

DOMINGOS DE CARVALHO FERREIRA

BENZODIAZEPINAS

CONTRIBUIÇÃO PARA O ESTUDO DE PREPARAÇÕES FARMACÊUTICAS

PORTO
1992

DOMINGOS DE CARVALHO FERREIRA

Assistente da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto

BENZODIAZEPINAS

CONTRIBUIÇÃO PARA O ESTUDO DE PREPARAÇÕES FARMACÊUTICAS

Dissertação de candidatura ao grau de Doutor
apresentada à Faculdade de Farmácia da
Universidade do Porto.

Trabalho realizado no Laboratório de Tecnologia Farmacêutica
Faculdade de Farmácia do Porto

PORTO - 1992

À ISABEL

AO FRANCISCO

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor Luís Vasco Nogueira Prista, agradeço a preciosa orientação prestada durante a execução deste trabalho. Pela amizade e confiança que sempre me manifestou, exprimo também a minha mais profunda gratidão.

Ao Professor Doutor Rui Manuel Ramos Morgado, agradeço as valiosas sugestões e entusiasmo que sempre me inculuiu. Pelo apoio e colaboração permanentes o meu reconhecimento.

À Professora Doutora Maria Fernanda Coelho Guedes Bahia, agradeço a colaboração e conselhos dados para a execução dos ensaios *in vivo*, e ainda a amizade que sempre me dispensou.

Ao Professor Doutor José Manuel Correia Neves de Sousa Lobo, agradeço o inteligente auxílio prestado durante a execução deste trabalho. Pela disponibilidade constante e pela confiança que sempre me transmitiu a minha profunda gratidão.

Aos Dr. Delfim Fernando Gonçalves dos Santos e ao Dr. Carlos Maurício Gonçalves Barbosa, agradeço a amizade e a boa vontade que sempre me dispensaram.

À Dr^a. Alda Fernanda Loureiro de Albuquerque Pinho e ao Dr. Edmundo Caldas Vilar, agradeço a amizade, a disponibilidade e o entusiasmo que sempre me transmitiram.

À Dr^a. Ana Paula Cancelo Carrilho, agradeço o valioso auxílio prestado durante um longo período na realização da parte experimental deste trabalho.

Ao Dr. Paulo Lobão, agradeço a colaboração prestada.

À Sr^a. D. Adelina Fiel, agradeço a colaboração prestada na preparação de vários reagentes. O meu agradecimento para o Sr. João Parente, Sr. Joaquim Ribeiro e Sr^a. D. Clara Soares, por todo o trabalho que prestaram.

Todo o trabalho de cromatografia líquida de alta pressão foi executado no Laboratório de Toxicologia.

À Professora Doutora Maria de Lourdes Pinho de Almeida Souteiro Bastos, agradeço a cedência do cromatógrafo, os valiosos conselhos prestados, a disponibilidade e a amizade que sempre manifestou.

À Eng^a. Elisa Soares, agradeço a simpatia e boa vontade demonstrada.

À Sr^a. D. Júlia Carames, Sr. Abílio da Silva e Sra D. Graziela Pinto, agradeço a boa vontade e o apoio prestado.

À Professora Doutora Madalena Maria Magalhães Pinto, agradeço a utilização de material diverso no Laboratório de Química Orgânica.

Ao Dr. António Filipe Oliveira Carneiro, agradeço a valiosa ajuda na execução e análise dos espectros de ressonância magnética nuclear e infravermelho.

Ao Dr. Rui Lapa, agradeço toda a ajuda prestada.

À Dr^a. Maria das Dores Sousa Lobo, agradeço toda a sua disponibilidade e espírito de ajuda.

Ao Dr. José Augusto Silveira Ferreira, agradeço toda a amizade, confiança e disponibilidade manifestada.

À Dr^a. Rosa Pinto, da Secretaria Geral do Ministério da Saúde, à Dr^a. Maria Teresa Barrosa e à Dr^a. Ana Marques, dos Serviços Farmacêuticos do Hospital Geral de Santo António e à Dr^a. Antonieta Sousa, dos Serviços Farmacêuticos do Hospital Conde Ferreira, agradeço a cedência das informações respeitantes ao consumo hospitalar de benzodiazepinas.

Agradeço aos voluntários que permitiram a realização dos ensaios *in vivo*. Agradeço também à Dr^a. Maria Palmira Martins e Sr^a. D. Maria Luísa Rodrigues o auxílio prestado durante a realização dos mesmos.

Ao Instituto Pasteur de Lisboa, agradeço a cedência do oxazepam e do lorazepam utilizados na execução deste trabalho.

Aos Laboratórios Bial, agradeço a consulta bibliográfica gratuita ao banco de dados Dialog. Ao Instituto Luso-Fármaco, ao Instituto de Medicina Legal de Coimbra e à JABA Farmacêutica, agradeço a cedência de bibliografia.

A todos quantos contribuíram de algum modo para a realização deste trabalho, o meu muito obrigado.

Ao Instituto Nacional de Investigação Científica, agradeço o apoio financeiro concedido para a realização deste trabalho, que constituiu uma das linhas de acção do Centro de Tecnologia do Medicamento e que foi efectuado no Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Faculdade de Farmácia do Porto, dirigido pelo Professor Catedrático Doutor Luís Vasco Nogueira Prista.

ABREVIATURAS

- ASC - Área sob a curva
- CB - Cloreto de Benzalcónio
- C_{máx.} - Concentração máxima
- CMC - Concentração micelar crítica
- DMSO - Dimetilsulfóxido deuterado
- (e) - Extragranular
- E% - Eficácia de dissolução
- EHL - Equilíbrio hidrófilo-lipófilo
- Fig.(s).- Figura(s)
- FP V - Farmacopeia Portuguesa
- GABA - Ácido γ -aminobutírico
- HPLC - Cromatografia líquida de alta pressão
- (i) - Intragranular
- IV - Infravermelho
- LI - Limite teórico inferior
- LS - Limite teórico superior
- LsS - Laurilsulfato de sódio
- PEG - Polietilenoglicol
- ppm - Partes por milhão
- RMN - Ressonância magnética nuclear
- r.p.m. -Rotações por minuto
- SNC - Sistema nervoso central
- T80 - Tween 80
- t_{máx.} - Tempo em que se atinge a concentração máxima
- TMS -Tetrametilsilano
- TRM - Tempo de retenção médio
- USP XXII/NF XVII - Farmacopeia Americana
- UV - Ultravioleta

ÍNDICE

RESUMO

PREFÁCIO

CAPÍTULO I - BENZODIAZEPINAS - Considerações Gerais

1.1.- História	2
1.2.- Classificação e relação estrutura-actividade	8
1.3.- Síntese	11
1.4.- Farmacologia	13
1.5.- Aspectos farmacocinéticos	15
1.5.1.- Farmacocinética	16
1.5.1.1.- Fase de absorção	16
1.5.1.2.- Fase de distribuição	18
1.5.1.3.- Fase de metabolização e eliminação	19
1.5.2.- Classificação	20
1.5.2.1.- Benzodiazepinas de acção ultra-curta	20
1.5.2.2.- Benzodiazepinas de acção curta a média	21
1.5.2.3.- Benzodiazepinas de acção longa	21
1.5.3.- Factores que influenciam a farmacocinética	23
1.5.3.1.- Grupos etários	23
1.5.3.1.1.- Gravidez e período perinatal	23
1.5.3.1.2.- Pediatria	23
1.5.3.1.3.- Geriatria	24
1.5.3.2.- Sexo	24
1.5.3.3.- Estados patológicos	24
1.5.3.3.1.- Doenças hepáticas	24
1.5.3.3.2.- Hipoalbuminémia	25
1.5.3.3.3.- Doenças respiratórias	25

1.5.3.3.4.- Doenças cardiovasculares	25
1.5.3.3.5.- Doenças renais	25
1.5.4.- Interações	26
1.5.4.1.- Interações na absorção	26
1.5.4.2.- Interações na ligação às proteínas	26
1.5.4.3.- Interações na eliminação	27
1.5.5.- Efeitos secundários	27
1.5.6.- Dependência, tolerância e abstinência	28
1.5.7.- Sobredosagem	28
1.6.- Usos clínicos	29
1.6.1.- Ansiedade	29
1.6.2.- Insónia	29
1.6.3.- Convulsões	30
1.6.4.- Espasmos musculares	30
1.6.5.- Cirurgia	30
1.6.6.- Alcoolismo	31
1.7.- Consumo em Portugal	32

CAPÍTULO II - COMPRIMIDOS DE ACÇÃO PROLONGADA CONTENDO OXAZEPAM

2.1.- Introdução	35
2.1.1.- Oxazepam	36
2.1.2.- Carbopol	37
2.2. Matrizes	38
2.2.1.- Matrizes inertes	38
2.2.2.- Matrizes lipídicas	38
2.2.3.- Matrizes hidrófilas	38
2.2.3.1.- Cedência de fármacos a partir de uma matriz hidrófila	39
2.3.- Preparação dos comprimidos	40
2.3.1.- Cálculo da dose de oxazepam	40
2.3.2.- Material e métodos	42
2.3.3.- Fórmula base	43

2.4.- Verificação da eficácia das preparações de acção prolongada	44
2.4.1.- Métodos de verificação <i>in vitro</i>	44
2.4.1.1.- Material e métodos	45
2.4.1.2.- Aparelhagem	45
2.4.1.3.- Reagentes	46
2.4.1.3.1.- Método A	46
2.4.1.3.2.- Método B	46
2.4.1.3.3.- Método C	46
2.4.1.4.- Determinação do teor total de oxazepam nos comprimidos	47
2.4.1.5.- Determinação do teor de oxazepam no granulado (dose de manutenção)	47
2.4.1.6.- Determinação do teor de oxazepam na mistura de pós (dose inicial)	47
2.4.1.7.- Técnica analítica	48
2.4.1.7.1.- Método A	48
2.4.1.7.2.- Método B	55
2.4.1.7.3.- Método C	58
2.4.1.8.- Resultados e estudo estatístico	62
2.4.2.- Métodos de verificação <i>in vivo</i>	63
2.4.2.1.- Material e métodos	64
2.4.2.1.1.- Experimentação em coelhos	64
2.4.2.1.2.- Experimentação no homem	64
2.4.2.2.- Aparelhagem	65
2.4.2.3.- Reagentes	65
2.4.2.3.1.- Preparação das soluções	65
2.4.2.4.- Ensaio por HPLC	66
2.4.2.4.1.- Condições de análise	66
2.4.2.4.2.- Análise cromatográfica dos extractos	66
2.4.2.4.3.- Estudo da recuperação	67
2.4.2.4.4.- Estudo da linearidade e sensibilidade ..	67
2.4.2.4.5.- Tratamento do material de vidro	67
2.4.2.4.6.- Estudo da possibilidade de aplicação de solventes tamponados	68

2.4.2.5.- Resultados e estudo estatístico	69
2.5.- Estudo de fórmulas constituídas por matrizes hidrófilas	70
2.5.1.- Matriz constituída por Carbopol 934,	
laurilsulfato de sódio e lubrificantes	70
2.5.1.1.- Influência da lactose	71
2.5.1.2.- Influência do laurilsulfato de sódio	72
2.5.1.3.- Ensaio de dissolução	72
2.5.1.4.- Resultados	72
2.5.1.5.- Discussão dos resultados	76
2.5.2.- Matriz constituída por Carbopol 934, sulfato de zinco,	
laurilsulfato de sódio e lubrificantes	77
2.5.2.1.- Influência do sulfato de zinco	77
2.5.2.2.- Influência do laurilsulfato de sódio	79
2.5.2.3.- Ensaio de dissolução	79
2.5.2.4.- Resultados	79
2.5.2.5.- Discussão dos resultados	82
2.5.3.- Matriz constituída por Carbopol 934, sulfato ou	
fosfato de cálcio, laurilsulfato de sódio e lubrificantes	84
2.5.3.1.- Influência do sulfato de cálcio	84
2.5.3.2.- Influência do fosfato de cálcio	84
2.5.3.3.- Influência dos punções	85
2.5.3.4.- Influência do estearato de magnésio	86
2.5.3.5.- Influência da granulometria	86
2.5.3.6.- Ensaio de dissolução	87
2.5.3.7.- Resultados	87
2.5.3.8.- Discussão dos resultados	91
2.5.4.- Matriz constituída por Carbopol 934, fosfato	
de cálcio, croscarmelose de sódio e lubrificantes	92
2.5.4.1.- Influência da croscarmelose de sódio	94
2.5.4.2.- Influência do fosfato de cálcio	95
2.5.4.3.- Ensaio de dissolução	95
2.5.4.4.- Resultados	95
2.5.4.5.- Discussão dos resultados	99
2.5.5.- Estudo da fórmula F ₂₁	101

2.5.5.1.- Métodos de verificação <i>in vitro</i>	101
2.5.5.1.1.- Ensaio de dissolução	101
2.5.5.1.2.- Resultados	101
2.5.5.1.3.- Discussão dos resultados	106
2.5.5.2.- Métodos de verificação <i>in vivo</i>	107
2.5.5.2.1.- Resultados	107
2.5.5.2.2.- Discussão dos resultados	111
2.5.6.- Comprimidos constituídos por grânulos revestidos com acetofalato de celulose	113
2.5.6.1.- Aparelhagem e métodos	115
2.5.6.1.1.- Técnica de preparação	115
2.5.6.1.2.- Ensaio de verificação da eficácia do revestimento	115
2.5.6.2.- Influência do método de granulação	117
2.5.6.3.- Influência do fosfato de cálcio	117
2.5.6.4.- Ensaio de dissolução	117
2.5.6.5.- Resultados	117
2.5.6.6.- Discussão dos resultados	121
2.5.7.- Ensaio de avaliação da estabilidade	122
2.5.7.1.- Condições de armazenagem	122
2.5.7.2.- Determinação do teor de oxazepam nos comprimidos	123
2.5.7.2.1.- Condições do ensaio por HPLC	123
2.5.7.3.- Resultados	123
2.5.7.4.- Discussão dos resultados	124
2.6.- Conclusões	125
2.6.1.- Matriz hidrófila constituída por Carbopol 934 e lactose	125
2.6.2.- Matriz hidrófila constituída por Carbopol 934 e Sulfato de zinco	125
2.6.3.- Influência do laurilsulfato de sódio	125
2.6.4.- Matriz constituída por Carbopol 934 e sulfato ou fosfato de cálcio	126
2.6.5.- Influência da croscarmelose de sódio	126
2.6.6.- Grânulos revestidos com acetofalato de celulose	127

CAPÍTULO III - SUPOSITÓRIOS DE OXAZEPAM

3.1.- Introdução	129
3.2.- Escolha do excipiente	130
3.3.- Influência dos tensioactivos	130
3.4.- Preparação dos supositórios	131
3.4.1.- Material e métodos	132
3.4.2.- Fórmula base	132
3.4.3.- Acondicionamento	133
3.5.- Métodos de verificação <i>in vivo</i>	133
3.5.1.- Material e métodos	133
3.5.1.1.- Experimentação em coelhos	133
3.5.1.2.- Experimentação no homem	134
3.5.1.3.- Aparelhagem, reagentes e ensaio cromatográfico	134
3.5.2.- Resultados e estudo estatístico	134
3.6.- Estudo de fórmulas destinadas à administração rectal	136
3.6.1.- Influência do excipiente	136
3.6.1.1.- Ensaio de absorção	137
3.6.1.2.- Resultados	137
3.6.1.3.- Discussão dos resultados	141
3.6.2.- Influência dos tensioactivos	142
3.6.2.1.- Ensaio de absorção	142
3.6.2.2.- Resultados	142
3.6.2.3.- Discussão dos resultados	145
3.6.3.- Ensaio de avaliação da estabilidade e verificação da biocaducidade	146
3.6.3.1.- Condições de armazenagem	146
3.6.3.2.- Ensaio de avaliação da estabilidade	146
3.6.3.2.1.- Determinação do teor de oxazepam nos supositórios	146
3.6.3.2.2.- Condições do ensaio por HPLC	147
3.6.3.2.3.- Resultados	147
3.6.3.3.- Ensaio de verificação da biocaducidade	148

3.6.3.3.1.- Determinação do tempo de liquefacção	148
3.6.3.3.2.- Determinação da consistência	149
3.6.3.3.3.- Ensaio de absorção	150
3.6.3.3.4.- Resultados	150
3.6.3.4.- Discussão dos resultados	153
3.6.4.- Ensaio em humanos	153
3.6.4.1.- Resultados	154
3.6.4.2.- Discussão dos resultados	156
3.7.- Conclusões	158
3.7.1.- Influência do excipiente	158
3.7.2.- Influência do laurilsulfato de sódio	158
3.7.3.- Estabilidade e biocaducidade	158
3.7.4.- Ensaio em humanos	159

CAPÍTULO IV - SOLUÇÕES INJECTÁVEIS DE LORAZEPAM

4.1.- Introdução	161
4.2.- Hidrólise das benzodiazepinas	162
4.2.1.- Oxazepam	164
4.2.2.- Diazepam	164
4.2.3.- Clorodiazepóxido	165
4.2.4.- Lorazepam	166
4.3.- Hidrólise do lorazepam	167
4.3.1.- Material e métodos	167
4.3.1.1.- Ensaio de decomposição acelerada	168
4.3.1.2.- Cromatografia líquida de alta pressão	168
4.3.1.3.- Cromatografia em camada fina e extracção dos produtos de hidrólise	168
4.3.1.4.- Identificação	170
4.3.1.4.1.- Ponto de fusão	170
4.3.1.4.2.- Espectrofotometria no infravermelho (IV)	171

4.3.1.4.3.- Espectrofotometria no ultravioleta (UV)	171
4.3.1.4.4.- Ressonância magnética nuclear (RMN)	171
4.3.1.4.4.1.- RMN de ¹ H	171
4.3.1.4.4.2.- RMN de ¹³ C	172
4.3.2.- Hidrólise do lorazepam analisada por cromatografia em camada fina	172
4.3.2.1.- Ensaio de decomposição acelerada	173
4.3.2.2.- Cromatografia em camada fina	173
4.3.2.3.- Preparação das soluções padrão	173
4.3.2.4.- Extração e concentração dos compostos presentes nas soluções em estudo	174
4.3.3.- Discussão dos resultados	174
4.4.- Preparação das soluções injectáveis	177
4.4.1.- Material e métodos	178
4.4.1.1.- Reagentes	178
4.4.1.2.- Aparelhagem	178
4.4.1.3.- Acondicionamento	179
4.4.1.4.- Enchimento e fecho das ampolas	179
4.4.1.5.- Esterilização	179
4.4.2.- Avaliação da estabilidade da solução injectável	179
4.4.2.1.- Ensaio de decomposição acelerada	180
4.4.2.2.- Cromatografia líquida de alta pressão	180
4.4.2.2.1.- Condições de análise	180
4.4.2.2.2.- Reagentes	181
4.4.2.2.3.- Análise cromatográfica das amostras e curvas de calibração	182
4.4.3.- Resultados e estudo estatístico	184
4.5.- Influência do pH	185
4.5.1.- Ensaio de decomposição acelerada	186
4.5.2.- Resultados	186
4.5.3.- Discussão dos resultados	192
4.6.- Influência dos solventes	194

4.6.1.- Ensaio de decomposição acelerada	195
4.6.2.- Resultados	195
4.6.3.- Discussão dos resultados	204
4.7.- Influência dos tensoactivos	205
4.7.1.- Ensaio de decomposição acelerada	206
4.7.2.- Resultados	206
4.7.3.- Discussão dos resultados	215
4.7.3.1.- Influência dos tensoactivos na estabilidade do lorazepam quando dissolvido em solução tampão de pH 5,0	216
4.7.3.2.- Influência dos tensoactivos na hidrólise do lorazepam quando dissolvido num solvente constituído por água/propilenoglicol (25:75)	216
4.8.- Conclusões	218
4.8.1.- Mecanismo de hidrólise do lorazepam	218
4.8.2.- Influência do pH	218
4.8.3.- Influência do solvente	218
4.8.4.- Influência dos tensoactivos	219
BIBLIOGRAFIA	220
ANEXO I	235
ANEXO II	241
ANEXO III	244

RESUMO/ABSTRACT/RESUMÉ

As benzodiazepinas, lorazepam e oxazepam, são experimentadas em preparações farmacêuticas com a finalidade de estudar a sua formulação, estabilidade e biodisponibilidade. Este trabalho é dividido em três capítulos experimentais:

1^o- Preparação de comprimidos de acção prolongada contendo oxazepam, usando uma matriz hidrófila constituída por Carbopol 934. Estudo da influência de vários adjuvantes e métodos de preparação na biodisponibilidade do oxazepam. Determinação da estabilidade e biodisponibilidade.

2^o- Estudo da absorção rectal do oxazepam em supositórios. Influência do índice de hidroxilo (glicérides semi-sintéticos - Novata) e do laurilsulfato de sódio (concentrações superiores e inferiores à concentração micelar crítica). Ensaio de avaliação da estabilidade e verificação das características biofarmacêuticas dos supositórios.

3^o- Estudo da estabilidade do lorazepam em soluções aquosas e em solventes de natureza hidrófila. Influência do pH (superiores ou inferiores ao pKa), dos solventes (glicerina, PEG 400, propilenoglicol e água/propilenoglicol) e dos tensoactivos (cloreto de benzalcónio, laurilsulfato de sódio e Tween 80).

The benzodiazepines, lorazepam and oxazepam, are experimented in pharmaceutical preparations to study their formulation, stability and bioavailability. This work is divided in three experimental chapters:

1st. Preparation of oxazepam sustained release tablets, using a hydrophilic matrix made of Carbopol 934. Influence of the adjuvants and preparation methods in the oxazepam dissolution rate. Determination of the stability and bioavailability.

2nd. Study of rectal absorption of oxazepam suppositories. Influence of the hydroxyl value (semi-synthetic glycerides - Novata) and of sodium lauryl sulfate (above and below CMC). Determination of the stability and biopharmaceutical parameters of the suppositories.

3rd - Study of the lorazepam stability in aqueous solution and in hydrophilic solvents. Influence of the pH (above and below pKa), solvents (glycerin, PEG 400, propylene glycol and water/propylene glycol) and surfactants (benzalkonium chloride, sodium lauryl sulfate and Tween 80).

Les benzodiazepines, lorazepam et oxazepam, sont essayés dans quelques formules pharmaceutiques avec l'objectif d'étudier sa formulation, stabilité et biodisponibilité. Ce travail est reparti en trois chapitres expérimentaux:

1^{er}- Préparation de comprimés à libération contrôlée avec oxazepam, employant une matrice hydrophile constituée par Carbopol 934. Étude de l'influence de différents adjuvants et des méthodes de préparation dans la biodisponibilité de l'oxazepam. Détermination de la stabilité et biodisponibilité.

2^{ème}- Étude de l'absorption rectal de l'oxazepam en suppositoires. Influence de l'indice d'hydroxyle (glycérides semi-synthétiques - Novata) et du laurylsulfate de sodium (au-dessus et au-dessous de la CMC). Essai d'évaluation des caractéristiques biopharmaceutiques des suppositoires.

3^{ème}- Étude de la stabilité du lorazepam en solutions aqueuses et en solvants hydrophiles. Influence du pH (au-dessus et au-dessous du pKa), des solvants (glycérine, PEG 400, propylène glycol et eau/propylène glycol) et des surfactants (chlorure de benzalkonium, laurylsulfate de sodium et Tween 80).

PREFÁCIO

Poucas classes de fármacos mereceram a aceitação e a popularidade que obtiveram as benzodiazepinas durante as últimas três décadas. Tudo leva a crer que para tal contribuiu não só a sua relativa segurança (inocuidade, não criação de dependência, tolerância), mas fundamentalmente a resposta eficaz às necessidades dos clínicos e doentes dadas as suas acções farmacológicas.

Por este motivo, as benzodiazepinas são os tranquilizantes mais utilizados no mundo ocidental, sendo o diazepam o exemplo mais representativo deste grupo de compostos.

Assim, não surpreende que hoje em dia as benzodiazepinas sejam dos fármacos estudados com mais intensidade em todo o mundo, podendo isto ser atestado pelas 11 338 referências feitas por Schütz a trabalhos efectuados acerca destes compostos até 1988. Neste conjunto, porém, apenas dizem respeito à área científica em que o presente trabalho se insere, os seguintes estudos: 100 galénicos, 50 de absorção, 500 de farmacocinética e 70 de hidrólise. Por outro lado, a consulta às principais revistas de âmbito farmacêutico também permite concluir que são escassos os trabalhos directamente relacionados com os problemas galénicos decorrentes da preparação de formas farmacêuticas contendo benzodiazepinas. E nesta classe terapêutica, ainda mais raros são os trabalhos referentes ao lorazepam e ao oxazepam.

Atendendo a estes factos, e pretendendo dar continuidade a um trabalho iniciado em 1985, estes dois compostos foram os escolhidos para o estudo presente.

CAPÍTULO I
BENZODIAZEPINAS

- CONSIDERAÇÕES GERAIS -

1.1. - HISTÓRIA

Através da história, e muito particularmente nos tempos que correm, a ansiedade tem sido reconhecida como parte inerente do ser humano, traduzindo de forma evidente as preocupações que sente o cidadão comum no dia a dia. É perante esta realidade que as benzodiazepinas se apresentam como um dos grupos de fármacos mais importantes da actualidade clínica, visto serem os tranquilizantes menores usados com maior frequência no tratamento da ansiedade.

De facto, desde a antiguidade o homem recorreu ao consumo de drogas que actuam sobre as faculdades mentais. Como exemplo, podemos citar Marks(1), que refere "as mulheres etilizadas com genebra popularizadas pelas caricaturas de Hogarth, ou os bebedores de láudano do período vitoriano, o haxixe do Médio Oriente, o ópio da China e a psilociba da América Central".

Contudo, os brometos foram introduzidos na clínica em 1853 inicialmente como sedativos e depois como hipnóticos. Até 1900, apenas o hidrato de cloral, o paraldeído, o uretano e o sulfural foram utilizados como sedativos/hipnóticos. Em 1903, foi introduzido na clínica o barbital e nove anos depois o fenobarbital que, além das acções anteriormente enunciadas, possuía acção anticonvulsivante(2). O sucesso destes compostos é atestado pelos milhares de derivados barbitúricos que foram sintetizados, embora se comercializasse apenas meia centena. Em 1960, com a aparecimento da primeira benzodiazepina, o clordiazepóxido, começou a dar-se o crepúsculo dos barbitúricos.

As benzodiazepinas são agentes terapêuticos descobertos em 1960 e converteram-se de imediato num dos grupos de fármacos mais utilizados em todo o mundo, merecendo mesmo a crítica de que o seu uso se propagou em demasia. Assim, o entusiasmo inicial foi substituído gradualmente por uma condenação crescente que atingiu o auge na década de 70.

No início dos anos 80 debateu-se com profundidade o balanço entre os aspectos positivos e negativos deste grupo de compostos. Não se tendo encontrado substitutos, e com o desenvolvimento de novos derivados benzodiazepínicos, verificou-se novamente uma grande aceitabilidade destes fármacos, que voltam a implantar-se na sociedade contemporânea.

A descoberta da acção das benzodiazepinas no SNC aconteceu com a síntese e o estudo da acção farmacológica do clordiazepóxido em 1960, seguindo-se o diazepam em 1963, o oxazepam e o nitrazepam em 1965.

Embora a introdução clínica destes compostos tivesse ocorrido apenas na década de 60, pode dizer-se que a história destes fármacos começou em finais do século XIX.

Em 1891, Anwers e Von Meyenburg(3) sintetizaram uma benzo-3-oxa-1,4-diazepina por tratamento da 2-aminoacetofenona-oxima(A) ou da 2-acetaminoacetofenona-oxima(B) com a mistura de Beckmann. Por sua vez, o composto (B) pode ser obtido a partir de (A) por reacção com o cloreto de acetilo. Contudo, só em 1924 se estabeleceu a estrutura definitiva das benzo-3-oxa-1,4-diazepinas(C) (Fig. 1).

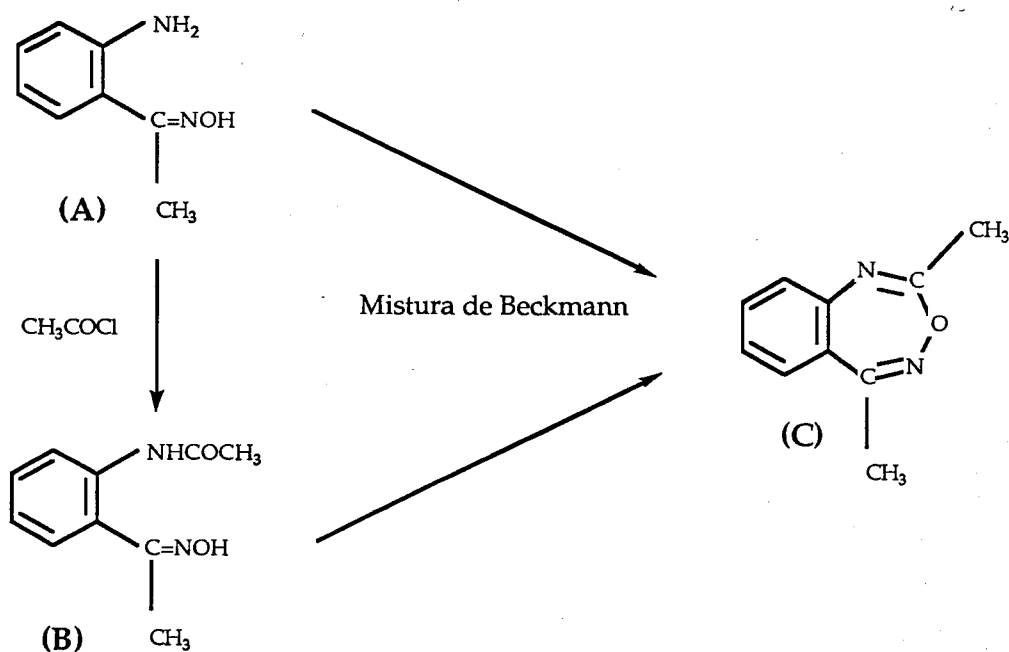


Figura 1 - Síntese das benzo-3-oxa-1,4-diazepinas.

A partir da estrutura destes compostos, Sternback(3,4) idealizou e realizou a síntese de outras benzo-3-oxa-1,4-diazepinas. Começou por fazer modificações no anel benzénico e acetilações nas aminoacetofenona-oximas(D), resultando aminoacetofenona-oximas do tipo(E) que, reagindo com ácidos, permitiram a obtenção de benzo-5-fenil-3-oxa-1,4-diazepinas(F) (Fig. 2).

Prosseguindo os estudos nesta área, a etapa seguinte foi a introdução de grupos químicos na molécula de benzo-5-fenil-3-oxa-1,4-diazepina os quais normalmente comunicam propriedades farmacológicas.

Em 1955, Sternbach verificou que as modificações introduzidas na molécula, nomeadamente uma hidrogenação, não levaram à formação de novas benzo-5-fenil-3-oxa-1,4-

-diazepinas, mas sim à formação de quinazolininas, concretamente à 6-cloro-4-fenilquinazolina-3-óxido(G), por remoção do oxigénio do anel (Fig. 3).

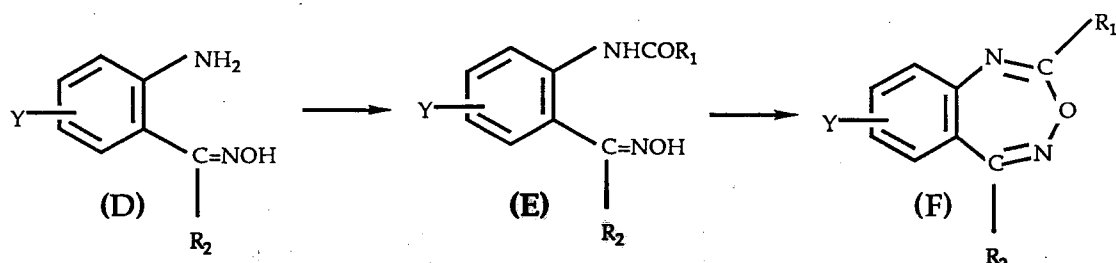


Figura 2 - Síntese das benzo-5-fenil-3oxa-1,4-diazepinas;

R₂ - grupo fenilo; Y - átomo de cloro.

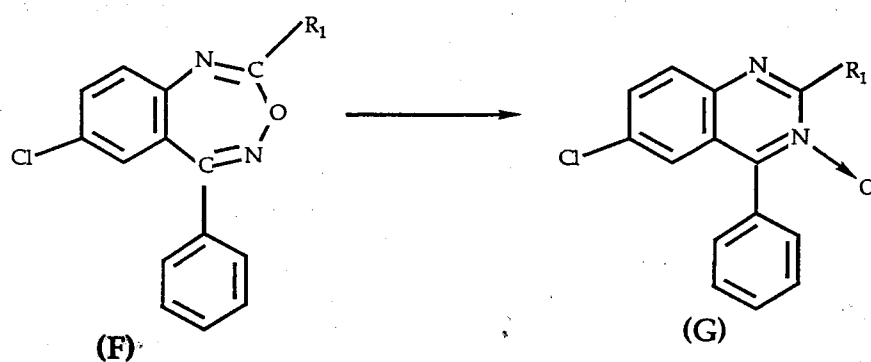


Figura 3 - Síntese da 6-cloro-4-fenilquinazolina-3-óxido.

Em 1957, Sternbach(5) conseguiu finalmente, por tratamento do 6-cloro-4-fenilquinazolina-3-óxido(H) com a metilamina, sintetizar a molécula da primeira 1,4-benzodiazepina, o clordiazepóxido(I) (Fig. 4).

Randall(6) realizou os estudos farmacológicos, concluindo que o clordiazepóxido apresentava propriedades sedativas, tranquilizantes, relaxantes musculares e anticonvulsivantes mais potentes e toxicidade menor do que a apresentada pelos fármacos usados habitualmente na clínica (meprobamato, clorpromazina e fenobarbital).

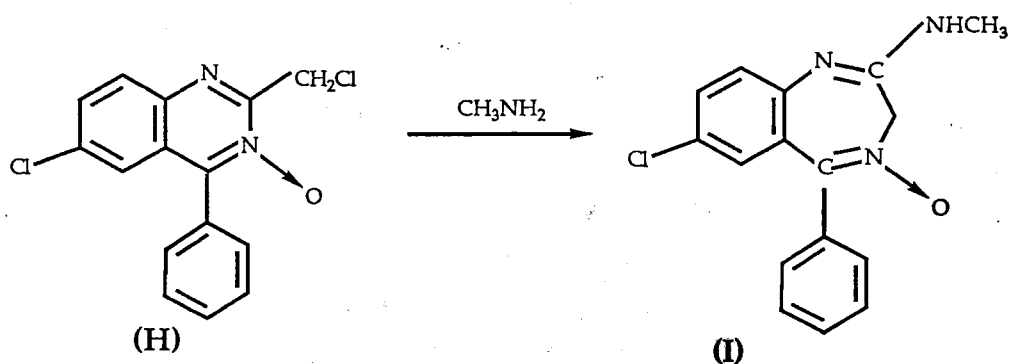


Figura 4 - Síntese do clorodiazepóxido.

Contudo, do ponto de vista químico, a estrutura molecular das 1,4-benzodiazepinas estava em pleno desenvolvimento (a síntese do clorodiazepóxido fora casual), procurando sintetizar-se compostos com maior estabilidade sem modificar as suas propriedades farmacológicas. Assim, o substituinte da posição 2(I), a metilamina, que era causa de instabilidade em soluções e suspensões aquosas inicialmente preparadas, foi facilmente retirado por hidrólise ácida, originando o substituinte 2-cetona, sem que ocorresse qualquer alteração na actividade farmacológica.

Finalmente, foi efectuada a remoção do grupo N-óxido(7), levando à obtenção da estrutura química das 1,4-benzodiazepinas(K), alteração esta que contribuiu para um aumento ligeiro da potência farmacológica destes compostos (Fig. 5).

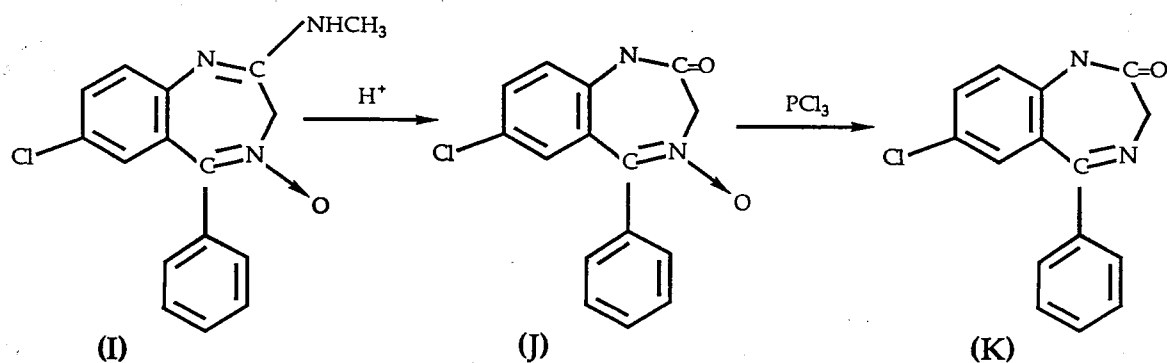


Figura 5 - Síntese das 1,4-benzodiazepinas.

A partir deste momento, os Laboratórios de Indústria Farmacêutica,

principalmente os Laboratórios Roche e os Laboratórios Wyeth, investiram todos os seus esforços na descoberta de novos derivados benzodiazepínicos que apresentassem vantagens relativamente ao clordiazepóxido, quer em estabilidade química, quer em eficácia farmacológica.

Deste modo, não surpreende o aparecimento do diazepam(8,9), fármaco cuja actividade farmacológica é 3 a 10 vezes maior que a manifestada pelo clordiazepóxido, principalmente no que diz respeito à acção relaxante muscular.

Passados dois anos, Bell(10) sintetizou o oxazepam, fármaco que apresentava a mesma actividade farmacológica do clordiazepóxido, manifestando contudo uma diminuição dos efeitos secundários(11).

No mesmo ano, Sternbach(12) sintetizou o nitrazepam, fármaco que se revelou com uma actividade anticonvulsivante extraordinária(13).

Ao longo dos últimos 20 anos foram sintetizadas e comercializadas muitas outras 1,4-benzodiazepinas, demonstrando o elevado interesse clínico que estes fármacos têm suscitado. Podem referir-se como exemplos o medazepam em 1968, o temazepam e o flurazepam em 1970, o clorazepato dipotássico em 1972, o desmetildiazepam em 1973, o bromazepam e o tetrazepam em 1974, o flunitrazepam e o clonazepam em 1975, o lorazepam e o prazepam em 1977, etc.

Entretanto, foram desenvolvidos programas(14) para a obtenção de novos derivados benzodiazepínicos, conduzindo à obtenção de modelos sofisticados destes compostos. Um interesse particular vai para os compostos resultantes da introdução de um anel heterocíclico na posição 1 e 2 das 1,4-benzodiazepinas, originando as triazolo e as imidazolobenzodiazepinas.

As triazolobenzodiazepinas(15,16) são as 1,2-heterociclo-1,4-benzodiazepinas mais conhecidas, visto que possuem um rendimento terapêutico elevado. As imidazolobenzodiazepinas(17,18) são as 1,2-heterociclo-1,4-benzodiazepinas mais recentes, sendo o anel imidazólico responsável pelo aumento da estabilidade, enquanto a presença do grupo metilo na posição 1 do referido anel é responsável pela acção ultra-curta destes compostos.

As primeiras triazolobenzodiazepinas comercializadas foram o estolazam em 1975, o triazolam em 1977 e o alprazolam em 1981. Quanto às imidazolobenzodiazepinas, o primeiro composto a ser comercializado foi o midazolam em 1978.

A introdução de um anel heterocíclico na posição 4 e 5 das 1,4-benzodiazepinas originou o aparecimento das oxazolo e oxazinobenzodiazepinas(19). Estes fármacos pertencem

ao grupo das 4,5-heterociclo-1,4-benzodiazepinas, cujo comportamento farmacológico é semelhante ao do diazepam.

As oxazolobenzodiazepinas comercializadas até ao momento são o cloxazolam, o flutazolam, o haloxazolam e o oxazolam, enquanto o cetazepam é a única oxazinobenzodiazepina.

A evolução química destes compostos levou ao aparecimento de uma nova estrutura química, as 1,5-benzodiazepinas. Apesar da alteração química verificada na posição 4 (de uma função imina por um grupo cetónico) as 1,5-benzodiazepinas apresentam um comportamento farmacológico semelhante ao das 1,4-benzodiazepinas. O clobazam é o composto mais conhecido.

Recentemente, foi sintetizada uma nova estrutura química, a qual pode designar-se por 2,3-benzodiazepinas; até ao presente momento, só o tofisolam é comercializado, possuindo propriedades ansiolíticas.

Devido à aceitação que as benzodiazepinas têm na actualidade(20,21), quer por parte dos clínicos, quer por parte dos doentes, e sabendo a importância que este grupo de fármacos representa para os Laboratórios da Indústria Farmacêutica, é de supor que na década de 90 novas benzodiazepinas surgirão, já que não se vislumbra, para este século, o aparecimento de substitutos dotados da mesma actividade e, até, maior inocuidade.

1.2. - CLASSIFICAÇÃO E RELAÇÃO ESTRUTURA-ACTIVIDADE

As benzodiazepinas são classificadas, de acordo com a sua estrutura química, em cinco grupos: as 1,4-benzodiazepinas, as 1,2-heterociclo-1,4-benzodiazepinas, as 4,5-heterociclo-1,4-benzodiazepinas, as 1,5-benzodiazepinas e as 2,3-benzodiazepinas.

No Quadro I, encontra-se esquematizada esta classificação, e nele se indicam os grupos, os subgrupos e exemplos dos compostos mais significativos de cada tipo.

QUADRO I
CLASSIFICAÇÃO DAS BENZODIAZEPINAS

GRUPO	SUBGRUPO	COMPOSTOS
1,4-benzodiazepinas	2-amino-4-óxido	clordiazepóxido
	1,3-dihidro-2-cetona	clonazepam; desmetildiazepam diazepam; flunitrazepam flurazepam; lorazepam lormetazepam; nitrazepam oxazepam; prazepam; temazepam
	1,3-dihidro-2-tioxo	quazepam
	2,3-dihidro	medazepam; metaclozepam
1,2-heterociclo- -1,4-benzodiazepinas	imidazolo	midazolam
	triazolo	adinazolam; alprazolam estolazam; triazolam
4,5-heterociclo- -1,4-benzodiazepinas	oxazolo	cloxazolam; flutazolam haloxazolam; oxazolam
	oxazino	cetazepam
1,5-benzodiazepinas		clobazam
2,3-benzodiazepinas		tofisolam

Como se pode observar no Quadro I, as 1,4-benzodiazepinas representam o grupo mais importante, atendendo não só à quantidade de derivados que o forma, mas devido fundamentalmente à grande utilização na clínica(19,22). As 1,3-dihidro-2-cetona são as mais usadas.

Assim sendo, com excepção do clorodiazepóxido, medazepam, metaclozepam e quazepam, todas têm a mesma estrutura química(Fig. 6), diferindo apenas nos substituintes das posições R₁, R₃, R₇ e R₂' (Quadro II).

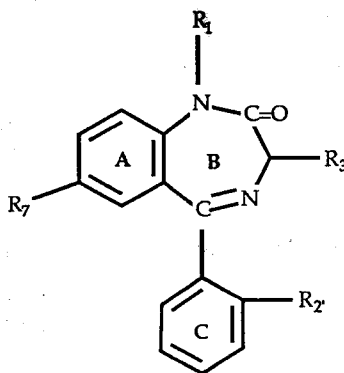


Figura 6 - Estrutura química das 1,4-benzodiazepinas.

As 1,4-benzodiazepinas têm uma estrutura química constituída por três anéis, designados por A, B e C, estando a actividade farmacológica destes compostos dependente dos seus substituintes(19).

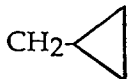
No anel A é necessário e importante para a farmacocinética desejada a presença de um grupo electronegativo na posição 7. A actividade aumenta com a presença de substituintes cloro, nitro e trifluormetilo e diminui com a presença de substituintes metilo e metoxi. O principal substituinte na posição 7 é o átomo de cloro. Contudo, a nível da relação estrutura-actividade farmacológica tem-se verificado que o grupo nitro, por exemplo no clonazepam, é o responsável pelo aumento da potência anticonvulsivante. Qualquer substituinte nas posições 6, 8 e 9, diminui a actividade das 1,4-benzodiazepinas.

No anel B, a presença de um substituinte metilo, na posição 1, aumenta a actividade farmacológica destes compostos, enquanto a presença de substituintes de cadeia longa a diminui. Na posição 2, a substituição da função cetónica diminui a actividade. A presença de um grupo electronegativo, hidróxi ou metoxi, na posição 3, diminui a potência das

1,4-benzodiazepinas, mas, por outro lado, diminui também a toxicidade destas moléculas, visto serem facilmente metabolizadas por conjugação. O tert-butilo é completamente inactivo.

No anel C, a presença de substituintes cloro ou fluor na posição 2'(orto) aumenta a actividade farmacológica, enquanto em *meta* ou em *para* a diminui, além de apresentar efeitos indesejáveis.

QUADRO II
SUBSTITUINTES DAS POSIÇÕES R₁, R₃, R₇, e R₂'
DAS 1,4-BENZODIAZEPINAS

1,4-BENZODIAZEPINAS	R ₁	R ₃	R ₇	R ₂ '
clonazepam	H	H	NO ₂	Cl
desmetildiazepam	H	H	Cl	H
diazepam	CH ₃	H	Cl	H
flunitrazepam	CH ₃	H	NO ₂	F
flurazepam	CH ₂ CH ₂ N(C ₂ H ₅) ₂	H	Cl	F
lorazepam	H	OH	Cl	Cl
lormetazepam	CH ₃	OH	Cl	Cl
nitrazepam	H	H	NO ₂	H
oxazepam	H	OH	Cl	H
prazepam	CH ₂ 	H	Cl	H
temazepam	CH ₃	OH	Cl	H

1.3.- SÍNTESE

Com o sucesso clínico alcançado pelas benzodiazepinas, e associando a este facto o aparecimento de um número cada vez maior destes compostos, desenvolveram-se vários métodos para a sua síntese(3,23), prevalecendo essencialmente os indicados na Fig. 7.

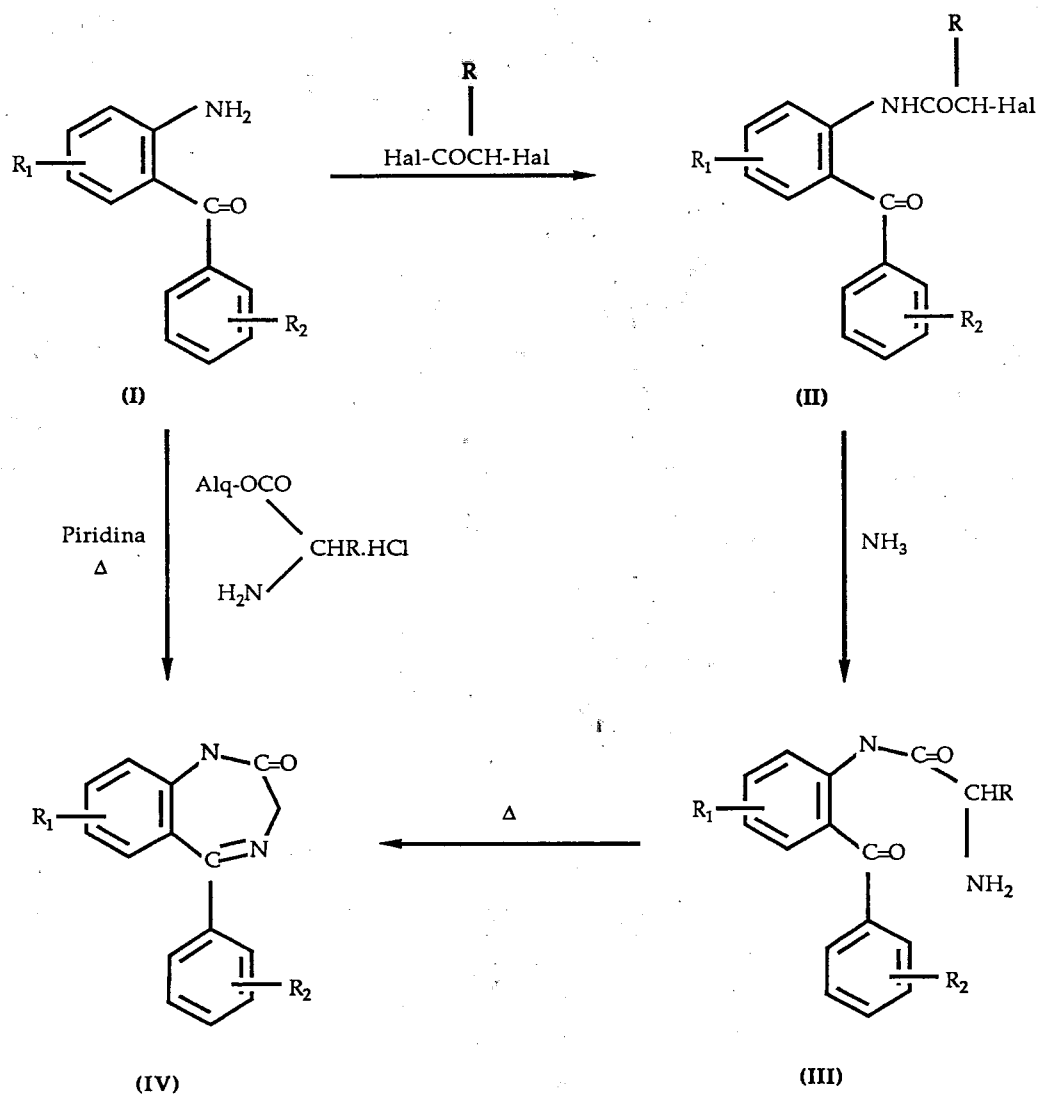


Figura 7 - Métodos usados na síntese das 1,4-benzodiazepinas.

Método A: I -> II -> III -> IV.

Método B: I -> IV.

Como pode observar-se, em ambos os casos, como matérias-primas para a síntese das benzodiazepinas são usadas as *o*-aminocetonas (I).

No método A, por tratamento apropriado, substituindo com um halogeneto de haloalquilacetilo a benzofenona, obtém-se um composto(II) que, tratado com amónia, origina uma 1,4-benzodiazepina(IV), formando-se o composto intermediário aminado(III). Este composto cicliza rapidamente por aquecimento e em muitos casos espontaneamente.

O método B, por tratamento da benzofenona com um cloridrato de um éster alquílico de um aminoácido num solvente, preferencialmente a piridina, conduz directamente do composto(I) à 1,4-benzodiazepina(IV).

O método A geralmente origina melhores produções com cerca de 70-80% de produtos puros. O método B facilita a síntese de 1,4-benzodiazepinas que possuam substituintes na posição 3. Desde então muitos α -aminoácidos transportam adicionalmente substituintes no carbono α .

1.4.- FARMACOLOGIA

As acções farmacológicas das benzodiazepinas são a causa primordial da grande aceitação que estes compostos têm na classe médica em particular e nos doentes em geral.

As acções farmacológicas das benzodiazepinas são as seguintes: acção ansiolítica, acção sedativa(hipnótica), acção anticonvulsivante e acção relaxante muscular. Todas estas acções se apresentam em maior ou menor extensão, e a predominância de uma delas relativamente às restantes, para uma mesma benzodiazepina, depende apenas e exclusivamente da dose e da via de administração utilizada.

Muitos dos trabalhos desenvolvidos nesta área, além de mostrarem como as benzodiazepinas produzem os seus efeitos terapêuticos, têm fornecido indicações para explicarem os mecanismos neuroquímicos básicos que intervêm no controlo da ansiedade, convulsões, relaxamento muscular e, talvez, do sono. Um facto que sobressai é a diversidade de mecanismos de acção que lhes são atribuídos. Com efeito, as pesquisas efectuadas ainda não permitiram chegar à demonstração de uma só teoria, mas sim de várias hipóteses, para explicar os efeitos farmacológicos das benzodiazepinas. Contudo, a orientação da investigação foi progressivamente dirigida para o estudo da acção indutora das benzodiazepinas na modulação do funcionamento de certas vias neuronais, particularmente ao nível da neurotransmissão.

Para explicar as acções farmacológicas das benzodiazepinas tem sido proposta uma multiplicidade de sistemas neurotransmissores, nomeadamente a acetilcolina(24,25), as catecolaminas(26-30), a serotonina(31,32), o ácido γ -aminobutírico (GABA)(33-37) e a glicina(38,39).

Os estudos bioquímicos e electrofisiológicos mais recentes sugerem que as benzodiazepinas actuam no SNC, pelo menos em parte, facilitando a transmissão em neurónios gabaérgicos. Nos anos 70 e 80 foram feitas várias descobertas nesta área, destacando-se as seguintes: as benzodiazepinas actuam a nível neuronal potenciando o principal neurotransmissor inibitório, o GABA(33,40-43); no cérebro dos mamíferos identificaram-se receptores específicos para as benzodiazepinas, localizados nas sinapses gabaérgicas (20,44).

O GABA é o principal neurotransmissor do cérebro e distribui-se de uma maneira pouco uniforme por todo o SNC. A concentração mais elevada de GABA encontra-se nas áreas extrapiramidais e hipotálamo, sendo na medula espinhal que se encontra em concentração mais baixa(32).

Existem dois tipos de receptores GABA, um dependente (receptor ligado ao

transportador de membrana) e outro independente da presença do sódio(28,30,31). Este último, post-sináptico, ainda poderá ser subdividido em receptores GABA_A e GABA_B(33,35,36). O receptor GABA_A é insensível ao baclofeno, sensível à bicuculina e está ligado ao canal cloro. O receptor GABA_B é sensível ao baclofeno, insensível à bicuculina e parece requerer a presença de cálcio(33,34,45).

Estudos *in vitro* e *in vivo* têm revelado que as benzodiazepinas, os barbitúricos, os opiáceos, o etanol e outros psicofármacos exercem muita influência nos componentes do complexo receptor GABA. Nas membranas do SNC, o GABA, as benzodiazepinas, a picrotoxina e os barbitúricos ocupam quatro locais diferentes, mas que interactuam(46). Em geral, os fármacos depressores, ansiolíticos, anticonvulsivos e convulsivos, actuam por ligação a um componente modificando alostericamente os outros locais de ligação deste complexo(36).

Perto destes locais de ligação foi identificada uma substância que modifica a afinidade dos receptores do GABA, a GABA-modulina, reduzindo de forma não competitiva o número de locais de alta afinidade para o GABA(33,40,44,48,49). A sua remoção origina um aumento da afinidade do GABA para os seus receptores(33,45,47,48).

Existem muitas maneiras de alterar a transmissão mediada pelo GABA. A neurotransmissão é facilitada pelas benzodiazepinas devido à sua capacidade de a aumentar, por remoção ou inibição da GABA-modulina(49).

Contudo, o efeito farmacológico das benzodiazepinas depende fundamentalmente da sua capacidade de ligação para os receptores específicos, visto que novos tipos de moléculas com alta afinidade para esses receptores foram descobertos(50-54). De facto, as benzodiazepinas competem no local específico do receptor GABA com outras substâncias, que são classificadas de acordo com a acção produzida. Assim, os agonistas actuando nos receptores referidos produzem o mesmo efeito farmacológico que aquelas (zopiclone, zopildem, etc.); os antagonistas competitivos não modificam a actuação do GABA, nem produzem efeitos farmacológicos (flumazenil); os agonistas inversos fixam-se aos receptores benzodiazepínicos produzindo efeitos farmacológicos contrários, isto é, actuam como convulsivantes e ansiogénios (DMCM, β -Carbolinas)

As propriedades anticonvulsivas e relaxantes musculares (55-57) das benzodiazepinas podem ser explicadas pelo papel importante que o GABA desempenha como neurotransmissor dos receptores post-sinápticos, na epilepsia e no relaxamento muscular. As propriedades ansiolíticas e hipnóticas destes compostos são ainda de difícil explicação. Segundo uns autores(58-61), resultam da potenciação do efeito do GABA no córtex; para outros (62), talvez a mediação seja feita por outros receptores.

1.5.- ASPECTOS FARMACOCINÉTICOS

Uma das principais diferenças entre as benzodiazepinas é o comportamento farmacocinético e metabólico que têm no homem. Após a administração de uma dose destes compostos, uns são eliminados a uma velocidade muito lenta (desmetildiazepam), enquanto outros desaparecem rapidamente do organismo (triazolam). Estas diferenças são muito importantes clinicamente, visto que os factores farmacocinéticos determinam a duração do efeito do fármaco e, deste modo, constituem a base para a elaboração de um regime racional de dosagem.

Para as várias indicações clínicas a necessidade de duração do efeito farmacológico das benzodiazepinas difere completa e fundamentalmente. Nos tratamentos prolongados, anticonvulsivantes ou ansiolíticos, as benzodiazepinas utilizadas devem ter um comportamento farmacocinético prolongado, indicando-se para o efeito fármacos com acção longa, pois estes são lentamente eliminados do organismo. Nestas circunstâncias, depois da administração de uma dose de fármaco, a concentração efectiva deste mantém-se sem que seja necessária administração frequente. Por outro lado, se se deseja acção hipnótica, a acção do fármaco deve ser restrita à noite, pois o doente deve despertar isento de qualquer efeito farmacológico. Assim, em terapia hipnótica deve recorrer-se a benzodiazepinas de acção curta, sendo administradas todas as noites e originando assim uma acção farmacológica intermitente.

Com base nestas considerações pode concluir-se que, para o tratamento ansiolítico e anticonvulsivante, as benzodiazepinas mais convenientes são as de tempo de semi-vida biológica grande (acção longa), enquanto para o tratamento sedativo (hipnótico) há vantagens em utilizar benzodiazepinas com tempo de semi-vida biológica pequeno (acção curta)(63).

Na farmacocinética das benzodiazepinas é essencial não se considerar apenas a cinética do fármaco, mas também a dos seus metabolitos activos, que possuem características farmacocinéticas próprias. Portanto, o efeito clínico das benzodiazepinas resulta do somatório das farmacocinéticas do fármaco e dos seus metabolitos activos. Isto é particularmente importante durante um tratamento crónico, quando ocasionalmente os níveis de metabolitos activos são mais elevados do que os da benzodiazepina administrada. Esta situação ocorre frequentemente, quando o fármaco administrado tem um tempo de semi-vida biológica pequeno (clorazepato dipotássico, fosazepam e prazepam) e é metabolizado num composto

farmacologicamente activo com um tempo de semi-vida biológica grande (desmetildiazepam) (63-65).

A eliminação dos metabolitos activos é de grande importância em relação à classificação destes fármacos em benzodiazepinas de acção curta, média ou longa. Quando um composto forma quantidades apreciáveis de um metabolito activo com um tempo de semi-vida biológica grande, será potencialmente de acção longa, mesmo quando o composto precursor é eliminado completa e rapidamente (tempo de semi-vida biológica pequeno). Isto acontece principalmente com benzodiazepinas que contêm grupos azotados substituídos, pois sofrem N-desalquilação oxidativa (diazepam e flurazepam)(66-69). Se as benzodiazepinas contêm um grupo hidroxilo, este é directamente conjugado em compostos inactivos, dependendo da duração dos efeitos farmacológicos apenas do composto precursor, geralmente classificado como benzodiazepina de acção curta ou média (lorazepam, oxazepam e temazepam)(70-75).

1.5.1.-FARMACOCINÉTICA

Quando uma benzodiazepina é administrada (excepto na administração por via endovenosa) e se estuda a concentração plasmática em função do tempo, obtém-se uma curva na qual se podem distinguir três fases: fase de absorção, com aumento da concentração; fase de distribuição, com diminuição rápida da concentração depois de atingida a concentração máxima, e a fase de metabolização e eliminação, com diminuição lenta da concentração.

1.5.1.1.- Fase de absorção


A intensidade de acção de um determinado fármaco depende em grande parte da velocidade de absorção e do aparecimento de substâncias activas no sangue.

As benzodiazepinas são bem absorvidas quando administradas por via oral. Como se pode observar no Quadro III, o diazepam e o clorazepato dipotássico são rapidamente absorvidos com resultado imediato nos efeitos farmacológicos. Em contraste, o prazepam, devido apenas à metabolização lenta no seu metabolito activo, o desmetildiazepam, origina o aparecimento dos efeitos farmacológicos tardios(71,76-78).

A absorção das benzodiazepinas varia, consoante o composto em questão, quando

administradas por via intramuscular. Assim, em relação ao clordiazepóxido e ao diazepam a absorção é lenta e irregular, enquanto para o lorazepam é rápida e completa(70,79-81).

QUADRO III
VELOCIDADE DE ABSORÇÃO
APÓS ADMINISTRAÇÃO POR VIA ORAL

BENZODIAZEPINA	VELOCIDADE DE ABSORÇÃO
Diazepam Clordiazepóxido	RÁPIDA
Lorazepam Flurazepam Alprazolam Triazolam Oxazepam Temazepam	
Prazepam	LENTA

Em relação à administração por via rectal, estudos referentes ao diazepam e ao nitrazepam indicam uma absorção rápida e completa(82-84). Todavia, no que diz respeito ao oxazepam e ao temazepam a absorção rectal é menor que a verificada na administração oral(75,85).

Quanto à absorção por via sublingual, há estudos em relação ao lorazepam indicando que as concentrações plasmáticas não diferem significativamente das encontradas após a administração por via oral e intramuscular(86).

Para o flurazepam, midazolam e triazolam, a administração por via intranasal origina uma absorção maior do que a encontrada para a via oral (87).

1.5.1.2.- Fase de distribuição

De um modo geral, as benzodiazepinas aparecem ligadas às proteínas plasmáticas em altas percentagens, como se pode observar no Quadro IV(22). Em concentrações terapêuticas o clordiazepóxido e o diazepam ligam-se às proteínas plasmáticas em 92-97% e 98-99%, respectivamente.

Além da ligação proteica muito elevada, as benzodiazepinas são muito lipossolúveis (com excepção do midazolam), distribuindo-se rapidamente nos tecidos do organismo e atravessando facilmente a barreira hematoencefálica(88).

QUADRO IV
LIGAÇÃO ÀS PROTEÍNAS PLASMÁTICAS

BENZODIAZEPINA	LIGAÇÃO ÀS PROTEÍNAS (%)
Alprazolam	67-72
Clobazam	88-93
Clordiazepóxido	92-97
Diazepam	98-99
Desmetildiazepam	96-98
Flunitrazepam	77-80
Lorazepam	88-92
Midazolam	95-98
Nitrazepam	82-87
Oxazepam	95-98
Temazepam	97-98
Triazolam	75-80

A solubilidade e distribuição das benzodiazepinas nos lípidos têm implicações no seu comportamento clínico(89). Como o aumento da lipofilia facilita a passagem para o SNC, a resposta de acção do diazepam é mais rápida do que a do clordiazepóxido e do lorazepam. Por outro lado, as benzodiazepinas com características mais lipófilas transferem-se rapidamente da corrente sanguínea e do cérebro para locais periféricos de armazenamento, como é o caso do tecido adiposo. Assim se compreende que o efeito terapêutico de uma dose de

lorazepam (que tem um tempo de semi-vida biológica médio), administrada por via endovenosa seja maior do que o de uma dose de diazepam, devido essencialmente ao facto de a sua concentração plasmática diminuir lentamente, estando associado com a distribuição nos tecidos.

As benzodiazepinas atravessam a placenta. Estudos realizados com o diazepam e o oxazepam indicam que estes compostos aparecem na circulação fetal em concentrações plasmáticas iguais ou superiores às encontradas no plasma materno (88,90-92).

1.5.1.3.- Fase de metabolização e de eliminação

Com excepção do clorazepato dipotássico, o principal local de metabolização das benzodiazepinas é o fígado. A principal via de eliminação é a excreção renal.

As principais vias metabólicas das benzodiazepinas envolvem processos de oxidação (desalquilação e hidroxilação), de conjugação (glucuronização e acetilação) e de redução (Quadro V)(78).

QUADRO V
VIAS METABÓLICAS

OXIDAÇÃO	CONJUGAÇÃO	REDUÇÃO
Alprazolam	Lorazepam	Clonazepam
Clobazam	Lormetazepam	Nitrazepam
Clordiazepóxido	Oxazepam	
Diazepam	Temazepam	
Desmetildiazepam		
Flunitrazepam		
Midazolam		
Triazolam		

Em geral, as benzodiazepinas que seguem a via oxidativa têm tempos de semi-vida biológica grandes e metabolitos activos, enquanto aquelas que são conjugadas

apresentam tempos de semi-vida biológica pequenos e metabolitos inactivos. As benzodiazepinas de acção longa têm como metabolito activo o desmetildiazepam. O tempo de semi-vida biológica deste metabolito é de 50-100 horas, o que prolonga a actividade farmacológica da benzodiazepina que o originou.

O metabolismo e a eliminação das benzodiazepinas são parâmetros importantes, porque permitem determinar a velocidade e a extensão com que estes compostos são acumulados no organismo. As benzodiazepinas com tempos de semi-vida biológica grandes acumulam-se lenta e extensamente, enquanto as de tempos de semi-vida biológica pequenos estabilizam rapidamente e acumulam-se muito pouco.

1.5.2.- CLASSIFICAÇÃO

As benzodiazepinas são classificadas de acordo com os seus tempos de semi-vida biológica e/ou os seus metabolitos activos, nos seguintes grupos: benzodiazepinas de acção ultra-curta ; benzodiazepinas de acção curta a média e benzodiazepinas de acção longa (22,88,93,94).

1.5.2.1.- Benzodiazepinas de acção ultra-curta

O triazolam e o midazolam são benzodiazepinas de acção ultra-curta por apresentarem tempos de semi-vida biológica pequenos, de 1,5-5 horas. Também os seus metabolitos activos contribuem para esta classificação, pois, no caso do triazolam, o 4-hidroxitriazolam e o α -hidroxitriazolam são encontrados no sangue em concentrações abaixo das concentrações terapêuticas, ao passo que no caso do midazolam a forma livre 1-hidroximetilmidazolam tem um tempo de semi-vida biológica de 1 hora e a forma conjugada de 80 minutos.

1.5.2.2.- Benzodiazepinas de acção curta a média

O lorazepam, o oxazepam e o temazepam têm tempos de semi-vida biológica de 10-15, de 5-10 e de 9,5-12,5 horas, respectivamente. Estes compostos são conjugados pelo ácido glucurónico formando metabolitos inactivos. Uma fracção pequena (1%) de temazepam sofre desmetilação originando o oxazepam. O oxazepam é metabolito activo de várias benzodiazepinas, resultando em regra da hidroxilação do desmetildiazepam.

O alprazolam também é uma benzodiazepina de acção média, pois apresenta um tempo de semi-vida biológica de 12-15 horas. A principal via de metabolização do alprazolam envolve uma oxidação (hidroxilação) e uma conjugação (glucuronização). Dos vários metabolitos, o α -hidroxialprazolam é o principal, pois é o único que possui actividade terapêutica significativa.

1.5.2.3.- Benzodiazepinas de acção longa

O diazepam tem um tempo de semi-vida biológica de 20-70 horas. O seu principal metabolito é o desmetildiazepam, cujo tempo de semi-vida biológica é de 50-100 horas. Outros metabolitos activos do diazepam são o oxazepam e o temazepam. Durante a administração crónica de diazepam, a actividade clínica e os efeitos secundários são explicados pela acumulação do desmetildiazepam.

O flurazepam tem um tempo de semi-vida biológica pequeno, de 2,3 horas, sendo um fármaco inactivo até ser metabolizado. A longa acção é atribuída a um dos seus metabolitos activos, o desalquilflurazepam, cujo tempo de semi-vida biológica é de 47-100 horas. O hidroxietilflurazepam é um metabolito de acção curta, tendo um tempo de semi-vida biológica de apenas 2-4 horas.

O clorodiazepóxido é metabolizado a desmetilclorodiazepóxido e a demoxepam, que são farmacologicamente activos. O demoxepam é em parte inactivado e em parte convertido em desmetildiazepam, que é então hidroxilado a oxazepam. Assim, a actividade terapêutica do clorodiazepóxido é mantida por quatro metabolitos. Os tempos de semi-vida biológica do clorodiazepóxido e dos dois principais metabolitos, o desmetilclorodiazepóxido e o demoxepam, são de 5-30, de 8-24 e de 14-95 horas, respectivamente.

O clorazepato dipotássico é considerado como um pró-fármaco devido à hidrólise ácida que sofre no estômago, originando o desmetildiazepam, que aparece na corrente

sanguínea e é responsável pela sua acção longa.

As benzodiazepinas acima descritas representam exemplos típicos de cada grupo. Existem, contudo, muitas outras benzodiazepinas cuja enumeração e descrição se tornaria cansativa e repetitiva. Por isso se elaborou o Quadro VI onde aparecem as benzodiazepinas usadas com mais frequência na clínica.

