluído com o mesmo ácido até obter-se uma concentração final de 10 ug/ml de Difosfato de Cloroquina. (veja espectro nº 4)

O cálculo em percentagem, na porção tomada para análise foi feito com base na fórmula:

$$C\% = \frac{A_a \cdot F \cdot \bar{P}_a}{A(1\%, 1\text{cm}) \cdot P_a \cdot C_d} \cdot 100 \quad (4.12)$$

onde:

A_a = absorvância da amostra

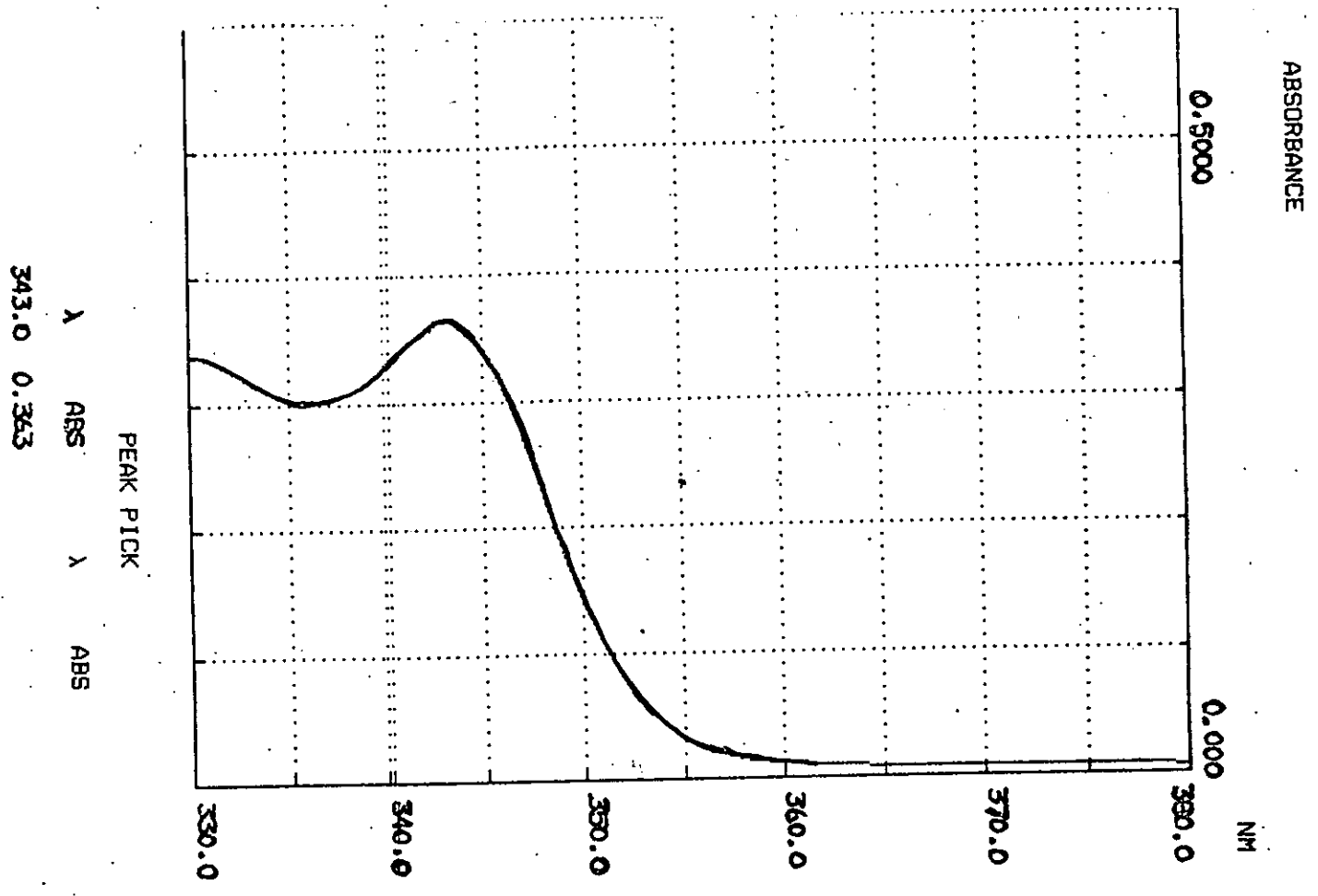
F = factor de diluição

\bar{P}_a = peso médio dos comprimidos, g.

