



UNICAMP

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE QUÍMICA

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA

GRUPO DE PESQUISAS EM QUÍMICA ANALÍTICA E EDUCAÇÃO



DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**DETERMINAÇÃO ESPECTROFOTOMÉTRICA DE
ACETATO DE MEDROXIPROGESTERONA EM
MEDICAMENTOS PELA REAÇÃO COM Mo(VI) EM H₂SO₄**

AUTORA: TÂNIA APARECIDA LOPES PINHEIRO

ORIENTADORA: PROFA. DRA. ADRIANA VITORINO ROSSI

Novembro / 2006

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA
DO INSTITUTO DE QUÍMICA DA UNICAMP**

P655d

Pinheiro, Tânia Aparecida Lopes.

Determinação espectrofotométrica de acetato de medroxiprogesterona em medicamentos pela reação com Mo(VI) em H_2SO_4 / Tânia Aparecida Lopes Pinheiro. -- Campinas, SP: [s.n], 2006.

Orientadora: Adriana Vitorino Rossi.

Dissertação - Universidade Estadual de Campinas,
Instituto de Química.

1. Acetato de medroxiprogesterona. 2.
Medicamentos. 3. Espectrofotometria. I. Rossi, Adriana
Vitorino. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de
Química. III. Título.

Nada vai permanecer
No estado em que está

Eu só penso em ver você
Eu só quero te encontrar

Geleiras vão derreter
Estrelas vão se apagar

E eu pensando em ter você
Pelo tempo que durar

Coisas vão se transformar
Para desaparecer

E eu pensando em ficar
A vida a te transcorrer

E eu pensando em passar
Pela vida com você

*Dedico esta dissertação à minha família,
Madalena, José e Silvia
por nunca me deixarem desistir...
Só vocês sabem quanto eu
caminhei para chegar até aqui.*

*Tenha sempre em mente que a pele enruga,
O cabelo embranquece e os dias convertem-se em anos...
Mas o que é importante não muda.
A sua força e convicção não tem idade
O seu espírito é como qualquer teia de aranha.
Atrás de cada linha de chegada há sempre uma de partida.
Atrás de cada conquista, vem um novo desafio.
Enquanto estiver viva, sinta-se viva...
Se sentir saudades do que fazia, volte a fazer.
Não viva de fotografias amareladas...
Continue quando todos esperam que desista.
Não deixe que enferruje o ferro que existe em você.
Faça com que em vez de pena, tenham respeito por você.
Quando não conseguir correr através dos anos, caminhe!
Quando não conseguir caminhar use uma bengala...
Mas nunca se deixe deter...*

“Madre Teresa de Calcutá”

*É bom ter a certeza que além do horizonte deve ter
algum lugar bonito para viver em paz...
Aproveitar a tarde sem pensar na vida, andar despreocupado sem
saber a hora de voltar.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha família, José, Madalena e Silvia, pelos valores que me ensinaram na infância, pelos incentivos e broncas nos momentos necessários. Aos melhores pais do mundo, deixo aqui minha homenagem: Amo muito, mas muito mesmo vocês!

“E agora, José? A festa acabou, a luz apagou, o povo sumiu, a noite esfriou, e agora, José? E agora, você? Você que é sem nome, que zomba dos outros, você que faz versos, que ama, protesta? E agora, José?” ... “Madalena, Madalena você é meu bem querer, eu vou falar pra todo mundo, vou falar pra todo mundo que eu só quero é você...”

Agradeço a Profa. Dra. Adriana Vitorino Rossi pela ajuda nesta reta final, pelas palavras de consolo nos momentos que perdi a calma. Dri, agradeço sua amizade em todos os momentos: bons, não tão bons e ruins... Afinal, amizades passam por altos e baixos, mas permanecem.

Não poderia deixar de mencionar a Acácia, um anjo que Deus colocou no meu caminho. Cá, obrigada por me suportar, mesmo quando eu mesma não me suportava mais. Obrigada por toda ajuda nestes anos todos.

Obrigada às *girls*, Camila Vigna, Camila Rezende, Juliana, Mary, Valery e Viviane, por estarem sempre ao meu lado.

Agradeço aos amigos e colegas de trabalho da KosmoScience, Adriano, Daniela, Douglas, Diogo e Willian, por permitirem que eu me ausentasse em alguns momentos para concluir este trabalho.

Não posso esquecer do pessoal do GPQUAE, pelas contribuições afetivas e profissionais desde quando comecei a trabalhar no laboratório. À Adriana Magna, Marta Vila, Mathias, Mare, Airton, Thiago, Gustavo, à Wilma pela colaboração no início deste trabalho, ao Rafael, Débora, Marcos Paulo, Mauro, Martha Favaro, Patrícia. Agradeço especialmente à Luciana Foltram Martins pelas essenciais contribuições neste trabalho.

Agradeço aos funcionários do IQ, Divino, Daniel, Beth, Márcia, Ricardo especialmente à Bel da CPG, pela solicitude e muitos outros que nestes anos sempre me ajudaram.

Ao Prof. Dr. Marcos N. Eberlin e seu aluno de doutorado Renato Haddad pela colaboração na tentativa de realizar experimentos em espectrometria de massas

Espero não ter esquecido de ninguém... A todos meus sinceros agradecimentos, que Deus abençoe todos vocês.

“Se eu morrer antes de vocês, acho que não vou estranhar o céu... Ter amigos como vocês...já é um pedaço dele...” (Autor desconhecido).

CURRÍCULO DA AUTORA

A autora desta Dissertação de Mestrado ingressou no Curso de Química em 1998, concluindo a modalidade Bacharelado em Química em 2002 e a modalidade Licenciatura em Química em 2004, pela Universidade Estadual de Campinas. Durante a graduação, realizou três projetos de Iniciação Científica sob orientação da Prof^a. Dr^a. Adriana Vitorino Rossi. Os dois primeiros intitulados “Uso de Indicadores Naturais como Indicador de pH”, realizado no período de 09/1999 a 08/2000 e “Análise Simultânea de Cátions em Microamostras Aplicando Quimiometria para Tratamento de Dados de Reflectância”, executado de 09/2000 a 08/2001, foram contemplados com bolsa de estudos SAE-UNICAMP. O terceiro projeto, “Especiação de Cromo em Microamostras”, foi contemplado com bolsa de estudos do PIBIC/CNPq e realizado no período de 09/2001 a 07/2002. Em julho de 2002, foi aprovada no processo seletivo para ingresso no Programa de Mestrado do Instituto de Química da Unicamp e desenvolveu o projeto “Determinação de Acetato de Medroxiprogesterona em Medicamentos Pela Reação com Mo(VI) em H₂SO₄”, também sob orientação da Prof^a. Dr^a. Adriana Vitorino Rossi. cursou 45 créditos, tendo sido aprovada em todas as disciplinas: “Métodos Cromatográficos de Separação”, “Preparo de Amostras” e “Métodos Analíticos Aplicados à Determinação de Traços”. Participou também do Programa de Estágio de Capacitação Docente (PED) na disciplina de Química Analítica Instrumental Experimental sob orientação do Prof^o. Dr^o. Célio Pasquini. Durante seu trabalho acadêmico, participou de 10 congressos científicos, tendo apresentado 14 trabalhos na forma de painéis. No 13^o Encontro Nacional de Química Analítica (ENQA), o trabalho “Identificação e Quantificação de Acetato de Medroxiprogesterona” do qual é co-autora foi apresentado na forma oral.

Em 2004, a autora realizou estágio na empresa Kosmoscience, que atua na área de avaliação de eficácia de produtos cosméticos, sendo efetivada no ano 2005 como Química Pesquisadora. Neste período participou de 4 eventos científicos na área de Química Cosmética, sendo 3 congressos nacionais (Congresso Brasileiro de Cosmetologia) e um internacional (XVII Congresso Latinoamericano e Ibérico de Químicos Cosméticos – Cuzco/Peru).

RESUMO

“Determinação Espectrofotométrica de Acetato de Medroxiprogesterona em Medicamentos pela Reação com Mo(VI) em H₂SO₄”

Aluna: Tânia Aparecida Lopes Pinheiro

Orientadora: Profa. Dra. Adriana Vitorino Rossi

Acetato de medroxiprogesterona (AMP) é um derivado da progesterona que vem sendo usado para contracepção por cerca de 30 milhões de mulheres e também vem aplicado em tratamentos de câncer. Como em alguns casos, AMP gera efeitos colaterais desfavoráveis, sua dosagem deve ser bem controlada. Neste trabalho, foi desenvolvido um método espectrofotométrico para quantificação de AMP em fármacos pela reação com Mo(VI) em meio fortemente ácido. Testes preliminares como avaliação do ponto de fusão e spot test com ácido sulfúrico foram introduzidos para identificar o AMP de outros compostos, como derivados de cortisona que também podem reagir com Mo(VI). A reação foi otimizada a partir da avaliação de algumas variáveis do sistema reacional: tempo e temperatura de aquecimento, solvente e concentração de ácido. Os resultados obtidos indicaram que as melhores condições para o sistema reacional são: solução 9 mol L⁻¹ de H₂SO₄, 70 minutos de aquecimento a 90 °C e uso de AMP em acetonitrila. Nestas condições, foram obtidas curvas analíticas com a absorbância em 406 nm do produto formado cuja concentração é diretamente proporcional à concentração de AMP na faixa de $5,87 \times 10^{-3}$ a $10,00 \times 10^{-2}$ mg mL⁻¹, com coeficiente de correlação linear = 0,9972 e limite de detecção = $1,77 \times 10^{-3}$ mg mL⁻¹. A precisão foi avaliada por intra (repetibilidade) e inter (precisão intermediária) testes, tendo sido obtidos desvios máximos de $\pm 1,9\%$. Quando comparado com um método de quantificação de AMP em medicamentos comerciais por cromatografia líquida de alta eficiência, os resultados com o método proposto não apresentaram diferenças estatisticamente significativas com 95 % de confiança, indicando bom desempenho do método baseado na reação colorimétrica, que tem favoráveis características de simplicidade instrumental.

ABSTRACT

“Spectrophotometric determination of Medroxioprogesterone in pharmaceuticals using a reaction with Mo(VI) in H₂SO₄”

Student: Tânia Aparecida Lopes Pinheiro

Adviser: Prof. Dr. Adriana Vitorino Rossi

Acetate of medroxioprogesterona (AMP) is one derivative of the progesterone, that have been used used as contraceptive method for about 30 million women. And in treatments of cancer. In some cases, AMP cause favorable collateral effect, therefore its dosage must be well controlled. In this work, a spectrophotometric method for quantification of AMP in pharmaceutical preparation using the reaction with Mo(VI) in strong acid was developed. Preliminary tests as evaluation of the fusing point and spot test with H₂SO₄ had been introduced in order to identify the AMP from other compounds, as corticoids, that ca also react with Mo(VI). The reaction was optimized from the evaluation of some reaction variable: time and temperature of heating, AMP solvent, acid concentration. The optimized conditions are 9 mol L⁻¹ H₂SO₄; heating for 70 minutes at 90 °C and acetone solvent for AMP. In these conditions, analytical curves of absorbance at 406 nm of the product formed whose concentration is directly proportional to the initial concentration of AMP were obtained from $5,87 \times 10^{-3}$ a $10,00 \times 10^{-2}$ mg mL⁻¹, with linear coefficient = 0,9972 and detection limit = $1,77 \times 10^{-3}$ mg mL⁻¹. The precision was evaluated by intra (repeatability) and inter (intermediate precision) tests, having been achieved maximum relative deviation = $\pm 1,9$ %. When compared with a HPLC method of quantification of AMP in commercial medicines, the results achieved with this method did give statistical significant differences at 95 % confidence level, indicating good performance of the colorimetric method, which has the advantage of instrumental simplicity.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO	1
1.1. Contraceptivos	2
1.1.1. Tipos de Contraceptivos Hormonais	4
1.1.1.1. Transdérmico	4
1.1.1.2. Anel Vaginal	4
1.1.1.3. Implante Subcutâneo	4
1.1.1.4. Contraceptivo Injetável.....	5
1.1.1.5. Contraceptivo Oral – Pílula	5
1.2. Acetato de Medroxiprogesterona	6
1.2.1. Propriedades Físico-Químicas	6
1.2.2. Indicações e formas de apresentação	7
1.3. Síntese de AMP	7
1.4. Propriedades Farmacodinâmicas.....	8
1.4.1. Mecanismo de Ação	9
1.4.2. Propriedades Farmacocinéticas	9
1.5. Técnicas Analíticas para análise de AMP	9
1.6. Reação com Mo(VI)	12
CAPÍTULO 2 – OBJETIVOS	14
CAPÍTULO 3 – PARTE EXPERIMENTAL.....	16
3.1. Reagentes	17
3.2. Amostras de Medicamentos	17
3.3. Padrões de Referência.....	17
3.4. Equipamentos	18
3.5. Outros materiais	18
3.6. Preparo das Soluções	18
3.6.1. Solução de AMP para o Método Espectrofotométrico.....	18
3.6.2. Preparo da Solução de AMP para o Método Cromatográfico ³⁹	19
3.6.3. Solução de H ₂ SO ₄	19
3.6.4. Solução de HCl	19
3.6.5. Solução de H ₃ PO ₄	19
3.6.6. Solução de Molibdato de Amônio 2,5% (m:v)	19
3.6.7. Fase Móvel para o Método Cromatográfico	20

3.7. Determinação do Ponto de Fusão.....	20
3.8. <i>Spot Test</i> com Ácido Sulfúrico Concentrado.....	21
3.9. Otimização das condições de reação	21
3.9.1 Sistema reacional para obtenção da espécie monitorada em 406 nm.....	21
3.9.2 – Solvente do AMP.....	22
3.9.2.1 - Reação com Solução de AMP em Clorofórmio.....	22
3.9.2.2 - Reação com Solução de AMP em Acetonitrila	22
3.9.3 – Solução de ácido.....	22
3.9.3.1 – Efeito da Concentração de H_2SO_4	23
3.9.3.1 – Uso de HCl e de H_3PO_4	23
3.9.4 – Efeito da Temperatura e do tempo de Aquecimento.....	23
3.10. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência	24
3.10.1. Condições cromatográficas.....	24
3.11. Preparo das Amostras de Medicamentos	24
3.11.1. Ensaios Espectroanalíticos (UV-VIS).....	24
3.11.1.1. Comprimidos	24
3.11.1.2. Suspensão Injetável	24
3.11.2 Ensaios Cromatográficos	25
3.11.2.1. Preparo da Amostra	25
3.12. Identificação do produto da reação	25
3.12.1. Espectros no Infravermelho médio.....	25
3.12.2. Espectrometria de Massas.....	26
3.12.2.1 Neutralização do Sistema Reacional	26
3.12.2.2. Extração Líquido-Líquido da Espécie Monitorada.....	26
3.13. Figuras de Mérito	26
3.13.1. Linearidade.....	26
3.13.2. Intervalo.....	27
3.13.3. Precisão	27
3.13.3.1. Repetibilidade.....	27
3.13.3.2. Precisão Intermediária	27
3.13.4. Especificidade	28
3.13.5. Estabilidade.....	28
3.13.6. Exatidão	28
CAPÍTULO 4 – RESULTADOS E DISCUSSÕES	29

4.1. Testes de Identificação de AMP	30
4.1.1 Ponto de Fusão	30
4.1.2. Teste com Ácido Sulfúrico Concentrado	32
4.2. Espectros Eletrônicos da Espécie Monitorada	34
4.3.1. Otimização do Sistema Reacional AMP-Mo(VI)	34
4.3.2. Solvente do AMP	35
4.3.4. Efeito da Concentração de H_2SO_4	36
4.2.3. Avaliação de Soluções Ácidas para substituir o H_2SO_4	37
4.2.5. Efeito da Temperatura e do Tempo de Aquecimento	39
4.2.5. Resumo das Condições Reacionais Otimizadas	39
4.3. Quantificação da Espécie Monitorada em 406 nm	40
4.3.1. Determinação de AMP em amostras pela da reação com Mo(VI)	41
4.4. Determinação de AMP no Ultravioleta	41
4.4.1 Determinação de AMP em amostras comerciais pelo método ultravioleta.	43
4.5. Validação do Método da reação com Mo(VI)	44
4.5.1 Figuras de Mérito	45
4.5.1.1. Especificidade e Seletividade	45
4.5.1.2. Linearidade	46
4.5.1.3. Intervalo	46
4.5.1.4. Precisão	46
4.5.1.5. Resultados Obtidos	47
4.6 Estudo Investigativo da Estrutura da Espécie Monitorada	56
CAPÍTULO 5 CONCLUSÕES	64
CAPÍTULO 6 - PERSPECTIVAS	66
CAPÍTULO 7 - REFERÊNCIAS	68
ANEXO I – Certificado de Análise do AMP	79

CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Acetato de medroxiprogesterona (AMP) é o contraceptivo de longa duração mais utilizado atualmente. Além da ação contraceptiva, outros efeitos de AMP têm sido explorados, com destaque para o tratamento de carcinoma metastático pulmonar e de mama, produzindo remissões por período prolongado ^{1,2}.

Para a ação contraceptiva, a dose empregada é 150 mg via intramuscular a cada três meses ³. Pode ser utilizado para tratamentos de amenorréias com doses diárias de 5 a 10 mg por 5 a 10 dias ⁴. Nos tratamentos contra o câncer, doses elevadas, acima de 150 mg, são empregadas. Nestes casos, a administração de AMP pode causar vários efeitos adversos e, por esse motivo, a dosagem deve ser cuidadosamente controlada ³.

Em farmácias de manipulação e em farmácias hospitalares o consumo de AMP é grande ^a. Por esse motivo, é desejável que haja um procedimento acessível para a dosagem deste fármaco nas preparações farmacêuticas.

Neste contexto, a proposta deste trabalho foi desenvolver um método acessível para a quantificação de AMP com medidas espectrofotométricas, com uso de equipamentos simples.

1.1. Contraceptivos

Milhares de pessoas em todo o mundo utilizam uma grande variedade de métodos contraceptivos para controlar a fertilidade humana ⁵. Entre estes, estão os métodos químicos, tais como contraceptivos oral, injetável e implante. Há também outros métodos físicos, tais como dispositivos intrauterino, métodos da barreira e esterilização cirúrgica, dentre outros ⁶. Nenhum destes métodos representa a opção ideal para controle da fertilidade e da natalidade já que cada um apresenta vantagens e desvantagens ^{7,8}.

^a Fonte: Nice Maria Oliveira da Silva, Diretora Co-Responsável Técnica, CAISM – Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher, Hospital da Clínicas – UNICAMP (Fevereiro de 2003).

O primeiro contraceptivo hormonal, EnovidTM (150 µg menastro e 9,85 mg de noretinodrel) foi aprovado pela FDA (U.S. Food and Drug Administration⁹) para o uso nos Estados Unidos em 1960. Contraceptivos hormonais constituem o grupo mais amplamente utilizado de contraceptivo reversível no mundo¹⁰.

Por serem os mais eficazes e oferecerem outras vantagens, incluindo melhora na qualidade de vida e proteção contra doenças ginecológicas¹¹, os contraceptivos hormonais (formas: oral, injetável e implante) são os mais utilizados. Por enquanto, os contraceptivos hormonais são de uso mais comum em mulheres¹². Na década de 60, quando iniciaram os estudos com contraceptivos hormonais femininos, já se buscava uma opção masculina do método¹³. Atualmente, já existem anticoncepcionais hormonais desenvolvidos para o público masculino^{14, 15}. No Brasil, o primeiro medicamento desse gênero comercializado, Nofertil, começou a ser usado em 1996¹⁶.

Os contraceptivos hormonais são derivados de alguns hormônios como estradiol, testosterona, pregna-4,6-dieno-3,20-diona, pregnadieno e outros compostos sintéticos com estruturas variadas¹⁷.

Desde que foi criada, a contracepção hormonal evoluiu extraordinariamente em composição, dosagem e administração, buscando-se redução da carga hormonal, acomodação ao ciclo menstrual e outras aplicações benéficas para as usuárias¹⁸. Em geral, a contracepção hormonal é realizada com associações de progestagênicos (como progesterona) e estrogênicos (mais conhecido é estradiol) e podem ser utilizados também para corrigir distúrbios menstruais, como amenorréia primária e secundária, dismenorréia, endometriose e hemorragia uterina disfuncional^{17, 19}.