QUADRO VI
TEMPOS DE SEMI-VIDA BIOLÓGICA ($t_{1/2}$)
E METABOLITOS ACTIVOS

BENZODIAZEPINA	$t_{1/2}$ (horas)	METABOLITOS ACTIVOS
ACÇÃO ULTRA-CURTA		
Midazolam	1,5-5	1-hidroximetilmidazolam
Triazolam	1,5-5	α -hidroxi e 4-hidroxitriazolam
ACÇÃO CURTA		
Oxazepam	5-10	
ACÇÃO MÉDIA		
Alprazolam	12-15	α -hidroxialprazolam
Flunitrazepam	15-35	Desmetilflunitrazepam
Lorazepam	10-15	
Nitrazepam	20-40	
Temazepam	9,5-12,5	Oxazepam
ACÇÃO LONGA		
Clonazepam	18-39	7-amino e 7-acetaminoclonazepam
Clordiazepóxido	5-30*	Desmetilclordiazepóxido; Demoxepam
Desmetildiazepam	50-100	Oxazepam
Diazepam	20-70	Desmetildiazepam; Oxazepam; Temazepam
Flurazepam	2,3*	Hidroxietil e Desalquilflurazepam; Hidroxietilflurazepam

* - Incluído no grupo de acção longa devido aos tempos de semi-vida biológica dos metabolitos.

1.5.3.- FACTORES QUE INFLUENCIAM A FARMACOCINÉTICA

Embora as benzodiazepinas não sejam fármacos que apresentem riscos toxicológicos demasiado grandes quando administradas em doses terapêuticas, é importante ter em atenção que a farmacocinética destes compostos varia de maneira mais ou menos significativa em função dos seguintes factores: grupos etários, sexo e estados patológicos.

1.5.3.1.- Grupos etários

1.5.3.1.1.- Gravidez e período perinatal

As benzodiazepinas atravessam facilmente as membranas biológicas, incluindo a placenta.

Quando administradas durante o primeiro trimestre da gravidez, podem causar danos no feto, aumentando o risco de mal-formações congénitas(95).

A administração crónica durante a gravidez pode originar dependência no recém-nascido, que se traduz em síndrome de abstinência. As benzodiazepinas com acção hipnótica (flurazepam, temazepam e triazolam) são contra-indicadas durante este período(88,96).

As benzodiazepinas são utilizadas no parto como relaxantes da musculatura pélvica, para prevenir e inibir as convulsões eclâmpsicas, ou para diminuir a ansiedade da mãe(97). Contudo, a administração de doses elevadas destes compostos antes ou durante o parto pode provocar no recém-nascido depressão respiratória, hipotermia e alterações do ritmo cardíaco(96).

As benzodiazepinas são excretadas no leite, mas só atingem níveis clínicos significativos se a mãe tomar doses elevadas(94,98).

1.5.3.1.2.- Pediatria

É no controlo das convulsões e da ansiedade que se encontra a principal indicação das benzodiazepinas em pediatria(16). As benzodiazepinas têm que ser administradas cuidadosamente nas crianças para não causarem efeitos longos e indesejáveis, devido ao facto de o metabolismo e a excreção estarem enfraquecidos em relação aos adultos, principalmente a

capacidade de hidroxilação que é limitada nos primeiros dias após o parto(99).

O uso do midazolam é controverso, já que é indicado por uns(100) e contra-indicado por outros(101).

1.5.3.1.3.- Geriatría

A farmacocinética das benzodiazepinas altera-se com o envelhecimento do corpo humano. O tempo de semi-vida biológica e o volume aparente de distribuição aumentam, enquanto a clearance total diminui. Assim, aumenta a acumulação destes fármacos e seus metabolitos, o que explica o aumento da intensidade dos efeitos secundários nos idosos (102,103).

Nestas circunstâncias, as benzodiazepinas com tempos de semi-vida biológica pequenos, como é o caso do oxazepam e do lorazepam, apresentam vantagens pois são compostos metabolizados por glucuronização que não seguem as vias metabólicas oxidativas enfraquecidas nos idosos(104-106).

1.5.3.2.- Sexo

O sexo influencia as concentrações plasmáticas máximas das benzodiazepinas, que tendem a ser mais altas na mulher que no homem(107).

1.5.3.3.- Estados patológicos

1.5.3.3.1.- Doenças hepáticas

Como o fígado é o principal local de metabolização das benzodiazepinas, as doenças hepáticas originam enfraquecimento dos processos metabólicos, nomeadamente a desalquilação e a hidroxilação, causando alterações significativas na farmacocinética destes compostos(108). Nestas circunstâncias, aconselham-se benzodiazepinas com tempos de semi-vida biológica pequenos, como o lorazepam e o oxazepam, para evitar acumulação excessiva de fármaco e/ou dos seus metabolitos activos(109,110).

1.5.3.3.2.- Hipoalbuminémia

Como as benzodiazepinas aparecem ligadas em alta percentagem à albumina no sangue, em doentes com hipoalbuminémia deve diminuir-se a dose diária, para que a quantidade de fármaco livre diminua também(111).

1.5.3.3.3.- Doenças respiratórias

Embora as benzodiazepinas causem menos depressão respiratória que outros sedativos, em caso de doenças respiratórias devem utilizar-se com precaução, pois podem originar falhas respiratórias(95).

1.5.3.3.4.- Doenças cardiovasculares

As benzodiazepinas em doentes cardiovasculares originam efeitos secundários insignificantes, excepto em intoxicações graves.

Os estudos já realizados revelam que as benzodiazepinas são inócuas, mesmo em doentes submetidos a cirurgia cardíaca, não existindo alterações importantes no ritmo cardíaco, na pressão sanguínea e na resistência periférica(112).

1.5.3.3.5.- Doenças renais

Apesar da excreção renal ser a principal via de eliminação das benzodiazepinas, o efeito das doenças renais na farmacocinética destes fármacos não está esclarecido, porque as disfunções renais resultam numa redução das proteínas plasmáticas, originando um aumento de fármaco livre e um aumento da clearance total(113).

1.5.4.- INTERACÇÕES

Basicamente, as interacções entre os fármacos podem ocorrer a três níveis distintos: farmacêutico (preparações), farmacodinâmico e farmacocinético.

Contudo, as alterações sofridas pelas benzodiazepinas acontecem essencialmente a nível da farmacocinética quando administradas em conjunto com outros fármacos. Estas alterações podem ter lugar nas diferentes etapas farmacocinéticas destes compostos.

1.5.4.1.- Interacções na absorção

Geralmente, as benzodiazepinas são administradas por via oral. Quando o clorazepato dipotássico é administrado por esta via em simultâneo com antiácidos, verifica-se uma menor absorção desta benzodiazepina, originando concentrações plasmáticas mais baixas do que as obtidas quando administrada sózinha, devido à alteração do pH no estômago(114). Esta alteração na absorção não se verifica quando se administra simultaneamente clordiazepóxido ou diazepam com antiácidos(115,116).

1.5.4.2.- Interacções na ligação às proteínas

Os anticoncepcionais influenciam a farmacocinética das benzodiazepinas, pois aumentam o volume aparente de distribuição e diminuem a ligação às proteínas plasmáticas. Como consequência, as mulheres que usam anticoncepcionais são mais sensíveis às benzodiazepinas, requerendo doses mais baixas destes compostos(117).

O etanol também baixa a ligação das benzodiazepinas às proteínas, aumentando a sua concentração plasmática(118-120).

A heparina origina um aumento dos ácidos gordos livres na corrente circulatória, os quais têm força suficiente para deslocar as benzodiazepinas dos seus locais de ligação. Vários estudos referenciam um aumento da fracção livre do clordiazepóxido, desmetildiazepam, diazepam e oxazepam quando administrados em simultâneo com diferentes doses de heparina(115-117).

1.5.4.3.- Interações na eliminação

No tratamento de doentes epiléticos, o clonazepam é administrado em simultâneo com outros anticonvulsivantes. Esta benzodiazepina apresenta níveis plasmáticos mais baixos quando coadministrada com a fenitoína e o fenobarbital, devido essencialmente a um aumento da clearance de 46-58% e de 19-24%, respectivamente(121).

O diazepam quando administrado juntamente com a antipirina tem uma eliminação hepática mais rápida, a qual é confirmada pelo tempo de semi-vida biológica mais pequeno e pelo aumento da clearance plasmática. O desmetildiazepam, principal metabolito do diazepam, também apresenta um tempo de semi-vida biológica mais pequeno(122).

Quanto aos tuberculostáticos, parece que a isoniazida prolonga o tempo de semi-vida biológica do diazepam. Na terapia tripla (isoniazida, etambutol, rifampicina) o tempo de semi-vida biológica do diazepam é mais pequeno e a clearance é maior. Este efeito é devido provavelmente à rifampicina que induz o sistema enzimático de metabolização(123). A isoniazida aumenta o tempo de semi-vida biológica do triazolam, mas não influencia a farmacocinética do oxazepam(124).

As benzodiazepinas são utilizadas como adjuvantes no tratamento das úlceras gástricas. Contudo, a cimetidina altera a farmacocinética do clordiazepóxido, desmetildiazepam, diazepam e flurazepam, aumentando o tempo de semi-vida biológica e diminuindo a clearance e o volume aparente de distribuição(125-127). Pelo contrário, a farmacocinética do lorazepam e do oxazepam não é alterada pela cimetidina(127,128).

A utilização concomitante de dissulfiramo e benzodiazepinas é, por vezes, utilizada em tratamentos prolongados nos alcoólicos e os estudos realizados indicam que o dissulfiramo reduz a clearance plasmática do clordiazepóxido e do diazepam, mas não altera a do oxazepam(116,123).

1.5.5.- EFEITOS SECUNDÁRIOS

As benzodiazepinas causam, por vezes, efeitos secundários mais intensos que os próprios efeitos farmacológicos. Os mais comuns são: sonolência, ataxia, fadiga, vertigens e síncope. Em geral, estes efeitos são transitórios e ocorrem durante os primeiros dias da terapia, diminuindo com a continuidade desta por desenvolvimento da tolerância, ou com a

redução da dose(129).

Provavelmente, os mais expostos a estes efeitos são as crianças, os idosos, os doentes hepáticos e hipoalbumínicos, devendo ser diminuída a dose inicial de fármaco. Em recém-nascidos originam prolongadas depressões do SNC(130).

Outros efeitos secundários das benzodiazepinas no SNC são: dor de cabeça, pesadelos, depressão mental e alucinações(131).

Paradoxalmente, as benzodiazepinas podem originar estimulação do SNC, resultando os efeitos secundários em ansiedade, agitação, distúrbios do sono, pesadelos, hiperactividade e aumento dos espasmos musculares(132,133). Nestas circunstâncias o tratamento deve ser interrompido.

1.5.6.- DEPENDÊNCIA, TOLERÂNCIA E ABSTINÊNCIA

As benzodiazepinas podem originar dependência física e psíquica quando administradas em doses altas e em tratamentos prolongados, principalmente em doentes com personalidade instável. O risco de dependência é muito pequeno, quando estes fármacos são administrados em doses normais(134,135).

A tolerância às benzodiazepinas desenvolve-se provavelmente para os efeitos sedativos(136).

Uma súbita paragem na administração de benzodiazepinas em doentes com dependência física produz graves sintomas de abstinência, tais como ansiedade, anorexia, insónia, vômitos, diarreia, irritabilidade, ataxia, alucinações e convulsões. Para as benzodiazepinas com tempo de semi-vida biológica grande, os sintomas de abstinência verificam-se vários dias após o fim do tratamento(137-140).

1.5.7.- SOBREDOSAGEM

Em geral, a sobredosagem das benzodiazepinas conduz a estados de sonolência, ataxia, hipotensão e coma. Embora alguns autores referenciem a paragem cardíaca, a morte resultante de sobredosagem das benzodiazepinas é muito rara, sobretudo na ausência de álcool e de outros depressores do SNC(141).

1.6.- USOS CLÍNICOS

Como já foi referido anteriormente, as benzodiazepinas têm acções farmacológicas idênticas. Quando administradas em doses terapêuticas, não é possível dizer se uma benzodiazepina é mais eficaz do que outra para a obtenção de determinada acção farmacológica. Contudo, as diferenças encontradas na farmacocinética destes compostos adquirem importância na escolha da benzodiazepina apropriada para a situação clínica apresentada.

Na clínica, as benzodiazepinas são indicadas como ansiolíticos no tratamento da ansiedade; como hipnóticos no tratamento da insónia; como anticonvulsivantes no tratamento de convulsões; como relaxantes musculares esqueléticos no tratamento de espasmos musculares; em pré-cirurgia no tratamento da ansiedade e como anestésicos; são ainda indicadas no tratamento dos alcoólicos.

1.6.1.- ANSIEDADE

As benzodiazepinas são mais específicas no sistema límbico que os barbitúricos e o meprobamato, reduzindo a ansiedade sem produzirem sono(95). Portanto, a preferência das benzodiazepinas é baseada no facto de produzirem acção ansiolítica, sem originarem sedação. Os fármacos mais utilizados como ansiolíticos são o alprazolam, o lorazepam e o oxazepam devido a apresentarem reduzida acumulação no organismo, e o prazepam devido ao seu metabolito activo aparecer lentamente na corrente sanguínea(88,142,143).

1.6.2.-INSÓNIA

O flurazepam, o nitrazepam, o quazepam, o temazepam e o triazolam são as benzodiazepinas que produzem sono quando administradas em doses terapêuticas, sendo portanto indicadas como hipnóticos(144-146). Estes compostos causam menor depressão respiratória e menos dependência em idosos que os barbitúricos e o meprobamato.

Outras benzodiazepinas indicadas inicialmente como ansiolíticos são usados como hipnóticos, como é o caso do clordiazepóxido e do diazepam devido a serem rapidamente absorvidas no tracto gastrintestinal(147). O lorazepam e o oxazepam são utilizados como hipnóticos em idosos e em indivíduos com doenças hepáticas, pois têm tempos de semi-vida biológica pequenos e não apresentam metabolitos activos(148,149).

1.6.3.- CONVULSÕES

As benzodiazepinas são eficazes em diversos estados de epilepsia. O clonazepam administrado por via oral é a benzodiazepina mais utilizada como anticonvulsivante(150). O clordiazepóxido, o diazepam e o lorazepam administrados por via endovenosa são também usados em estados epiléticos(95,151).

O diazepam administrado por via endovenosa é particularmente utilizado em convulsões agudas na presença de depressão do SNC (em doentes com sobredosagem de antidepressores tricíclicos ou fenotiazinas), pois não origina apneia como os barbitúricos.

1.6.4.- ESPASMOS MUSCULARES

As benzodiazepinas diminuem o tónus muscular em doentes com espasmos musculares. O diazepam tem sido usado na paralisia cerebral, nas escleroses múltiplas, nas lesões da medula espinhal e em envenenamentos com estriçnina(88,95).

1.6.5.- CIRURGIA

As benzodiazepinas são utilizadas em cirurgia na indução da anestesia, na normalização do ritmo cardíaco e em processos de endoscopia(152-155). Na indução da anestesia, o diazepam é administrado por via endovenosa sendo mais seguro mas menos eficaz que os barbitúricos(156,157). O clordiazepóxido e o lorazepam são também indicados nestas

situações clínicas(88,158,159).

1.6.6.- ALCOOLISMO

As benzodiazepinas são indicadas no tratamento de alcoólicos para evitar estados de agitação, de tremor, de "delirium tremens" e as alucinações. O clordiazepóxido, o diazepam, o lorazepam e o oxazepam são eficazes, embora o oxazepam não seja administrado por via endovenosa devido a apresentar baixa solubilidade em solventes de natureza hidrófila(16,88,148). O clorazepato dipotássico é também administrado por via oral na desintoxicação alcoólica(160).

1.7.- CONSUMO EM PORTUGAL

As benzodiazepinas constituem a classe dos compostos ansiolíticos, também chamados de tranquilizantes menores, cuja utilização terapêutica é mais elevada em todos os países do mundo ocidental (CEE e EUA). Os estudos realizados acerca do consumo das benzodiazepinas permitem afirmar que 10 a 20% dos adultos dos referidos países tomam regularmente medicamentos contra a ansiedade. Este facto está relacionado com a substituição gradualmente crescente dos barbitúricos pelas benzodiazepinas(21,161,162).

Embora não tenha sido possível o acesso ao consumo nacional, pode prever-se que Portugal, como país membro da CEE, apresente consumo de benzodiazepinas dentro dos limites apontados anteriormente.

Deste modo, procurou avaliar-se o consumo hospitalar das preparações contendo estes compostos, quer através dos valores dos concursos públicos efectuados pela Direcção dos Serviços de Aprovisionamento da Secretaria Geral do Ministério da Saúde, quer através das aquisições efectuadas pelos Serviços Farmacêuticos do Hospital Geral de Santo António e do Hospital Conde Ferreira.

Várias benzodiazepinas estão incluídas no Formulário Hospitalar Nacional de Medicamentos(163), em formas simples e compostas destinadas à administração por via oral, parentérica e rectal. O oxazepam foi retirado do Formulário Hospitalar Nacional de Medicamentos em 1990, embora este composto ainda tenha sido submetido a concurso público em 1991 pela referida Secretaria Geral. Todavia, outras benzodiazepinas constam neste Formulário.

No Quadro VII apresentam-se os números de unidades das formas farmacêuticas, submetidos a concurso público entre 1985 e 1991, contendo o lorazepam e o oxazepam, benzodiazepinas com as quais realizamos este trabalho, e também o diazepam, sem qualquer dúvida a benzodiazepina mais estudada e mais consumida no mundo. A análise dos resultados permite concluir que o lorazepam representa cerca de 31,1% e o oxazepam 2,1%, enquanto o diazepam representa aproximadamente 46,7% do total de unidades.

No mesmo Quadro indica-se o número de unidades das formas farmacêuticas adquiridas pelos Serviços Farmacêuticos dos Hospitais referidos ao período entre 1985 e 1991, contendo as mesmas benzodiazepinas. No Hospital Geral de Santo António os consumos médios em relação ao número total de unidades durante estes anos foram de 16,5% para o lorazepam, de 0,8% para o oxazepam e de 65,1% para o diazepam. No Hospital Conde Ferreira os consumos médios em relação ao número total de unidades, para os mesmos anos, foram de 20,7% para o lorazepam, de 1,3% para o oxazepam e de 24,6% para o diazepam.

QUADRO VII

FORMAS FARMACÊUTICAS CONTENDO BENZODIAZEPINAS
POSTAS A CONCURSO PÚBLICO PELO MINISTÉRIO DA SAÚDE E
ADQUIRIDAS PELOS HOSPITAIS GERAL DE SANTO ANTÔNIO E CONDE FERREIRA

INSTITUIÇÃO	1985	1986	1987	1988	1989	1990	1991
MINISTÉRIO DA SAÚDE							
Total	4278110	4702650	4599300	4871112	4550045	4398860	4583608
Diazepam	1982910	2017450	2154250	2266647	2467268	2053918	1991048
Lorazepam	1520000	1695000	1428000	1451200	1364640	1196440	1287500
Oxazepam	63500	92100	72500	104340	94200	93470	164822
HOSPITAL GERAL DE SANTO ANTÔNIO							
Total	153762	138893	170698	179995	139916	139347	137790
Diazepam	103167	99198	107534	108694	87510	91400	90294
Lorazepam	23300	31400	30700	34600	22990	16700	17016
Oxazepam	985	1915	1560	1400	1530	690	782
HOSPITAL CONDE FERREIRA							
Total	358914	486847	449390	382681	274830	333210	314592
Diazepam	96828	129816	79000	92000	80000	77500	80672
Lorazepam	72060	122780	94000	107000	33000	60000	20000
Oxazepam	9085	5991	3000	1500	3600	5160	11720

CAPÍTULO II

COMPRIMIDOS DE ACÇÃO PROLONGADA

CONTENDO OXAZEPAM

2.1.- INTRODUÇÃO

As formas farmacêuticas de acção prolongada têm como finalidade colocar à disposição do organismo, o mais rapidamente possível, uma dose de princípio activo que permita atingir, ou mesmo ultrapassar ligeiramente, a concentração mínima eficaz. A quantidade restante irá manter a acção terapêutica por tempo apreciavelmente mais longo do que aquele que se consegue com uma dose única convencional.

A obtenção de comprimidos de acção prolongada contendo oxazepam, utilizando como matriz o Carbopol 934, foi o principal objectivo deste trabalho.

Com a finalidade de se obter uma forma farmacêutica de libertação controlada, em que a cedência do princípio activo é regida pelo próprio sistema em que está incluído e que permite uma administração mais exacta, reproduzível e previsível, foram estudadas e desenvolvidas várias técnicas de produção da referida forma farmacêutica, bem como a influência de alguns adjuvantes.

Neste trabalho pode observar-se que a biodisponibilidade do oxazepam é profundamente modificada desde que se altere a fórmula em que ele é veiculado. De facto, a primeira condição para que se possa verificar uma resposta terapêutica eficaz consiste na libertação ou cedência do princípio activo a partir de um medicamento, visto que só há absorção do fármaco se este se encontra dissolvido no tracto gastrintestinal.

É neste contexto que o ensaio de dissolução representa uma etapa fundamental na formulação e controlo de formas galénicas sólidas destinadas à administração por via oral. Em boa verdade, e não excluindo a execução de estudos de biodisponibilidade (foram realizados para a fórmula que apresentou melhores resultados), o ensaio de dissolução permite medir a libertação do fármaco em função do tempo. Esta cedência é de primordial importância devido ao facto de a velocidade de dissolução ser um parâmetro fundamental na velocidade de absorção dos princípios activos.

No ensaio de dissolução, estudou-se a influência do pH e do método utilizado na variação do mesmo - substituição total do líquido de dissolução ou adição de um corrector de pH - sobre a biodisponibilidade do oxazepam.

Também foi analisada a especificidade do método analítico, a espectrofotometria no UV, usado na determinação do teor do princípio activo por comparação com a cromatografia líquida de alta pressão (HPLC). Como o oxazepam e os seus produtos de degradação resultantes da hidrólise absorvem na região do ultravioleta, a presença destes últimos na solução poderia passar despercebida e originar erros na avaliação da biodisponibilidade do fármaco. Todavia, o HPLC é uma técnica analítica que permite a separação e doseamento em simultâneo do oxazepam e produtos resultantes da hidrólise.

Contudo, além desta função, a utilização do HPLC ficou essencialmente a dever-se à curiosidade de verificar se o oxazepam se hidrolisava ou não nos líquidos de dissolução durante a realização dos ensaios *in vitro*.

2.1.1.- OXAZEPAM

O oxazepam (Fig. 7) é uma benzodiazepina de acção curta, cujo tempo de semi-vida biológica médio é de 8 horas, e é utilizada na clínica essencialmente como ansiolítico e no tratamento do alcoolismo.

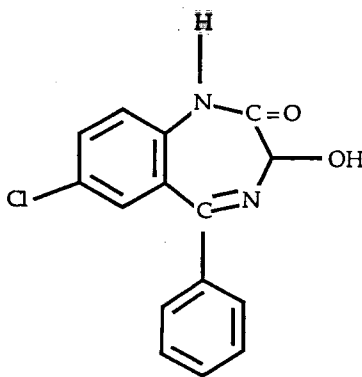


Figura 7 - Estrutura química do oxazepam.

A preparação de formas de acção prolongada apresenta limitações que condicionam o seu uso. O principal condicionalismo é o tempo de semi-vida biológica do fármaco que, quando muito elevado (superior a 8 horas), não justifica este tipo de preparação. Como se pode verificar, o tempo de semi-vida biológica do oxazepam encontra-se localizado no limite aconselhável de utilização desta forma farmacêutica(164). Contudo, a sua

preparação justificou-se fundamentalmente devido ao facto de se pretender um tempo de acção de 12 horas. Este período de tempo parece ser o mais adequado para o tipo de doentes a que este fármaco se destina, uma vez que permite um esquema posológico mais simples de apenas duas administrações diárias.

2.1.2.- CARBOPOL

O Carbopol (Fig. 8), também designado por carbomer ou carboxipolimetileno, é um polímero do ácido acrílico, obtido por síntese química, apresentando elevado peso molecular e contendo na sua composição 56-68% de grupos carboxílicos(165,166).

O Carbopol é usado fundamentalmente em preparações farmacêuticas líquidas e semi-sólidas, sendo menos utilizado em formas sólidas. Destes polímeros, o Carbopol 934 é o único aprovado na preparação de formas farmacêuticas destinadas à administração oral.

Em Tecnologia Farmacêutica, o Carbopol 934 é utilizado principalmente como agente emulsionante (0,1-0,5%), suspensor (0,5-1,0%) e gelificante (0,5-2%)(165,167-170). É também usado como aglutinante em comprimidos e como gelificante em comprimidos de acção prolongada(171-175).

Foi precisamente com a função de agente gelificante que o Carbopol 934 foi utilizado na preparação de comprimidos de acção prolongada contendo oxazepam.

Na forma farmacêutica comprimido, as substâncias que actuam como agentes gelificantes são um dos meios capazes de responder positivamente, em caso de necessidade, a uma libertação prolongada do princípio activo.

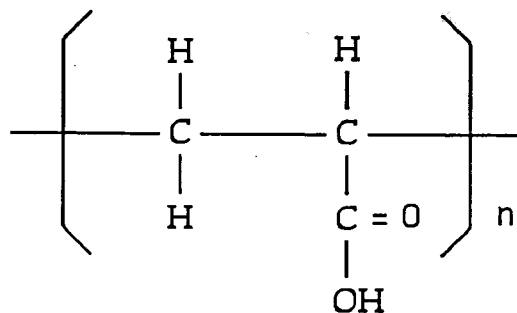


Figura 8 - Estrutura química do Carbopol

2.2.- MATRIZES

De acordo com a composição química as matrizes dividem-se em três tipos: inertes, lipídicas e hidrófilas.

2.2.1.- MATRIZES INERTES

As matrizes inertes (chamadas igualmente de insolúveis ou, por vezes e incorrectamente, "plásticas") são substâncias que conservam a forma do comprimido quando colocadas em contacto com os sucos digestivos. A porosidade da matriz é o elemento estrutural da forma farmacêutica que controla a libertação do princípio activo(175-178).

2.2.2.- MATRIZES LIPÍDICAS

As matrizes lipídicas são constituídas essencialmente por triglicerídeos, que sofrem erosão devido à acção das lipases. Por outro lado, os ácidos gordos são lentamente solubilizados no meio intestinal originando a formação de uma película tensioactiva. Estas matrizes são menos sensíveis à humidade que os hidrocolóides(179,180).

2.2.3.- MATRIZES HIDRÓFILAS

As matrizes hidrófilas são constituídas por polímeros que, por hidratação, criam uma rede capaz de ceder os princípios activos. Na sua constituição podem incluir-se derivados celulósicos, polissacarídeos não celulósicos e polímeros do ácido acrílico. Após hidratação, as matrizes hidrófilas constituem um sistema homogéneo no qual a substância a difundir não encontra partículas sólidas que façam barreira à sua libertação. A vantagem que estas matrizes apresentam, em relação às matrizes inertes e lipídicas, reside no facto de a libertação dos princípios activos ser independente dos parâmetros fisiológicos, como o pH e a mobilidade do tracto gastrintestinal, a força iónica e a composição enzimática dos sucos digestivos(175,181-186).

2.2.3.1.- Cedência de fármacos a partir de uma matriz hidrófila

Os comprimidos de acção prolongada em matriz hidrófila são constituídos por uma mistura de uma ou várias substâncias medicamentosas com um agente gelificante.

Quando as primeiras fracções de água ou de sucos digestivos penetram no comprimido, deve dissolver-se uma determinada quantidade de princípio activo. E em consequência da hidratação a macromolécula vai gelificando progressivamente, conduzindo à formação de uma camada viscosa. Esta camada forma a matriz propriamente dita, pois é a partir dela que o princípio activo é libertado por difusão após ter ocorrido a sua dissolução(187-189).

Deste modo, a cedência do princípio activo a partir de uma matriz hidrófila é feita em várias etapas, consecutivas ou simultâneas, que se podem resumir do seguinte modo:

- em primeiro lugar, desde o momento em que o líquido de dissolução entra em contacto com o comprimido, uma parte do princípio activo é libertada antes de ocorrer a gelificação total da macromolécula. A quantidade de fármaco dissolvido depende fundamentalmente da sua solubilidade e dimensões das partículas, bem como das condições de penetração do líquido de dissolução e velocidade de gelificação da matriz.

- em segundo lugar, o líquido de dissolução penetra no comprimido, originando uma camada gelificada e porosa que se forma a pouco e pouco. Finalmente, os sucos digestivos dissolvem o princípio activo, que é então cedido por difusão através da camada hidratada (transporte em contra-corrente). Todos os constituintes dos comprimidos solúveis nos sucos digestivos contribuem para modificar a porosidade da matriz. Assim, a porosidade destes comprimidos vai aumentando em função do tempo de contacto com os líquidos de dissolução, devido ao esgotamento das substâncias solúveis e à modificação da estrutura física das macromoléculas. A velocidade de cedência do princípio activo depende essencialmente das características físico-químicas do comprimido, da camada hidratada formada e do próprio fármaco.

Com uma fórmula e uma tecnologia de fabrico adequadas, a matriz hidratada atravessa o tracto gastrointestinal sem se desagregar. As suas dimensões, pelo contrário, modificam-se ao longo do tempo, aumentando à medida que ocorre o processo de hidratação(182,183,187,188). A barreira assim constituída opõe-se a uma rápida cedência do princípio activo e controla igualmente a penetração dos sucos digestivos do exterior para o interior do comprimido.

2.3.- PREPARAÇÃO DOS COMPRIMIDOS

O processo de fabricação de comprimidos de acção prolongada que utiliza matrizes hidrófilas consiste na mistura do princípio activo com um agente gelificante dotado de elevada viscosidade, seguida da obtenção da forma farmacêutica por compressão directa ou compressão após granulação a seco ou a húmido. Quando em contacto com os líquidos digestivos, as macromoléculas hidratam-se e dão origem a uma barreira gelificada, física, que permite regular a velocidade de libertação do fármaco. Entre os compostos que se usam para estas preparações destacam-se os derivados da celulose, o Carbopol e os alginatos. As matrizes hidrófilas apresentam várias vantagens em relação às outras matrizes, nomeadamente a simplicidade e rapidez de preparação, a possibilidade de incorporação de quantidades apreciáveis de princípios medicamentosos, a fraca variabilidade da libertação perante os agentes externos (pH, movimentos peristálticos e composição enzimática dos sucos digestivos) e a possibilidade de proporcionar diferentes condições de cedência, uma vez que se pode alterar o pH da própria matriz.

2.3.1.- CÁLCULO DA DOSE DE OXAZEPAM

Como já foi referido, este estudo teve como objectivo a preparação de comprimidos de acção prolongada contendo oxazepam. Assim, estes comprimidos são constituídos por uma dose inicial e uma dose de manutenção de oxazepam. A dose inicial, ou dose de acção imediata, corresponde à quantidade de fármaco que deve ser incorporada na preparação galénica de modo a que seja cedida tão rapidamente quanto possível, permitindo atingir, ou até ultrapassar ligeiramente, o nível sanguíneo que se sabe ser terapeuticamente efectivo. A dose de manutenção corresponde à quantidade de fármaco incorporada no comprimido e que originará uma cedência sustentada durante um período 12 horas.

As fórmulas ensaiadas foram estruturadas considerando como dose terapêutica convencional a quantidade unitária de 15,0 mg de oxazepam. Após a estipulação desta dose, impunha-se calcular a dose de manutenção necessária para manter o efeito terapêutico durante 12 horas.

Embora nos comprimidos de acção prolongada a dose de manutenção se liberte simultaneamente com a dose imediata, ou na altura em que esta atinge a concentração plasmática máxima, ou, ainda, após um período de latência, para o cálculo da dose de manutenção considerou-se que esta só se liberta quando a dose de acção imediata é totalmente absorvida e praticamente eliminada(164,190-192).

Para o cálculo da dose de manutenção foi utilizada a equação:

$$W_o = K \cdot W \cdot T$$

em que W_o é a dose de manutenção, K é a velocidade específica de eliminação, W é a dose inicial e T é o tempo desejado para manter o nível terapêutico.

A velocidade específica de eliminação foi calculada aplicando a equação:

$$K = 0,693/t_{1/2}$$

em que $t_{1/2}$ é o tempo de semi-vida biológica do oxazepam.

A dose terapêutica total foi calculada através da equação:

$$Q_t = W + W_o$$

em que Q_t é a dose terapêutica total, W é a dose inicial e W_o é a dose de manutenção.

Nestas circunstâncias os comprimidos a preparar devem ter uma dose inicial de 15,0 mg e uma dose de manutenção de 15,6 mg, originando comprimidos com doses unitárias totais de 30,6 mg de oxazepam, quantidade julgada suficiente não só para produzir efeito imediato, mas também para assegurar a manutenção de um nível sérico terapêutico eficaz entre duas administrações sucessivas.

No Quadro VIII resumem-se os cálculos efectuados para a determinação da quantidade necessária para obter comprimidos de acção prolongada de oxazepam.

QUADRO VIII
CÁLCULO DAS QUANTIDADES DE OXAZEPAM

Tempo de semi-vida	$t_{1/2} = 8,0$ horas
Velocidade de eliminação	$K = 0,693/8,0 = 0,0866 \text{ h}^{-1}$
Tempo desejado para manter o nível terapêutico	$T = 12$ horas
Dose de ação imediata (dose inicial)	$W = 15,0$ mg
Dose de manutenção	$W_o = K W T = 0,0866 \times 15 \times 12 = 15,6$ mg
Dose terapêutica total	$Q_t = W + W_o = 15,0 + 15,6 = 30,6$ mg

2.3.2- MATERIAL E MÉTODOS

O oxazepam (IPL - lotes 5M039 e 132212) apresentava as características indicadas no Anexo I.

Utilizou-se Carbopol 934 (V.P. 880021) com as características indicadas no mesmo Anexo, estearato de magnésio p.a. (Merck) e talco p.a. (Merck).

As pesagens foram efectuadas em balanças Mettler (AE 200 e PE 3600).

O granulado foi obtido triturando em almofariz de porcelana os comprimidos resultantes da primeira compressão e calibrando-o através de um tamis de abertura de malha de 750 μm (Erweka).

A compressão foi realizada numa máquina de comprimir alternativa (Manesty), utilizando punções de superfície plana e lisa com 10 mm de diâmetro e de superfície côncava e lisa com 8 mm de diâmetro.

A friabilidade foi determinada com um friabilómetro Erweka tipo TAP.

A dureza dos comprimidos foi determinada com um aparelho Erweka tipo TBT/S.

As dimensões dos comprimidos foram determinadas com craveira (Mitutoyo).

2.3.3.- FÓRMULA BASE

Na execução deste trabalho prepararam-se 26 fórmulas diferentes de comprimidos de acção prolongada, que são divididas em 5 grupos, de modo que, em cada grupo apenas varie um parâmetro entre as fórmulas que o constituem. Contudo, se se considerar a natureza das substâncias que compõem a maioria das fórmulas ensaiadas é legítimo estabelecer a seguinte fórmula base, que serviu de ponto de partida para este trabalho:

Mistura I (dose inicial)

Oxazepam	15,0 mg
Diluyente	15,0 mg
Talco	2,5 mg

Mistura II (dose de manutenção)

Oxazepam	15,6 mg
Carbopol 934	200,0 mg
Estearato de magnésio	1,25 mg

Técnica de preparação:

Pese os componentes mencionados na fórmula.

Misture os componentes da mistura II. Comprima. Granule os comprimidos, calibre o granulado obtido através de um tamis de abertura de malha de 750 µm.

Misture os componentes da mistura I.

Adicione a esta mistura o granulado obtido anteriormente. Misture. Comprima de modo a obter comprimidos com o peso aproximado de 250 mg.

A dureza dos comprimidos deve estar compreendida entre 4,5 e 6,5 kg(193,194).

2.4.- VERIFICAÇÃO DA EFICÁCIA DAS PREPARAÇÕES DE ACÇÃO PROLONGADA

Uma forma farmacêutica de acção prolongada exige cuidados especiais quanto à verificação da sua eficácia. Com efeito, não basta conhecer o teor total do princípio activo e o tempo necessário para que haja absorção de uma preparação deste género. Nestas preparações galénicas é absolutamente indispensável estabelecer e confirmar que a cedência do fármaco se realize dentro de limites de concentração bem definidos em função do tempo, única circunstância que poderá garantir um efeito terapêutico eficaz.

2.4.1.- MÉTODOS DE VERIFICAÇÃO *IN VITRO*

No estudo e planificação de uma formulação de comprimidos de acção prolongada, o ensaio de dissolução é o método de verificação *in vitro* mais importante, pois permite verificar a cedência dos princípios activos em função do tempo em condições que se aproximam, tanto quanto possível, das fisiológicas.

Segundo Prista *et al.*(164), a cedência dos fármacos de uma preparação de tempo de actuação de 10-12 horas deverá processar-se do seguinte modo:

- primeiras 4 horas de ensaio - 35 a 45% do total do fármaco;
- primeiras 8 horas de ensaio - 65 a 85% do total de fármaco;
- entre as 10-12 horas de ensaio - 85 a 100% do total de fármaco.

Contudo, este perfil de cedência em função do tempo foi estabelecido para um fármaco que tinha um tempo de semi-vida biológica médio de 4 horas. Nestas circunstâncias, a quantidade de fármaco presente na dose inicial é pequena em relação à da dose de manutenção, e será tanto mais pequena quanto menor for o tempo de semi-vida biológica do fármaco.

Como já foi referido anteriormente, o fármaco usado no presente trabalho tem um tempo de semi-vida biológica médio de 8 horas, que é o máximo aconselhado para este tipo de preparações. Por este motivo, e como pode observar-se no Quadro VIII, a relação entre a dose de acção inicial e a de manutenção é de aproximadamente 1 para 1. Assim, e atendendo aos valores de cedência descritos, é possível estabelecer os seguintes tempos de cedência para a fórmula a preparar:

- das 0-2 horas de ensaio - 35 a 55% do total do fármaco;
- às 4 horas de ensaio - 60 a 70% do total do fármaco;
- às 8 horas de ensaio - 80 a 90% do total do fármaco;
- às 12 horas de ensaio - 95 a 100% do total do fármaco.

2.4.1.1.- Material e métodos

Na execução do ensaio de dissolução utilizou-se o aparelho com cesto de rede indicado na FP V.

O tempo do ensaio foi de 12 horas.

O ensaio decorreu à temperatura de $37^{\circ}\pm 0,5^{\circ}$ C.

A velocidade de rotação do cesto foi de 100 r.p.m.

O volume de líquido de dissolução foi de 900 ml. Os líquidos de dissolução utilizados estão indicados na FP V e na USP XXII/NFXVII. Os ensaios de dissolução podem classificar-se, de acordo com a natureza do líquido de dissolução, em: método A - utilizado para todas as fórmulas preparadas; métodos B e C - utilizados apenas para a fórmula que apresentou melhores resultados no ensaio de dissolução usando o método A.

O teor de oxazepam dissolvido nos líquidos de dissolução em função do tempo foi determinado recorrendo às seguintes técnicas analíticas: espectrofotometria de ultravioleta (UV) e cromatografia líquida de alta pressão (HPLC).

2.4.1.2.- Aparelhagem

Aparelho de dissolução com cesto de rede Erweka DT, conforme o indicado na FP V, que compreende um banho termostatado e um motor que assegura a velocidade de rotação pretendida.

Espectrofotómetro de UV/Vis de duplo feixe Hitachi U-2000, usando um par de tinas de 10 mm de percurso óptico.

Cromatógrafo líquido de alta pressão de mistura binária Varian 5000.

Potenciómetro Metrohm 605 pH-Meter, com um eléctrodo selectivo de iões H^+ Metrohm 6.020.000.

2.4.1.3.- Reagentes

2.4.1.3.1.- Método A

Líquido de dissolução A

Utilizou-se o suco gástrico artificial da USP XXII/NF XVII, sem pepsina, de pH

1,2.

Líquido de dissolução B

Utilizou-se o suco entérico artificial USP XXII/NF XVII, sem pancreatina, de pH

7,5±0,1.

2.4.1.3.2.- Método B

Líquido de dissolução A

Utilizou-se o suco gástrico artificial da USP XXII/NF XVII, sem pepsina, de pH

1,2.

Líquido de dissolução B1

Utilizou-se a Solução Tampão de Fosfatos de pH 4,5 da FP V.

Líquido de dissolução C

Utilizou-se o suco entérico artificial USP XXII/NF XVII, sem pancreatina, de pH

7,5±0,1.

2.4.1.3.3.- Método C

Líquido de dissolução A

Utilizou-se o suco gástrico artificial da USP XXII/NF XVII, sem pepsina, de pH

1,2.

Líquido de dissolução B2: Solução tampão de pH 13-14

Solução de fosfato monopotássico 1,5 N 25,0 ml
Solução de hidróxido de sódio 4 N 23,4 ml
Água destilada q.b.p. 100 ml

2.4.1.4.- Determinação do teor total de oxazepam nos comprimidos

Pulverize 5 comprimidos do mesmo lote de produção. Pese rigorosamente cerca de 25 mg (correspondente a 1/10 do peso teórico dos comprimidos) e introduza em matrás de 250 ml. Meça 90 ml de líquido de dissolução. Deixe em contacto durante 2 horas, à temperatura de $37\pm 1^{\circ}\text{C}$, com uma velocidade de agitação de 500 r.p.m. (agitador Heidolph MR 2002). Filtre. Dilua o filtrado com o líquido de dissolução de modo a obter valores de absorvências compreendidas entre 0,400 e 0,600, no comprimento de onda adequado.

2.4.1.5.- Determinação do teor de oxazepam no granulado (dose de manutenção)

Pulverize cerca de 2 g de granulado. Pese rigorosamente cerca de 21,7 mg (correspondente a 1/10 da quantidade teórica existente em cada comprimido) e introduza em matrás de 250 ml. Junte 90 ml de líquido de dissolução. Deixe em contacto durante duas horas, à temperatura de $37\pm 1^{\circ}\text{C}$, com uma velocidade de agitação de 500 r.p.m. Filtre. Dilua o filtrado com o líquido de dissolução correspondente, de modo a obter valores de absorvências compreendidos entre 0,400 e 0,600, no comprimento de onda adequado.

2.4.1.6.- Determinação do teor de oxazepam na mistura de pós (dose inicial)

Pese rigorosamente 3,3 mg da mistura de pós (correspondente a 1/10 da quantidade teórica existente em cada comprimido) e introduza em matrás de 250 ml. Junte 90 ml de líquido de dissolução. Deixe em contacto durante duas horas, à temperatura de $37\pm 1^{\circ}\text{C}$, com uma velocidade de rotação de 500 r.p.m. Filtre. Dilua o filtrado com o líquido de dissolução correspondente de maneira a obter valores de absorvências compreendidos entre 0,400 e 0,600,

no comprimento de onda adequado.

2.4.1.7.- Técnica analítica

2.4.1.7.1.- Método A

No ensaio usaram-se os líquidos de dissolução A (pH 1,2) e B (pH 7,5), permanecendo os comprimidos duas horas no primeiro líquido e mantendo-se no segundo as restantes 10 horas. O teor de oxazepam dissolvido nos líquidos de dissolução foi determinado em amostras recolhidas por um processo descontínuo, sendo o volume retirado da solução compensado por igual volume de líquido de dissolução.

Método operatório:

Meça 900 ml de líquido de dissolução A para o recipiente do aparelho de dissolução. Coloque um comprimido de oxazepam no cesto de rede e mergulhe-o no líquido de dissolução aquecido à temperatura de $37 \pm 0,5^{\circ}$ C. Regule a velocidade de rotação para 100 r.p.m. Recolha amostras de 9 ml, em intervalos de meia hora e durante as duas primeiras horas. Ao fim deste período, substitua o meio de dissolução por 900 ml de líquido B previamente aquecido a $37 \pm 0,5^{\circ}$ C. Recolha amostras de 9 ml em intervalos de 1 hora, até perfazer 12 horas de ensaio. Compense o volume retirado com o líquido de dissolução usado no ensaio. Filtre. Dilua o filtrado com líquido de dissolução correspondente de maneira a obter valores de absorvências compreendidos entre 0,400 e 0,600.

As determinações do teor de oxazepam nas soluções obtidas em função do tempo e na solução correspondente ao teor total foram feitas por espectrofotometria no UV nos comprimentos de onda de 282 e 230 nm, consoante se utilizava como meio de dissolução o líquido A ou o líquido B, respectivamente (Fig. 9). Os mesmos líquidos foram usados como líquido de compensação.

As curvas de calibração obtiveram-se do seguinte modo:

Introduza 10 mg de oxazepam em cada um de 6 balões de 1000 ml. Dissolva com o líquido de dissolução correspondente e complete o volume. Filtre. Dilua o filtrado de maneira a obter concentrações de 0,100, 0,250, 0,350, 0,500, 0,600 e 0,750 mg/100 ml. Determine as

absorvências das soluções obtidas, usando como líquido de compensação o meio de dissolução.

As concentrações e respectivas absorvências, bem como as curvas de calibração dos líquidos de dissolução A e B, estão representadas na Fig. 10.

O doseamento efectuado por HPLC obedeceu às seguintes condições de análise:
pré-coluna-Alltech C-18, enchimento com partículas de 30-40 µm de diâmetro.

coluna-Perkin-Elmer C-18 Sil-X-10, modelo 409028, com 4,6 mm de diâmetro interno e 25 cm de comprimento, enchimento com partículas de 10 µm de diâmetro;

volume de líquido injectado-20 µl;

composição do eluente-eluição isocrática em metanol/água (67/33 V/V);

velocidade de fluxo-0,7 ml.min⁻¹;

deteccção-espectrofotométrica em 230 nm;

acerto automático do zero-no tempo zero;

sistema de registo-integrador Varian, modelo 4290;

atenuação-16;

sensibilidade de deteccção à largura de pico-6;

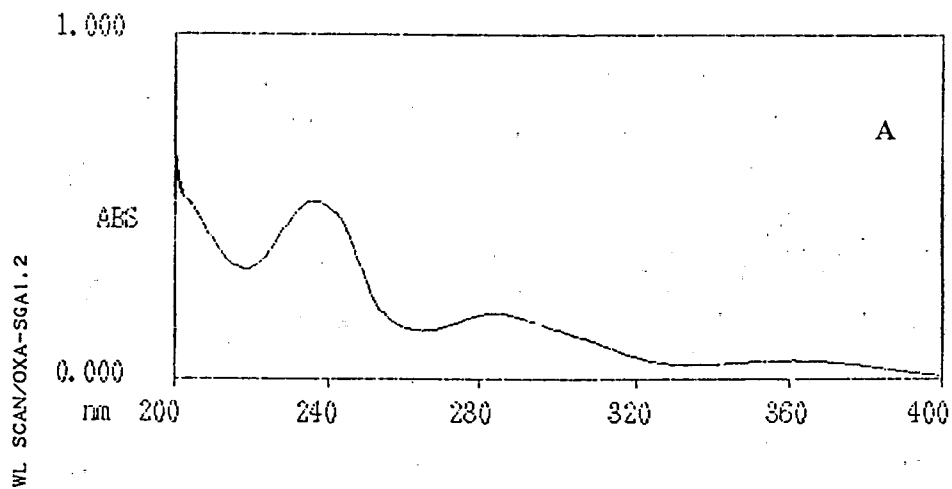
O padrão interno utilizado foi o desmetildiazepam.

Os tempos de retenção médios foram de 10,85 minutos para o oxazepam e de 14,21 minutos para o desmetildiazepam.

Solução mãe de padrão interno: solução de 100 mg de desmetildiazepam em metanol até perfazer 1000,0 ml.

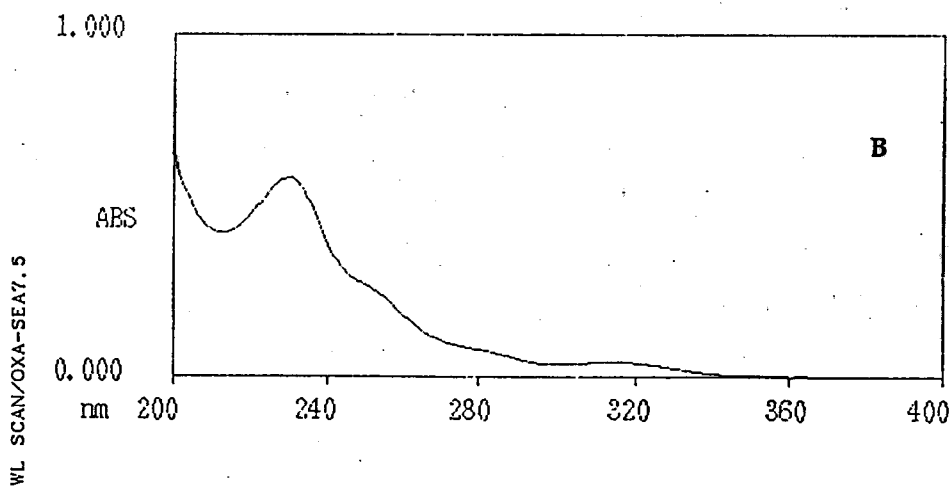
Solução de padrão interno: dilua 10,0 ml de solução mãe de padrão interno até 100,0 em metanol.

Solução padrão: pese rigorosamente 100 mg de oxazepam. Dissolva em metanol e complete 1000,0 ml com o mesmo solvente. Para balão marcado de 100 ml meça 10,0 ml desta solução e complete o volume com metanol. Adicione 1,0 ml desta diluição a 1,0 ml de solução de padrão interno. Homogenize em vórtex. Filtre por filtro de 0,45 µm.



WL SCAN/OXA-SGA1.2

NO.	PEAK		VALLEY	
	nm	ABS	nm	ABS
1	361.5	0.054	335.0	0.041
2	293.5	0.187	265.0	0.137
3	236.0	0.518	218.0	0.316



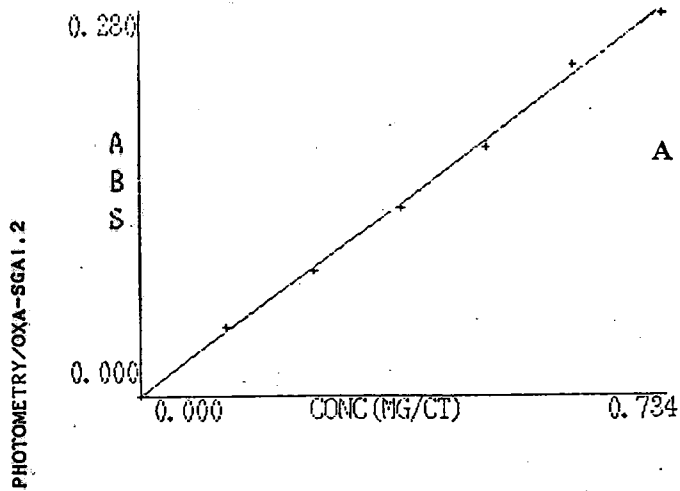
WL SCAN/OXA-SEA7.5

NO.	PEAK		VALLEY	
	nm	ABS	nm	ABS
1	313.0	0.042	300.0	0.036
2	229.5	0.585	212.5	0.422

Figura 9 - Espectros de absorção do oxazepam.

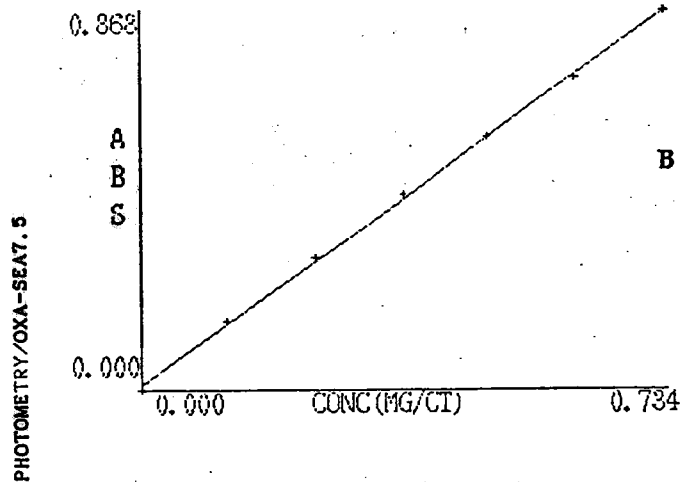
A - no líquido de dissolução A (pH 1,2);

B - no líquido de dissolução B (pH 7,5).



PHOTOMETRY/OXA-SGA1.2

ID	ABS	CONC
STD 1	0.000	0.000
STD 2	0.050	0.122
STD 3	0.092	0.245
STD 4	0.139	0.367
STD 5	0.184	0.490
STD 6	0.243	0.612
STD 7	0.280	0.734



PHOTOMETRY/OXA-SEA7.5

ID	ABS	CONC
STD 1	0.000	0.000
STD 2	0.162	0.122
STD 3	0.306	0.245
STD 4	0.453	0.367
STD 5	0.585	0.490
STD 6	0.718	0.612
STD 7	0.868	0.734

Figura 10 - Relações gráficas entre as absorvências e as concentrações de oxazepam.

A - no líquido de dissolução A (pH 1,2);

B - no líquido de dissolução B (pH 7,5).

Solução para determinar o teor total de oxazepam nos comprimidos: dilua o filtrado, obtido como se descreveu em 2.4.1.4., com o líquido de dissolução correspondente de modo a obter concentrações de oxazepam próximas de 20 µg/ml. Adicione 1,0 ml desta diluição a 1,0 ml de solução de padrão interno. Homogenize em vórtex. Filtre, por filtro de 0,45 µm.

Solução problema: dilua o filtrado correspondente à amostra do ensaio de dissolução com o líquido de dissolução correspondente de modo a obter concentrações de oxazepam próximas de 20µg/ml. Adicione 1,0 ml desta diluição a 1,0 ml de solução de padrão interno. Homogenize em vórtex. Filtre, por filtro de 0,45 µm.

Análise por HPLC das soluções: a solução problema, a solução padrão e a solução para determinar o teor total de oxazepam nos comprimidos foram analisadas em triplicado.

O teor de oxazepam em cada solução problema foi determinado do seguinte modo:

-calcular as médias das alturas dos picos cromatográficos do fármaco em análise e do padrão interno nos cromatogramas padrão e nos cromatogramas das soluções problema.

-calcular a razão entre as alturas médias dos picos do oxazepam e do padrão interno, e esses valores foram relacionados com a concentração do fármaco (µg/ml) na solução padrão.

As curvas de calibração obtiveram-se usando a seguinte técnica:

Introduza 10 mg de oxazepam em cada um de 6 balões de 1000 ml. Dissolva com o líquido de dissolução correspondente e complete o volume. Filtre. Dilua o filtrado convenientemente. Adicione 1,0 ml destas diluições a 1,0 ml de solução de padrão interno. Homogenize em vórtex. Filtre, por filtro de 0,45 µm.

As concentrações, as razões das alturas e as curvas de calibração estão representadas na Fig. 11.

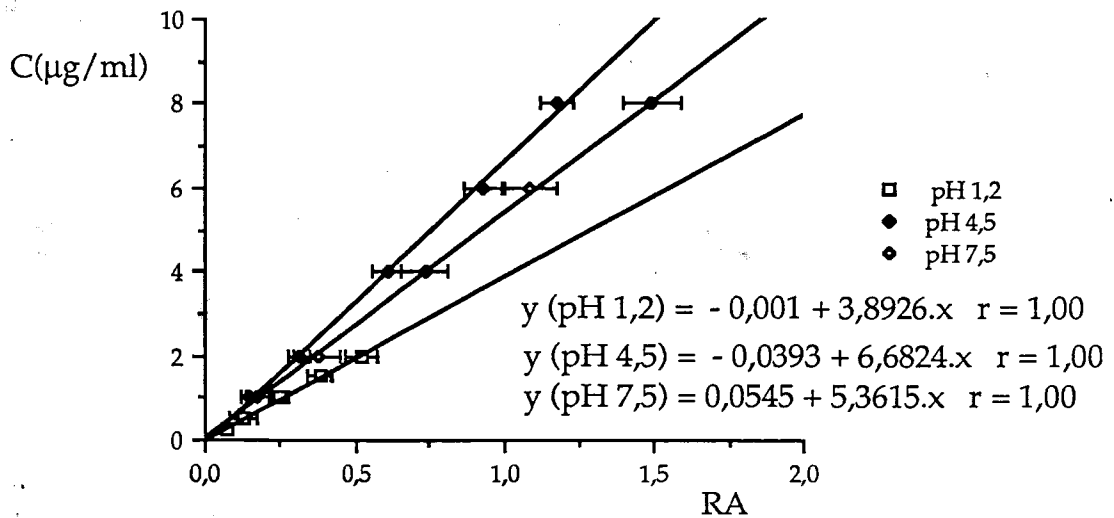


Figura 11 - Estudo da linearidade de resposta do detector para várias concentrações de oxazepam em função do pH.

RA - Razão da altura oxazepam/desmetildiazepam.

As percentagens de oxazepam dissolvido nos líquidos de dissolução, em função do tempo, foram obtidas aplicando as seguintes equações:

a) No líquido de dissolução A

$$Q(\%) = \frac{\text{Aprob} \times \text{Pt}}{\text{Apad} \times \text{Pc}} \times D \times 100$$

- após 0,5 hora de ensaio

$$\text{Aprob} = A_{0,5h}$$

- após 1 hora de ensaio

$$\text{Aprob} = A_{1h} + 0,01A_{0,5h}$$

- após 1,5 horas de ensaio

$$A_{\text{prob}} = A_{1,5\text{h}} + 0,01(A_{0,5\text{h}} + A_{1\text{h}})$$

- após 2 horas de ensaio

$$A_{\text{prob}} = A_{2\text{h}} + 0,01(A_{0,5\text{h}} + A_{1\text{h}} + A_{1,5\text{h}})$$

b) No líquido de dissolução B

$$Q(\%) = \frac{A_{\text{prob}} \times P_t}{A_{\text{pad}} \times P_c} \times D \times 100 + L$$

- após 3 horas de ensaio

$$A_{\text{prob}} = A_{3\text{h}}$$

- após 4 horas de ensaio

$$A_{\text{prob}} = A_{4\text{h}} + 0,01A_{3\text{h}}$$

- após 5 horas de ensaio

$$A_{\text{prob}} = A_{5\text{h}} + 0,01(A_{3\text{h}} + A_{4\text{h}})$$

- ao fim n horas de ensaio

$$A_{\text{prob}} = A_n + 0,01(\sum A_{n-1})$$

em que:

Q (%) - quantidade de princípio activo dissolvido em função do tempo, expressa em percentagem;

A_{prob} - valor da absorvência da solução problema;

A_{pad} - valor da absorvência da solução padrão (teor total de oxazepam);

P_c - peso do comprimido a ensaiar;

P_t - peso teórico de um comprimido ;

D - factor de correcção das diluições efectuadas nas soluções;

L - quantidade de princípio activo dissolvido no líquido de dissolução A, expresso em percentagem.

2.4.1.7.2.- Método B

No ensaio usaram-se os líquidos de dissolução A (pH 1,2), B1 (pH 4,5) e C (pH 7,5), permanecendo os comprimidos duas horas no primeiro, duas horas no segundo e mantendo-se no terceiro as restantes 8 horas. O teor de oxazepam dissolvido nos líquidos de dissolução foi determinado em amostras recolhidas por um processo descontínuo, sendo o volume retirado compensado por igual volume do líquido de dissolução.

Método operativo:

Meça 900 ml de líquido de dissolução A para o recipiente do aparelho de dissolução. Coloque um comprimido de oxazepam no cesto de rede e mergulhe-o no líquido de dissolução aquecido à temperatura de $37 \pm 0,5^\circ \text{C}$. Regule a velocidade de rotação para 100 r.p.m. Recolha amostras de 9 ml, em intervalos de meia hora e durante as duas primeiras horas. Ao fim deste período, substitua o meio de dissolução por 900 ml de líquido B previamente aquecido a $37 \pm 0,5^\circ \text{C}$. Recolha amostras de 9 ml em intervalos de 1 hora, até perfazer 4 horas de ensaio. Ao fim deste período, substitua o meio de dissolução por 900 ml de líquido C previamente aquecido a $37 \pm 0,5^\circ \text{C}$. Recolha amostras de 9 ml em intervalos de 1 hora, até perfazer 12 horas de ensaio. Compense o volume retirado com o líquido de dissolução usado no ensaio. Filtre. Dilua o filtrado com o líquido de dissolução de maneira a obter valores de absorvências compreendidos entre 0,400 e 0,600.

As determinações do teor de oxazepam nas soluções obtidas em função do tempo e na solução correspondente ao teor total foram feitas por espectrofotometria no UV nos comprimentos de onda indicados no método A usando os líquidos de dissolução A e C, e em 230 nm usando o líquido de dissolução B1 (Fig. 12). Como líquidos de compensação foram utilizados os líquidos referidos.

As curvas de calibração para os líquidos de dissolução A e C são as mesmas que foram utilizadas no método A para os líquidos de dissolução A e B, respectivamente. Usando a mesma técnica, contruiu-se uma curva de calibração para o líquido de dissolução B1 (pH 4,5).

As concentrações, as absorvências e a curva de calibração do líquido de dissolução B estão representadas na Fig. 13.

O doseamento efectuado por HPLC obedeceu às condições de análise indicadas

para o método A.

As percentagens de oxazepam dissolvido nos líquidos de dissolução, em função do tempo, foram obtidas aplicando as seguintes equações:

a) No líquido de dissolução A

$$Q(\%) = \frac{A_{\text{prob}} \times P_t}{A_{\text{pad}} \times P_c} \times D \times 100$$

em que os valores de A_{prob} para os tempos de ensaio correspondentes a este meio de dissolução, foram calculados de modo idêntico ao indicado para o método A.

b) No líquido de dissolução B1

$$Q(\%) = \frac{A_{\text{prob}} \times P_t}{A_{\text{pad}} \times P_c} \times D \times 100 + L_A$$

- após 3 horas de ensaio

$$A_{\text{prob}} = A_{3h}$$

- após 4 horas de ensaio

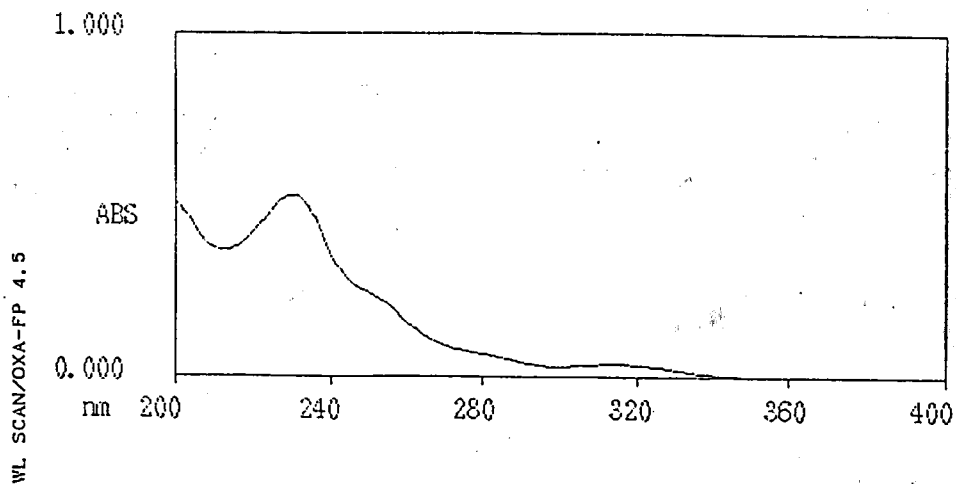
$$A_{\text{prob}} = A_{4h} + 0,01A_{3h}$$

c) No líquido de dissolução C

$$Q(\%) = \frac{A_{\text{prob}} \times P_t}{A_{\text{pad}} \times P_c} \times D \times 100 + L_A + L_B$$

- após 5 horas de ensaio

$$A_{\text{prob}} = A_{5h}$$



WL SCAN/OXA-FP 4,5

NO.	PEAK		VALLEY	
	nm	ABS	nm	ABS
1	314.0	0.036	299.0	0.029
2	230.0	0.528	212.0	0.365

Figura 12 - Espectro de absorção do oxazepam no líquido de dissolução B (pH 4,5).

PHOTOMETRY/OXA-FP 4,5

ID	ABS	CONC
STD 1	0.000	0.000
STD 2	0.138	0.122
STD 3	0.271	0.245
STD 4	0.403	0.367
STD 5	0.538	0.490
STD 6	0.664	0.612
STD 7	0.802	0.734

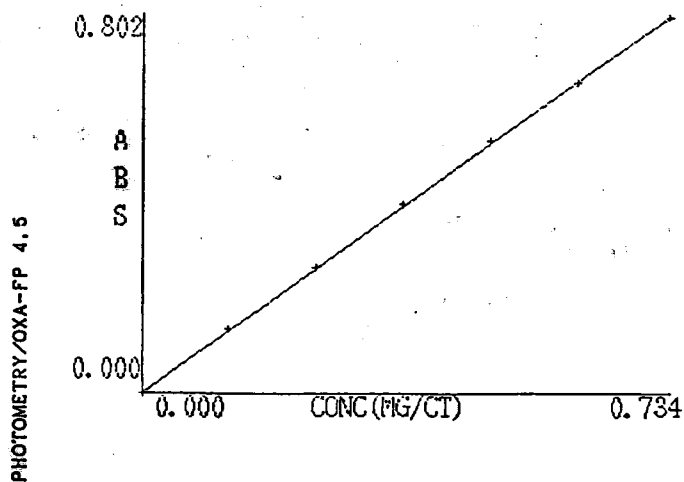


Figura 13 - Relação gráfica entre as absorvências e as concentrações de oxazepam no líquido de dissolução B (pH 4,5).

- após 6 horas de ensaio

$$A_{\text{prob}} = A_{6h} + 0,01(A_{5h})$$

- após 7 horas de ensaio

$$A_{\text{prob}} = A_{7h} + 0,01(A_{5h} + A_{6h})$$

- após n horas de ensaio

$$A_{\text{prob}} = A_n + 0,01(\sum A_{n-1})$$

em que:

Q (%) - quantidade de princípio activo dissolvido em função do tempo, expressa em percentagem;

A_{prob} - valor da absorvência da solução problema;

A_{pad} - valor da absorvência da solução padrão (teor total de oxazepam);

P_c - peso do comprimido a ensaiar;

P_t - peso teórico de um comprimido;

D - factor de correcção das diluições efectuadas nas soluções;

L_A - quantidade de princípio activo dissolvido no líquido de dissolução A, expresso em percentagem;

L_B - quantidade de princípio activo dissolvido no líquido de dissolução B, expresso em percentagem.

2.4.1.7.3.- Método C

No ensaio usaram-se os líquidos de dissolução A (pH 1,2) e B2 (pH 13-14). O líquido de dissolução B2 actuou como corrector do pH. Neste método, a variação do pH no decorrer do ensaio não foi conseguida por substituição total do líquido de dissolução, como aconteceu nos métodos A e B, mas sim por adição ao líquido de dissolução A de uma quantidade de líquido de dissolução B que permitisse obter o valor de pH pretendido. Assim, os comprimidos permaneceram uma hora no líquido de dissolução A, seguindo-se duas horas num meio de dissolução de pH 2,5, duas horas num meio de dissolução pH 4,5 e mantendo-se as restantes 7 horas num meio de dissolução de pH 7,5. Os processos operatórios estão resumidos no Quadro IX. O teor de oxazepam dissolvido nos líquidos de dissolução foi determinado em

amostras recolhidas por um processo descontínuo, sem compensação do volume retirado.

Método operatório:

Meça 900 ml de líquido de dissolução A para o recipiente do aparelho de dissolução. Coloque um comprimido de oxazepam no cesto de rede e mergulhe-o no líquido de dissolução à temperatura de $37 \pm 0,5^{\circ}$ C. Regule a velocidade de rotação para 100 r.p.m. Adicione líquido de dissolução B2 nas seguintes quantidades: 28,0 ml imediatamente após a recolha da amostra correspondente à 1ª hora de ensaio; 43,0 ml imediatamente após a recolha da amostra correspondente à 3ª hora de ensaio; 35,0 ml imediatamente após a recolha da amostra correspondente à 5ª hora de ensaio. Recolha amostras de 9 ml em intervalos de 1 hora até perfazer as 12 horas de ensaio. Filtre. Dilua o filtrado com líquido usado na dissolução de maneira a obter valores de absorvências compreendidas entre 0,400 e 0,600.

As determinações do teor de oxazepam nas soluções obtidas em função do tempo e na solução correspondente ao teor total foram feitas por espectrofotometria no UV nos comprimentos de onda indicados no método B usando os líquidos de dissolução de pH 1,2, 4,5 e 7,5 e em 230 nm usando o líquido de dissolução de pH 2,5 (Fig. 14). Como líquidos de compensação, foram utilizados os líquidos referidos.

As curvas de calibração para os líquidos de dissolução de pH 1,2, 4,5 e 7,5 são as utilizadas nos métodos A e B. Usando a mesma técnica, contruiu-se uma curva de calibração para o líquido de dissolução de pH 2,5.

As concentrações, as absorvências e a curva de calibração do líquido de dissolução de pH 2,5 estão representadas na Fig. 15.

O doseamento efectuado por HPLC obedeceu às condições de análise indicadas para o método A.