P_a = " da amostra tomada para análise, g

C_d = conteúdo do princípio activo declarado por comprimido, mg

$A(1\%, 1\text{cm})$ = absorvância específica (371)



Esp. nº 4 , espectro de fosfato de cloroquina

4.2.2. RESULTADOS DE ANÁLISE DOS DOIS MÉTODOS

Para o estudo da técnica de análise, foi escolhido um lote recém-importado, existente na altura na central de medicamentos e no armazém Filipe Samuel Magaia. As condições deste armazém são muito precárias e se não pode ser dispensado ao menos que se faça a sua recuperação, pondo estrados, reparando as paredes e numa melhor organização das caixas. No armazém Filipe Samuel Magaia encontramos embalagens de cloroquinas espalhadas pelo chão, algumas já abertas, e foi feita a recolha aleatória das embalagens das caixas e das embalagens espalhadas pelo chão (abertas) para uma avaliação sobre a degradação do medicamento devido as condições de armazenamento. Os resultados de análise obtidos com estas amostras estão apresentados na tabela 4.3.

Tabela 4.3

Comparação dos resultados de análise
do método da USP(I) e modificado (II).

UNIDADE SANITÁRIA		Conteúdo em difosfato de cloroquina em %		Valor médio % X = —		Desvio-Padrão %	
		I	II	I	II	I	II
Central de Medicamentos de Maputo		100,4	100,7	100,1	101,3	1,2	0,8
		98,9	100,4				
		100,2	101,1				
		99,6	102,1				
		101,4	102,4 101,2				
Armazém Filipe Samuel Magaia	Embalagem fechada	100,1	101,6	101,1	102,2	0,9	0,9
		101,6	102,3				
		101,6	103,4				
	Embalagem aberta	101,7	100,0	100,7	100,9	1,0	1,0
		99,7	101,4				
		100,6	101,5				

Pelos valores do desvio padrão verificamos que o método II não difere muito do método I.

4.2.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS

4.2.3.1. Distribuição de student.

Admitimos que os erros, neste caso, seguem a lei de distribuição de student, porque $n < 30$. Então o conteúdo mais provável deve ser igual a

$$\bar{X} \pm \sigma_m \cdot t \quad (4.13)$$

\bar{X} - é o valor médio do conteúdo, em %,

σ_m - é o desvio - padrão, em %

t - é o t de student.

σ_m é o desvio - padrão médio, também chamado erro - padrão da média ou desvio médio. Geralmente, ao tratar com um dado conjunto de n dados é usual calcular a média \bar{X} e escrevê-la na forma $\bar{X} \pm \sigma_m t$ em que $\sigma_m = \sigma/\sqrt{n}$. Esta grandeza afecta a média e dá-nos a precisão dum conjunto de medidas.

O valor do parâmetro t pode tirar-se das tabelas compiladas por Fischer, sendo o valor válido para um determinado número de medições e para uma dada probabilidade, que vulgarmente em química analítica se toma como igual a 95%.