Em todo o mundo, o uso de anticoncepcionais hormonais é crescente. Em diversos países pobres, a pílula anticoncepcional é distribuída gratuitamente em programas de planejamento familiar²⁰. Com um número tão elevado de usuárias, os anticoncepcionais orais fazem parte do seleto grupo de medicamentos mais exaustivamente pesquisados desde o seu surgimento, há mais de 40 anos²¹.

1.1.1. Tipos de Contraceptivos Hormonais

1.1.1.1. Transdérmico

O adesivo contraceptivo transdérmico é uma recente opção contraceptiva para as mulheres brasileiras. O adesivo libera diariamente, na circulação sistêmica, 150 ug de norelgestromina, um progestogênio moderno, e 20 ug de etinilestradiol, dose que equivale a uma pílula oral de baixa dosagem^{22, 23}. Entretanto, a usuária deve trocá-lo apenas uma vez por semana.

Em estudos controlados, o adesivo demonstrou eficácia semelhante à da pílula no controle do ciclo menstrual e na prevenção de gestações. Com esquema de dosagem mais prático, com aplicação semanal pela própria usuária, aliado ao fato de ser facilmente reversível, o uso correto do adesivo semanal (sem falhas por parte da usuária) superou o da pílula oral diária²³.

1.1.1.2. Anel Vaginal

Trata-se de um anel de material macio e flexível com cerca de 5 cm de diâmetro que deve ser colocado na vagina uma vez em cada mês. Durante um período de 3 semanas, uma baixa dose de hormônios, aproximadamente 120 µg de etonogestrel (derivado progestagênio 19-nortestosterona) e 15 µg de estradiol por dia, é liberada, regular e controladamente para prevenir gravidez²⁴.

Como este dispositivo envolve uma menor exposição aos estrogênios, há uma menor incidência de efeitos secundários, como dores de cabeça, náuseas e aumento da sensibilidade mamária. A regular, constante e baixa taxa de liberação de hormônios proporciona menos desequilíbrios hormonais, em comparação com a pílula ou o adesivo contraceptivo. O índice de falha deste método é de 0,65 %²⁵.

1.1.1.3. Implante Subcutâneo

Pesquisas mais recentes sobre implantes anticoncepcionais concentraram-se na redução do número de bastões ou cápsulas pelo uso de diferentes progestogênios, na minimização dos efeitos colaterais (particularmente

os transtornos de sangramento) e na tentativa de garantir que o uso seja mais seguro durante a amamentação ²⁶.

Atualmente, são usadas cápsulas de progestogênio levonorgestrel que oferecem excelente proteção anticoncepcional. Porém, em alguns países observaram-se muitos casos de interrupção do uso desses implantes devido a problemas de sangramento que são os efeitos colaterais mais comuns do uso do implantes e representam a principal justificativa das pacientes para explicar a interrupção do uso ²⁵. Falhas deste método são raras: de 0,20% a 1,6 % ²⁷.

1.1.1.4. Contraceptivo Injetável

Os contraceptivos hormonais injetáveis são semelhantes aos de uso oral, porém são administrados na forma de depósito, ou seja, de ação prolongada, suficiente para 1 até 3 meses. É indicado para pacientes que apresentam incompatibilidade gástrica com contraceptivos orais ou em casos de pacientes que esquecem de tomar a pílula diariamente ^{25,26}.

1.1.1.5. Contraceptivo Oral – Pílula

A pílula, como os contraceptivos orais são popularmente conhecidos, talvez seja o método de contracepção mais comum no mundo. Calcula-se que nada menos que 90 milhões de mulheres no mundo todo façam uso da pílula ¹⁰. Com esse número de usuárias, não é de se espantar que os anticoncepcionais orais (ou, abreviando, ACO), façam parte do seleto grupo de medicamentos mais exaustivamente pesquisados desde o seu surgimento, há cerca de 40 anos ²⁶.

ACO têm sido estudados e modificados ao longo do tempo com a finalidade de reduzir a dosagem de estrogênio e progesterona nas formulações a fim de minimizar os efeitos colaterais.

Apesar de nenhum método contraceptivo ser isento de riscos, estes tendem a ser minimizados e contrabalançados pelos benefícios. Um bom acompanhamento médico ajuda a reduzir os riscos potenciais durante o uso.

1.2. Acetato de Medroxiprogesterona

Acetato de medroxiprogesterona, AMP, é um derivado progestagênico com estrutura ilustrada na Figura 1 e que vem sendo usado para contracepção por 30 milhões de mulheres em mais de 90 países devido ao seu baixo custo ¹⁰. Seu efeito contraceptivo resulta principalmente da inibição da ovulação. A elevadíssima eficácia contraceptiva do AMP, que promove a atrofia endometrial e alteração da mobilidade da tuba uterina, também resulta do efeito de aumento da viscosidade do muco cervical que evita a penetração do espermatozóide ²⁶.

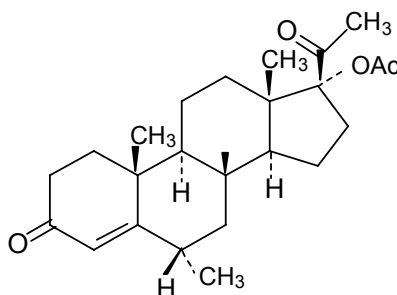


Figura 1. Fórmula estrutural do AMP ²⁷.

Além da sua ação contraceptiva, AMP tem sido utilizado no tratamento contra o câncer de mama. Neste caso, AMP é utilizado na dose de 1000 mg/dia via intramuscular ou via oral no primeiro mês de tratamento e, depois, com doses de 500 mg/dia, 2 vezes por semana. Doses mais elevadas não são relacionadas com aumento da resposta, mas sim com maiores efeitos colaterais, como abscessos musculares ²⁸. É geralmente utilizado como hormonioterapia de segunda linha por apresentarem efeitos colaterais mais intensos (retenção hídrica, trombozes venosas, hipertensão, diabetes *mellitus* e aumento do apetite) que o tamoxifeno (hormonioterapia de primeira linha). Existem estudos nos quais, faz-se a opção de utilizar AMP combinado com doxifluridina e ciclofosfamida como hormonioterapia de primeira linha, com redução dos efeitos colaterais ²⁹.

1.2.1. Propriedades Físico-Químicas

Acetato de medroxiprogesterona apresenta-se na forma de um pó branco cristalino, inodoro, estável ao ar, insolúvel em água, porém muito solúvel em

clorofórmio, acetona, acetonitrila, dioxano e parcialmente solúvel em etanol^{30,31}. O armazenamento de AMP deve ser feito em recipiente fechado e protegido da luz.

Dados da literatura indicam que a dose de AMP letal em 50%, LD₅₀, é: > 6,4 g kg⁻¹ (para camundongos, via oral) e > 5 g kg⁻¹ (cães, via oral)³².

1.2.2. Indicações e formas de apresentação

AMP pode ser utilizado por via oral ou intramuscular, para contracepção e no tratamento de distúrbios menstruais. Por via intramuscular, seu tempo de ação é muito prolongado e não pode ser adotado como rotina¹. A forma injetável de AMP tem efeito de longa duração (12 semanas), sendo um método contraceptivo extremamente efetivo, com índice de falha entre 0 e 0,7%¹⁻⁴.

1.3. Síntese de AMP

Desde 1923, diversos compostos progestacionais têm sido sintetizados. Alguns mostram atividade quando administrados por via oral, constituindo um grupo de compostos com propriedades semelhantes, porém todos diferem da estrutura da progesterona em um ou mais grupo funcional.

Em geral, compostos com 21 carbonos (hidroxiprogesterona, medroxiprogesterona, megestrol e dimetisterona) são os mais estreitamente relacionados com a progesterona, tanto do ponto de vista farmacológico quanto químico. A Figura 2 ilustra alguns destes compostos progestacionais³³.

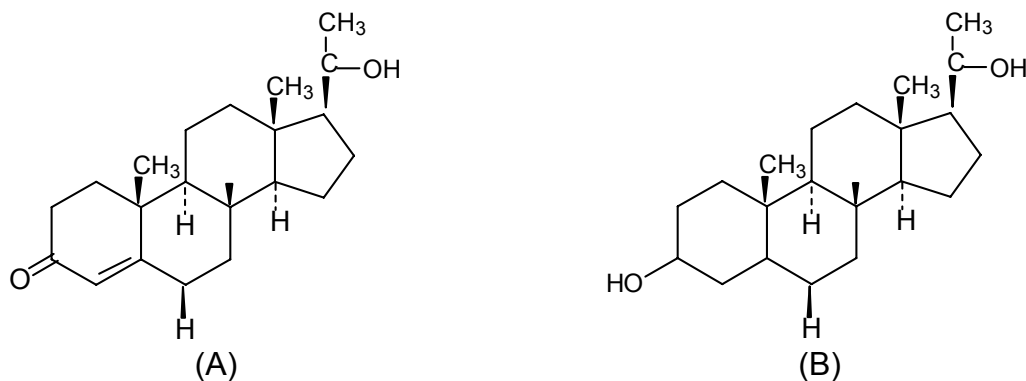


Figura 2. Exemplos de compostos progestacionais sintéticos semelhantes a progesterona. (A) Hidroxiprogesterona. (B) Pregnanodiol.

A Figura 3 ilustra a rota simplificada de síntese de AMP^{34,35}.

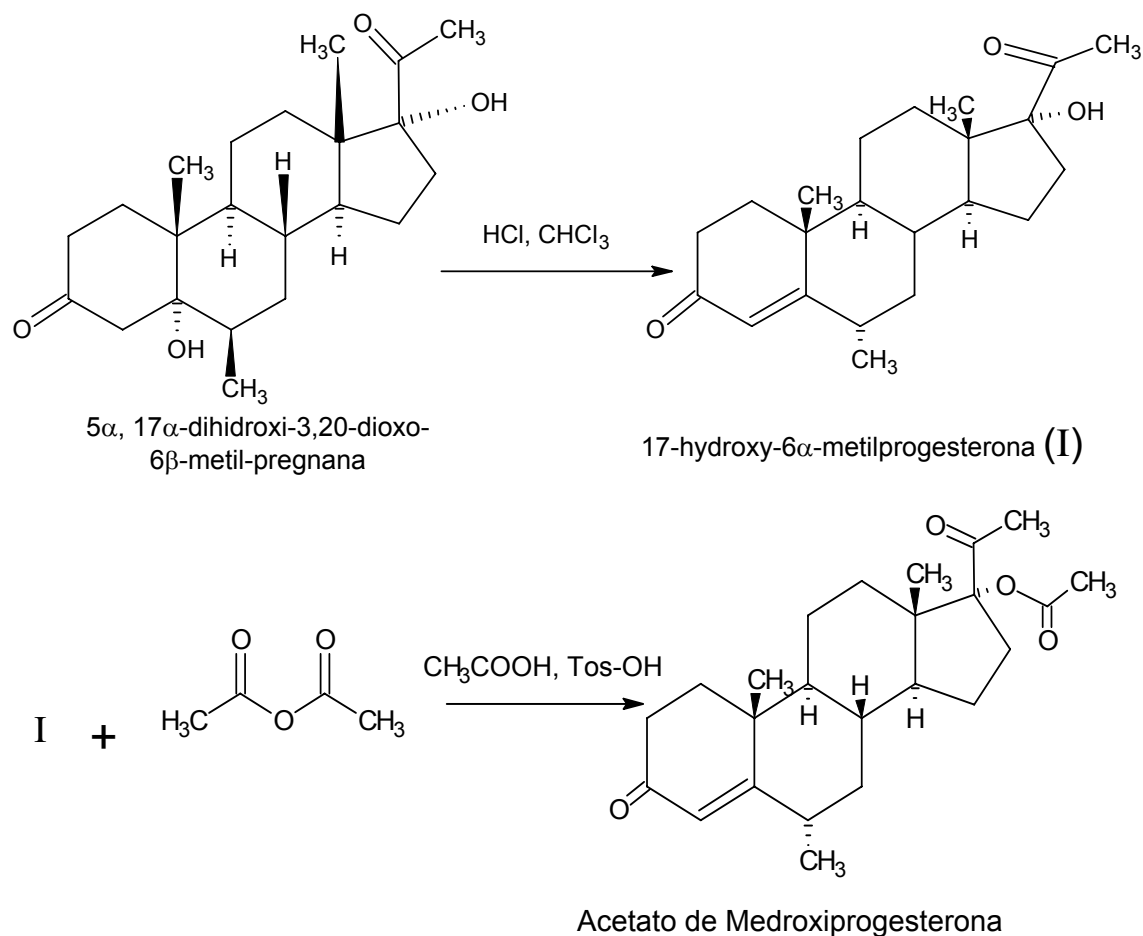


Figura 3. Esquema simplificado da síntese do AMP^{34,35}.

1.4. Propriedades Farmacodinâmicas

As propriedades farmacodinâmicas compreendem os diferentes mecanismos de ação pelos quais os medicamentos atuam sobre as funções bioquímicas ou fisiológicas de um organismo vivo³⁶.

Neste contexto, AMP é um derivado sintético da progesterona, que é a progestina mais importante nos seres humanos. Além de seus efeitos hormonais, a progesterona atua como precursor de estrogênios, androgênios e esteróides córtico-supra-renais³³.

1.4.1. Mecanismo de Ação

Ações farmacológicas sobre o sistema endócrino ^{33,37}:

- Inibição das gonadotrofinas pituitárias (hormônio folículo-estimulante-FSH e hormônio luteinizante-LH);
- Diminuição dos níveis sanguíneos de hormônio adrenocorticotrófico e de hidrocortisona;
- Diminuição da testosterona circulante;
- Diminuição dos níveis de estrogênio circulante (como resultado da inibição de FSH e indução enzimática de redutase hepática).

1.4.2. Propriedades Farmacocinéticas

Farmacocinética é o termo utilizado para o estudo da velocidade com que os fármacos atingem o sítio de ação e são eliminados do organismo, bem como dos diferentes fatores que influenciam na quantidade de fármaco a atingir o seu sítio. Essencialmente, estuda os processos metabólicos de absorção, distribuição, biotransformação e eliminação das drogas ³⁶.

AMP administrado via oral é rapidamente absorvido, atingindo concentração máxima após 2 a 4 horas. A meia-vida é de aproximadamente 17 horas, ficando aproximadamente 90% ligado às proteínas e sendo principalmente excretado na urina ^{37,38}.

1.5. Técnicas Analíticas para análise de AMP

Nos últimos anos, estudos para análise de fármacos, especialmente os hormônios esteróides, têm sido freqüentes. Entre as técnicas mais utilizadas estão a cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS, do inglês: *Gas Chromatography-Mass Spectroscopy*) ³ e cromatografia líquida de alta eficiência ³⁹ (HPLC, do inglês *High Performance Liquid Chromatograph*), método oficial de análise da Farmacopéia Americana (*XV USP*) ³⁰, tanto para

determinações qualitativas quanto quantitativas. Os dois métodos diferem no modo de preparo da amostra, tipo de coluna e fase móvel utilizadas.

Outra técnica, a espectroscopia Raman também passou a ser empregada para determinações qualitativa e quantitativa de AMP. Esta técnica é considerada uma das mais avançadas atualmente para determinações de principais ativos em fármacos devido a vantagens como resposta rápida e não destrutiva, sendo que há possibilidade de obtenção do sinal analítico do medicamento na própria embalagem, sem que haja manipulação⁴⁰⁻⁴¹.

Estes métodos apesar de apresentarem muitas vantagens, especialmente na sensibilidade e seletividade, envolvem alto custo, tanto de instrumentação, incluindo a manutenção dos equipamentos, quanto com os reagentes necessários.

Em farmácias de manipulação e em farmácias hospitalares é grande o consumo de AMP e recursos como um cromatógrafo para HPLC e profissional capacitado não são normalmente disponíveis. Por outro lado, espectrofotômetros para medidas no visível são mais acessíveis em termos de custo e facilidades operacionais. Neste contexto, esta foi a condição considerada para o desenvolvimento da proposta analítica de dosagem de AMP, objeto do estudo do presente trabalho.

Apesar da atual predominância de métodos cromatográficos nas análises de fármacos, métodos espectrofotométricos ainda vêm sendo explorados. A despeito de sua baixa seletividade, a espectrofotometria UV-vis ainda é muito utilizada para quantificação de fármacos, em função da simplicidade, custo relativamente baixo e grande número de aplicações desenvolvidas⁴¹.

Consultando-se o banco de dados do "*Analytical Abstracts*", encontram-se pelo menos 4.300 citações de trabalhos envolvendo espectrofotometria na análise de fármacos nos últimos 15 anos⁴³. Os procedimentos envolvem medidas diretas de espécies que absorvem radiação, medidas após derivação química e acoplamento a diversas técnicas ou processos, como cromatografia, eletroforese e análises em fluxo⁴⁴.

A associação da espectrofotometria com outros métodos para identificação e o uso de padrões de referência tornam-na eficaz para o desenvolvimento de

métodos para a quantificação de fármacos, tanto na matéria-prima quanto nas formulações comerciais ^{45,46}.

Outra alternativa é a espectrofotometria derivativa, uma representação das derivadas da absorbância em relação ao comprimento de onda, em função do comprimento de onda ⁴⁷. Os métodos de derivação espectral envolvem cálculos com programas já comuns em diversos espectrofotômetros UV-VIS ⁴⁸. Em geral, a derivação espectral visa determinações simultâneas, bem como aumento de seletividade. Entretanto, freqüentemente também se observa aumento de sensibilidade e melhoria do limite de detecção ^{49,50}.

Algumas das dificuldades a serem superadas para a aplicação de métodos espectrofotométricos para a análise de fármacos envolvem a eliminação do efeito de matriz e a determinação simultânea de ingredientes ativos em formulações multifuncionais ⁵¹. Em alguns casos o problema pode ser resolvido utilizando-se 2 ou mais comprimentos de onda e empregando métodos quimiométricos de calibração multivariada ⁵¹.

Como exemplos de propostas para a quantificação de fármacos utilizando-se espectrofotometria, podem ser citados trabalhos de Pezza e colaboradores ^{52,53} e Crivillente e Rossi ⁵⁴. Estes trabalhos envolvem um sistema colorimétrico baseado na reação entre molibdato de amônio e derivados de cortisona em meio fortemente ácido, que foi utilizado para a quantificação de alguns corticóides. O produto da reação tem coloração azul esverdeada e em solução tem absorbância máxima entre 403 a 409 nm. A concentração desse produto em solução é proporcional a concentração inicial do corticóide colocado para reagir.

AMP possui fórmula estrutural semelhante aos corticóides e verificou-se que também reage com molibdênio resultando em um composto colorido análogo com máximo de absorção em 406 nm, conforme ilustrado na Figura 4. Esta foi a base do desenvolvimento da proposta analítica deste trabalho, visando inclusive a possibilidade de adaptação das medidas para dispositivos fotométricos de baixo custo para a quantificação de AMP em formulações comerciais ou manipuladas.

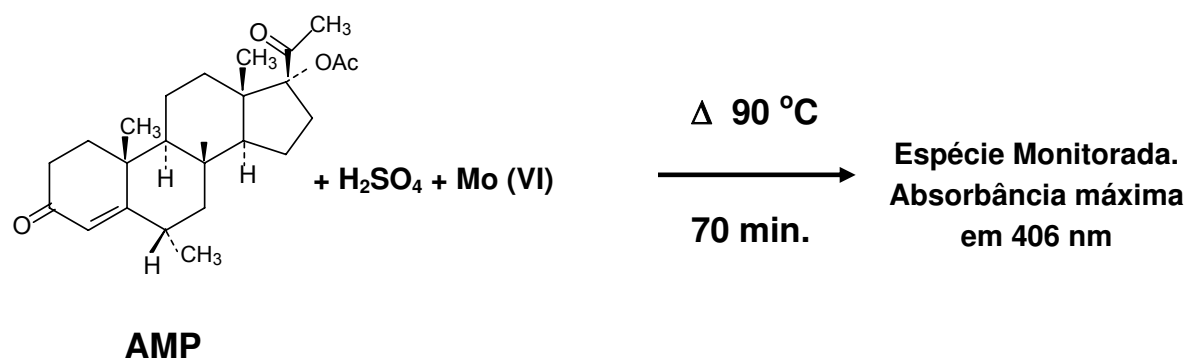


Figura 4. Esquema da reação entre AMP e Mo(VI).