As percentagens de oxazepam dissolvido nos líquidos de dissolução em função do tempo foram obtidas aplicando as seguintes equações:

$$Q(\%) = \frac{A_{\text{prob}} \times P_t \times V_t}{A_{\text{pad}} \times P_c \times V_i} \times D \times 100$$

QUADRO IX

MÉTODO C - Variação lenta e contínua do pH

TEMPO (horas)	pH		Líquido de Dissolução (ml)		Amostras (ml)	Líquido de Dissolução B ADICIONADO (ml)
	ANTES	APÓS	ANTES	APÓS		
0	1,2	1,2	900	900	0	0
1	1,2	2,5	900	891	9	28,0
2	2,5	2,5	919	910	9	0
3	2,5	4,5	910	901	9	43,0
4	4,5	4,5	944	935	9	0
5	4,5	7,5	935	926	9	35,0
6	7,5	7,5	961	952	9	0
7	7,5	7,5	952	943	9	0
8	7,5	7,5	943	934	9	0
9	7,5	7,5	934	925	9	0
10	7,5	7,5	925	916	9	0
11	7,5	7,5	916	907	9	0
12	7,5	7,5	907	898	9	0

- após 0,5 horas de ensaio

$$A_{\text{prob}} = A_{0,5\text{h}}$$

- após 1 hora de ensaio

$$A_{\text{prob}} = A_{1\text{h}} + 0,01(A_{0,5\text{h}})$$

- após 1,5 horas de ensaio

$$A_{\text{prob}} = A_{1,5\text{h}} + 0,01(A_{0,5\text{h}} + A_{1\text{h}})$$

- após n horas de ensaio

$$A_{\text{prob}} = A_n + 0,01(\sum A_{n-1})$$

em que:

Q (%) - quantidade de princípio activo dissolvido em função do tempo, expresso em percentagem;

A_{prob} - valor da absorvência da solução problema;

A_{pad} - valor da absorvência da solução padrão (teor total de oxazepam);

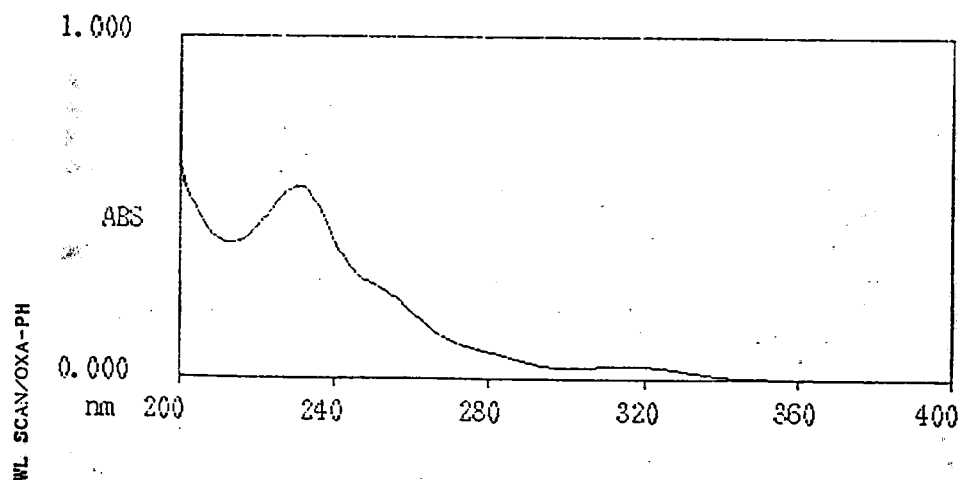
P_c - peso do comprimido a ensaiar;

P_t - peso teórico de um comprimido;

D - factor de correcção das diluições efectuadas nas soluções;

V_i - volume inicial do líquido de dissolução;

V_t - volume do líquido de dissolução ao fim do tempo t.



WL SCAN/OXA-PH

NO.	PEAK		VALLEY	
	nm	ABS	nm	ABS
1	356.0	0.002	354.5	0.000
2	316.0	0.038	300.0	0.031
3	230.5	0.565	213.0	0.394

Figura 14 - Espectro de absorção do oxazepam no líquido de dissolução de pH 2,5.

PHOTOMETRY/OXA-PH

ID	ABS	CONC
STD 1	0.000	0.000
STD 2	0.155	0.113
STD 3	0.291	0.227
STD 4	0.431	0.340
STD 5	0.570	0.454
STD 6	0.712	0.567
STD 7	0.855	0.681

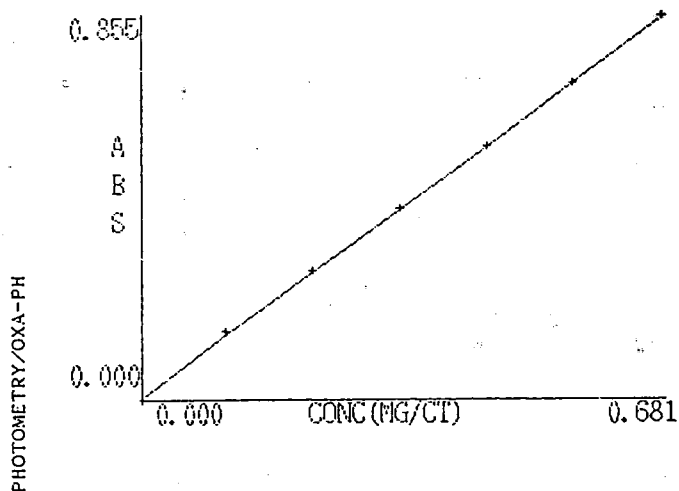


Figura 15 - Relação gráfica entre as absorvências e as concentrações de oxazepam no líquido de dissolução de pH 2,5.

2.4.1.8.- Resultados e estudo estatístico

Os resultados referentes aos ensaios de dissolução que permitem a análise da cedência do oxazepam contido nos comprimidos de acção prolongada são expressos em:

- percentagem de oxazepam dissolvido em função do tempo;
- área sob a curva;
- eficácia de dissolução.

A percentagem de princípio activo dissolvido nos líquidos de dissolução em função do tempo é a forma mais simples de exprimir os resultados, permitindo também uma fácil interpretação dos mesmos, em relação a uma só fórmula ou para comparação entre várias. As percentagens são calculadas aplicando as equações apresentadas anteriormente.

A área sob a curva é calculada para um tempo (12 horas) correspondente ao valor máximo de dissolução usando o método do trapézio, no qual a área sob a curva é igual ao somatório das superfícies de cada trapézio traçado no gráfico. O cálculo foi feito por

computador.

A eficácia de dissolução é expressa em percentagem e é obtida pela relação entre a área sob a curva de dissolução correspondente a uma dissolução de 100% ao fim do tempo t e a área do rectângulo cujos lados correspondem também àqueles valores (tempo ao fim do qual ocorre a dissolução total de fármaco)(195).

O conceito de eficácia de dissolução é importante, já que este parâmetro permite relacionar teoricamente os ensaios *in vitro* com os ensaios *in vivo*. Na realidade, se se admite que o grau de absorção de um fármaco *in vivo* é proporcional à concentração do fármaco em solução e ao respectivo tempo de contacto com o tracto gastrintestinal, facilmente se compreende que a eficácia de dissolução é função destas duas variáveis(195).

Na análise estatística, a rejeição de um resultado que apresentasse um valor discrepante foi efectuada utilizando o critério de rejeição baseado na distribuição t de Student.

A variável t , uma vez calculada, era comparada com o valor t dado na tabela de Fischer(196), para o nível de probabilidade escolhido (95%: $P=0,05$); o número de graus de liberdade (N) é dado por $N=n-1$, em que n é o número de amostras.

2.4.2.- MÉTODOS DE VERIFICAÇÃO *IN VIVO*

A verificação das formas farmacêuticas de acção prolongada pode executar-se através de ensaios realizados *in vivo* e *in vitro*.

Apesar de as técnicas *in vitro* se mostrarem realmente eficazes para a determinação do comportamento dos medicamentos de acção prolongada, fornecem apenas excelentes bases para a planificação das formas que apresentem este tipo de comportamento. A razão desta circunstância reside em não bastar uma cedência regular para haver uma resposta terapêutica também uniforme, dada a complexidade dos fenómenos de absorção, distribuição, fixação e metabolismo dos fármacos no organismo.

Nestas circunstâncias, os resultados *in vitro* permitem apenas orientar as pesquisas galénicas, pois há dificuldade em se extrapolar os resultados obtidos para as condições fisiológicas. Assim, os ensaios *in vitro* não permitem prever o comportamento exacto

das preparações no organismo, pelo que não há possibilidade de dispensar os ensaios *in vivo*, mesmo que seja possível estabelecer certas correlações entre uns e outros.

O uso de métodos de verificação *in vivo* é, pois, indispensável para o estudo das formas de acção prolongada.

A verificação *in vivo* de uma forma farmacêutica engloba duas fases, correspondendo a primeira à experimentação em animais e a segunda à experimentação no homem.

No presente trabalho foi estudada a absorção do oxazepam administrado em comprimidos de acção prolongada, avaliando a concentração de fármaco no sangue em tempos determinados após a sua administração. O método analítico usado foi a cromatografia líquida de alta pressão.

2.4.2.1.- Material e métodos

2.4.2.1.1.- Experimentação em coelhos

A primeira fase dos ensaios consistiu na experimentação em coelhos saudáveis, com peso compreendido entre 2,0 e 2,5 kg. Os coelhos foram mantidos em jejum 24 horas antes da realização do ensaio.

A cada animal foi administrado um comprimido de acção prolongada com uma dose correspondente à de um ser humano. Os comprimidos administrados foram produzidos de acordo com a fórmula F₂₁.

A colheita das amostras de sangue foi feita 1, 2, 4, 8, 12 e 24 horas após a administração oral dos comprimidos, efectuando-se em cada animal cinco extracções na veia marginal da orelha.

As amostras de sangue foram tratadas seguindo a técnica descrita em 2.4.2.3.1.

2.4.2.1.2.- Experimentação no homem

O ensaio foi efectuado com indivíduos saudáveis, de idade compreendida entre 25 e 40 anos, de ambos os sexos. Os comprimidos de acção prolongada foram administrados após a ingestão do pequeno almoço(197-200).

Executaram-se seis séries de determinações e as colheitas foram feitas 1, 2, 4, 8, 12 e 24 horas após a administração. A cada voluntário foram efectuadas quatro recolhas de sangue.

As amostras de sangue foram tratadas seguindo a técnica descrita em 2.4.2.3.1.

2.4.2.2.- Aparelhagem

Cromatógrafo líquido de alta pressão de mistura binária Varian 5000.

Centrífuga ECCO Type: E II/11.

Homogeneizador Heidolph, modelo REAX 1 DR.

Seringas esterilizadas Artsana de 2,5 ml.

Tubos plásticos para colheitas de sangue F/R - 12 x 75 mm.

Colunas Extralut 3 (Merck).

Dispositivo de filtração Millipore modelo XX30 012000, equipado com filtros da marca Millipore modelo C6P12140.

Frigorífico Agni.

Rotavapor Büchi RE 111, incluindo um banho termostático Büchi 461.

2.4.2.3.- Reagentes

2.4.2.3.1.- Preparação das soluções

Solução mãe de padrão interno: solução de 100 mg de desmetildiazepam em metanol até perfazer 1000,0 ml.

Solução de padrão interno: dilua 12,0 ml de solução mãe com metanol até 100,0 ml.

Solução padrão: pese rigorosamente 100 mg de oxazepam. Dissolva em metanol e complete 1000,0 ml com o mesmo solvente. Para balão marcado de 100 ml meça 12,0 ml desta solução e complete o volume com metanol. Adicione 0,15 ml desta diluição a 1,0 ml de plasma humano, 0,15 ml de solução de padrão interno e 1,70 ml de solução de amónia a 0,5%. Homogenize em vórtex e transfira para coluna Extralut 3. Deixe em contacto durante 15

minutos. Extraia com 15 ml de éter etílico. Evapore o extracto etéreo. Retome o resíduo com 1 ml de metanol. Homogenize em vórtex. Filtre.

Solução problema: centrifugue a amostra de sangue durante 30 minutos a 3000 rotações por minuto. Separe o sobrenadante. Congele. A 1,0 ml do plasma descongelado adicione 1,85 ml de solução de amónia a 0,5% e 0,15 ml de solução de padrão interno. Homogenize em vórtex e transfira para coluna Extralut 3. Deixe em contacto durante 15 minutos. Extraia com 15 ml de éter etílico. Evapore o extracto etéreo. Retome o resíduo com 1 ml de metanol. Homogenize em vórtex. Filtre.

2.4.2.4.- Ensaio por HPLC

2.4.2.4.1.- Condições de análise:

pré-coluna-Alltech C-18, enchimento com partículas de 30-40 µm de diâmetro.

coluna-Perkin Elmer C18 SIL-X-10, modelo 409028, com 4,6 mm de diâmetro interno e 25 cm de comprimento; enchimento com partículas de 10 µm de diâmetro.

volume de líquido injectado-100 µl.

composição do eluente-eluição isocrática em metanol/água (67/33 V/V).

velocidade de fluxo-0,7 ml.min⁻¹.

deteccção-espectrofotométrica 230 nm.

acerto automático do zero-no tempo zero.

sistema de registo-integrador Varian, modelo 4290.

atenuação-2.

sensibilidade de deteção à largura do pico-6.

O padrão interno utilizado foi o desmetildiazepam.

Os tempos de retenção médios foram de 10,85 minutos para o oxazepam e de 14,21 minutos para o desmetildiazepam.

2.4.2.4.2.- Análise cromatográfica dos extractos

Os extractos sanguíneos, obtidos como se referiu anteriormente, foram analisados

em triplicado.

A solução padrão também foi analisada em triplicado.

O teor de oxazepam no plasma foi determinado do seguinte modo:

-calcular as médias das alturas dos picos cromatográficos do fármaco em análise e do padrão interno tanto nos cromatogramas padrão como nos cromatogramas dos extractos de plasma.

-calcular a razão entre as alturas médias dos picos do oxazepam e do padrão interno, e relacionar esses valores com a concentração do fármaco na solução padrão.

2.4.2.4.3.- Estudo da recuperação

A recuperação do oxazepam foi determinada pelo processo extractivo adoptado, adicionando-se a 1,0 ml de plasma 0,15 ml das soluções padrão e 1,70 ml de solução de amónia a 0,5% (m/V) e procedendo-se em seguida do modo descrito para a análise dos extractos obtidos.

A recuperação do oxazepam é da ordem dos 98,5%.

2.4.2.4.4.- Estudo da linearidade e da sensibilidade

A linearidade de resposta do detector foi verificada preparando-se soluções metanólicas de oxazepam e de padrão interno em seis concentrações diferentes: quatro na zona de valores séricos terapêuticos e duas abaixo dessa zona de valores.

As soluções foram analisadas em triplicado e determinou-se a razão média das alturas dos picos cromatográficos do oxazepam e do padrão interno, relacionando-a com a respectiva concentração, como pode observar-se na Fig. 16.

A sensibilidade do método é aproximadamente de 10 ng/ml.

2.4.2.4.5.- Tratamento do material de vidro

Todo o material de vidro envolvido na preparação dos extractos sanguíneos foi

desactivado com o objectivo de evitar as perdas de benzodiazepinas por adsorção que, nas quantidades presentes (ng/ml), podem ser significativas.

A desactivação foi feita por silanização, fazendo contactar o material de vidro com uma solução a 5% de dimetildiclorossilano em tolueno durante 4 horas. Seguidamente foi lavado com metanol e seco na estufa a 100° C.

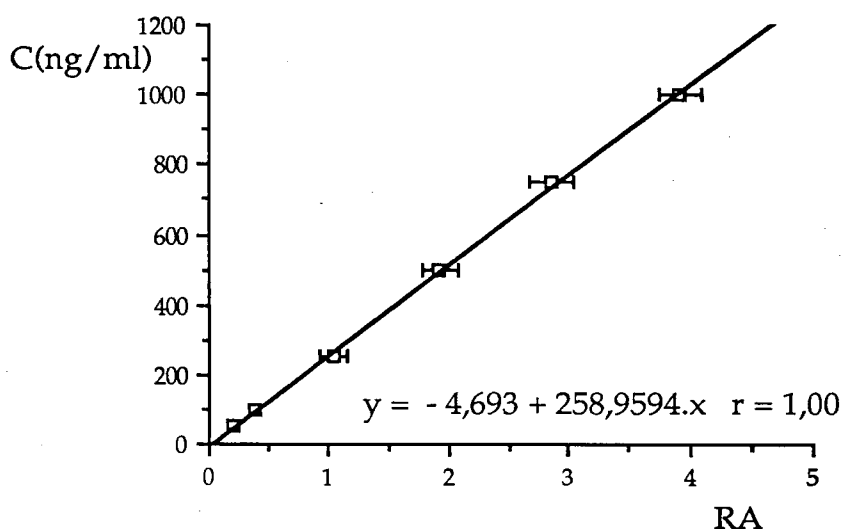


Figura 16 - Estudo da linearidade de resposta do detector para várias concentrações séricas de oxazepam.

RA - Razão das alturas dos picos de oxazepam e de desmetildiazepam.

2.4.2.4.6.- Estudo da possibilidade de aplicação de solventes tamponados

Muitos autores referem a vantagem de analisar as benzodiazepinas por HPLC com solventes tamponados(201-204). Baseiam-se na melhor definição dos picos, com ausência de "tailing", fenómeno vulgar na análise por HPLC em fase reversa de compostos com características químicas deste tipo. Os tampões usados são, em regra, o tampão de fosfatos e o de acetatos.

Contudo, Bastos(205) não encontrou qualquer vantagem em fazer a análise por HPLC das benzodiazepinas, nomeadamente do oxazepam e do desmetildiazepam, com os tampões acima referidos.

2.4.2.5.- Resultados e estudo estatístico

Os resultados referentes ao ensaio de absorção *in vivo* são expressos em:

- concentração plasmática de oxazepam ($\mu\text{g}/\text{l}$) em função do tempo;
- área sob a curva;

A concentração plasmática de oxazepam em função do tempo foi calculada conforme o descrito em 2.4.2.4.2.

A área sob a curva ($\text{h} \cdot \mu\text{g}/\text{l}$) foi calculada para o tempo (12 horas) até ao qual o fármaco deveria manter níveis plasmáticos dentro da zona terapêutica, utilizando-se o método do trapézio, no qual a área sob a curva é igual ao somatório das superfícies de cada trapézio. O cálculo foi feito por computador.

Na análise estatística, a rejeição de um resultado que apresentasse um valor discrepante foi efectuada utilizando o critério de rejeição baseado na distribuição t de Student.

A variável t, uma vez calculada, era comparada com o valor t dado na tabela de Fischer, para o nível de probabilidade escolhido (95%: $P=0,05$); o número de graus de liberdade é dado por $N=n-1$, em que n é o número de amostras.

2.5.- ESTUDO DE FÓRMULAS CONSTITUÍDAS POR MATRIZES HIDRÓFILAS

2.5.1.- MATRIZ CONSTITUÍDA POR CARBOPOL 934, LAURILSULFATO DE SÓDIO E LUBRIFICANTES

A introdução da lactose nas fórmulas que constituem este grupo ficou a dever-se essencialmente às características que esta substância possui, podendo destacar-se a sua solubilidade em água e nos líquidos de dissolução utilizados, além do fácil manuseamento na preparação de comprimidos. Devido à solubilidade apresentada, a lactose deve originar teoricamente um aumento da cedência dos princípios activos a partir de comprimidos de acção prolongada constituídos por matrizes hidrófilas(206-208). Como foi referido, as matrizes hidrófilas secas têm uma porosidade baixa. Contudo, depois de entrarem em contacto com os sucos digestivos ocorre um aumento da porosidade, porque os constituintes solúveis da matriz são dissolvidos e o líquido de dissolução ocupa o espaço deixado por estes. Como consequência, a dissolução do fármaco será maior e a sua difusão para o exterior da matriz mais rápida. A lactose, além de ser o diluente referido na fórmula base para a dose inicial e que é adicionada com a finalidade de aumentar o volume desta relativamente à dose de manutenção, também aparece nesta misturado com o Carbopol 934. Nestas circunstâncias, através de uma granulação a seco e depois de uma prévia mistura dos pós, prepararam-se matrizes hidrófilas constituídas por quantidades diferentes de Carbopol 934 e lactose, com a finalidade de variar positivamente a cedência do fármaco.

Durante o desenvolvimento deste trabalho, e com o intuito de aumentar a cedência do fármaco presente na dose inicial, também foi necessário recorrer a uma substância com características molhantes: o laurilsulfato de sódio foi o escolhido. Sabe-se que esta substância promove a dissolução de fármacos contidos em comprimidos devido à produção de uma fina película de partículas dispersas, aumentando deste modo a superfície e consequentemente a dissolução(209-213).

Este grupo de comprimidos é constituído pelas fórmulas apresentadas no Quadro X.

QUADRO X

FÓRMULAS CONTENDO CARBOPOL 934, LACTOSE E LAURILSULFATO DE SÓDIO

	Quantidades unitárias (mg)					
	F ₁	F ₂	F ₃	F ₄	F ₅	F ₆
MISTURA I						
Oxazepam	15,0	15,0	15,0	15,0	15,0	15,0
Lactose	15,0	15,0	15,0	15,0	15,0	15,0
Laurilsulfato de sódio	—	—	0,625	6,25	—	6,25
Talco	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
MISTURA II						
Oxazepam	15,6	15,6	15,6	15,6	15,6	15,6
Carbopol 934	200,0	100,0	100,0	100,0	60,0	60,0
Lactose	—	100,0	100,0	100,0	140,0	140,0
Estearato de Magnésio	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25

2.5.1.1.- Influência da lactose

Para estudar a influência da lactose na dissolução do oxazepam foram preparadas as fórmulas F₁, F₂ e F₅, inscritas no Quadro X. As percentagens relativas entre as substâncias que constituem o suporte da dose de manutenção foram as seguintes: F₁ (100% de Carbopol 934), F₂ (50% de Carbopol 934 e 50% de lactose) e F₅ (70% de Carbopol 934 e 70% de lactose). Esta última fórmula é constituída pela percentagem máxima de lactose que pode adicionar-se ao carbopol 934, sem que ocorra desagregação dos comprimidos antes de atingidas as 12 horas de ensaio. Portanto, pode afirmar-se que 30% corresponde à quantidade mínima de Carbopol 934 necessária para, em associação com a lactose, originar uma matriz hidrófila eficaz por granulação a seco.

2.5.1.2.- Influência do laurilsulfato de sódio

A influência do laurilsulfato de sódio na dissolução do oxazepam contido em comprimidos de acção prolongada, quando adicionado à mistura que contém a dose inicial, foi estudada em duas matrizes diferentes. A utilização de duas matrizes de composição diferente teve como objectivo permitir a análise conclusiva e inequívoca de que qualquer influência na dissolução do oxazepam, se deveria apenas à presença do agente molhante na fórmula. As percentagens absolutas de laurilsulfato de sódio presentes foram as indicadas no Quadro XI.

QUADRO XI

QUANTIDADE DE LAURILSULFATO DE SÓDIO

Fórmula	Laurilsulfato de sódio (%)	Constituição da matriz
F ₃	0,25	Carbopol 934 (50%) e lactose (50%)
F ₄	2,5	Carbopol 934 (50%) e lactose (50%)
F ₆	2,5	Carbopol 934 (30%) e lactose (70%)

2.5.1.3.- Ensaio de dissolução

Na realização do ensaio de dissolução usou-se o método A descrito em 2.4.1.7.1.

O teor de oxazepam dissolvido em função do tempo a partir das fórmulas indicadas no Quadro X foi determinado por espectrofotometria no UV.

2.5.1.4.- Resultados

Os resultados do ensaio de dissolução, expressos em percentagem, em área sob a curva ao fim de 12 horas(ASC) e em eficácia de dissolução após 12 horas (E%) são apresentados no Quadro XII e nas Figs 17, 18, 19 e 20.

QUADRO XII

ENSAIO DE DISSOLUÇÃO - MÉTODO A

pH	Tempo (horas)	Oxazepam dissolvido (%)					
		F ₁	F ₂	F ₃	F ₄	F ₅	F ₆
1,2	0,5	—	3,0±0,6	3,4±0,5	3,9±0,7	2,9±0,3	2,7±0,8
1,2	1	2,5±0,3	4,9±0,3	4,7±0,4	5,7±1,3	4,2±0,1	4,0±0,2
1,2	1,5	—	5,7±0,3	6,0±0,6	7,8±0,4	5,7±0,4	6,1±0,3
1,2	2	5,1±0,5	7,0±0,5	7,5±0,4	9,2±0,4	7,1±0,4	7,9±0,9
7,5	3	7,1±0,6	9,9±0,8	11,7±1,1	13,4±1,9	10,7±0,6	14,0±1,5
7,5	4	10,0±1,5	12,1±1,0	13,6±1,1	15,9±2,7	14,0±1,3	18,3±1,2
7,5	5	13,6±0,7	15,3±1,6	16,9±1,5	18,5±3,7	17,0±1,8	22,6±2,6
7,5	6	16,9±1,1	19,5±2,0	19,8±1,7	23,9±6,2	21,0±2,2	27,1±2,9
7,5	7	20,0±2,4	22,6±2,1	22,6±2,6	26,3±5,9	25,9±3,5	32,1±2,9
7,5	8	21,7±2,6	24,1±2,2	24,6±2,6	29,6±5,9	28,6±4,4	37,5±3,8
7,5	10	27,5±3,5	29,4±3,3	28,1±3,4	35,6±5,7	34,7±3,8	46,6±4,3
7,5	12	32,1±3,1	33,6±4,1	33,8±4,2	40,8±6,6	39,5±4,1	52,2±6,0
ASC (t=12h)		194,9±21,1	220,0±25,5	222,2±24,0	270,0±48,8	252,1±28,4	328,1±32,2
E% (t=12h)		16,2±1,8	18,3±1,9	18,5±2,0	22,5±4,1	21,0±2,4	27,3±2,7

(±) - Intervalo de confiança: 95%

t - 0,05

N - 5

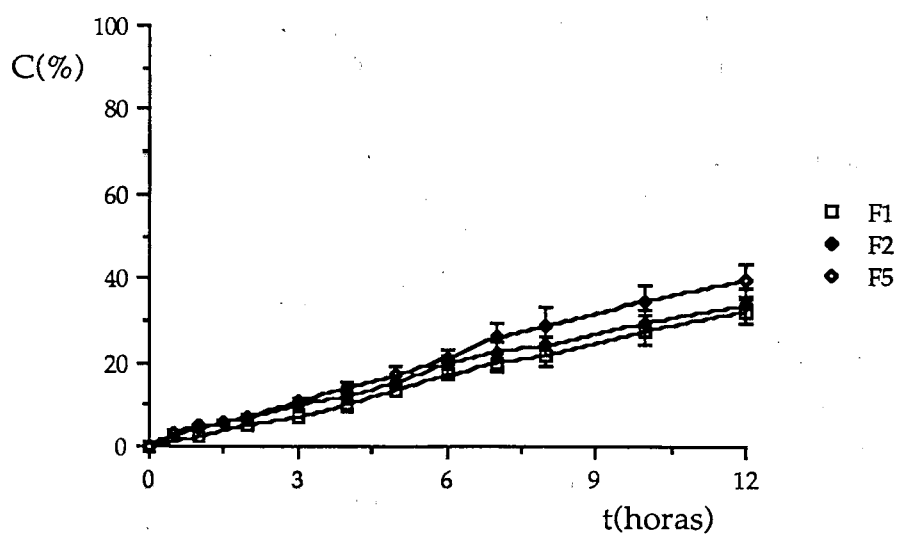


Figura 17 - Liodisponibilidade do oxazepam.

Influência da lactose interna.

F1 - 0%; F2 - 50% e F5 - 70%.

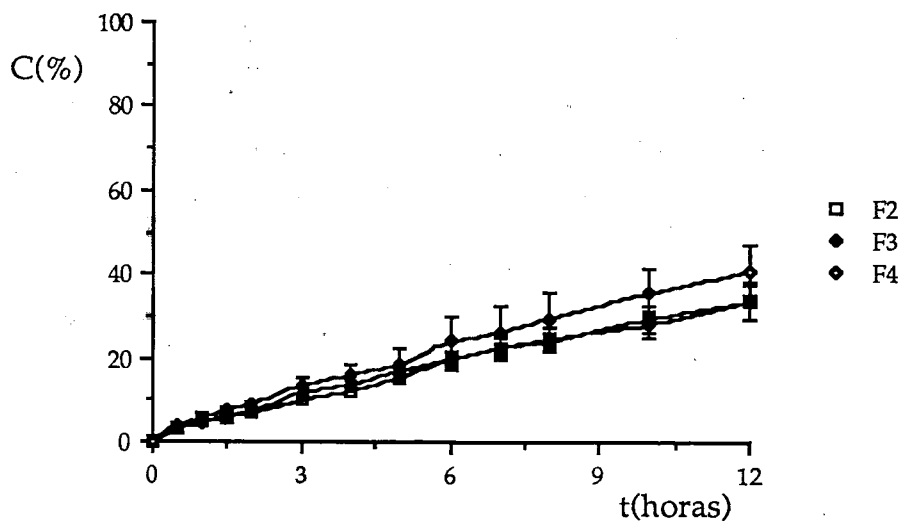


Figura 18 - Liodisponibilidade do oxazepam.

Influência do laurilsulfato de sódio externo.

F2 - 0%; F3 - 0,25% e F4 - 2,5%

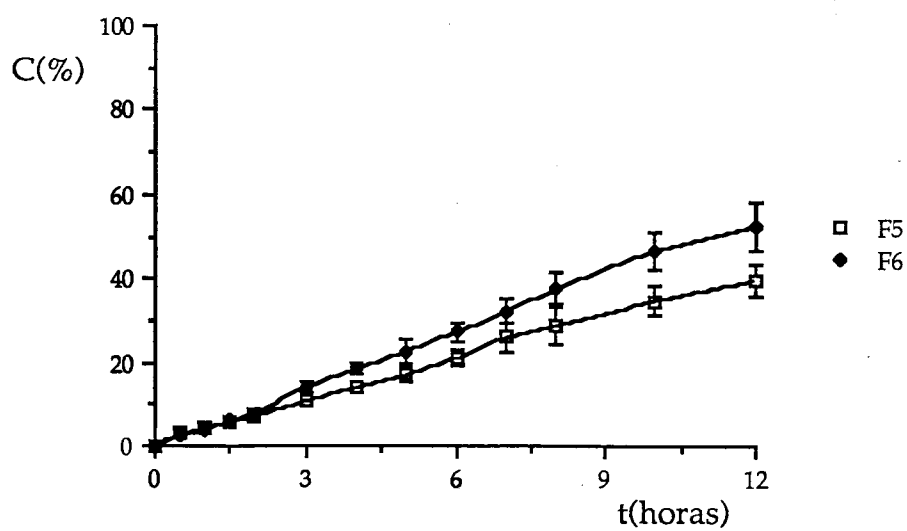


Figura 19 - Liodisponibilidade do oxazepam.
 Influência do laurilsulfato de sódio externo.
 F5 - 0% e F6 - 2,5%.

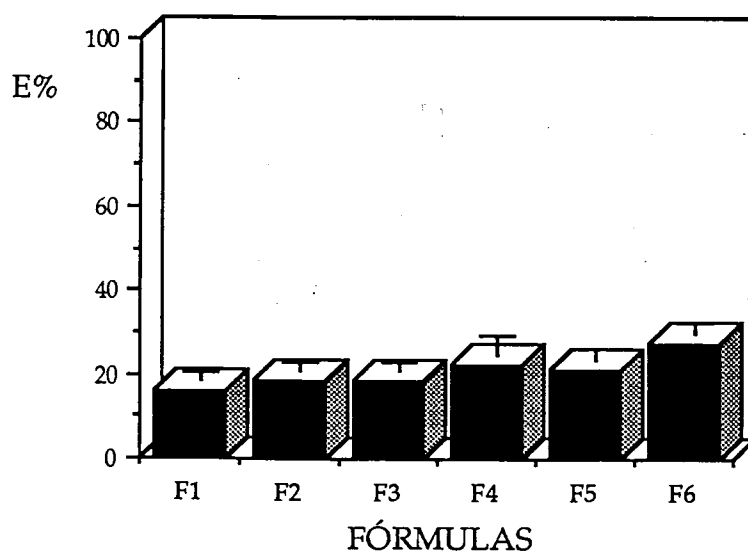


Figura 20 - Eficácia de dissolução do oxazepam.

2.5.1.5.- Discussão dos resultados

Da análise dos resultados obtidos pode afirmar-se que o objectivo pretendido não foi atingido, pois a dissolução do oxazepam em função do tempo ficou aquém do desejado, para todas as fórmulas ensaiadas, apresentando baixa liodisponibilidade.

A percentagem de oxazepam dissolvido no suco gástrico artificial ao fim de 2 horas de ensaio não ultrapassou 9,2 % do teor total, quando o resultado aceitável deveria estar compreendido entre 35% e 55%. Também se verificou que as alterações introduzidas nas fórmulas estudadas não produziram resultados significativamente diferentes, pois apresentaram dissoluções compreendidas entre 7,0 e 7,9%, excepto para as fórmulas F₁ (5,1%) e F₄ (9,2%).

Pelo contrário, a percentagem de oxazepam dissolvido no suco entérico artificial apresentou diferenças importantes e significativas, já que ao fim de 12 horas de ensaio estava compreendida entre 32,1% na fórmula F₁ e 52,2% na fórmula F₆. De acordo com a percentagem de oxazepam dissolvido ao fim de 12 horas de ensaio, as fórmulas ensaiadas podem ser divididas do seguinte modo:

- as que cederam aproximadamente 30%; nestas circunstâncias estão as fórmulas F₁ (100% de Carbopol 934), F₂ (50% de Carbopol 934 e 50% de lactose) e F₃ (50% de Carbopol 934, 50% de lactose e 0,25% de laurilsulfato de sódio);

- as que cederam aproximadamente 40%; nestas circunstâncias estão as fórmulas F₄ (50% de Carbopol 934, 50% de lactose e 2,5% de laurilsulfato de sódio) e F₅ (30% de Carbopol 934 e 70% de lactose)

- a que cedeu aproximadamente 50%; nestas circunstâncias está a fórmula F₆ (30% de Carbopol 934, 70% de lactose e 2,5% de laurilsulfato de sódio).

Assim, pode afirmar-se que a influência da lactose na dissolução do oxazepam apenas se nota quando está presente na matriz hidrófila em quantidades relativas próximas de 70%, como se pode observar na Fig. 17.

A presença do laurilsulfato de sódio na mistura de pós que compõem a dose inicial não conseguiu satisfazer os requisitos pretendidos, já que o objectivo principal era o de promover a libertação do princípio activo no suco gástrico artificial. Contudo, pode afirmar-se que este agente molhante promove a cedência, e consequentemente a dissolução, do oxazepam no suco entérico artificial, desde que esteja em concentrações próximas de 2,5%. Este fenómeno é independente da composição da matriz, como se pode concluir a partir das diferenças

encontradas entre as fórmulas F₂ e F₄ e entre as fórmulas F₅ e F₆ (Figs. 18 e 19).

A análise da Fig. 20 permite concluir que, das fórmulas estudadas, a F₆ é a que apresenta melhor eficácia de dissolução.

2.5.2.- MATRIZ CONSTITUÍDA POR CARBOPOL 934, SULFATO DE ZINCO, LAURILSULFATO DE SÓDIO E LUBRIFICANTES

Neste grupo de fórmulas e em relação ao grupo de fórmulas anterior, o sulfato de zinco p.a. (Merck) foi a única substância introduzida em substituição da lactose. A escolha do sulfato de zinco deveu-se fundamentalmente a duas características que possui: é muito solúvel em água e nos sucos digestivos e apresenta na sua constituição um catião activo, o zinco. Como foi referido para a lactose, a solubilidade representa um factor importante na escolha do diluente, pois aumentará a porosidade da matriz após penetração dos líquidos. Por outro lado, o Carbopol 934 apresenta carga negativa quando em solução aquosa, o que poderia originar uma baixa cedência de oxazepam. Assim, este problema ficaria resolvido se, após ionização, o catião zinco neutralizasse o carbopol 934.

Este grupo de comprimidos é constituído pelas fórmulas apresentadas no Quadro XIII.

2.5.2.1.- Influência do sulfato de zinco

Inicialmente comparou-se a influência do sulfato de zinco em relação à lactose na liodisponibilidade do oxazepam contido nos comprimidos de acção prolongada, substituindo esta substância por aquela, nas fórmulas F₂ e F₃. Obtiveram-se assim as fórmulas F₇ e F₈, respectivamente.

Também se estudou a influência do sulfato de zinco quando este está presente na matriz hidrófila quer na dose inicial, quer na dose de manutenção, ou seja, quando está presente intra ou extragranularmente. Para o efeito prepararam-se três matrizes com a mesma constituição quantitativa de sulfato de zinco (fórmulas F₉, F₁₀ e F₁₁). A distribuição intragranular do sulfato de zinco relativamente ao Carbopol 934 variou da seguinte maneira:

F9 - 50% de sulfato de zinco e 50% de Carbopol 934; F10 - 33,3% de sulfato de zinco e 66,7% de carbopol 934 e F11 - 53,5% de sulfato de zinco e 46,5% de Carbopol 934. De modo a manter a quantidade total de sulfato de zinco nas fórmulas ensaiadas, foi necessário ajustar a quantidade presente na mistura extragranular do seguinte modo: F9 - 15 g, F10 - 65 g e F11 - 11 g.

QUADRO XIII

FÓRMULAS CONTENDO CARBOPOL 934, SULFATO DE ZINCO E LAURILSULFATO DE SÓDIO

	Quantidades unitárias (mg)				
	F7	F8	F9	F10	F11
MISTURA I					
Oxazepam	15,0	15,0	15,0	15,0	15,0
Sulfato de zinco	15,0	15,0	15,0	65,0	—
Laurilsulfato de sódio	—	6,25	6,25	6,25	6,25
Talco	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
MISTURA II					
Oxazepam	15,6	15,6	15,6	15,6	15,6
Carbopol 934	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
Sulfato de zinco	100,0	100,0	100,0	50,0	115,0
Laurilsulfato de sódio	—	—	6,25	6,25	6,25
Estearato de Magnésio	1,25	1,25	1,25	1,25	1,25

2.5.2.2.- Influência do laurilsulfato de sódio

No grupo anterior, estudou-se a influência do laurilsulfato de sódio externo na biodisponibilidade do oxazepam contido em comprimidos de acção prolongada. Neste grupo desenvolveu-se aquele estudo, verificando-se a influência do agente molhante quando está presente quer na dose inicial, quer na dose de manutenção, ou seja, quando a sua presença é intra ou extragranular. As percentagens absolutas de laurilsulfato de sódio nas fórmulas experimentadas foram as seguintes: F8 - 2,5% na dose inicial e 0% na dose de manutenção e F9 - 2,5% na dose inicial e 2,5% na dose de manutenção.

2.5.2.3.- Ensaio de dissolução

Na realização do ensaio de dissolução usou-se o método A, descrito em 2.4.1.7.1.

O teor de oxazepam dissolvido em função do tempo a partir das fórmulas indicadas no Quadro X foi determinado por espectrofotometria no UV.

2.5.2.4.- Resultados

Os resultados do ensaio de dissolução, expressos em percentagem, em área sob a curva ao fim de 12 horas(ASC) e em eficácia de dissolução após 12 horas (E%), são apresentados no Quadro XIV e nas Figs. 21, 22 e 23.

QUADRO XIV

ENSAIO DE DISSOLUÇÃO - MÉTODO A

pH	Tempo (horas)	Oxazepam dissolvido (%)				
		F ₇	F ₈	F ₉	F ₁₀	F ₁₁
1,2	0,5	4,2±0,9	4,2±0,4	4,4±0,3	4,4±0,7	5,6±0,5
1,2	1	6,8±0,7	5,7±0,4	7,0±0,4	6,7±0,8	7,3±0,6
1,2	1,5	9,3±0,8	7,7±0,5	8,9±1,1	8,8±1,8	9,6±1,2
1,2	2	10,5±1,4	10,4±2,0	11,4±1,1	10,4±1,0	11,4±1,4
7,5	3	16,9±2,5	20,9±2,9	19,9±2,1	19,2±2,9	17,5±4,8
7,5	4	21,0±4,1	30,7±3,9	27,3±4,1	24,0±3,7	23,2±3,4
7,5	5	29,8±4,1	36,5±5,3	39,9±5,5	30,2±4,9	26,4±4,0
7,5	6	37,7±2,6	46,2±7,8	53,0±3,3	36,9±5,3	29,8±4,1
7,5	7	42,7±2,9	52,9±3,2	62,3±4,0	42,4±7,8	33,3±4,3
7,5	8	47,4±4,2	58,1±7,2	68,9±4,4	48,7±8,7	38,1±4,7
7,5	9	————	————	69,5±4,3	52,5±9,2	43,5±7,0
7,5	10	53,1±5,2	61,4±7,5	72,4±4,8	57,0±11,1	47,7±5,1
7,5	11	————	————	74,8±5,5	64,6±8,3	54,0±6,7
7,5	12	58,4±6,4	67,2±8,1	77,4±5,7	68,9±8,5	58,5±7,8
ASC (t=12h)		401,6±41,6	481,0±59,2	544,5±42,6	427,7±68,6	362,6±50,3
E% (t=12h)		33,5±3,5	40,1±4,9	45,4±3,6	35,6±5,7	30,2±4,2

(±) - Intervalo de confiança - 95%

t - 0,05

N - 5

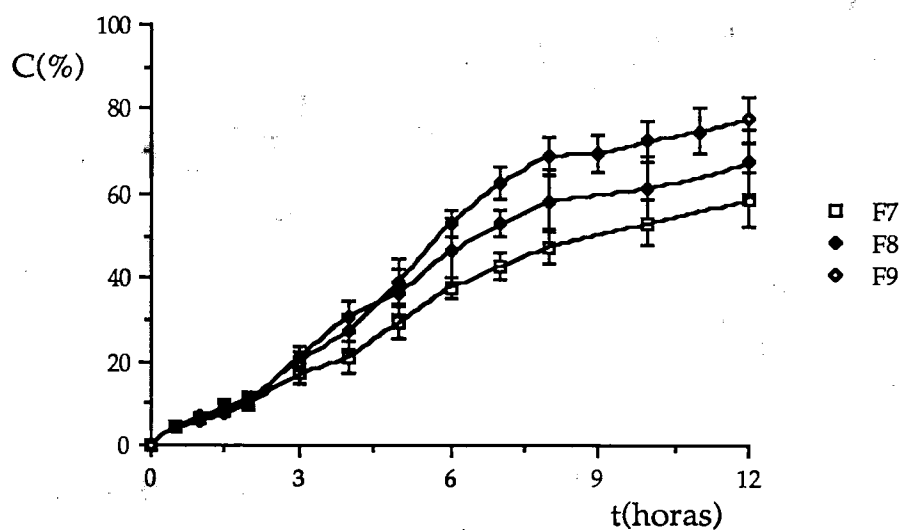


Figura 21 - Liodisponibilidade do oxazepam.

Influência do laurilsulfato de sódio intra (i) e extragranular (e).

F7 - 0%, F8 - 2,5% (i) e F9 - 2,5% (i) e 2,5% (e).

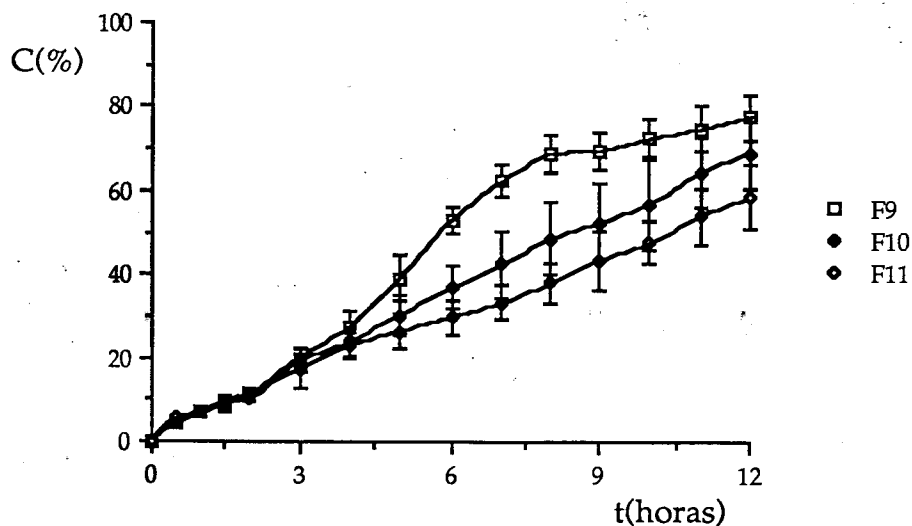


Figura 22 - Liodisponibilidade do oxazepam.

Influência do sulfato de zinco intra (i) e extragranular (e).

F9 - 100 mg (i) e 15 mg (e), F10 - 50 mg (i) e 65 mg (e) e

F11 - 115 mg (i).

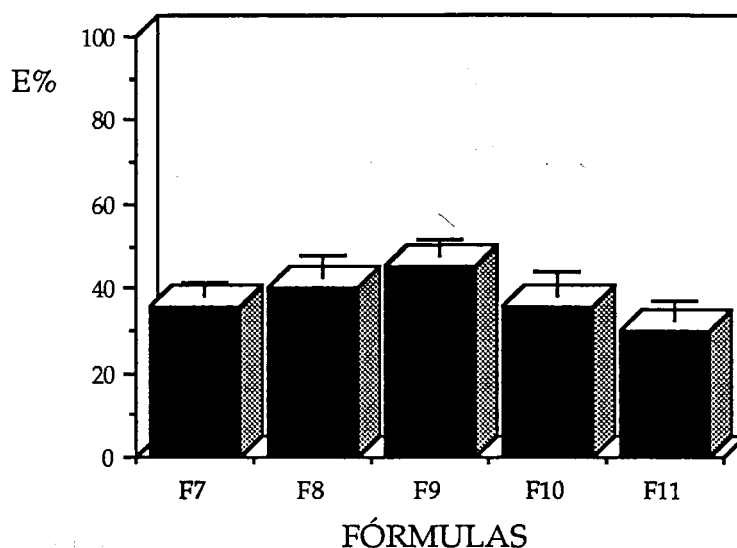


Figura 23 - Eficácia de dissolução do oxazepam.

2.5.2.5.- Discussão dos resultados

Da análise dos resultados, e tal como foi referido para o grupo anterior, pode afirmar-se que o objectivo principal deste trabalho não foi alcançado.

A quantidade de oxazepam dissolvido no suco gástrico artificial ao fim de 2 horas de ensaio não ultrapassou os 11,4% do total de princípio activo contido nos comprimidos. Também se verificou que as alterações introduzidas nas cinco fórmulas apresentadas no Quadro XIII não produziram resultados positivos, pois foram praticamente coincidentes variando entre 10,4% e 11,4%.

A liodisponibilidade do oxazepam no suco entérico artificial apresentou diferenças importantes e atribuíveis às alterações introduzidas nas fórmulas. Nas 12 horas de ensaio, a quantidade total de fármaco dissolvido variou entre 58,4% na fórmula F7 e 77,4% na fórmula F9, como está indicado no Quadro XIV. De acordo com a quantidade de oxazepam dissolvido ao fim de 12 horas de ensaio, é possível classificar as fórmulas ensaiadas da seguinte maneira:

- as que cederam aproximadamente 60%; nestas circunstâncias estão as fórmulas F7 (intragranular: 50% de Carbopol 934 e 50% de sulfato de zinco; extragranular: 15 g de sulfato de zinco) e F11 (intragranular: 46,5% de Carbopol 934, 53,5% de sulfato de zinco e 2,5%

de laurilsulfato de sódio; extragranular: 2,5% de laurilsulfato de sódio);

- as que cederam aproximadamente 70%; nestas circunstâncias estão as fórmulas F8 (intragranular: 50% de Carbopol 934 e 50% de sulfato de zinco; extragranular: 15 g de sulfato de zinco e 2,5% de laurilsulfato de sódio) e F10 (intragranular: 66,6% de Carbopol 934, 33,3% de sulfato de zinco e 2,5% de laurilsulfato de sódio; extragranular: 65 g de sulfato de zinco e 2,5% de laurilsulfato de sódio);

- a que cedeu aproximadamente 80%; nestas circunstâncias está a fórmula F9 (intragranular: 50% de Carbopol 934, 50% de sulfato de zinco e 2,5% de laurilsulfato de sódio; extragranular: 15 g de sulfato de zinco e 2,5% de laurilsulfato de sódio).

Numa primeira análise, e tratando-se de considerações gerais, os resultados apresentados permitem concluir que a liodisponibilidade do oxazepam contido nos comprimidos de acção prolongada varia em função da composição da matriz hidrófila. O sulfato de zinco presente na matriz mostrou-se sempre mais eficaz do que a lactose.

Em relação ao agente molhante, presente intra ou extragranularmente, pode afirmar-se que o laurilsulfato de sódio originou sempre um efeito positivo na liodisponibilidade do oxazepam.

Numa segunda análise, e tratando-se de considerações específicas, pode afirmar-se que a liodisponibilidade do oxazepam em F9 é maior do que em F10 e em F11, podendo concluir-se que existe uma proporção relativa de sulfato de zinco intra e extragranular ideal e que é mais ou menos intermédia (cerca de 50% intragranular e 15 g extragranular).

Apresentando as fórmulas F8 e F10 liodisponibilidades idênticas, pode concluir-se que a presença intragranular do laurilsulfato de sódio (2,5%) anula o efeito negativo do afastamento da proporção relativa ideal intra e extragranular do sulfato de zinco.

Pelo mesmo motivo, ou seja, tendo as fórmulas F7 e F11 liodisponibilidades de oxazepam idênticas, pode afirmar-se que a ausência de sulfato de zinco extragranular anula o efeito positivo da presença do laurilsulfato de sódio intra e extragranular.

Da análise do Quadro XIV e da Fig. 23 conclui-se que, das cinco fórmulas que constituem este grupo, a F9 é a que apresenta melhor eficácia de dissolução.

2.5.3.- MATRIZ CONSTITUÍDA POR CARBOPOL 934, SULFATO OU FOSFATO DE CÁLCIO, LAURILSULFATO DE SÓDIO E LUBRIFICANTES

Apesar de no grupo de fórmulas anterior não se ter conseguido atingir o objectivo proposto, (neutralização do Carbopol 934 pelo catião zinco, modificando assim positivamente o comportamento da matriz hidrófila na cedência do oxazepam) pareceu interessante prosseguir o estudo verificando o efeito de outros sais de cálcio. O sulfato p.a.(Merck) e o fosfato de cálcio p.a. (Merck) foram os escolhidos, essencialmente devido às suas características tecnológicas e toxicológicas que são responsáveis pelo maior emprego na preparação de medicamentos do que o sulfato de zinco(214-216).

Até ao momento, a formulação dos comprimidos baseou-se apenas na associação de diluentes solúveis na água e nos sucos digestivos aos restantes constituintes da matriz. Com a introdução do fosfato de cálcio foi possível preparar uma matriz hidrófila com um diluente insolúvel nesses líquidos.

Este grupo de comprimidos é constituído pelas fórmulas apresentadas no Quadro XV.

2.5.3.1.- Influência do sulfato de cálcio

Para estudar a influência do sulfato de cálcio na biodisponibilidade do oxazepam preparou-se a fórmula F12. Como pode observar-se nos Quadros XV e XVI, a diferença entre as fórmulas F7 e F12 resultou da substituição integral do sulfato de zinco pelo sulfato de cálcio.

2.5.3.2.- Influência do fosfato de cálcio

Após o estudo da biodisponibilidade do oxazepam a partir de matrizes hidrófilas constituídas por diluentes solúveis na água e sucos digestivos, faltava estudar o efeito de um diluente insolúvel nos mesmos solventes. A escolha recaiu no fosfato de cálcio.

Inicialmente preparou-se a fórmula F13 com uma quantidade total de fosfato de cálcio (intragranular: 44% de fosfato de cálcio e 66% de Carbopol 934; extragranular: 11,9 g de fosfato de cálcio) calculada de modo que a concentração em catião cálcio fosse igual à da fórmula F12.

QUADRO XV

FÓRMULAS CONTENDO CARBOPOL 934, SULFATO E FOSFATO DE CÁLCIO
E LAURILSULFATO DE SÓDIO

	Quantidades unitárias (mg)				
	F12	F13	F14	F16	F15,F17,F18
MISTURA I					
Oxazepam	15,0	15,0	15,0	15,0	15,0
Sulfato de cálcio	15,0	—	—	—	—
Fosfato de cálcio	—	11,9	15,0	15,0	15,0
Laurilsulfato de sódio	6,25	6,25	5,0	5,0	5,0
Talco	2,5	2,5	2,0	2,0	2,0
MISTURA II					
Oxazepam	15,6	15,6	15,6	15,6	15,6
Carbopol 934	100,0	100,0	56,6	56,6	56,6
Sulfato de cálcio	100,0	—	—	—	—
Fosfato de cálcio	—	79,0	84,8	84,8	84,8
Laurilsulfato de sódio	6,25	6,25	5,0	5,0	5,0
Estearato de Magnésio	1,25	1,25	1,0	—	1,0
Talco	—	—	—	1,0	—

2.5.3.3.- Influência dos punções

As novas fórmulas revelaram a necessidade de reduzir o peso teórico dos comprimidos de 250 mg para 200 mg. Como os punções utilizados tinham 10 mm de diâmetro e superfície plana e lisa, originavam comprimidos com pouca altura (F14), pelo que foram substituídos por punções de 8 mm de diâmetro e superfície côncava e lisa (F15)(215).

2.5.3.4.- Influência do estearato de magnésio

Vários trabalhos referenciam que o estearato de magnésio influencia a cedência dos princípios activos a partir de comprimidos devido às características hidrófobas que possui(217-219). Perante este facto, procurou estudar-se a influência deste lubrificante, que do ponto de vista tecnológico é muito importante numa fórmula, na biodisponibilidade do oxazepam contido em comprimidos de acção prolongada. Para o efeito, prepararam-se as fórmulas F₁₅ (0,5% de estearato de magnésio) e F₁₆(o estearato foi substituído totalmente pelo talco).

2.5.3.5.- Influência da granulometria

Todas as fórmulas estudadas até ao momento apresentaram características granulométricas iguais. A verificação dos pós foi feita com tamises de abertura de malha de 300 μm . A análise granulométrica do principio activo e do agente gelificante foi realizada por microscopia óptica, como pode observar-se no Anexo I. Quanto ao tamanho dos grãos que constituem o granulado, pode afirmar-se que na preparação dos comprimidos apenas foram utilizados grãos que passaram através de um tamis de abertura de malha de 750 μm e ficaram retidos no tamis de abertura de malha de 300 μm , sendo as restantes fracções rejeitadas. Todavia, prepararam-se fórmulas com granulados totais, para estudar a sua influência na biodisponibilidade do oxazepam(220-222). Como pode observar-se na Fig. 24, as fórmulas ensaiadas apresentavam um granulado com a seguinte frequência de distribuição em peso: F₁₅ (750 μm -100%), F₁₇ (2000 μm -3,3%; 1200 μm -44,8%; 750 μm -36,2% e 300 μm -15,6%) e F₁₈ (2000 μm -19,3%; 1200 μm -40,0%; 750 μm -26,4% e 300 μm -14,3%).

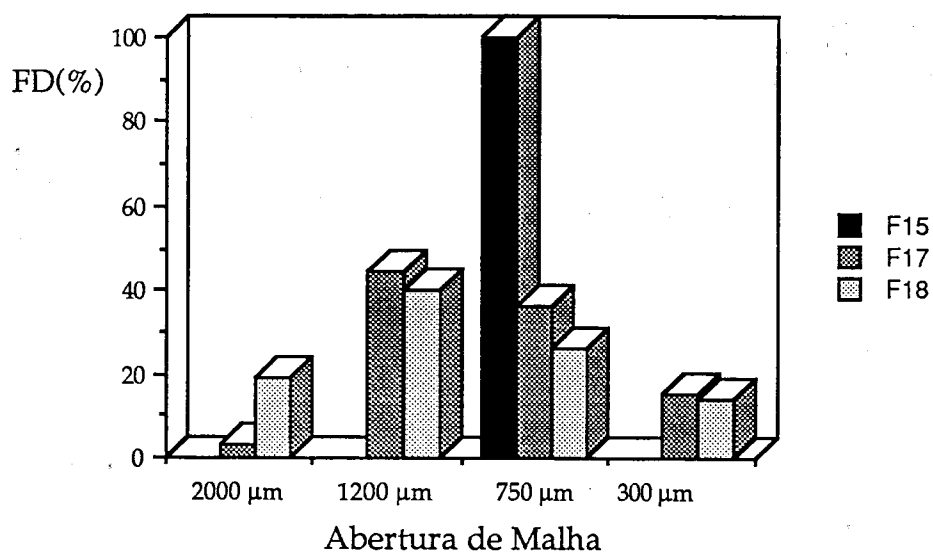


Figura 24 - Frequência de distribuição granulométrica (FD) dos grãos que constituem a dose de manutenção das fórmulas F15, F17 e F18.

2.5.3.6.- Ensaio de dissolução

No ensaio de dissolução usou-se o método A descrito em 2.4.1.7.1.

O teor de oxazepam dissolvido em função do tempo a partir das fórmulas indicadas no Quadro XV foi determinado por espectrofotometria no UV.

2.5.3.7.- Resultados

Os resultados do ensaio de dissolução, expressos em percentagem, em área sob a curva ao fim de 12 horas(ASC) e em eficácia de dissolução após 12 horas (E%), são apresentados no Quadro XVI e nas Figs 25, 26, 27, 28, 29.

QUADRO XVI

ENSAIO DE DISSOLUÇÃO - MÉTODO A

pH	Tempo (horas)	Oxazepam dissolvido (%)						
		F ₁₂	F ₁₃	F ₁₄	F ₁₅	F ₁₆	F ₁₇	F ₁₈
1,2	0,5	3,6±0,4	4,9±0,3	4,1±0,7	—	—	—	—
1,2	1	4,1±0,2	5,9±0,1	5,9±0,3	6,4±0,2	7,0±0,4	8,2±0,5	7,7±0,4
1,2	1,5	5,5±0,3	7,5±1,0	9,1±1,4	—	—	—	—
1,2	2	6,5±0,5	8,3±1,0	11,3±1,1	8,3±0,6	10,7±0,7	12,0±0,5	11,5±0,9
7,5	3	13,2±0,8	13,7±0,3	18,5±1,0	16,1±0,7	21,0±1,7	21,7±2,8	20,4±1,5
7,5	4	14,2±0,9	18,2±0,9	24,1±1,5	25,8±2,9	30,0±2,3	27,3±1,5	28,9±1,7
7,5	5	16,6±0,3	22,7±1,3	32,2±2,8	32,1±1,9	41,3±2,2	34,6±1,4	35,7±1,9
7,5	6	20,0±1,3	29,4±1,7	38,8±5,6	44,0±6,7	50,4±2,3	41,4±2,7	40,1±2,0
7,5	7	22,7±2,1	34,9±1,0	48,2±5,5	50,0±7,2	55,8±3,2	47,8±3,4	45,0±1,7
7,5	8	26,0±2,6	39,7±2,3	54,6±6,7	53,1±7,3	64,4±3,4	51,2±2,8	48,8±2,0
7,5	9	29,6±1,9	43,8±2,9	58,3±8,9	57,1±8,1	67,6±4,0	54,1±3,0	51,6±2,9
7,5	10	32,9±1,4	47,5±4,0	63,1±8,5	60,5±10,0	69,4±2,9	57,8±3,9	54,1±2,1
7,5	11	36,8±2,1	52,1±4,9	66,8±8,7	65,7±7,7	73,7±2,5	59,2±4,6	56,9±1,9
7,5	12	40,6±4,0	57,5±5,6	72,7±8,1	69,7±7,5	76,0±2,6	61,2±4,6	59,5±2,9
ASC (t=12h)		243,8±16,2	346,1±23,6	459,0±55,3	454,0±57,1	528,7±26,9	446,4±29,4	430,5±20,5
E% (t=12h)		20,3±1,4	28,8±2,0	38,3±4,6	37,8±4,8	44,1±2,2	37,2±2,5	35,9±1,7

(±) - Intervalo de confiança - 95%

t - 0,05

N - 5

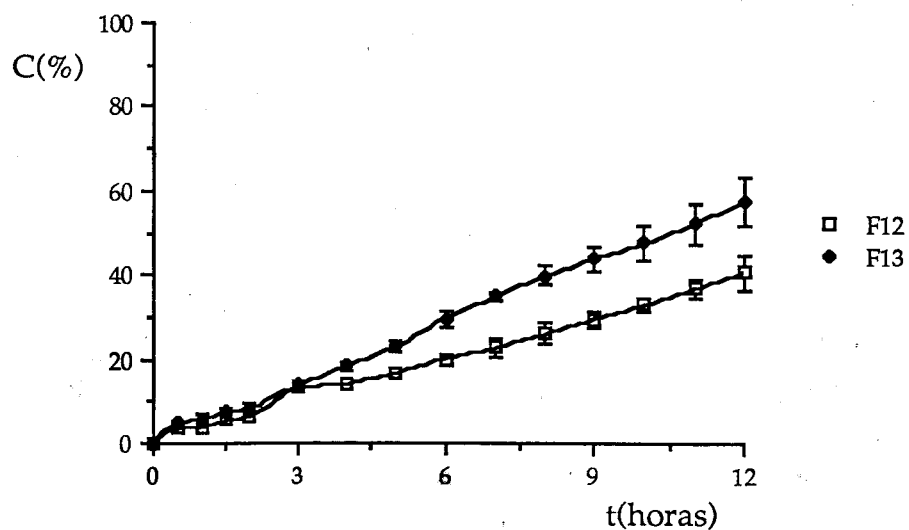


Figura 25 - Liodisponibilidade do oxazepam.

Influência do sulfato de cálcio (F12) e do fosfato de cálcio (F13).

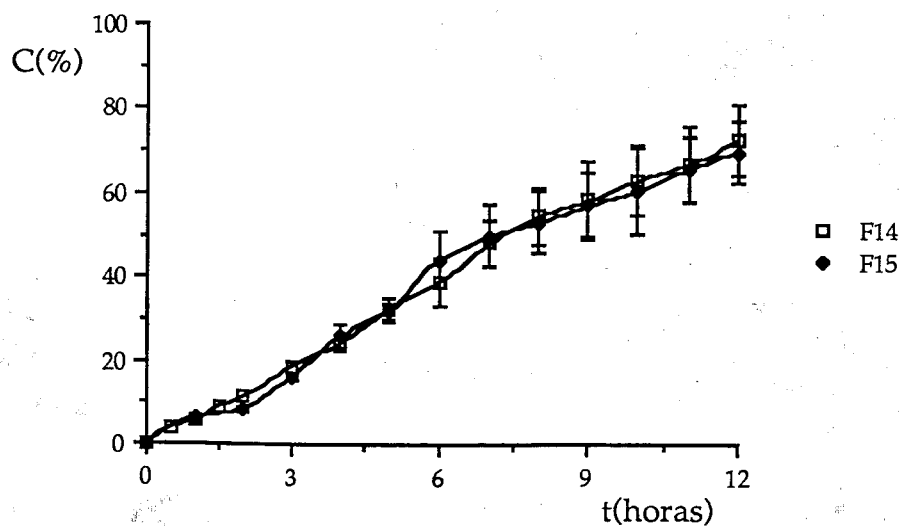


Figura 26 - Liodisponibilidade do oxazepam.

Influência dos punções : F14 - 10 mm de diâmetro, de superfície plana e lisa; F15- 8 mm de diâmetro, de superfície côncava e lisa.

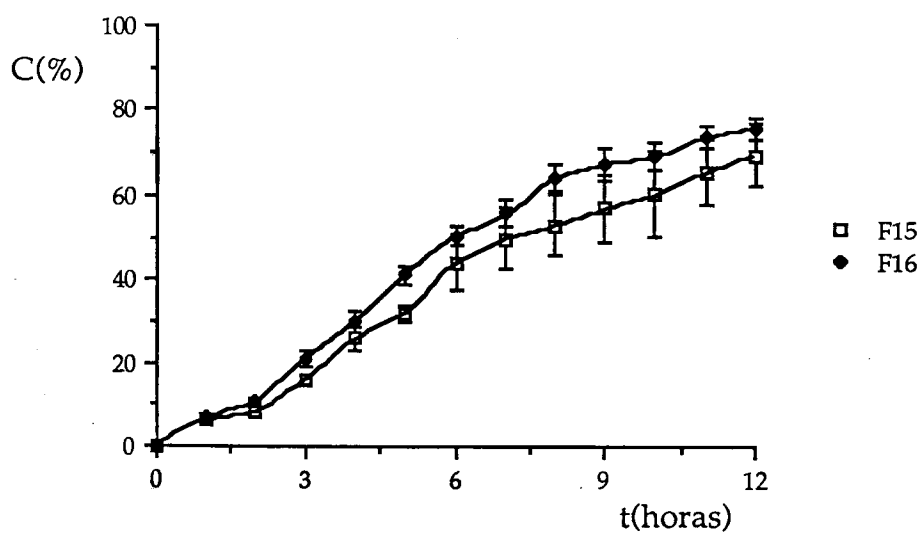


Figura 27 - Liodisponibilidade do oxazepam.
 Influência do estearato de magnésio.
 F15 - 0,5% e F16 - 0%.

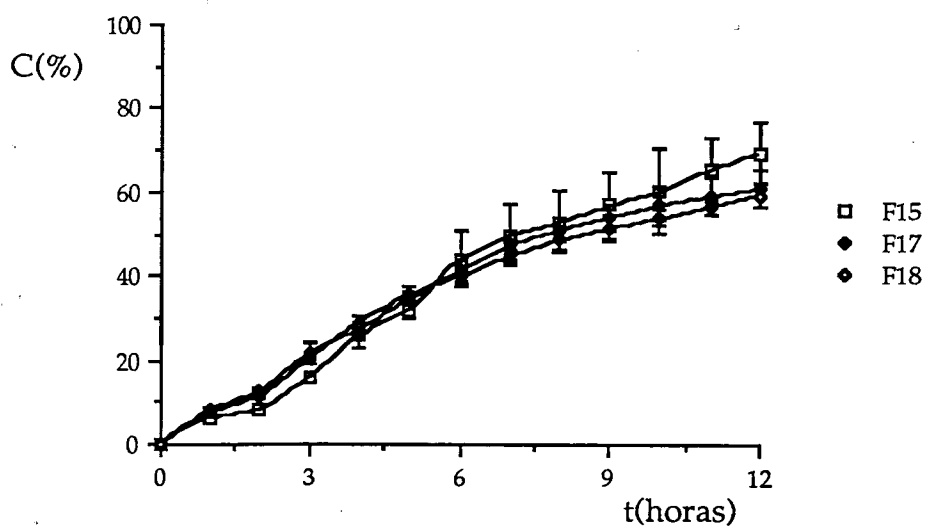


Figura 28 - Liodisponibilidade do oxazepam.
 Influência da granulometria.

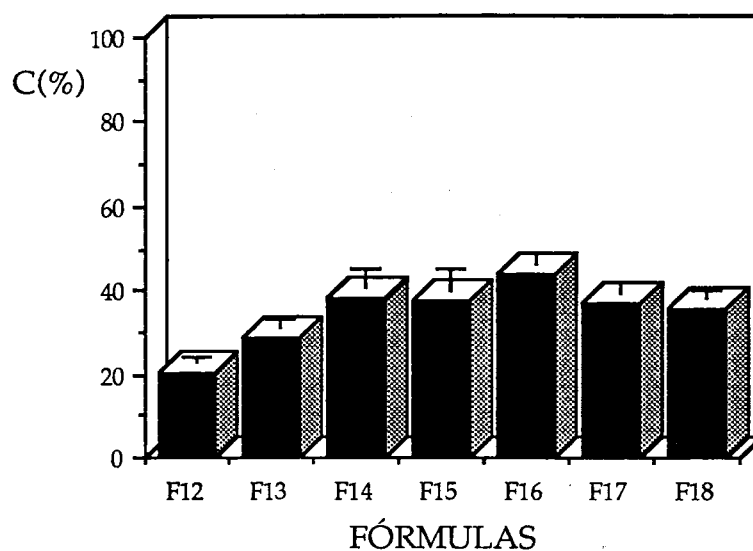


Figura 29 - Eficácia de dissolução do oxazepam.

2.5.3.8.- Discussão dos resultados

Pelas razões apontadas na discussão dos resultados dos grupos anteriores, uma vez mais se conclui que o objectivo principal deste estudo não foi alcançado.

A quantidade de oxazepam dissolvido no suco gástrico artificial ao fim de 2 horas de ensaio não ultrapassou 12% do teor total de fármaco contido nos comprimidos, pelo que as alterações introduzidas nas fórmulas experimentadas não se fizeram notar nos resultados obtidos.