Tabela 4.4

Valores de distribuição de student

UNIDADE SANITÁRIA	$\sigma_m \cdot t$		$\bar{X} \pm \sigma_m \cdot t$		Erro relativo %	
	I	II	I	II	I	II
Central de Medicamentos	1,2	0,8	100,1 + 1,2	101,3 + 0,8	1,2	0,8
Armazém Filipe Samuel Nagala	2,5	1,4	101,1 + 2,4	102,2 + 1,2	2,5	1,4
		1,6	100,7 + 2,5	100,9 + 1,1	2,5	1,6

Com os resultados obtidos, pode-se afirmar que a precisão para uma probabilidade de 95% é melhor para o método II, porque o valor de $\sigma_m t$ e o erro relativo são menores. A precisão ou reprodutibilidade do resultado, relativo a um dado conjunto de medidas e para um dado valor de n , informa-nos dos erros fortuitos ou acidentais, e é tanto maior quanto menor for o valor $\sigma_m t$.

Por exemplo para o método modificado e dentro dos resultados da Central de Medicamentos o valor médio tem 95% de probabilidade de se encontrar entre os limites da equação 4.13.

$$\text{Isto é: } 101,3 \pm \frac{0,8 \cdot 2,57}{\sqrt{6}}$$

Ou seja entre os valores 100.5 e 102.1, o que conduz a um erro relativo no conteúdo de:

$$\frac{\sigma_m \cdot t}{101,3} \cdot 100 = + 0,83\%$$

Atendendo a que σ_m dá-nos o erro de que vem afetado um dado resultado isolado, pode-se verificar que um resultado cujo valor fosse de 99,8% seria considerado aberrante e se despresaria, isto é, este resultado tem a probabilidade de ser deficituoso. Este valor σ_m dá-nos também o valor mais pequeno que se pode detectar como sendo diferente de zero.

4.2.3.2. COMPARAÇÃO DOS VALORES MÉDIOS

Pode-se verificar se os valores médios obtidos por dois ou vários métodos diferentes na análise duma mesma substancia são coincidentes ou não. Por métodos diferentes entende-se que diferem realmente (por exemplo volumetria e espectrofotometria) ou que varia um dos factores dum dado método (por exemplo, dosesamentos identicos efectuados por operadores diferentes.

A comparação dos valores médios entre os métodos, faz-se na base da diferença entre os valores médios.

(4.14)

$$d = (X_I - X_{II})$$

II são:

$$\sigma_{mI} = \frac{\sigma_I}{\sqrt{n_I}} \quad \text{e} \quad \sigma_{mII} = \frac{\sigma_{II}}{\sqrt{n_{II}}}$$

Pelo que a diferença entre os valores médios tem um desvio médio $\sigma = \sqrt{\sigma_{mI}^2 + \sigma_{mII}^2}$. Dado que o número de análises é inferior 30 portanto os erros seguem a distribuição de student, vem para o valor da diferença e os seus limites de erro:

$$(\bar{X}_I - \bar{X}_{II}) \pm \sqrt{\sigma_{mI}^2 + \sigma_{mII}^2} \cdot t$$

(4.15)

Para que $X_I - X_{II}$ não tenha significado é preciso que esta diferença esteja englobada nos erros acidentais dados por $\pm \sqrt{\sigma_{mI}^2 + \sigma_{mII}^2}$ então se $t \sqrt{\sigma_{mI}^2 + \sigma_{mII}^2} < d$ a diferença entre $X_I - X_{II}$ não tem significado e os dois métodos coincidem. Para compreender facilmente esta comparação pode determina-se o valor:

$$\frac{d}{\sqrt{\sigma_{mI}^2 + \sigma_{mII}^2}} \quad (4.16)$$

que pode ser chamado t_{exp} e se $t_{exp} > t$ os dois métodos não diferem, acontecendo o contrario quando $t_{exp} < t$, sendo o valor de t determinado a partir da tabela de Fischer para $N = (R_I - 1) + (R_{II} - 1)$ e para um dado valor escolhido de probabilidade que geralmente é 95%.