1.6. Reação com Mo(VI)

Como a reação colorimétrica que seria testada envolve Mo(VI), informações sobre este elemento e sua reatividade são importante para o estudo.

Molibdênio, cuja configuração eletrônica é $[\text{Kr}] 4d^5 5s^1$ pode apresentar-se nos estados de oxidação 0, II, III, IV, V, e VI. Exibe características alcalinas em estados de oxidação mais baixos e características ácidas em estados de oxidação mais elevados, sendo que o estado de oxidação VI é considerado o mais estável e a única forma que apresenta coloração verde em solução ⁵⁵.

Existem vários trabalhos na literatura sobre reações de molibdênio em meio ácido que geram produtos coloridos ⁵⁶⁻⁵⁸. Como exemplo pode ser citada a Basques-Lustosa ⁵⁹ para a determinação de íons fosfato baseada na reação com molibdênio em meio ácido, formando um complexo amarelo, que por ação de um tampão alcalino é reduzido a “azul-molibdênio”, um composto que deve conter Mo(V) e Mo(VI), que é medido colorimetricamente em 650 nm e forma-se tanto em meio alcalino como ácido, pela redução parcial de molibdatos ou pela oxidação de estados de oxidação mais baixos ⁵⁵.

Outro exemplo é a reação para quantificar catecol, que reage com Mo(VI) em meio ácido formando um complexo amarelo-alaranjado. Nesta reação, é proposto que o molibdênio esteja na forma de $\text{MoO}_2(\text{OH})_4^{2+}$ em meio neutro. A formação do complexo ocorre segundo a reação ilustrada na Figura 5 ^{60,61}:

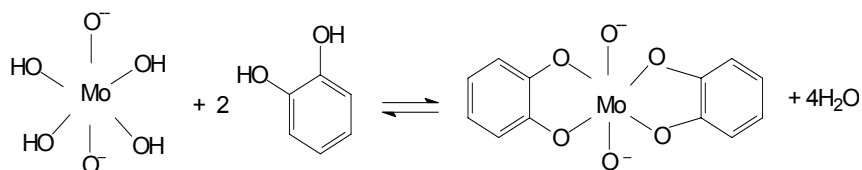


Figura 5. Esquema da Reação entre Mo(VI) e Catecol ⁶⁰.

Aman e colaboradores ⁶²⁻⁶⁵ vêm estudando reações colorimétricas envolvendo diversos fármacos. Em um de seus estudos ⁶², a reação de cloridrato de amitriptilina com molibdato de amônio em ácido sulfúrico concentrado sob aquecimento a 100°C durante 20 minutos gerou um produto de coloração verde, que absorve em 660 nm e que pode ser utilizado para quantificar cloridrato de amitriptilina. Neste caso, molibdato de amônio foi utilizado como reagente oxidante responsável pela formação produto de coloração verde obtido. Outros reagentes oxidantes como KMnO₄, K₂Cr₂O₇, KI, NaI, NaNO₂ e NaNO₃ também foram testados, porém não foi obtida nenhuma resposta colorimétrica para fins quantitativos. Também foi investigado o efeito da concentração de ácido sulfúrico, tendo sido notado que na ausência deste ácido, a reação entre a amitriptilina e molibdato de amônio gerava um precipitado amarelo, solúvel em ácido sulfúrico concentrado (solução de coloração verde).

Este sistema reacional, composto orgânico com Mo(VI) em meio contendo ácido sulfúrico concentrado sob aquecimento, foi utilizado para determinação de corticóides ⁵²⁻⁵⁴ e inspirou o trabalho desta dissertação. Como não é uma reação específica mas que seria utilizada para quantificação de um único analito, foi desenvolvida uma sistemática de testes preliminares simples para identificar a espécie de interesse, envolvendo medida do ponto de fusão e um *spot test*^b com H₂SO₄ concentrado.

^b Reações diretas para identificação rápida de determinados grupos químicos de interesse utilizando pouca quantidade de amostra e reagente, na ordem de microescala ⁶⁷

CAPÍTULO 2 – OBJETIVOS

Este trabalho visou o desenvolvimento de um método espectrofotométrico para determinação de AMP em fármacos pela reação com Mo(VI) em meio fortemente ácido.

Especificamente os objetivos foram:

- Identificação do AMP, a fim de diferenciá-lo de outros esteróides, especialmente corticóides, por meio de testes físicos e químicos (ponto de fusão e adição de ácido sulfúrico concentrado);
- Desenvolver um método espectrofotométrico para a quantificação de AMP;
- Otimizar o sistema reacional com íons Mo(VI) em H_2SO_4 para melhorar a sensibilidade e a repetibilidade do método;
- Aplicar o método em medicamentos comerciais;
- Investigar o produto da reação.

CAPÍTULO 3 – PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Reagentes

- Acetato de Etila p.a. (Merck);
- Acetonitrila grau cromatográfico (J.T. Baker);
- Acetonitrila p.a. (Carbo Erba);
- Ácido Clorídrico p.a. (Synth)
- Ácido Fosfórico p.a.(Synth)
- Ácido Sulfúrico p.a. (Synth);
- Clorofórmio p.a. (Synth);
- Clorofórmio grau cromatográfico (Synth);
- Hexano grau cromatográfico (Tédia)
- Hidróxido de Sódio p.a. (Nuclear)
- Metanol grau cromatográfico (Tédia);
- Molibdato de Amônio p.a. (Synth)

3.2. Amostras de Medicamentos

- Comprimidos de 10 mg de AMP (Pharmacia);
- Suspensão injetável de 150 mg/mL de AMP (Pharmacia);
- Solução otológica de 10 mg/mL de hidrocortisona (GlaxoWellcome).

3.3. Padrões de Referência

- AMP (Galena®) ^c;
- Acetato de Cortisona; (Sigma), mínimo 98%;
- Cortisona (Sigma), mínimo 98%;
- Hidrocortisona (Sigma), mínimo 98%.

Para a preparação das soluções foi utilizada água destilada (destilador de vidro) e quando necessário foi utilizada água deionizada (Milipore) seguindo-se de padronização nos casos necessários ⁶⁸.

^c Certificado de Análise do material encontra-se no Anexo 1

3.4. Equipamentos

- Balança Analítica Mettler AE 200.
- Centrífuga Excelsa II Fanem 206 BL.
- Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência Shimatzu,
 - Auto injetor 10AF;
 - Detector UV-Vis SPD 10 A;
 - Coluna: C18 (Nucleosil silica 5 mm, 100 Å); Macherey-Nagel.
- Espectrofotômetro UV/vis Pharmacia Biotech Ultrospech 2000, com celas de quartzo com caminho óptico de 1 cm.
- Espectrômetro FTIR Bomem MB Series B 100 e cela de ATR com cristal de ZnSe e ângulo de 45°.
- pHmetro com eletrodo de vidro combinado Analyser pH 300;
- Placa de agitação e aquecimento Quimis Q 261 – 22.
- Ultra-som Unique Ultracleaner 14000;

3.5. Outros materiais

- Filtro com membrana de porosidade 0,45 µm Gellman GHP Acrodisc;
- Papel de filtro qualitativo J Prolab;
- Fitas com papel indicador universal pH 0-14, Merck.

3.6. Preparo das Soluções

3.6.1. Solução de AMP para o Método Espectrofotométrico

A solução estoque de AMP (massa molar = 386,53 g mol⁻¹) era preparada diariamente^d pela dissolução em solvente apropriado (acetonitrila ou clorofórmio) da massa adequada do sólido para se obter uma solução 1,5 mg mL⁻¹. Foram realizadas as dissoluções utilizando-se o solvente adequado (acetonitrila ou clorofórmio) para obtenção das concentrações desejadas.

^d Exceto no estudo de avaliação de precisão intermediária, descritos no item 3.13.3.2., no qual foi utilizada solução de AMP preparada no primeiro dia do teste.

3.6.2. Preparo da Solução de AMP para o Método Cromatográfico ³⁹

Uma massa de 50,0 mg de AMP foi transferida para um balão volumétrico de 250 mL, completando-se o volume com metanol (solução 1). Desta solução, foram pipetados 25,00 mL e transferidos para um balão volumétrico de 50 mL. Completou-se o volume com metanol e em seguida filtrou-se a solução membrana com porosidade de 0,45 μm (solução 2). Por diluição adequada com metanol da solução 2, foram preparadas soluções com concentrações de 50, 75, 100, 125 e 150 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para elaboração de curva de calibração do método cromatográfico para dosagem de AMP em comprimidos ³⁹.

3.6.3. Solução de H_2SO_4

Preparou-se solução de H_2SO_4 de 1 a 11 mol L^{-1} por diluição do ácido concentrado com água destilada.

3.6.4. Solução de HCl

Preparou-se solução de HCl de 2 a 12 mol L^{-1} por diluição do ácido concentrado com água destilada.

3.6.5. Solução de H_3PO_4

Preparou-se solução de H_3PO_4 de 2 a 12 mol L^{-1} por diluição do ácido concentrado com água destilada.

3.6.6. Solução de Molibdato de Amônio 2,5% (m:v)

Esta solução foi preparada pela dissolução em água destilada de 2,5 g do sal $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ em balão volumétrico de 100 mL.

3.6.7. Fase Móvel para o Método Cromatográfico

Foi preparada uma mistura de solução de aquosa de $(\text{NH}_4)\text{HPO}_4$ $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ e metanol, na proporção volumétrica 80:20. O pH foi ajustado para $7,2 \pm 0,1$ pela adição de H_3PO_4 85%³⁹.

3.7. Determinação do Ponto de Fusão

Para as medidas de ponto de fusão, foi utilizado o método clássico com tubo de Thiele. Colocava-se uma pequena quantidade do composto de interesse no tubo capilar que era preso a um termômetro com o auxílio de um pequeno elástico. O termômetro era preso a uma rolha perfurada e o sistema inserido no tubo de Thiele contendo óleo de silicone, conforme ilustra a Figura 6.

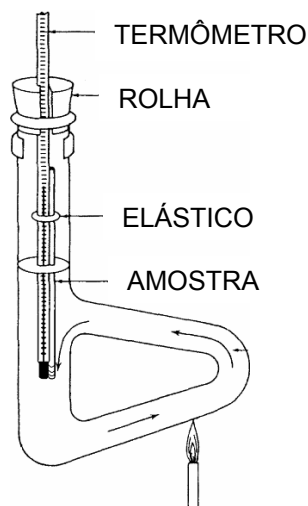


Figura 6. Montagem com tubo de Thiele, utilizada na determinação do ponto de fusão.

O tubo de Thiele foi aquecido na chama de um bico de Bunsen. Observou-se a temperatura em que o sólido começou a fundir e a temperatura do fim da fusão, obtendo-se a faixa de fusão dos compostos. Este procedimento foi realizado em triplicata. Nesta etapa, bem como nos procedimentos de *spot tests* com ácido sulfúrico concentrado foram utilizados alguns corticóides (acetato de cortisona, acetato de hidrocortisona, cortisona e hidrocortisona) para posterior comparação com medicamentos contendo AMP.

3.8. *Spot Test* com Ácido Sulfúrico Concentrado

Num tubo de ensaio, misturavam-se cerca 10 mg da amostra (padrão ou medicamento previamente macerado com o auxílio de almofariz e pistilo) ou 3 gotas do medicamento em solução e 5 gotas de H_2SO_4 concentrado.

3.9. Otimização das condições de reação

Como citado anteriormente, inicialmente neste trabalho foi testado o procedimento proposto por Pezza e colaboradores^{52, 53} e Crivelente e Rossi⁵⁴ para determinação do corticóides, no que diz respeito a quantidade e ordem de reagentes. Considerando diversas condições de trabalho envolvidas, um estudo de adaptação do sistema reacional foi necessário para otimização de parâmetros como tempo e temperatura de reação, concentração do H_2SO_4 e tipo de solvente.

3.9.1 Sistema reacional para obtenção da espécie monitorada em 406 nm

Este procedimento consistia em reagir num tubo de ensaio de 10 mL (aferido para 5,00 mL) 500 μL de solução de AMP, 500 μL de água destilada, 3 mL de solução de ácido e 1 mL de solução de molibdato de amônio 2,5 % (m/v), totalizando 5,00 mL de solução final. Os tubos eram fechados com fita TEFLON[®] perfurada e aquecidos em banho-maria.

O tipo e a concentração de ácido, o solvente de AMP, o tempo e a temperatura de aquecimento foram condições e parâmetros de reação otimizados. Para cada condição estudada, o procedimento foi realizado em quintuplicata para cada concentração de AMP.

Após o aquecimento, os tubos eram resfriados em banho de gelo por 10 min e depois mantidos a temperatura ambiente durante 15 min. Em todos os casos, ao final do procedimento, a mistura reacional, originalmente uma solução incolor, apresentava-se na forma de uma solução de coloração verde-azulada. Posteriormente, fazia-se o acerto de volume para 5 mL com solução ácida,

obtendo-se em seguida o espectro na faixa de 190 a 800 nm da solução resultante, usando-se cubetas de quartzo, com 1,0 cm de caminho óptico.

3.9.2 – Solvente do AMP

Foram realizados experimentos empregando-se 2 solventes para preparar a solução de AMP: clorofórmio e acetonitrila.

3.9.2.1 - Reação com Solução de AMP em Clorofórmio

Para a solubilização do AMP, utilizou-se como solvente clorofórmio p.a.; em seguida, realizou-se o procedimento descrito no item 3.9.1. utilizando-se H_2SO_4 com aquecimento a 90°C durante 50 minutos. Destaca-se que neste caso, durante a etapa de aquecimento, os tubos eram agitados manualmente para favorecer a evaporação do clorofórmio. Em todos os casos, foi observado que, ao final do procedimento, a mistura reacional, originalmente uma solução incolor, apresentava-se na forma de uma solução de coloração verde-azulada.

3.9.2.2 - Reação com Solução de AMP em Acetonitrila

Para a solubilização do AMP, utilizou-se como solvente acetonitrila p.a.. Em seguida, realizou-se o procedimento descrito no item 3.8.1 utilizando-se H_2SO_4 com aquecimento a 90°C durante 50 minutos. Analogamente aos testes com clorofórmio, em todas as replicatas foi observado que, ao final do procedimento, a mistura reacional que originalmente era uma solução incolor, apresentava-se na forma de uma solução de coloração verde-azulada.

3.9.3 – Solução de ácido

Estudou-se o sistema reacional utilizando o ácido H_2SO_4 em várias concentrações e também HCl e H_3PO_4 na tentativa de substituí-lo para os testes de identificação do produto da reação. Realizou-se o procedimento descrito no item 3.8.1, porém utilizando cada um dos ácidos citados em diversas concentrações.

3.9.3.1 – Efeito da Concentração de H_2SO_4

Foram avaliadas diferentes concentrações deste ácido visando verificar se seria possível baixar sua concentração sem prejudicar a formação do produto. Foram preparadas soluções de H_2SO_4 nas concentrações de 2 a 11 mol L^{-1} . Neste estudo, aplicou-se o procedimento descrito no item 3.8.1, alterando-se a concentração de H_2SO_4 na faixa citada.

3.9.3.1 – Uso de HCl e de H_3PO_4

Foi avaliada a possibilidade de uso desses ácidos em substituição a H_2SO_4 a fim de se alcançarem condições de reação mais brandas que seriam necessárias para o estudo do produto de reação por espectrometria de massas. Neste estudo, aplicou-se o procedimento descrito no item 3.8.1, utilizando-se individualmente os ácidos citados em soluções de concentração 2 a 12 mol L^{-1} .

3.9.4 – Efeito da Temperatura e do tempo de Aquecimento

Foi realizado um planejamento experimental 2^2 , descrito na Tabela 1, no qual foram avaliados em triplicata 2 tempos de reação (50 e 70 minutos) e 2 temperaturas diferentes (70 e 90 °C), totalizando 4 experimentos, utilizando solução de AMP ($5,9 \times 10^{-2}$ mg mL^{-1}). Nesta etapa, foi realizado procedimento descrito no item 3.8.1, alterando-se o tempo e a temperatura de aquecimento.

Tabela 1. Planejamento experimental realizado para otimização de tempo e temperatura de aquecimento.

Variável	Nível	
	-1	+1
Tempo	50	70
Temperatura	70	90

3.10. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Esta técnica foi empregada a fim de verificar a exatidão do método proposto quando comparado. Foi utilizado o procedimento desenvolvido por Fatmi, Willians e Hickson³⁹ para determinação de AMP em comprimidos^e.

3.10.1. Condições cromatográficas

- Detector UV-Vis , com operação em 234 nm (SPD 10AF, Shimatzu);
- Coluna: C18 (Nucleosil silica 5 mm, 100 Å; Macherey-Nagel);
- Vazão: 1 mL/min;
- Tempo de eluição: 7 minutos

3.11. Preparo das Amostras de Medicamentos

3.11.1. Ensaios Espectroanalíticos (UV-VIS)

Para esta etapa foi seguido o procedimento recomendado pela Farmacopéia americana (USP XXV)³⁰.

3.11.1.1. Comprimidos

Foram pesados e triturados 20 comprimidos. Massa equivalente a 25 mg de AMP foi dissolvida em 15 mL de clorofórmio. Esta mistura foi filtrada com papel de filtro qualitativo. O filtrado foi evaporada em banho-maria para evaporação do solvente. O resíduo obtido foi seco em estufa a 105 °C por 3 horas³⁰.

Após resfriamento do material, este foi submetido ao procedimento 3.9.1. nas condições otimizadas.

3.11.1.2. Suspensão Injetável

Massa equivalente a 50 mg de AMP foi centrifugada por 1 minuto a 3000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com duas

^e A utilização do método oficial de determinação de AMP recomendado pela Farmacopéia Americana (USP XXV)³⁰ foi inviabilizada devido à indisponibilidade de coluna cromatográfica adequada. Neste contexto, optou-se pela utilização do método descrito por Fatmi, Willians e Hickson para determinação de AMP em comprimidos³⁹.

porções de 15 mL de água destilada. O sólido foi dissolvido em clorofórmio, transferido para um béquer e colocado em banho-maria para evaporação do solvente. O resíduo obtido foi seco em estufa a 105 °C por 3 horas³⁰. Após resfriamento do material, este foi submetido ao procedimento 3.9.1. nas condições otimizadas.

3.11.2 Ensaios Cromatográficos

3.11.2.1. Preparo da Amostra

Seguindo o procedimento desenvolvido por Fatmi, Willians e Hickson³⁹, foram pesados 20 comprimidos contendo AMP para determinar a massa média dos mesmos. Os comprimidos foram triturados e transferiu-se massa equivalente a 10 mg de AMP para um balão volumétrico de 50 mL. Adicionaram-se 10 mL de metanol e deixou-se em ultra-som por 5 minutos. Completou-se o volume do balão com metanol. Desta solução foram pipetados 25 mL que foram transferidos para um balão volumétrico de 50 mL, completando-se o volume novamente com metanol. Esta solução foi filtrada em membrana porosa de 0,45 µm.

3.12. Identificação do produto da reação

3.12.1. Espectros no Infravermelho médio

Na tentativa de identificar o produto da reação entre o AMP em Mo(VI) em meio de H₂SO₄, foram obtidos espectros no infravermelho dos reagentes e da espécie monitorada, empregando-se a técnica de transmissão (pastilha de KBr e janelas de NaCl) e reflexão total atenuada com cela de ATR (do inglês *Attenuated Total Reflectance*) com cristal de ZnSe, no intervalo espectral de 4000 a 600 cm⁻¹, com 16 e 256 varreduras respectivamente.

3.12.2. Espectrometria de Massas

Outra ferramenta considerada para identificação do produto da reação foi espectrometria de massas. Como o sistema reacional era constituído de agente oxidante muito forte (H_2SO_4), foram realizados testes para obtenção do produto da reação em condições compatíveis para injeção no espectrômetro de massas.

3.12.2.1 Neutralização do Sistema Reacional

Inicialmente, optou-se por testar a eficiência e adequação de neutralizar o sistema reacional utilizando-se solução de NaOH. A solução básica era adicionada gota a gota e o pH era medido acompanhado com papel indicador universal.

3.12.2.2. Extração Líquido-Líquido da Espécie Monitorada.

Na tentativa de extrair a espécie monitorada do meio reacional, alguns solventes orgânicos de polaridades diferentes foram testados.