Pela análise dos resultados inscritos nos Quadros XIV e XVI, pela observação das Figs. 22 e 25 e em função da quantidade de oxazepam dissolvido no suco entérico artificial ao fim de 12 horas de ensaio, pode concluir-se que o sulfato de zinco contido na matriz hidrófila (F9) proporcionou quase o dobro da dissolução obtida na presença do sulfato de cálcio (F12). Estes resultados indicam que o ião zinco tem um efeito neutralizador do Carbopol 934 superior ao ião cálcio, o que é confirmado pelo facto de as quantidades de zinco e cálcio presentes nas fórmulas serem praticamente iguais (utilizou-se sulfato de zinco, hepta-hidratado e sulfato de cálcio, di-hidratado).

A comparação dos resultados inscritos no Quadro XVI respeitantes às fórmulas F12 e F13 permite concluir que o fosfato de cálcio (diluyente insolúvel), relativamente ao sulfato de

cálcio (diluyente solúvel), origina um aumento da quantidade de fármaco dissolvido em função do tempo.

Este resultado pode considerar-se surpreendente por duas razões: por um lado, sabe-se que a porosidade das matrizes hidrófilas aumenta à medida que os líquidos de dissolução nela penetram por esgotamento das substâncias solúveis; por outro lado, a proporção relativa intragranular entre os sais de cálcio e o Carbopol 934 são, para a fórmula F₁₂, 50% de sulfato de cálcio e 50% de Carbopol 934, e para a fórmula F₁₃, 44% de fosfato de cálcio e 66% de Carbopol 934.

Não se verificou qualquer influência dos punções usados na preparação dos comprimidos em relação à quantidade de oxazepam dissolvido, podendo mesmo afirmar-se que o perfil das curvas de dissolução em função do tempo são coincidentes, como se demonstra na Fig. 26. Apesar das dimensões e forma dos comprimidos variar consoante os punções usados, a superfície média dos comprimidos obtidos foi idêntica.

No que diz respeito à influência do estearato de magnésio na quantidade de fármaco dissolvido, a análise dos resultados inscritos no Quadro XVI para as fórmulas F₁₅ e F₁₆ e a observação das curvas de dissolução representadas na Fig. 27 permite concluir que não se encontram resultados significativamente diferentes.

A granulometria do granulado, dentro de limites de variabilidade aceitáveis e que eventualmente possam acontecer numa produção industrial, não modificaram significativamente a percentagem de oxazepam dissolvido nos líquidos de dissolução em função do tempo, como se observa na Fig. 28.

Da análise do Quadro XVI e da Fig. 29 concluiu-se que, das fórmulas que constituem este grupo, a fórmula F₁₆ é a que tem a melhor eficácia de dissolução.

2.5.4.- MATRIZ CONSTITUÍDA POR CARBOPOL 934, FOSFATO DE CÁLCIO, CROSCARMELOSE DE SÓDIO E LUBRIFICANTES

A obtenção de comprimidos de acção prolongada contendo oxazepam como princípio activo e Carbopol 934 como agente gelificante não foi conseguida até ao presente momento deste trabalho, pois não foi possível fabricar, por granulação a seco, comprimidos que apresentassem a liodisponibilidade pretendida para o fármaco. De facto, nunca se atingiram

concentrações de oxazepam próximas das desejadas durante as primeiras duas horas do ensaio de dissolução. O máximo obtido para a dose inicial foi de 13%, quando o pretendido teoricamente está compreendido entre 35 e 55%. Portanto, o problema localizava-se fundamentalmente na cedência do princípio activo pela matriz ao suco gástrico artificial, já que no suco entérico artificial a cedência se realizava a um ritmo satisfatório.

Perante esta realidade, e verificando que a substituição dos constituintes não modificara positivamente a fraca biodisponibilidade apresentada pelo fármaco, atribui-se este fenómeno a incompatibilidades existentes entre o princípio activo e o agente gelificante. Embora esta possibilidade possa ser colocada para meios de dissolução que apresentem valores de pH básicos, o mesmo não acontece para meios com valores de pH ácidos. De facto, a molécula de oxazepam apresenta um valor de pKa de 1,7, pelo que em meio ácido se encontra carregada negativamente, tal como o Carbopol 934. Assim, não sendo em princípio uma incompatibilidade química a responsável pela fraca cedência do oxazepam a partir das matrizes hidrófilas experimentadas, surge como hipótese viável o comportamento físico apresentado pelo agente gelificante. A molécula do Carbopol 934 em meio ácido, ou seja, a valores de $\text{pH} < 3$, tem uma capacidade de hidratação praticamente nula. Além disso, os comprimidos resultantes deste tipo de matrizes têm uma porosidade baixa no estado seco, pelo que a difusão dos líquidos de dissolução com valores de pH ácidos através da massa sólida é muito difícil.

Ora, se se pretendia que a dose inicial fosse libertada o mais rapidamente possível, tornava-se necessário inverter esta situação. Pelos motivos apontados anteriormente, pensou-se que o caminho a seguir deveria ser o de permitir um rápido contacto da dose inicial com os líquidos de dissolução, sem contudo alterar a cinética de cedência da dose de manutenção. Nestas circunstâncias, recorreu-se a uma substância com propriedades desagregantes, referenciada na literatura da especialidade como um "superdesagregante", a croscarmelose de sódio(NF, Wyeth Laboratories, Inc., Philadelphia, Lot T808), que é um polímero da carboximetilcelulose sódica(223-226).

Este grupo de comprimidos é constituído pelas fórmulas apresentadas no Quadro XVII.

QUADRO XVII

FÓRMULAS CONTENDO CARBOPOL 934, FOSFATO DE CÁLCIO
E CROSCARMELOSE DE SÓDIO

	Quantidades unitárias (mg)				
	F19	F20	F21	F22	F23
MISTURA I					
Oxazepam	15,0	15,0	15,0	15,0	15,0
Croscarmelose de sódio	5,0	8,0	10,0	25,0	10,0
Fosfato de cálcio	20,0	17,0	15,0	—	15,0
Talco	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
MISTURA II					
Oxazepam	15,6	15,6	15,6	15,6	15,6
Carbopol 934	56,6	56,6	56,6	56,6	84,8
Fosfato de cálcio	84,8	84,8	84,8	84,8	56,6
Estearato de Magnésio	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0

2.5.4.1.- Influência da croscarmelose de sódio

Para estudar a influência da croscarmelose de sódio na dissolução do oxazepam contido nos comprimidos de acção prolongada, foram preparadas fórmulas com quantidades diferentes de agente desagregante, como pode verificar-se no Quadro XVII. As percentagens de croscarmelose de sódio presentes na fase extragranular da matriz são as seguintes: na fórmula F19-2,5%, na F20-4,0%, na F21-5,0% e na F22-12,5%.

2.5.4.2.- Influência do fosfato de cálcio

Em função dos resultados obtidos no ensaio de dissolução para as fórmulas acima referidas, procurou estudar-se a influência dos constituintes da fase intragranular da matriz na dissolução do oxazepam. As percentagens relativas das substâncias responsáveis pela cedência do oxazepam correspondente à dose de manutenção são as seguintes: na fórmula F21 (60% de fosfato de cálcio e 40% de Carbopol 934) e na F23 (40% de fosfato de cálcio e 60% de Carbopol 934). A percentagem absoluta da croscarmelose de sódio presente nas fórmulas foi de 5%.

2.5.4.3.- Ensaio de dissolução

No ensaio de dissolução usou-se o método A, descrito em 2.4.1.7.1.

O teor de oxazepam dissolvido em função do tempo a partir das fórmulas indicadas no Quadro XVII foi determinado por espectrofotometria no UV e por cromatografia líquida de alta pressão (HPLC).

2.5.4.4.- Resultados

Os resultados do ensaio de dissolução, expressos em percentagem, em área sob a curva ao fim de 12 horas(ASC) e em eficácia de dissolução após 12 horas (E%), são apresentados no Quadro XVIII e nas Figs 30, 31, 32, 33 e 34.

QUADRO XVIII

ENSAIO DE DISSOLUÇÃO - MÉTODO A

pH	Tempo (horas)	Oxazepam dissolvido (%)				
		F ₁₉	F ₂₀	F ₂₁	F ₂₂	F ₂₃
1,2	0,5	3,2±0,3	9,7±1,6	13,0±2,6	26,7±1,6	3,7±0,2
1,2	1	5,5±0,2	19,4±2,5	31,7±4,0	63,8±7,1	6,2±0,5
1,2	1,5	7,5±0,4	29,5±5,2	44,0±4,2	73,7±7,8	7,6±0,6
1,2	2	12,9±2,0	36,8±5,9	52,3±3,7	80,6±6,3	9,5±0,4
7,5	3	30,9±1,9	48,2±8,1	60,5±3,1	88,3±5,1	21,0±3,9
7,5	4	49,6±2,6	57,3±4,2	67,1±4,9	92,3±5,9	31,9±9,0
7,5	5	59,6±2,8	64,3±2,8	74,3±5,9	96,5±4,3	35,3±6,7
7,5	6	63,9±1,0	73,9±2,1	80,1±5,2	97,4±3,6	45,5±9,9
7,5	7	69,9±1,0	77,5±2,3	84,8±6,1	98,5±3,4	49,5±9,7
7,5	8	75,9±2,2	80,9±2,3	87,7±5,1	99,3±2,8	52,5±8,9
7,5	9	78,3±1,9	87,4±6,6	91,3±5,2	————	55,3±9,0
7,5	10	80,3±1,6	89,1±6,4	93,2±5,2	100,3±1,4	59,4±9,2
7,5	11	82,9±2,6	91,6±5,8	96,0±2,5	————	61,8±8,8
7,5	12	85,8±2,9	93,4±5,3	99,5±0,9	100,8±1,1	66,1±9,1
ASC (t=12h)		651,5±21,2	773,8±52,5	868,3±51,8	1066,0±43,4	461,1±80,6
E% (t=12h)		54,3±1,8	64,5±4,4	72,4±4,3	88,8±3,6	38,4±6,7

(±) - Intervalo de confiança - 95%

t - 0,05

N - 5

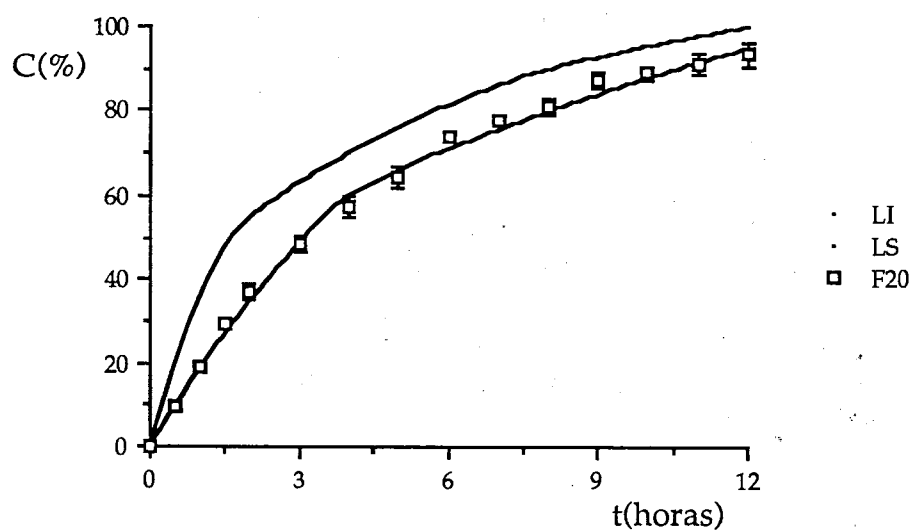


Figura 30 - Liodisponibilidade do oxazepam.
 Influência da croscarmelose de sódio. F20 - 4%.
 LI - limite teórico inferior; LS - limite teórico superior.

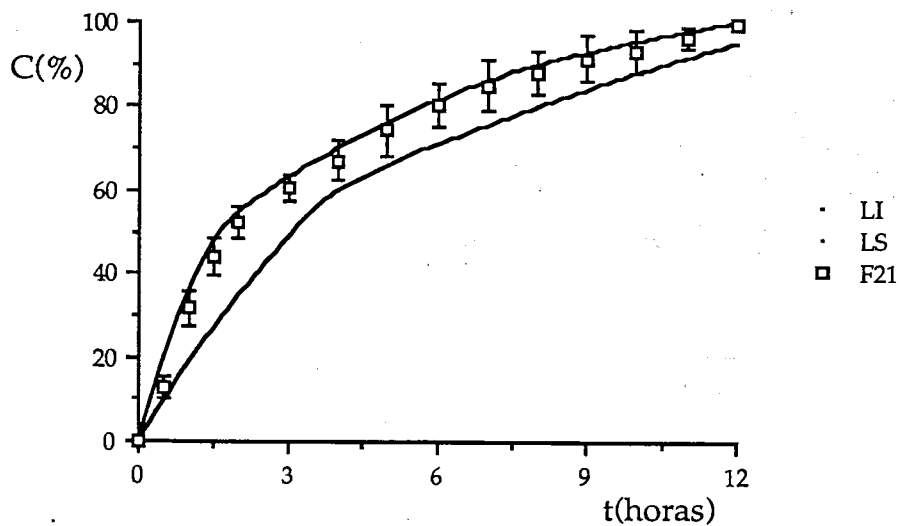


Figura 31 - Liodisponibilidade do oxazepam.
 Influência da croscarmelose de sódio. F21 - 5%.
 LI - limite teórico inferior; LS - limite teórico superior.

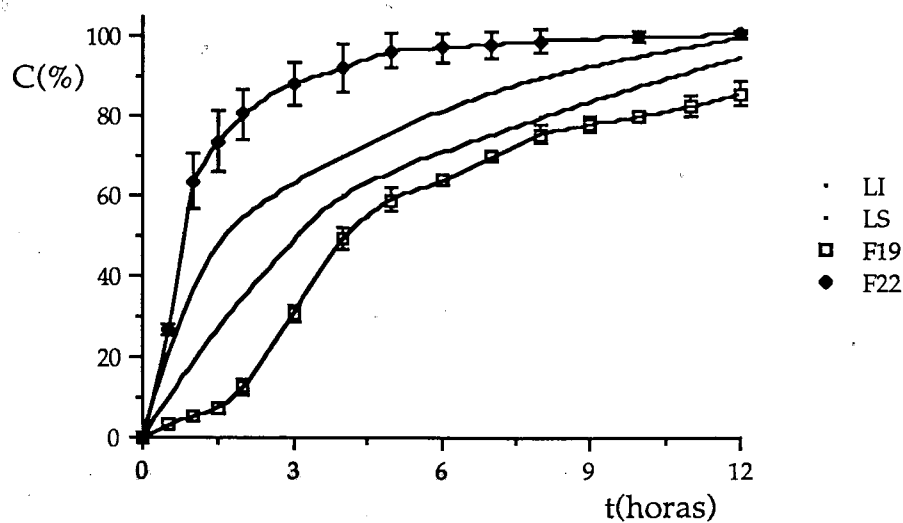


Figura 32 - Liodisponibilidade do oxazepam.

Influência da croscarmelose de sódio. F19 - 2,5%; F20 -12,5%.

LI - limite teórico inferior; LS - limite teórico superior.

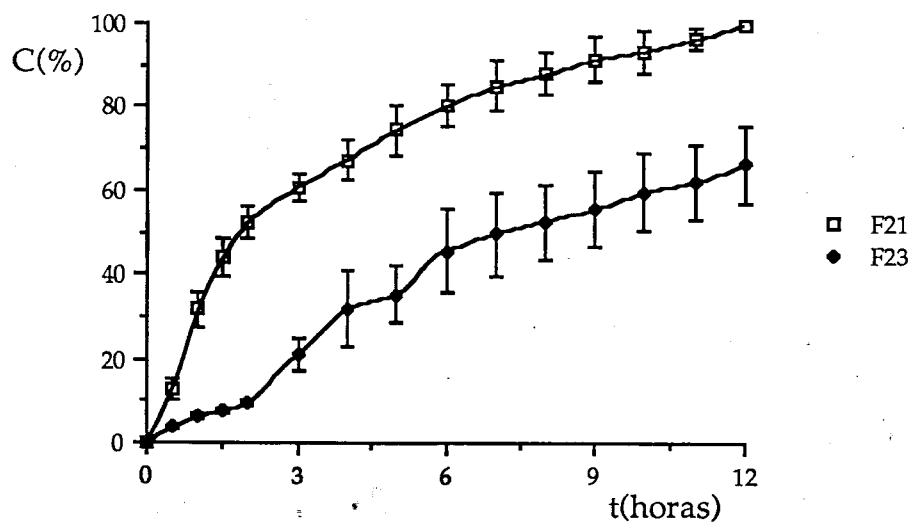


Figura 33 - Liodisponibilidade do oxazepam.

Influência da constituição dos grânulos em matrizes hidrófilas contendo 5% de croscarmelose de sódio extragranular.

F21 - (60% de fosfato de cálcio e 40% de carbopol 934) e

F23 - (40% de fosfato de cálcio e 60% de carbopol 934).

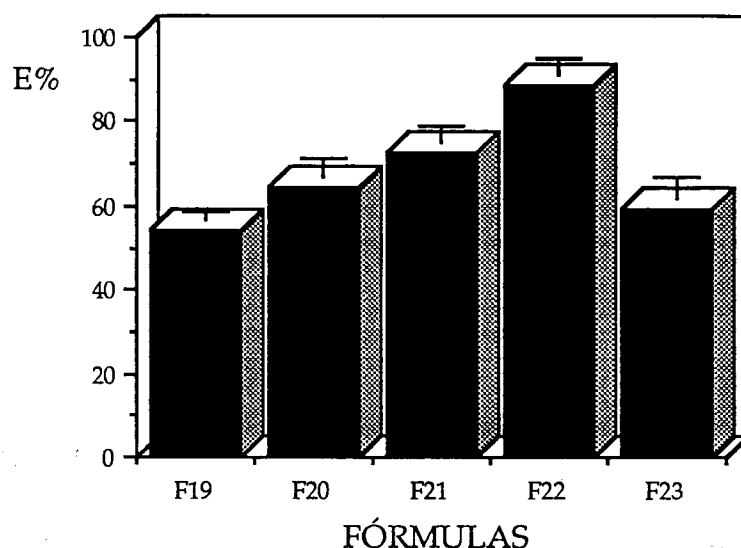


Figura 34 - Eficácia de dissolução do oxazepam.

2.5.4.5.- Discussão dos resultados

Quando se iniciou este estudo, o objectivo principal foi produzir comprimidos de acção prolongada contendo oxazepam usando como agente gelificante o Carbopol 934. Ao mesmo tempo, pretendia-se que a biodisponibilidade do fármaco fosse traduzida em percentagens de dissolução ao longo do tempo de acordo com os limites teóricos indicados no Quadro XIX.

Pela análise dos resultados obtidos no ensaio de dissolução utilizando o método A, pode concluir-se que as fórmulas F20 e F21 apresentam uma biodisponibilidade de oxazepam dentro dos limites teóricos pretendidos. Para estas fórmulas, com excepção do valor encontrado para as 12 horas de ensaio da fórmula F20, todos os valores se encontram dentro das percentagens pretendidas, incluindo os obtidos no suco gástrico artificial. Contudo, e tendo em atenção a quantidade de princípio activo presente na dose de acção imediata, a fórmula F21 apresenta melhores resultados, ou seja, melhor biodisponibilidade.

Como pode observar-se nas Figs. 30 e 31, desde que a concentração de croscarmelose de sódio extragranular presente no comprimido esteja compreendida entre 4 e 5%, a cedência da dose inicial de oxazepam ocorre no período de tempo desejado.

QUADRO XIX

LIMITES TEÓRICOS E RESULTADOS DO ENSAIO DE DISSOLUÇÃO

TEMPO (horas)	Limites teóricos	Oxazepam dissolvido (%)				
		F19	F20	F21	F22	F23
0-2	35-55	12,9±2,0	36,8±5,9	52,3±3,7	80,6±6,3	9,5±0,4
4	60-70	49,6±2,6	57,3±4,2	67,1±4,9	92,3±5,9	31,9±9,0
8	80-90	75,9±2,2	80,9±2,3	87,7±5,1	99,3±2,8	52,5±8,9
12	95-100	85,8±2,9	93,4±5,3	99,5±0,9	100,8±1,1	66,1±9,1
ASC	760-880	651,5±21,2	773,8±52,5	868,3±51,8	1066,0±43,4	461,1±80,6
E%	62,5-73,3	54,3±1,8	64,5±4,4	72,4±4,4	88,8±3,6	38,4±6,7

Comparando os resultados obtidos no ensaio de dissolução para as fórmulas F21 e F23 pode afirmar-se que a constituição dos grânulos é importante, mesmo na cedência do fármaco que constitui a dose inicial. De facto, a concentração de croscarmelose de sódio a 5% na fase extragranular só é eficaz se os grânulos apresentarem, na sua constituição, uma percentagem relativa de 60% de fosfato de cálcio e 40% de Carbopol 934. Se a concentração de Carbopol 934 for superior a 40% (como acontece na F23) a cedência de oxazepam no suco gástrico artificial é muito menor, verificando-se neste caso a anulação do efeito positivo da croscarmelose de sódio (Fig. 33).

Na Fig. 32 estão representadas as curvas de dissolução do oxazepam em função do tempo a partir das fórmulas F19 e F22, cujas concentrações de croscarmelose de sódio são de 2,5% e 12,5%, respectivamente. Apresentam ambos resultados não satisfatórios, ocorrendo um desvio negativo no primeiro caso e um desvio positivo no segundo em relação aos limites teóricos de dissolução.

Da análise do Quadro XIX e da Fig. 34 conclui-se que, das fórmulas que constituem este grupo, a fórmula F21 tem a melhor eficácia de dissolução, já que a fórmula F22, apesar de apresentar um valor superior, ultrapassa os limites teóricos estabelecidos.

2.5.5.- ESTUDO DA FÓRMULA F₂₁

2.5.5.1.- Métodos de verificação *in vitro*

Para finalizar o estudo dos comprimidos de acção prolongada contendo oxazepam em que o carbopol 934 é o agente gelificante utilizado na constituição da matriz hidrófila, restava testar a forma farmacêutica noutras condições *in vitro*. O objectivo foi verificar se os resultados obtidos dependiam das condições do ensaio ou se dependiam única e exclusivamente da forma farmacêutica(227-232).

Apesar de as fórmulas F₂₀ e F₂₁ apresentarem liodisponibilidades concordantes com os limites teóricos previamente estipulados, a escolha recaiu na fórmula F₂₁, pelas razões apontadas anteriormente.

Assim, a liodisponibilidade da fórmula F₂₁ foi determinada usando no ensaio de dissolução os métodos A (descrito em 2.4.1.7.1.), B (descrito em 2.4.1.7.2.) e C (descrito em 2.4.1.7.3.).

Em qualquer dos métodos de dissolução ensaiados e para a mesma amostra, o teor de oxazepam dissolvido em função do tempo foi determinado utilizando dois métodos de análise, a espectrofotometria no UV e a cromatografia líquida de alta pressão. A utilização deste último método analítico teve como finalidade verificar se havia ou não hidrólise do oxazepam no suco gástrico artificial. A espectrofotometria no UV não permite separar e dosear em simultâneo o princípio activo e os seus produtos de degradação.

2.5.5.1.1.- Ensaio de dissolução

Na realização do ensaio de dissolução usaram-se o método A, B e C. O teor de oxazepam dissolvido em função do tempo a partir da fórmula F₂₁ foi determinado por espectrofotometria no UV e por cromatografia líquida de alta pressão (Fig. 35).

2.5.5.1.2.- Resultados

Os resultados do ensaio de dissolução, expressos em percentagem, em área sob a curva ao fim de 12 horas (ASC) e em eficácia de dissolução após 12 horas (E%) estão indicados no Quadro XX e nas Figs. 36, 37, 38,39 e 40.

QUADRO XX

ENSAIO DE DISSOLUÇÃO - FÓRMULA F₂₁

Tempo (horas)	Oxazepam dissolvido (%)								
	Método A			Método B			Método C		
	pH	UV	HPLC	pH	UV	HPLC	pH	UV	HPLC
0,5	1,2	13,0±2,6	14,6±2,0		—	—		—	—
1	1,2	31,7±4,0	33,1±3,1	1,2	34,6±4,2	34,3±3,1	1,2	32,6±2,9	31,6±2,6
1,5	1,2	44,0±4,2	46,8±3,2		—	—		—	—
2	1,2	52,3±3,7	53,0±3,3	1,2	53,1±5,0	52,6±3,8	2,5	50,4±3,3	31,6±2,6
3	7,5	60,5±3,1	62,4±3,3	4,5	63,4±5,1	64,3±4,2	2,5	58,4±4,1	59,4±3,9
4	7,5	67,1±4,9	66,9±3,8	4,5	69,4±6,0	70,2±3,0	4,5	63,6±4,0	64,5±5,2
5	7,5	74,3±5,9	73,6±4,2	7,5	76,2±6,9	77,0±5,3	4,5	70,2±3,8	70,7±4,8
6	7,5	80,1±5,2	78,4±4,0	7,5	83,2±4,9	83,1±3,3	7,5	75,7±3,2	75,9±3,6
7	7,5	84,8±6,1	81,0±4,3	7,5	87,6±3,8	87,2±3,0	7,5	79,0±3,6	79,8±2,6
8	7,5	87,7±5,1	86,7±3,6	7,5	91,3±4,0	90,8±2,0	7,5	83,5±2,9	84,0±3,4
9	7,5	91,3±5,2	90,0±3,4	7,5	94,0±2,8	93,6±2,8	7,5	87,6±2,6	87,6±2,1
10	7,5	93,2±5,2	93,2±3,0	7,5	96,2±2,4	96,1±2,4	7,5	92,7±1,4	92,8±2,1
11	7,5	96,0±2,5	95,2±2,0	7,5	98,9±1,0	98,0±1,3	7,5	95,8±1,8	95,5±1,6
12	7,5	99,5±0,9	99,3±0,6	7,5	99,3±0,9	99,8±0,7	7,5	98,8±0,9	98,5±1,3
ASC (t=12h)		868,3±51,8	864,7±38,5		897,7±46,6	897,1±34,6		839,0±34,1	842,2±36,0
E% (t=12h)		72,4±4,3	72,1±3,2		74,8±3,9	74,8±2,9		69,9±2,8	70,2±3,0

(±) - Intervalo de confiança - 95%

t - 0,05

N - 5

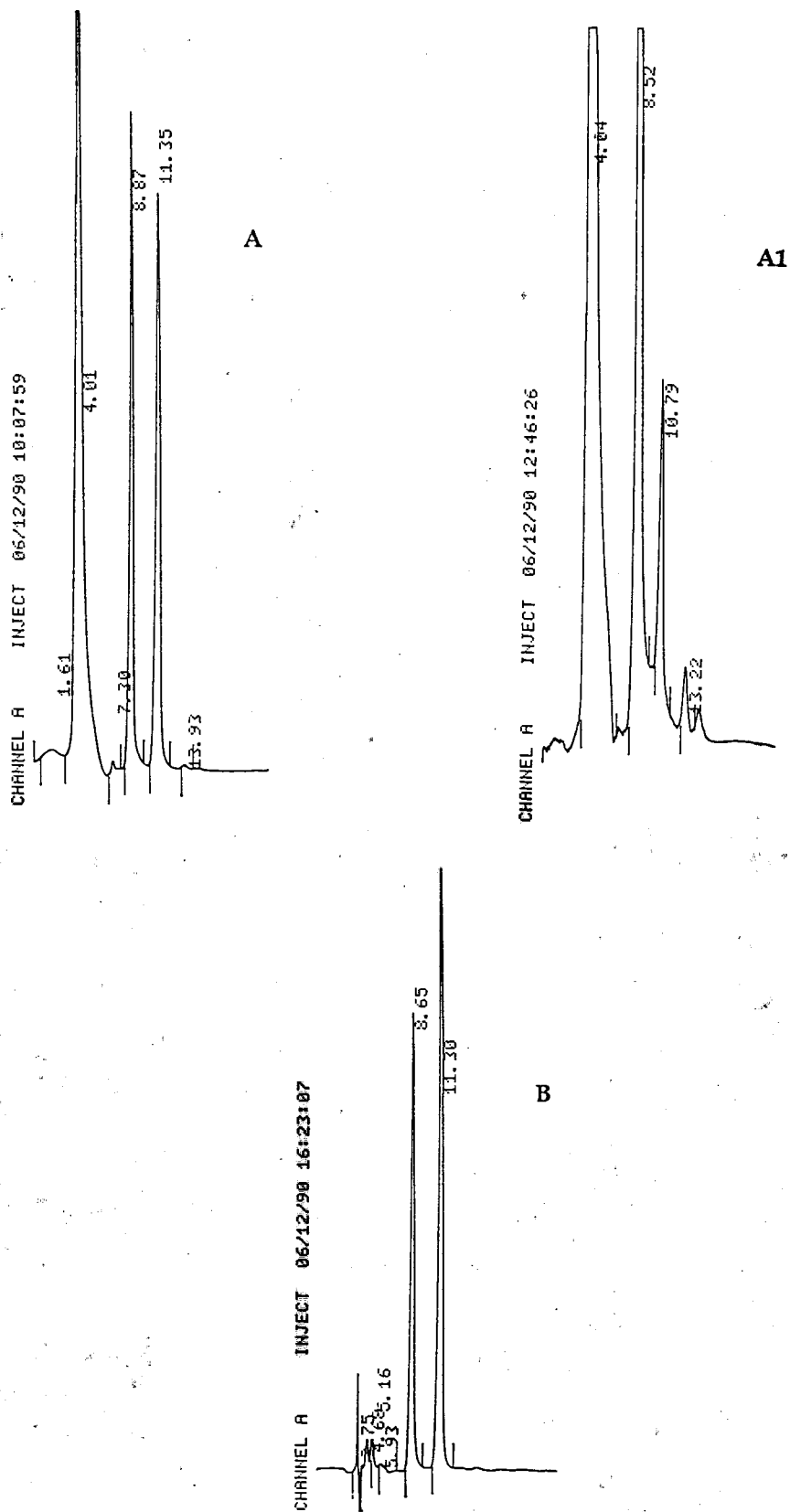


Figura 35 - Cromatogramas obtidos durante a realização do ensaio de dissolução.

A - Líquido de dissolução a pH 1,2, atenuação 16;

A1 - Líquido de dissolução a pH 1,2, atenuação 2;

B - Líquido de dissolução a pH 7,5±0,1, atenuação 16.

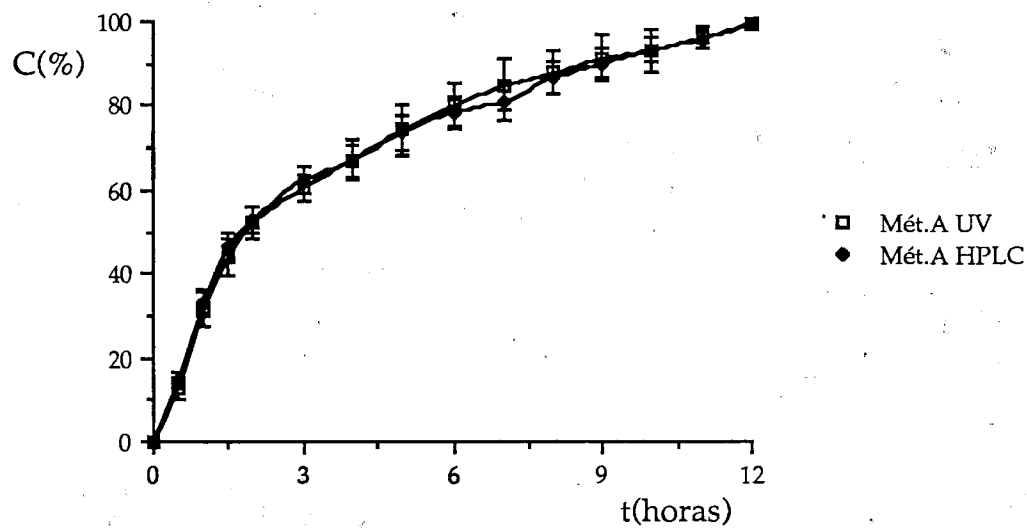


Figura 36 - Liodisponibilidade do oxazepam.

Influência do método analítico usando o método de dissolução A.

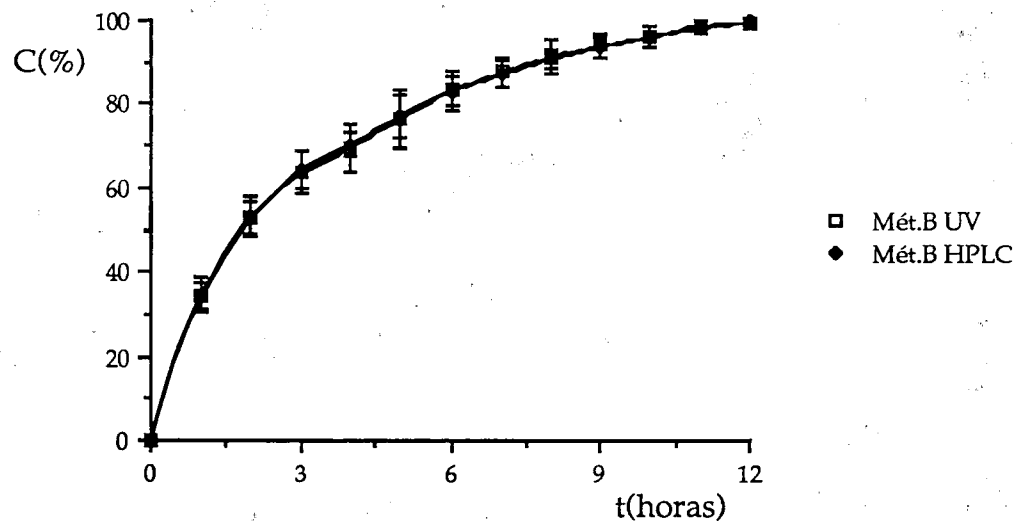


Figura 37 - Liodisponibilidade do oxazepam.

Influência do método analítico usando o método de dissolução B.

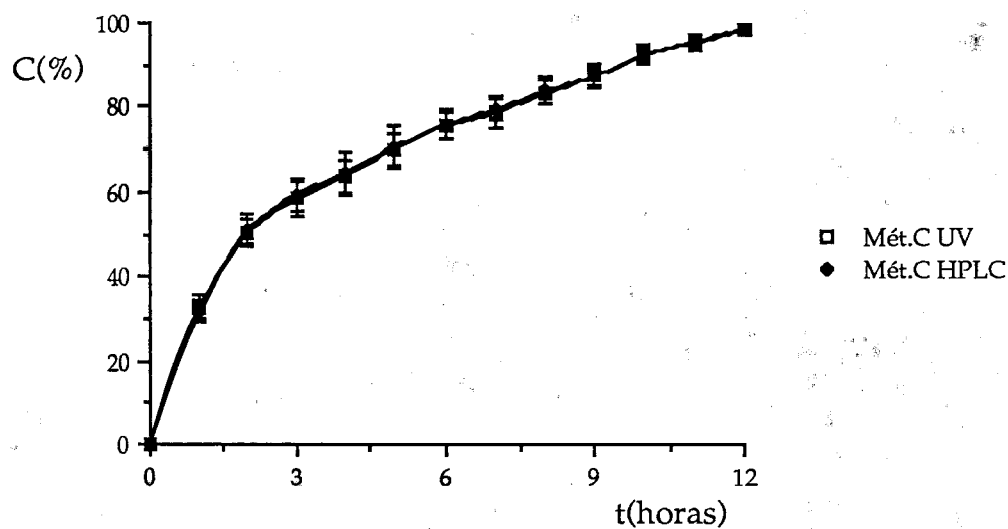


Figura 38 - Liodisponibilidade do oxazepam.

Influência do método analítico usando o método de dissolução C.

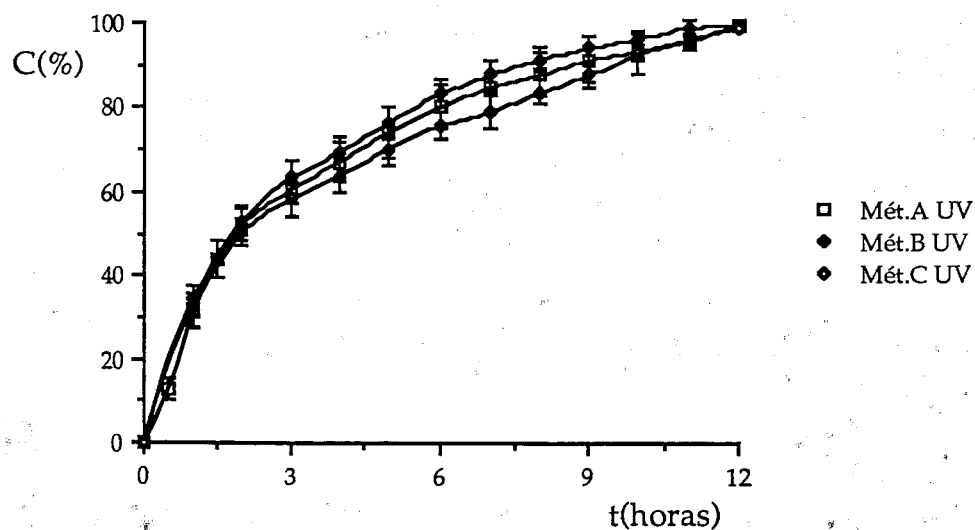


Figura 39 - Liodisponibilidade do oxazepam.

Influência do método de dissolução usando como método analítico a espectrofotometria no UV.

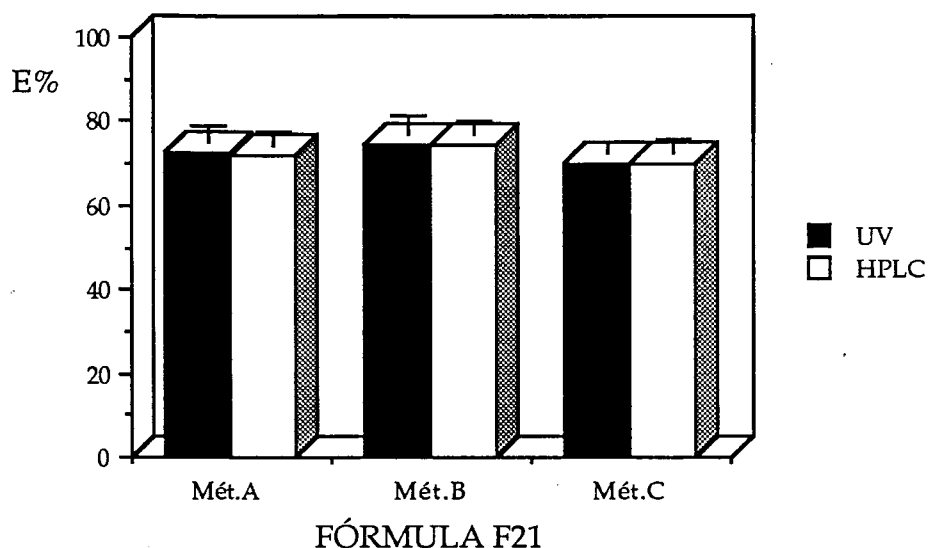


Figura 40 - Eficácia de dissolução do oxazepam na fórmula F21.
Influência dos métodos de análise e de dissolução.

2.5.5.1.3.- Discussão dos resultados

A análise dos resultados do ensaio de dissolução respeitantes à fórmula F21 permite concluir que a quantidade de oxazepam dissolvido em função do tempo não foi influenciada significativamente pelo método de dissolução usado, como pode observar-se na Fig. 39.

A espectrofotometria no UV é um método analítico que permite determinar com precisão o teor de oxazepam em solução durante o ensaio de dissolução, como é comprovado pelos resultados inscritos no Quadro XX e pelas Figs. 36, 37 e 38.

Como pode observar-se nos cromatogramas da Fig. 35, não ocorreu hidrólise do oxazepam nos líquidos de dissolução utilizados durante a realização do ensaio de dissolução.

Da análise do Quadro XX e da Fig. 40 conclui-se que o método de dissolução e o método analítico utilizados não influenciam significativamente a eficácia de dissolução do oxazepam na fórmula F21.

2.5.5.2.- Métodos de verificação *in vivo*

Além das condições gerais do organismo (idade, sexo, equilíbrio hídrico, etc.), e em particular do estado anatomofisiológico do aparelho digestivo, a absorção dos fármacos no tracto gastrintestinal é influenciada pelas características físico-químicas do fármaco e pelo tipo de forma farmacêutica administrada. O fármaco, incorporado numa forma farmacêutica, é por ela transportado e deve ser libertado, antes de se verificar a sua absorção no organismo. Assim, a biodisponibilidade depende da forma farmacêutica que veicula o princípio activo e da natureza dos excipientes que a compõem.

Neste estudo foi apreciada a absorção do oxazepam contido nos comprimidos de acção prolongada produzidos de acordo com o estipulado para a fórmula F₂₁. Esta fórmula foi a escolhida para a realização dos ensaios *in vivo* pois, de acordo com os critérios previamente estabelecidos para o ensaio *in vitro*, foi a que apresentou resultados satisfatórios.

A absorção do fármaco foi avaliada a partir da obtenção de um "pico" e da sua manutenção durante o tempo de acção pretendido, expresso em concentrações plasmáticas ($\mu\text{g/l}$), segundo determinações feitas a intervalos de tempo convenientes, após a administração do medicamento.

Inicialmente foi estudada a absorção do oxazepam em coelhos. Este ensaio permitiu traçar o perfil farmacocinético do princípio activo e verificar se as concentrações plasmáticas se mantinham constantes durante o tempo de acção pretendido.

Em seguida, os ensaios foram realizados em voluntários saudáveis, homens e mulheres, com idades compreendidas entre os 25 e 40 anos.

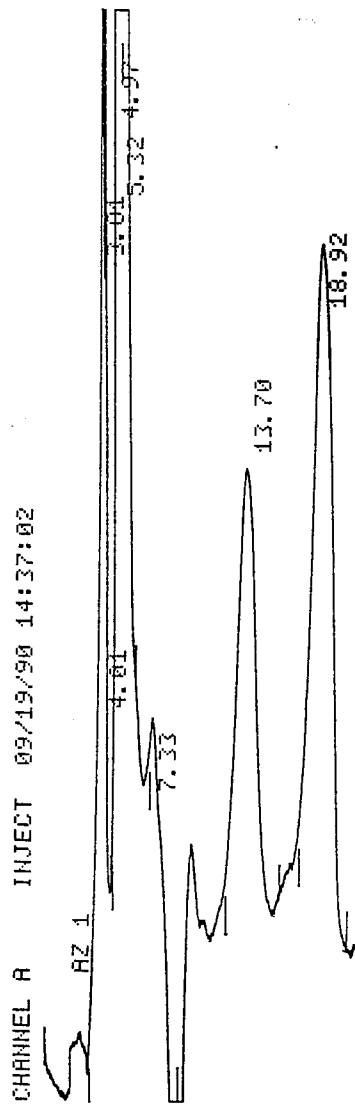
As amostras de sangue foram tratadas conforme o descrito em 2.4.2.3.1.

O doseamento do oxazepam no plasma foi efectuado por cromatografia líquida de alta pressão nas condições indicadas em 2.4.2.4.1.

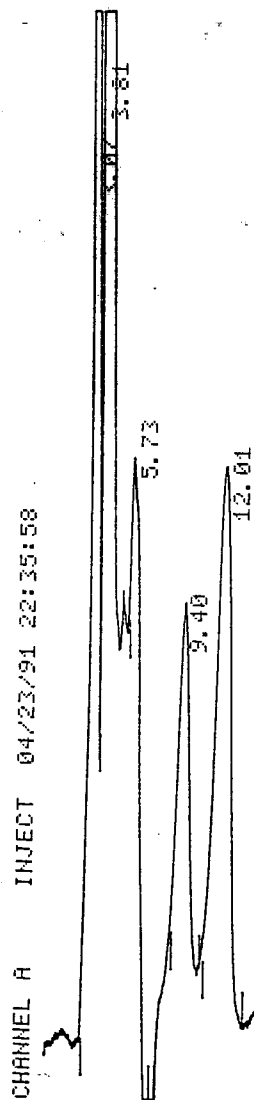
Os cromatogramas obtidos são apresentados na Fig. 41.

2.5.5.2.1.- Resultados

Os resultados do ensaio *in vivo* realizado em coelhos, expressos em concentração plasmática ($\mu\text{g/l}$) e área sob a curva ao fim de 12 horas (ASC) ($\text{h}\cdot\mu\text{g/l}$) são apresentados no Quadro XXI e na Fig. 42.



A



B

Figura 41 - Cromatogramas obtidos nos ensaios *in vivo*.

A - em coelhos; B - em humanos.

QUADRO XXI

ENSAIO *IN VIVO* REALIZADO EM COELHOS

Tempo (horas)	Concentração plasmática ($\mu\text{g/l}$)
1	264,8 \pm 57,0
2	406,9 \pm 77,7
4	353,7 \pm 55,6
8	570,5 \pm 91,9
12	548,4 \pm 86,3
24	62,3 \pm 25,4
ASC (t=12h)	5315,1 \pm 880,6

(\pm) - Intervalo de confiança - 95%

t - 0,05

N - 4

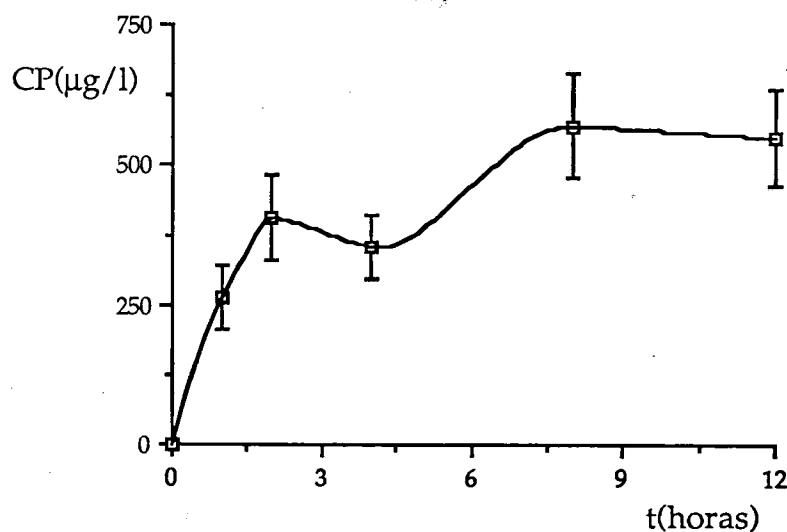


Figura 42 - Concentrações plasmáticas em função do tempo, avaliadas em coelhos após administração de comprimidos da fórmula F21.

Os resultados do ensaio *in vivo* realizado no homem, expressos em concentração plasmática ($\mu\text{g/l}$) e em área sob a curva após 12 horas (ASC) ($\text{h}\cdot\mu\text{g/l}$), são apresentados no Quadro XXII e na Fig. 43.

QUADRO XXII

ENSAIOS *IN VIVO* REALIZADOS NO HOMEM

Indivíduo				Concentração sanguínea ($\mu\text{g/l}$)						ASC ($\text{h}\cdot\mu\text{g/l}$)	C _{máx} ($\mu\text{g/l}$)	t _{máx} (h)
n ^o	sexo	peso	idade	1h	2h	4h	8h	12h	24h			
1	M	75	27	92,8	173,2	—	196,7	210,2	31,6	2102,9	210,2	12
2	M	68	31	109,1	—	266,3	—	251,9	44,4	2525,5	266,3	4
3	F	55	25	151,2	—	335,5	—	316,1	76,9	3412,1	335,5	4
4	M	68	31	—	221,1	240,2	310,3	290,4	—	2984,8	310,3	8
5	F	45	40	—	230,6	300,5	250,8	273,4	83,6	2912,7	300,5	4
6	F	55	25	136,1	242,2	—	306,1	299,4	—	3100,1	306,1	8
\bar{X}				122,3	216,8	285,6	266,0	275,4	59,0	2883,4	288,2	6,7
(\pm)				41,8	48,2	65,9	85,2	44,1	39,7	758,2	50,8	3,8

(\pm) - Intervalo de confiança - 95%

t - 0,05

N - 3

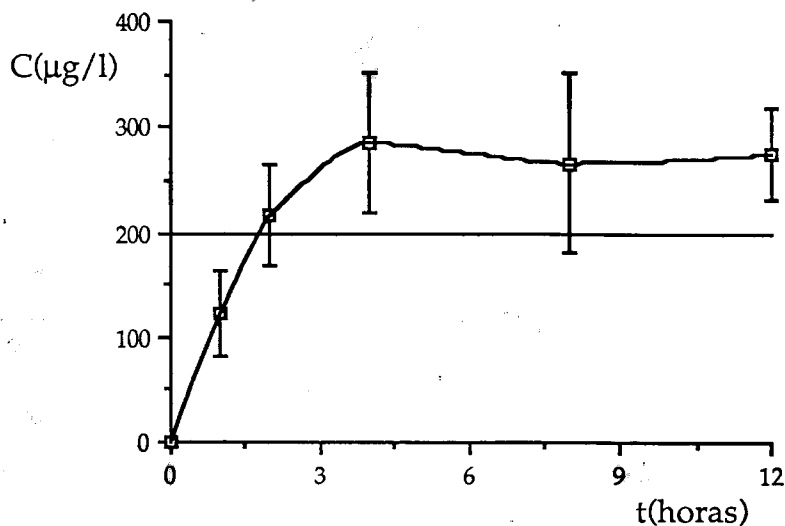


Figura 43 - Concentrações sanguíneas em função do tempo, avaliadas em humanos após a administração de comprimidos da F21. Concentração terapêutica mínima - 200 µg/l.

2.5.5.2.2.- Discussão dos resultados

Embora seja indispensável saber se o fármaco é posto à disposição do organismo num intervalo de tempo previamente estabelecido, nas formas farmacêuticas de acção prolongada importa, acima de tudo, que essa cedência se realize de modo a não haver desvios de limites de concentração bem definidos, única circunstância que garantirá o efeito terapêutico desejado.

Por isso, é necessário demonstrar que uma preparação de acção prolongada mantém concentrações terapêuticas de fármaco durante um período de tempo maior do que uma forma farmacêutica convencional.

Assim, para uma correcta interpretação dos resultados obtidos na realização de um ensaio *in vivo* com comprimidos de acção prolongada, torna-se necessário fazer uma comparação com os resultados obtidos para o mesmo fármaco nas seguintes administrações: uma dose normal de princípio activo; uma dose repetida durante o tempo correspondente à duração da acção da forma a testar e uma dose de princípio activo igual à dose total que está incluída nos comprimidos de acção prolongada, se a margem terapêutica o permitir.

Nestas circunstâncias e devido ao facto de não terem sido realizados os ensaios acima referidos, recorreu-se a trabalhos efectuados por outros investigadores.

Os resultados obtidos após administração por via oral de doses simples de oxazepam por Pilbrant *et al.*(233), Wretlind *et al* (234) e Alván *et al.*(235,236) permitem uma comparação com os resultados encontrados para a fórmula F₂₁, mesmo considerando que em termos de dose as administrações não sejam exactamente as indicadas anteriormente. Nestes trabalhos as formas farmacêuticas sólidas contendo 15 mg de oxazepam atingiram as concentrações terapêuticas entre a 1ª e a 2ª hora após a administração, variando entre 169±79 e 315±69 µg/l. Estes valores representam também os máximos de absorção conseguidos. À 6ª hora após a administração, as concentrações sanguíneas encontradas variam entre 152±53 e 178±63 µg/l. Estes autores também estudaram a absorção de preparações farmacêuticas contendo 25 mg de oxazepam. Neste estudo, e por interpolação gráfica, verifica-se que o máximo de absorção (entre 350 a 400 µg/l) ocorre à 2ª hora após a administração, enquanto a partir da 7ª hora de ensaio as concentrações sanguíneas são menores do que 200 µg/l.

Assim, da análise dos resultados incritos no Quadro XXII, e que permitiram a construção do gráfico representado na Fig. 43, pode afirmar-se que a fórmula F₂₁ apresenta características de uma forma farmacêutica de acção prolongada. Considerando a concentração mínima terapêutica de 200 µg/l (237), a fórmula F₂₁ proporciona concentrações terapêuticas durante o período de tempo pretendido, sendo este muito maior do que o obtido para as preparações convencionais, quer estas contenham 15 ou 25 mg de oxazepam, como comprovam os resultados dos trabalhos acima referidos.

Após a administração de um comprimido contendo oxazepam e preparado de acordo com a fórmula F₂₁, o aparecimento do fármaco em concentrações terapêuticas ocorre na mesma grandeza (entre 169±79 e 315±69 µg/l) e intervalo de tempo (entre a 1ª e a 2ª hora) das formas farmacêuticas convencionais.

Por outras palavras, o ensaio de absorção *in vivo* confirma os resultados obtidos no ensaio *in vitro* para a fórmula F₂₁.

2.5.6.- COMPRIMIDOS CONSTITUÍDOS POR GRÂNULOS REVESTIDOS COM ACETOFTALATO DE CELULOSE

Com excepção das fórmulas do último grupo, no qual se prepararam comprimidos de acção prolongada com cedências de princípio activo em função do tempo de acordo com o estipulado teoricamente, nos restantes grupos esta finalidade não foi concretizada.

Do ponto de vista tecnológico, esta situação poderia ser contornada por dois caminhos diferentes, ou seja, recorrendo a um aumento da porosidade da matriz ou ao revestimento dos grânulos.

A primeira hipótese seria conseguida com um aumento de peso dos adjuvantes usados na constituição da dose inicial e respectiva granulação. O granulado obtido seria então misturado com o granulado que constitui a dose de manutenção antes de se proceder à compressão.

O revestimento dos grânulos da dose de manutenção, evitando o contacto directo entre os seus constituintes, nomeadamente o Carbopol 934 e os pós que constituem a dose inicial, foi a eleita para finalizar este trabalho.

Entre os processos para a obtenção de formas de acção prolongada figura o método de revestimento de grânulos por camadas de materiais dotados de diferente resistência aos sucos digestivos, quer utilizando substâncias solúveis a pH crescente, quer revestindo com películas do mesmo produto, depositadas em camadas de espessura variada, mas bem determinada(192,238-242).

Como já foi referido, o recurso a esta técnica de fabrico de comprimidos de acção prolongada teve objectivos próprios e não os propostos pela literatura da especialidade. De facto, usou-se um revestimento gastrorresistente cuja espessura, além de ser idêntica, era a necessária para evitar incompatibilidades físico-químicas entre as substâncias que constituem a dose inicial e as que constituem a dose de manutenção. Este revestimento deve permitir a passagem dos grânulos pelo suco gástrico sem que se verifique cedência do princípio activo neles contido. Contudo, após contacto com o suco entérico artificial, o revestimento deve desaparecer rapidamente da superfície dos grânulos, visto que a cedência do fármaco contido na dose de manutenção deverá ser função da constituição dos grânulos e não da espessura do revestimento.

O acetofalato de celulose p.a. (Merck) é o revestimento gastrorresistente mais usado, cuja dissolução no intestino é efectuada em simultâneo por hidrólise enzimática e em

função do pH, que deve ser igual ou superior a 6(243). A fórmula utilizada na realização do envolvimento dos grânulos foi a seguinte:

Acetofalato de celulose	6 g
Ftalato de etilo	2 g
Álcool isopropílico	46 g
Acetona	46 g

A presença do ftalato de etilo é devida à sua função de plastificante, impedindo o aparecimento de fendas no revestimento dos grânulos.

Este grupo de comprimidos é constituído pelas fórmulas apresentadas no Quadro XXIII.

QUADRO XXIII

FÓRMULAS CONTENDO GRÂNULOS REVESTIDOS COM ACETOFTALATO DE CELULOSE

	Quantidades unitárias (mg)	
	F24 e F25	F26
MISTURA I		
Oxazepam	15,0	15,0
Fosfato de cálcio	20,0	20,0
Talco	2,0	2,0
Estearato de magésio	1,0	1,0
MISTURA II		
Oxazepam	15,6	15,6
Carbopol 934	58,6	146,4
Fosfato de cálcio	87,8	—

2.5.6.1.- Aparelhagem e métodos

Para fazer a drageificação utilizou-se uma bacia de vidro girando em volta de um eixo inclinado e possuindo uma abertura centrada com esse eixo. A velocidade de rotação foi de 30 ± 3 rotações por minuto.

A solução de revestimento foi acondicionada num frasco munido de atomizador.

2.5.6.1.1.- Técnica de preparação

Pese os componentes mencionados na fórmula. Misture os componentes da mistura II.

a) Granulação a seco: Comprima. Granule os comprimidos e calibre o granulado obtido por tamis de abertura de malha de $750 \mu\text{m}$.

b) Granulação a húmido: Adicione álcool 95° e granule por tamis de abertura de malha de $750 \mu\text{m}$. Seque o granulado em estufa a 40°C durante 3 horas. Calibre o granulado obtido por tamis de abertura de malha de $750 \mu\text{m}$.

Transfira o granulado para bacia de drageificação. Coloque a bacia a rodar a 30 rotações por minuto durante 1 hora. Retire o granulado. Separe o pó formado por tamis de abertura de malha de $300 \mu\text{m}$. Pese e transfira o granulado para a bacia de drageificação.

Atomize aproximadamente 0,1 ml de líquido de revestimento sobre o granulado à temperatura ambiente. Faça entre 40 a 50 aplicações de 5 em 5 minutos, de modo a usar 5 g de líquido de revestimento por 10 g de granulado. Calibre o granulado por tamis de abertura de malha de $1200 \mu\text{m}$.

Pese e misture os componentes da mistura I. Junte a esta mistura o granulado revestido. Misture. Comprima de modo a obter comprimidos de 200 mg de peso.

2.5.6.1.2.- Ensaio de verificação da eficácia do revestimento

O teor total de oxazepam contido nos grânulos foi determinado utilizando a técnica descrita em 2.4.1.5.

Depois de efectuado o revestimento dos grânulos, realizou-se um ensaio para determinar a quantidade de oxazepam dissolvido no suco gástrico artificial usando a seguinte

técnica:

Pese rigorosamente 16,2 mg de grânulos revestidos (correspondentes a 1/10 do seu peso teórico nos comprimidos) e introduza em matrás de 250 ml. Junte 90 ml de líquido de dissolução A. Deixe em contacto durante duas horas, à temperatura de $37^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$, com uma velocidade de agitação de 100 r.p.m.. Filtre. Determine a absorvência no comprimento de onda adequado.

A eficácia do revestimento é dada pela seguinte equação:

$$\text{ER}\% = \frac{\text{Tg} - \text{Tr}}{\text{Tg}} \times 100$$

em que ER% é a eficácia do revestimento, Tg é o teor total do oxazepam contido nos grânulos e Tr é o teor de oxazepam encontrado no suco gástrico artificial, expressos em percentagem.

Como é obvio, a eficácia do revestimento ideal deve ter um valor de 100%. No Quadro XXIV estão indicados os resultados da eficácia de revestimento das fórmulas estudadas.

QUADRO XXIV

EFICÁCIA DO REVESTIMENTO

Fórmulas	Eficácia do revestimento (%)
F24	96,4 \pm 2,9
F25	98,3 \pm 1,3
F26	95,6 \pm 2,3

(\pm) - Intervalo de confiança - 95%

t - 0,05

N - 5

2.5.6.2.- Influência do método de granulação

A influência do método de granulação na dissolução do oxazepam contido nos grânulos revestidos foi estudada nas fórmulas F24 e F25. Como pode observar-se no Quadro XXII, as fórmulas F24 e F25 apresentam na sua constituição os mesmos componentes e as mesmas quantidades por unidade, variando apenas o método de preparação dos grânulos. Na fórmula F24 os grânulos obtiveram-se usando a granulação a seco, enquanto na fórmula F25 os grânulos foram produzidos utilizando a granulação a húmido.

2.5.6.3.- Influência do fosfato de cálcio

As fórmulas F24 e F26 foram utilizadas para estudar a influência do fosfato de cálcio presente na composição dos grânulos na quantidade de oxazepam dissolvida em função do tempo a partir de uma matriz hidrófila. As percentagens relativas dos constituintes dos grânulos, com excepção do princípio activo, são 60% de fosfato de cálcio e 40% de carbopol 934 na F24 e 100% de carbopol 934 na F26.

2.5.6.4.- Ensaio de dissolução

Na realização do ensaio de dissolução usou-se o método A, descrito em 2.4.1.7.1.

O teor de oxazepam dissolvido em função do tempo a partir das fórmulas indicadas no Quadro XXIII foi determinado por espectrofotometria no UV.

2.5.6.5.- Resultados

Os resultados do ensaio de dissolução, expressos em percentagem, em área sob a curva ao fim de 12 horas(ASC) e em eficácia de dissolução após 12 horas (E%) são apresentados no Quadro XXV e nas Figs 44, 45, 46 e 47.

QUADRO XXV

ENSAIO DE DISSOLUÇÃO - MÉTODO A

pH	Tempo (horas)	Oxazepam dissolvido (%)		
		F ₂₄	F ₂₅	F ₂₆
1,2	0,5	22,5±1,7	18,4±2,4	10,5±1,4
1,2	1	30,3±1,9	28,3±3,3	26,3±2,6
1,2	1,5	36,9±2,3	34,0±3,3	36,7±3,9
1,2	2	47,5±2,8	48,1±3,9	51,0±5,5
7,5	3	59,4±3,4	62,5±4,3	54,8±5,2
7,5	4	67,4±4,1	69,2±4,2	58,1±5,7
7,5	5	72,3±2,9	72,5±5,5	62,3±3,3
7,5	6	76,2±3,8	74,8±5,0	64,2±3,9
7,5	7	81,4±4,4	79,6±6,1	65,5±4,5
7,5	8	86,0±3,3	82,4±6,5	69,6±4,3
7,5	9	90,2±2,9	84,0±6,6	70,6±4,2
7,5	10	93,1±1,0	87,8±6,3	74,0±2,9
7,5	11	96,4±0,9	92,4±5,5	76,3±3,2
7,5	12	98,7±1,0	95,6±4,9	79,2±2,7
ASC (t=12h)		852,2±32,3	829,5±59,9	710,0±46,6
E% (t=12h)		71,0±2,7	69,1±5,0	59,2±3,9

(±) - Intervalo de confiança - 95%

t - 0,05

N - 5

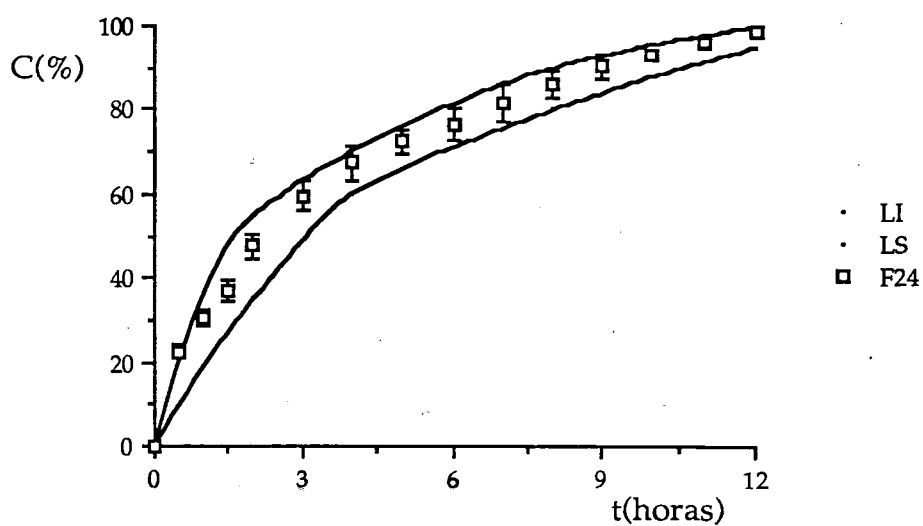


Figura 44 - Liodisponibilidade do oxazepam.

F24 - granulação a seco.

LI - limite teórico inferior; LS - limite teórico superior.

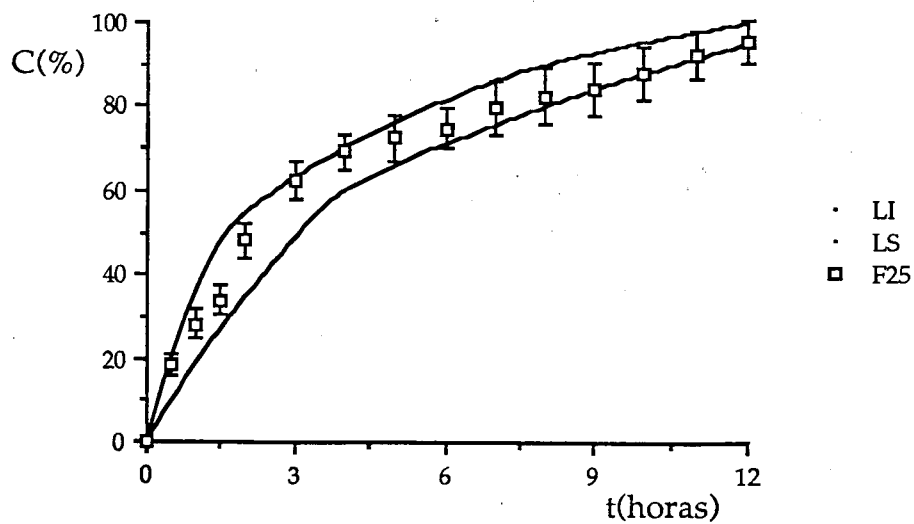


Figura 45 - Liodisponibilidade do oxazepam.

F25 - granulação a húmido.

LI - limite teórico inferior; LS - limite teórico superior

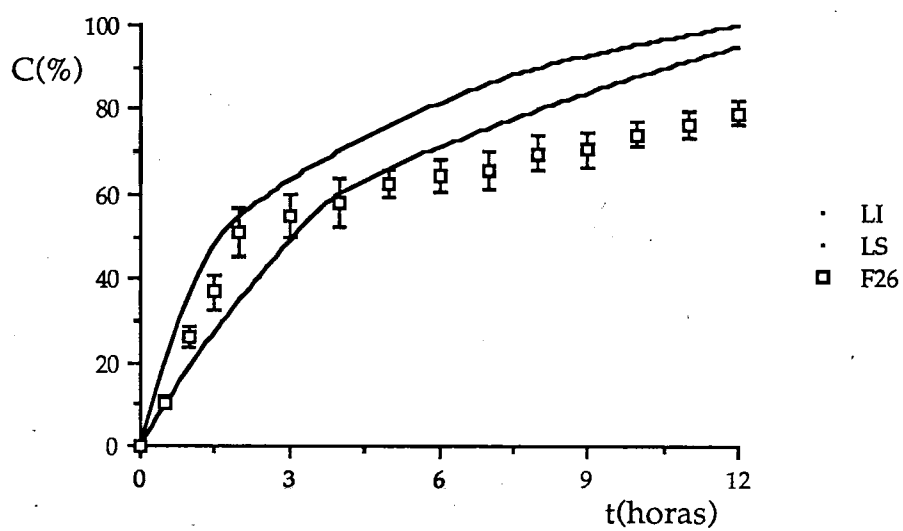


Figura 46 - Liodisponibilidade do oxazepam.

Influência da composição dos grânulos.

F26 - (100% de Carbopol 934).

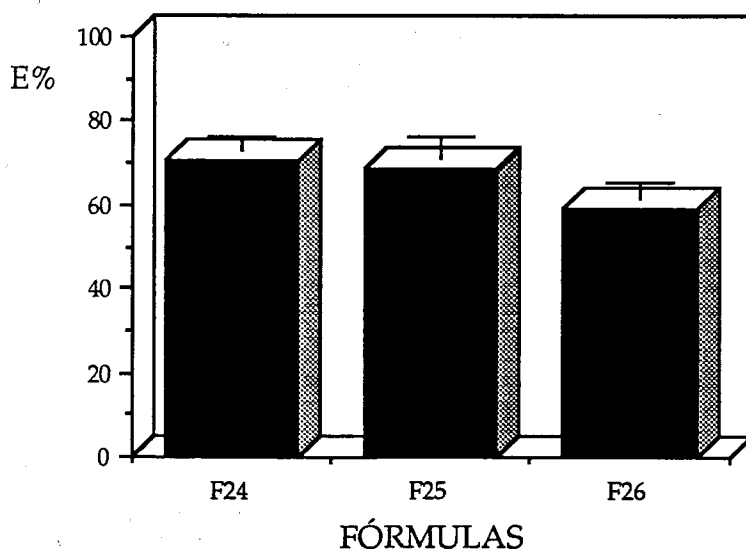


Figura 47 - Eficácia de dissolução do oxazepam.

2.5.6.6 - Discussão dos resultados

Da análise dos resultados obtidos no ensaio de dissolução usando o método A pode concluir-se que o revestimento dos grânulos da matriz hidrófila permite a cedência do oxazepam para o suco gástrico artificial dentro dos limites teóricos pretendidos, como pode observar-se no Quadro XXVI.