Ex:

Da tabela 3 temos

UNIDADE SANITÁRIA	Nº.de Doseamento	Método I	Método 2
Central de Medicamentos de Maputo	1	106,4	100,7
	2	98,9	100,4
	3	100,2	101,1
	4	99,6	102,1
	5	101,4	102,4
	6		101,6

$$= 5$$

$$II = 6$$

$$X = 100,1$$

$$X_{II} = 101,3$$

$$= 1,2$$

$$= 0,8$$

$$\sigma^2 = \frac{3,48 + 3,15}{9} = 0,73$$

$$\sigma = \sqrt{0,37 \left(\frac{1}{6} + \frac{1}{5} \right)} = 0,52$$

$$t_{exp} = \frac{101,3 - 100,1}{0,52} = 2,3$$

$$N = (6 - 1) + (5 - 1) = 9$$

Da tabela de Fischer para $P = 0,05$ e $N = 9$

$$\text{vem } t = 2,26 = 2,3$$

$t_{exp} = t$ tabelado.

Deve considerar-se que os dois métodos têm mais que 95% de probabilidade de serem idênticos.

A comparação dos valores médios entre os métodos I. e II estão representados na tabela 4.5.

Tabela 4.5

Comparação dos valores médios

UNIDADE SANITÁRIA	$d = (X_{II} - X_I)$	σ^2	$\frac{d}{\sigma} = t_{exp}$	t tabelado	
Central de Medicamentos	1,2	0,73	2,30	2,26	
Armazém Filipe	caixa fechada	1,1	0,61	2,57	2,57
Samuel Magaia	caixa aberta	0,2	0,99	0,20	2,57

Por esta tabela ve-se que em todos os casos tem $t_{exp} < t$ isto significa que os dois métodos têm mais que 95% de probabilidade se serem iguais. Neste caso admitimos que os dois métodos coincidem e por isso é possível calcular os valores médio de toda a população, que podem ser vistos na tabela 4.6.

Tabela 4.6

Valores médios de toda a população

UNIDADE SANITÁRIA	Valor médio em %	σ_{n-1}	$\sigma_m \cdot t$	
Central de Medicamentos	100.8	1,02	0.69	
Armazém Filipe Samuel	caixa fechada	101.7	0,98	0.92
Magaia	caixa aberta	100.9	0.81	0.74

4.2.3.3. CALCULO DA EXACTIDÃO DO MÉTODO

Quando se estabelece um novo método é preciso verificar a sua exactidão comparando os valores obtidos com os conhecidos através de métodos bem conhecidos para a mesma amostra.

Assim designemos por X o valor analítico conhecido e por \bar{X} a média de N valores obtidos com o novo método, para a mesma amostra.

Começando por calcular a diferença $d = X - \bar{X}$ é possível verificar o erro de que vem afectada esta diferença. Para isso começa-se por calcular o desvio padrão relativo à dispersão dos valores X_1, \dots, X_n , em relação à média, e depois o erro de que vem afectada a média $\sigma_m = \frac{\sigma}{\sqrt{n}}$. Então o desvio $d = |X - \bar{X}|$ vem afectado do erro $\pm \sigma_m \cdot t$ pelo que se $\sigma_m \cdot t < |X - \bar{X}|$ pode afirmar-se que não se obtêm erros sistemáticos apreciáveis com o novo método.

Por exemplo consideramos 100,1 (valor médio do método I) como sendo X, já que este valor foi obtido a partir dum método comprovado.

$$d = |X - \bar{X}| = 100,1 - 101,3 = 1,2$$

$$\sigma_m = \frac{\sigma}{\sqrt{n}} = \frac{0,8}{\sqrt{6}} \approx 0,32$$

d vem afectado de erros 10.8.

Então $\sigma_m \cdot t < |X - \bar{X}|$ para uma probabilidade de 0,05 e pode-se afirmar que para esta análise obtêm-se erros sistemáticos apreciáveis, quer dizer que os dois métodos conduzem a resultados diferentes, havendo um erro total igual a $d = 1,2$.

Na tabela 4.7 estão representados os valores do cálculo da exactidão do método II, para as outras unidades sanitárias.