Foram adicionados 10 mL da solução contendo a espécie monitorada e 10 mL de solvente em funil de separação. Os solventes testados foram clorofórmio, hexano, acetato de etila.

Com estes testes não foi possível obter o produto da reação em condições compatíveis para injeção no espectrômetro de massas. Neste contexto, a técnica não pode ser aplicada.

3.13. Figuras de Mérito

Na avaliação do desempenho do método desenvolvido, diversos experimentos foram realizados para obtenção de parâmetros de mérito analítico.

3.13.1. Linearidade

Este parâmetro foi avaliado a partir dos resultados obtidos na elaboração da curva de calibração. É a capacidade de um método analítico de demonstrar

que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração da espécie de interesse na amostra, dentro de um intervalo especificado⁶⁹. Foi utilizado o coeficiente de correlação (r) da curva analítica.

3.13.2. Intervalo

É definida como a faixa de concentração na qual a sensibilidade do método pode ser mantida constante. Foram realizados experimentos segundo o item 3.9.1 variando as concentrações de AMP de 80 % a 120 % do valor teórico.

3.13.3. Precisão

A precisão de um método analítico pode ser expressa como o desvio padrão ou desvio padrão relativo de uma série de medidas⁶⁹. A avaliação da precisão das medidas é realizada pelos dados de Repetibilidade e Precisão Intermediária⁶⁹.

3.13.3.1. Repetibilidade

A repetibilidade do método foi verificada por 9 determinações do analito, contemplando o intervalo linear do método, ou seja, 3 concentrações: baixa, média e alta, com 3 replicatas de cada⁶⁹.

3.13.3.2. Precisão Intermediária

Trata-se da concordância entre os resultados obtidos num mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes, com analistas diferentes e/ou equipamentos diferentes. Para a determinação da precisão intermediária, recomenda-se um mínimo de 2 dias diferentes com analistas diferentes⁶⁹.

O valor máximo de variação aceitável deve ser definido de acordo com a metodologia empregada, a concentração da espécie de interesse na amostra, o tipo de matriz e a finalidade do método, não se admitindo valores superiores a $\pm 5\%$ ⁶⁹. Para análises realizadas com preparações farmacêuticas são admitidos

desvios inferiores a $\pm 2\%$ ³⁰. Foram encontradas as concentrações médias de AMP (5 replicatas) em 3 valores diferentes, em procedimentos realizados em 5 dias.

3.13.4. Especificidade

Para avaliar a especificidade da espécie monitorada frente aos seus produtos de degradação (ação de ácido, base ou agente oxidante) ^{70,71}, investigou-se o efeito da exposição do AMP a esses agentes.

Preparou-se solução de AMP $1,5 \text{ mg mL}^{-1}$ pela dissolução do sólido nas soluções dos agentes de degradação e a menor quantidade possível de acetonitrila. Foram obtidas soluções de AMP $1,5 \text{ mg mL}^{-1}$ em HCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, em NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e (H_2O_2 3 % m/v. Após 72 h, utilizou-se a solução de AMP para iniciar a reação colorimétrica, conforme descrito no item 3.9.1. Isto serviria para se verificar se a exposição aos agentes de degradação manteria a mesma reatividade do AMP na reação colorimétrica.

Pra efeitos de comparação com o método cromatográfico, o suposto produto de degradação alcalina também foi analisado também por cromatografia líquida de alta eficiência.

3.13.5. Estabilidade

Solução de AMP $1,5 \text{ mg mL}^{-1}$ em acetonitrila foi exposta à luz ambiente e ao calor (em estufa) até 72 horas. A cada 12 horas era realizado o procedimento descrito no item 3.9.1 para verificar a eventual degradação do AMP. Notou a degradação a partir de 72 horas de exposição e o teste foi encerrado.

3.13.6. Exatidão

Este parâmetro foi avaliado por comparação de resultados obtidos na determinação da espécie monitorada em 406 nm em amostras comerciais de medicamentos pelo método proposto e pelo método de Fatmi, Willians e Hickson ³⁹ para determinação de AMP em comprimidos por cromatografia.

CAPÍTULO 4 – RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1. Testes de Identificação de AMP

No trabalho de Crivilente ⁵⁴, que empregou a reação de corticóides com Mo(VI) em H₂SO₄, foi constatado que diversos derivados da cortisona produziam um mesmo composto azul esverdeado. Para contornar a falta de especificidade da reação, foi introduzida uma etapa de identificação de AMP com testes preliminares simples. Esta etapa de trabalho contou com a colaboração da estudante de Iniciação Científica, Luciana Martins Foltram ^f.

4.1.1 Ponto de Fusão

A determinação do ponto de fusão é um procedimento clássico e simples para identificação de substâncias. O ponto de fusão é um dado que pode ser facilmente determinado e depende de pureza dos materiais, por isso é útil para indicar aspectos de qualidade das substâncias além de trazer informações sobre de sua composição.

A Tabela 2 descreve os valores médios de temperatura do ponto de fusão obtidos para AMP e os diversos compostos que participam da reação de forma análoga com Mo(VI) em H₂SO₄, incluindo resultados obtidos com as amostras de medicamentos comerciais.

Tabela 2. Valores de ponto de fusão experimentais e da literatura ⁵⁷.

Composto	Ponto de Fusão Médio (°C)	Ponto de Fusão Literatura (°C)
Acetato de cortisona	213-218	220-224
Acetato de hidrocortisona	212-214	216-222
Cortisona	213-218	220-224
Hidrocortisona	212-216	217-220
AMP	206-209	207-209
Comprimidos (10 mg de AMP)	202-206	207-209
Suspensão Injetável (150 mg de AMP)	206-209	207-209

^f O trabalho da Srta. Martins “Proposta de Baixo Custo para Identificação e Quantificação de Acetato de Medroxiprogesterona”, foi apresentado no XIII Congresso Interno de Iniciação Científica da UNICAMP e recebeu prêmio de Mérito Científico em setembro de 2005 ⁷²

Observou-se que os valores de pontos de fusão obtidos tanto para o padrão de AMP quanto para os medicamentos em comprimido (10 mg de AMP) e suspensão injetável (150 mg de AMP) são distintos daqueles obtidos para os corticóides, permitindo identificar a presença de AMP na amostra a ser testada. As médias dos pontos de fusão obtidos para os compostos descritos na Tabela 2 foram analisadas estatisticamente, utilizando-se teste t-Student, num intervalo de confiança de 95%^{73,74}.

Tabela 3. Resultados da análise estatística comparando os valores médios de ponto de fusão entre corticóides e derivados de AMP.

Pares de Comparação	Valor de $t_{calculado}$
Acetato Cortisona e Acetato de Hidrocortisona	1,723
Acetato Cortisona e Cortisona	0,365
Acetato Cortisona e Hidrocortisona	0,830
Acetato Cortisona e AMP	5,208
Acetato Cortisona e Comprimido	7,026
Acetato Cortisona e Suspensão	5,455
Acetato de Hidrocortisona e Cortisona	2,121
Acetato de Hidrocortisona e Hidrocortisona	0,894
Acetato de Hidrocortisona e AMP	5,842
Acetato de Hidrocortisona e Comprimido	7,682
Acetato de Hidrocortisona e Suspensão	6,000
Cortisona e Hidrocortisona	1,206
Cortisona e AMP	5,455
Cortisona e Comprimido (10 mg de AMP)	7,214
Cortisona e Suspensão (150 mg/mL de AMP)	5,692
Hidrocortisona e AMP	5,033
Hidrocortisona e Comprimido (10 mg de AMP)	6,983
Hidrocortisona e Suspensão (150 mg/mL de AMP)	5,292
AMP e Comprimido (10 mg de AMP)	3,130
AMP e Suspensão (150 mg/mL de AMP)	0,577
Comprimido (10 mg de AMP) e Suspensão (150 mg/mL de AMP)	2,540

O valor de t_{tabelado} para estas condições ($\alpha = 0,05$; $\nu = 2$) é 4,303. Sempre que os valores de $t_{\text{calculado}}$ são maiores que o valor de t_{tabelado} há diferença estatisticamente significativa. Na Tabela 3, podem ser observados os valores de $t_{\text{calculado}}$ na comparação entre os diversos compostos e produtos. NA comparação de corticóides e AMP, inclusive em medicamentos, todos os valores destacados representaram $t_{\text{calculado}}$ maior que o t_{tabelado} . Este resultado demonstra que é possível diferenciar corticóides de AMP realizando testes de ponto de fusão dos compostos.

4.1.2. Teste com Ácido Sulfúrico Concentrado

O procedimento de *spot test* envolve realizar reações específicas, preferencialmente rápidas, utilizando pequena quantidade de amostras e reagentes com a finalidade de obter uma resposta rápida e objetiva sobre a presença de um determinado composto⁶⁷. Neste trabalho, empregou-se o *spot test* com ácido sulfúrico concentrado. O ácido sulfúrico é um poderoso agente oxidante e forma produtos com colorações bem definidas em reação com diferentes compostos orgânicos. Esta reação com esteróides insaturados resulta em produto de coloração marron, por ação na ligação dupla de anéis com 6 átomos de carbono. O colesterol, por exemplo, possui uma dupla ligação C5-C6 no seu anel beta correspondente ao do ciclopentanoperidrofenantreno e reage com o ácido sulfúrico dando um produto de cor marrom⁷⁵.

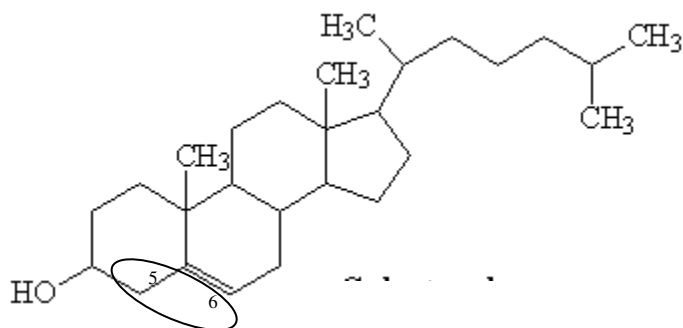


Figura 7. Estrutura do colesterol com destaque da região atacada em reação com H_2SO_4 ⁷⁶.

Os compostos derivados de corticóides e de AMP, assim como algumas preparações farmacêuticas comerciais foram submetidos ao *spot test* com ácido sulfúrico concentrado. O resultado obtido está descrito na Tabela 4.

Tabela 4. Resultado de *spot tests* com H₂SO₄ concentrado.

Composto	Coloração da solução
Acetato de Cortisona	Marrom
Acetato de Hidrocortisona	Marrom escuro
Cortisona	Marrom escuro
Hidrocortisona	Marrom escuro
AMP	Amarelo claro
Comprimidos (10 mg de AMP)	Amarelo
Suspensão Injetável (150 mg mL ⁻¹ de AMP)	Amarelo claro
Solução otológica (10 mg mL ⁻¹ de hidrocortisona)	Marron claro

Neste teste, o padrão de AMP e as preparações farmacêuticas que contém este princípio ativo resultaram em soluções com apresentaram coloração amarela, enquanto que o produto da reação dos corticóides e um medicamento contendo cortisona apresentaram coloração mais escura, de tonalidade marrom. Este resultado indica que este *spot test* é útil para a diferenciação entre corticóides e AMP, inclusive em formulações farmacêuticas compostos contendo tais princípios ativos.

A reação empregada neste trabalho entre Mo(VI) em meio fortemente ácido pode ocorrer com vários esteróides. A combinação dos resultados do *spot-test* com os valores encontrados para o ponto de fusão é uma ferramenta simples e eficiente para conferir seletividade ao método, já que permite identificar com segurança o AMP frente aos outros compostos avaliados que participam analogamente da reação analítica.

4.2. Espectros Eletrônicos da Espécie Monitorada

A reação entre AMP e Mo(VI)/H₂SO₄ ocorre segundo o esquema descrito na Figura 4 (página 12) e gera um produto azul esverdeado cuja concentração estimada a partir de valores de absorvância da solução obtida é diretamente proporcional à quantidade inicial de AMP.

O espectro eletrônico da solução da “*espécie monitorada*” (produto da reação com concentração proporcional a concentração inicial de AMP) é apresentado na Figura 8, onde se notam máximos de absorção em 406 e 665 nm. Devido à maior intensidade da absorção em 406 nm, este comprimento de onda foi utilizado para construção das curvas de calibração.

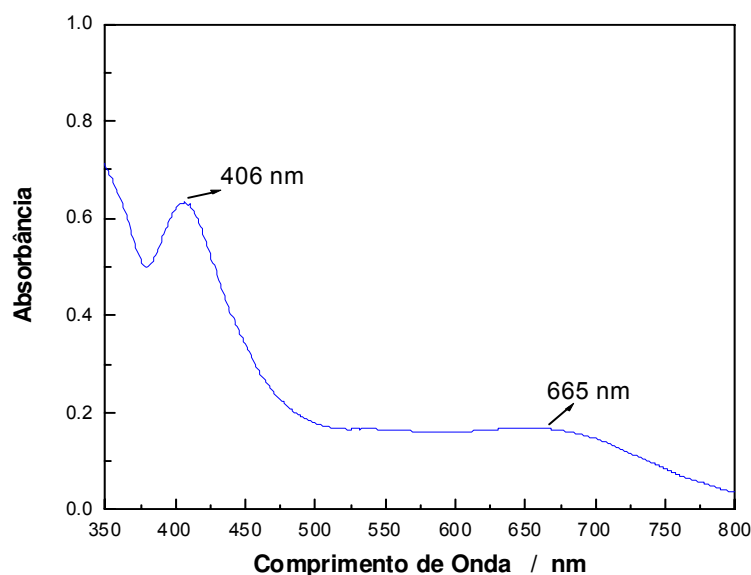


Figura 8. Espectro da solução da espécie monitorada obtida a partir de solução $5,96 \times 10^{-2} \text{ mg mL}^{-1}$ de AMP

4.3.1. Otimização do Sistema Reacional AMP-Mo(VI)

Como citado anteriormente, inicialmente neste trabalho foi testado o procedimento proposto por Pezza e colaboradores^{52,53} e Crivelente⁵⁴ para determinação do corticóides, no que diz respeito à quantidade e ordem de reagentes. Considerando diversas condições de trabalho envolvidas, um estudo de adaptação do sistema reacional foi necessário para otimização de parâmetros como tempo e temperatura de reação, concentração do H₂SO₄ e tipo de solvente.

Na sequência são descritos os resultados obtidos nestes testes de otimização.

4.3.2. Solvente do AMP

Na reação proposta por Pezza^{52,53} e colaboradores assim como nos estudos realizados por Rossi e Crivelente⁵⁴, clorofórmio era utilizado como solvente de AMP, assim as misturas reacionais deviam ser manipuladas rapidamente para evitar evaporação, além de se tratar de solvente potencialmente tóxico. Nos primeiros testes do presente trabalho, empregou-se clorofórmio para a dissolução do AMP e deste modo a mistura reacional era constituído por 2 fases, notando-se dificuldade de migração do princípio ativo AMP da fase orgânica para a fase aquosa onde os demais reagentes encontravam-se. Para minimizar esta dificuldade, era necessário agitar vigorosamente os tubos reacionais durante o período de aquecimento a fim de melhorar a repetibilidade dos resultados.

Os resultados obtidos utilizando-se clorofórmio como solvente do AMP apresentavam desvios relativos de até $\pm 7,4\%$, conforme dados descritos na Tabela 5, não aceitáveis para os propósitos da análise envolvendo medicamento. Estes resultados, que também sugeriam tendência de decomposição da solução de AMP utilizada, foram obtidos seguindo o procedimento do item 3.9.1, realizando-se medidas em quintuplicata durante 5 dias.

Tabela 5. Avaliação da precisão dos resultados com clorofórmio como solvente de AMP.

$C_{AMP} \text{ mg L}^{-1}$	(%RSD*; n=5).				
	1	2	3	4	5
0,950	7,39	5,98	4,33	3,78	2,87
1,90	4,09	1,85	1,87	1,27	0,89
3,33	1,13	1,05	0,690	0,53	0,38

* %RSD = o desvio padrão relativo percentual, definido por $100 \cdot s / x$, onde s é a estimativa do desvio padrão e x a média aritmética da 5 replicatas.

Neste contexto, seria adequado substituir o solvente do AMP, buscando-se um reagente com características mais favoráveis, como menor toxicidade e

volatilidade que o clorofórmio, além de ser miscível com água. A opção foi acetonitrila, cuja toxicidade e volatilidade são inferiores ao clorofórmio. A Tabela 6 descreve algumas propriedades dos solventes.

Tabela 6. Algumas características físico-químicas e de toxicidade de acetonitrila e clorofórmio ³⁶.

	Clorofórmio:	Acetonitrila:
LD* ₅₀ (oral, rato):	908mg kg ⁻¹	2730 a 3800 mg kg ⁻¹
Potencial cancerígeno	C:3	
Ponto de Ebulição	61 °C.	82 °C
Solubilidade em água (25°C)	8g L ⁻¹	solúvel

* LD = dose letal em ratos

A substituição de clorofórmio como solvente do AMP para acetonitrila proporcionou melhora expressiva na precisão dos dados, conforme está descrito na avaliação das Figuras de Mérito (item 4.5.1.5. Precisão), onde são apresentados os valores obtidos de desvios inferiores a $\pm 2\%$.

4.3.4. Efeito da Concentração de H₂SO₄

Ácido sulfúrico é um forte agente oxidante, necessário para que ocorra a formação do produto na reação de AMP com Mo(VI). Foram avaliadas diferentes concentrações deste ácido a fim de se verificar seu efeito na formação da espécie monitorada. A Figura 9 ilustra o comportamento do sistema reacional em diferentes concentrações do H₂SO₄ mediante a verificação da absorbância da solução resultante.

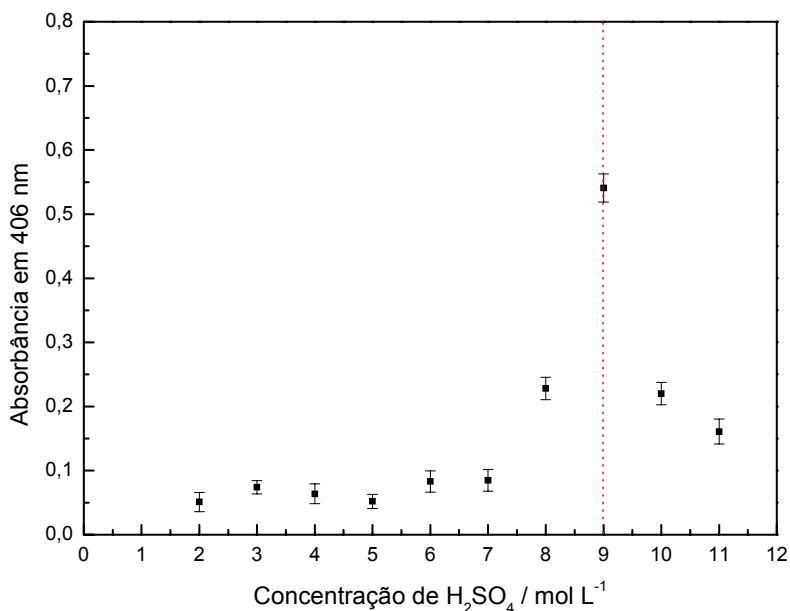


Figura 9. Efeito da concentração de H_2SO_4 na absorbância do produto de reação obtido a partir de solução de AMP $4,30 \times 10^{-2} \text{ mg mL}^{-1}$.

Observou-se que não há variação significativa no valor da absorbância em 406 nm, quando se usaram soluções de H_2SO_4 de 2 e 7 mol L^{-1} de. A partir da concentração 8 mol L^{-1} houve um aumento no valor da concentração do produto obtido, que a absorbância, atingindo o máximo de absorção foi máxima usando-se H_2SO_4 9 mol L^{-1} . Concentrações superiores do ácido resultam em diminuição significativa do sinal medido, indicando que há realmente um compromisso importante entre a concentração de H_2SO_4 e a quantidade de produto formado.

Isto aponta para uma característica crítica do método, mas que pode facilmente ser controlada já que se trata de solução de preparo e conservação simples.