QUADRO XXVI

LIMITES TEÓRICOS E RESULTADOS DO ENSAIO DE DISSOLUÇÃO

Tempo (horas)	Limites teóricos	Oxazepam dissolvido (%)		
		F24	F25	F26
0-2	35-55	47,5±2,8	48,1±3,9	51,0±5,5
4	60-70	67,4±4,1	69,2±4,2	58,1±5,7
8	80-90	86,0±3,3	82,4±6,5	69,6±4,3
12	95-100	98,7±1,0	95,6±4,9	79,2±2,7
ASC(t=12h)	760-880	852,2±32,3	829,4±59,9	710,0±46,6
E%(t=12h)	62,5-73,3	71,0±2,7	69,1±5,0	59,2±3,9

Em função dos resultados alcançados no ensaio de dissolução, verifica-se que entre as fórmulas F24 (granulação a seco) e F25 (granulação a húmido) não existem diferenças significativas em relação à biodisponibilidade. Contudo, do ponto de vista tecnológico o método de fabrico mais adequado para a produção dos grânulos é a granulação a seco, visto que a granulação a húmido é uma técnica de difícil execução quando na mistura de pós a granular

está presente o Carbopol 934, mesmo usando como líquido de granulação o álcool de 95°.

Ao contrário do que aconteceu no grupo de fórmulas anteriores, em que não foi possível estudar a influência da composição dos grânulos na cedência do princípio activo no suco entérico artificial, neste grupo este estudo foi concretizado graças ao revestimento efectuado nos grânulos. Assim, os níveis de fármaco dissolvido no suco gástrico artificial foram sensivelmente iguais para as fórmulas F24 e F26. O mesmo não se verificou no suco entérico artificial, no qual os resultados são significativamente diferentes devido, fundamentalmente, à diferente composição dos grânulos, se se considerar que o revestimento tem rigorosamente a mesma espessura nas duas fórmulas e portanto não intervém no ritmo de cedência. Nestas circunstâncias, pode afirmar-se que a presença do fosfato de cálcio em associação com o Carbopol 934 nos grânulos aumenta a cedência de oxazepam em função do tempo no suco entérico artificial, parecendo as quantidades indicadas no Quadro XXIII para a fórmula F24 as mais apropriadas.

A análise do Quadro XXVI e da Fig. 47 permite concluir que as fórmulas F24 e F25 têm valores de eficácia de dissolução de acordo com o estipulado.

2.5.7.- ENSAIO DE AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE

A verificação da estabilidade do oxazepam nos comprimidos foi efectuada nas fórmulas F21 e F24.

2.5.7.1.- Condições de armazenagem

Durante a realização do ensaio de estabilidade, os comprimidos foram armazenados nas seguintes condições:

- temperatura de 22 ± 1 °C;
- acondicionamento em recipientes hermeticamente fechados e ao abrigo da luz.

O teor de oxazepam nos comprimidos foi avaliado por cromatografia líquida de

alta pressão, no momento do fabrico e ao fim de 6, 12 e 18 meses.

2.5.7.2.- Determinação do teor de oxazepam nos comprimidos

Pulverize 3 comprimidos do mesmo lote de produção. Pese rigorosamente cerca de 20 mg (correspondentes a 1/10 do peso teórico dos comprimidos) e introduza em matrás de 250 ml. Junte 90 ml de metanol. Deixe em contacto durante 2 horas, à temperatura de $22 \pm 1^\circ \text{C}$, com uma velocidade de rotação de 500 r.p.m. Filtre.

2.5.7.2.1.- Condições do ensaio por HPLC

O doseamento efectuado por HPLC obedeceu às condições de análise descritas em 2.4.1.7.1.

A solução mãe de padrão interno e as soluções de padrão interno e de padrão foram preparadas de acordo com o descrito em 2.4.1.7.1.

Solução para determinar o teor de oxazepam nos comprimidos: Dilua o filtrado, obtido como o descrito em 2.5.7.2., com metanol de modo a obter concentrações de oxazepam próximas de $20 \mu\text{g/ml}$. Adicione 1,0 ml desta diluição a 1,0 ml de solução de padrão interno. Homogenize em vórtex. Filtre por filtro de $0,45 \mu\text{m}$.

2.5.7.3.- Resultados

Os resultados obtidos no ensaio de estabilidade estão indicados no Quadro XXVII.

QUADRO XXVII

ENSAIO DE ESTABILIDADE

Tempo (meses)	Oxazepam (%)	
	F21	F24
0	100,0	100,0
6	99,6±0,3	99,7±0,2
12	99,2±0,4	99,4±0,4
18	98,7±0,4	98,3±0,5

(±) -Intervalo de confiança - 95%

t - 0,05

N - 5

2.5.7.4.- Discussão dos resultados

A análise dos resultados obtidos no ensaio de avaliação da estabilidade das fórmulas F21 e F24, do ponto de vista farmacêutico, permite afirmar que o oxazepam apresenta uma estabilidade de acordo com o fabrico industrial de comprimidos.

Não foi possível detectar nos cromatogramas obtidos os compostos de degradação descritos na literatura, devido por um lado à sensibilidade do método (atenuação 16) e, por outro lado, devido à estabilidade apresentada pelas fórmulas ensaiadas(244-246).

Como os comprimidos foram acondicionados ao abrigo da luz, não se verificou qualquer alteração do Carbopol 934(165).

2.6.- CONCLUSÕES

2.6.1.- MATRIZ HIDRÓFILA CONSTITUÍDA POR CARBOPOL 934 E LACTOSE

A presença da lactose favorece a liodisponibilidade do oxazepam, sendo esta tanto maior quanto maior for a quantidade daquela.

O limite máximo de lactose a adicionar ao Carbopol 934 de modo a originar uma matriz hidrófila é de 70%.

2.6.2.- MATRIZ HIDRÓFILA CONSTITUÍDA POR CARBOPOL 934 E SULFATO DE ZINCO

A presença do sulfato de zinco favorece a liodisponibilidade do oxazepam. Nas mesmas proporções, o efeito positivo do sulfato de zinco é maior do que o da lactose.

Existe uma proporção ideal entre a quantidade intra e extragranular de sulfato de zinco de modo a favorecer a liodisponibilidade do oxazepam, que é, respectivamente, de 100 mg e 15 mg por comprimido de 200 mg.

2.6.3.- INFLUÊNCIA DO LAURILSULFATO DE SÓDIO

O laurilsulfato de sódio favorece a liodisponibilidade do oxazepam em presença da lactose e do sulfato de zinco, quando associados ao Carbopol 934.

2.6.4.- MATRIZ CONSTITUÍDA POR CARBOPOL 934 E SULFATO OU FOSFATO DE CÁLCIO

Nas mesmas proporções, e ao fim de 12 horas de ensaio, o sulfato de cálcio proporciona cerca de metade da taxa de dissolução do oxazepam obtida com o sulfato de zinco.

O fosfato de cálcio tem um efeito positivo maior do que o sulfato de cálcio na liodisponibilidade do oxazepam, desde que o catião se encontre na mesma concentração.

A liodisponibilidade do oxazepam não é influenciada pela granulometria, pelo diâmetro e forma dos punções e pela presença de estearato de magnésio na concentração utilizada.

2.6.5.- INFLUÊNCIA DA CROSCARMELOSE DE SÓDIO

A quantidade de croscarmelose de sódio presente na fase extragranular da matriz hidrófila deve estar compreendida entre 4 e 5%, de modo a originar a liodisponibilidade pretendida para a dose inicial.

A constituição dos grânulos deve ser de 60% de fosfato de cálcio e 40% de Carbopol 934, para que a dose de manutenção seja cedida de acordo com a liodisponibilidade desejada.

A liodisponibilidade do oxazepam não é influenciada pelo método de dissolução usado nem pelos métodos analíticos.

2.6.6.- GRÂNULOS REVESTIDOS COM ACETOFTALATO DE CELULOSE

O revestimento dos grânulos com acetofalato de celulose permite obter a liodisponibilidade do oxazepam esperada para o suco gástrico artificial.

Para que a dose de manutenção seja cedida de acordo com a liodisponibilidade desejada, a constituição dos grânulos deve ser de 60% de fosfato de cálcio e 40% de Carbopol 934.

O método utilizado na obtenção dos grânulos não influencia a liodisponibilidade do oxazepam.

CAPÍTULO III
SUPOSITÓRIOS DE OXAZEPAM

3.1.- INTRODUÇÃO

O oxazepam é menos solúvel do que o diazepam quer em água e solventes hidrófilos, quer em líquidos hidrófobos. A baixa solubilidade deste fármaco é a principal razão para não serem comercializadas preparações destinadas à administração parenteral e, também, responsável pela baixa absorção gastrintestinal deste composto relativamente ao diazepam(247).

O oxazepam é excepcionalmente bem tolerado pelos doentes e é considerada a benzodiazepina de primeira escolha no tratamento da ansiedade, principalmente em pediatria e geriatria(248). O tratamento da ansiedade é de difícil execução, mas mais complicado se torna quando a idade dos doentes sujeitos a tratamento é baixa ou elevada. É neste contexto que se justifica o estudo da absorção rectal do oxazepam.

Embora nunca tenham conhecido uma verdadeira popularidade, os supositórios foram empregados na preparação de medicamentos desde Hipócrates e, a partir do século XIX, passaram a constituir uma forma farmacêutica de bastante interesse. Nos anos 30, a administração sob esta forma farmacêutica foi essencialmente destinada a fármacos anti-hemorroidais, analgésicos e laxativos. Entretanto, nos últimos 60 anos a sua importância foi definitivamente reconhecida, constituindo actualmente um dos tipos de medicação mais vezes utilizado para veicular fármacos destinados à absorção sistémica. Contudo, muitos dos doentes são relutantes em administrar fármacos por via rectal, sendo as razões desta relutância bastante complexas e refletindo de um modo geral a cultura ou um preconceito emocional do doente.

O mecanismo de absorção dos fármacos por via rectal não é diferente do observado no tracto gastrintestinal, mesmo considerando as condições fisiológicas diferentes (pH, quantidade de fluido, etc). De um modo geral, a absorção rectal de benzodiazepinas a partir de soluções aquosas ou alcoólicas é mais rápida que a absorção oral. Contudo, quando estão incorporadas em supositórios a absorção é mais lenta, dependendo sobretudo da natureza do excipiente, da utilização de tensioactivos ou de outros aditivos, e das características do fármaco(82,249-252). Também o método de preparação e a conservação dos medicamentos são factores que influenciam a absorção dos fármacos administrados por via rectal.

Numa primeira fase deste trabalho estudou-se a influência do excipiente na absorção rectal do oxazepam, utilizando para o efeito diferentes tipos de massas Novata, constituídas por misturas de glicerídeos semi-sintéticos. Numa segunda fase, e com o objectivo de procurar encontrar vantagens neste tipo de administração relativamente à absorção oral, experimentou-se o oxazepam na presença de um tensoactivo promotor de absorção, como é o caso do laurilsulfato de sódio.

As concentrações plasmáticas do oxazepam foram determinadas por cromatografia líquida de alta pressão.

3.2.- ESCOLHA DO EXCIPIENTE

Os excipientes destinados à administração por via rectal devem ser inócuos e compatíveis com o fármaco e adjuvantes a utilizar na preparação dos supositórios. A escolha do excipiente é muito importante, já que dele depende em grande parte a homogeneidade, a estabilidade e a biodisponibilidade pretendida para o supositório. Contudo, estas características só são alcançadas se o fármaco apresentar granulometria $<100 \mu\text{m}$, solubilidade no excipiente e dose adequadas(253).

Outro factor a ter em atenção na escolha do excipiente diz respeito à finalidade a que os supositórios se destinam. Assim, quando se pretende uma acção local do fármaco são usados excipientes hidrodispersíveis ou mucilaginosos e lipossolúveis com elevada viscosidade à temperatura de fusão. Para a obtenção de uma acção sistémica recorre-se principalmente, à utilização de excipientes lipossolúveis(254).

As interacções que eventualmente existam entre o fármaco e o excipiente não devem modificar as características físicas deste último, nomeadamente o ponto de fusão, o ponto e o tempo de solidificação, o tempo de liquefacção, a viscosidade à temperatura fisiológica e a capacidade de extensibilidade.

3.3.- INFLUÊNCIA DOS TENSOACTIVOS

A presença de tensoactivos em fórmulas destinadas à administração por via rectal provoca geralmente um aumento da absorção do fármaco(255,256).

Os tensoactivos podem influenciar positivamente a absorção rectal por dois processos diferentes: desnaturando as proteínas da mucosa da membrana rectal, o que afecta a integridade da membrana, e/ou aumentando o número de locais de absorção por limpeza da superfície da membrana(257). Mas estes efeitos verificam-se apenas se o tensoactivo se encontrar em concentração inferior à sua concentração micelar crítica (CMC). De facto, se a concentração do tensoactivo for superior à sua concentração micelar crítica origina a formação de micelas. Os fármacos são complexados pelas micelas, dependendo o grau de complexação da lipofilia do fármaco, e como estas são demasiado volumosas não atravessam as membranas porosas, pelo que o complexo também não é susceptível de ser absorvido. Deste modo, a quantidade de fármaco livre é menor e, conseqüentemente, a absorção também será menor(258,259).

A absorção dos fármacos depende fundamentalmente da sua velocidade de libertação do excipiente em que estão incorporados. Se o princípio activo não se libertar do excipiente, não será absorvido pelo organismo. Os tensoactivos também promovem a absorção dos fármacos administrados por via rectal, pois facilitam a libertação dos fármacos desde que possuam um valor de EHL superior a 11. Este tipo de acção por parte dos tensoactivos é independente da concentração micelar crítica(260).

3.4.- PREPARAÇÃO DOS SUPOSITÓRIOS

Os supositórios são preparados por mistura e/ou dissolução dos fármacos com os excipientes, de acordo com os métodos de fusão e compressão.

A forma, o peso e as dimensões dos supositórios estão padronizados, variando em função da absorção pretendida e do grupo etário a que se destinam. Todavia, de um modo geral, os supositórios devem apresentar a superfície externa lisa (sem rugosidades e/ou fissuras) e não devem notar-se cristalizações; as secções longitudinal e transversal devem ser homogéneas(261).

A variação de massa de supositórios de um mesmo lote deve estar de acordo com o ensaio geral para as preparações unitárias sólidas, designado na FP V por "Ensaio de Uniformidade de Massa".

A variação de teor em princípio activo deve obedecer ao "Ensaio de Uniformidade de Teor" descrito na mesma Farmacopeia.

3.4.1.- MATERIAL E MÉTODOS

Utilizaram-se as massas Novata (Henkel) 299, B e BC, cujas características estão indicadas no Anexo II.

Utilizou-se manteiga de cacau (V.P. 892285/588), com as características indicadas no mesmo Anexo.

Usaram-se moldes metálicos e de plástico para preparar os supositórios.

3.4.2.- FÓRMULA BASE

Na execução deste trabalho os supositórios foram preparados por fusão.

Prepararam-se dois tipos de supositórios, uns destinados ao ensaio de absorção realizado com animais que continham 12 mg de oxazepam (peso médio 0,77 g) por unidade, e outros destinados ao ensaio de absorção realizado com voluntários humanos e cujo teor era de 15 mg (peso médio 2,5 g) por unidade.

Oxazepam	12 ou 15 mg
Excipiente q.b.p.....	1 Supositório

Preparação do excipiente:

A adição do tensioactivo à massa Novata fundida foi feita à temperatura de 55-60 °C.

Técnica de preparação:

Pese os componentes mencionados na fórmula. Funda o excipiente à temperatura de 55-60 °C. Incorpore o oxazepam em cerca de 1/10 de excipiente à temperatura de 40 °C. Junte o excipiente restante aquecido à mesma temperatura. Homogenize. Verta em moldes para supositórios. Deixe solidificar à temperatura de 4 °C.

3.4.3.- ACONDICIONAMENTO

Os supositórios foram acondicionados por lotes, em frascos de polietileno de alta densidade, hermeticamente fechados e ao abrigo da luz.

A temperatura de armazenagem foi de 22 ± 1 °C.

3.5.- MÉTODOS DE VERIFICAÇÃO *IN VIVO*

A eficácia terapêutica dos supositórios foi determinada através da realização de ensaios de absorção praticados em animais de experiência e no homem.

A influência do excipiente e da presença de tensioactivos na absorção rectal do oxazepam foi estudada em coelhos, avaliando a concentração sanguínea em tempos determinados após a sua administração.

As fórmulas que melhores resultados apresentaram no ensaio com os animais, com e sem tensioactivo, foram usadas num ensaio biológico realizado com voluntários.

O método analítico usado foi a cromatografia líquida de alta pressão.

3.5.1.- MATERIAL E MÉTODOS

3.5.1.1.- Experimentação em coelhos

O ensaio foi feito com coelhos saudáveis, com peso compreendido entre 2,0 e 2,5 kg. Os coelhos foram mantidos em jejum 24 horas antes da realização do ensaio. O período mínimo entre cada ensaio foi de uma semana, tempo suficiente para a eliminação total do fármaco, controlada por ensaios em branco realizados com os animais, normalmente 48 horas antes do ensaio.

A cada animal foi administrado um supositório com uma dose de 4 mg de oxazepam/kg de animal.

A colheita das amostras de sangue foi feita em tempos seleccionados em função da

absorção verificada, efectuando-se em cada animal cinco extracções na veia marginal da orelha.

As amostras de sangue foram tratadas segundo a técnica descrita em 2.4.2.3.1.

3.5.1.2.- Experimentação no homem

O ensaio foi efectuado com indivíduos saudáveis, de idade compreendida entre 25 e 60 anos e de ambos os sexos.

Executaram-se seis séries de determinações e as colheitas foram feitas 1, 2, 3, 4, 6, 8 e 12 horas após a administração. Em cada voluntário foram efectuadas quatro recolhas de sangue.

As amostras de sangue foram tratadas segundo a técnica descrita em 2.4.2.3.1.

3.5.1.3.- Aparelhagem, reagentes e ensaio cromatográfico

O material, os métodos e as técnicas cromatográficas utilizadas na realização dos ensaios cromatográficos estão indicados em 2.4.2.2., 2.4.2.3. e 2.4.2.4.

3.5.2.- RESULTADOS E ESTUDO ESTATÍSTICO

Os resultados referentes ao ensaio de absorção *in vivo* são expressos em: concentração plasmática de oxazepam ($\mu\text{g}/\text{l}$) em função do tempo; área sob a curva; clearance plasmática e volume de distribuição.

A concentração plasmática de oxazepam em função do tempo foi calculada conforme o indicado em 2.4.2.4.2.

A área sob a curva ($\text{h} \cdot \mu\text{g}/\text{l}$) foi calculada para um tempo de 8 horas e utilizou-se o método do trapézio.

Este parâmetro está de algum modo relacionado com a grandeza e a duração da resposta biológica do fármaco, já que representa a área definida por uma curva que relaciona a concentração plasmática com o tempo. Convém referir que a área sob a curva não é uma medição

directa da dose administrada, embora esteja, obviamente, relacionada com ela.

A clearance do fármaco está também relacionada com a área sob a curva. A medição deste parâmetro constitui, portanto, um índice muito útil da biodisponibilidade do fármaco e do modo de avaliar a respectiva clearance.

A clearance é definida como sendo o volume de plasma que é desprovido de fármaco por unidade de tempo. A relação entre a clearance plasmática, a dose e a área sob a curva é verdadeira qualquer que seja a via de administração utilizada. No entanto, para qualquer via de administração diferente da endovenosa, como é o caso presente, a dose deve ser considerada como a fracção da dose administrada que é realmente absorvida. Esta relação é particularmente útil, já que a clearance é independente do tipo de modelo farmacocinético utilizado. A clearance plasmática (l/h/kg) foi calculada usando a seguinte equação:

$$C_p = D/ASC \times 1/P$$

em que C_p é a clearance plasmática, D é a dose administrada, ASC é a área sob a curva e P é o peso do indivíduo.

O volume aparente de distribuição corresponde ao volume corpóreo no qual se encontra contida a totalidade do fármaco administrado. Este parâmetro permite saber se o fármaco se distribui por um ou mais compartimentos. O volume aparente de distribuição (l/kg) foi calculado utilizando a seguinte equação:

$$V_d = C_p/\beta$$

em que V_d é o volume aparente de distribuição, C_p é a clearance plasmática e β é a velocidade específica de eliminação híbrida.

Na análise estatística a eliminação de um resultado que apresentasse um valor discrepante foi efectuada utilizando o critério de rejeição baseado na distribuição t de Student.

A variável t foi comparada com o valor t indicado na tabela de Fischer para o nível de probabilidade escolhido (95%: $P=0,05$); o número de graus de liberdade foi $N=n-1$, em que n é o número de amostras.

3.6- ESTUDO DE FÓRMULAS DESTINADAS À ADMINISTRAÇÃO RECTAL

3.6.1.- INFLUÊNCIA DO EXCIPIENTE

A libertação de um fármaco a partir de um supositório é condicionada, para além das suas características intrínsecas (granulometria, solubilidade ou coeficiente de partilha O/A), pelas propriedades físicas do excipiente onde está incorporado(262,263). Como a absorção de um fármaco só ocorre após a libertação, acontece que a biodisponibilidade dos fármacos contidos em supositórios depende da natureza do excipiente e das características físicas que este possui.

Quando os excipientes utilizados são de natureza lipossolúvel (como acontece com as massas Novata, que são constituídas por glicerídeos semi-sintéticos) deve indicar-se sempre os valores referentes ao ponto de fusão, ponto e tempo de solidificação, índices de hidroxilo, de acidez, de iodo e de saponificação, e as características reológicas e polimórficas(264). Estes parâmetros estão relacionados com a distribuição das cadeias gordas dos ésteres do glicerol, influenciando a cedência dos fármacos contidos nos supositórios e, em consequência, a sua absorção.

Com a finalidade de escolher o excipiente mais adequado para a realização do ensaio de absorção rectal do oxazepam, prepararam-se supositórios de Novata 299, Novata B e Novata BC. Como pode observar-se no Anexo II e comparando os parâmetros dependentes do excipiente susceptíveis de influenciar a absorção do oxazepam, apenas o índice de hidroxilo é significativamente diferente. Os índices de hidroxilo dos excipientes experimentados são os seguintes:

- Novata 299 - menor que 5
- Novata B - compreendido entre 20 e 30
- Novata BC - compreendido entre 30 e 40.

Este parâmetro relaciona-se com o teor de um excipiente em mono e diglicerídeos, fornecendo indicações acerca do seu grau de hidrofília, que será tanto maior quanto maior for o índice de hidroxilo(265). Deste modo, a presença destes ésteres confere ao excipiente um maior ou menor poder absorvente de água, pois existem moléculas de glicerina com hidroxilos livres que se comportam como emulgentes de A/O.

Também foram preparados supositórios de manteiga de cacau, já que durante muitos anos constituiu o único excipiente gordo oficializado pelas farmacopeias. Devido à proveniência, método de obtenção, métodos de análise, etc., a composição química que lhe é atribuída apresenta grande variabilidade, o que influi nas características dos supositórios que com ela se preparam. No Anexo II estão inscritos os valores obtidos para a manteiga de cacau experimentada.

3.6.1.1.- Ensaio de absorção

Os supositórios ensaiados foram preparados conforme o descrito em 3.4.2.

O ensaio de absorção realizou-se conforme o descrito em 3.5.1.1.

O doseamento do oxazepam no plasma foi efectuado por cromatografia líquida de alta pressão, nas condições indicadas em 2.4.2.4.1.

3.6.1.2.- Resultados

Os resultados do ensaio de absorção realizado em coelhos, expressos em concentração plasmática ($\mu\text{g}/\text{l}$) e área sob a curva ao fim de 8 horas ($\text{h} \cdot \mu\text{g}/\text{l}$), são apresentados no Quadro XXVIII e nas Figs. 48, 49, 50 e 51.

QUADRO XXVIII

ENSAIO DE ABSORÇÃO RECTAL REALIZADO EM COELHOS

Tempo (horas)	Concentração plasmática de oxazepam (µg/l)			
	Novata 299	Novata B	Novata BC	Manteiga de cacau
0,5	175,0±31,2	173,8±24,8	164,7±33,0	119,9±26,1
1	197,4±29,1	254,0±26,0	178,7±30,3	151,2±28,3
1,5	229,2±36,7	351,6±36,9	222,9±30,9	207,4±30,6
2	223,9±41,6	297,1±26,3	300,2±37,5	242,0±22,5
3	226,8±22,5	265,0±29,8	324,4±37,2	282,5±35,2
4	165,1±25,2	221,7±26,9	247,5±29,5	219,8±23,6
6	118,6±24,1	196,6±32,0	173,7±34,3	162,3±34,6
8	92,8±26,7	143,6±24,9	132,8±27,9	122,1±18,3
ASC (t = 8h)	1273,2±214,9	1746,9±222,6	1684,2±253,2	1479,7±217,5
Cmáx.	229,2±36,7	351,6±36,9	324,4±37,2	282,5±35,2
tmáx.	1,5	1,5	3,0	3,0

(±) - Intervalo de confiança - 95%

t - 0,05

N - 4

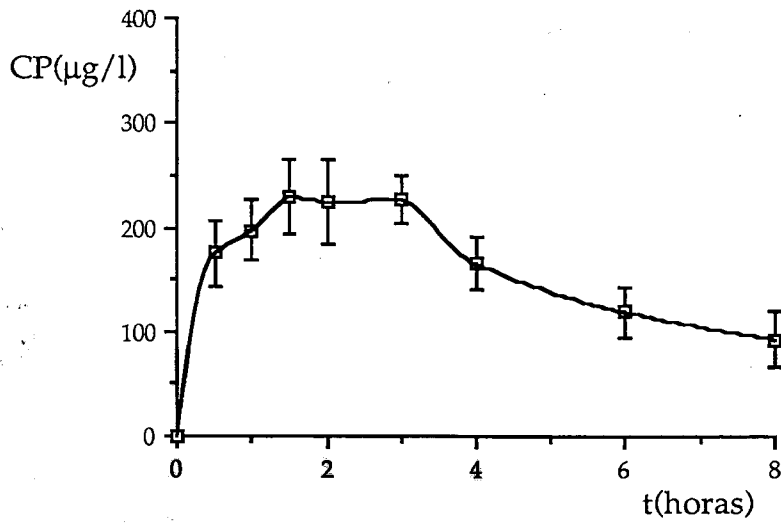


Figura 48 - Concentrações plasmáticas de oxazepam em função do tempo, avaliadas em coelhos após administração de supositórios de Novata 299.

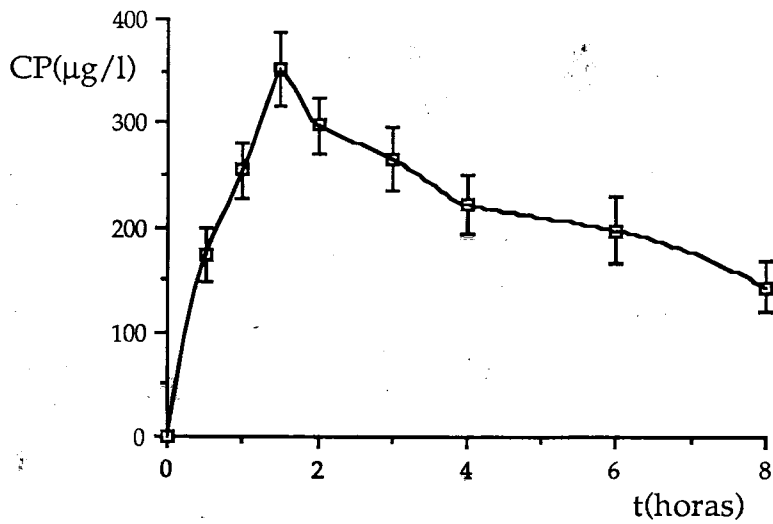


Figura 49 - Concentrações plasmáticas de oxazepam em função do tempo, avaliadas em coelhos após administração de supositórios de Novata B.

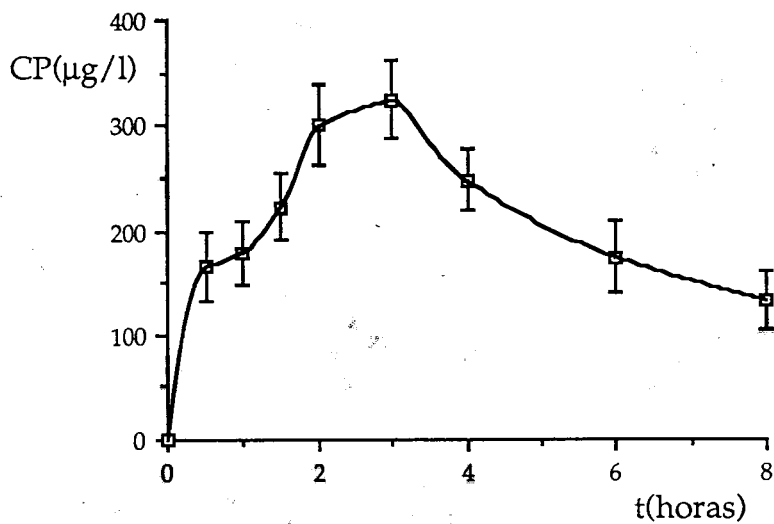


Figura 50 - Concentrações plasmáticas de oxazepam em função do tempo, avaliadas em coelhos após administração de supositórios de Novata BC.

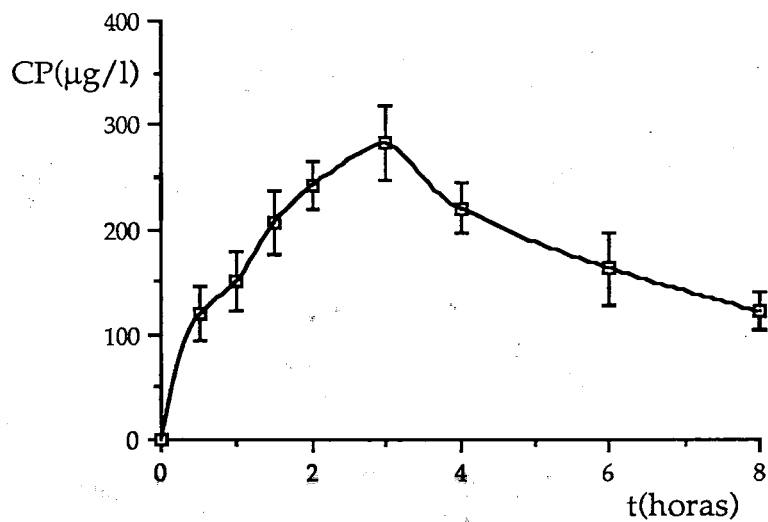


Figura 51 - Concentrações plasmáticas de oxazepam em função do tempo, avaliadas em coelhos após administração de supositórios de manteiga de cacau.

3.6.1.3.- Discussão dos resultados

Da análise dos resultados inscritos no Quadro XXVIII e nas Figs. 48, 49, 50 e 51, concluiu-se que dos excipientes utilizados na preparação de supositórios de oxazepam, a massa Novata B é a que origina melhor absorção do fármaco.

De facto, quando o fármaco é incorporado em Novata B ou Novata BC, excipientes com alto valor de índice de hidroxilo, obtêm-se concentrações plasmáticas mais elevadas. Contudo, além de apresentar concentrações plasmáticas de oxazepam maiores, a Novata B é o excipiente que proporciona uma absorção mais rápida, já que o máximo de absorção é alcançado 1,5 horas após a administração, ao passo que com a Novata BC apenas se atinge às 3 horas de ensaio. A Novata 299, excipiente com índice de hidroxilo baixo, origina um máximo de absorção do oxazepam entre 1,5 e 3 horas após a administração, embora em concentrações plasmáticas menores que as outras massas Novata ensaiadas.

De acordo com as características físicas dos excipientes experimentados, pode concluir-se que o índice de hidroxilo é um factor importante na escolha de um excipiente destinado à administração por via rectal do oxazepam, pois proporciona concentrações plasmáticas diferentes consoante o seu valor. Todavia, embora as concentrações plasmáticas máximas não sejam muito diferentes, parece existir um valor intermédio óptimo de índice de hidroxilo, pois, apesar de terem sido utilizados apenas três intervalos de valores, foi o excipiente de índice de hidroxilo compreendido entre 20 e 30 o que originou maior e mais rápida absorção. O interesse deste factor na absorção faz-se sentir devido, por um lado, às características do oxazepam (nomeadamente o coeficiente de partilha O/A) e, por outro lado, às características do veículo utilizado (especialmente o sistema físico formado entre o excipiente e o fármaco).

Como já se referiu, o índice de hidroxilo fornece indicações acerca da capacidade emulgente do excipiente, traduzindo o seu poder de absorção de água. Nesta perspectiva, é legítimo afirmar-se que, na administração por via rectal do oxazepam, as diferenças de absorção encontradas se devem fundamentalmente à estabilidade do sistema fármaco-excipiente. De facto, o oxazepam parece formar um sistema de potencial termodinâmico mais elevado quando os excipientes utilizados apresentam um índice de hidroxilo elevado. Contudo, a hidrofilia do excipiente não deve ser ilimitada, devendo o índice de hidroxilo localizar-se entre 20-30, pois para valores mais elevados existem outros factores que começam a influenciar negativamente a absorção como, por exemplo, o efeito osmótico. Quando o afluxo de líquido dos tecidos para o lúmen é grande, o excesso de água pode vir a prejudicar o transporte passivo do fármaco.

3.6.2.- INFLUÊNCIA DOS TENSIOACTIVOS

A influência dos tensioactivos na absorção dos fármacos por via rectal é, para a maioria dos casos, favorável. De acordo com o referido na literatura, os tensioactivos podem interferir a dois níveis distintos na biodisponibilidade dos fármacos. Em primeiro lugar, podem actuar na libertação dos fármacos da forma farmacêutica, bastando para o efeito que o tensioactivo tenha um valor de EHL superior a 11. Em segundo lugar, podem afectar a absorção do fármaco. Contudo, nesta situação o tensioactivo para actuar como promotor da absorção deve encontrar-se em concentração abaixo da concentração micelar crítica.

A concentração micelar crítica do laurilsulfato de sódio (tensioactivo aniónico) é 8 mMoles/l, ou seja 2,3 g/l, e o respectivo EHL é 40 (266-269).

Os objectivos do presente estudo foram verificar, em primeiro lugar, se o laurilsulfato de sódio, tensioactivo aniónico, aumentava a absorção do fármaco e, em segundo lugar, se actuava ao nível da libertação.

Nestas circunstâncias, prepararam-se supositórios de oxazepam com 0,10% e 0,20% de tensioactivo, isto é, concentrações inferiores à CMC, e 0,50% de tensioactivo, ou seja concentração superior à CMC. O excipiente utilizado foi a massa Novata B.

3.6.2.1.- Ensaio de absorção

Os supositórios ensaiados foram preparados conforme o descrito em 3.4.2.

O ensaio de absorção realizou-se conforme o descrito em 3.5.1.1.

O doseamento do oxazepam no plasma foi efectuado por cromatografia líquida de alta pressão, nas condições indicadas em 2.4.2.4.1.

3.6.2.2.- Resultados

Os resultados do ensaio de absorção realizado em coelhos, expressos em concentração plasmática ($\mu\text{g/l}$) e área sob a curva ao fim de 8 horas ($\text{h}\cdot\mu\text{g/l}$), são apresentados no Quadro XXIX e nas Figs. 52, 53 e 54.

QUADRO XXIX

ENSAIO DE ABSORÇÃO RECTAL REALIZADO EM COELHOS

Tempo (horas)	Concentração plasmática de oxazepam (µg/l)			
	Novata B	0,10% LsS	0,20% LsS	0,50% LsS
0,25	—————	—————	181,0±26,9	—————
0,5	173,8±24,8	171,1±34,9	326,3±39,3	240,9±31,1
0,75	—————	303,4±34,9	381,4±37,5	302,9±37,4
1	254,0±26,0	356,3±36,2	457,9±31,8	360,9±47,2
1,25	—————	393,2±41,3	393,7±37,2	379,8±38,3
1,5	351,6±36,9	364,6±43,2	372,3±43,8	375,0±31,9
1,75	—————	—————	—————	365,9±35,5
2	297,1±26,3	340,1±36,7	321,6±34,1	328,0±32,2
2,5	—————	313,6±32,8	—————	—————
3	265,0±29,8	271,8±35,7	292,5±39,4	254,3±29,6
4	221,7±26,9	—————	277,2±32,5	—————
6	196,6±32,0	236,3±31,3	270,1±36,6	206,1±28,6
8	143,6±24,9	154,8±37,4	258,8±29,0	134,5±32,2
ASC (t = 8h)	1746,9±222,6	2012,2±270,6	2323,2±278,7	1899,8±242,3
C _{máx.}	351,6±36,9	393,2±41,3	457,9±31,8	379,8±38,3
t _{máx.}	1,50	1,25	1,00	1,25

(±) - Intervalo de confiança - 95%

t - 0,05

N - 4

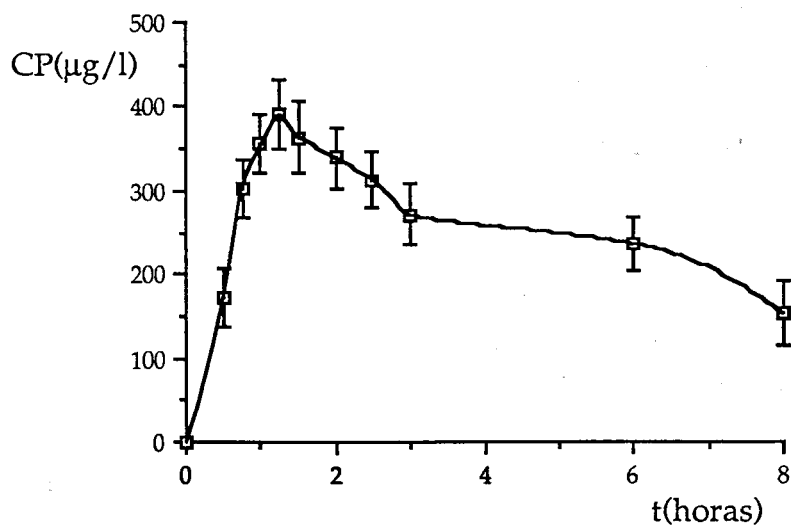


Figura 52 - Concentrações plasmáticas de oxazepam em função do tempo, avaliadas em coelhos após administração de supositórios de Novata B contendo 0,10% de laurilsulfato de sódio.

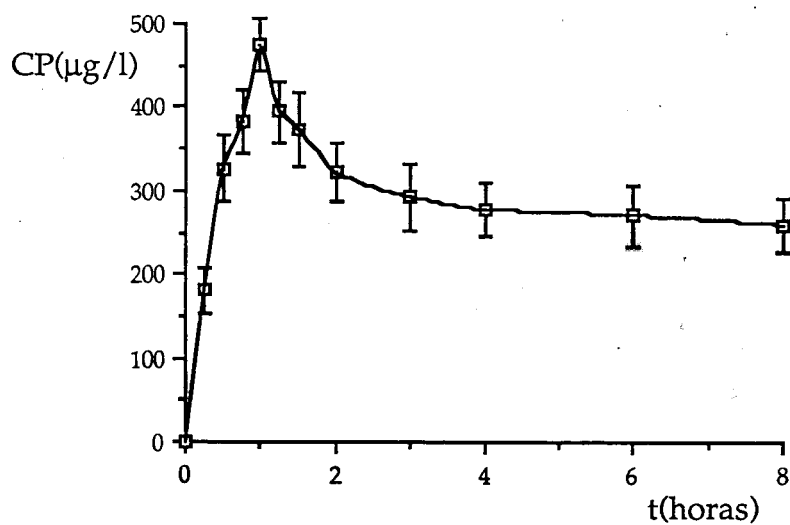


Figura 53 - Concentrações plasmáticas de oxazepam em função do tempo, avaliadas em coelhos após administração de supositórios de Novata B contendo 0,20% de laurilsulfato de sódio.

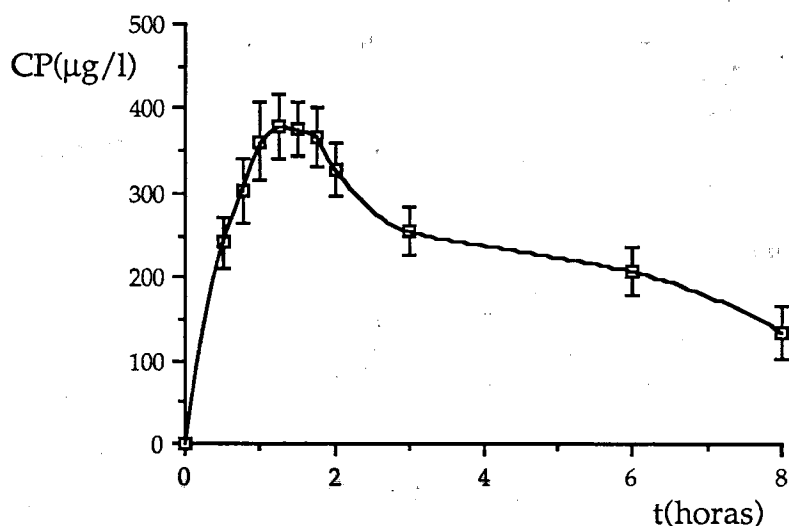


Figura 54 - Concentrações plasmáticas de oxazepam em função do tempo, avaliadas em coelhos após administração de supositórios de Novata B contendo 0,50% de laurilsulfato de sódio.

3.6.2.3.- Discussão dos resultados

Da análise dos resultados inscritos no Quadro XXIX e nas Figs. 52, 53 e 54, pode concluir-se que o laurilsulfato de sódio incrementa a absorção rectal do oxazepam.

De facto, em relação aos resultados obtidos com os supositórios de NovataB, verifica-se um aumento da quantidade de oxazepam absorvido de 12% para uma concentração de tensoactivo de 0,10%, de 30% para 0,20% e de 8% para 0,50%.

Além do incremento de absorção verificado, o tensoactivo também diminui o tempo ao fim do qual se atinge o máximo de absorção. Assim, este é atingido 1,5 horas após a administração do supositório sem tensoactivo, ao fim de 1 hora para 0,20% e de 1,25 horas para 0,10 e 0,50% de laurilsulfato de sódio.

Os resultados obtidos permitem afirmar que o laurilsulfato de sódio promove a absorção do oxazepam por mecanismos diferentes. Assim, para concentrações inferiores à CMC o incremento verificado é devido ao somatório de dois efeitos distintos, ou seja, à cedência mais rápida de oxazepam devido ao EHL do tensoactivo e às modificações que provoca na permeabilidade da membrana. Devido ao deslocamento do máximo de absorção e ao aumento

considerável verificado nas concentrações plasmáticas, é de admitir que ambos os efeitos aumentam, progressivamente, à medida que a concentração de tensioactivo se aproxima da CMC. Para concentrações superiores à CMC, o incremento da absorção deve-se exclusivamente à cedência mais rápida do fármaco.

3.6.3.- ENSAIO DE AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE E VERIFICAÇÃO DA BIOCADUCIDADE

3.6.3.1.- Condições de armazenagem

Durante a realização do ensaio de avaliação da estabilidade e da biocaducidade, os supositórios foram armazenados nas seguintes condições:

- temperatura de 22 ± 1 °C;
- acondicionamento em recipientes hermeticamente fechados e ao abrigo da luz.

3.6.3.2.- Ensaio de avaliação da estabilidade

A verificação da estabilidade do oxazepam nos supositórios foi efectuada nas fórmulas constituídas com Novata B com e sem tensioactivo (0,20%).

O teor de oxazepam nos supositórios foi avaliado por cromatografia líquida de alta pressão no momento do fabrico, ao fim de 6 e de 12 meses.

3.6.3.2.1.- Determinação do teor de oxazepam nos supositórios

Fragmente 3 supositórios do mesmo lote de produção. Pese rigorosamente cerca de 250 mg (correspondentes a 1/10 do peso teórico dos supositórios) e introduza em matrás de 250 ml. Meça 100 ml de solução tampão de pH 7,0. Deixe em contacto durante 1 hora, à temperatura de 40 ± 1 °C, com uma velocidade de rotação de 500 r.p.m. Filtre.

3.6.3.2.2.- Condições cromatográficas

O doseamento efectuado por HPLC obedeceu às condições de análise descritas em 2.4.1.7.1.

A solução mãe de padrão interno e as soluções de padrão interno e padrão foram preparadas de acordo com o descrito em 2.4.1.7.1.

Solução para determinar o teor de oxazepam nos supositórios: Dilua o filtrado obtido como se descreve em 3.6.3.2. com metanol de modo a obter concentrações de oxazepam próximas de 20 µg/ml. Adicione 1,0 ml desta diluição a 1,0 ml de solução de padrão interno. Homogenize em vórtex. Filtre por filtro de 0,45 µm.

3.6.3.2.3.- Resultados

Os resultados obtidos no ensaio de estabilidade estão indicados no Quadro XXX.

QUADRO XXX

ENSAIO DE ESTABILIDADE

Tempo (meses)	Oxazepam (%)	
	Novata B	0,20% LsS
0	100,0	100,0
6	96,3±0,7	95,2±2,6
12	91,6±2,3	93,8±1,8

(±) -Intervalo de confiança - 95%

t - 0,05

N - 5

3.6.3.3.- Ensaio de verificação da biocaducidade

Ao longo do tempo de armazenagem, mesmo em condições de temperatura e humidade normais, podem ocorrer modificações não só do teor em princípio activo dos supositórios, mas também das respectivas características físicas. Entre estas assume particular importância o ponto de fusão, o tempo de liquefacção e a consistência, que podem modificar a biodisponibilidade inicial apresentada pela forma farmacêutica(270).

3.6.3.3.1.- Determinação do tempo de liquefacção

A determinação do tempo de liquefacção permite prever a rapidez da acção terapêutica dos supositórios e ainda o conhecimento de modificações operadas nos supositórios e excipientes ao fim de um certo tempo de armazenagem(271).

O tempo de liquefacção foi determinado por um método não compressivo utilizando um aparelho do tipo Erweka.

As determinações foram efectuadas à temperatura de 37°C e o tempo de liquefacção é definido pelo tempo total (em minutos) necessário para que o supositório se liquefaça.

QUADRO XXXI

RESULTADOS DO TEMPO DE LIQUEFAÇÃO

Tempo (meses)	Novata B (minutos)	0,20% LsS (minutos)
0	8,3±1,0	6,5±1,6
6	9,5±1,7	7,7±2,2
12	9,8±1,4	8,2±2,5

(±) -Intervalo de confiança - 95%

t - 0,05

N - 5

3.6.3.3.2.- Determinação da consistência

A consistência permite observar o aumento de endurecimento que ocorre geralmente durante a armazenagem dos supositórios e parece estar relacionado com o polimorfismo dos triglicerídeos, o aumento da ordem cristalina e mudanças de natureza química, como é o caso da transesterificação(272).

Para a determinação da consistência dos supositórios foi utilizado o aparelho proposto por Cameli *et al.*(271). O supositório foi introduzido num tubo de vidro, com a base do supositório assente sobre o fundo. No vértice do supositório apoia-se um pistão munido de um prato onde foi colocado inicialmente um peso de 600 g e ao qual podem ser adaptadas cargas adicionais de 100 g, de minuto a minuto e até ao esmagamento.

As determinações foram conduzidas a 22±1°C e a consistência é definida pela carga total (kg) que foi capaz de esmagar o supositório.

QUADRO XXXII

RESULTADOS DA CONSISTÊNCIA

Tempo (meses)	Novata B (kg)	0,20% LsS (kg)
0	2,2±0,2	1,9±0,2
6	2,6±0,3	2,3±0,2
12	2,8±0,3	2,3±0,4

(±) -Intervalo de confiança - 95%

t - 0,05

N - 5

3.6.3.3.3.- Ensaio de absorção

Foi estudada a biodisponibilidade do oxazepam em supositórios de Novata B sem e com 0,20% de laurilsulfato de sódio, conservados durante 6 e 12 meses nas condições indicadas em 3.6.3.1.

Os supositórios ensaiados foram preparados conforme o descrito em 3.4.2.

O ensaio de absorção realizou-se conforme o descrito em 3.5.1.1.

O doseamento do oxazepam no plasma foi efectuado por cromatografia líquida de alta pressão nas condições indicadas em 2.4.2.4.1.

3.6.3.3.4.- Resultados

Os resultados do ensaio de absorção realizado em coelhos, expressos em concentração plasmática ($\mu\text{g}/\text{l}$) e área sob a curva ao fim de 8 horas ($\text{h} \cdot \mu\text{g}/\text{l}$), são apresentados no Quadro XXXIII e na Figs. 55 e 56.

QUADRO XXXIII

ENSAIO DE ABSORÇÃO RECTAL REALIZADO EM COELHOS

Tempo (horas)	Novata B			0,20% LsS		
	Após prep.	6 meses	12 meses	Após prep.	6 meses	12 meses
0,5	173,8±24,8	150,3±39,0	128,4±41,1	326,3±39,3	279,4±42,1	291,4±43,1
1	254,0±26,0	237,2±48,1	206,2±48,7	457,9±31,8	413,1±44,9	384,3±47,5
1,5	351,6±36,9	295,5±42,5	244,1±39,6	372,3±43,8	353,8±47,4	331,9±40,1
2	297,1±26,3	290,5±34,2	253,6±42,9	321,6±34,1	265,7±36,3	286,5±40,8
4	221,7±26,9	254,1±37,3	186,9±38,5	277,2±32,5	225,7±41,0	213,1±45,5
8	143,6±24,9	164,4±40,7	117,2±42,0	258,8±29,0	191,2±38,5	162,4±37,0
ASC (t=8h)	1713,4	1795,8	1401,5	2329,5	1914,8	1826,0
(±)	207,2	300,9	317,8	255,6	312,6	326,9
C _{máx.}	351,6±36,9	295,5±42,5	253,6±38,5	457,9±31,8	413,1±44,9	384,3±47,5
t _{máx.}	1,5	1,5	2,0	1,0	1,0	1,0

(±) - Intervalo de confiança - 95%

t - 0,05

N - 4

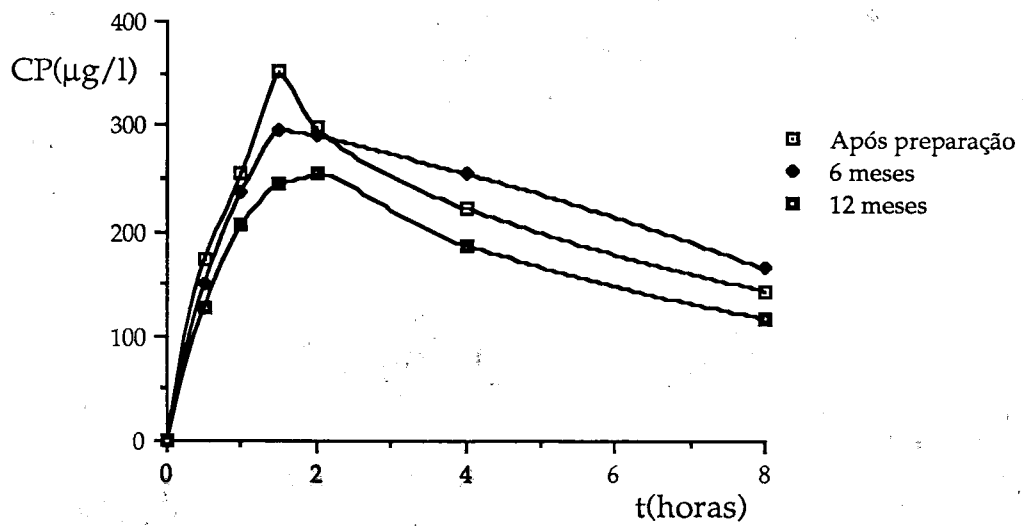


Figura 55 - Concentrações plasmáticas de oxazepam em função do tempo, avaliadas em coelhos após administração de supositórios de Novata B.

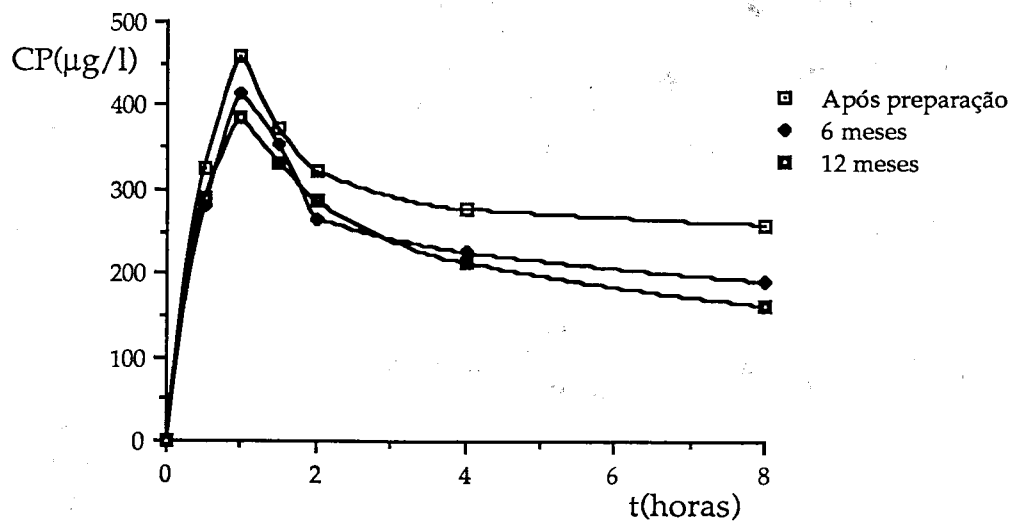


Figura 56 - Concentrações plasmáticas de oxazepam em função do tempo, avaliadas em coelhos após administração de supositórios de Novata B contendo 0,20% de laurilsulfato de sódio.

3.6.3.4.- Discussão dos resultados

Da análise dos resultados inscritos no Quadro XXX pode concluir-se que as fórmulas ensaiadas em relação ao teor em princípio activo apresentam estabilidade aceitável, pois são susceptíveis de serem utilizadas pelo menos 12 meses após a sua preparação. Contudo, do ponto de vista organoléptico, nomeadamente no que diz respeito à cor, deveriam ser corrigidos, pois ao fim de 6 meses de armazenagem apresentam cor ligeiramente amarelada, a qual aumenta muito de intensidade até aos 12 meses.

Em relação aos resultados da variação do tempo de liquefacção e da consistência ao longo do tempo, inscritos nos Quadros XXXI e XXXII, verifica-se que ambas se elevam, aumento esse que é mais acentuado nos primeiros 6 meses de armazenagem.

Assim, não é de surpreender que a absorção rectal do oxazepam contido nas fórmulas ensaiadas diminua com o envelhecimento dos supositórios (Quadro XXXIII e Figs. 55 e 56).

Para os supositórios sem laurilsulfato de sódio, a diminuição da absorção é progressiva ao longo do tempo de armazenagem, verificando-se uma quebra nas concentrações máximas de 16 e 28% para 6 e 12 meses, respectivamente.

Para os supositórios com laurilsulfato de sódio, a diminuição da absorção é menor do que a verificada sem tensioactivo: 10 e 16% para 6 e 12 meses de armazenagem, respectivamente.

Nestas circunstâncias, e tendo em atenção que o teor em princípio activo também diminuiu, pode afirmar-se que as fórmulas ensaiadas apresentam estabilidade do ponto de vista químico e biofarmacêutico, permitindo estabelecer um prazo de validade de pelo menos 12 meses.

3.6.4.- ENSAIO EM HUMANOS

Depois do estudo desenvolvido com os animais, em que foi escolhido o excipiente mais apropriado para a preparação dos supositórios de oxazepam e a quantidade de tensioactivo a incorporar, faltava verificar se no homem a absorção rectal do oxazepam apresentava um comportamento idêntico.

Nestas circunstâncias, foi realizado um ensaio biológico em voluntários saudáveis, homens e mulheres, com idades compreendidas entre os 25 e os 60 anos. Os supositórios administrados continham 15 mg de oxazepam cada um (supositórios de 2,5 g

aproximadamente). Aos voluntários foram administrados supositórios com e sem tensioactivo (0,20%).

As amostras de sangue foram tratadas conforme o descrito em 2.4.2.3.1.

O doseamento do oxazepam no sangue foi efectuado por cromatografia líquida de alta pressão nas condições indicadas em 2.4.2.4.1.

3.6.4.1.- Resultados

Os resultados do ensaio in vivo realizado no homem, expressos em concentração plasmática ($\mu\text{g/l}$) e em área sob a curva após 12 horas (ASC) ($\text{h}\cdot\mu\text{g/l}$), bem como a clearance plasmática (l/h/kg) e o volume de distribuição (l/kg), são apresentados no Quadro XXXIV e na Fig. 57.

QUADRO XXXIV

ENSAIO DE ABSORÇÃO RECTAL
REALIZADO EM HUMANOS

Tempo (horas)	Concentração sanguínea de oxazepam (µg/l)	
	Novata B	0,20% LsS
1	97,5±29,6	242,3±41,0
2	190,4±35,4	377,9±54,2
3	237,6±37,6	355,9±64,9
4	220,7±50,4	296,2±45,1
6	183,1±43,6	239,8±46,6
8	142,6±32,3	188,5±47,0
12	114,9±37,4	134,6±34,4
ASC (t = 12h)	1880,4±437,1	2734,7±530,8
t _{1/2}	12	8
Cp	0,123±0,021	0,085±0,016
Vd	0,007±0,003	0,007±0,002

(±) - Intervalo de confiança - 95%

t - 0,05

N - 4

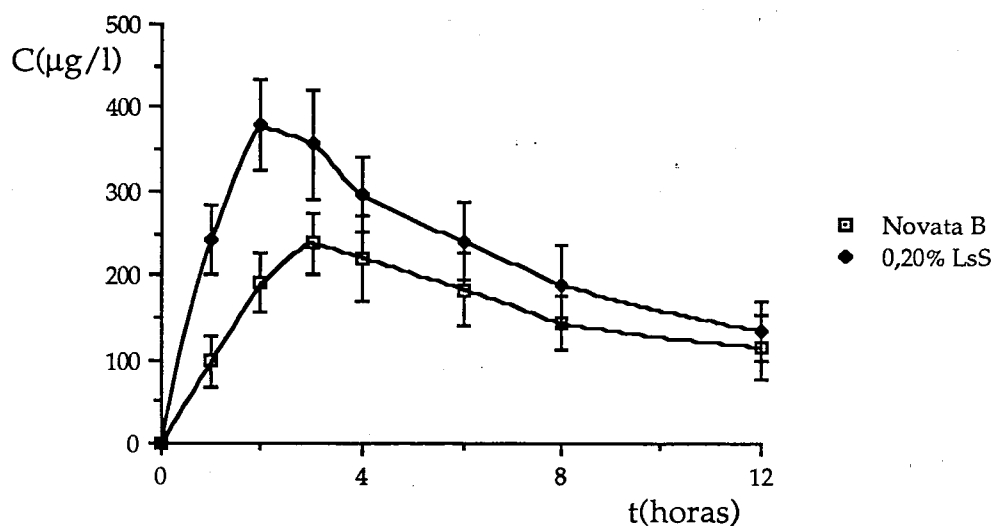


Figura 57 - Concentrações sanguíneas de oxazepam em função do tempo, obtidas em humanos após a administração de supositórios.

3.6.4.2.- Discussão dos resultados

Da análise dos resultados apresentados no Quadro XXXIV e na Fig. 57, pode concluir-se que os supositórios constituem uma forma farmacêutica capaz de veicular o oxazepam com sucesso terapêutico, após alterações de formulação apropriadas.

Embora os ensaios não tenham sido efectuados em indivíduos cujas idades se encontrem localizadas nos grupos etários que justificaram a preparação da forma farmacêutica estudada, é natural que haja paralelismo na biodisponibilidade, principalmente no que se refere à geriatria. De facto, para os idosos, a relação fármaco-excipientes é igual (isto é, a dose, o peso e as dimensões do supositório são as que foram utilizadas no ensaio). Além disso, e do ponto de vista farmacocinético, o oxazepam é uma benzodiazepina metabolizada por glucuronização, não seguindo, por conseguinte, as vias oxidativas enfraquecidas neste grupo etário.

As concentrações máximas encontradas, de $237,6 \pm 37,6$ µg/l obtidas 3 horas após a administração da fórmula sem tensioactivo e de $377,9 \pm 54,2$ µg/l ao fim de 2 horas após a administração da fórmula que contém 0,20% de laurilsulfato de sódio, permitem concluir que os tensioactivos influenciam positivamente a absorção do oxazepam. Portanto, os resultados

encontrados no homem confirmam que o laurilsulfato de sódio actua quer aumentando a absorção, quer originando um deslocamento do máximo de absorção para tempos mais próximos da administração, isto é, a velocidade de absorção é maior. Isto significa que, do ponto de vista farmacológico, origina uma acção mais rápida e mais intensa.

Comparando os resultados da absorção rectal do oxazepam com os referidos em 2.5.5.2.2. para a administração oral, pode afirmar-se que os supositórios com tensioactivo (0,20% de laurilsulfato de sódio) proporcionam níveis de absorção maiores do que os obtidos com igual dose de oxazepam veiculada em comprimidos, sendo idênticos aos alcançados após a administração oral de 25 mg de fármaco..

Nestas circunstâncias, a administração rectal pode constituir uma via alternativa à administração oral do oxazepam.

3.7.- CONCLUSÕES

3.7.1.- INFLUÊNCIA DO EXCIPIENTE

A absorção rectal do oxazepam é influenciada pelo índice de hidroxilo do excipiente. De acordo com os excipientes experimentados, o valor do índice de hidroxilo óptimo encontra-se localizado entre 20-30. Por este motivo, a massa Novata B foi a que originou maior absorção do fármaco.

3.7.2.- INFLUÊNCIA DO LAURILSULFATO DE SÓDIO

A presença do laurilsulfato de sódio promove a absorção rectal do oxazepam.

Em concentrações inferiores à CMC, o laurilsulfato de sódio origina dois fenómenos distintos e aditivos, facilitando não só a cedência do oxazepam a partir da massa fundida, mas também a respectiva absorção.

Em concentrações superiores à CMC, facilita apenas a cedência do oxazepam do excipiente para a ampola rectal.

3.7.3.- ESTABILIDADE E BIOCADUCIDADE

Do ponto de vista químico e biofarmacêutico, os supositórios de oxazepam em Novata B sem ou com 0,20% de laurilsulfato de sódio apresentam boa estabilidade.

3.7.4.- ENSAIO EM HUMANOS

Os supositórios, quando convenientemente formulados, constituem uma preparação farmacêutica capaz de veicular o oxazepam com sucesso terapêutico. De facto, a coadministração do oxazepam com o laurilsulfato de sódio origina uma absorção rectal significativamente maior do que a verificada com igual dose de fármaco administrado por via oral.

CAPÍTULO IV
SOLUÇÕES INJECTÁVEIS DE
LORAZEPAM

4.1- INTRODUÇÃO

A administração parenteral, também chamada injectável, foi utilizada na terapêutica, embora o seu desenvolvimento tivesse início após os estudos realizados por Pasteur sobre a esterilização. Além da necessidade de soluções injectáveis estéreis, a via parenteral exige que as mesmas apresentem pH e tonicidade compatíveis com os tecidos onde serão aplicadas, que sejam apirogênicas e isentas de partículas em suspensão.

Todavia, a importância relativa das características enunciadas na preparação de formas injectáveis é variável. Embora a esterilidade seja condição obrigatória, o pH ou a tonicidade podem variar entre limites que dependem do volume de líquido a administrar ou do efeito terapêutico pretendido.

Na actualidade, um dos problemas mais complicados com que se debate a Tecnologia Farmacêutica está relacionado com a estabilidade química dos medicamentos. A preparação de qualquer forma farmacêutica deve garantir, entre outras características, a integridade molecular dos fármacos incorporados.

Segundo a bibliografia disponível, as benzodiazepinas são compostos que se alteram facilmente por hidrólise quando se encontram na forma de soluções aquosas.

Em relação ao lorazepam, de acordo com a pesquisa realizada na base de dados Dialog: International Pharmaceutical Abstracts(1985-1990), a literatura aí referenciada diz respeito aos trabalhos desenvolvidos no Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Faculdade de Farmácia do Porto e que permitiram ao autor desta dissertação realizar as "Provas de Aptidão Pedagógica e Capacidade Científica"(273,274). As conclusões aí apresentadas foram sem dúvida o ponto de partida para o presente estudo, que teve como objectivo fundamental desenvolver os conhecimentos acerca da degradação hidrolítica do lorazepam quando dissolvido em líquidos de natureza hidrófila. Nestas circunstâncias, este trabalho evoluiu naturalmente no sentido de permitir esclarecer, ou começar a compreender, a influência de alguns factores cuja variação pode contribuir de uma maneira geral para minimizar tanto quanto possível, a degradação hidrolítica do lorazepam. Os factores estudados foram o pH, os solventes e o efeito dos tensoactivos.

A cromatografia líquida de alta pressão foi o método seleccionado para a determinação da estabilidade das soluções de lorazepam.

4.2.- HIDRÓLISE DAS BENZODIAZEPINAS

Nos últimos anos, a estabilidade das benzodiazepinas quando em solução aquosa tem sido objecto de profundo estudo de muitos investigadores. Os mecanismos que comandam a hidrólise das benzodiazepinas, assim como as reacções de equilíbrio destes compostos, foram estudados para o bromazepam, o clonazepam, o clordiazepóxido, o demoxepam, o desmetildiazepam, o diazepam, o flunitrazepam, o nimetazepam, o nitrazepam, o oxazepam e as triazolobenzodiazepinas (alprazolam, brotizolam e triazolam)(275-287).

Com excepção dos trabalhos referentes às triazolobenzodiazepinas, todos os autores são unânimes em afirmar que as benzodiazepinas se alteram facilmente em solução aquosa por duas vias diferentes e que a velocidade de decomposição depende do pH, da temperatura e da força iónica da solução.

De acordo com o que foi dito, as benzodiazepinas são susceptíveis de sofrerem hidrólise ácida ou alcalina em dois locais da molécula:

- na ligação 1,2-amida
- na ligação 4,5-imina.

De uma maneira geral, a hidrólise das benzodiazepinas pode ser explicada de acordo com a Fig. 58, onde se observa a formação de dois compostos intermediários e/ou de dois compostos finais. Os primeiros resultam da cisão da ligação 1,2-amida, que origina 2-amino-5-clorobenzofenona-etilimina(II), e da ligação 4,5-imina, obtendo-se 2-glicilamino-5-clorobenzofenona (III). Os segundos resultam da hidrólise total das benzodiazepinas, originando uma benzofenona (IV) e um derivado glicínico (V).

A etapa inicial corresponde a duas reacções paralelas (e por vezes simultâneas) que, em determinadas condições, podem ser reversíveis. Para cada benzodiazepina, o pKa apresentado na zona ácida representa o principal factor condicionante.

Assim, o composto intermediário II originado por algumas benzodiazepinas (como o diazepam e o oxazepam) existe como anião carboxilato em meios cujo pH seja superior ao pKa do fármaco. Deste modo, a carga apresentada pode diminuir a possibilidade de um ataque nucleofílico à amina aromática, fenómeno que é necessário para que se verifique a reversibilidade. Para valores de pH inferiores ao valor do pKa, o composto intermediário II

existe na forma ácida e, nestas circunstâncias, pode ocorrer a reciclagem.

O composto intermediário III pode apresentar o grupo imina protonado para valores de pH inferiores ao do pKa, pelo que o azoto é ineficaz como nucleofílico; nestas condições, não se verifica a reciclagem. Como a forma base existe para valores de pH superiores ao do pKa, a reversibilidade da reacção de formação do composto intermediário III está muito mais favorecida.

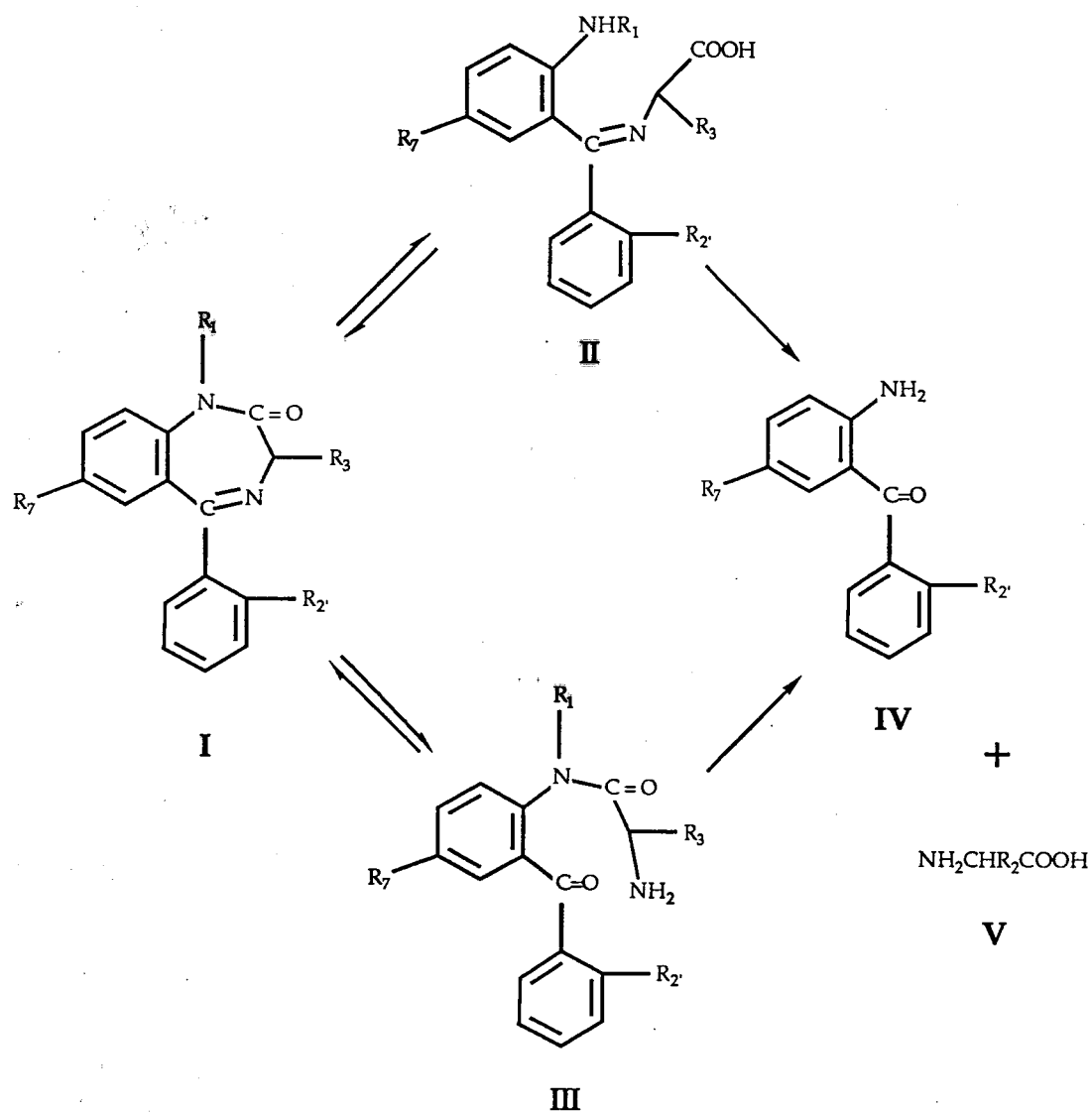


Figura 58 - Hidrólise das benzodiazepinas.