Tabela 4.7

Valores do cálculo da exactidão para o método II

UNIDADE SANITÁRIA		$d = X - \bar{X} $	$\sigma_m \cdot t$
Central de Medicamentos		1,2	0,8
Armazém Filipe	caixa fechada	1,1	1,4
S. Magaia	caixa aberta	0,2	1,6

Exceptuando o caso da central de medicamentos, os outros resultados permitem concluir que os dois métodos conduzem a resultados idênticos, portanto os erros sistemáticos e acidentais não são significativos.

4.2.3.4 Cálculo do número de doseamento a fazer para uma dada precisão.

Dum modo geral, quanto maior é o número de doseamentos que se faz, melhor é a precisão dum conjunto de medidas, portanto do resultado obtido. Na prática, há interesse em reduzir tanto quanto possível o número de doseamentos para reduzir ao mínimo o trabalho experimental.

Deste modo, constantemente surge a questão: Quantos doseamentos é possível efectuar para obter um resultado que tenha, por exemplo 95% de probabilidade de estar afectado por um dado valor de erro.

Supondo que numa primeira tentativa obteve-se $n=6$ doseamentos, que nos permitem calcular o desvio-padrão, e que se fixa a precisão a atingir. Por exemplo estabelecemos que o erro não deve ser superior a γ , sabe-se que:

$$\gamma = \frac{\sigma}{\sqrt{n}} \cdot t \quad (4.17)$$

E para uma probabilidade de 0,95 o valor de t na tabela de Fischer tem aproximadamente o valor 2 pelo que $n = \left(\frac{2\sigma}{\gamma}\right)^2$ com o valor de n , recalcula-se o desvio-padrão e refazem-se os cálculos para o número de determinações. Tem-se então que fazer n_2 experiências de tal modo que;

$$n_2 = n - n_1 \quad (4.18)$$

ex: para análise de amostra de central de medicamentos conduziu a $n=6$ e $\sigma=0,8$ as análises a efectuar para que o erro de que vem afectado o valor médio não ultrapasse 1,32 com uma probabilidade de 95 % será:

$$n = \left(\frac{2 \cdot 0,8}{1,32}\right)^2 = 1,2$$

Portanto basta uma análise.

5. CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES

1. À luz dos resultados obtidos neste estudo , podemos afirmar que a temperatura e a humidade são factores potenciais de degradação dos medicamentos. A variação da temperatura em $\pm 5^{\circ}\text{C}$ afecta muito a estabilidade dum medicamento.
2. À temperatura de 30°C a Penicilina G é facilmente degradada , quer se trate da forma em pó quer da suspensão. recomenda-se a conservação deste medicamento à temperaturas mais baixas.
3. A Clortalidona é muito afectada pela humidade . A reacção característica é de hidrólise , por isso , deve-se ter em conta as embalagens a entregar ao doente.
4. Quanto ao Cloranfenicol , é uma droga que em condições normais é muito estável mas especial cuidado deve-se ter em relação à sua exposição à luz , porque é susceptível de sofrer fotoreacção.
5. Sobre a técnica de análise da Cloroquina , podemos afirmar que a versão proposta é mais simples , rápida, precisa e exacta e mais económica mormente no se refere ao uso de solventes e padrões.

Com base nestes resultados experimentais e tendo em vista que :

- Moçambique é um País que não dispõe de uma indústria farmaceutica capaz de garantir a disponibilidade de medicamentos necessários e previstos nos programas sanitários ficando deste modo completamente dependente das importações.
 - Os portos de entrada estão concentrados em Maputo e Beira , facto este , que implica condições de armazenamento principalmente nas duas Províncias e no sistema de distribuição nas outras Províncias e Distritos em geral.
- Para prevenir a degradação de modo a garantir medicamentos seguros e reduzir as perdas económicas , podemos recomendar as seguintes medidas:

- 1-As condições de guarda quer em armazens gerais quer em farmácias devem ser melhoradas , procurando ter todos os medicamentos em sítios com temperaturas inferiores à 20°C .
- 2-À semelhança de outros países adoptar normas de conservação de medicamentos
- 3-Devido à muito maior estabilidade de Penicilinas nas formulações em pó o Departamento Farmaceutico e a Medimoc devem comprar este medicamento nesta forma e providenciar a sua distribuição pela via mais rápida . Na compra de outros medicamentos as duas entidades devem fazê-lo tendo sempre em vista a forma mais estável.