4.2.3. Avaliação de Soluções Ácidas para substituir o H_2SO_4

Estes ensaios, descritos no item 3.9.3, na página 22, foram realizados a fim de avaliar condições reacionais mais brandas para viabilizar estudos de identificação do produto da reação pela técnica de espectrometria de massas,

para a qual o uso de soluções de HCl e H_3PO_4 é mais indicado. As Figuras 10 e 11 descrevem as absorbâncias das soluções em 406 nm, após as reações com as diversas concentrações dos ácidos estudadas.

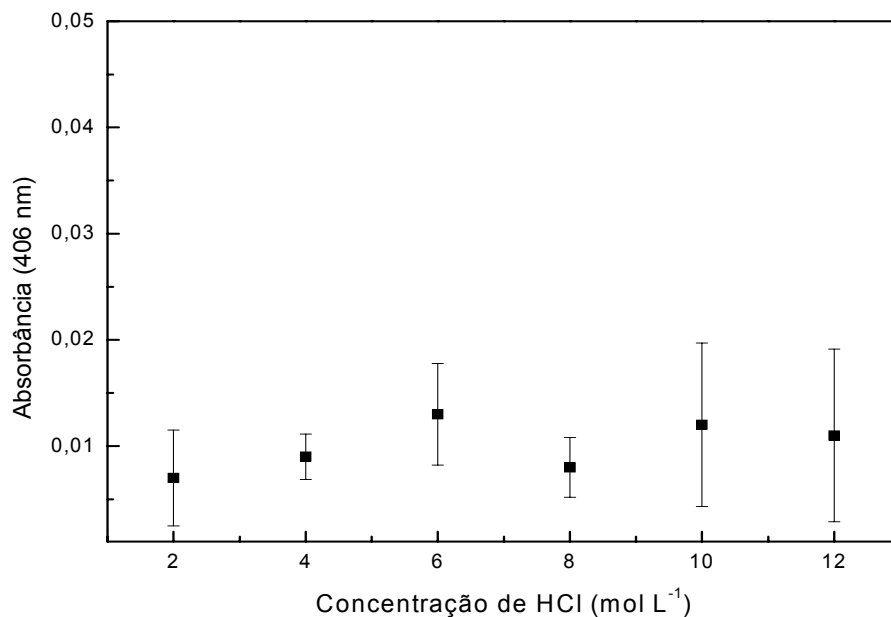


Figura 10. Efeito da concentração de HCl na absorbância da espécie monitorada, obtida a partir de AMP $4,30 \times 10^{-2} \text{ mg mL}^{-1}$.

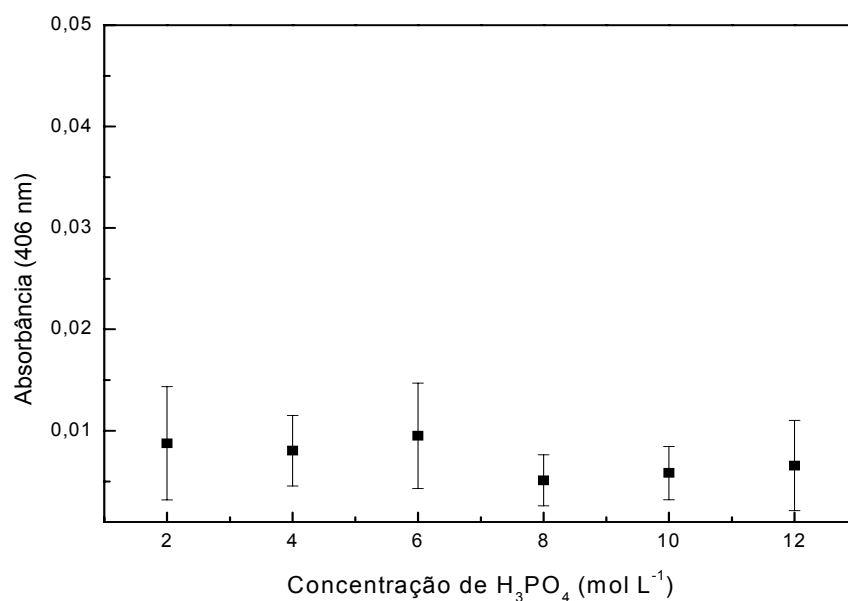


Figura 11. Efeito da concentração de H_3PO_4 na absorbância da espécie monitorada, obtida a partir de AMP $4,30 \times 10^{-2} \text{ mg mL}^{-1}$.

Observou-se que tanto o HCl quanto o H_3PO_4 quando empregados no sistema reacional, não foram eficientes para a formação do produto com absorção em 406 nm, provavelmente por não atuarem terem a mesma característica oxidante do H_2SO_4 .

4.2.5. Efeito da Temperatura e do Tempo de Aquecimento

Foi realizado um planejamento experimental 2^2 , descrito na Tabela 7, no qual foram avaliados em triplicata 2 tempos de reação (50 e 70 minutos) e 2 temperaturas diferentes (70 e 90 °C), totalizando 4 experimentos, utilizando solução de AMP ($5,9 \times 10^{-2}$ mg mL⁻¹). Os dados estatísticos foram processados pelo software Design-Expert v. 5 (Stat-Ease Corp, Minneapolis/USA, 1997).

Tabela 7. Resultados obtidos nos experimentos realizados para otimização do tempo e temperatura de aquecimento.

Variável	Nível		Prob > t *
	-1	+1	
Tempo	50	70	0,4538
Temperatura	70	90	0,0319

*Prob > |t| é o dado que indica se a variável é ou não significativa no sistema reacional.

Se Prob > |t| for < 0,05; a variável é significativa, se $\geq 0,05$, a variável não afeta o sistema reacional⁷⁴.

De acordo com os resultados obtidos, a variável tempo (50 ou 70 minutos) não afetou significativamente o sinal analítico, porém o aumento no tempo de reação diminuiu a dispersão dos dados. A temperatura alterou significativamente o sinal analítico quando passou da temperatura 70 °C para 90°C.

4.2.5. Resumo das Condições Reacionais Otimizadas

- Substituição do solvente de AMP, de clorofórmio para acetonitrila;
- Concentração de H_2SO_4 : 9 mol L⁻¹;
- Tempo de Aquecimento: 70 minutos;
- Temperatura: 90 °C.

4.3. Quantificação da Espécie Monitorada em 406 nm

A Tabela 8 apresenta as concentrações de AMP e os respectivos valores de absorvância da espécie monitorada em 406 nm em condições otimizadas. Com estes dados foi possível construir curvas de calibração relacionando a absorvância da espécie monitorada em 406 nm com as concentrações iniciais de AMP entre $8,61 \times 10^{-4}$ e $8,94 \times 10^{-2}$ mg mL⁻¹.

Tabela 8: Absorvância da solução da espécie monitorada obtida a partir de diferentes concentrações de solução de AMP.

Ponto	Concentração de AMP (10 ⁻² mg mL ⁻¹)	Absorvância* em 406 nm
1	0,000	0,016±0,003
2	1,49	0,160±0,005
3	2,98	0,281±0,002
4	4,47	0,417±0,004
5	5,96	0,60±0,01
6	7,45	0,78±0,01
7	8,94	0,95±0,02

* média de 5 replicatas

A Figura 12 ilustra a curva de calibração utilizada que relaciona a concentração de AMP (C_{AMP}) com a absorvância em 406 nm da solução da espécie monitorada (A_{406}) de acordo com a Equação 1, com coeficiente de correlação = 0,9972.

$$A_{406} = 9,46 \times 10^{-3} - 10,5 \times C_{AMP} \quad \text{Equação 1}$$

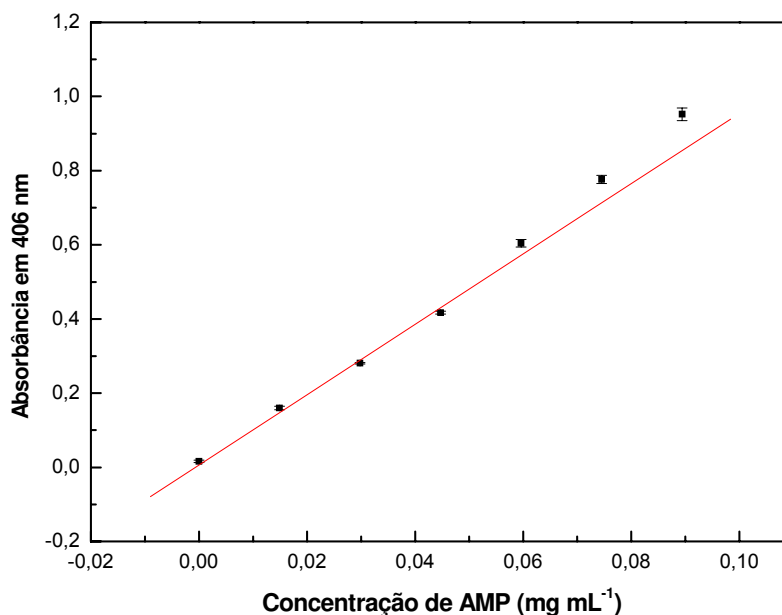


Figura 12. Curva analítica para a espécie monitorada nas condições de reação otimizadas.

4.3.1. Determinação de AMP em amostras comerciais pelo método da reação com Mo(VI)

Nos testes com medicamentos em suspensão e comprimidos, foi utilizada a curva analítica da Figura 11 para a determinação da concentração de AMP. Os resultados obtidos encontram-se descritos na Tabela 9.

Tabela 9. Resultados de concentração de AMP em amostras comerciais (média $\pm$ s)*

Concentração de AMP (mg mL ⁻¹)	
Suspensão Injetável (150 mg/mL)	Comprimidos (10 mg)
1,02 $\pm$ 0,01	1,00 $\pm$ 0,02

* média de triplicatas $\pm$ estimativa de desvio padrão

4.4. Determinação de AMP no Ultravioleta

Com esta técnica é possível realizar a quantificação de AMP de maneira simples e direta, não sendo necessárias etapas de aquecimento e resfriamento. Porém, apresenta algumas desvantagens com relação ao método proposto neste

trabalho. Um sistema colorimétrico de quantificação de AMP pode ser precursor para medidas fotométricas utilizando um dispositivo portátil de medidas e, até mesmo, desenvolver escalas visuais de cores relacionando a concentração de AMP com a intensidade da coloração. Com medidas no ultravioleta, esta proposta não é possível.

Apenas para efeito comparativo com o método proposto neste trabalho, foram obtidos espectros de AMP na região do ultravioleta, ilustrado na Figura 13.

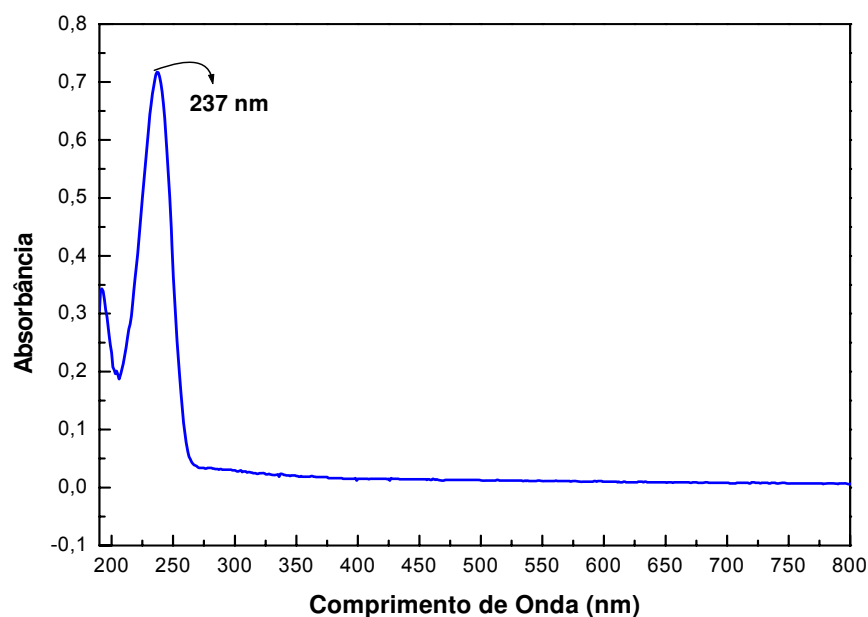


Figura 13. Espectro eletrônico de solução $6,12 \times 10^{-3} \text{ mg mL}^{-1}$ de AMP em acetonitrila () obtido em cela de quartzo com 1,0 cm de caminho óptico.

A Tabela 10 apresenta as concentrações de AMP (C_{AMP}) e os respectivos valores de absorbância em 237 nm (A_{237}) usados para construção de uma curva analítica na faixa de $1,02 \times 10^{-2}$ a $3,06 \times 10^{-2} \text{ mg mL}^{-1}$, descrita pela Equação 2 com coeficiente de correlação = 0,9996, ilustrada na Figura 14.

Tabela 10. Dados de absorbância obtidos para cada concentração de AMP.

Pontos	Concentração de AMP (mg mL^{-1})	Absorbância em 237 nm (Média $\pm$ SD)
1	$2,04 \times 10^{-3}$	$0,143 \pm 0,003$
2	$6,12 \times 10^{-3}$	$0,362 \pm 0,007$
3	$1,02 \times 10^{-2}$	$0,63 \pm 0,01$

4	$1,43 \times 10^{-2}$	$0,87 \pm 0,02$
5	$1,84 \times 10^{-2}$	$1,15 \pm 0,02$
6	$2,24 \times 10^{-2}$	$1,39 \pm 0,03$
7	$2,65 \times 10^{-2}$	$1,53 \pm 0,03$
8	$3,06 \times 10^{-2}$	$1,82 \pm 0,04$

$$A_{237} = 2,08 \times 10^{-2} + 59,0 \times C_{AMP}$$

Equação 2

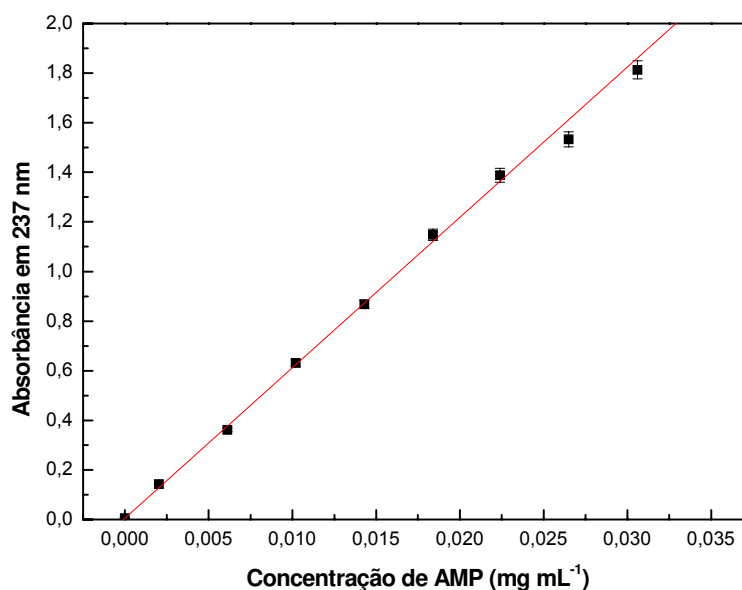


Figura 14. Curva analítica para AMP com medidas no ultravioleta.

4.4.1 Determinação da concentração de AMP em amostras comerciais pelo método ultravioleta.

Nos testes com medicamentos em suspensão e comprimidos, foi utilizada a curva analítica da Equação 2 para a determinação da concentração de AMP. Os resultados obtidos encontram-se descritos na **Tabela 11**.

Tabela 11. Resultados de concentração de AMP em amostras comerciais (média $\pm$ s)*

Concentração de AMP (método ultravioleta) mg mL ⁻¹	
Suspensão	Comprimidos
$1,00 \pm 0,01$	$0,99 \pm 0,01$

* média de triplicatas $\pm$ estimativa de desvio padrão

Apesar dos resultados obtidos pelo método ultravioleta apresentarem precisão muito alta das medidas, deve-se lembrar que muitos compostos orgânicos absorvem em 237 nm⁷⁷. Deste modo a seletividade do método é comprometida.

Um dos objetivos do presente trabalho é a proposta de simplificar a quantificação de AMP através de medidas fotométricas e escalas visuais correlacionado a concentração de AMP com a intensidade de coloração obtida. Portanto, o método ultravioleta é inadequado para esta proposta.

4.5. Validação do Método da reação com Mo(VI)

O objetivo de uma validação é demonstrar que o método é apropriado para a finalidade pretendida, ou seja, a determinação qualitativa, semi-quantitativa e/ou quantitativa de fármacos e outras substâncias em produtos farmacêuticos⁶⁹.

Um método poderá ser considerado validado, desde que sejam avaliados os parâmetros relacionados nas Tabelas 12 e 13.

Tabela 12. Classificação de testes, segundo sua finalidade. Normas estabelecidas pela Anvisa (Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde)⁶⁹.

Categoria	Finalidade do Teste
I	Testes quantitativos para a determinação do princípio ativo em produtos farmacêuticos ou matérias-primas.
II	Testes quantitativos ou ensaios limite para a determinação de impurezas e produtos de degradação em produtos farmacêuticos e matérias-primas.
III	Teste de desempenho (dissolução, liberação de ativo).
IV	Testes de Identificação

Para cada categoria de teste será exigido um conjunto ensaios, relacionados na Tabela 13.

Tabela 13. Ensaios necessários para a validação de método analítico, segundo sua finalidade ⁶⁹.

		Categoria				
		I	II		III	IV
Parâmetro			Quantitativo	Ensaio Limite		
	Especificidade	Sim	Sim	Sim	*	Sim
	Linearidade	Sim	Sim	Não	*	Não
	Intervalo	Sim	Sim	*	*	Não
Precisão	Repetibilidade	Sim	Sim	Não	Sim	Não
	Intermediária	**	**	Não	**	Não
	Limite de Detecção	Não	Não	Sim	*	Não
	Limite de Quantificação	Não	Sim	Não	*	Não
	Exatidão	Sim	Sim	*	*	Não
	Robustez	Sim	Sim	Sim	Não	Não

* pode ser necessário, dependendo da natureza do teste específico;

** se houver comprovação da reprodutibilidade não é necessária a comprovação de precisão intermediária.

O método espectrofotométrico proposto tem a finalidade de quantificar AMP em medicamentos comerciais e manipulados e, portanto se enquadra na categoria II, da Tabela 13, devendo, portanto, ser avaliadas as seguintes figuras de mérito: especificidade, linearidade, intervalo (faixa linear), precisão (repetibilidade de precisão intermediária), exatidão e robustez.

4.5.1 Figuras de Mérito

4.5.1.1. Especificidade e Seletividade

É a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz ⁷⁰. O parâmetro especificidade foi avaliado pelo estudo do produto de degradação, que consiste em simular processos de degradação da espécie de interesse, no caso AMP, expondo-a a condições como

calor, luz, solução ácida (HCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$), solução alcalina (NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$) e com agente oxidante (H_2O_2 3 % m/v) ^{70,71}.

4.5.1.2. Linearidade

É a capacidade de um método analítico de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração da espécie de interesse na amostra, dentro de um intervalo especificado ⁶⁹.

4.5.1.3. Intervalo

É a faixa entre o limite superior e inferior de um método analítico. É obtido no estudo da linearidade e depende da aplicação pretendida pelo método. É estabelecido pela confirmação de que o método apresenta exatidão, precisão, e linearidade adequados ⁶⁹.

4.5.1.4. Precisão

É a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra ⁶⁹.

4.5.1.4.1. Repetibilidade

Concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo com o mesmo analista e a mesma instrumentação.

A repetibilidade do método é verificada por, no mínimo, 9 determinações, contemplando o intervalo linear do método, ou seja, 3 concentrações, baixa, média e alta, com 3 réplicas cada ou no mínimo 6 determinações a 100% da concentração do teste (10 mg) ⁶⁹.

4.5.1.4.2. Precisão Intermediária

Concordância entre os resultados de um mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes, com analistas diferentes e/ou equipamentos diferentes. Para a determinação da precisão intermediária, recomenda-se um mínimo de 2 dias diferentes com analistas diferentes.

A precisão de um método analítico pode ser expressa como o desvio padrão ou desvio padrão relativo de uma série de medidas.

O valor máximo aceitável deve ser definido de acordo com a metodologia empregada, a concentração da espécie de interesse na amostra, o tipo de matriz e a finalidade do método, não se admitindo valores superiores a 5%⁶⁹.