I - Benzodiazepina;

II e III - Compostos intermediários da hidrólise;

IV e V- Benzofenona e derivado glicínico.

4.2.1.- OXAZEPAM

A presença de dois compostos intermediários na hidrólise do oxazepam torna válido o esquema representado na Fig 58 para todos os valores de pH. Contudo, a valores de pH superiores ao valor do pKa forma-se principalmente o composto intermediário II, enquanto a valores de pH inferiores ao do pKa se observa um comportamento cinético bifásico. Nestas condições, o esquema só é compatível com as afirmações anteriores se a transformação dos compostos intermediários II e III nos compostos finais IV e V for de igual grandeza.

Assim, a valores de pH superiores ao do pKa, o esquema representado na Fig. 59 é o que apresenta maior probabilidade de ocorrer. De facto, esta via de degradação hidrolítica é favorecida pela reciclagem do composto intermediário III e pela ausência de reversibilidade de I para II.

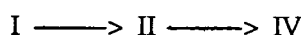


Figura 59 - Hidrólise do oxazepam (pH>pKa).

Do ponto de vista estérico, também a cisão na ligação 1,2-amida é mais fácil do que na ligação 4,5-imina.

A competitividade observada a valores de pH inferiores ao do pKa é atribuída às diferenças existentes na reversibilidade das etapas hidrolíticas iniciais. Também a protonação do azoto imínico favorece o ataque nucleofílico à posição 5 do oxazepam.

4.2.2.- DIAZEPAM

A hidrólise do diazepam processa-se através da formação do composto intermediário III, como se indica no esquema da Fig. 60. Aparentemente, no diazepam a cisão da ligação 4,5-imina é facilitada pela presença de um substituinte metilo no azoto amídico.



Figura 60 - Hidrólise do diazepam (pH<pKa).

Para valores de pH inferiores ao do pKa, o composto intermediário III não sofre

reciclagem, originando uma cinética hidrolítica bifásica.

Para valores de pH superiores ao do pKa, o composto intermediário III pode reciclar-se, segundo uma cinética monofásica (Fig. 61).

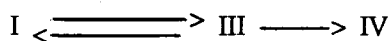


Figura 61 - Hidrólise do diazepam (pH > pKa).

4.2.3.- CLORODIAZEPÓXIDO

O clorodiazepóxido representa um caso especial na hidrólise das 1,4-benzodiazepinas. Pela observação do esquema da Fig. 62, verifica-se que o clorodiazepóxido (Ia) se transforma inicialmente em demoxepam (I), por cisão do grupo metilamino na posição 2. Para que esta etapa hidrolítica ocorra é necessário que o pH da solução seja inferior a 10 e superior ao pKa do clorodiazepóxido. A valores de pH superiores a 10, o clorodiazepóxido origina demoxepam a uma velocidade hidrolítica mais lenta do que a transformação deste nos compostos intermediários II e/ou III. Nestas condições, a reação do demoxepam num intermediário hidrolítico não apresenta uma cinética verdadeira, pois depende da velocidade de hidrólise do clorodiazepóxido.

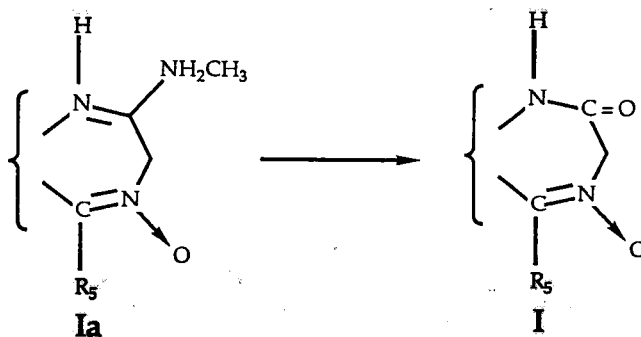


Figura 62 - Hidrólise do clorodiazepóxido em demoxepam.

Após o aparecimento do demoxepam resultante do clorodiazepóxido, o mecanismo de hidrólise depende fundamentalmente do pH.

Para valores de pH inferiores ao do pKa do demoxepam, ocorre uma cinética

monofásica, por cisão da ligação 1,2-amida. Embora nesta etapa hidrolítica o composto intermediário resultante (II) possa reciclar-se, não se exclui a cisão da ligação 4,5-imina originando a benzofenona respectiva (IV). A estes valores de pH o grupo N-óxido pode ser protonado e a posição 5, que estava impedida estericamente dum ataque nucleofílico, passa a competir com o carbono do grupo carbonilo, resultando deste facto os compostos finais.

A reciclagem do composto intermediário II faz com que nesta zona de valores de pH a hidrólise do demoxepam se processe de acordo com o esquema da Fig 63.

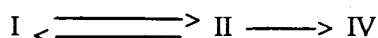


Figura 63 - Hidrólise do demoxepam (pH < pKa).

Para valores de pH superiores ao do pKa do demoxepam, a velocidade de formação do composto intermediário II é mais significativa do que a do III, pois a protonação do grupo N-óxido da forma base conjugada não permite um ataque nucleofílico à posição 5.

Nesta zona de pH não se verifica a reciclagem, o que faz com que a hidrólise do demoxepam possa ser representada de acordo com o esquema da Fig. 64.

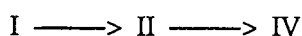


Figura 64 - Hidrólise do demoxepam (pH > pKa).

4.2.4.- LORAZEPAM

Como já foi dito, não existem (ou não foram encontrados nas fontes utilizadas) trabalhos referentes ao mecanismo de hidrólise do lorazepam. Também não foi objectivo deste estudo a definição do referido mecanismo, mas sim a determinação da estabilidade química do lorazepam em solventes próprios para injectáveis, atendendo ao valor do pH da solução e aos tipos de adjuvantes a utilizar.

4.3.- HIDRÓLISE DO LORAZEPAM

A cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) foi o método analítico utilizado na avaliação da estabilidade do lorazepam, pois permite separar e dosear em simultâneo o lorazepam e os seus produtos de degradação. Assim, foi possível observar nos cromatogramas obtidos durante a realização do ensaio o seguinte facto: à medida que diminuía o "pico" correspondente ao lorazepam, surgia um outro perfeitamente separado e individualizado que correspondia ao(s) produto(s) de decomposição.

Nessa altura estudava-se a estabilidade do lorazepam num solvente constituído por água/propilenoglicol (25:75). Na tentativa de identificar os produtos resultantes da hidrólise, inicialmente estudou-se o comportamento cromatográfico da 2-amino-5,2'-diclorobenzofenona p. a. (Aldrich), benzofenona resultante da hidrólise ácida do lorazepam. O tempo de retenção do pico correspondente àquele composto era diferente do do pico correspondente ao(s) produto(s) de degradação obtido nos cromatogramas do ensaio de decomposição acelerada. Este facto originou um prolongamento do ensaio de decomposição acelerada até ao desaparecimento (ou perda de sensibilidade do método nas condições indicadas em 4.4.2.2.) do pico correspondente ao lorazepam, continuando a aumentar de tamanho o pico do(s) composto(s) de hidrólise e a manter-se a ausência do pico correspondente à benzofenona final.

Neste momento do estudo, pensou-se que o pico cromatográfico deveria corresponder a um ou a ambos os compostos intermediários de hidrólise do lorazepam, a 2-glicilamino-5,2'-diclorobenzofenona e/ou a 2-amino-5,2'-diclorobenzofenona-etilimina.

Como não se encontrava comercializado nenhum dos compostos referidos no parágrafo anterior, a etapa seguinte deste estudo foi a separação por cromatografia em camada fina, extracção e identificação do(s) produto(s) correspondente(s) à banda linear obtida.

4.3.1.- MATERIAL E MÉTODOS

O lorazepam apresenta um pKa de 1,3 (288).

O solvente utilizado apresenta um pH de 5,33.

Para a síntese dos compostos resultantes da hidrólise do lorazepam, trabalhou-se

nas condições utilizadas na realização do ensaio de decomposição acelerada e indicadas em 4.4.2.1. A solução de lorazepam no solvente constituído por água/propilenoglicol nas proporções já referidas foi colocada em estufa termorregulada a 80° C. A hidrólise foi verificada por HPLC, retirando-se a solução da estufa após o desaparecimento total do pico correspondente ao lorazepam. A separação do lorazepam dos produtos de degradação foi feita utilizando a cromatografia em camada fina. A extracção dos compostos intermediários de hidrólise foi feita com éter etílico. A identificação dos compostos extraídos foi efectuada por comparação com o lorazepam e a 2-amino-5,2'-diclorobenzofenona.

4.3.1.1.- Ensaio de decomposição acelerada

O material, os métodos e as técnicas utilizadas na realização deste ensaio estão indicadas em 4.4.2.1.

4.3.1.2.- Cromatografia líquida de alta pressão

O material, os métodos e as técnicas utilizadas na realização deste ensaio estão indicadas em 4.4.2.2.

Como se pode observar nos cromatogramas apresentados na Fig 65, mesmo utilizando misturas de líquido eluente com composição diferente, o pico correspondente aos compostos intermediários de hidrólise permanecia perfeitamente individualizado.

4.3.1.3.- Cromatografia em camada fina e extracção dos produtos de hidrólise

Os compostos intermediários da hidrólise do lorazepam foram separados por cromatografia em camada fina ascendente (16 cm), à temperatura de 22° C. Utilizaram-se placas de gele de sílica 60 GF254, de 10x20 cm.

O líquido de desenvolvimento(289) seleccionado foi uma mistura de clorofórmio/acetona (90:10 V/V) que, para os compostos em solução, originava bandas lineares com valores de R_f diferentes: 0,74 para o(s) composto(s) a identificar, 0,97 para a 2-amino-

-5,2'-diclorobenzofenona e 0,16 para o lorazepam.

A detecção foi feita por exposição à luz UV de 254 nm.

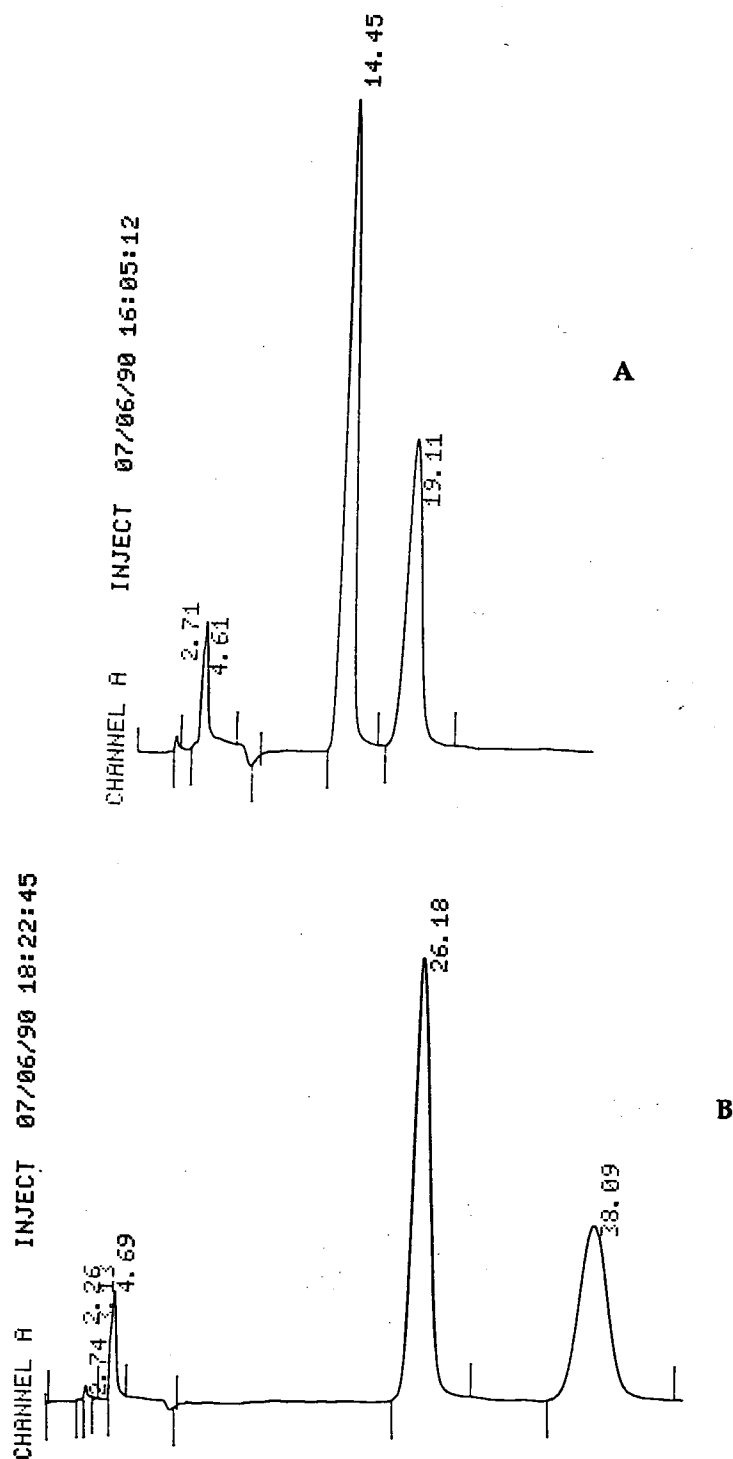


Figura 65 - Cromatogramas obtidos com as seguintes composições de eluente:

A - eluição isocrática com metanol em água (67/33 V/V);

B - eluição isocrática com metanol em água (60/40 V/V).

Método operatório:

Dilua a solução obtida em 4.4.2.1. com igual volume de éter etílico. Aplique 0,3 ml em placa de gele de sílica 60 GF254. Seque à temperatura ambiente. Coloque a placa numa câmara saturada com clorofórmio/acetona (90:10 V/V). Desenvolva no percurso de 16 cm com a fase móvel. Seque. Exponha a placa à luz UV de 254 nm. Destaque a banda linear correspondente ao(s) produto(s) a identificar. Extraia com éter etílico (5x20 ml). Junte as fracções etéreas. Filtre. Evapore à secura.

Retome o resíduo obtido com 25 ml de éter etílico. Aplique em placa de gele de sílica 60 GF254.

Repita o tratamento indicado para a solução inicial e exsique com pentóxido de fósforo até peso constante.

4.3.1.4.- Identificação

Para a identificação da substância obtida foram utilizadas as técnicas analíticas que se indicam a seguir para o produto a identificar, para o lorazepam e para a 2-amino-5,2'-diclorobenzofenona.

4.3.1.4.1.- Ponto de fusão

As características de fusão determinaram-se em bloco Köfler e não foram corrigidas.

Os resultados obtidos foram os seguintes:

- lorazepam: 159-160 °C
- 2-amino-5,2'-diclorobenzofenona: 87-89 °C
- produto de hidrólise: 59-64 °C.

O intervalo de fusão do produto de síntese é elevado, fazendo supôr que se trata de uma mistura de compostos.

4.3.1.4.2.- Espectrofotometria no infravermelho (IV)

Os espectros foram registados num espectrofotómetro Perkin-Elmer modelo 257. Utilizaram-se pastilhas de brometo de potássio contendo cerca de 1% da amostra.

Os resultados obtidos (Anexo III - espectros das Figs. 88, 89 e 90) levam a admitir a formação de dois compostos diferentes, resultantes da hidrólise do lorazepam.

Assim, considerando o espectro do produto de hidrólise, pode observar-se que:

- a banda a 1720 cm^{-1} , correspondente à frequência de estiramento do carbonilo carboxílico, sugere a formação da 2-amino-5,2'-diclorobenzofenona-etilimina.

- as bandas a $1050\text{-}1075\text{ cm}^{-1}$, correspondentes à frequência de vibração do grupo amina primária, sugerem a formação da 2-glicilamino-5,2'-diclorobenzofenona.

4.3.1.4.3.- Espectrofotometria no ultravioleta (UV)

Os espectros (Anexo III - Figs. 91, 92 e 93) foram obtidos num espectrofotómetro Hitachi U-2000. O solvente usado foi o álcool etílico p.a. (Merck).

4.3.1.4.4.- Ressonância magnética nuclear (RMN)

Os espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C foram registados num espectrofotómetro Brücker Pulser NMR Spectrometer NR 200AF, usando-se como padrão interno o TMS (Stoher Isotope Chemicals). Os desvios químicos foram registados em unidades de δ e as constantes de acoplamento (J) em Hz.

4.3.1.4.4.1.- RMN de ^1H

Os espectros de RMN de ^1H do lorazepam, da 2-amino-5,2'-diclorobenzofenona e do produto de hidrólise (Anexo III - Figs. 94, 95 e 96) sugerem a formação da 2-amino-5,2'-diclorobenzofenona-etilimina, já que a hidrólise do grupo amida poderá justificar o sinal

observado a 10,149 ppm no espectro do produto de hidrólise.

Por outro lado, esta técnica espectrofotométrica não permite excluir a hipótese de formação da 2-glicilamino-5,2'-diclorobenzofenona. Na verdade, uma vez que o carbono imínico não se encontra ligado a átomos de hidrogénio, o eventual efeito hidrolítico deste grupo será melhor estudado por RMN de ^{13}C .

4.3.1.4.2.- RMN de ^{13}C

Embora o RMN de ^1H aponte para a hidrólise do grupo amida, tal efeito não pode ser acompanhado por RMN de ^{13}C , em virtude de se verificar um efeito protector equivalente quer a nível da amida, quer a nível da função carboxílica.

Todavia, os resultados dos espectros do lorazepam, da 2-amino-5,2'-diclorobenzofenona e do produto de hidrólise (Anexo III - Figs. 97, 98 e 99) sugerem que a cisão tenha ocorrido ao nível do grupo imina, como se observa pelo sinal a 193,448 ppm no espectro do produto de hidrólise, sinal esse que também está presente no espectro relativo à 2-amino-2,5'-diclorobenzofenona.

Em conclusão, pode admitir-se a formação de dois compostos diferentes, a 2-amino-5,2'-diclorobenzofenona-etilimina e o 2-glicilamino-5,2'-diclorobenzofenona, resultantes, respectivamente, da hidrólise do grupo amida (visível por RMN de ^1H) e do grupo imina (visível por RMN de ^{13}C).

4.3.2.- HIDRÓLISE DO LORAZEPAM ANALISADA POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA FINA

De acordo com o esquema apresentado na Fig. 66 (e face aos resultados obtidos na extracção e identificação dos compostos de hidrólise) é provável a existência de uma mistura e que os compostos que a constituem sejam a 2-amino-5,2'-diclorobenzofenona-etilimina e a 2-glicilamino-5,2'-diclorobenzofenona.

De facto, não foi possível separar os compostos presentes na mistura, quer utilizando a cromatografia em camada fina (conforme o descrito em 4.3.1.3.), que originou o

aparecimento de uma "mancha" com valor de Rf bem definido, quer utilizando a cromatografia líquida de alta pressão (conforme o descrito em 4.4.2.2.), que originou um "pico" perfeitamente individualizado com um tempo de retenção bem definido.

Nestas circunstâncias, e recorrendo à cromatografia em camada fina, seleccionou-se um líquido eluente com características diferentes do utilizado anteriormente e que permitisse a separação dos componentes da mistura previamente isolada.

4.3.2.1.- Ensaio de decomposição acelerada

O material, os métodos e as técnicas utilizadas na realização deste ensaio estão indicadas em 4.4.2.1.

Foram preparadas soluções de lorazepam 10^{-3} M, usando como solvente as soluções tampão de pH 1,2 e pH 5,0 da USP XXII/NF XVII.

4.3.2.2.- Cromatografia em camada fina

Para a realização da cromatografia em camada fina seleccionou-se um líquido de desenvolvimento constituído por clorofórmio/tolueno/metanol (58:42:7). Este líquido eluente foi utilizado por Han *et al.*(285) no estudo do mecanismo hidrolítico do diazepam e do oxazepam. Devido à semelhança estrutural do lorazepam e do oxazepam, pensou-se que poderia ser usado com êxito na separação dos compostos que constituem a mistura anteriormente isolada e na definição do mecanismo de hidrólise do lorazepam para os valores de pH indicados, já que os compostos presentes apresentariam valores de Rf diferentes.

4.3.2.3.- Preparação das soluções padrão

Para avaliar o Rf no líquido eluente em questão, prepararam-se soluções padrão de lorazepam 10^{-3} M, da mistura isolada de acordo com o indicado em 4.3.1.3. e de 2-amino-5,2'-diclorobenzofenona em clorofórmio.

4.3.2.4.- Extração e concentração dos compostos presentes nas soluções em estudo

Os compostos presentes em amostras correspondentes a vários tempos de ensaio foram extraídos com clorofórmio e concentrados. A separação foi efectuada por cromatografia em camada fina ascendente (16cm), à temperatura de 22°C. Utilizaram-se placas de gele de sílica 60 GF254, de 10x20 cm.

Como já foi referido, o líquido de desenvolvimento usado foi uma mistura de clorofórmio/tolueno/metanol (58:42:7), no qual os compostos presentes na solução apresentaram bandas lineares com valores de Rf diferentes.

A detecção foi feita por exposição à luz UV de 254 nm.

Em seguida, os compostos intermediários resultantes da hidrólise foram diferenciados com solução de 2,4-dinitrofenil-hidrazina.

Método operatório:

Extraia 5 ml da solução obtida em 4.3.2.1. com 3 x 5 ml de clorofórmio. Junte aos extractos clorofórmicos 2 g de sulfato de sódio anidro (p. a. Merck). Agite. Filtre. Evapore à secura o clorofórmio à temperatura de 35 °C com auxílio do vazio. Junte ao resíduo 2 ml de clorofórmio. Aplique 0,1 ml em placa de gele de sílica 60 F254. Seque à temperatura ambiente. Coloque a placa numa câmara saturada com clorofórmio/tolueno/metanol (52:48:7). Desenvolva no percurso de 16 cm com a fase móvel. Exponha a placa à luz UV de 254 nm. Pulverize a placa com solução de 2,4-dinitrofenil-hidrazina.

4.3.3.- DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Na realização do ensaio de cromatografia em camada fina, nas condições anteriormente referidas, os compostos presentes nas soluções padrão apresentaram os seguintes valores de Rf:

- lorazepam: 0,55;
- 2-amino-5,2'-diclorobenzofenona: 0,85;
- produtos de hidrólise: bandas lineares em 0,71 e 0,79.

Como se verifica pelos valores de Rf, o líquido de desenvolvimento usado separou

os compostos resultantes da hidrólise do lorazepam. À luz UV de 254 nm detectaram-se duas bandas lineares com intensidade diferente. Todavia, a banda linear com valor de Rf 0,71 apresentava uma intensidade muito maior do que a de Rf 0,79.

Já foi referido que as duas bandas lineares obtidas correspondem provavelmente aos compostos intermediários de hidrólise do lorazepam, a 2-amino-5,2'-diclorobenzofenona-etilimina e a 2-glicilamino-5,2'-diclorobenzofenona. É possível identificar a banda que corresponde a cada um destes compostos pulverizando a placa cromatográfica com solução de 2,4-dinitrofenil-hidrazina. Este reagente é específico dos grupos carbonilo de natureza aldeídica ou cetónica, originando cor amarela(290). Uma das diferenças na estrutura química destes compostos é precisamente a presença de um grupo cetona na 2-glicilamino-5,2'-diclorobenzofenona, isto é, no composto resultante da cisão ao nível da ligação 4,5-imina.

A banda com valor de Rf 0,71 corou de amarelo.

Nestas circunstâncias, a banda linear de Rf 0,71 corresponderia à 2-glicilamino-5,2'-diclorobenzofenona e a banda de Rf 0,79 à 2-amino-5,2'-diclorobenzofenona-etilimina.

Portanto, pode afirmar-se que a hidrólise do lorazepam no solvente constituído por água/propilenoglicol (25:75) origina simultaneamente a 2-amino-5,2'-diclorobenzofenona-etilimina e a 2-glicilamino-5,2'-diclorobenzofenona, embora este último se forme em maior quantidade.

Nas condições em que decorreu o ensaio de decomposição acelerada, não se forma a 2-amino-5,2'-diclorobenzofenona como composto de hidrólise do lorazepam.

Assim, e de acordo com o conceito habitual de prazo de validade de uma forma farmacêutica destinada à administração injectável (degradação de 10% do princípio activo contido na fórmula), é possível afirmar que nesse período de tempo não se forma, ou pelo menos não foi detectada, a 2-amino-5,2'-diclorobenzofenona, mas sim os compostos intermediários de hidrólise.

A actividade do lorazepam depende apenas da integridade da molécula, já que os compostos intermediários de hidrólise não possuem qualquer actividade farmacológica sobre o SNC(291).

De acordo com os resultados obtidos na hidrólise do lorazepam nas soluções tampão ensaiadas, pode concluir-se que o composto apresenta dois comportamentos distintos, consoante o pH da solução onde está dissolvido se encontra abaixo ou acima do valor do pKa do fármaco.

Na solução tampão de pH 1,2, cujo valor de pH é inferior ao do pKa, formam-se os dois compostos intermediários. Contudo, à medida que o tempo de hidrólise aumenta, começa a observar-se a formação da 2-amino-5,2'-diclorobenzofenona. Portanto, a reacção hidrolítica do lorazepam apresenta um comportamento cinético bifásico. A este valor de pH a largura das bandas para os compostos intermediários é ligeiramente maior para a de Rf 0,71. A banda de menor largura, Rf 0,79, após pulverização das placas cromatográficas com a solução de 2,4-dinitrofenil-hidrazina, corou de amarelo. Deste modo, é legítimo afirmar que a cisão ao nível da ligação 1,2-amida é mais fácil do que ao nível da ligação 4,5-imina.

Em relação ao oxazepam, Han *et al.*(285) afirmam que a estes valores de pH o ataque nucleofílico à posição 5 é favorecido pela protonação do grupo imina, sendo a intensidade das bandas dos compostos intermediários igual. Em função dos resultados obtidos com o lorazepam, pode concluir-se que possivelmente a presença de um grupo electronegativo na posição 2' evita a protonação do grupo imina por impedimento estérico e favorece indirectamente a cisão da ligação 1,2-amida.

Na solução tampão de pH 5,0, valor superior ao do pKa do lorazepam, também aparecem os dois compostos intermediários. A intensidade das bandas correspondentes aos compostos intermediários é muito maior para a de Rf 0,71. Esta banda corou de amarelo após pulverização das placas cromatográficas com a solução de 2,4-dinitrofenil-hidrazina, permitindo afirmar que a cisão ao nível da ligação 4,5-imina é mais fácil.

Para o oxazepam, Han *et al.*(285) afirmam que, a valores de pH superiores ao do pKa, a reciclagem do composto intermediário obtido por cisão ao nível da ligação 4,5-imina e a ausência de reversibilidade do composto intermediário obtido da cisão da ligação 1,2-amida, permitem representar o mecanismo hidrolítico conforme se indica no esquema da Fig 59. Em função dos resultados obtidos na análise cromatográfica para o lorazepam, precisamente contrários aos encontrados para o oxazepam, pode afirmar-se que a presença de um grupo electronegativo na posição 2' impede estericamente a reciclagem da 2-glicilamino-5,2'-diclorobenzofenona.

Estas hipóteses são confirmadas por Maupas *et al.*(292), os quais afirmam que os efeitos estéricos são os responsáveis pela diminuição da basicidade da função imina quando o átomo de carbono da posição 3 está substituído por um grupo hidroxilo (oxazepam e lorazepam) ou quando o segundo anel benzénico é substituído por um átomo de cloro na posição *orto* (lorazepam).

4.4.- PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES INJECTÁVEIS

A técnica de preparação da solução de lorazepam deverá obedecer aos cuidados inerentes à manipulação de medicamentos destinados à administração parenteral: utilização de água própria para injectáveis, de acordo com as especificações da FP V, ou de outros solventes com elevada qualidade, e execução das operações tecnológicas apropriadas em condições ambientais adequadas.

A água é o líquido mais abundante no corpo humano, sendo por este motivo o veículo mais utilizado para a obtenção de preparações injectáveis. De facto, do ponto de vista fisiológico, a sua introdução no organismo é preferível à de qualquer outro solvente. A esta circunstância, junta-se a facilidade da sua obtenção.

Contudo, no caso das benzodiazepinas em geral, e do lorazepam em particular, não se verifica a preferência pela água como veículo medicamentoso fundamentalmente por duas razões:

- pela impossibilidade de dissolução do fármaco, em concentrações terapêuticas,
- pela facilidade de alteração por hidrólise, à temperatura ambiente.

Perante esta realidade, é pois razoável que se procure encontrar solventes hidrófilos, de modo a modificarem positivamente estes dois inconvenientes.

Atendendo às características físico-químicas do lorazepam, o problema de dissolução do fármaco em concentrações terapêuticas é de fácil resolução, bastando para o efeito recorrer a solventes que apresentem valores de constante dielétrica mais baixa do que a água e que com ela sejam miscíveis. Como o lorazepam é um fármaco que se dissolve bem, pelo menos em concentrações terapêuticas, em líquidos com valores de constante dielétrica próxima de 50, este problema resolve-se com facilidade recorrendo a misturas hidroalcoólicas.

A estabilidade química do lorazepam em solução aquosa ou em misturas hidroalcoólicas representa para o Tecnologista a grande questão a resolver. Assim, além do recurso a solventes constituídos por misturas hidroalcoólicas, pode escolher-se o pH de acordo com a estabilidade máxima apresentada pelo fármaco e adicionar adjuvantes que eventualmente possam contribuir para minimizar a degradação hidrolítica do princípio activo.

4.4.1.- MATERIAL E MÉTODOS

Relativamente ao modo de preparação das soluções e à respectiva concentração em lorazepam, o presente estudo pode dividir-se em duas fases. Na primeira estudou-se a estabilidade do lorazepam em função do pH. A concentração de fármaco foi de $6,2 \times 10^{-5}$ M (2mg/100 ml), o que está de acordo com as concentrações indicadas na bibliografia referida em 4.2. para outras benzodiazepinas. Na segunda fase, em que foram utilizados solventes hidrófilos simples ou compostos com interesse tecnológico na preparação de soluções injectáveis, a concentração de lorazepam foi escolhida em função da dose terapêutica e dos objectivos a alcançar (5mg/ml)(293).

4.4.1.1.- Reagentes

O lorazepam apresentava as características indicadas no Anexo II.

A água destilada utilizada na preparação das soluções injectáveis foi produzida por termocompressão em destilador Ponzini (modelo BD/E - SA) e a respectiva resistividade estava compreendida entre 0,8 e 1,0 M Ω .

Os outros solventes utilizados foram a glicerina, o PEG 400 e o propilenoglicol comerciais.

As soluções tampão utilizadas estão indicadas na USP XXII/NFXVII, tendo-se usado na sua preparação substâncias com características pró-análise (Merck).

Utilizou-se cloreto de benzalcónio p.a. (Sigma), laurilsulfato de sódio p.a. (Merck) e Tween 80 p.a. (Merck).

As ampolas de vidro corado, de 2 ml, satisfaziam ao ensaio de resistência hidrolítica incluído na FP V para o vidro do tipo II.

4.4.1.2.- Aparelhagem

Estufas Elektro-Helios, 284-54-C e Heraeus, FB-420.

A restante aparelhagem utilizada encontra-se referenciada ao longo deste trabalho.

4.4.1.3.- Acondicionamento

A solução de lorazepam foi acondicionada em ampolas de vidro âmbar com a capacidade de 2 ml.

Optou-se por um vidro do tipo II, pois é o mais resistente ao ataque hidrolítico das soluções neutras ou ácidas(294). A escolha de um vidro corado (âmbar) ficou a dever-se ao facto de ele proteger o fármaco da luz, eliminando as reacções fotolíticas que eventualmente possam ocorrer(279,295).

4.4.1.4.- Enchimento e fecho das ampolas

O método de enchimento adoptado foi o unitário, pois o enchimento por vazio afigurava-se difícil, devido principalmente à presença dos tensioactivos. Além disso, a viscosidade do solvente torna a lavagem do colo das ampolas de difícil execução, podendo até falsear os resultados da avaliação da estabilidade.

O fecho foi realizado procedendo-se à soldadura manual com chama de gás propano.

4.4.1.5.- Esterilização

O propilenoglicol foi previamente esterilizado pelo calor seco à temperatura de 140 °C, durante 120 minutos. Em ambiente asséptico procedeu-se à preparação da solução injectável de lorazepam em propilenoglicol. A esterilização desta solução foi efectuada pelo calor seco à temperatura de 100° C, durante 30 minutos.

4.4.2.- AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DA SOLUÇÃO INJECTÁVEL

Apesar de as benzodiazepinas se alterarem facilmente quando conservadas à temperatura ambiente, a análise da estabilidade das soluções de lorazepam foi realizada por decomposição acelerada e segundo o método proposto por Garrett(296).

De maneira a eliminar possíveis desvios à equação de Arrhenius que acontecem a temperaturas elevadas, Garrett aconselha que os ensaios decorram a temperaturas inferiores a 70^o C. No entanto, outros investigadores conduziram os ensaios a temperaturas superiores (80 a 100^o C) e os resultados encontrados foram praticamente coincidentes, para as formas farmacêuticas estudadas, com os obtidos de acordo com a equação de Garrett(297-299). Os trabalhos encontrados acerca da avaliação da estabilidade das benzodiazepinas, e em particular os realizados no Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Faculdade de Farmácia do Porto, decorreram normalmente a temperaturas superiores(300). Assim, as temperaturas seleccionadas para a realização dos ensaios foram de 60 e 80^o C.

4.4.2.1.- Ensaio de decomposição acelerada

Coloque as ampolas em estufas termorreguladas para a temperatura de 60 e para a de 80 °C. Retire amostras das estufas em tempos previamente estabelecidos. Congele as amostras e conserve-as assim até ao momento da análise.

A avaliação do teor de lorazepam na solução injectável foi executada antes e durante o ensaio, em tempos previamente estabelecidos e utilizando a técnica analítica descrita em 4.4.2.2.

4.4.2.2.- Cromatografia líquida de alta pressão

As amostras, depois de descongeladas, foram diluídas e injectadas no cromatógrafo. Igual procedimento foi aplicado à solução mãe de lorazepam.

4.4.2.2.1.- Condições de análise

O doseamento efectuado por HPLC obedeceu às seguintes condições:

pré-coluna-Alltech C-18, enchimento com partículas de 30-40 µm de diâmetro.

coluna-Perkin-Elmer C-18 Sil-X-10, modelo 409028, com 4,6 mm de diâmetro interno e 25 cm de comprimento, enchimento com partículas de 10 µm de diâmetro;

volume de líquido injectado-20 µl;

composição do eluente-elução isocrática de metanol em água (67/33 V/V);

velocidade de fluxo-0,7 ml.min⁻¹;

deteccção-espectrofotométrica em 230 nm;

acerto automático do zero-no tempo zero;

sistema de registo-integrador Varian, modelo 4290;

atenuação-16;

sensibilidade de deteccção à largura de pico-6;

Utilizou-se como padrão interno o desmetildiazepam.

Os tempos de retenção médios foram os seguintes:

- lorazepam - 11,15 minutos;
- compostos intermediários de hidrólise - 19,48 minutos;
- 2-amino-5,2'-diclorobenzofenona - 24,50 minutos;
- desmetildiazepam - 14,21 minutos.

4.4.2.2.2.- Reagentes

Solução mãe de padrão interno: solução de 100 mg de desmetildiazepam em metanol até perfazer 1000,0 ml.

Solução de padrão interno: dilua 10,0 ml de solução mãe com metanol até 100,0 ml.

Solução padrão de lorazepam: pese rigorosamente 100 mg de lorazepam. Dissolva em metanol e complete 1000,0 ml com o mesmo solvente. Para balão marcado de 100 ml meça 40,0 ml desta solução e complete o volume com metanol. Junte 0,5 ml desta diluição a 1,5 ml de solução de padrão interno. Homogenize em vórtex. Filtre por filtro de 0,45 µm.

Solução padrão de 2-amino-5,2'-diclorobenzofenona: pese rigorosamente 200 mg de

2-amino-5,2'-diclorobenzofenona. Dissolva em metanol e complete 1000,0 ml com o mesmo solvente. Junte 0,5 ml desta solução a 1,5 ml de solução de padrão interno. Homogenize em vórtex. Filtre por filtro de 0,45 μm .

Solução para determinar o teor total de lorazepam nas soluções: antes de iniciar o ensaio de decomposição junte 0,5 ml de solução de lorazepam a 1,5 ml de solução de padrão interno. Homogenize em vórtex. Filtre por filtro de 0,45 μm .

Solução problema: junte 0,5 ml da solução retirada da estufa no tempo t de ensaio a 1,5 ml de solução de padrão interno. Homogenize em vórtex. Filtre por filtro de 0,45 μm .

4.4.2.2.3.- Análise cromatográfica das amostras e curvas de calibração

Para a solução problema, as soluções padrão e a solução para determinar o teor total de lorazepam em solução, os valores apresentados correspondem à média de três injeções da mesma amostra.

O teor de lorazepam em cada solução problema foi determinado do seguinte modo:

-calcular as médias das alturas dos picos cromatográficos do fármaco em análise e do padrão interno nos cromatogramas padrão e nos cromatogramas das soluções problema.

-calcular a razão entre as alturas médias dos picos do lorazepam e da 2-amino-5,2'-diclorobenzofenona e a do padrão interno, relacionar esses valores com a concentração do fármaco ($\mu\text{g/ml}$) na solução padrão.

As curvas de calibração obtiveram-se usando a seguinte técnica:

Introduza 20 mg de lorazepam ou 200 mg de 2-amino-5,2'-diclorobenzofenona em cada um de 6 balões de 1000 ml. Dissolva com o líquido de dissolução correspondente e complete o volume. Filtre. Dilua o filtrado convenientemente. Junte 0,5 ml destas diluições a 1,5 ml de solução de padrão interno. Homogenize em vórtex. Filtre por filtro de 0,45 μm .

Devido ao número de solventes ensaiados e à sobreposição obtida para as diferentes curvas de calibração, nas Figs. 66 e 67 apenas se indicam as concentrações e as respectivas razões das alturas, bem como as curvas de calibração para o lorazepam e a 2-amino-5,2'-diclorobenzofenona no solvente constituído por água/propilenoglicol (25:75).

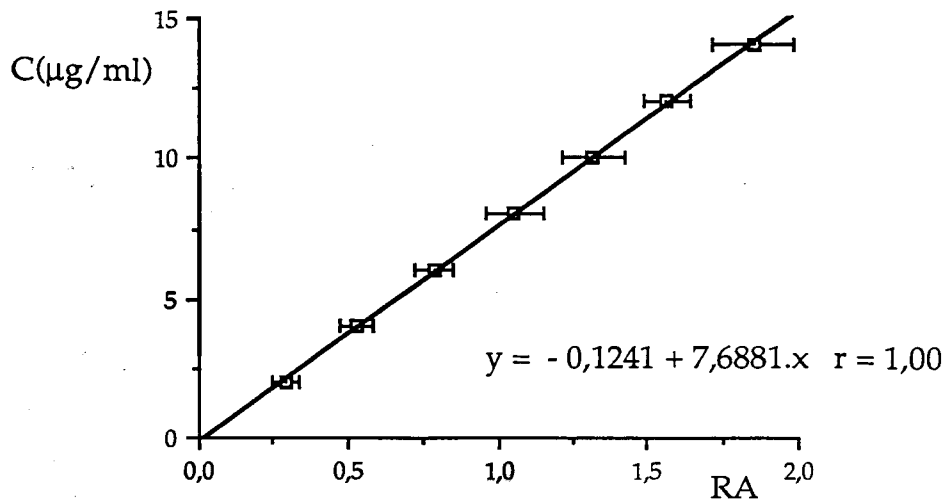


Figura 66 - Estudo da resposta do detector para várias concentrações de lorazepam.
RA - Razão da altura lorazepam/desmetildiazepam.

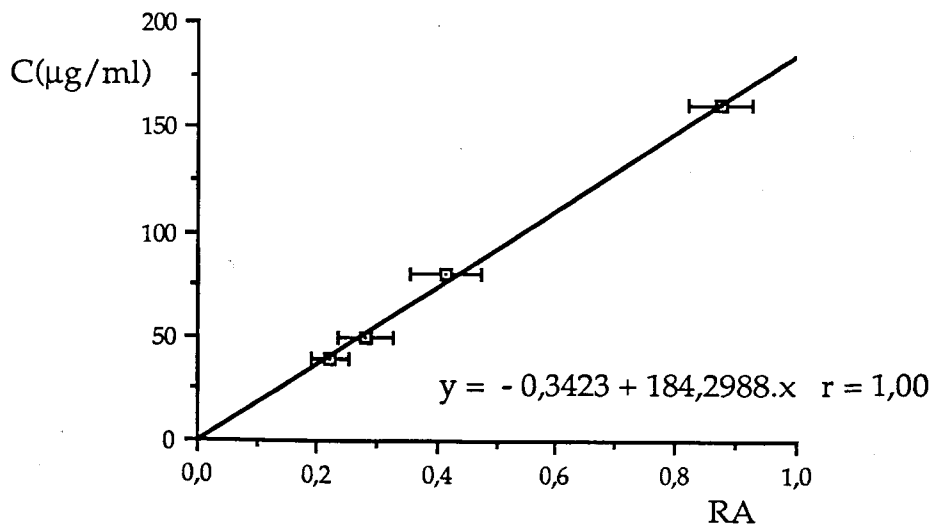


Figura 67 - Estudo da resposta do detector para várias concentrações de 2-amino-5,2'-diclorobenzofenona. RA - Razão da altura 2-amino-5,2'-diclorobenzofenona/desmetildiazepam.

4.4.3.- RESULTADOS E ESTUDO ESTATÍSTICO

Depois da execução desta técnica, determinou-se a estabilidade do lorazepam em função do tempo, calculando-se a concentração de fármaco em solução para as temperaturas a que se operou e construíram-se os gráficos em que se relacionam as concentrações e os tempos.

A interpretação dos gráficos mostrou que existia uma relação linear entre o logaritmo da concentração e o tempo. Nestas circunstâncias, aplicando a equação correspondente às reacções de ordem um, calcularam-se as velocidades específicas de decomposição às temperaturas a que decorreu o ensaio.

A energia de activação, o factor de frequência e a velocidade específica de decomposição foram calculadas aplicando a equação de Arrhenius.

Os resultados referentes ao ensaio de avaliação da estabilidade são expressos em relação à temperatura de 20 °C, que permitiram a análise da degradação hidrolítica do lorazepam nos solventes estudados.

Na análise estatística, a rejeição de um resultado que apresentasse um valor discrepante foi efectuada utilizando o critério de rejeição baseado na distribuição t de Student.

Uma vez calculada, a variável t, foi comparada com o valor t incluído na tabela de Fischer, para o nível de probabilidade escolhido (95%: $P=0,05$); o número de graus de liberdade é dado por $N=n-1$, em que n é o número de amostras.

4.5.- INFLUÊNCIA DO pH

A hidrólise é uma das causas de alteração das soluções aquosas de vários fármacos, dos quais se destacam as benzodiazepinas. Em geral, a hidrólise realiza-se com menor ou maior facilidade a determinado pH, podendo dizer-se que há sempre um valor para o qual é menor o grau de hidrólise.

Ainda que o pH das soluções injectáveis possa ser susceptível de variar entre limites relativamente afastados, é sempre preferível que seja vizinho da neutralidade, pois é indiscutível que as injeções são tanto menos dolorosas e nocivas quanto mais próximo de 7 estiver o pH da forma farmacêutica. Também há vários sistemas de regulação (do sangue ou das funções pulmonar, renal e hepática) em que é importante que o pH das soluções injectáveis seja o mais próximo possível da neutralidade. Se o pH se afastar muito de 7, a injeção nos diferentes tecidos é mal tolerada, provocando irritação e inflamação. É corrente aceitar-se que, para as vias intramuscular e subcutânea, o pH esteja compreendido entre 5,5-8,0, podendo estes limites ser muitas vezes ultrapassados (4,4-8,5). Tratando-se de injeções endovenosas ou intrarraquídeas, o pH deve situar-se entre 6 e 7,5.

Contudo, muitas vezes a solubilidade do fármaco, a sua estabilidade ou até a sua acção farmacológica exigem que as soluções medicamentosas apresentem um valor de pH diferente do recomendado para a via de administração a que se destina.

Como foi referido, a velocidade de decomposição das benzodiazepinas depende do pH, da temperatura e da força iónica da solução.

No presente trabalho, o objectivo principal foi estudar a estabilidade do lorazepam em função do pH da solução. Com a finalidade de eliminar a influência da temperatura, o ensaio de decomposição acelerada foi realizado a temperaturas constantes e rigorosamente vigiadas. Com a finalidade de eliminar a influência da força iónica do meio recorreu-se a soluções tampão indicadas na USP XXII/NF XVII, adicionadas de solução de cloreto de sódio 2 M de modo a apresentarem uma força iónica igual a 0,5. As quantidades, em ml, de solução de cloreto de sódio 2 M utilizadas na correcção da força iónica de 200 ml de solução tampão estão indicadas no Quadro XXXV.

Como está indicado em 4.2., no estudo da estabilidade das benzodiazepinas é importante considerar como ponto de referência obrigatório os valores de pKa inferiores a 7. O valor do pKa do lorazepam é de 1,3. Nestas circunstâncias, prepararam-se soluções tampão a

pH 1,2 e 1,3, respectivamente abaixo e igual ao pKa do lorazepam, e com valores de pH superiores a este, compreendidos entre 2,0 e 8,0, variando de unidade em unidade.

No estudo da estabilidade do lorazepam em função do pH, ensaiaram-se soluções com a concentração $6,2 \times 10^{-5}M$ de lorazepam.

QUADRO XXXV

SOLUÇÕES TAMPÃO COM FORÇA IÓNICA 0,5

	Soluções tampão pH								
	1,2	1,3	2,0	3,0	4,0	5,0	6,0	7,0	8,0
Solução de cloreto de sódio 2 M (ml)	36,5	38,3	43,7	32,8	35,0	32,7	19,4	17,1	15,4

4.5.1.- ENSAIO DE DECOMPOSIÇÃO ACELERADA

Na realização do ensaio de decomposição acelerada usou-se a técnica descrita em 4.4.2.1.

O teor de lorazepam íntegro foi determinado por HPLC de acordo com as condições indicadas em 4.4.2.2. Na Fig. 68 estão representados os cromatogramas obtidos a valores de pH 1,2 (<pKa) e 2,0 (>pKa).

4.5.2.- RESULTADOS

Os resultados do ensaio de decomposição acelerada às temperaturas de 60 e 80 °C, expressos em percentagem, e as velocidades específicas de hidrólise ($K_{60^{\circ}}$ e $K_{80^{\circ}}$) são apresentados no Quadros XXXVI e XXXVII e nas Figs 69, 70 e 71. Os logaritmos dos factores de frequência (A), as energias de activação (ΔH_a), as velocidades específicas de hidrólise (K) e os prazos de validade (PV) à temperatura de 20 °C são apresentados no Quadro XXXVIII.

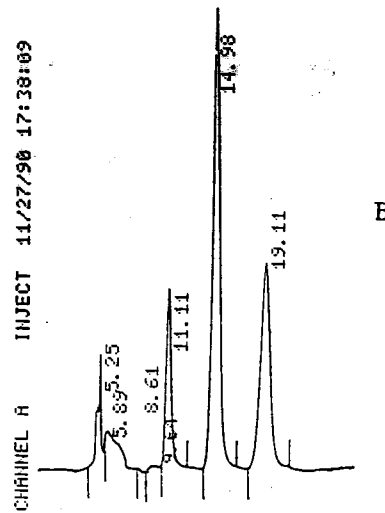
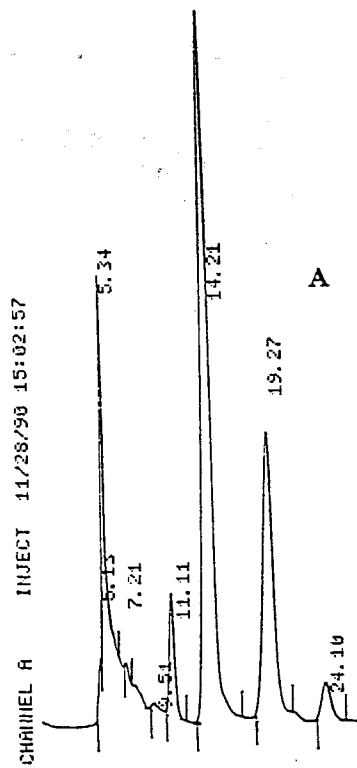
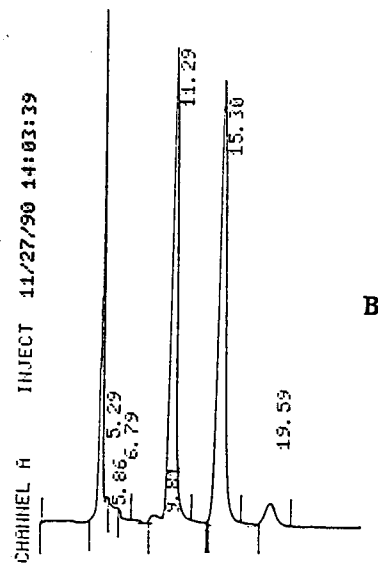
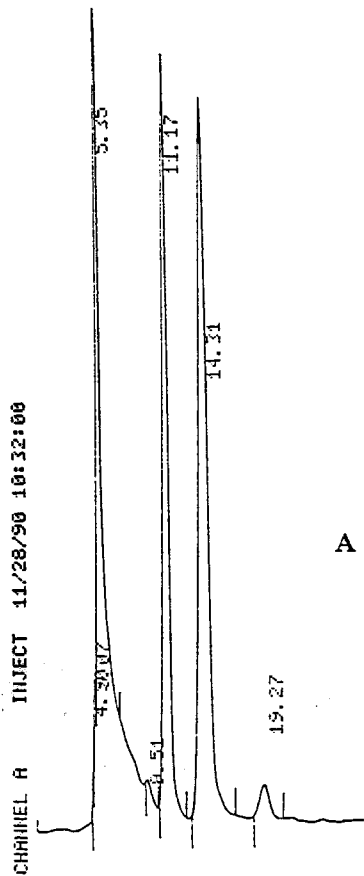


Figura 68 - Cromatogramas correspondentes à hidrólise do lorazepam.

A - pH 1,2 (<pKa); B - pH 2,0 (>pKa).

TRM: lorazepam (11,05); desmetildiazepam (14,21); compostos intermediários de hidrólise (19,48); 2-amino-2,5'-diclorobenzofenona (24,90).

QUADRO XXXVI

INFLUÊNCIA DO pH - TEMPERATURA DE 60 °C

Tempo (horas)	Teor de lorazepam (%)								
	1,2	1,3	2,0	3,0	4,0	5,0	6,0	7,0	8,0
0	100	100	100	100	100	100	100	100	100
0,5	82,0±2,6	83,0±1,9	84,7±1,7	_____	_____	_____	_____	_____	_____
1	_____	_____	_____	87,0±3,0	_____	_____	_____	_____	_____
1,5	60,1±2,9	58,8±1,8	62,0±1,7	_____	_____	_____	_____	_____	_____
2	_____	_____	_____	79,5±2,3	89,2± 2,1	_____	92,1±3,6	_____	82,5±3,1
2,5	41,8±3,4	43,2±1,7	47,0±1,8	_____	_____	_____	_____	_____	_____
3	_____	_____	_____	71,1±1,9	_____	_____	_____	_____	_____
3,5	28,6±2,8	29,5±1,7	34,6±0,9	_____	_____	_____	_____	_____	_____
4	_____	_____	_____	61,2±2,6	81,2±0,6	92,3±1,9	88,7±3, 1	84,7±4,1	71,6±3,4
4,5	21,6±2,1	22,9±2,6	28,3±1,2	_____	_____	_____	_____	_____	_____
5	_____	_____	_____	53,9±1,3	_____	_____	_____	_____	_____
5,5	15,7±2,2	16,7±3,1	19,7±2,6	_____	_____	_____	_____	_____	_____
8	_____	_____	_____	36,0±3,1	69,2±1,8	80,0±2,6	79,9±4,1	74,8±1,7	54,6±2,5
12	_____	_____	_____	22,9±2,8	56,0±2,4	75,2±2,4	71,2±2,0	63,9±1,2	37,1±0,5
16	_____	_____	_____	_____	45,4±2,4	65,8±2,2	65,5±1,6	54,4±3,0	27,5±1,6
24	_____	_____	_____	_____	31,6±3,3	56,0±3,0	54,0±2,3	40,8±1,8	_____
32	_____	_____	_____	_____	_____	44,0±2,7	42,7±0,9	31,5±2,5	_____
K _{60°}	0,3534	0,3434	0,3028	0,1234	0,0504	0,0250	0,0275	0,0378	0,0837
(±)	9,7x10 ⁻³	7,4x10 ⁻³	15,0x10 ⁻³	2,3x10 ⁻³	2,1x10 ⁻³	1,1x10 ⁻³	0,9x10 ⁻³	1,4x10 ⁻³	9,1x10 ⁻³

(±) - Intervalo de confiança - 95%

t - 0,05

N - 4

QUADRO XXXVII

INFLUÊNCIA DO pH - TEMPERATURA 80 °C

Tempo (horas)	Teor de lorazepam (%)								
	1,2	1,3	2,0	3,0	4,0	5,0	6,0	7,0	8,0
0	100	100	100	100	100	100	100	100	100
0,17	84,7±2,9	————	88,1±1,0	————	————	————	————	————	————
0,25	78,1±2,2	79,6±2,1	80,2±2,7	————	————	————	————	————	————
0,33	68,0±3,0	74,1±1,5	73,8±1,9	————	————	————	————	————	————
0,5	53,8±1,7	62,1±1,2	65,6±2,1	84,1±2,1	————	————	————	————	————
0,67	————	52,7±3,1	————	————	————	————	————	————	————
1	34,2±5,0	35,0±2,0	40,3±1,8	67,2±3,0	82,8±3,2	89,6±1,9	88,9±2,3	85,9±1,9	71,8±2,7
1,5	19,7±3,6	23,5±2,7	25,2±3,1	55,8±2,4	————	————	————	————	————
2	————	————	16,3±2,6	46,7±1,8	74,7±2,3	81,1±2,2	81,2±1,6	————	47,3±3,2
2,5	————	————	————	42,1±2,2	————	————	————	————	————
3	————	————	————	35,0±4,1	65,8±2,3	74,2±2,6	73,3±2,4	66,1±0,9	34,2±1,4
3,5	————	————	————	29,8±2,5	————	————	————	————	————
4	————	————	————	————	55,7±2,5	69,1±2,1	66,8±2,1	25,4±1,4	25,4±2,1
6	————	————	————	————	41,0±1,8	57,0±2,8	56,7±3,0	44,0±2,1	————
8	————	————	————	————	29,9±3,4	48,3±2,8	44,7±2,2	34,1±2,7	————
10	————	————	————	————	————	40,1±2,1	38,5±3,4	————	————
K ₈₀₀	1,0865	0,9572	0,8765	0,3637	0,1533	0,0972	0,1032	0,1401	0,3516
(±)	19,4x10 ⁻³	8,7x10 ⁻³	5,4x10 ⁻³	7,0x10 ⁻³	5,2x10 ⁻³	3,8x10 ⁻³	4,3x10 ⁻³	5,1x10 ⁻³	6,3x10 ⁻³

(±) - Intervalo de confiança - 95%

t - 0,05

N - 4

QUADRO XXXVIII

FACTOR DE FREQUÊNCIA, ENERGIA DE ACTIVAÇÃO, VELOCIDADE ESPECÍFICA DE DEGRADAÇÃO E PRAZO DE VALIDADE DO LORAZEPAM EM FUNÇÃO DO pH

pH	log A	ΔH_a (cal/Mole)	K_{20^0} (hora ⁻¹)	PV (horas)
1,2	8,16±0,09	13119±148	23,62x10 ⁻³ ±13,6x10 ⁻⁴	4,5±0,2
1,3	7,40±0,08	11975±140	29,10x10 ⁻³ ±15,2x10 ⁻⁴	3,6±0,6
2,0	7,56±0,14	12312±208	24,08x10 ⁻³ ±12,2x10 ⁻⁴	4,4±0,2
3,0	7,38±0,04	12663±58	9,13x10 ⁻³ ±1,7x10 ⁻⁴	11,5±0,3
4,0	7,24±0,16	13006±253	3,45x10 ⁻³ ±3,0x10 ⁻⁴	30,7±2,5
5,0	8,82±0,13	15881±212	0,94x10 ⁻³ ±0,7x10 ⁻⁴	111,6±7,7
6,0	8,57±0,17	15528±248	1,14x10 ⁻³ ±0,7x10 ⁻⁴	92,4±4,9
7,0	8,62±0,17	15303±266	1,61x10 ⁻³ ±1,3x10 ⁻⁴	65,4±4,9
8,0	9,92±0,08	16757±111	2,64x10 ⁻³ ±0,5x10 ⁻⁴	39,9±1,1

(±) - Intervalo de confiança - 95%

t - 0,05

N - 4

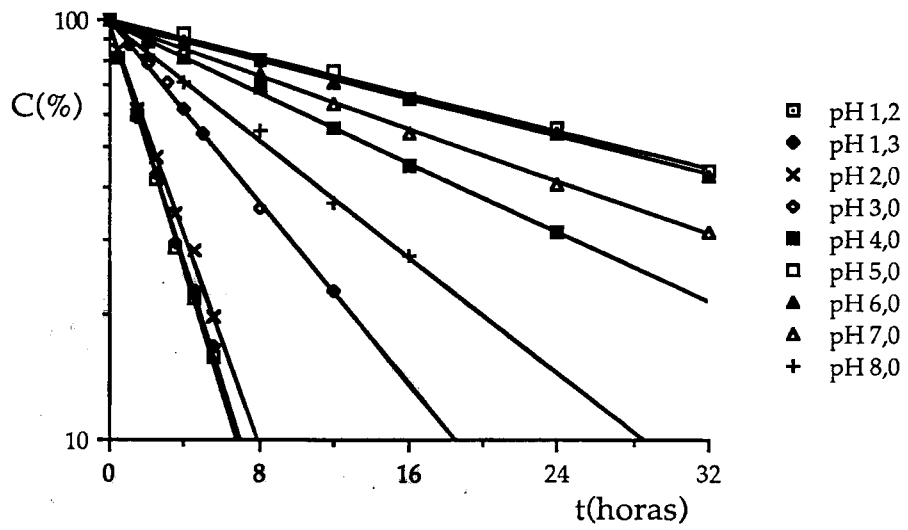


Figura 69 - Influência do pH. Temperatura de 60 °C.

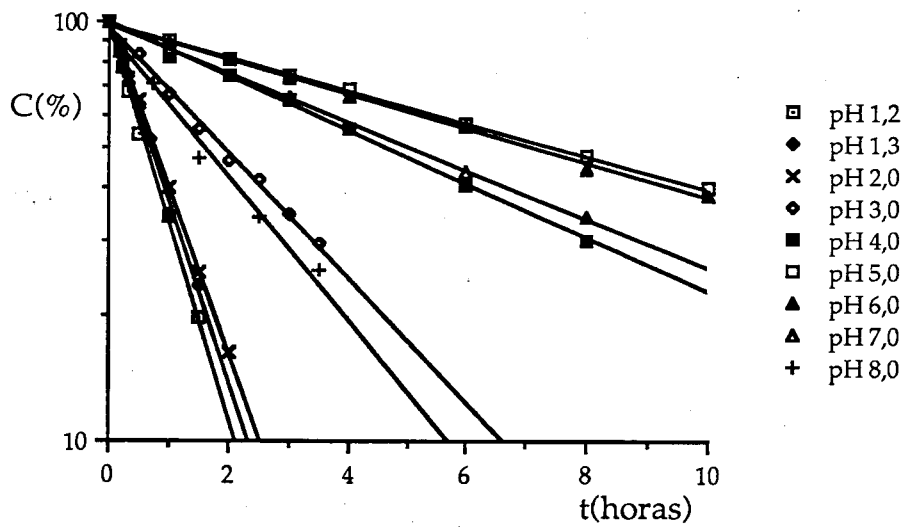


Figura 70 - Influência do pH. Temperatura de 80 °C.

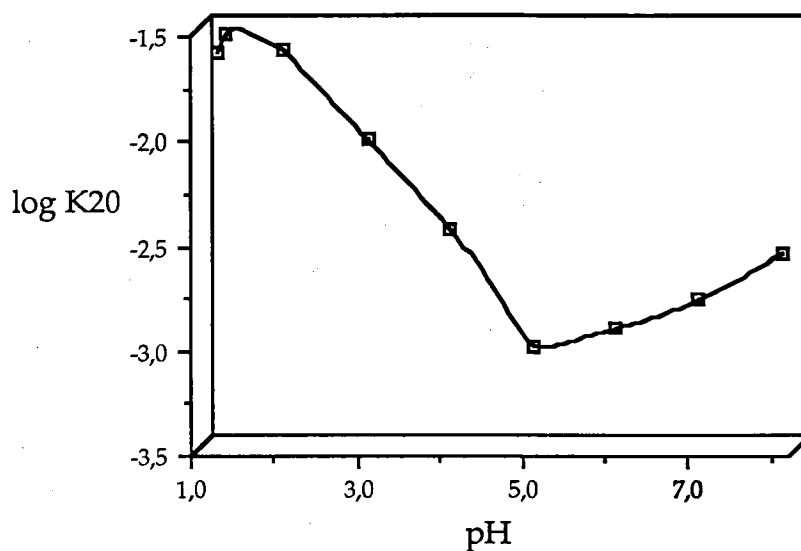


Figura 71 - Relação entre o log K₂₀ do lorazepam e o pH do solvente.

4.5.3.- DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Da análise dos resultados apresentados nos Quadros XXXVI e XXXVII e nas Figs 69 e 70, observa-se que existe uma relação linear entre o logaritmo da concentração de lorazepam presente em solução e o tempo. Tendo em atenção que a velocidade de reacção depende fundamentalmente da concentração de lorazepam, visto que a concentração do solvente (soluções tampão) permanece praticamente constante, pode concluir-se que a hidrólise do lorazepam obedece a uma cinética de pseudo-primeira ordem.

De acordo com os resultados inscritos no Quadro XXXVIII, é aos valores de pH próximos dos do pKa do lorazepam que corresponde a zona em que o fármaco apresenta velocidades específicas de hidrólise maiores (entre $23,62 \times 10^{-3} \pm 13,6 \times 10^{-4}$ e $29,10 \times 10^{-3} \pm 15,2 \times 10^{-4}$ hora⁻¹).

A valores de pH superiores ao do pKa ocorre uma diminuição significativa das velocidades específicas de hidrólise, que variam de $24,08 \times 10^{-3} \pm 12,2 \times 10^{-4}$ a pH 2,0 para $0,94 \times 10^{-3} \pm 0,7 \times 10^{-5}$ hora⁻¹ a pH 5,0, traduzindo um aumento da estabilidade do fármaco. Contudo, na zona de valores de pH compreendida entre 5,0 e 8,0 verifica-se novo aumento da velocidade específica de hidrólise, embora menos acentuado (de $0,94 \times 10^{-3} \pm 0,7 \times 10^{-5}$ a pH 5,0

para $2,64 \times 10^{-3} \pm 0,5 \times 10^{-4}$ hora⁻¹ a pH 8,0) correspondendo a uma diminuição da estabilidade do fármaco.

A Fig. 71, na qual se relaciona os logaritmos das velocidades específicas de hidrólise do lorazepam a 20°C com o pH do solvente, ilustra o que foi dito no parágrafo anterior, isto é, existem duas zonas de velocidades convergentes no valor de pH 5,0:

- a primeira, em que a velocidade específica de hidrólise diminui, situa-se entre pH 2,0 e 5,0;

- a segunda, em que a velocidade específica de hidrólise aumenta, localiza-se entre pH 5,0 e 8,0.

Daqui se conclui que o lorazepam apresenta uma estabilidade máxima a valores de pH próximos de 5,0.

Como se pode observar na Fig. 68, para valores de pH inferiores ao do pKa do lorazepam os cromatogramas obtidos por HPLC apresentam não só os picos correspondentes ao lorazepam e à mistura dos compostos intermediários de hidrólise, mas também um outro correspondente à benzofenona, concretamente à 2-amino-5,2'-diclorobenzofenona, com um tempo de retenção médio de 24,50 minutos. O comportamento cinético da reacção de hidrólise do lorazepam nesta zona de pH é bifásico. Assim, além da velocidade específica de hidrólise que foi calculada, e que corresponde à transformação do lorazepam nos compostos intermediários de hidrólise, existe em simultâneo uma outra que corresponde à transformação dos compostos intermediários nos produtos finais de hidrólise.

A valores de pH superiores ao do pKa do lorazepam e para um grau de hidrólise do fármaco próximo do verificado nos valores de pH referidos anteriormente, os cromatogramas apresentados na mesma Fig. não apresentam nenhum pico a 24,50 minutos correspondente à 2-amino-5,2'-diclorobenzofenona. Nas condições analíticas ensaiadas, o comportamento cinético da reacção de hidrólise do lorazepam nesta zona de valores de pH é aparentemente monofásico.

4.6.- INFLUÊNCIA DOS SOLVENTES

Se por um lado o lorazepam se altera facilmente em solução aquosa, dependendo a velocidade específica de hidrólise do pH da solução, por outro lado apresenta fraca solubilidade, nunca atingindo concentrações suficientes para a administração por via injectável. Embora na administração por via endovenosa o volume possa ser maior do que 10 ml, desde que devidamente controlado, na via intramuscular é normalmente limitado a 3 ml e na via subcutânea apenas a 2 ml.

Nestas circunstâncias, e para ultrapassar estes inconvenientes, é uso corrente recorrer-se a agentes solubilizantes, que são solventes com constante dieléctrica mais baixa do que a água, aumentando deste modo a solubilidade dos fármacos com características apolares (301,302). Por sua vez, a presença destes agentes solubilizantes também pode proteger o fármaco contra alterações químicas, concretamente evitando ou reduzindo substancialmente a velocidade de hidrólise do lorazepam(303).

Assim, quando não é possível usar apenas soluções aquosas, por razões físicas ou químicas, é necessária a adição de agentes solubilizantes ou cossolventes hidrófilos(304-306). Entre as substâncias mais usadas com esta finalidade estão incluídas a glicerina, o PEG 400 e o propilenoglicol, que foram os experimentados para avaliar a estabilidade do lorazepam por substituição parcial ou total da água.

A glicerina é considerada atóxica por via oral, mas o seu emprego como veículo injectável tem dado origem a controvérsias, pois afirma-se que pode produzir hemoglobinúria, hipotensão e alterações nervosas. As soluções endovenosas de glicerina a 5% no homem não produzem efeitos tóxicos ou indesejáveis, enquanto a concentrações até 30% administrada por via intramuscular é bem tolerada e absorvida com rapidez(294,307).

O propilenoglicol é o dissolvente não aquoso mais utilizado em medicações parenterais (10-60%), mas é também usado em soluções orais (10-25%) e em preparações tópicas (5-80%). Todavia, a Food and Drug Administration emitiu directrizes acerca do uso do propilenoglicol em soluções injectáveis, nas quais aconselha a não ultrapassar os 40% da totalidade do veículo(294,307).

O PEG 400 tem sido empregado com alguma frequência na preparação de injectáveis. Os PEG são muito pouco tóxicos e a toxicidade diminui, de um modo geral, com o aumento do peso molecular. Tal como os solventes referidos anteriormente, o PEG 300 e o 400 são especialmente utilizados para dissolver fármacos pouco solúveis na água ou facilmente hidrolizáveis(294,307).