- 4 - Deve-se providenciar que o sistema de entrega dos medicamentos aos doentes em regime ambulatorio, nos Hospitais seja em embalagens próprias evitando o sistema de cartuchos.
- 5 - Usar o método modificado de análise de cloroquina graças a sua precisão, exactidão e simplicidade mais alta.

BIBLIOGRAFIA

- 1- Martindale " THE EXTRA FARMACOPEIA" , 28^a Edition 1902. Great Britain.
- 2-B.D.Levine-"Degradation of Benzilpenicilin at pH 7,5 to benzilpeniciloic acid".
Chemical Abstract 1969 vol.90 4033i;
- 3-Guravich I.;Yastroen S.S.;Mashkova L.P.;Gorlov,V.D.-"stability of penicillin in some grude forms for topical aplications" Analitical Abstract 1980 vol.46 9E12;
- 4-Joseph Alicino-" Iodometric detemination of natural penicillin , 6-Aminopenicil-
laniv Acid and Cephlosporin" chemical abstracts , 1961 vol.55, 10010;
- 5-G.R.Bespond and S.S.Karmekan-"Colorimetric determination of Penicillin G in Pro-
cain Penicilin G" - Chemical abstract 1961 , vol55,25159;
- 6-Denito Casu e Paolo-"Simple and especificdetermination of Penicillins by I.R.Es-
pectrophotometry in Deutrim Oxid and Dimethylsiphoxid solutio" Journal of pharma-
ceutical science vol.66, n^o12
- 7-J.R.Fooks;G.L.Matlok-"Thin layer chromathography of PBocain Penicilin"
Analitical Abstracts vol.19 1970 4370
- 8-U.S.Pharmacopoeia, National Formulary, Rockeville, 1980 XX,p.137;
- 9-Joan M.Blama, Adelbert M. Kwevel;Stanlei L. Mem -" H.P.L.C. Analysis of Penicillin
G P^utassio and its degradations products" Journal of pharmaceutical science,AUGUST
1975 vol.64.
- 10-Kenneth A. Connors, Gordon I.Amidon, Floyd Kennon -"chemical stability of Pharmae
ceutical " p.3-185;
- 11-Koka I.P.-"Iodometric determination of Cloranfenicol and Synthomycin in prepara-
tion and drug forms" -Analitical abstract, vol.46 , November 1984 11E15;
- 12-British pharmacopoeiae , 1980 vol.II. p. 526
- 12-Koka I.P. -" Iodometric determination of Cloxanfenicol and Synthomicin in prepara-
tions and drug forms " -Analitical abstract vol.46,November 1984 11E15;
- 13-Shinghal D.M. ;Prabhudesai J.S.-"stimation of Clortalidone in its formulatio " "
Analitical abstract vol.47 ,March 1985 3E85
- 14-Bauer J. ; Quick,J. ;Krogh,S"-stability-indicating for Chlortalidose formulation:
evaluation of the U.S.P. assay and H.P.L.C. " Analitical abstract vol.46 n^o3
March 1985 , 3E47
- 15- The Merck Index, NINTH EDITION^{iv} , Merck & CO.;INC. 1976
- 16- R.H.Black, C.J.Canfield, D.F.Clyde, W.Peters,W.H'.Wernsdorfer -"Quimioterapia
do paludismo" ; Organizacion Mundial de la salute, Ginebra , 1982, p.41-54;