4.5.1.5. Resultados Obtidos

De acordo com o Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos⁶⁹, o método espectrofotométrico proposto para a determinação de AMP em amostras comerciais de medicamentos foi validado, seguindo os parâmetros descritos na Tabela 13, de acordo com a categoria I. Os resultados estão apresentados nas Tabelas 14 a 16.

Tabela 14. Figuras de Mérito para o método espectrofotométrico proposto (n=5)

Parâmetros	Valor	
Faixa Linear	$(5,87 \times 10^{-3} \text{ a } 10,00 \times 10^{-2}) \text{ mg mL}^{-1}$	
Linearidade	0,9972	
Sensibilidade	10,5 mL mg ⁻¹	
Limite de detecção	$1,77 \times 10^{-3} \text{ mg mL}^{-1}$	
Limite de determinação	$5,87 \times 10^{-3} \text{ mg mL}^{-1}$	
Especificidade (produto de degradação) ⁶¹	HCl	não degrada
	NaOH	degrada
	H ₂ O ₂	degrada
Estabilidade	72 horas	

Especificidade:

De acordo com os resultados obtidos, não houve degradação do AMP quando exposto em solução ácida. A exposição em solução alcalina (NaOH) e oxidante (H_2O_2) degradou o AMP, alterando o produto da reação com Mo(VI) em H_2SO_4 . A Figura 15 ilustra os espectros obtidos para os produtos de degradação, indicando que houve ação efetiva de degradação por ação de NaOH e H_2O_2 .

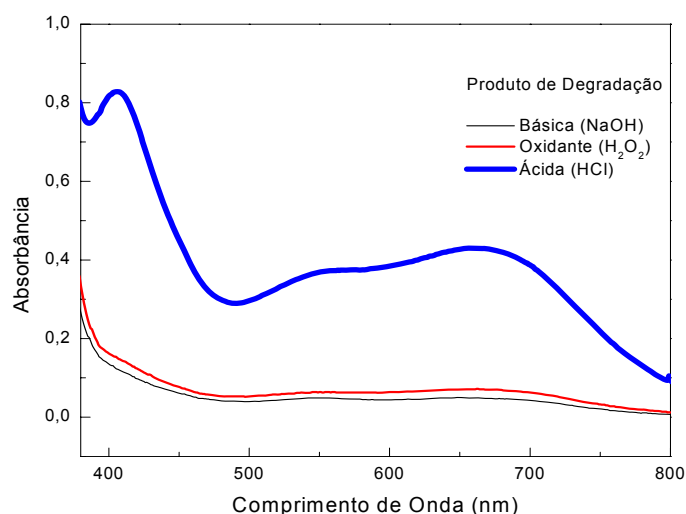


Figura 15. Espectros eletrônicos dos produtos da degradação do AMP em NaOH, H_2O_2 e HCl.

O produto de degradação alcalina também foi analisado por HPLC e o cromatograma obtido está ilustrado na Figura 16. Notou-se que também para esta técnica a degradação alcalina ocorre e o produto de degradação apresenta sinal diferente do sinal do produto não degradado, já que houve modificações no tempo de retenção dos compostos eluídos. Isto pode ser verificado pela comparação com os cromatograma da Figura 18.

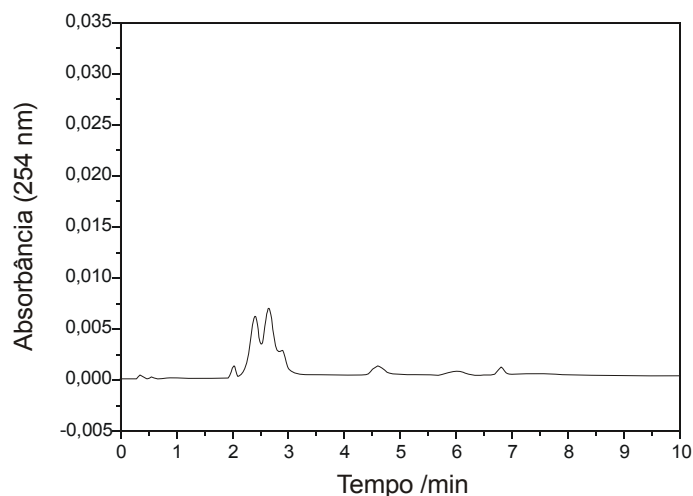


Figura 16. Cromatograma do produto da degradação alcalina de solução $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ de AMP, obtido nas condições descritas no item 3.10.

Estabilidade:

A exposição à luz e ao calor a partir de 72 horas alterou a solução de AMP, já que o produto da reação dessa solução com Mo(VI) em meio ácido não apresentou o espectro característico com intensa absorção em 406 nm. A Figura 17 ilustra o espectro do produto de reação obtido a partir da solução de AMP exposta à luz e ao calor por 72 horas.

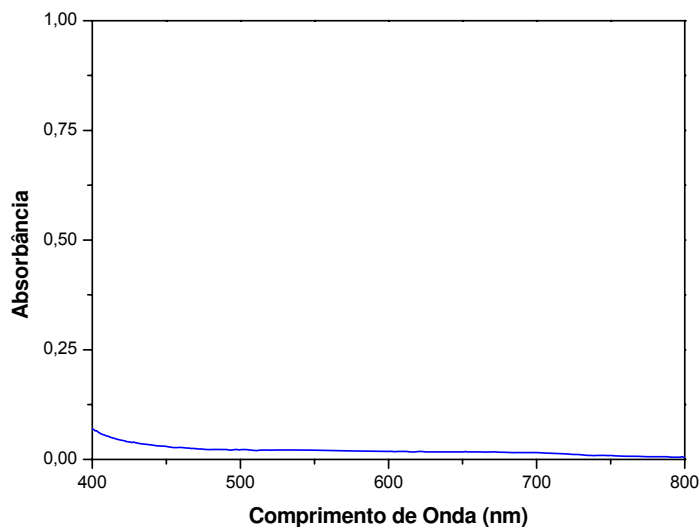


Figura 17. Espectro do produto obtido a partir de solução de AMP (10 mg mL^{-1}) exposta à luz por 72 horas

Repetibilidade:

Repetibilidade pode ser definida pelo grau de concordância entre repetidas medidas da mesma propriedade. Foram avaliadas medidas realizadas em 5 dias consecutivos partindo da mesma solução estoque, utilizando-se 3 concentrações diferentes de AMP⁷⁸. Os dados obtidos estão descritos na Tabela 15.

Tabela 15. Avaliação da Repetibilidade das medidas. Valores de %RSD^{*} (n=5).

C_{AMP} mg mL⁻¹	1	2	3	4	5
1,50×10 ⁻²	1,6	1,9	1,8	1,6	1,8
4,50×10 ⁻²	1,7	1,0	0,8	1,4	1,1
8,50×10 ⁻²	0,6	1,2	1,6	0,6	1,1

^{*} %RSD = o desvio padrão relativo percentual, definido por $100 \cdot s / x$, onde s é a estimativa do desvio padrão e x a média aritmética de 5 medidas.

A Tabela 15, com resultados dos ensaios de repetibilidade, mostra os valores de desvio padrão relativo (%RSD) obtidos entre 0,6 % a 1,9%, indicando que o método é repetitivo, pois de acordo com as normas estabelecidas pela Farmacopéia Americana (USP XXV), para medidas quantitativas com fármacos são aceitos desvios inferiores a 2 %³⁰.

Precisão Intermediária:

Indica o efeito das variações dentro do laboratório devido a eventos como diferentes dias ou diferentes analistas ou diferentes equipamentos ou uma combinação destes fatores^{78,79}. Avaliou-se este parâmetro utilizando-se as medidas realizadas em dias diferentes. A precisão intermediária pode ser expressa através da estimativa do desvio padrão relativo (RSD). Os resultados obtidos estão descritos na Tabela 16.

Tabela 16. Avaliação da Precisão Intermediária das medidas. Valores de %RSD ^a (n=5).

C_{AMP} mg mL⁻¹	Média ^a	Desvio Padrão ^b	%RSD ^c
1,50×10 ⁻²	0,159	0,003	1,7
4,50×10 ⁻²	0,411	0,005	1,2
8,50×10 ⁻²	0,949	0,011	1,2

a - Média aritmética dos 5 dias consecutivos partindo da mesma solução estoque e estudando-se 3 concentrações diferentes.

b – Desvio padrão das medidas nos 5 dias consecutivo de ensaios.

c- %RSD de medidas realizadas em 5 dias consecutivos de ensaios.

Nos ensaios de precisão intermediária (Tabela 16), foram obtidos valores de desvio padrão relativo (%RSD) entre 1,2 % a 1,7 %, indicando que o método é preciso, pois apresentou em avaliações realizadas em dias diferentes desvio padrão relativo (%RSD) inferior a 2 %, de acordo com os critérios estabelecidos pela Farmacopéia Americana (USP XXV)³⁰.

Exatidão:

Este parâmetro foi avaliado por comparação de resultados obtidos na determinação da espécie monitorada em 406 nm em amostras comerciais de medicamentos pelo método proposto e um método cromatográfico desenvolvido por Fatmi, Willians e Hickson³⁹. A Figura 18 traz os cromatogramas utilizados para construção da curva de calibração para este método, cujo pico é máximo no tempo de retenção em 7 minutos correspondente à eluição do AMP.

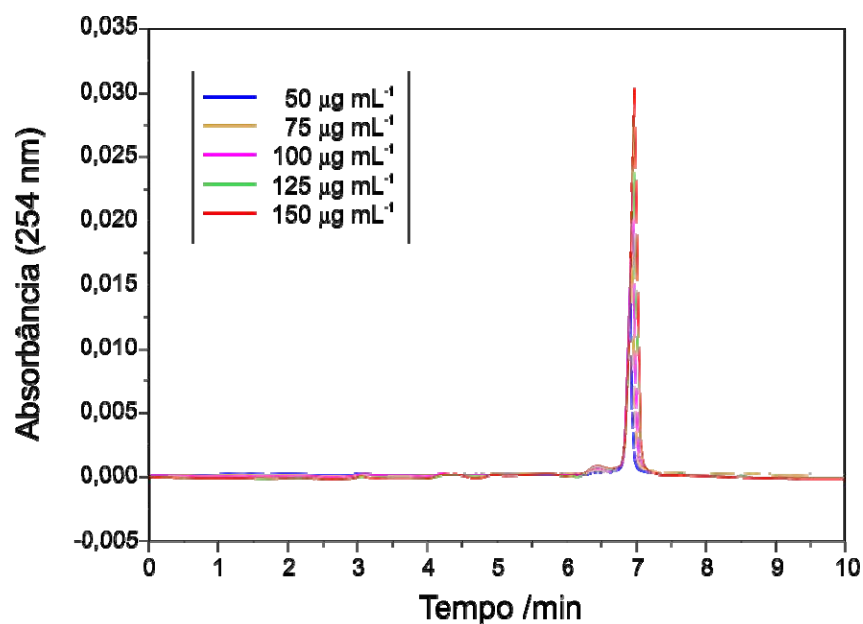


Figura 18. Cromatogramas de AMP em diversas concentrações, obtidos pelo procedimento descrito em 3.10 (página 24).

O tempo de retenção para o AMP em solução foi de 7 minutos, com estes dados foi possível elaborar uma curva de calibração correlacionando a área dos picos (Área) com a concentração de AMP (C_{AMP}), descrita pela Equação 3, com coeficiente de correlação = 0,9998 (Figura 19).

$$\text{Área} = 1,007 \times 10^{-5} - 3,025 \times 10^{-5} \times C_{AMP} \quad \text{Equação 3}$$

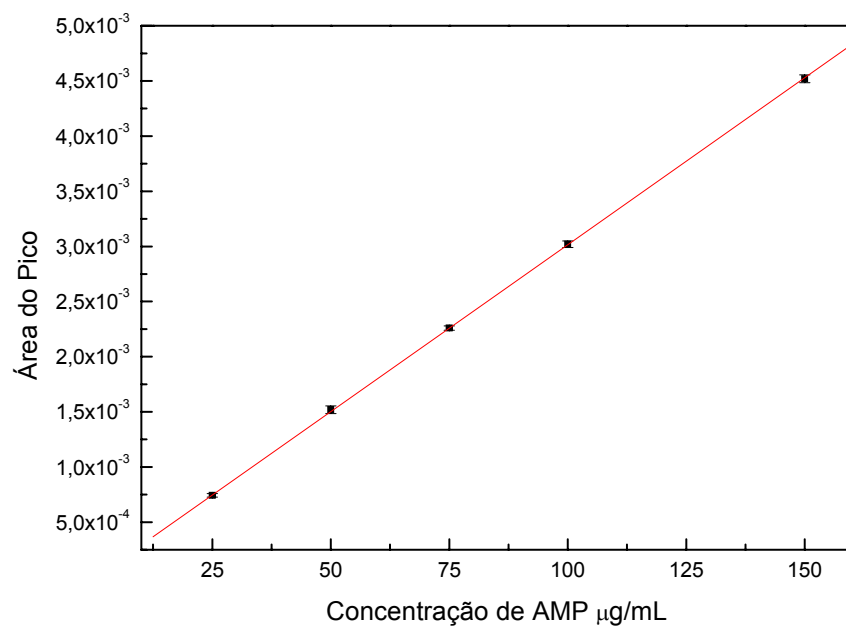


Figura 19. Curva de Calibração para AMP pelo método cromatográfico.

A Figura 20 corresponde ao cromatograma obtido com a análise do comprimido 10 mg de AMP. Na figura 10 é apresentado o cromatograma da análise da suspensão injetável de AMP.

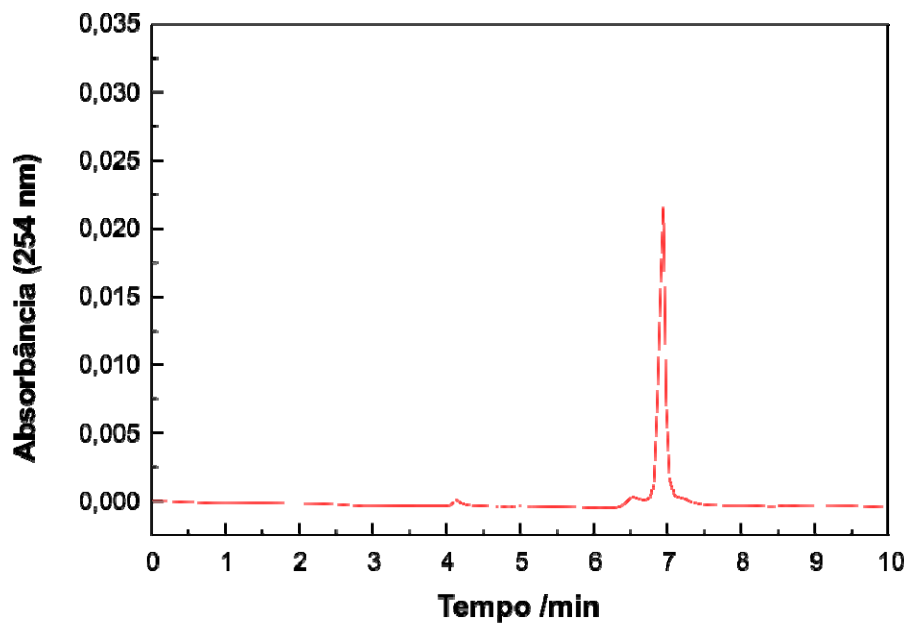


Figura 20. Cromatograma do medicamento em comprimidos 10 mg de AMP.

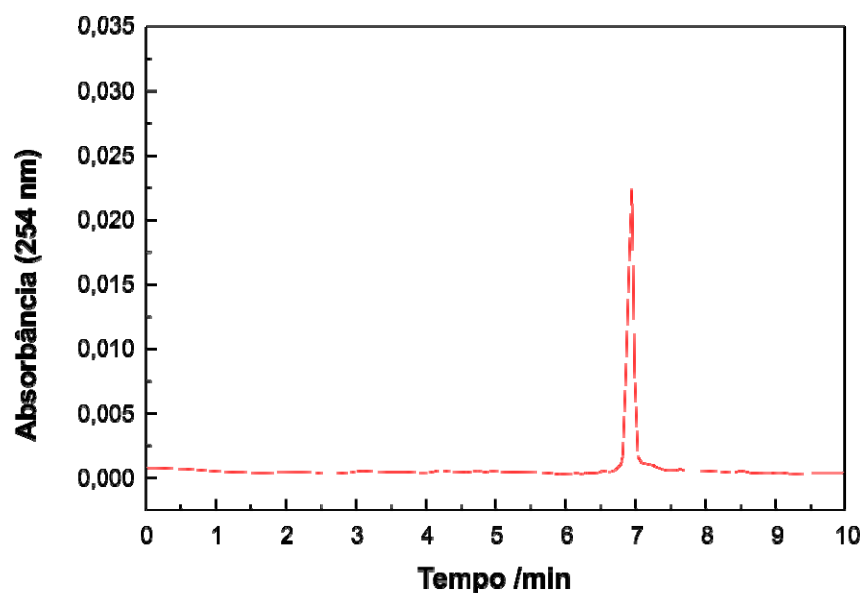


Figura 21. Cromatograma do medicamento em suspensão injetável 150 mg mL^{-1} de AMP.

Os resultados da comparação entre os métodos espectrofotométrico e cromatográfico estão na Tabela 17.

Tabela 17: Comparação do método proposto com o método cromatográfico.

Concentração de AMP $\pm$ SD* (mg mL^{-1})			
Método proposto		Método cromatográfico	
Suspensão	Comprimidos	Suspensão	Comprimidos
$1,02 \pm 0,01$	$1,00 \pm 0,03$	$1,035 \pm 0,003$	$0,982 \pm 0,005$

*SD = Desvio padrão da concentração média (3 replicatas) de AMP.

Comparação entre os Métodos

Foram realizados testes estatísticos (Teste F e Teste t-Student)^{73,74} a fim de avaliara a precisão e exatidão entre o método espectrofotométrico, reação com Mo(VI), e o método cromatográfico.

Teste F^{73,74}

Para comparar a precisão das medidas espectrofotométricas e cromatográficas, foi realizado o Teste F (Equação 4).

$$F = \frac{s_x^2}{s_y^2} \quad \text{Equação 4}$$

onde: s_x^2 e s_y^2 são os valores de estimativa quadrática de desvio padrão obtidos nos dois métodos, sendo que por convenção, o maior valor de variância é colocado no numerador⁷³.

O valor crítico de F, considerando 2 graus de liberdade e um intervalo de confiança de 95% é de 19,000⁷³. Os valores calculados de F estão descritos na Tabela 18.

Tabela 18: Resultados de $F_{\text{calculado}}$.

Suspensão Injetável	Comprimidos
11,111	18,370

Os valores de $F_{\text{calculados}}$ na comparação entre os métodos foram inferiores ao $F_{\text{crítico}}$, tanto para as amostras em suspensão injetável como para os comprimidos, portanto, não foi observada diferença estatisticamente significativa entre o método cromatográfico para determinação de AMP em comprimidos e o método presentemente desenvolvido.

Teste t-Student⁷³

A comparação entre as médias dos resultados espectrofotométricos e cromatográficos foi realizada utilizando-se o Teste t-Student, num intervalo de confiança de 95% (Equação 5). O valor de t_{tabelado} para $n = 3$ medidas é de 4,303.

$$t = \frac{\bar{x}_A - \bar{x}_B}{\sqrt{\frac{s_A^2 + s_B^2}{n - 1}}} \quad \text{Equação 5}$$

Onde: $\bar{x}_A$ é a média das determinações para o método A;

$\bar{x}_B$ é a média das determinações para o método B;

s_A^2 é a estimativa do desvio padrão para o método A;

s_B^2 é a estimativa do desvio padrão para o método B;

n é o número de determinações a partir das quais foi obtida a média $\bar{x}$.

Tabela 19: Resultados de $t_{calculado}$.

Suspensão Injetável	Comprimidos
2,873	1,184

Os valores de $t_{calculado}$ obtidos, descritos na Tabela 19 indicaram que a média obtida no método espectrofotométrico não difere estatisticamente da média obtida pelo método cromatográfico ao nível de 95 % de confiança.