Em relação à constituição do solvente, o presente estudo pode ser dividido em:

- Avaliação da estabilidade do lorazepam dissolvido em glicerina, em PEG 400 e em propilenoglicol;
- Avaliação da estabilidade do lorazepam dissolvido em solventes constituídos por água e propilenoglicol. Devido à concentração pretendida, à solubilidade do fármaco e à constante dielétrica do solvente à temperatura ambiente, a quantidade máxima de água utilizada no solvente foi 25%.

As outras quantidades de água ensaiadas foram 6,25% e 12,5%.

A estabilidade do lorazepam em propilenoglicol foi determinada em outro trabalho realizado no Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Faculdade de Farmácia do Porto(274). Contudo, a substituição do método analítico então utilizado (espectrofotometria no UV pelo HPLC) justifica a repetição desta determinação.

No estudo da estabilidade do lorazepam nos solventes referidos, ensaiaram-se soluções com a concentração de 5mg/ml.

4.6.1.- ENSAIO DE DECOMPOSIÇÃO ACELERADA

Na realização do ensaio de decomposição acelerada usou-se a técnica descrita em 4.4.2.1.

O teor de lorazepam íntegro foi determinado por HPLC de acordo com as condições indicadas em 4.4.2.2.

4.6.2.- RESULTADOS

Os resultados do ensaio de decomposição acelerada em solventes simples às temperaturas de 60 e 80°C, expressos em percentagem, e as velocidades específicas de hidrólise ($K_{60^{\circ}}$ e $K_{80^{\circ}}$) estão indicados nos Quadros XXXIX e XL e nas Figs. 72 e 73. Os Quadros XLII e XLIII e as Figs. 74 e 75 apresentam os resultados obtidos em solventes constituídos por água/propilenoglicol. Os logaritmos dos factores de frequência (A), as energias de activação (ΔH_a), as velocidades específicas de hidrólise (K) e os prazos de validade (PV) à temperatura de 20°C são apresentados no Quadro XLI para os primeiros e no Quadro XLIV para os segundos.

QUADRO XXXIX

INFLUÊNCIA DO SOLVENTE - TEMPERATURA 60 °C

Tempo (dias)	Teor de lorazepam (%) nos solventes		
	Glicerina	PEG 400	Propilenoglicol
0	100	100	100
0,5	75,6±2,6	90,1±2,8	_____
1	49,9±3,1	85,1±2,4	95,8±2,0
1,5	38,3±3,4	80,0±1,3	_____
2	28,2±2,4	73,6±3,0	91,8±2,5
3	_____	62,1±3,1	_____
4	_____	56,2±2,7	83,5±2,1
5	_____	45,3±3,4	_____
6	_____	_____	76,5±2,8
8	_____	_____	70,8±3,2
10	_____	_____	62,7±2,8
$K_{60^{\circ}}$	0,6322	0,1625	0,0443
(±)	0,0464	0,0334	0,0017

(±) - Intervalo de confiança - 95%

t - 0,05

N - 4

QUADRO XL

INFLUÊNCIA DO SOLVENTE - TEMPERATURA 80 °C

Tempo (dias)	Teor de lorazepam (%) nos solventes		
	Glicerina	PEG 400	Propilenoglicol
0	100	100	100
0,083	—————	—————	96,8±3,0
0,125	77,3±4,1	93,1±2,7	—————
0,25	64,1±3,2	87,4±2,2	88,7±3,2
0,333	—————	—————	85,7±3,0
0,375	51,2±3,4	—————	—————
0,5	38,0±3,9	78,3±3,9	80,9±3,1
0,666	—————	—————	74,5±3,6
0,75	—————	69,4±3,2	72,2±3,7
1	—————	60,6±5,2	65,4±3,4
K ₈₀₀	1,8914	0,5162	0,4374
(±)	0,1717	0,1157	0,0553

(±) - Intervalo de confiança - 95%

t - 0,05

N - 4

QUADRO XLI

FACTOR DE FREQUÊNCIA, ENERGIA DE ACTIVAÇÃO, VELOCIDADE ESPECÍFICA DE DEGRADAÇÃO E PRAZO DE VALIDADE DO LORAZEPAM EM FUNÇÃO DO SOLVENTE

SOLVENTE	log A	ΔH_a (cal/Mole)	K_{20^0} (dia ⁻¹)	PV (dias)
Glicerina	8,20±0,24	12793±336	451,8x10 ⁻⁴ ±366,3x10 ⁻⁵	2,3±0,2
PEG 400	8,04±0,93	13464±1418	103,3x10 ⁻⁴ ±331,5x10 ⁻⁵	11,0±4,5
Propilenoglicol	16,18±0,81	26717±1222	1,8x10 ⁻⁴ ±4,7x10 ⁻⁵	599,3±147,4

(±) - Intervalo de confiança - 95%

t - 0,05

N - 4

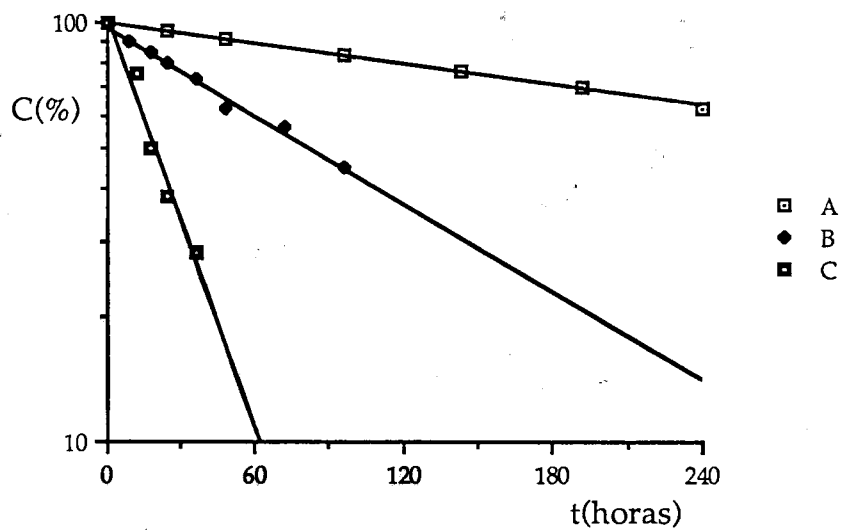


Figura 72 - Influência do solvente. Temperatura de 60 °C.

A- Propilenoglicol, B - PEG 400 e C - Glicerina.

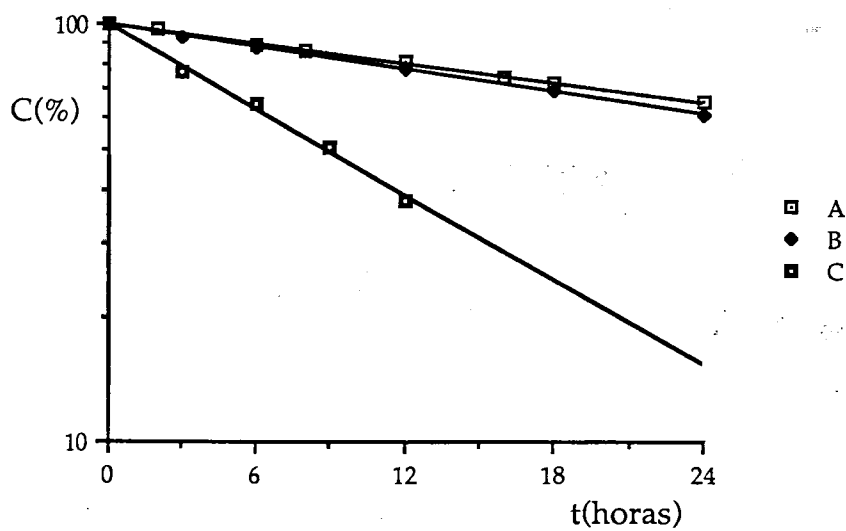


Figura 73 - Influência do solvente. Temperatura de 80 °C.

A- Propilenoglicol, B - PEG 400 e C - Glicerina.

QUADRO XLII

INFLUÊNCIA DO SOLVENTE (ÁGUA/PROPILENOGLICOL) - TEMPERATURA 60 °C

Tempo (dias)	Teor de lorazepam (%)			
	Percentagens de água:propilenoglicol			
	(0:100)	(6,25:93,75)	(12,5:87,5)	(25:75)
0	100	100	100	100
0,5	—	96,1±2,5	93,9±1,7	89,4±2,9
1	95,8±2,0	91,3±2,0	89,2±1,2	80,3±3,2
1,5	—	—	—	71,8±2,2
2	91,8±2,5	—	79,3±2,4	61,7±2,6
3	—	78,1±2,9	71,6±2,3	50,9±3,1
4	83,5±2,1	70,2±2,2	63,4±2,7	40,5±2,1
6	76,5±2,8	59,9±3,1	—	—
8	70,8±3,2	—	—	—
10	62,7±2,8	—	—	—
K _{60°}	0,04425	0,0849	0,1162	0,2266
(±)	1,7x10 ⁻³	5,9x10 ⁻³	6,1x10 ⁻³	8,4x10 ⁻³

(±) - Intervalo de confiança - 95%

t - 0,05

N - 4

QUADRO XLIII

INFLUÊNCIA DO SOLVENTE (ÁGUA/PROPILENOGLICOL) - TEMPERATURA 80 °C

Tempo (dias)	Teor de lorazepam (%)			
	Percentagens de água:propilenoglicol			
	(0:100)	(6,25:93,75)	(12,5:87,5)	(25:75)
0	100	100	100	100
0,08	96,8±3,0	_____	_____	_____
0,125	_____	_____	_____	91,2±2,9
0,25	88,7±3,2	86,3±3,0	86,8±2,1	84,1±2,3
0,33	85,8±3,0	_____	_____	_____
0,375	_____	81,2±1,9	80,4±3,8	_____
0,5	80,9±3,1	74,6±2,5	71,2±3,3	68,7±3,4
0,67	74,5±3,6	_____	_____	_____
0,75	72,2±3,7	62,0±2,3	60,4±2,4	53,3±2,3
1	65,4±3,4	58,1±2,0	54,1±3,7	45,4±3,3
K _{80°}	0,4374	0,5819	0,6218	0,7614
(±)	0,0553	0,0465	0,0640	0,9807

(±) - Intervalo de confiança - 95%

t - 0,05

N - 4

QUADRO XLIV

FACTOR DE FREQUÊNCIA, ENERGIA DE ACTIVAÇÃO, VELOCIDADE ESPECÍFICA DE DEGRADAÇÃO E PRAZO DE VALIDADE DO LORAZEPAM EM FUNÇÃO DO SOLVENTE (ÁGUA/PROPILENOGLICOL)

ÁGUA:PROPILENOGLICOL				
(%:%)	log A	ΔH_a (cal/Mole)	K_{20} (dia ⁻¹)	PV (dias)
0:100	16,18±0,81	26717±1222	$1,8 \times 10^{-4} \pm 4,7 \times 10^{-5}$	599,3±147,4
6,25:93,75	13,68±0,66	22483±829	$8,2 \times 10^{-4} \pm 12,5 \times 10^{-5}$	128,2±13,6
12,5:87,5	11,86±1,03	19502±1685	$22,2 \times 10^{-4} \pm 112,8 \times 10^{-5}$	55,7±30,4
25:75	8,48±0,40	13898±649	$130,6 \times 10^{-4} \pm 308,0 \times 10^{-5}$	8,3±3,8

(±) - Intervalo de confiança - 95%

t - 0,05

N - 4

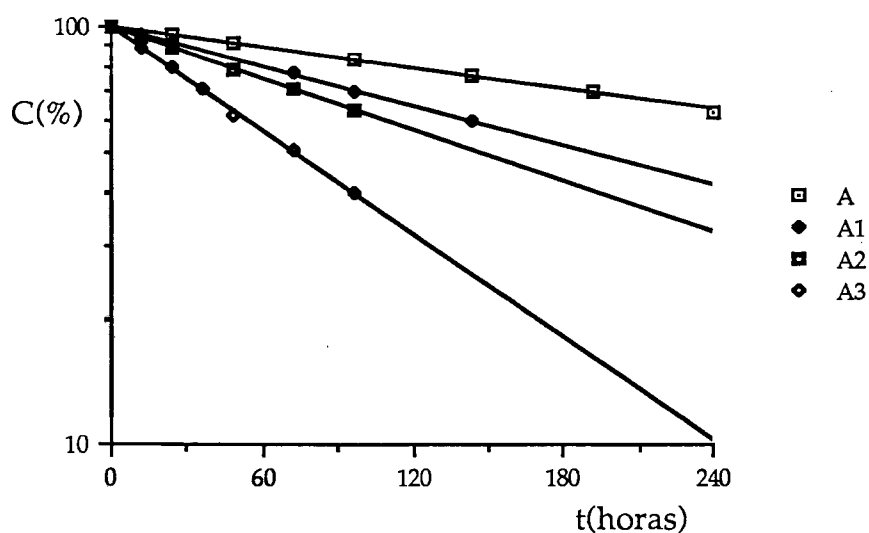


Figura 74 - Influência da presença de água num veículo constituído por água/propilenoglicol (m/m). Temperatura de 60 °C.

A - (0:100), A1 - (6,25:93,75), A2 - (12,5:87,5) e A3 -(25:75).

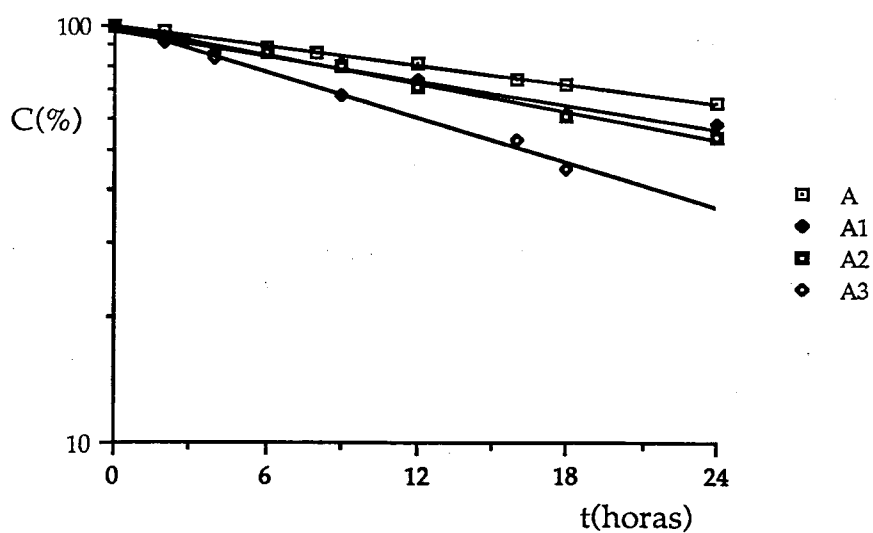


Figura 75 - Influência da presença de água num veículo constituído por água/propilenoglicol (m/m). Temperatura de 80 °C.

A - (0:100), A1 - (6,25:93,75), A2 - (12,5:87,5) e A3 -(25:75).

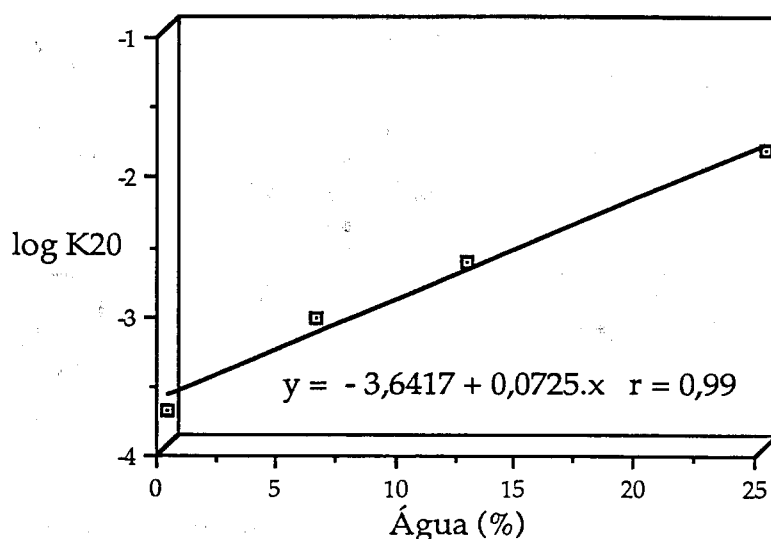


Figura 76 - Relação entre o log K_{20} do lorazepam e a quantidade de água presente no solvente.

4.6.3.- DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Da análise dos resultados obtidos, e pelos motivos apresentados em 4.5.3., pode concluir-se que a hidrólise do lorazepam obedece a uma cinética de pseudo-primeira ordem.

Em função dos resultados encontrados para as velocidades específicas de hidrólise e para os prazos de validade, inscritos no Quadro XLI, a estabilidade máxima do lorazepam é conseguida quando este se encontra dissolvido em propilenoglicol, seguindo-se o PEG 400 e finalmente a glicerina. De facto, os resultados sugerem que o propilenoglicol é, dos solventes experimentados, o mais indicado para a preparação de soluções injectáveis de lorazepam.

Relativamente aos resultados encontrados na avaliação da estabilidade do lorazepam dissolvido em solventes constituídos por água e propilenoglicol, o gráfico apresentado na Fig. 76 mostra que existe uma relação linear entre o logaritmo da velocidade específica de hidrólise e a quantidade de água presente no veículo. Assim, por interpolação gráfica ou por cálculo através da equação da recta, é possível determinar a velocidade específica de hidrólise e o prazo de validade para outros veículos constituídos por outras proporções relativas de água e propilenoglicol.

4.7.- INFLUÊNCIA DOS TENSIOACTIVOS

Quando os fármacos estão dissolvidos em solventes de natureza hidrófila, há outros factores, além do pH e do solvente, cuja presença pode contribuir para aumentar a estabilidade. É o caso dos tensioactivos que, quando adicionados a uma solução, podem constituir um meio eficaz de minimização da degradação hidrolítica dos fármacos(308-310).

A acção exercida pelos tensioactivos na estabilização dos fármacos que sofrem hidrólise depende essencialmente da carga que possuem, pois, para um dado fármaco, a velocidade de hidrólise não é igual em presença de um tensioactivo aniónico, catiónico ou não iónico(310-312).

Os tensioactivos também são usados como solubilizantes, geralmente em concentrações compreendidas entre 0,05 e 0,5% (306).

Perante a situação descrita foram experimentados os seguintes tensioactivos: o cloreto de benzalcónio (catiónico), o laurilsulfato de sódio (aniónico) e o Tween 80 (não iónico).

Em relação à natureza do solvente utilizado, o presente estudo pode dividir-se em:

- Influência dos tensioactivos na estabilidade do lorazepam quando dissolvido em solução tampão de pH 5,0.

Foram ensaiadas soluções $6,2 \times 10^{-5}$ M de lorazepam.

Os tensioactivos foram utilizados na concentração de 0,02g/100ml. Esta concentração é superior à concentração micelar crítica para o Tween 80 (313) e inferior à concentração micelar crítica do laurilsulfato de sódio. Também foi ensaiada uma solução com concentração superior à concentração micelar crítica, contendo 1g/100ml de laurilsulfato de sódio. O valor deste parâmetro para o cloreto de benzalcónio não foi encontrado na bibliografia, nem determinado experimentalmente.

- Influência dos tensioactivos na hidrólise do lorazepam quando dissolvido num solvente constituído por água/propilenoglicol (25:75), de pH 5,33.

Foram ensaiadas soluções com a concentração de 5mg/ml de lorazepam.

Os tensioactivos foram utilizados na concentração de 5 g/100 ml, e no caso do laurilsulfato de sódio ensaiou-se também uma solução contendo 1 g/100 ml.

4.7.1.- ENSAIO DE DECOMPOSIÇÃO ACELERADA

Na realização do ensaio de decomposição acelerada usou-se a técnica descrita em 4.4.2.1.

O teor de lorazepam íntegro foi determinado por HPLC de acordo com a técnica indicada em 4.4.2.2.

4.7.2.- RESULTADOS

Os Quadros XLV e XLVI e as Figs. 77 e 78 contêm os resultados do ensaio de decomposição acelerada às temperaturas de 60 e 80°C, expressos em percentagem, e as velocidades específicas de hidrólise (K_{600} e K_{800}) obtidas no estudo da influência dos tensoactivos na hidrólise do lorazepam em solução tampão de pH 5,0. Os Quadros XLVIII e XLIX e as Figs. 79 e 80 apresentam os resultados obtidos com o solvente água/propilenoglicol (25:75). Os logaritmos dos factores de frequência (A), as energias de activação (ΔH_a), as velocidades específicas de hidrólise (K) e os prazos de validade (PV) à temperatura de 20°C são apresentados no Quadro XLVII para o primeiro e no Quadro L para o segundo solvente.

CB - Cloreto de benzalcónio;

LsS - Laurilsulfato de sódio;

T80 - Tween 80.

QUADRO XLV

INFLUÊNCIA DOS TENSIOACTIVOS NA SOLUÇÃO TAMPÃO DE pH 5,0

TEMPERATURA 60 °C

Teor de lorazepam (%) na solução tampão de pH 5,0

Tempo (horas)	Percentagem de tensioactivo				
	0%	0,02% CB	0,02% LsS	1% LsS	0,02% T80
0	100	100	100	100	100
2	—	—	—	96,7±1,1	—
4	92,3±1,9	90,6±2,3	92,4±1,4	—	93,1±2,0
8	80,0±2,6	78,3±2,3	73,7±1,7	83,3±2,2	81,2±2,4
12	75,2±2,4	71,6±2,8	71,4±2,1	78,1±2,4	74,3±2,5
16	65,8±2,2	61,1±3,1	56,8±3,1	68,2±2,3	62,5±3,3
24	56,0±3,0	52,2±4,0	49,4±2,4	60,3±1,5	53,3±2,9
32	44,0±2,7	—	39,6±2,8	52,4±3,6	—
K _{60°}	0,0250	0,0284	0,0300	0,0211	0,0245
(±)	1,1×10 ⁻³	8,8×10 ⁻³	3,0×10 ⁻³	4,4×10 ⁻³	4,2×10 ⁻³

(±) - Intervalo de confiança - 95%

t - 0,05

N - 4

QUADRO XLVI

INFLUÊNCIA DOS TENSIOACTIVOS NA SOLUÇÃO TAMPÃO DE pH 5,0
TEMPERATURA 80 °C

Teor de lorazepam (%) na solução tampão de pH 5,0

Tempo (horas)	Percentagem de tensioactivo				
	0%	0,02% CB	0,02% LsS	1% LsS	0,02% T80
0	100	100	100	100	100
1	89,6±1,9	88,7±3,2	85,2±2,4	92,0±0,8	90,9±1,5
2	81,1±2,2	83,2±3,3	82,3±2,0	83,7±2,0	85,8±3,1
3	74,2±2,6	—	—	—	—
4	69,1±2,1	68,8±4,1	68,6±3,2	71,1±2,0	73,8±3,2
6	57,0±2,8	56,1±4,1	55,2±2,3	59,4±2,7	58,0±3,5
8	48,3±2,8	—	—	—	—
10	40,1±2,1	—	—	—	—
$K_{80^{\circ}}$	0,0972	0,1006	0,1129	0,0864	0,0850
(±)	0,0038	0,0276	0,0205	0,0198	0,0300

(±) - Intervalo de confiança - 95%

t - 0,05

N - 4

QUADRO XLVII

FACTOR DE FREQUÊNCIA, ENERGIA DE ACTIVAÇÃO, VELOCIDADE ESPECÍFICA DE
 DEGRADAÇÃO E PRAZO DE VALIDADE DO LORAZEPAM
 NA SOLUÇÃO TAMPÃO DE pH 5,0

SOLVENTE	log A	ΔH_a (cal/Mole)	K_{20° (hora ⁻¹)	PV (horas)
0 %	8,82±0,13	15881±212	9,4×10 ⁻⁴ ±0,7×10 ⁻⁴	112,5±7,7
0,02% CB	8,27±0,81	14972±1311	13,4×10 ⁻⁴ ±6,4×10 ⁻⁴	89,8±45,2
0,02% LsS	8,59±0,80	15404±1185	12,6×10 ⁻⁴ ±2,8×10 ⁻⁴	85,4±16,2
1% LsS	9,13±0,64	16475±971	7,1×10 ⁻⁴ ±2,1×10 ⁻⁴	155,4±46,1
0,02% T80	7,74±1,60	14248±2369	13,5×10 ⁻⁴ ±5,6×10 ⁻⁴	85,9±34,4

(±) - Intervalo de confiança - 95%

t - 0,05

N - 4

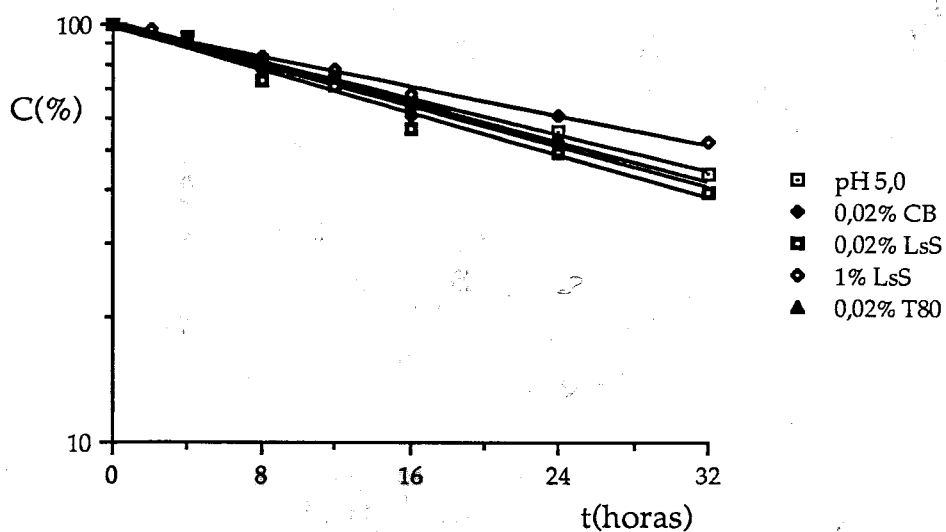


Figura 77 - Influência dos tensoactivos (solução tampão de pH 5,0). Temperatura de 60 °C.
 CB- cloreto de benzalcónio, LsS - laurilsulfato de sódio e T80 - Tween 80.

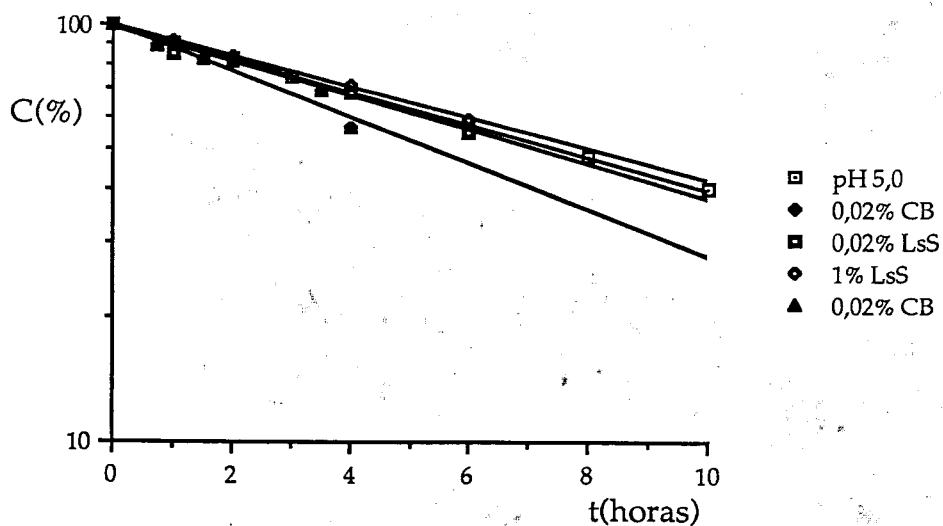


Figura 78 - Influência dos tensoactivos (solução tampão de pH 5,0). Temperatura de 80 °C.
 CB - cloreto de benzalcónio, LsS - laurilsulfato de sódio e T80 - Tween 80.

QUADRO XLVIII

INFLUÊNCIA DOS TENSIOACTIVOS NO SOLVENTE - ÁGUA/PROPILENOGLICOL (25:75)

TEMPERATURA 60 °C

Tempo (dias)	Teor de lorazepam (%) no solvente				
	Percentagem de tensioactivo				
	0%	5% CB	1% LsS	5% LsS	5% T80
0	100	100	100	100	100
0,125	—	93,0±3,0	—	—	—
0,25	—	87,3±2,7	—	—	92,1±3,2
0,375	—	84,1±3,2	—	—	—
0,5	89,4±2,9	77,6±3,0	92,7±2,3	92,3±3,4	87,3±3,0
0,75	—	69,4±2,5	—	—	79,9±2,7
1	80,3±3,2	63,2±2,2	81,5±2,1	84,7±4,2	75,9±2,3
1,5	71,8±2,2	56,0±2,6	75,2±1,4	75,3±4,0	63,2±3,8
2	61,7±2,6	—	65,2±1,8	67,3±3,5	54,7±3,5
3	50,9±3,1	—	55,0±2,3	57,6±3,9	—
4	40,5±2,1	—	43,9±2,1	46,0±4,5	—
K _{60°}	0,2272	0,5047	0,1953	0,1826	0,2981
(±)	0,0310	0,0476	0,0305	0,0381	0,0507

(±) - Intervalo de confiança - 95%

t - 0,05

N - 4

QUADRO XLIX

INFLUÊNCIA DOS TENSIOACTIVOS NO SOLVENTE -ÁGUA/PROPILENOGLICOL (25:75)
TEMPERATURA 80 °C

Tempo (dias)	Teor de lorazepam (%) no solvente				
	Percentagem de tensioactivo				
	0%	5% CB	1% LsS	5% LsS	5% T80
0	100	100	100	100	100
0,083	—	88,2±2,5	—	—	—
0,125	91,2±2,9	—	—	92,5±3,2	86,0±3,0
0,167	—	78,0±2,8	—	—	—
0,25	84,1±2,3	66,8±2,8	85,1±1,9	84,9±3,3	77,7±2,5
0,375	—	54,7±2,8	76,7±2,2	76,6±3,8	72,5±2,5
0,5	68,7±3,4	44,8±3,1	70,0±2,4	71,9±3,1	64,6±3,1
0,75	53,3±2,3	—	56,8±2,7	59,9±2,8	49,2±2,9
1	45,4±3,3	—	46,3±2,2	51,0±3,6	—
K _{80°}	0,7461	1,5633	0,6709	0,6654	0,9805
(±)	0,9102	0,0788	0,0864	0,1091	0,1359

(±) - Intervalo de confiança - 95%

t - 0,05

N - 4

QUADRO L

FACTOR DE FREQUÊNCIA, ENERGIA DE ACTIVAÇÃO, VELOCIDADE ESPECÍFICA DE
 DEGRADAÇÃO E PRAZO DE VALIDADE DO LORAZEPAM
 NO SOLVENTE ÁGUA/PROPILENOGLICOL (25/75)

SOLVENTE	log A	ΔH_a (cal/Mole)	K_{200} (dia ⁻¹)	PV (dias)
0%	8,48±0,40	13898±649	0,0131±3,1×10 ⁻³	8,3±3,8
5% CB	8,37±0,19	13201±260	0,0334±4,4×10 ⁻³	3,2±0,4
1% LsS	8,77±0,39	14445±667	0,0101±2,5×10 ⁻³	10,9±3,4
5% LsS	9,13±0,79	15052±1283	0,0085±3,5×10 ⁻³	13,8±6,0
5% T80	8,62±0,60	13937±967	0,0172±5,8×10 ⁻³	6,5±2,0

(±) - Intervalo de confiança - 95%

t - 0,05

N - 4

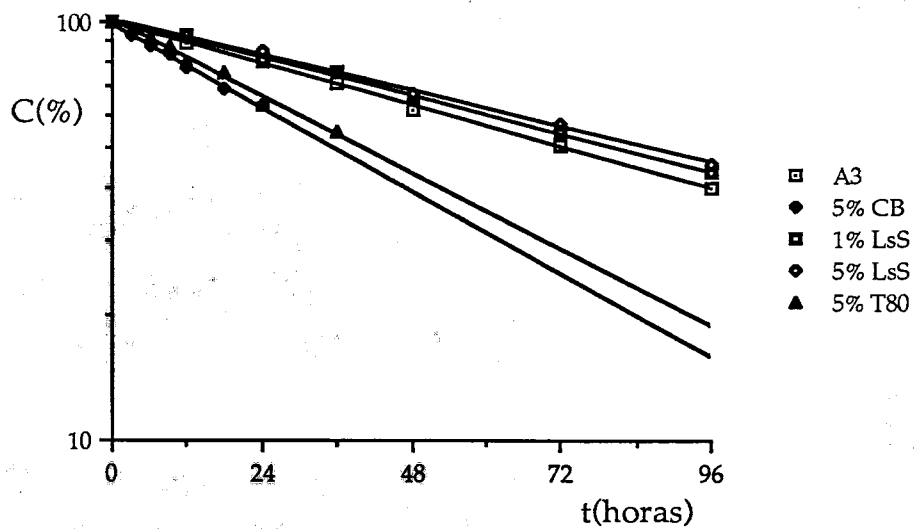


Figura 79 - Influência dos tensoativos (água/propilenoglicol-A3). Temperatura de 60 °C.
 CB- cloreto de benzalcônio, LsS - laurilsulfato de sódio e T80 - Tween 80.

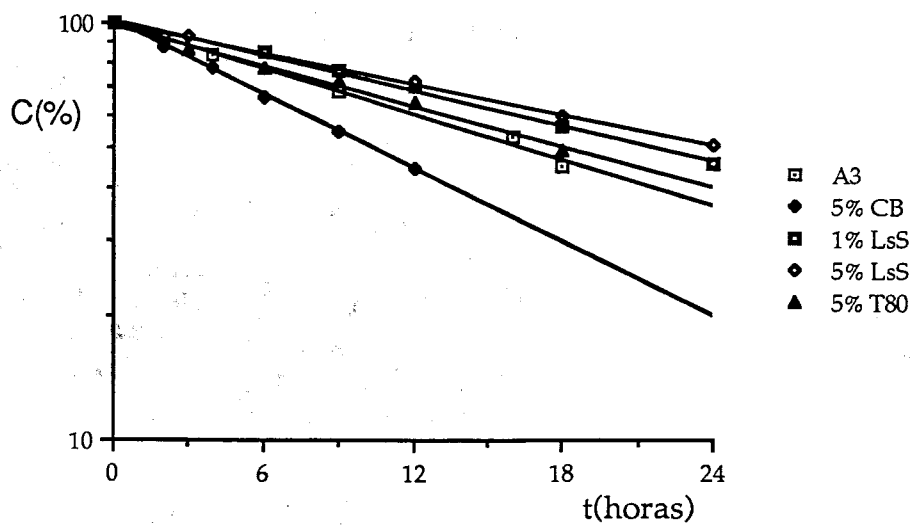


Figura 80 - Influência dos tensoativos (água/propilenoglicol-A3). Temperatura de 80 °C.
 CB- cloreto de benzalcônio, LsS - laurilsulfato de sódio e T80 - Tween 80.

4.7.3.- DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

No estudo da influência dos tensoactivos na estabilidade do lorazepam e para os solventes usados, solução tampão pH 5,0 e água/propilenoglicol (25:75), a hidrólise do fármaco ocorre devido principalmente à protonação e cisão do grupo imina e, em menor intensidade, devido à protonação e cisão do grupo amida.

Quando os tensoactivos estão em concentração inferior à concentração micelar crítica, encontram-se como moléculas individuais e podem ser adsorvidos à superfície de outras moléculas presentes na solução. Nestas circunstâncias, o mecanismo de actuação dos tensoactivos na protecção dos fármacos, embora não esteja perfeitamente explicado, pode ser devido à acção exercida à superfície das partículas do fármaco por formação de uma barreira de natureza eléctrica. De acordo com a carga do tensoactivo, esta barreira pode actuar por atracção ou repulsão dos iões H^+ , impedindo-os de protonar os grupos com características básicas do fármaco. Deste modo, os tensoactivos não iónicos não exercem qualquer influência na hidrólise dos fármacos, uma vez que a barreira formada não tem carga eléctrica.

Quando os tensoactivos estão em concentração superior à concentração micelar crítica, formam agregados moleculares que são verdadeiras vesículas constituídas por uma parte hidrófila (externa) e uma parte lipófila (interna). Estas estruturas têm a capacidade de incorporarem fármacos que contenham grupos polares ou apolares, por alinhamento entre moléculas de tensoactivo, que se dispõem com a parte apolar localizada na região central da micela e a parte polar localizada na região periférica. Nestas circunstâncias, o mecanismo de actuação dos tensoactivos na protecção dos fármacos depende sobretudo das características químicas destes, e portanto da localização que vão ter na micela. Contudo, e devido à orientação das moléculas de tensoactivo que formam a micela, o conceito de barreira eléctrica continua a fazer sentido.

Da análise dos resultados verifica-se que a presença em solução dos tensoactivos não altera o tipo de cinética de hidrólise do lorazepam, pois continua a obedecer a uma cinética de pseudo-primeira ordem, embora a velocidade da mesma sofra pequenas modificações.

4.7.3.1.-Influência dos tensoactivos na estabilidade do lorazepam quando dissolvido em solução tampão de pH 5,0.

Nas condições usadas, o cloreto de benzalcónio (tensoactivo catiónico) não protege o lorazepam por repulsão dos iões H^+ , agravando ligeiramente a velocidade específica de hidrólise do fármaco e diminuindo a sua estabilidade, como se pode observar no Quadro XLVII.

O Tween 80 (tensoactivo neutro) foi utilizado em concentração superior à concentração micelar crítica, verificando-se um agravamento na velocidade específica de hidrólise do lorazepam da mesma ordem de grandeza da apresentada pelo cloreto de benzalcónio.

O laurilsulfato de sódio (tensoactivo aniónico) apresenta um comportamento diferente quando se encontra em concentrações superiores ou inferiores à concentração micelar crítica, que é de 0,23 g/100 ml. Comparando os resultados das velocidades específicas de hidrólise do lorazepam inscritos no Quadro XLVII com os obtidos com a solução tampão de pH 5,0, verifica-se que a presença do tensoactivo em concentrações inferiores à concentração micelar crítica acelera a hidrólise do fármaco, ocorrendo o fenómeno inverso quando a concentração é superior à concentração micelar crítica. Neste último caso, a estabilidade do lorazepam aumenta em cerca de 25%.

Teoricamente, quando se trata de uma hidrólise ácida (como é o caso presente) os compostos aniónicos devem acelerar a velocidade da reacção, enquanto os compostos catiónicos protegem o fármaco do ataque dos iões H^+ . Todavia, em função do exposto no parágrafo anterior verifica-se que acontece o contrário, isto é, o tensoactivo aniónico protege o fármaco mas apenas quando se encontra presente sob a forma de micelas.

4.7.3.2.- Influência dos tensoactivos na hidrólise do lorazepam quando dissolvido num solvente constituído por água/propilenoglicol (25:75)

Da análise dos resultados inscritos no Quadro L, verifica-se que o cloreto de benzalcónio e o Tween 80 continuam a acelerar a hidrólise do lorazepam, embora o agravamento seja de 62,5% para o primeiro e de 20% para o segundo. Para as concentrações utilizadas de laurilsulfato de sódio, verifica-se um efeito protector de hidrólise do

lorazepam, de 31,5% para a concentração de 1% e de 62,5% para a de 5%.

Como o solvente é constituído por água e propilenoglicol, e os tensioactivos estão presentes em concentrações elevadas, provavelmente superiores à concentração micelar crítica, os resultados obtidos podem ser explicados do seguinte modo:

- o cloreto de benzalcónio é o tensioactivo com maior afinidade para a água, formando uma zona menos hidrófoba dentro das micelas formadas;

- o laurilsulfato de sódio é o tensioactivo com maior afinidade para o propilenoglicol, formando uma zona mais hidrófoba dentro das micelas formadas;

- o Tween 80 é o tensioactivo com uma afinidade intermédia para os constituintes do solvente, formando uma zona hidrófoba intermédia dentro das micelas formadas.

4.8.- CONCLUSÕES

4.8.1.- MECANISMO DE HIDRÓLISE DO LORAZEPAM

A valores de pH inferiores ao do pKa do lorazepam a cinética de hidrólise é bifásica. A cisão ao nível da ligação 1,2-amida é mais fácil, originando a 2-amino-5,2'-diclorobenzofenona-etilimina.

A valores de pH superiores ao do pKa do lorazepam a cinética de hidrólise é monofásica. A cisão ao nível da ligação 4,5-imina é mais fácil, originando a glicilamino-5,2'-diclorobenzofenona.

4.8.2.- INFLUÊNCIA DO pH

Relacionando os logaritmos das velocidades específicas de hidrólise com o pH do solvente, existem duas zonas de velocidades que convergem no valor de pH 5,0. Na primeira zona, localizada entre pH 2,0 a 5,0, a velocidade de hidrólise diminui significativamente, pelo que a curva resultante apresenta uma inclinação elevada. Na segunda zona, situada entre pH 5,0 a 8,0, a velocidade de hidrólise aumenta ligeiramente, pelo que a curva resultante apresenta uma inclinação menor.

O lorazepam apresenta um máximo de estabilidade a valores de pH próximos de 5,0.

4.8.3.- INFLUÊNCIA DO SOLVENTE

O lorazepam quando se encontra dissolvido em solventes de natureza hidrófila (como é o caso da glicerina, PEG 400 e propilenoglicol) apresenta velocidades específicas de hidrólise significativamente diferentes.

Dos solventes experimentados, o propilenoglicol é o único em que o

lorazepam apresenta um prazo de validade compatível com o fabrico industrial de preparações injectáveis.

Embora do ponto de vista farmacêutico o lorazepam seja muito instável nos restantes solventes ensaiados, quando dissolvido no PEG 400 é significativamente mais estável do que na glicerina.

Se o solvente é constituído por água e propilenoglicol, aumentando a hidrólise do lorazepam em função da quantidade de água, verifica-se que existe uma relação linear entre o logaritmo da velocidade específica de hidrólise do lorazepam e a quantidade de água presente no veículo.

4.8.4.- INFLUÊNCIA DOS TENSIOACTIVOS

Quando se encontram dissolvidos com o lorazepam num solvente constituído por água/propilenoglicol (25:75), o cloreto de benzalcónio a 5% e o Tween 80 a 5% aceleram a hidrólise, enquanto a presença do laurilsulfato de sódio a 1% e a 5% aumenta a estabilidade do fármaco.

Quando se encontram dissolvidos com o lorazepam em soluções aquosas (solução tampão de pH 5,0), o cloreto de benzalcónio a 0,02%, o laurilsulfato de sódio a 0,02% (concentração inferior à CMC) e o Tween 80 a 0,02% (na zona da CMC) aceleram a hidrólise do fármaco. Contudo, a presença do laurilsulfato a 1% (concentração superior à CMC) aumenta a estabilidade do lorazepam.

BIBLIOGRAFIA

- 1 - Marks, J., *Uso e Abuso das Benzodiazepinas*, Girton College, Cambridge, Inglaterra, Publicado pelo Instituto Pasteur de Lisboa, Wyeth
- 2 - Goodman e Gilman's, *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 6ª Ed., MacMillan Publishing Co., Inc., New York, 339-442 (1980)
- 3 - Sternbach, L.H., *J. Med. Chem.*, 22:1-7 (1979)
- 4 - Sternbach, L.H., *Benzodiazepines Today and Tomorrow*, Ed. Press Limited, 5-17 (1980)
- 5 - Sternbach, L.H. e Reeder, E., *J. Org. Chem.*, 26:1111-1118 (1961)
- 6 - Randall, L.O., *Curr. Therap. Res.*, 3:405-425 (1961)
- 7 - Sternbach, L.H., Reeder, E., Keller, O. e Metlesics, W., *J. Org. Chem.*, 26:4488-4497 (1961)
- 8 - Sternbach, L.H. e Reeder, E., *J. Org. Chem.*, 26:4936-4941 (1961)
- 9 - Bell, S.C., Sulkowski, T.S., Gochman, C. e Childress, S.J., *J. Org. Chem.*, 27:562-566 (1962)
- 10 - Bell, S.C. e Childress, S.J., *J. Org. Chem.*, 27:1691-1695 (1962)
- 11 - Childress, S.J. e Gluckman, M.I., *J. Pharm. Sci.*, 53:577-590 (1964)
- 12 - Sternbach, L.H., Fryer, R.I., Keller, O., Metlesics, W., Sach, G. e Steiger, N., *J. Med. Pharm. Chem.*, 6:261-271 (1963)
- 13 - Liske, E. e Forster, F.M., *J New Drugs*, 3:241-248 (1963)
- 14 - Sternbach, L.H., *The Discovery of CNS Active 1,4-Benzodiazepine (Chemistry)* em *Pharmacology of Benzodiazepines*, Ed. Usdin, E., Skolnick, P., Tallman Jr, J.F., Greenblatt, D.J. e Paul, S.M., Verlag Chemie, Weinheim, Deerfield Beach, Florida, Basel, 7-22, (1983)
- 15 - Hester, J.B., Duchamp, D.J., Chidester, C.G., *Tetrahedron Lett.*, 43:1609-1616 (1978)
- 16 - William, V.C., Varnado, G.C., Nwangwu, P.U., *Drugs of Today*, 21:75-96 (1985)
- 17 - Walser, A., Benjamin, L.E., Flynn, T., Mason, C., Schwartz, R., *J. Org. Chem.*, 43:936-944 (1978)
- 18 - Kanto, J.H., *Pharmacotherapy*, 5:138-154 (1985)
- 19 - Vanderheyden, J.-L. e Vanderheyden, J.-E., *J. Pharm. Belg.*, 36:354-364 (1981)
- 20 - Muller, W.E., *Drugs of Today*, 24:649-663 (1998)
- 21 - Lempereur, J.D., *Science & Vie*, 856:30-43 (1989)
- 22 - *Martindale - The Extra Pharmacopoeia*, 29th Ed., London, The Pharmaceutical Press, 706-776 (1989)
- 23 - Lespagnol, A., *Chimie Des Médicamentes*, Tome I, Entreprise Moderne D'Édition/ Technique Et Documentation, Paris, 168-176 (1974)
- 24 - Phillis, J.W. e Wu, P.K., *Adenosine and Benzodiazepine Action* em *Pharmacology of*

- Benzodiazepines, Ed. Usdin, E., Skolnick, P., Tallman Jr, J.F., Greenblatt, D.J. e Paul, S.M., Verlag Chemie, Weinheim, Deerfield Beach, Florida, Basel, 497-505 (1983)
- 25 - Zsilla, G., Cheney, D.L. e Costa, E., *Naunyn Schemiedebergs Arch. Pharmacol.*, 294:251-255 (1976)
- 26 - Corrodi, H., Fuxe, K. e Hokfelt, T., *Eur. J. Pharmacol.*, 1:363-368 (1967)
- 27 - Dotenchi, H. e Costa, E., *Neuropharmacology*, 12:1059-1072 (1973)
- 28 - Gale, K. Costa, E. Toffano, G, Hong, J.S. e Guidotti, A., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 206:29-37 (1978)
- 29 - Polc, P. e Haefely, W., *Naunyn Schemiedebergs Arch. Pharmacol.*, 294:121-131 (1976)
- 30 - Taylor, K.M. e Laverty, R., *Eur.J. Pharmacol.*, 8:296-301 (1969)
- 31 - Weise, C.D., Berger, B.D. e Stein, L., *Science*, 177:180-183 (1972)
- 32 - Chase, T.N., Katz, R.I. e Kopin, I.J., *Neuropharmacology*, 9:103-108 (1970)
- 33 - Ribeiro, C.A.F., *Arq. Inst. Farm. Terap. Exp. Coimbra*, 21:5-15 (1983)
- 34 - Karobath, M., Placheta, P. e Lippitsch, M., *Nature*, 278:748-749 (1979)
- 35 - Costa, E. e Guidotti, A., *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 19:531-535 (1979)
- 36 - DeFeudis, F.V., *Drugs of Today*, 21:453-461 (1985)
- 37 - De Deyn, P.P. e MacDonald, R.L., *Br. J. Pharmacol.*, 95:109-120 (1988)
- 38 - Young, A.B., Zukin, S.R. e Snyder, S.H., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 71:2246-2250 (1974)
- 39 - Curtis, D.R., Game, C.J.A. e Lodge, D., *Br. J. Pharmacol.*, 56:307-311 (1976)
- 40 - Tallman, J.F., Paul, S.M., Skolnick, P. e Gallagher, D.W., *Science*, 207:274-281 (1980)
- 41 - Anholt, R.R.H., *Trends Pharmacol. Sci.*, 4: 506-511 (1986)
- 42 - Costa, E. , Guidotti, A., Mao, C.C. e Suria, A., *Life Sci.*, 17:167-186 (1975)
- 43 - Dingemans, J. e Breimer, D.D., *Pharm. Int.*, 5: 33-36 (1984)
- 44 - Iversen, L.L., *Benzodiazepines Divided*, Ed. M. R. Trimble, John Wiley & Sons Ltd., 79-85 (1985)
- 45 - Bertilsson, L., *Acta Psy. Scand.*, Suppl. 274:19-26 (1978)
- 46 - Ruano, D., Cano, J., Machado, A. e Vitorica, J., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 256:902-908 (1991)
- 47 - Guidotti, A., Konkel, D., Ebstein, B., Corda, M.G., Wise, B.C., Krustzsch, M. e Meek, J.L., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 8:886-890 (1983)
- 48 - Iversen, L.L., *Arzneim.-Forsch./Drug Res.*, 30(I):907-910 (1980)
- 49 - Barajdi, M., Guidotti, A., Schwartz, J.P. e Costa, E., *Science*, 205:821-283 (1979)
- 50 - Lippke, K.P., Müller, W.E. e Schunack, W.G., *J. Pharm. Sci.*, 74:676-680 (1985)
- 51 - Petersen, E.N., *Drugs of the Future*, 12:1043-1053 (1987)

- 52 - Moreau, J.-L. e Pieri, L., *Br. J. Pharmacol.*, 93:964-968 (1988)
- 53 - Freye, E., Neruda, B. e Falke, K., *Drugs of Today*, 25:119-124 (1989)
- 54 - Bacon, E. e Viennot, F., *La Recherche*, 22:1424-1431 (1991)
- 55 - Massoti, M., Schlichting, J.L., Antonacci, M.D., Giusti, P., Memo, M., Costa, E. e Guidotti, A., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 256:1154-1160 (1991)
- 56 - Mandema, J.W., Sansom, L.N., Dios-Vieitez, M.C., Hollander-Jansen, M. e Danhof, M., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 257:472-478 (1991)
- 57 - Jacqmin, P. e Lesne, M., *J. Pharm. Belg.*, 40:35-54 (1985)
- 58 - Giusti, P., Guidetti, G., Costa, E. e Guidotti, A., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 257: 1062-68 (1991)
- 59 - Kellogg, C.K., Primus, R.J. e Bitran, D., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 256:259-265 (1991)
- 60 - Kang, I. e Miller, L.G., *Br. J. Pharmacol.*, 103:1285-1287 (1991)
- 61 - Gray, J.A., Holt, L. e MacNanghton, N., *Clinical Implication of the Experimental Pharmacology of the Benzodiazepines em The Benzodiazepines: from molecular biology to clinical practice*, Ed. Costa E., Raven Press, New York, 147-171 (1983)
- 62 - Stein, L., *Arzneim.-Forsch./Drug Res.*, 30(I):868-874 (1980)
- 63 - Breimer, D.D., Jochemsen, R. e Von Albert, H.H., *Arzneim.-Forsch./Drug Res.*, 30(I):875-881 (1980)
- 64 - Dundee, J.W., Johnston, H.M., Lilburn, J.K., Nair, S.G. e Scott, M.G., *Br. J. clin. Pharmac.*, 4: 706-708 (1977)
- 65 - Dios-Vieitez, M.C. e Fos, D., *An. Real Acad. Farm.*, 56:163-170 (1990)
- 66 - De Silva, J.A.F., Koechlin, B.A. e Bader, G., *J. Pharm. Sci.*, 55: 692-702 (1966)
- 67 - Jack, M.L. e Colburn, W.A., *J. Pharm. Sci.*, 72:1318-1323 (1983)
- 68 - Schwartz, M.A. e Postma, E., *J. Pharm. Sci.*, 59:1800-1806 (1970)
- 69 - Breimer, D.D. e Jochemsen, R., *Br. J. clin. Pharmac.*, 16:277S-278S (1983)
- 70 - Greenblatt, D.J., Shader, R.I., Franke, K., Maclaughlin, D.S., Harmatz, J.S., Allen, M.D., Werner, A. e Woo, E., *J. Pharm. Sci.*, 68:57-63 (1979)
- 71 - Shader, R.I. e Greenblatt, D.J., *Br. J. clin. Pharmac.*, 11:5S-9S (1981)
- 72 - Walkenstein, S.S., Wiser, R., Gudmundsen, C.H., Kimmel, H.B. e Corradino, R.A., *J. Pharm. Sci.*, 53:1181-1186 (1964)
- 73 - Sisenwine, S.F. e Tio, C.O., *Drug Metab. Dispos.*, 14:41-45 (1986)
- 74 - Sisenwine, S.F., Tio, C.O., Liu, A.L. e Politowski, J.F., *Drug Metab. Dispos.*, 15:579-580 (1987)
- 75 - Fuccella, L.M., *Br. J. clin. Pharmac.*, 8: 31S-35S (1979)

- 76 - Kaplan, S.A., Jack, M.L., Alexander, K. e Weinfeld, R.E., *J. Pharm. Sci.*, 62:1789-1795 (1973)
- 77 - Greenblatt, D.J., Shader, R.I. e Abernethy, D.R., *N. Eng. J. Med.*, 309:354-358 (1983)
- 78 - Greenblatt, D.J., Shader, R.I., Abernethy, D.R., Ochs, H.R., Divoll, M., Sellers, E.M., *Benzodiazepines and the Challenge of Pharmacocinetic Taxonomy* em *Pharmacology of Benzodiazepines*, Ed. Usdin, E., Skolnick, P., Tallman Jr, J.F., Greenblatt, D.J. e Paul, S.M., Verlag Chemie, Weinheim, Deerfield Beach, Florida, Basel, 257- 269 (1983)
- 79 - Singh, A.N. e Saxena, B., *Curr. Therap. Res.*, 26:260-274 (1979)
- 80 - Saxena, B., Singh, A.N. e Porter, W.R., *Curr. Therap. Res.*, 28:260-276 (1980)
- 81 - Lukey, B.J., Corcoran, K.D. e Solana, R.P., *J. Pharm. Sci.*, 80:918-921 (1991)
- 82 - Walker, R., Newman, P., Candlish, P., Hiller, C. e Seviour, J., *J. Pharm. Pharmacol.*, 34:33P (1982)
- 83 - Aiache, J.-M., Margot, Ph., Aiache, S. e Renoux, R., *Comparaison de la Biodisponibilité Voie Orale/Voie Rectale* em *Rectal Therapy*, Ed. Glas, B. e Blaey, C.J., St. Rémy de Provence, J.R. Prous/Publishers, 9-19 (1983)
- 84 - Jochemsen, R., Hogendoorn, J.J.H., Dingemanse, J., Hermans, J., Boeijinga, J.K e Breimer, D.D., *J. Pharmacokin. Biopharm.*, 10:231-245 (1982)
- 85 - Pelzer, H. e Maaß, M. D., *Arzneim.-Forsch./Drug Res.*, 19:1652-1656 (1969)
- 86 - Greenblatt, D.J., Divoll, M., Harmatz, J.S. e Shader, R.I., *J. Pharm. Sci.*, 71: 248-252 (1982)
- 87 - Lui, C.Y., Amidon, G.L. e Goldberg, A., *J. Pharm. Sci.*, 80:1125-1129 (1991)
- 88 - *AHFS Drug Information, American Hospital Formulary Service, American Society of Hospital Pharmacists*, Bethesda, 1333-1357 (1991)
- 89 - Greenblatt, D.J., Arendt, R.M., Abernethy, D.R., Giles, H.G., Sellers, E.M. e Shader, R.I., *Br. J. Anaesth.*, 55:985-989 (1983)
- 90 - Bernardi, M., Manzo, L., Hokari, S. e Bertè, F., *Boll. Soc. It. Biol. Sper.*, 44: 1937-1941 (1968)
- 91 - Manzo, L., Hokari, S., Bernardi, M. e Bertè F., *Soc. It. Biol. Sper.*, 44:1941-1944 (1968)
- 92 - Hokari, S., Manzo, L., Bernardi, M., Bertè, F., *Soc. It. Biol. Sper.*, 43:861-864 (1967)
- 93 - Greenblatt, D.J., Shader, R.I., Divoll, M. e Harmatz, J.S., *Br. J. clin. Pharmacol.*, 11:11S-16S (1981)
- 94 - Straw, R.N., *Implications of Benzodiazepine Prescribing* em *Benzodiazepines Divided*, Ed. Trimble, M.R., John Wiley & Sons Ltd., 67-77 (1983)
- 95 - Rogers, H.J., Spector, R.J. e Trounce, J.R., *Benzodiazepines* em *A textbook of Clinical*

- Pharmacology, 1ª Ed., 204-212 (1981)
- 96 - Garret, J., Osswald, W., *Terapêutica Medicamentosa e Suas Bases Farmacológicas*, Porto Editora, II Vol., 1103 (1983)
- 97 - Sklar, G.S., Sonn, D.D.-I. e Watson, W.A., *DICP, The Annals of Pharmacotherapy*, 23:659-661 (1989)
- 98 - Patrick, M.J., Tilstone, W.J. e Reavey, P., *Lancet*, 4:542-543 (1972)
- 99 - Bertè, F., Manzo, L., Bernardi, M. e Benzi, G., *Il Farmaco, Ed. Pr.*, 25: 177-185 (1970)
- 100 - Baladrón, M.A., Vicedo, B.T., Díaz, G.B., Velasco, J.P., Gonzalez, C.F. e Sierra, A.A., *Farm. Clin.*, 8: 86-90 (1991)
- 101 - Nahata, M.C., *Drug Intell. Clin. Pharm.*, 22:711-715 (1988)
- 102 - Greenblatt, D.J., Divoll, M., Harmatz, J.S., MacLaughlin, D.S. e Shader, R.I., *Clin. Pharmacol. Therap.*, 30:475-486 (1981)
- 103 - Bayer, A.J. e Pathy, M.S.J., *Curr. Med. Res. Opin.*, 10:17-24 (1986)
- 104 - Salzman, C., Shader, R.I., Greenblatt, D.J. e Harmatz, J.S., *Arch. Gen. Psychiatry*, 40: 293-297 (1983)
- 105 - Ameer, B. e Greenblatt, D.J., *Drugs*, 21:161-200 (1981)
- 106 - Maloley, P.A., Gal, P., Mize, R., Weaver, R.L. e Ransom, J.L., *DICP, The Annals of Pharmacotherapy*, 24:326-327 (1990)
- 107 - Divoll, M., Greenblatt, D.J., Harmatz, J.S. e Shader, R.I., *J. Pharm. Sci.*, 70:1104-1107 (1981)
- 108 - Jochemsen, R., Beusekom, B.R., Spoelstra, P., Jassens, A.R. e Breimer, D.D., *Br. J. clin. Pharmac.*, 15:295-302 (1983)
- 109 - Shull, H.J., Wilkinson, G.R., Johnson, R. e Schenkr, S., *An. Intern. Med.*, 84:420-425 (1976)
- 110 - Greenblatt, D.J., Divoll, M., Harmatz, J.S. e Shader, R.I., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 215: 86-91 (1980)
- 111 - Dhillon, S. e Richens, A., *Br. J. clin. Pharmac.*, 12:591-592 (1981)
- 112 - Alps, B.J., Harry, T.V.A. e Southgate, P.J., *Curr. Med. Res. Opin.*, 1:265-268 (1973)
- 113 - Ochs, H.R., Greenblatt, D.J., Kaschell, H.J., Klehr, U., Divoll, M. e Abernathy, D.R., *Br. J. clin. Pharmac.*, 12:829-832 (1981)
- 114 - Abruzzo, C.W., MacOsieb, T., Weinfeld, R., Rider, J.A. e Kaplan, S.A., *J. Pharmacokin. Biopharm.*, 5:377-390 (1977)
- 115 - Greenblatt, D.J., Shader, R.I., Harmatz, J.S., Franke, K. e Weser, J.K., *Clin. Pharmacol. Ther.*, 26:103-113 (1976)

- 116 - Klotz, U., *Drug Interactions With Benzodiazepines* em Pharmacology of Benzodiazepines, Ed. Usdin, E., Skolnick, P., Tallman Jr, J.F., Greenblatt, D.J. e Paul, S.M., Verlag Chemie, Weinheim, Deerfield Beach, Florida, Basel, 299-311 (1983)
- 117 - Kroboth, P.D., Smith, R.B., Stoehr, G.P e Juhl, R.P. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 38: 525-532 (1985)
- 118 - *Manual de Interacciones de los Medicamentos*, Publicacion del Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos, Madrid, 22-23 (1983)
- 119 - Divoll, M. e Greenblatt, D.J., *Pharmacology*, 22:263-268 (1981)
- 120 - Barnhill, J.G., Ciraulo, D.A., Greenblatt, D.J., Faggart, M.A. e Harmatz, J.S., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 258:812-819 (1991)
- 121 - Khoo, K.-C., Mendels, J., Rothbart, M., Garland, W.A., Colburn, W.A., Min, B.H., Lucek, R., Carbone, J.J., Boxenbaum, H.G. e Kaplan, S.A., *Clin. Pharmacol. Ther.*, 28:368-375 (1980)
- 122 - Ohnhaus, E.E., Park, B.K., Columbo, J.P. e Heizmann, P., *Br. J. clin. Pharmac.*, 8:557-563 (1979)
- 123 - Ochs, H.R., Greenblatt, D.J., Roberts, G.M., Dengler, H.J., *Clin. Pharmacol. Ther.*, 29:671-678 (1981)
- 124 - Ochs, H.R., Greenblatt, D.J. e Knüchel, M., *Br. J. clin. Pharmac.*, 16:743-746 (1983)
- 125 - Patwardman, R.A. Johnson, R.F., Sinclair, A.P., Schenker, S. e Speeg, K.V., *Gastroenterology*, 81:547-551 (1981)
- 126 - Klotz, U. e Reimann, I., *Clin. Pharmacol. Ther.*, 30:513-517 (1981)
- 127 - Greenblatt, D.J., Abernethy, D.R., Koepke, H.H. e Shader, R.I., *J. Clin. Pharmacol.*, 24: 187-193 (1984)
- 128 - Patwardhen, R.V., Yarborough, G.W., Desmond, P.V., Johnson, R.F., Schenker, S. e Speeg Jr., K.V., *Gastroenterology*, 79:912-916 (1980)
- 129 - Botter, P.A., *Curr. Med. Res. Opin.*, 1:282-284 (1973)
- 130 - Debert, R., *Curr. Med. Opin.*, 1:296-300 (1973)
- 131 - Bailey, H.R., Davies, E. e Morrison, I.J., *Curr. Med. Res. Opin.*, 7:156-163 (1981)
- 132 - Schneider, P.J. e Perry, P.J., *DICP, The Annals of Pharmacotherapy*, 24:389-392 (1990)
- 133 - *Drugs and Therapeutics Bulletin*, 29:89-90 (1991)
- 134 - Lader, M.H., *Acta Psych. Scand.*, Suppl. 274:89-93 (1978)
- 135 - Siassi, I., Thomas, M. e Vanov, S.K., *Curr. Ther. Res.*, 18:163-171 (1975)
- 136 - Imlah, N.W., *Acta Psych. Scand.*, Suppl. 274:94-98 (1978)

- 137 - Scharf, M.B. e Jacoby, J.A., *Clin. Pharmacol. Ther.*, 31:175-179 (1982)
- 138 - Votolato, N.A., Batcha, K.J. e Olson, S.C., *Drug Intell. Clin. Pharm.*, 21: 754-755 (1987)
- 139 - Finley, P.R. e Nolan, P.E., *DICP, The Annals of Pharmacotherapy*, 23:151-152 (1989)
- 140 - Burnakis, T.G. e Berman, D.E., *DICP, The Annals of Pharmacotherapy*, 23: 671-672 (1989)
- 141 - Hollister, L.E., *Br. J. clin. Pharmac.*, 11:117S-119S (1981)
- 142 - Olgiatei, S.G., *Curr. Ther. Res.*, 17:13-22 (1975)
- 143 - Gomez-Lozano, P., *Curr. Ther. Res.*, 19 469-474 (1976)
- 144 - Kales, A., Bixler, E.O., Vela-Bueno, A., Soldatos, C.R., Niklaus, D.E. e Manfredi, R.L., *Clin. Pharmacol. Ther.*, 40:378-386 (1986)
- 145 - Yahni, C.Z. e Pardo, C.A., *Farm. Clin.*, 5:131-138 (1988)
- 146 - Ankier, S.I. e Goa, K.L., *Drugs*, 35:42-62 (1988)
- 147 - Lader, M., *Br. Med. J.*, 293:1048-1049 (1986)
- 148 - Fouks, L., Pinalie, B., Porcheron, J.B. e Cardon, A., *Acta Psych. Scand.*, Suppl. 274:99-103 (1978)
- 149 - Blitt, C.D., Petty, W.C. e Wright, W.A., *Anesth. Analg.*, 55:522-525 (1976)
- 150 - Colwell, B.L. e Lopez, J.R., *Drug Intell. Clin. Pharm.*, 21:794-795 (1987)
- 151 - Walker, J.E., Homan, R.W., Vasko, M.R., Crawford, I.L., Bell, R.D. e Tasker, W.G., *Annals of Neurology*, 6:207-213 (1979)
- 152 - Fragen, R.J., Gahl, F e Caldwell, N., *Anesthesiol.*, 49:41-43 (1978)
- 153 - Hewitt, J.M. e Barr, A.M., *Br. J. Anaesth.*, 50:1149-1154 (1978)
- 154 - Knapp, R.B. e Fierro, L., *Anesth. Analg.*, 53:122-124 (1974)
- 155 - Fragen, R.J., Cadwell, N., *Anesth. Analg.*, 55:792-796 (1976)
- 156 - Wilson, J. e Ellis, F.R., *Br. J. Anaesth.*, 45:738-744 (1973)
- 157 - Magbagbeola, J.A.O., *Br. J. Anaesth.*, 46:449-451 (1974)
- 158 - Norris, W. e Wallace, P.J.M., *Br. J. Anaesth.*, 43:785-789 (1971)
- 159 - Pandit, S.K., Heisterkamp, D.V. e Cohen, P.J., *Anesthesiol.*, 45:495-500 (1976)
- 160 - Roussaux, J.P., Derely, M. e Hers, D., *J. Pharm. Belg.*, 44:192-196 (1989)
- 161 - Díaz, B.G., Rodríguez, E.G., Molist, M.G. e Collado, M.P.S., *Farm. Clin.*, 4: 733-742 (1987)
- 162 - McGillion, F., *Drugs of Today*, 25:27-31 (1989)
- 163 - *Formulário Hospitalar Nacional de Medicamentos*, 4ª Ed., Direccção-Geral de Assuntos Farmacêuticos, Imprensa Nacional-Casa da Moeda, 93-94 (1990)
- 164 - Prista, L.V.N., Alves, A.C. e Morgado, R.M.R., *Técnica Farmacêutica e Farmácia*