Robustez

A robustez de um método é a capacidade do sistema não ser afetado por pequenas variações dos parâmetros que afetam o sistema. Apesar de o sistema reacional operar em concentração específica de H_2SO_4 (9 mol L^{-1}) e variações de temperatura afetar o sinal analítico, estas variações podem facilmente ser controladas, sem comprometer o desempenho do método.

4.6 Estudo Investigativo da Estrutura da Espécie Monitorada

Os compostos estudados por Amare e colaboradores⁶²⁻⁶⁶, Pezza e colaboradores^{52,53}, Rossi e Crividente⁵⁴, assim como o AMP são compostos esteróides, uma classe de lipídeos. Os esteróides são derivados do ciclopentanoperhidrofenantreno e todos têm em comum estrutura ilustrada na Figura 22.

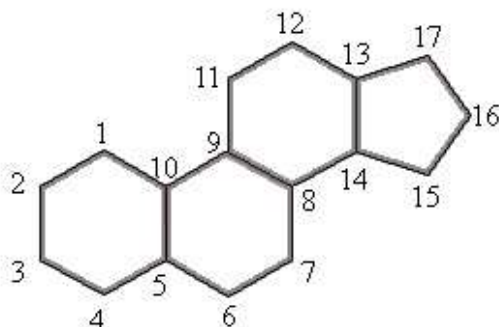


Figura 22. Estrutura tetracíclica comum aos esteróides ⁷⁶.

Sabe-se que esteróides podem sofrer as reações esperadas para moléculas que contenham ligações duplas, grupos hidroxilas, cetona, e assim por diante. Em geral, reações de esteróides na presença de metais formam complexos que envolvem a transferência de elétrons de uma parte para outra da molécula ⁸⁰⁻⁸², os chamados complexos de transferência de carga.

Se a absorção de radiação leva à excitação de um elétron de um orbital localizado essencialmente sobre o metal para um orbital localizado essencialmente sobre o ligante, diz-se que essa absorção é uma banda de transferência de carga do metal (*M*) para o ligante (*L*), que pode ser representada esquematicamente pela Equação 6 ⁸⁰.



Pode ocorrer também o processo inverso: se a absorção de radiação leva à excitação de um elétron de um orbital localizado essencialmente sobre o ligante para um orbital localizado essencialmente sobre o metal, diz-se que essa absorção é uma banda de transferência de carga do ligante para o metal, como representado na Equação 7.



Quando estas absorções ocorrem na região espectral UV-VIS, produzem colorações intensas. A Figura 8 na página 34 ilustra o espectro de absorção eletrônica da espécie monitorada, com concentração proporcional à concentração de AMP. As absorções em 406 e 665 nm que são responsáveis pela coloração verde-azulada do produto da reação.

Observou-se que os produtos das reações em estudos com corticóides e neste estudo com AMP apresentaram espectros eletrônicos de absorção semelhantes. Nos estudos realizados por Rossi e Crivilente⁵⁴, destacou-se que a presença do radical acetato não afetava a absorvidade molar do produto. Porém, para alguns corticóides, como hidrocortisona, por exemplo, a presença do radical hidroxila no lugar do radical ceto aumentou a absorvidade molar do produto da reação. Este efeito também foi observado quando se comparou o espectro dos produtos de reação de acetato de dexametasona e hidrocortisona, indicando que grupos metila e haletos (flúor) diminuíram a absorvidade molar do produto da reação.

Quando o grupo de Aman⁶³ estudou o sistema Mo(VI) / H₂SO₄ / Cloridrato de Amitriptilina, destacou-se que o produto da reação poderia ser resultante da ação oxidante do Mo(VI) sobre a amitriptilina. Além disso, também foi enfatizado que o produto colorido poderia se atribuído à formação da espécie N(R)₄⁺, que reagiria com o íon molibdato formando um complexo verde de máxima absorbância em 660 nm.

Assim como relatado em diversos trabalhos^{52-54, 62-65}, no presente estudo, utilizando AMP, observou-se que o produto de reação também apresentou coloração verde, com absorbância máxima em 406 nm. Nos estudos realizados com corticóides e derivados os espectros eletrônicos de absorção apresentaram máximos variando de 403 a 409 nm.

Nota-se que não é possível distinguir o produto da reação por comparação dos espectros dos produtos obtidos a partir de cada espécie. Reações envolvendo molibdênio são difíceis de compreender no que diz respeito às estruturas formadas. Provavelmente, são formadas misturas de óxidos e hidróxidos de valência mista, formando séries entre os extremos Mo^{VI}O₃ e

$\text{Mo}^{\text{V}}\text{O}(\text{OH})_3$. Neste contexto, apenas os espectros eletrônicos não trazem informações conclusivas sobre a estrutura do produto da reação, mas intensas absorções na região espectral visível (Figura 8: $\epsilon_{406\text{nm}} \sim 4,5 \times 10^5 \text{ mmol}^{-1} \text{ L cm}^{-1}$ e $\epsilon_{665\text{nm}} \sim 1,5 \times 10^5 \text{ mmol}^{-1} \text{ L cm}^{-1}$) sugerem que o produto pode envolver uma estrutura com transferência de carga, característica de complexo entre ligantes orgânicos (no caso AMP) e cátion de metal de transição, no caso Mo(VI) ⁸¹. As Figuras 23 a 25 ilustram uma comparação entre os espectros obtidos por Rossi e Crivillente ⁵⁴ para os produtos de reação com Mo(VI) em meio ácido com alguns corticóides e o espectro do produto obtido da reação com AMP, bem como as estruturas das respectivas moléculas para facilitar o entendimento da discussão.

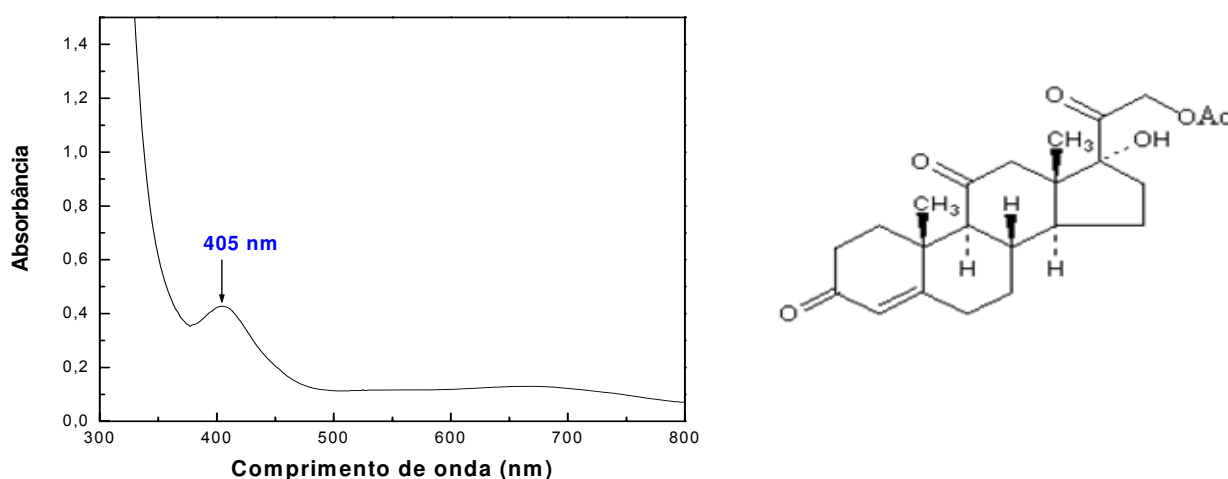


Figura 23. Espectro eletrônico do produto da reação entre Mo(VI) $3,24 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ / H_2SO_4 e Acetato de Cortisona $1,34 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$.

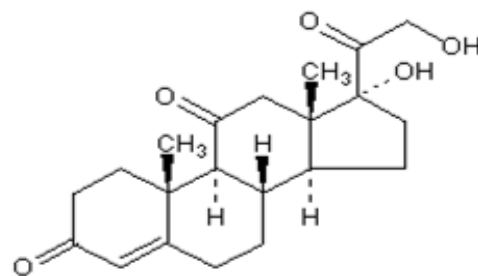
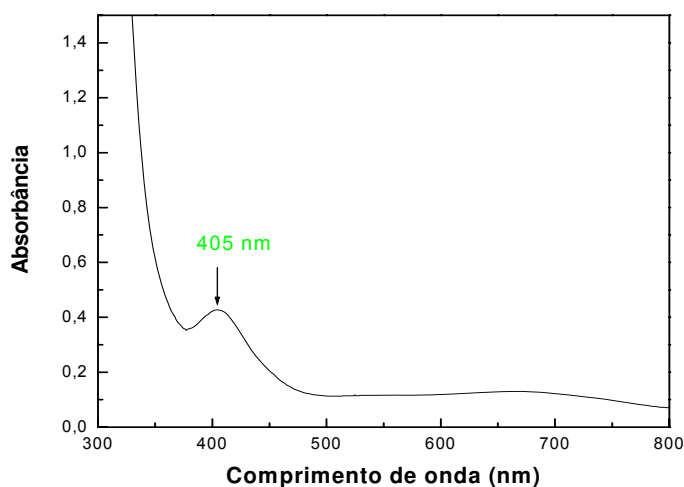


Figura 24. Espectro eletrônico do produto da reação entre Mo(VI) $3,24 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ / H_2SO_4 e Cortisona $1,34 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$

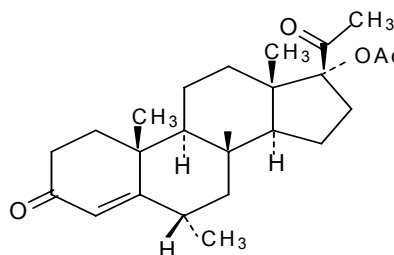
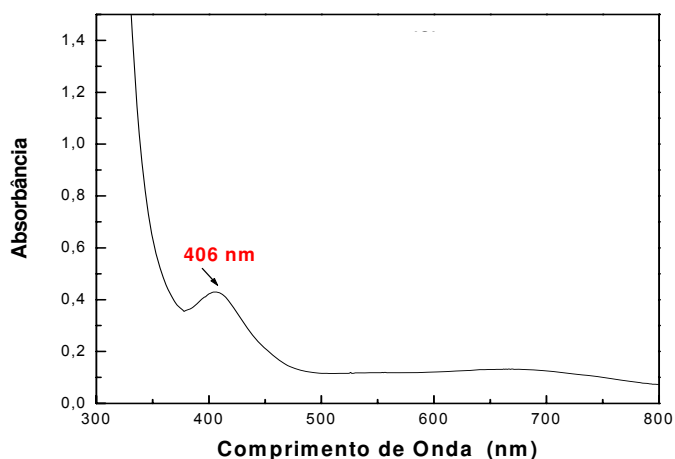


Figura 25. Espectros do produto da reação entre Mo(VI) $3,24 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ / H_2SO_4 e AMP $1,34 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$

Avaliou-se a absortividade molar dos produtos de reação com diferentes esteróides e todos apresentaram características espectrais semelhantes. Estes resultados indicam que a reação possa ocorrer em um ponto comum aos esteróides, gerando um produto de estrutura similar no que diz respeito aos grupos cromóforos. Os possíveis pontos reativos nas estruturas de esteróides seriam as ligações carbonílicas, uma vez que o meio fortemente ácido causa protonação destas espécies^{80,82}. A Figura 26 traz as moléculas de hidrocortisona

e de AMP com os possíveis pontos de ligação para a formação de complexos com Mo(VI) destacados.

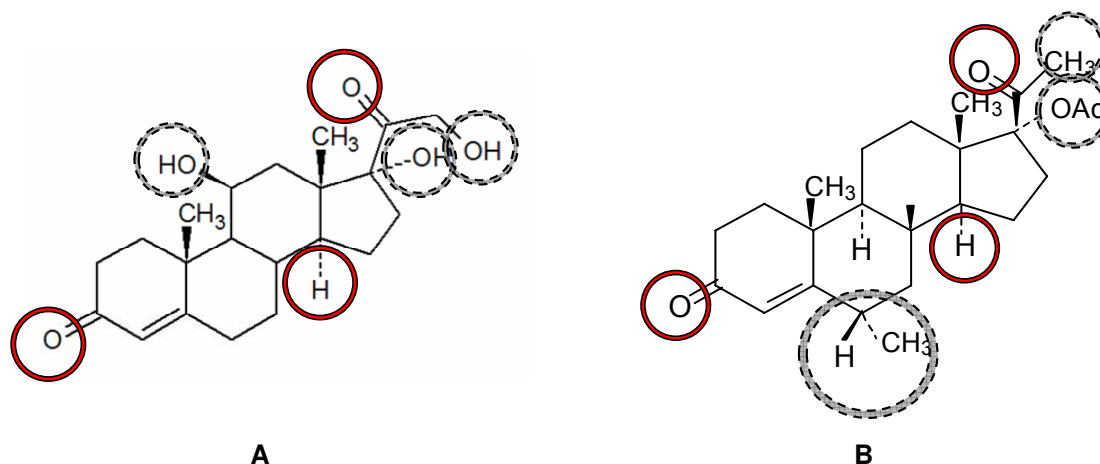


Figura 26. Comparativo entre as estruturas químicas das moléculas hidro cortisona e AMP, destacando os grupos em comum as duas moléculas (círculo contínuo) e as diferenças entre elas (círculo tracejado).

Como as informações obtidas nos estudos dos espectros eletrônicos não foram suficientes para elucidar a estrutura da espécie monitorada em 406 nm, optou-se pela obtenção de espectros no infravermelho dos reagentes e produtos envolvidos na reação com a intenção de encontrar informações mais conclusivas.

Como o meio reacional era constituído em grande parte por H_2SO_4 e água (cerca de 60%), as bandas de absorção destas espécies poderiam encobrir as bandas de absorção do produto da reação, comprometendo a atribuição das bandas. Como alternativa, optou-se pela obtenção dos espectros em ATR. Aumentar o número de varreduras foi uma opção para melhorar a qualidade (quantidade de detalhes espectrais observáveis) do espectro obtido pelo aumento da relação sinal/ruído. Os espectros de transmissão estão apresentados na Figura 27.

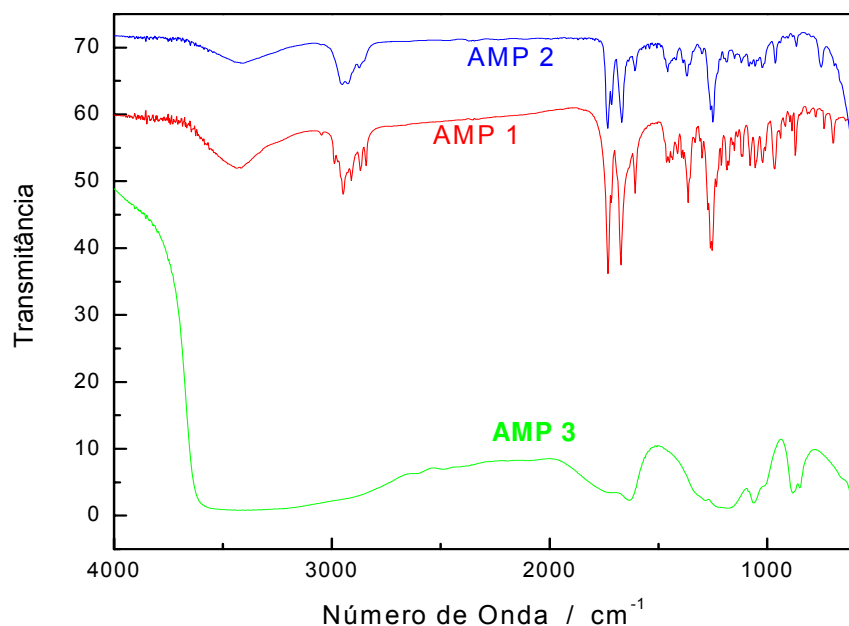


Figura 27. Espectros de transmissão no infravermelho. AMP 1 = AMP sólido; AMP 2 = solução $6,12 \times 10^{-3} \text{ mg mL}^{-1}$ de AMP em CHCl_3 ; AMP 3 = solução da espécie monitorada obtida a partir de solução $6,12 \times 10^{-3} \text{ mg mL}^{-1}$ de AMP em CHCl_3 .

A Figura 28 traz um exemplo de espectro de ATR do produto da reação em solução.

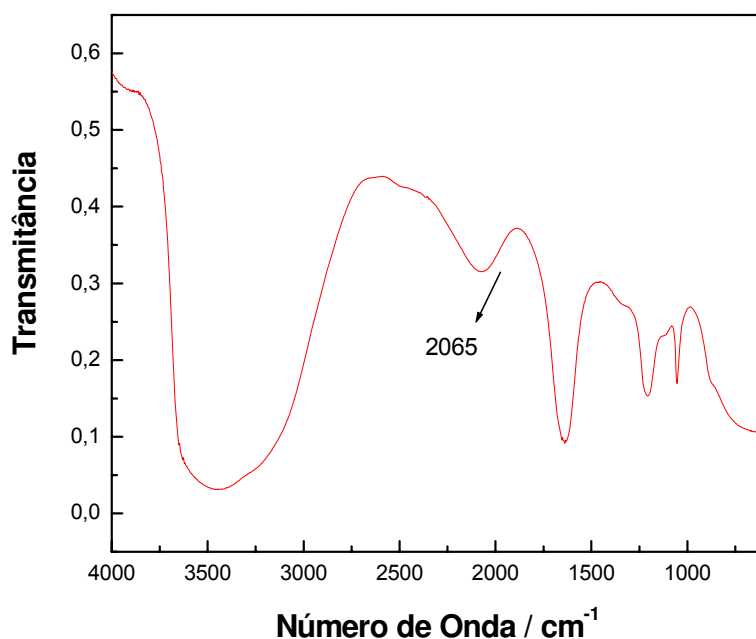


Figura 28. Espectro de ATR no infravermelho da solução da espécie monitorada obtida a partir de solução $6,12 \times 10^{-3} \text{ mg mL}^{-1}$ de AMP em CHCl_3 , aquecimento a 90°C por 60 minutos.

O espectro de ATR indicou uma absorção em torno de 2065 cm^{-1} , porém não foi possível associar esta absorção com nenhum produto conhecido de reação de composto orgânico com um metal de transição. Nesta faixa espectral encontram-se bandas relacionadas com íons sulfato e bissulfato⁷³, provavelmente relacionadas ao ácido sulfúrico presente na reação.

Diante destas dificuldades, optou-se por uma tentativa de investigar o produto da reação com espectroscopia de massas. Este estudo foi realizado em colaboração com o Prof. Dr. Marcos N. Eberlin e seu aluno de doutorado Renato Haddad. Resultados simulados do espectro de massas da espécie monitorada em 406 nm indicaram que a molécula de AMP poderia sofrer ruptura em parte de sua estrutura na reação com Mo(VI) em meio ácido, com rearranjo dos átomos e formação de nova espécie. Porém, como o meio reacional é composto por H_2SO_4 numa concentração muito alta, não seria possível injetar diretamente a amostra no equipamento. Para contornar essa dificuldade foram realizadas tentativas de neutralizar ou abrandar o meio reacional. Em meio menos ácido não se forma a espécie monitorada em 406 nm e nas tentativas de neutralização do meio, notou-se o aparecimento de precipitados, provavelmente óxidos de molibdênio.

Verificou-se também a possibilidade de extrair a espécie cromófora do meio reacional, utilizando reagentes orgânicos variando-se a polaridade do mais polar ao mais apolar. Porém estas avaliações foram realizadas sem êxito.

Neste contexto, não foi possível obter dados de espectrometria de massas que contribuíssem para a elucidação a identificação do produto da reação.

CAPÍTULO 5 CONCLUSÕES

Foi possível estabelecer método de quantificação de AMP a partir da reação com Mo(VI) em meio ácido. As condições otimizadas para o sistema reacional são: solução 9 mol L⁻¹ de H₂SO₄, 70 minutos de aquecimento a 90 °C e uso de AMP em acetonitrila. Nestas condições, foram obtidas curvas analíticas com a absorbância em 406 nm do produto formado cuja concentração é diretamente proporcional à concentração de AMP na faixa de 5,87×10⁻³ a 10,00×10⁻² mg mL⁻¹, com coeficiente de correlação linear = 0,9972 e limite de detecção = 1,77×10⁻³ mg mL⁻¹.

Como a reação não é específica e ocorrer com diversos compostos de estrutura tetracíclica, foi necessário adaptar testes preliminares de avaliação do ponto de fusão e um *spot test* com ácido sulfúrico para identificar o AMP de outros compostos, como derivados de cortisona que também podem reagir com Mo(VI).

Com relação à validação do método estudado, os resultados foram muito favoráveis.

A precisão foi avaliada por intra (repetibilidade) e inter (precisão intermediária) testes, tendo sido obtidos desvios máximos de ± 1,9%.

Com relação à exatidão do método desenvolvido, foi feita comparação com um método desenvolvido por Fatmi, Willians e Hickson³⁹ para quantificação de AMP em medicamentos comerciais por cromatografia líquida de alta eficiência. Os resultados com o método proposto não apresentaram diferenças estatisticamente significativas com 95 % de confiança. Isto indica o bom desempenho do método baseado na reação colorimétrica, que tem favoráveis características de simplicidade instrumental.

CAPÍTULO 6 - PERSPECTIVAS

Os resultados favoráveis do desenvolvimento deste trabalho que pretendeu associar simplicidade instrumental com bom desempenho analítico serviram de base para a adaptação do método para medidas fotométrica, realizadas com dispositivo portátil desenvolvido em nosso grupo.

Vislumbra-se a possibilidade de retomar contato com o CAISM-UNICAMP para propor a aplicação do método simplificado para dosagem de AMP nas formulações manipuladas, no que se constituiria uma etapa de transferência da dos resultados do trabalho desenvolvido.

Outro importante objeto de estudo que merece ser desenvolvido é a identificação da estrutura do produto de reação que é a espécie monitorada e que deve conter molibdênio. Como a peculiar química do molibdênio com seus diversos estados de oxidação está envolvida, esforços interdisciplinares devem ser necessários para a elucidação dessa estrutura, pois não se trata de um estudo trivial e deverá caracterizar um interessante trabalho investigativo.

CAPÍTULO 7 - REFERÊNCIAS

1. Nishimura, R.; Nagao, K.; Matsuda, M.; Baba, K.; Matsuoka, Y.; Yamashita, H.; Fakuda, M.; Higuchi, A.; Ikeda, K., "Predictive value of serum medroxyprogesterone acetate concentration for response in advanced or recurrent breast cancer", *European. Journal of Cancer* **33**: 1407 (1997).
2. Frederiksen, M. C., "Depot Medroxyprogesterone Acetate Contraception in Women with Medical Problems", *Journal of Reproductive Medicine* **41**: 414 (1996).
3. Choi, M. H.; Kim, K. R.; Chung, B. C., "Rapid and Sensitive Analysis of Medroxyprogesterone Acetate in Human Serum by Gas Chromatography-Mass Spectrometry", *Chromatography* **54**: 765 (2001).
4. Izuo, M.; Iino, Y.; Endo, K., "Oral High-Dose Medroxyprogesterone Acetate (MAP) in Treatment of Advanced Breast Cancer", *Breast Cancer Research and Treatment*, **1**: 125 (1981).
5. Greep, R. O.; Koblinsky, M. A.; Jaffe, F. S.: "Reproduction and Human Welfare", MIT Press, Massachusets (1976).
6. Garcia, C. R.; Rosenfeld D. L.: "Fertility: The Regulation of Reproduction", FA Davis Company, Philadelphia (1997).
7. Mastroiani Jr., P.; Donaldson, J.; Kane, T. T.: "Developing New Contraceptives", National Academic Press, Washington, D.C. (1990).
8. Hatcher, R. A.; Trussel, J.; Steward, F. (Eds.): "Contraceptive Technology", 17th ed., Ardent Media Inc., New York (1989).
9. U.S. Food and Drug Administration <http://www.fda.gov> acessada em março de 2006.
10. American Society for Reproductive Medicine, "Hormonal Contraception: Recent Advances and Controversies" *Fertility and Sterility* **82 SUPPL.1**: 27 (2004).
11. The American College of Obstetricians and Gynecologists (ACOG) Technical Bulletin, No. 198, (1994).
12. Drife, J. O., "The Third Generation Pill Controversy (Continued)" *British Medical Journal* **323-7305**: 119 (2001).

13. Kar, A.B.; Setty, B. S., "Biological Evaluation of Cytopentyl Enol Ether of 17 Alpha-Ethynyl-19-Nortestosterone Acetate as a Male Oral Contraceptive", *Indian Journal of Medical Research* **53**: 1180 (1965).
14. Zhanga, L.; Shahb, I. H.; Liua, Y.; Vogelsongb, K. M.; Zhangc, L., "The acceptability of an injectable, once-a-month male contraceptive in China", *Contraception* **73**: 548 (2006).
15. Yan, C.; Chenga, T.; Mruka, D.; Silvestrinib, B.; Bonanomib, M.; Wonga, C.-H.; Siua, M. K. Y.; Lee, N. P.Y.; Luia, W.-Y.; Moa, M.-Y. "AF-2364 [1-(2,4-Dichlorobenzyl)-1H-Indazole-3-Carbohydrazide] is a Potential Male Contraceptive: A Review of Recent Data", *Contraception* **72**: 251 (2005).
16. Csillag C., "Male Contraceptive Pill to Start Trial in Brazil", *The Lancet* **348**:, 608 (1996).
17. Korolkovas, A.; Burckhalter, J. H.: "Química Farmacêutica", Guanabara Dois, Rio de Janeiro (1982).
18. Garattini, S.; Berendes, H. W.: "Pharmacology of Steroid Contraceptive Drugs", Raven, New York (1977).
19. Crighton, D. B.: "Control of Ovulation", Butterworth, Baltimore (1978).
20. Núcleo de Informática Biomédica da Universidade Estadual de Campinas, 2002, <<http://www.nib.unicamp.br/svol/pilula.htm>>. Acesso em 18 de novembro de 2003.
21. Sang, G. W.; Shao, Q. X.; Ge, R. S.; Ge, J, L.; Song, S.; 'A multicentered Phase II Comparative Clinical Trial of Mesigyna, Cyclofem and Injectable No. 1 Given by Intramuscular Injection to Chinese Women. The Comparison of Bleeding Patterns", *Contraception* **51**: 185 (1995).
22. Kaunitz, A. M.; Garceau, R. J.; Cromie, M. A., "Comparative Safety, Efficacy, and Cycle Control of Lunelle Monthly Contraceptive Injection (medroxyprogesterone acetate and estradiol cypionate injectable suspension) and Ortho-Novum 7/7/7 oral Contraceptive (norethindrone/ethinyl estradiol triphasic)", *Contraception* **60**: 179 (1999).
23. Ferriani, R. A., Andrade, R. P. Ferraz, L., Nakagava, H. M. , Dias, R., Finott M. F., Estudo Multicêntrico Brasileiro, "Adesivo Contraceptivo Transdérmico

semanal: Preferência e Satisfação das Usuárias” *Revista Brasileira de Medicina*. **65**: 134 (2006).

24. Cromer B. A.; Blair J. M.; Mahan J. D.; Zibners, L; Naumovski, Z., “A prospective comparison of bone density in adolescent girls receiving depot medroxyprogesterone acetate (Depo-Provera), levonorgestrel (Norplant), or oral contraceptives”, *The Journal of Pediatrics*. **129**: 671 (1996).

25. Marshall L. M.; Spiegelman D.; Goldman M. B., “A prospective study of reproductive factors and oral contraceptive use in relation to the risk of uterine leiomyomata”, *Fertility and Sterility* . **70**: 432 (1998).

26. Rathke, A.F., Poester, D., Lorenzatto, J. F. Schmidt, V. B.; Helter, L. D., “Contracepção hormonal contendo apenas progesterona”, *Adolescência Latinoamericana* **2**: 90 (2001).

27. Martindale: The Extra Pharmacopoeia. 29. ed. London: The Pharmaceutical Press, London (1989).

28. Bezwoda, W. R.; Seymour, L.; Dansey, R. D., “High-dose chemotherapy with hematopoietic rescue as primary treatment for metastatic breast cancer: a randomized trial”, *Journal of Clinical Oncology* **13**: 2483 (1995).

29. Kihara, M.; Kontani, K.; YamauchiM A.; Yokomise, H., “Two cases of advanced breast cancer responding to oral chemoendocrine therapy with 5'-deoxy-5-fluorouridine, medroxyprogesterone acetate and cyclophosphamide (DMpC), *Cancer and Chemotherapy* **32**: 683 (2005).

30. “The United States Pharmacopeia: The National Formulary – 25th ed.”, United States Pharmacopeial Convention, Rockville (2002).

31. “British Pharmacopeia”, H. M. Stationery Office, London (1980).

32. Kleemann, A., Engel, J. Kutscher, B., Reichert, D.: “Pharmaceutical Substances: Synthesis, Patents, Applications”. 4th ed. Thieme, New York (2001).

33. Katzung, B. G.: “Farmacologia Básica e Clínica”, 6^a ed, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro (1995).

34. Burn D., Ellis B., Petrow V., “Modified Steroid Hormones 4-6-Methylpregnane Derivatives”, *Journal of the Chemical Society* **10**: 4092 (1957).

35. Babcock, J. C. Gutsell E. S., Herr M. E., "6-Alpha-Methyl-17-Alpha-Hydroxyprogesterone 17-Acyates - A New Class of Potent Progestins", *Journal of the American Chemical Society* **80**: 2904 (1958).
36. Maryadele J. O., "The Merck Index and Encyclopedia of Chemicals, Drugs and Biologicals", 13th ed.; John Wiley and Sons, New York (2001).
37. Acetato de Medroxiprogesterona, disponível em <http://www.pfizer.com.br>, acessado em 10 de março de 2006.
38. Jornal Brasileiro de Medicina: "Dicionário de Especialidades Farmacêuticas - DEF97/98", Editora de Publicações Científicas, Rio de Janeiro (1997);
39. Fatmi, A. A., Willians, G. V., Hickson, E. A., "Liquid Chromatographic determination of MPA in Tablets", *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, **71**: 528 (1988).
40. Compton, D. A. C.; Compton, S. V., "Examination of Packaged Consumer-Goods by Using FT-Raman Spectrometry", *Applied Spectroscopy* **45**: 1587 (1991).
41. Skoulika, S. G.; Georgiou, C.A., "Rapid, Noninvasive Quantitative Determination of Acyclovir in Pharmaceutical Solid Dosage Forms Through Their Poly(Vinyl Chloride) Blister Package by Solid-State Fourier Transform Raman Spectroscopy", *Applied Spectroscopy* **57**., 407 (2003).
42. Lobinski, R.; Marczenko, Z., "Recent Advances in Ultraviolet-Visible Spectrophotometry", *Critical Reviews in Analytical Chemistry* **23**: 55 (1992)
43. Analytical Abstracts, <http://www.portaldapesquisa.com.br/databases/sites>, acessada em Maio 2006.
44. Rocha, F. R. P.; Teixeira, L. S. G., "Strategies to Increase Sensitivity in UV-VIS Spectrophotometry", *Química Nova* **27**: 807 (2004).
45. Görög, S., "Recent Advances in the Analysis of Steroid Hormones and Related Drugs", *Analytical Sciences* **20**: 767 (2004).
46. Bonazzi, D.; Andrisano, V.; Gatti, R.; Cavrini, V., "Analysis of Pharmaceutical Creams - A Useful Approach Based on Solid-Phase Extraction (SPE) and UV Spectrophotometry", *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **13**: 1321 (1995).

47. Perkampus, H. H.: "UV-VIS Spectroscopy and its Applications", Springer-Verlag: Berlin, 1992.
48. Howell, J. A.; Hargis, L. G., "Ultraviolet and Light-Absorption Spectrometry" *Analytical Chemistry* **62**: 155 (1990).
49. Medinilla, J.; Ales, F.; Sanchez, F. G., "Spectrophotometric and Second-Derivative Spectrophotometric Determination of Mercury in Organomercurials by Means of Benzyl 2-Pyridyl Ketone 2-Quinolyldrazone" *Talanta* **33**: 329 (1986).
50. Sedaira, H., "Simultaneous Determination of Manganese and Zinc in Mixtures Using First and Second-Derivative Spectrophotometry" *Talanta* **51**: 39 (2000).
51. Linares M. S.; Fraga J. M. G.; Jimenez, A. I.; Jimenez F.; Arias, J. J., "Influence of The Selected Wavelength Range on The Simultaneous Spectrophotometric Determination of Mixture Components by Use of Partial Least-Squares Regression", *Analytical Letters* **32**: 2489 (1999).
52. Vicentin, A.; Pezza, L.; Pezza, H. R.: "Desenvolvimento de Método Espectrofotométrico para Análise de Acetato de Hidrocortisona em Pomadas usando Molibdato de Amônio"; *XXXLII Congresso Brasileiro de Química – Livro de Resumos*, 128 (2002).
53. Vicentin, A.; Franzini, V. P.; Pezza, L.; Pezza, H. R.: "Determinação Espectrofotométrica de Acetato de Hidrocortisona usando Molibdato de Amônio"; *49ª Jornada Farmacêutica da UNESP – CD de resumos* (2002).
54. Crivilente, W. C. T.: "Reações Luminescentes e Colorimétricas para Determinação de Hidrocortisona em Fármacos", Dissertação de Mestrado, IQ-UNICAMP (2003).
55. Elwell, W. T.: "Analytical Chemistry of Molybdenum and Tungsten , Including the Analysis of the Metal and their Alloys", Vol 47, Pergamon Press, New York (1971).
56. Balcerzak M.; Marczenko, Z.: "Separation, Preconcentration and Spectrophotometry in Inorganic Analysis"; Ed. Elsevier Sciences, Amsterdam (2000).

57. Brauer, G.: "Handbook of Preparative Inorganic Chemistry" – Vol. 2; Ed. Academic Press, New York (1965).
58. Lee, J. D.: "Química Inorgânica Consisa"; Ed. Edgard Blucher, São Paulo (1999).
59. Henry, R. J.; Cannon, D. C.; Wikelman, J. W.: "Clinical Chemistry, Principles and Technics", 2nd ed. Harper & Row, New York (1974).
60. Haight, G. P.; Paragamian, V., "Color Complexes of Catechol with Molybdate", *Analytical Chemistry* **32**: 642 (1960).
61. Onishi, H., Sandell, E. B.: "Photometric Determination of Trace Metals", 4th Edition, Part 1, Wiley, New York, (1978).
62. Kustin, K.; Liu, S. T., "Kinetics and Complex-Formation of Molybdate with Catechol", *Journal of the American Chemical Society* **95**: 2487 (1973).
63. Aman, T.; Kazi, A. A.; Hussain, M. I.; Firdous, S.; Khan, I. U., "Spectrophotometric Determination of Amitriptyline-HCl in Pure and Pharmaceutical Preparations", *Analytical Letters* **33**: 2477 (2000).
64. Aman, T.; Rashid, A.; Khokhar, I., "Spectrophotometric Determination of Carnitine", *Analytical Letters* **26**: 2113 (1993).
65. Aman, T.; Hassan, A.; Khokhar, I.; Rashid, A., "Spectrophotometric Determination of Atropine", *Analytical Letters* **27**: 1833 (1994).
66. Aman, T.; Rashid, A.; Kulsoom, R.; Khokhar, I., Spectrophotometric Determination of Streptomycin, *Analytical Letters* **28**: 881 (1995).
67. Feigl, F.; Anger, V.: "Spot Tests in Inorganic Analysis", 6th ed., Elsevier Publishing Company: Amsterdam (1972).
68. Jeffrey, G. H.; Bassett, J. J.; Mendham, J.; Denney, R. C.: "VOGEL - Análise Química Quantitativa", 5^a ed., Guanabara Koogan, Rio de Janeiro (1992).
69. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA): <http://www.anvisa.gov.br/> acessada em março 2006.
70. Shabir, G. A., "Validation of High-Performance Liquid Chromatography Methods for Pharmaceutical Analysis. Understanding the Differences and Similarities Between Validation Requirements of US Food and Drug Administration

the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization”, *Journal of Chromatography A* **987**: 57 (2003).

71. Text on Validation of Analytical Procedures” Q2A International Conference on Harmonization (ICH), Harmonised Tripartite Guideline. Disponível em: <http://www.ich.org>. Acesso em novembro de 2003

72. Rossi, A. V.; Pinheiro, T.A.L., Foltram, L. M.: “Proposta de Baixo Custo para Identificação e Quantificação de Acetato de Medroxiprogesterona”, *XIII Congresso Interno de Iniciação Científica da UNICAMP*. CD de Resumos (2005).

73. Miller, J.C.; Miller, J.N. Statistics for Analytical Chemistry. 3rd ed., Prentice Hall, New York (1993).

74. Eckschlager, K.: “Errors, Measurements and Results in Chemical Analysis”. Van Nostrand Reinhold, London (1961).

75. Solomons, T. W. G. “Organic Chemistry”, 5th Edition, Wiley, New York (1992).

76. Silverstein, R. M.; Webster, F. X.: “Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos”, 6^a ed, Livros Técnicos e Científicos, Rio de Janeiro (1998)

77. NBR 14597/2000- Precisão de Métodos Analíticos – Determinação de Repetibilidade e Reprodutibilidade de Métodos para Ensaios de Produtos Químicos.

78. Ribani, M.; Bottoli, C. B. G.; Collins, C. H.; Jardim, I. C. S. F.; Melo, L. F. C., “Validação em Métodos Cromatográficos e Eletroforéticos Validation for Chromatographic and Electrophoretic Methods”, *Química Nova* **27 (5)**:771(2004).

79. Huheey, J. E.; Keiter, E. A.; Keiter, R. L.: “Inorganic Chemistry: Principles of Structure and Reactivity”, 4th ed. Haper Collins College Publishers, New York, 964p. (1993).

80. Shriver, D.F.; Atkins, P.W.: “Inorganic Chemistry”. Oxford University Press. New York. (1999).

81. Jones, C, J.: “A Química dos Elementos dos Blocos d e f”, Bookman, Porto Alegre (2002).



Produto: MEDROXIPROGESTERONA ACETATO

994
Seq.013-000

Data de Fabricação: 7/2/2004

País de Origem: CHINA

Data de Validade: 6/2/2007

Lote de Fabricação: 0402007

Nota Fiscal: 0570994

CIQ: 7040319779

121109-8

Volumes: 01

CERTIFICADO DE ANÁLISE

FCQ0005682

FÓRMULA MOLECULAR: $C_{24}H_{34}O_4$
PESO MOLECULAR: 386,5
CAS: 71-58-9
DCB: 0773.02-6

ARMAZENAMENTO: À temperatura ambiente, em recipiente perfeitamente fechado, protegido de luz e umidade.

Exame/Componentes	Especificação	Resultado dos exames
CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS		
- Descrição*	Pó cristalino branco a quase branco.	Pó branco.
SOLUBILIDADE		
- Água*	Praticamente insolúvel	Praticamente insolúvel
- Metanol*	Ligeiramente solúvel	Ligeiramente solúvel
- Acetona*	Solúvel	Solúvel
- Clorofórmio*	Facilmente solúvel	Facilmente solúvel
- Álcool*	Ligeiramente solúvel	Pouco solúvel
PONTO DE FUSÃO		
- Ponto de fusão*	Em torno de 205°C.	209° a 211°C
PERDA POR DESSECACÃO		
- 0,5 g, 100 a 105°C, 3 horas*	No máximo 1,0 %	0,1 %
IDENTIFICAÇÃO		
- Infravermelho*	Positivo	Positivo
- Cromatografia camada delgada	Positivo	Positivo
ROTAÇÃO ÓPTICA ESPECÍFICA		
- Rotação óptica específica	+45° a +51°, calculado com referência a substância seca.	+48°
SUBSTÂNCIAS RELATADAS		
- Total de impurezas	No máximo 2,0%.	0,8%
- Impureza simples	No máximo 1,0%.	0,2%, 0,3%
DOSEAMENTO		
- HPLC	97,0 a 103,0%, em relação a substância seca.	99,1%
DENSIDADE APARENTE		
- Sem compactação*	Informativo	0,3 g/mL

OBSERVAÇÃO

(*) Testes realizados no Laboratório de Controle da Qualidade Galena, os demais estão em conformidade com o certificado de análise do fornecedor.

Referência: BP 98 e USP 24

Resultado: (X) Aprovado

Data da Análise: 30/03/2004

Roberto T. Yoshida
Farmacêutico Responsável
CRF-SP: 18.441