- Galénica*, III Vol., 3ª Ed., Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa, 501-553 (1990)
- 165 - The Pharmaceutical Society of Great Britain, *Handbook of Pharmaceutical Excipients*, The Pharmaceutical Press, London, 41-42 (1986)
- 166 - Ruiz, M.A., Contreras, M.D., Parera, A. e Cerezo, A., *Farm. Clin.*, 3:76-81 (1986)
- 167 - Deasy, P.V., O'Neill, C.T., *Pharm. Acta Helv.*, 64:231-235 (1989)
- 168 - Vila-Jato, J.L., Concheiro, A. e Seijo, B., *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 13:1315-1327 (1987)
- 169 - Turakka, L., Syrjänen, S., Lammi, J. e Syrjänen, K., *Acta Pharm. Fenn.*, 95:77-81 (1986)
- 170 - Graf, E., Fawzy, A.A. e Tsaktanis, J., *Acta Pharm. Technol.*, 29:209-215 (1983)
- 171 - Pinho, A.A., Morgado, R.R., Vilar, E.D. e Prista, L.V.N., *An. Dep. Farm. Centro Ci. Saúde - Univ. Fed. Pe*, 15:7-14 (1976)
- 172 - Baun, D.C. e Walker G.C., *Pharm. Acta Helv.*, 46:94-113 (1971)
- 173 - Buri, P., *Boll. Chim. Farm.*, 123:453-464 (1984)
- 174 - Lejoyeux, F., Ponchel, G., Wouessidjewe, D., Peppas, N.A. e Duchêne, D., *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 15:2037-2048 (1989)
- 175 - Choulis, N.H. e Papadopoulos, H., *J. Pharm. Sci.*, 64:1033-1035 (1975)
- 176 - Carli, F. e Simioni, L., *Pharm. Acta Helv.*, 53:320-326 (1988)
- 177 - Romero, A.P., Poncet, M., Jinot, J.C. e Chulia, D., *Pharm. Acta Helv.*, 63:309-314 (1988)
- 178 - Barbosa, M.T.R., *An. Real Acad. Farm.*, 56:201-210 (1990)
- 179 - Schwartz, J.B., Simonelli, A.P. e Higuchi, W.I., *J. Pharm. Sci.*, 57:274-277 (1968)
- 180 - Schwartz, J.B., Simonelli, A.P. e Higuchi, W.I., *J. Pharm. Sci.*, 57:278-282 (1968)
- 181 - Buri, P., *S.T.P. Pharma*, 3:193-199 (1987)
- 182 - Buri, P. e Doelker, E., *Pharm. Acta Helv.*, 55:189-197 (1980)
- 183 - Gander, B., Gurny, R. e Doelker, E., *Pharm. Acta Helv.*, 61:130-134 (1986)
- 184 - Moës, A.J., *J. Pharm. Belg.*, 44:60-70 (1989)
- 185 - Arama, E., Michaud, P., Rouffiac, R. e Rodriguez, F., *Pharm. Acta Helv.*, 64:116-120 (1989)
- 186 - Beltrami, V., Gurny, R. e Doelker, E., *Pharm. Acta Helv.*, 65:130-143 (1990)
- 187 - Gander, B., Gurny, R. e Doelker, E., *Pharm. Acta Helv.*, 61:178-184 (1986)
- 188 - Boscá, M.T.M., Morsillo, J.S. e Galán, A.C., *Farm. Clin.*, 7:344-353 (1990)
- 189 - Harland, R.S., Gazzaniga, A., Sangalli, M.E., Colombo, P. e Peppas, N.A., *Pharm. Res.*, 5:488-494 (1988)
- 190 - Rowland, M. e Beckett, A.W., *J. Pharm. Pharmacol.*, Suppl 16:156T-162T (1964)
- 191 - Robinson, J.R. e Erikson, S.P., *J. Pharm. Sci.*, 55:1254-1263 (1966)
- 192 - Prista, L.V.N., Melo, O.V. e Freitas, J.L., *An. Dep. Farm. Centro Ci Saúde - Univ. Fed.*

- Pe, 15:57-68 (1976)
- 193- Gaudi, D., Joachim, J., Duru, C., Poech, A. e Jacob, M., *Pharm. Acta Helv.*, 62:37-41 (1987)
- 194 - Huber, H.E. e Christenson, G.L., *J. Pharm. Sci.*, 57:164-166 (1968)
- 195 - Khan, K.A., *J. Pharm. Pharmacol.*, 27:48-49 (1975)
- 196 - Fischer, M., *Les Méthodes Statistiques Appliquées à La Recherche Scientifique*, Presses Universitaires de France, Paris, 57 (1947)
- 197 - Divoll, M., Greenblatt, D.J., Ciraulo, D.A. Puri, S.K., Ho, I. e Shader, R.I., *J. Clin. Pharmacol.*, 22:69-73 (1982)
- 198 - Bornemann, L.D., Crews, T., Chen, S.S., Twardak, S. e Patel, I.H., *J. Clin. Pharmacol.*, 26:55-59 (1986)
- 199 - Ueno, K., Kawashima, S., Uemoto, K., Ikada, T., Miyai, K., Wada, K., Yamazaki, K., Matsumoto, K. e Nakata, I., *D. I. C. P., The Annals of Pharmacotherapy*, 23:662-665 (1989)
- 200 - Conway, E.L., Phillips, P.A., Drummer, O.H. e Louis, W.J., *J. Pharm. Sci.*, 79:228-231 (1990)
- 201 - Kabra, P.M., Stevens, G.L. e Marton, L.J., *J. Chromatogr.*, 150:361-366 (1978)
- 202 - Peat, M.A. e Kopfak, L., *J. Forensic Sci.*, 24:46-54 (1979)
- 203 - Tjaden, U.R., Meeles, M.T.H.A., Thys, C.P. e Van der Kaay, M., *J. Chromatogr. (Biomedical Applications)*, 181:227-241 (1980)
- 204 - Ratnaraj, N., Goldberg, V.D., Elyas, A. e Lascelles, P.T., *Analyst*, 106:1001-1004 (1981)
- 205 - Bastos, M.L.P.A.S., *Resíduos de Fármacos em Carne de Bovino-Diazepam e Metabolitos*, Faculdade de Farmácia, Porto (1987)
- 206 - Allen, J.G. e Davies, C.A., *J. Pharm. Pharmacol.*, 27: 50-51 (1975)
- 207 - Benkaddour, N., Bonnet, L., Rodriguez, F. e Rouffiac, R., *Labo-Pharma-Probl. Tech.*, 32:270-278 (1984)
- 208 - Benkaddour, N., Michaud, P., Rodriguez, F. e Rouffiac, R., *Pharm. Acta Helv.*, 66:253-258 (1991)
- 209 - Cooper, B.F. e Brecht, J. *Am. Pharm. Assoc.*, 46:520-524 (1957)
- 210 - Samaligy, M.S. e Szantmiklosi, P., *Pharm. Ind.*, 40:274-277 (1978)
- 211 - Boymond, C., Doelker, E. e Buri, P., *Pharm. Acta Helv.*, 56:26-30 (1981)
- 212 - Wan, L.S.C. e Heng, P.W.S., *Pharm. Acta Helv.*, 61:157-163 (1986)
- 213 - Wan, L.S.C. e Heng, P.W.S., *Pharm. Acta Helv.*, 62:169-174 (1987)
- 214 - Fessi, H., Puisieux, F., Marty, J.-P. e Cartensen, J.T., *Pharm. Acta Helv.*, 55:261-269 (1980)

- 215 - Costa, M.L., Fessi, H. e Maty, J.-P., *Pharm. Acta Helv.*, 61:298-302 (1986)
- 216 - Guyonnet, T., Brossard, C. e Ylouses, D.L., *J. Pharm. Belg.*, 45:111-119 (1990)
- 217 - Bolhuis, J.K., Lerk, C.F., Zijlstra, H.T. e De Boer, A.H., *Pharm. Weekbl.*, 110:317-325 (1975)
- 218 - Lerk, C.F., Bolhuis, G.K. e Smedema, S.S., *Pharm. Acta Helv.*, 52:33-39 (1977)
- 219 - Wan, L.C.S. e Choong, Y.L., *Pharm. Acta Helv.*, 61:150-156 (1986)
- 220 - Solvang, S. e Finholt, P., *J. Pharm. Sci.*, 59:49-52 (1970)
- 221 - Giordano, F., Bettinetti, J.P., Caramella, C. e La Manna, A., *Il Farmaco Ed. Pr.*, 40:253-258 (1985)
- 222 - Dahl, T., Ling, T., Yee, J. e Bormeth, A., *J. Pharm. Sci.*, 79:389-392 (1990)
- 223 - *The United States Pharmacopoea XXII/National Formulary XVII*, 1922-1923 (1990)
- 224 - Gordon, M.S. e Chowhan, Z.T., *J. Pharm. Sci.*, 76:907-909 (1987)
- 225 - Johnson, J.R., Wang, L.-H., Gordon, M.S. e Chowhan, Z.T., *J. Pharm. Sci.*, 80:469-471 (1991)
- 226 - Gordon, M.S., Chatterjee, B. e Chowhan, Z.T., *J. Pharm. Sci.*, 79:43-47 (1990)
- 227 - Gibassier, D., Sado, P., Le Verge, R. e Devissaguet, J.-Ph., *Labo-Pharma-Probl. Tech.*, 30:249-256 (1982)
- 228 - Gueurten, D. e Jaminet, F., *Pharm. Acta Helv.*, 56:314-319 (1981)
- 229 - Ingani, H.M., e Moës, A.J., *S.T.P. Pharma*, 4:188-195 (1988)
- 230 - Sallans, F., Rodriguez, F., Sablayrolles, B., Combes, A., Patau, J.P. e Rouffiac, R., *J. Pharm. Belg.*, 43:81-87 (1988)
- 231 - Lin, S.-Y. e Yang, J.-C., *Pharm. Acta Helv.*, 64:236-240 (1989)
- 232 - Drewe, J., Keck, N., Guitard, P., Pellet, A., Johnston, B. e Beglinger, C., *J. Pharm. Sci.*, 80:160-163 (1991)
- 233 - Pilbrant, A., Glenn, P.-O., Sundwall, A., Vessman, J. e Wretlind, M., *Acta Pharmacol. Toxicol., Suppl.* 40:7-15 (1977)
- 234 - Wretlind, M., Pilbrant, A., Sundwall, A. e Vessman, J., *Acta Pharmacol. Toxicol., Suppl.* 40:28-39 (1977)
- 235 - Alván, G., Jönsson, M., Sundwall, A. e Vessman, J., *Acta Pharmacol. Toxicol., Suppl.* 40:16-27 (1977)
- 236 - Alván, G., Siwers, B. e Vessman, J., *Acta Pharmacol. Toxicol., Suppl.* 40:40-51 (1977)
- 237 - Baselt, R.C., *Analytical Procedures for Therapeutic Drug Monitoring and Emergency Toxicology*, 2ª Ed., PSG Publishing Company, Inc., Littleton, Massachusetts, 49-56 (1987)

- 238 - Shah, N.B. e Sheth, B.B., *J. Pharm. Sci.*, 61:412-416 (1972)
- 239 - Donbrow, M. e Samuelov, Y., *J. Pharm. Pharmacol.*, 32:463-470 (1980)
- 240 - Conte, U., Colombo, P., Caramella, C. e La Manna, A., *Il Farmaco Ed. Pr.*, 39:67-75 (1984)
- 241 - Lin, S.-Y., *J. Pharm. Sci.*, 77:229-232 (1988)
- 242 - Meddeb, F., Brossard, C., Wouessidjewe, D. e Devissaguet, J.P., *Pharm. Acta Helv.*, 64:307-311 (1989)
- 243 - Prista, L.V.N., Alves, A.C. e Morgado, R.M.R., *Técnica Farmacêutica e Farmácia Galénica*, I Vol., 3ª Ed., Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa, 948-957 (1983)
- 244 - Bargo, E.S., *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 66: 864-866 (1983)
- 245 - Reif, V.D. e DeAngelis, N.J., *J. Pharm. Sci.*, 72:1330-1332 (1983)
- 246 - Ergüven, H., Matejka, M., Dabas, P.C., Gaozza, C.H. e Carducci, C.N., *Acta Farm. Bonaerense*, 6:3-7 (1987)
- 247 - Alván, G. e Odar-Cederlöf, I., *Acta Psych. Scand.*, Suppl. 274:47-55 (1978)
- 248 - Deberdt, R., *Acta Psych. Scand.*, Suppl. 274:104-110 (1978)
- 249 - Mattila, M.A.K., Ruoppi, M.K., Ahlström-Bengs, Larni, H.M. e Pekkola, P.O., *Br. J. Anaesth.*, 53:1269-1272 (1981)
- 250 - Milligan, N., Dhillon, S., Oxley, J. e Richens, A., *Epilepsia*, 23:323-331 (1982)
- 251 - Saint-Maurice, C., Meistelman, C., Rey, E., Esteve, C., De Lauture, D. e Olive, G., *Anesthesiol.*, 65:536-538 (1986)
- 252 - Clausen, T.G., Wolff, J., Hansen, P.B., Larsen, F., Rasmussen, S.N., Dixon, J.S. e Crevoisier, C., *Br. J. clin. Pharmac.*, 25:457-463 (1988)
- 253 - Bahia, M.F.C.G., *Estabilidade e Biodisponibilidade de Penicilinas Semi-Sintéticas*, Faculdade de Farmácia, Porto, (1988)
- 254 - Prista, L.V.N., Alves, A.C. e Morgado, R.M.R., *Técnica Farmacêutica e Farmácia Galénica*, III Vol., 3ª Ed., Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa, 7-123 (1990)
- 255 - Muranishi, S., *Characteristics of Drug Absorption via the Rectal Route em Rectal Therapy*, Ed. Glas, B. e Blaey, C.J., St. Rémy de Provence, J.R. Prous/Publishers, 35-44 (1983)
- 256 - Caldwell, L., Nishihata, T., Fix, J., Selk, S., Cargill, R., Gardner, C.R. e Higuchi, T., *Absorption-Promoting Adjuvants: Animal Studies on their Effects on Rectal Drug Absorption em Rectal Therapy*, Ed. Glas, B. e Blaey, C.J., St. Rémy de Provence, J.R. Prous/Publishers, 57-61 (1983)
- 257 - Rácz, I., *Drug Formulation*, John Wiley and Sons, New York, Brisbane, Toronto,

- Singapore, 308-309 (1989)
- 258 - Gibaldi, M. e Feldman, S., *J. Pharm. Sci.*, 59:579-589 (1970)
- 259 - Van Hoogdalem, E.J., Vermeij-Kerrs, C., De Boer, A.G. e Breimer, D.D., *J. Pharm. Sci.*, 79:866-870 (1990)
- 260 - Jhavar, R.C., *Characterization of Physical Properties of Fatty Suppository Formulations Using Nonisothermal and Isothermal Techniques*, Rutgers University The State U. of New Jersey, New Brunswick, (1984)
- 261 - Guillot, B.R. e Lombard, A.P., *Le Suppositoire*, 1ª Ed., Maloine, S.A., Paris, 93-96 (1973)
- 262 - Lasserre, Y., Peneva, B., Jacob, M. e Puech, A., *Pharm. Acta Helv.*, 59:77-79 (1984)
- 263 - Fehri, B., Aiache, J.M. e Boukef, K., *J. Pharm. Belg.*, 44:197-209 (1989)
- 264 - Müller, B.W., *Physicochemical Parameters Affecting Chemical Stability and Bioavailability of Drugs in Suppository Bases em Rectal Therapy*, Ed. Glas, B. e Blaey, C.J., St. Rémy de Provence, J.R. Prous/Publishers, 21-26 (1983)
- 265 - Schmitt, M. e Guentert, T.W., *J. Pharm. Sci.*, 79:359-363 (1990)
- 266 - Ferreira, D.C., Bahia, M.F.G., Prista, L.V.N. e Carrilho, A.N.C., *Anal. Real Acad. Farm.*, 57: (1991)(em publicação)
- 267 - The Pharmaceutical Society of Great Britain, *Handbook of Pharmaceutical Excipients*, The Pharmaceutical Press, London, 271-272 (1986)
- 268 - *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18ª Ed., Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania, 270 (1990)
- 269 - Prista, L.V.N., Alves, A.C. e Morgado, R.M.R., *Técnica Farmacêutica e Farmácia Galénica*, I Vol., 3ª Ed., Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa, 1141 (1983)
- 270 - Lasserre, Y., Peneva, B., Jacob, M., Puech, A. e Sabatier, R., *Pharm. Acta Helv.*, 62:287-291 (1987)
- 271 - Albuquerque, A.R.G.A., *Administração de Fármacos por Via Rectal - Contribuição para o Estudo dos Supositórios*, Faculdade de Farmácia, Porto, (1965)
- 272 - Moës, A.J., *Pharm. Acta Helv.*, 55:307-311 (1980)
- 273 - Ferreira, D.C., *Rev. Port. Farm.*, 38:71-74 (1988)
- 274 - Ferreira, D.C., *Rev. Port. Farm.*, 38:77-82 (1988)
- 275 - Cho, M.J., Scahill, T.A. e Hester, Jr., J.B., *J. Pharm. Sci.*, 72: 356-362 (1983)
- 276 - De Bruyne, M.M.A., Sinnema, A. e Verweij, A.M.A., *Pharm. Weekbl.*, 4:12-15 (1982)
- 277 - Gallo, B., Alonso, R.M. e Madariaga, J.M., *Anal. Letter*, 19:1853-1865 (1986)
- 278 - Vire, J.-C., Hermosa, B.G. e Patriarche, G.J., *Analisis*, 15:499-503 (1987)
- 279 - Han, W.W., Yakatan, G.J. e Maness, D.D., *J. Pharm. Sci.*, 65:1198-1204 (1976)

- 280 - Mayer, W., Erbe, S., Wolf, G. e Voigt, R., *Pharmazie*, 27:700-707 (1972)
- 281 - Connors, K.A., Amidon, G.L. e Stella, V.J., *Chemical Stability of Pharmaceuticals - A Handbook for Pharmacists*, John Wiley & Sons, New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore, 412-419 e 637-642 (1986)
- 282 - Bruyne, M.M.A., Sinnema, A., e Verweij, A.M.A., *Forensic Sci. Int.*, 24:125-135 (1984)
- 283 - Inotsume, N. e Nakano, M., *J. Pharm. Sci.*, 69:1331-1334 (1980)
- 284 - Han, W.W., Yakatan, G.J. e Maness, D.D., *J. Pharm. Sci.*, 66:795-798 (1977)
- 285 - Han, W.W., Yakatan, G.J. e Maness, D.D., *J. Pharm. Sci.*, 66:573-577 (1977)
- 286 - Konishi, M., Hirai, K. e Mori, Y., *J. Pharm. Sci.*, 71:1328-1334 (1982)
- 287 - Vire, J.-C., Hermosa, B.G. e Patriarche, G.J., *Anal. Letter*, 19:1839-1851 (1986)
- 288 - The Pharmaceutical Society of Great Britain, *Clarke's Isolation and Identification of Drugs, in pharmaceuticals, body fluids and post-mortem material*, 2ª Ed., The Pharmaceutical Press, London, 711 (1986)
- 289 - Schütz, H., *J. Anal. Toxicol.*, 2:147-148 (1978)
- 290 - Stahl, E., *Thin-Layer Chromatography - A Laboratory Handbook*, 2ª Ed., Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 219 (1969)
- 291 - Inotsume, N. e Nakano, M., *Chem. Pharm. Bull.*, 28:2536-2540 (1980)
- 292 - Maupas, B. e Fleury, M.B., *Analisis*, 10:187-196 (1982)
- 293 - Ferreira, D.C., *Preparações Farmacêuticas de Benzodiazepinas - Influência da Constante Dielétrica, pH e Temperatura*, Faculdade de Farmácia, Porto (1987)
- 294 - Prista, L.V.N., Alves, A.C. e Morgado, R.M.R., *Técnica Farmacêutica e Farmácia Galénica*, III Vol., 3ª Ed., Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa, 238- 290 (1990)
- 295 - Sternlake, J.B., *Foundations of Molecular Pharmacology*, Vol. I, Medicinal and Pharmaceutical Chemistry, The Athlone Press of the University of London, 859-861 (1979)
- 296 - Garrett, E.R., *J. Pharm. Sci.*, 51:811-833 (1962)
- 297 - Colombo, B.M. e Causa, P., *Il Fármaco Ed. Pr.*, 25:95- 104 (1970)
- 298 - Colombo, B.M. e Causa, P., *Boll. Chim. Farm.*, 109:406-416 (1970)
- 299 - Colombo, B.M., Causa, P., Primavera, P. e Villano, V., *Il Fármaco Ed. Pr.*, 27:327-333 (1972)
- 300 - Lobo, J.M.C.N.S., *Contribuição para o Estudo da Tecnologia de Fabrico, Estabilidade e Biodisponibilidade de Formas Farmacêuticas Contendo Dipirona*, Faculdade de Farmácia, Porto (1989)
- 301 - Martin, A.N., *Principios de Física-Química para Farmacia e Biologia*, 1ª Ed. Esp.,

Editorial Alhambra (1967)

- 302 - Ferreira, D.C., Prista, L.V.N., Morgado, R.M.R. e Carrilho, A.P.C., *Anal. Real Acad. Farm.*, 56:493-502 (1990)
- 303 - Yalkowsky, S. H., *Techniques of Solubilization of Drugs* em *Drugs and the Pharmaceutical Sciences*, Vol. 12, Marcel Dekker, Inc., New York, Basel, 60-87 (1981)
- 304 - Yalkowsky, S.H. e Rubino, J.T., *J. Pharm. Sci.*, 74:416-421 (1985)
- 305 - Rubino, J.T. e Obeng, E.K., *J. Pharm. Sci.*, 80:479-483 (1991)
- 306 - Avis, K.E., Lachman, L. e Lieberman, H.A., *Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications*, Vol.I, Marcel Dekker, Inc., New York, Basel, 139-201 (1984)
- 307 - The Pharmaceutical Society of Great Britain, *Handbook of Pharmaceutical Excipients*, The Pharmaceutical Press, London, 123-124, 241-242 e 209-213 (1986)
- 308 - Broxton, T.J. e Wright, S., *J. Org. Chem.*, 51:2965-2969 (1986)
- 309 - Oliveira, A.G., Cuccovia, I.M. e Chaimovich, H., *J. Pharm. Sci.*, 79:37-42 (1990)
- 310 - Riegelman, S., *J. Am. Pharm. Assoc.*, 49:339-343 (1960)
- 311 - Prista, L.V.N., Alves, A.C. e Morgado, R.M.R., *Técnica Farmacêutica e Farmácia Galénica*, III Vol., 3ª Ed., Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa, 559 (1990)
- 312 - Moro, M.E., Novillo-Fertrell, J., Velazquez, M.M., *J. Pharm. Sci.*, 80:459-468 (1991)
- 313 - Barbosa, C.M.G., Prista, L.V.N. e Lobão, P., *Rev. Port. Farm.*, 40:20-23 (1990)

ANEXO I

OXAZEPAM - ENSAIOS DE VERIFICAÇÃO

1.- DESCRIÇÃO - Martindale - The Extra Pharmacopoeia, 29ª Ed.

Pó branco ou quase branco, inodoro ou quase inodoro, praticamente insolúvel na água, pouco solúvel no álcool e no clorofórmio.

2.- IDENTIFICAÇÃO - Farmacopeia Americana (USP XII/NFXVII)

2.1.- Utilizando uma diluição de brometo de potássio, obteve-se o espectro de infravermelho do oxazepam.

2.2.- Utilizando soluções alcoólicas, obteve-se o espectro de ultravioleta do oxazepam.

2.3.- pH (suspensão aquosa a 2%): localizado entre 4,8 e 7,0.

3.- PUREZA - Farmacopeia Americana (USP XII/NFXVII)

3.2.- Cinzas: teor inferior a 0,3%.

4.- DOSEAMENTO - Farmacopeia Americana (USP XXII/NF XVII)

A média de 6 determinações foi de 99,95%.

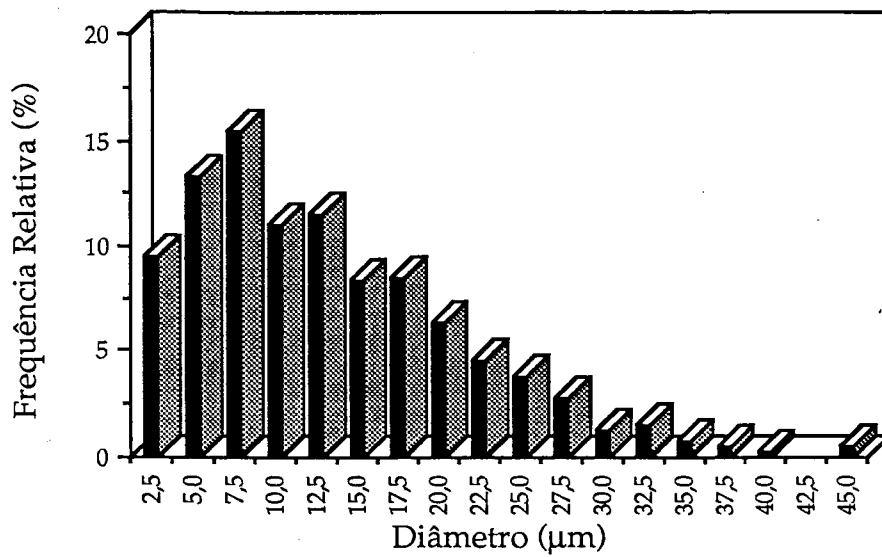


Figura 81 - Análise granulométrica do oxazepam (nº de partículas: 500).

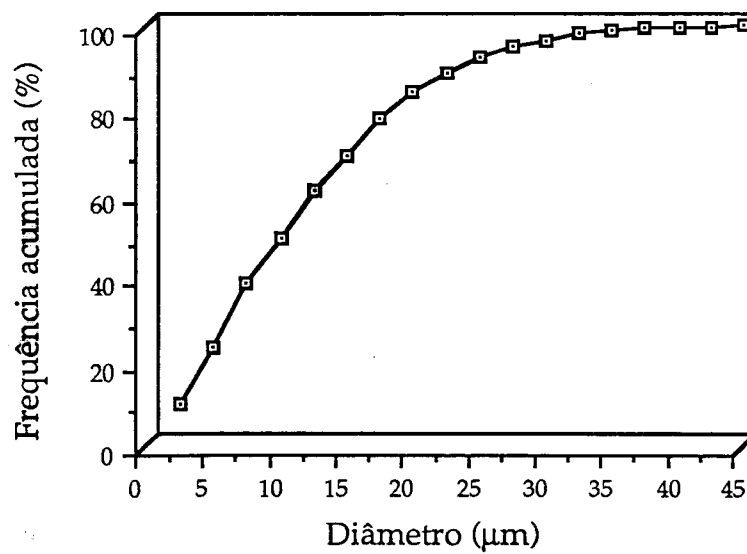


Figura 82 - Curva de frequências acumuladas.

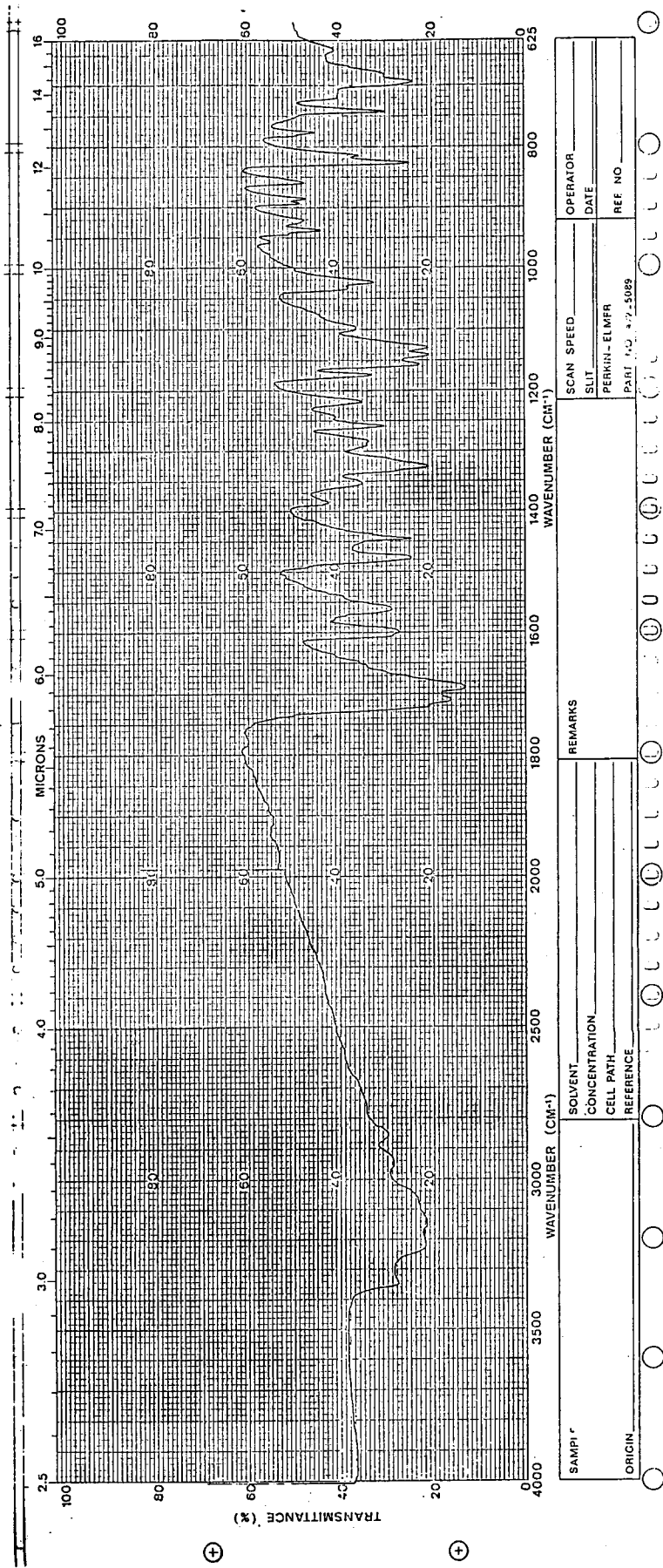


Figura 83 - Espectro no infravermelho do oxazepam.

CARBOPOL 934 - ENSAIOS DE VERIFICAÇÃO

1.- DESCRIÇÃO - Farmacopeia Inglesa (B Ph 1988)

Pó branco e impalpável, com cheiro característico, higroscópico, depois de neutralizado com álcalis é solúvel em água, em etanol (96%) e em glicerina.

2.- IDENTIFICAÇÃO - Farmacopeia Inglesa (B Ph 1988)

2.1.- Suspensão aquosa a 1% (m/V): com adição de solução azul de timol mudou para cor laranja; com adição de solução de vermelho de cresol mudou para cor amarela.

2.2 - Suspensão aquosa a 1% (m/V) a pH 7,5 (solução de hidróxido de sódio 1M): gele muito viscoso.

3.- PUREZA - Farmacopeia Inglesa (B Ph 1988)

3.1.- Perda por secagem: teor inferior a 2%.

3.2.- Cinzas: teor inferior a 0,1%.

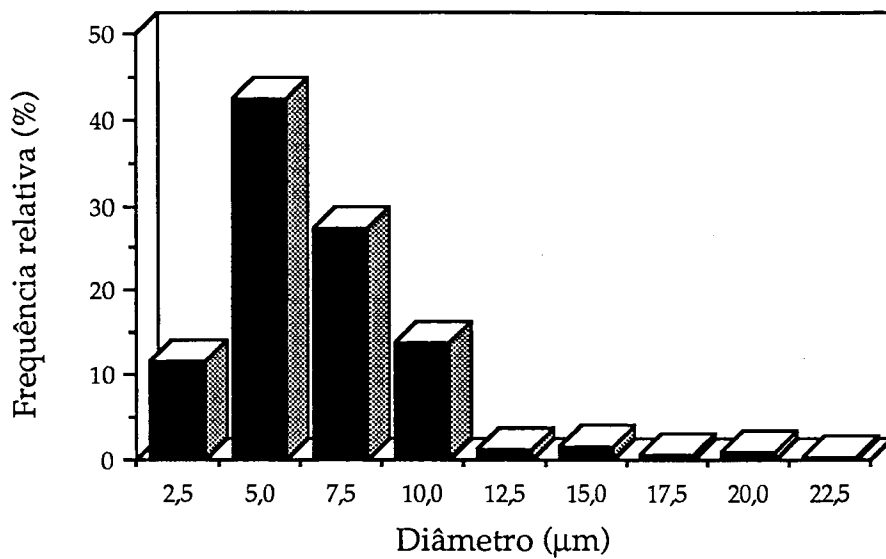


Figura 84 - Análise granulométrica do Carbopol 934 (nº de partículas: 500).

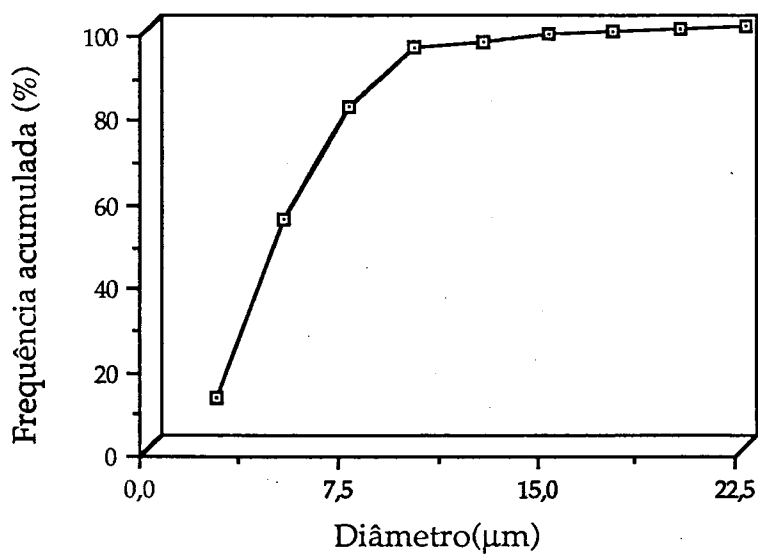


Figura 85- Curva de frequências acumuladas.

ANEXO II

MASSA NOVATA 299, B e BC - ENSAIOS DE VERIFICAÇÃO

1.- DESCRIÇÃO - Farmacopeia Portuguesa (FP V)

Massa branca, quebradiça, quase inodora, gordurosa ao tacto, praticamente insolúvel na água, facilmente solúvel no éter, pouco solúvel no etanol; aquecida funde originando um líquido incolor ou levemente amarelado; fundida e agitada energicamente com um volume igual de água quente, forma uma emulsão branca.

2.- IDENTIFICAÇÃO - Farmacopeia Portuguesa (FP V)

2.1.- Cheiro: inodoro

2.2.- Ponto de fusão(PF): 33-36°C.

2.3.- Índice de ácido(IA): teor inferior a 0,5.

2.4.- Índice de hidroxilo(IH): teor inferior a 50.

2.4.- Índice de iodo(II): teor inferior a 3.

2.5.- Índice de saponificação(IS): teor entre 225-245.

QUADRO LI - Os valores inscritos estão indicados no catálogo Henkel (1984)

NOVATA	IA	IH	II	IR	IS	PF	Densidade
299	<0,3	<5	<3	1,449	235-250	33,5-35,5	0,955-0,975
B	<0,3	20-30	<3	1,453	225-240	33,5-35,5	0,955-0,975
BC	<0,3	30-40	<3	1,453	225-240	33,0-34,5	0,955-0,975

MANTEIGA DE CACAU - ENSAIOS DE VERIFICAÇÃO

1.- DESCRIÇÃO - Farmacopeia Portuguesa (FP IV)

Sólido, de cor amarelada, opaco, fractura lisa, solúvel em 20 partes de álcool absoluto fervente, em 2 de éter, em 0,5 de benzina e no clorofórmio.

2.- IDENTIFICAÇÃO - Farmacopeia Portuguesa (FP V)

2.1.- Ponto de fusão: 29-32°C.

2.2.- Índice de ácido: 0,9.

2.4.- Índice de hidroxilo: 34.

2.4.- Índice de iodo: 2,3

2.5.- Índice de peróxidos: 0.

2.6.- Índice de saponificação: 212

ANEXO III

LORAZEPAM - ENSAIOS DE VERIFICAÇÃO

1.- DESCRIÇÃO - Farmacopeia Portuguesa (FP V)

Pó branco ou quase branco, inodoro ou quase inodoro, praticamente insolúvel na água, pouco solúvel no álcool e ligeiramente solúvel no clorofórmio.

2.- IDENTIFICAÇÃO - Farmacopeia Portuguesa (FP V)

2.1.- Utilizando as condições indicadas em 4.3.1.4.2., obteve-se o espectro de infravermelho do lorazepam.

2.2.- Utilizando as condições indicadas em 4.3.1.4.3., obteve-se o espectro de ultravioleta do lorazepam.

3.- PUREZA - Farmacopeia Portuguesa (FP V)

3.1.- Cromatografia em camada fina: aparecimento apenas da mancha principal.

3.2.- Cinzas sulfúricas: teor inferior a 0,1%.

4.- DOSEAMENTO - Farmacopeia Portuguesa (FP V)

A média de 6 determinações foi de 99,97%.

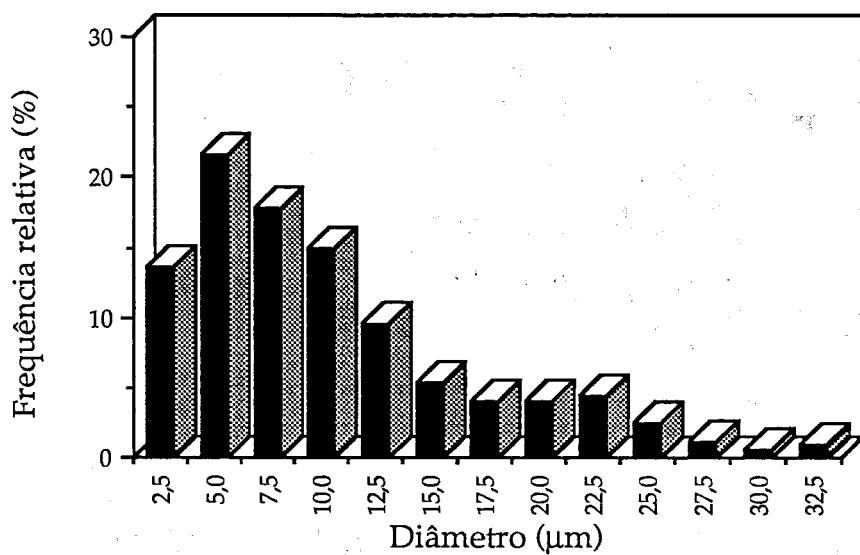


Figura 86 - Análise granulométrica do lorazepam (nº partículas: 500).

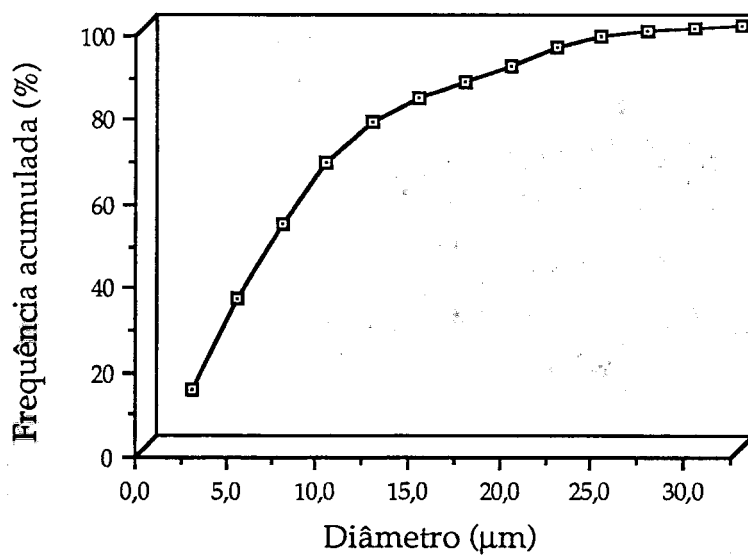


Figura 87 - Curva de frequências acumuladas.

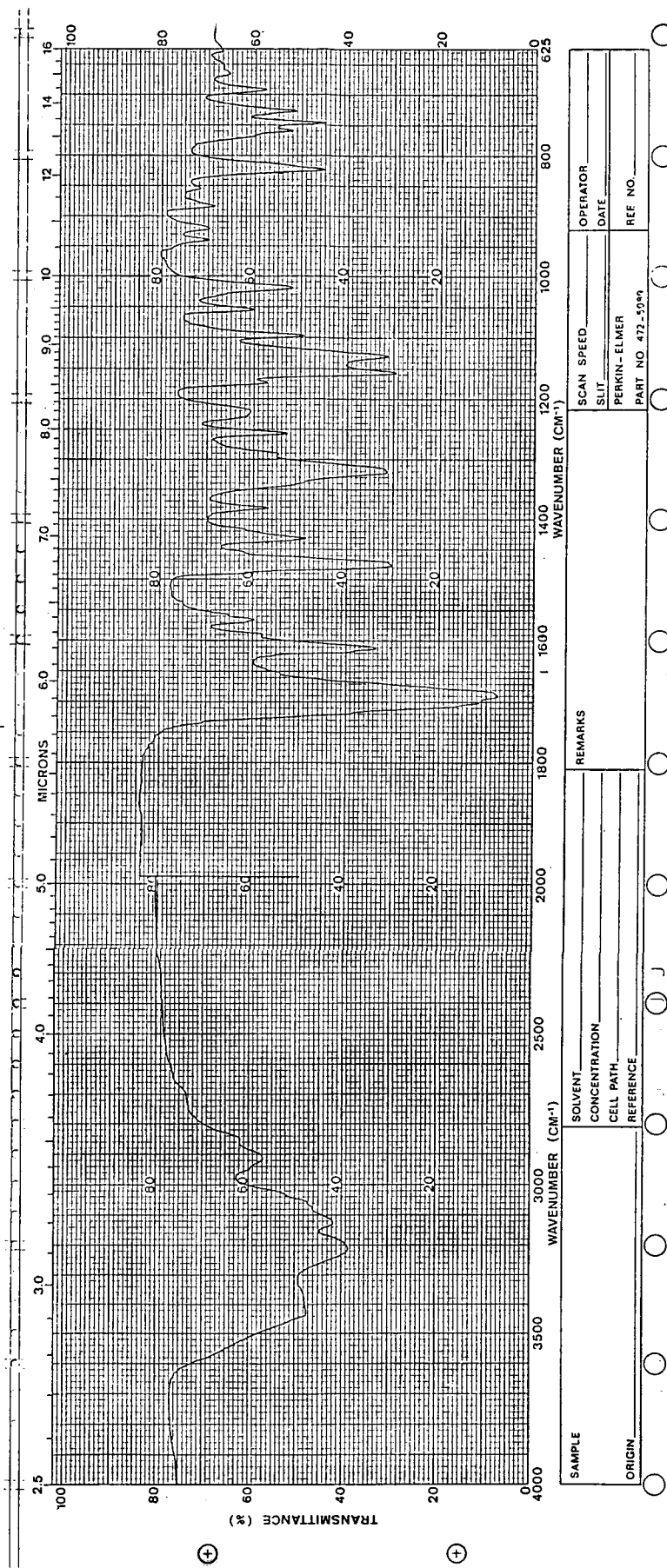


Figura 88 - Espectro no infravermelho do lorazepam.

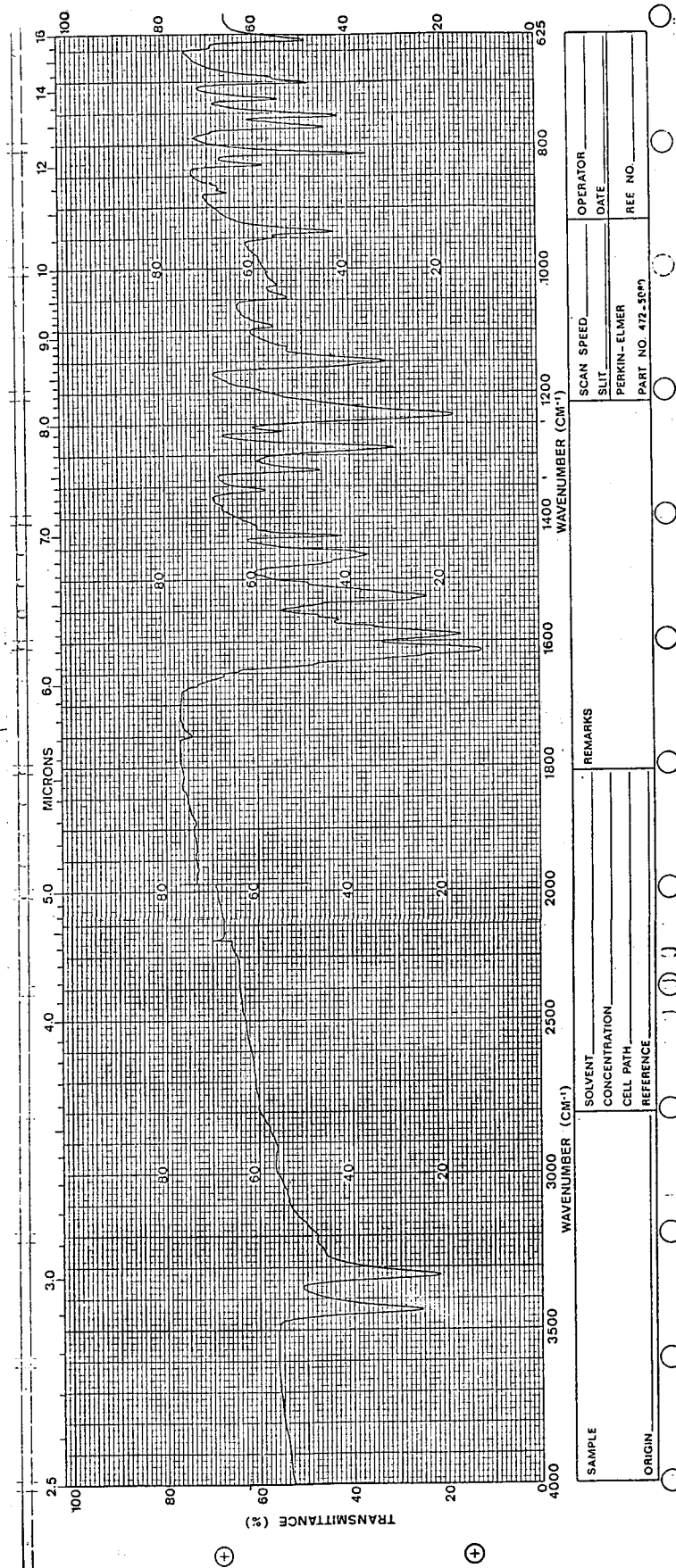


Figura 89 - Espectro no infravermelho do 2-amino-5,2'-diclorobenzofenona.

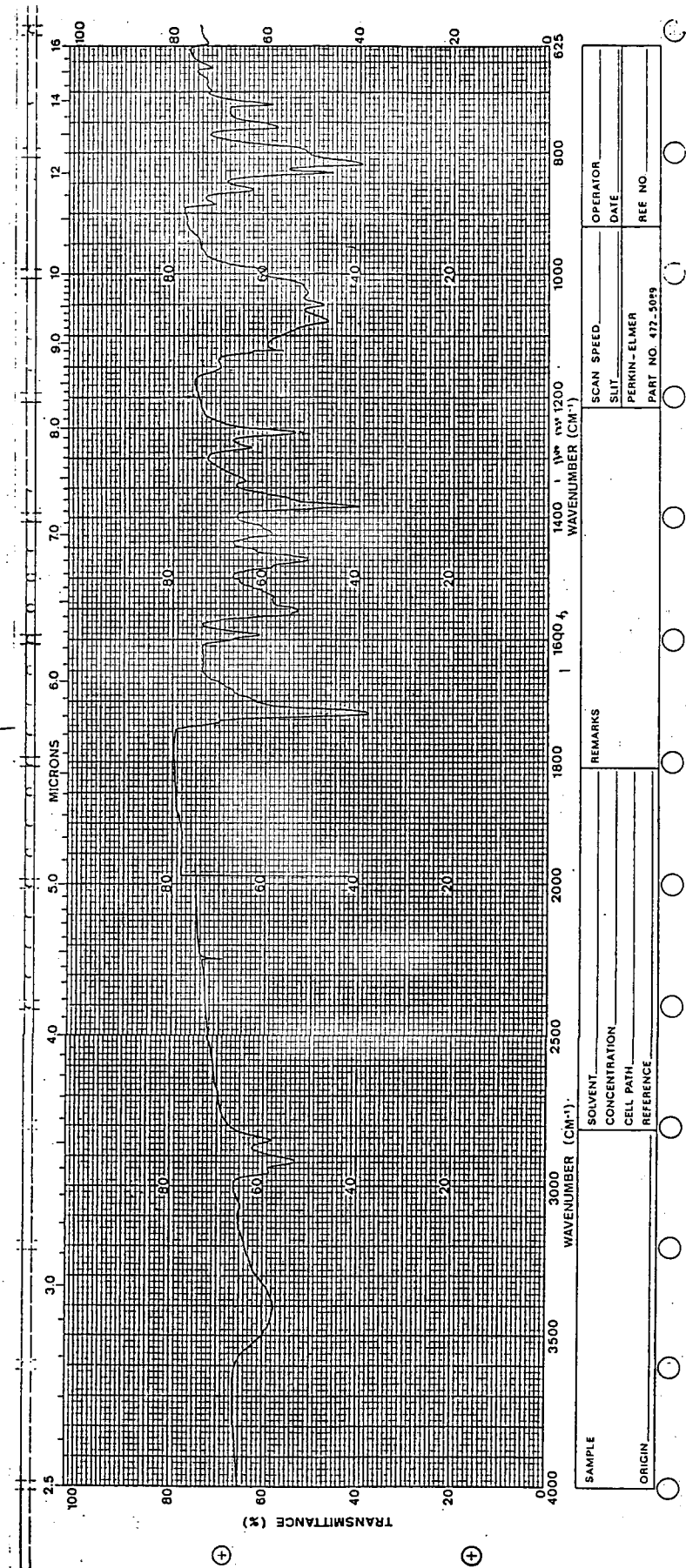


Figura 90 - Espectro no infravermelho do produto de hidrólise.

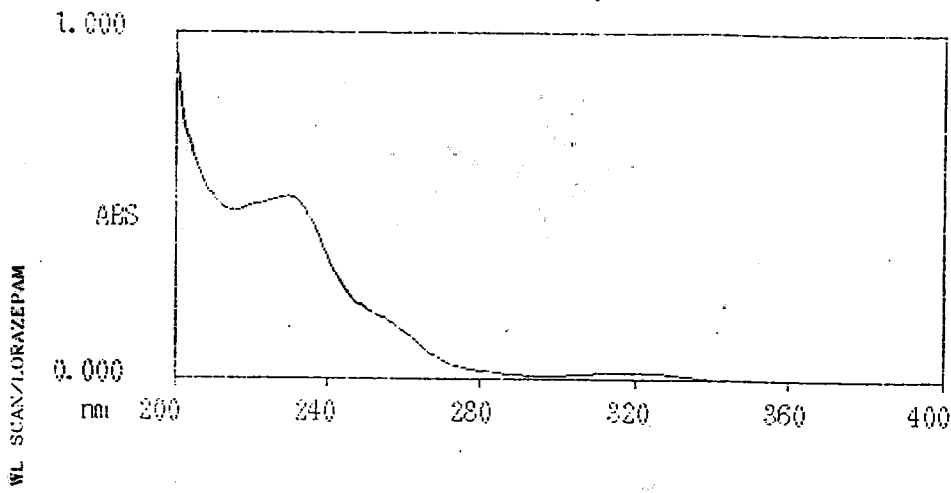


Figura 91 - Espectro no ultravioleta do lorazepam.

PEAK		VALLEY	
NO.	nm	nm	ABS
1	319.0	297.5	0.010
2	229.0	215.0	0.484

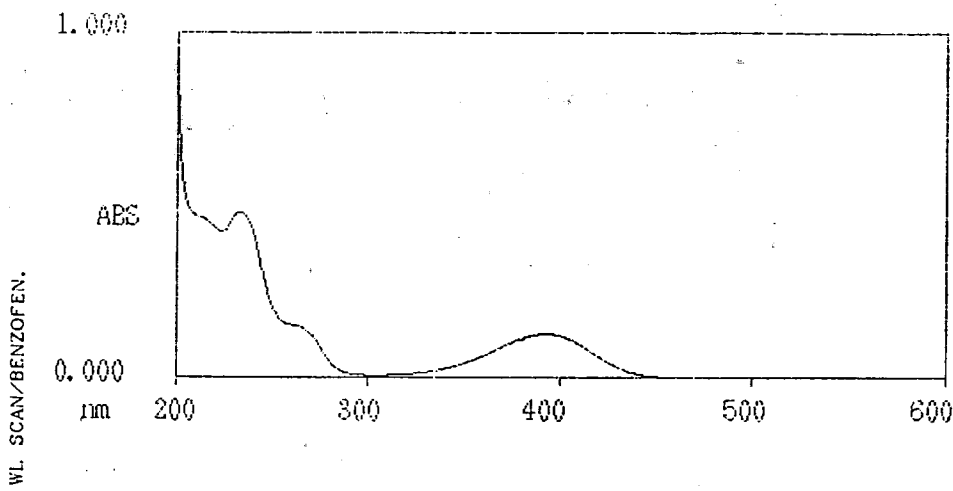


Figura 92 - Espectro no ultravioleta do 2-amino-5,2'-diclorobenzofenona.

PEAK		VALLEY	
NO.	nm	nm	ABS
1	392.0	304.5	0.006
2	233.0	223.0	0.417

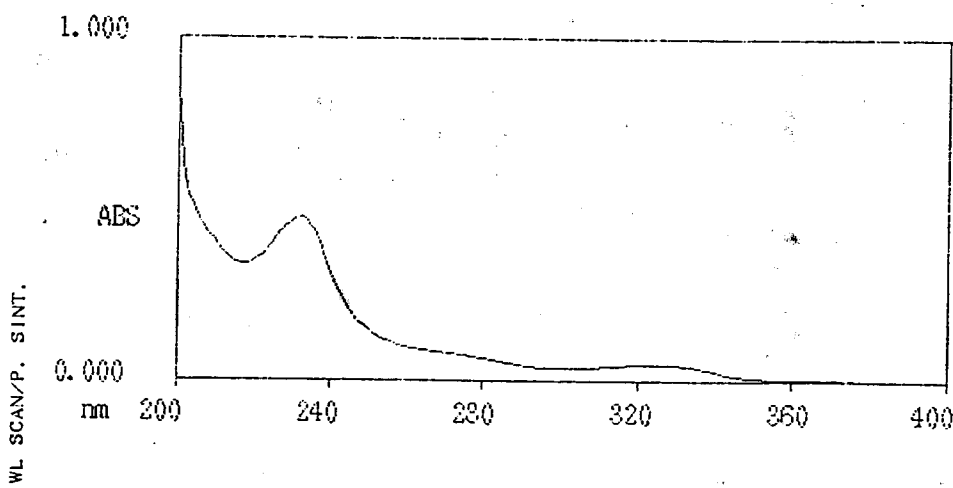


Figura 93 - Espectro no ultravioleta do produto de hidrólise.

PEAK		VALLEY	
NO.	nm	nm	ABS
1	321.0	380.5	-0.001
2	232.0	300.0	0.035
3		217.0	0.335

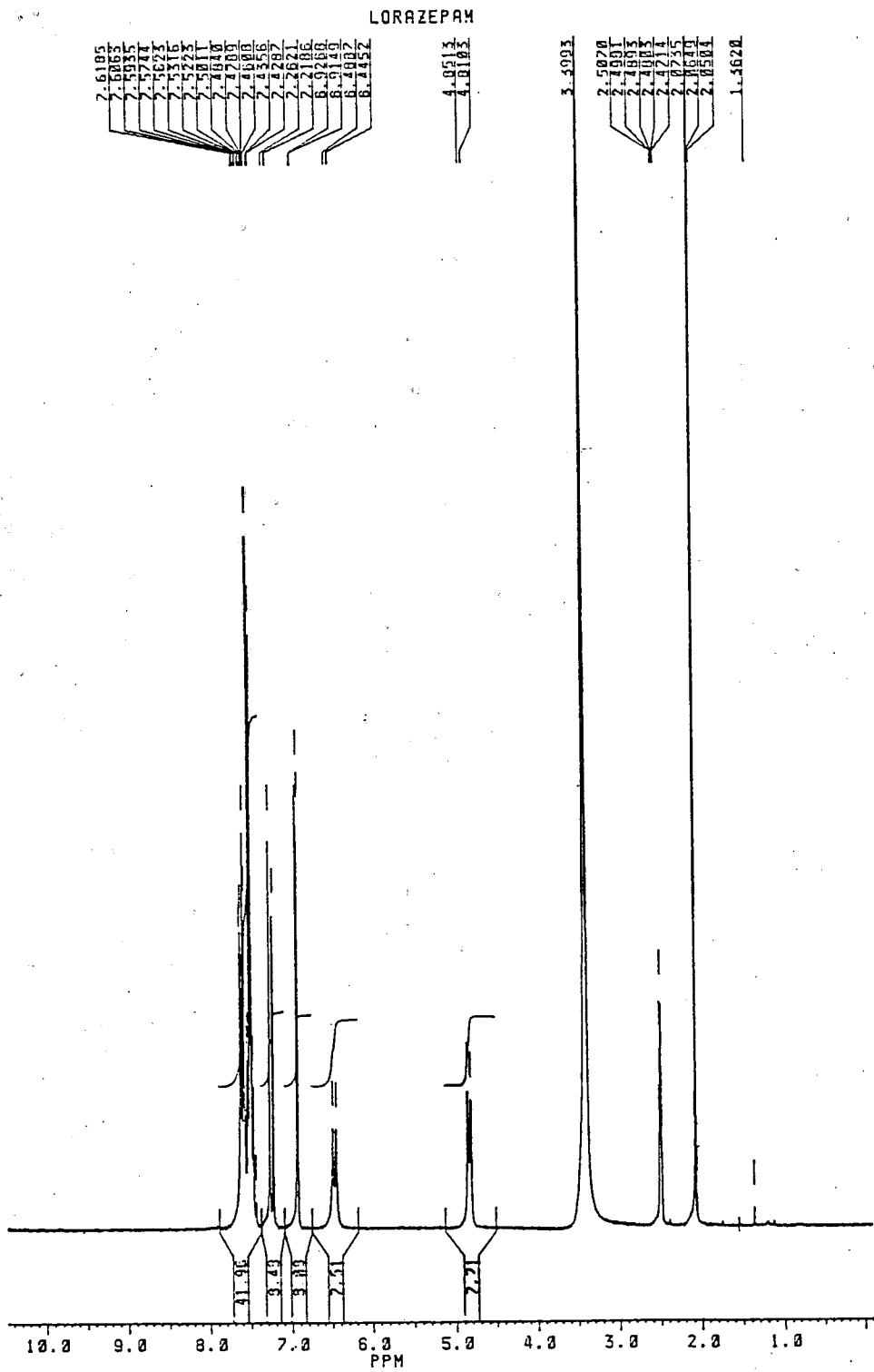


Figura 94 - Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, DMSO) do lorazepam.

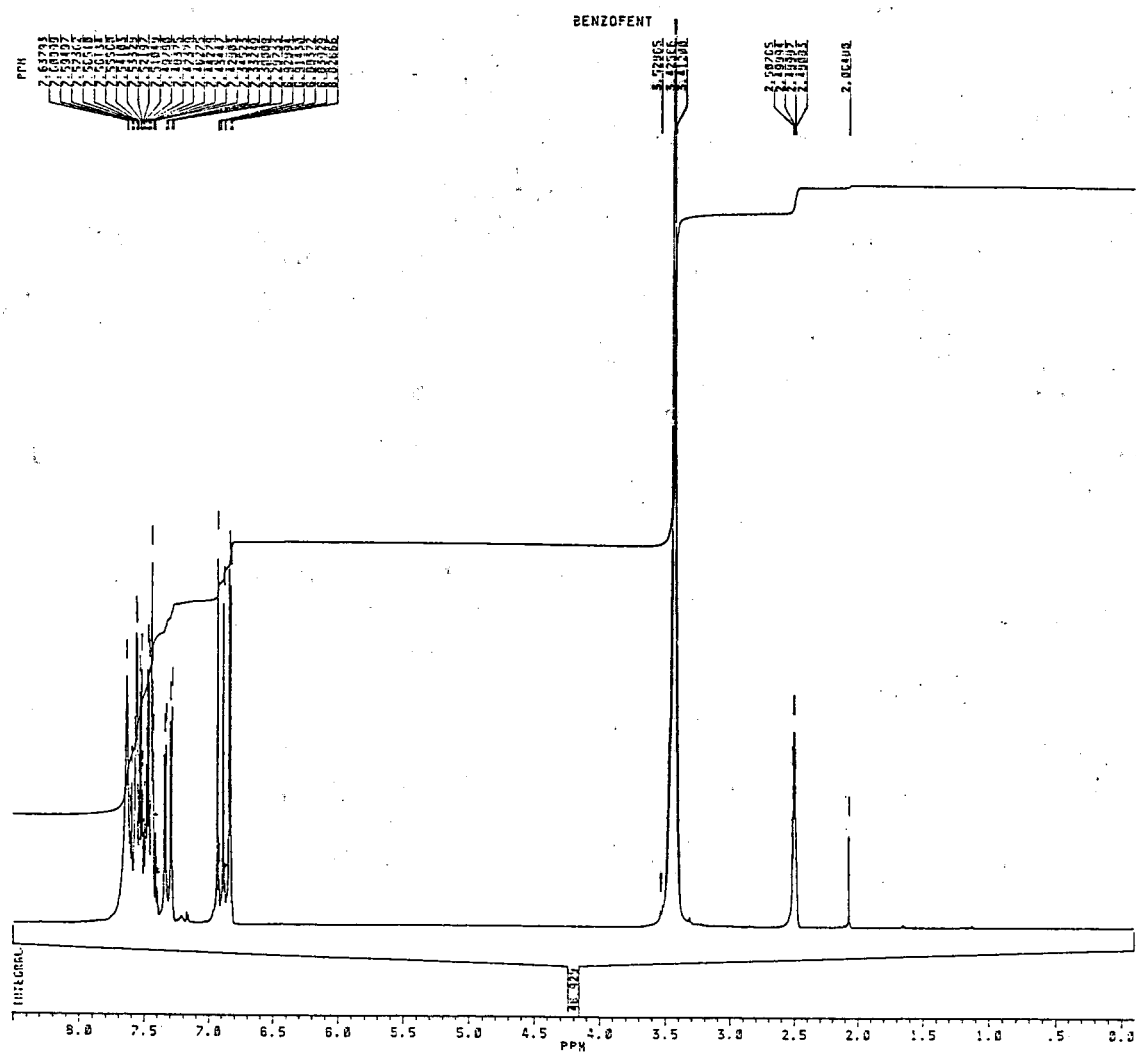


Figura 95 - Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, DMSO) do 2-amino-5,2'-diclorobenzofenona.

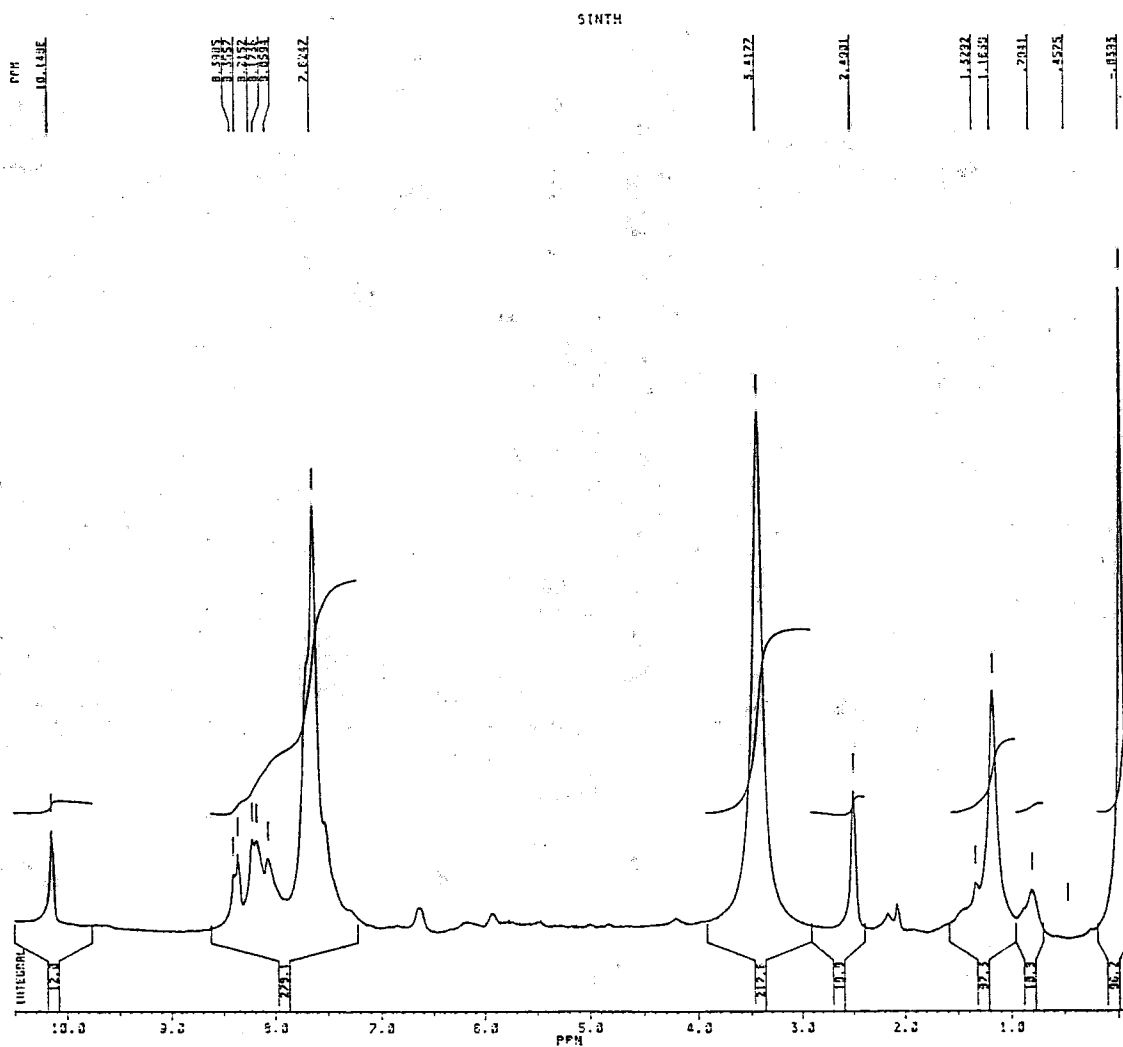


Figura 96 - Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, DMSO) do produto de hidrólise.

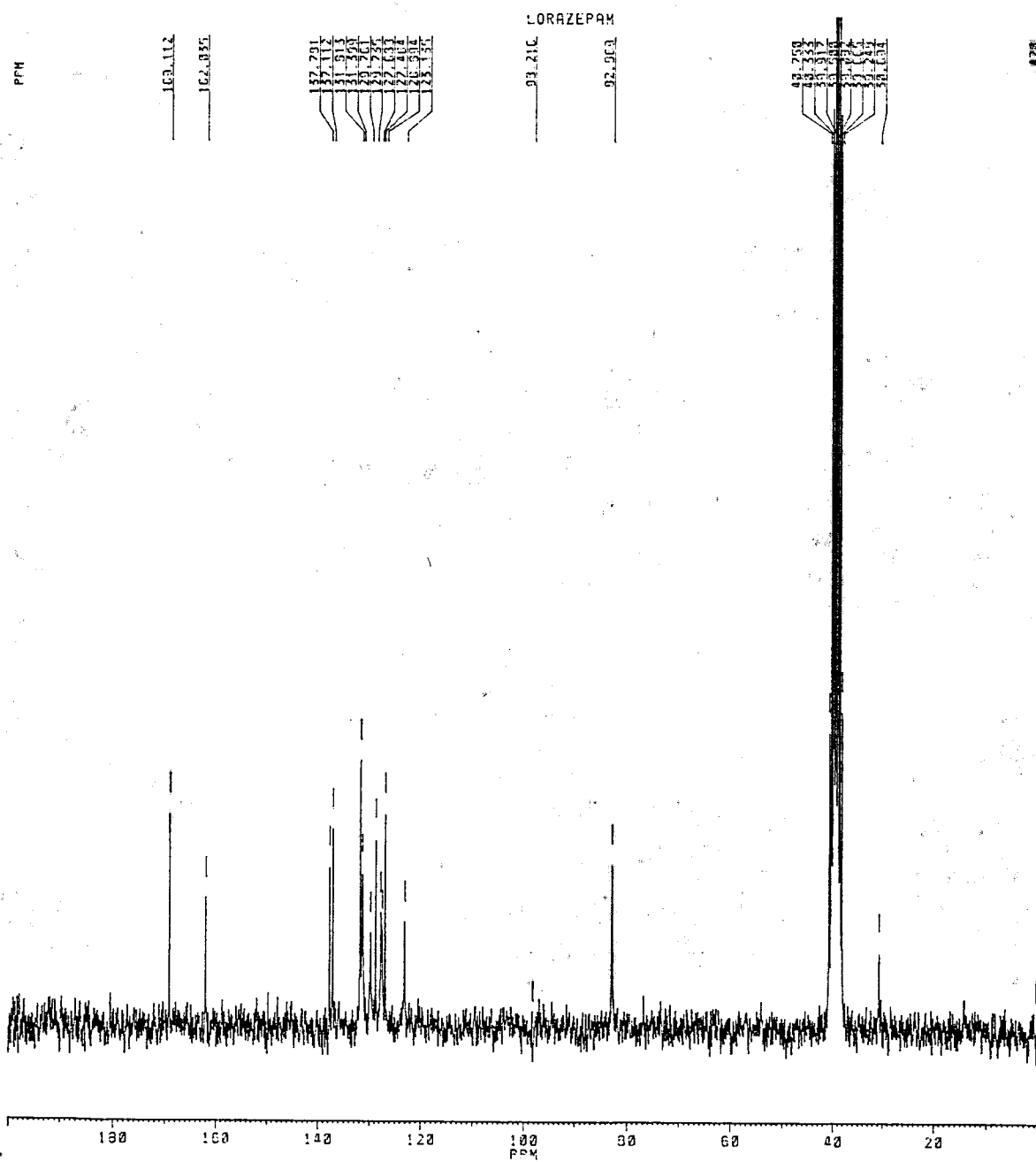


Figura 97 - Espectro de RMN de ^{13}C (50,3 MHz, DMSO) do lorazepam.

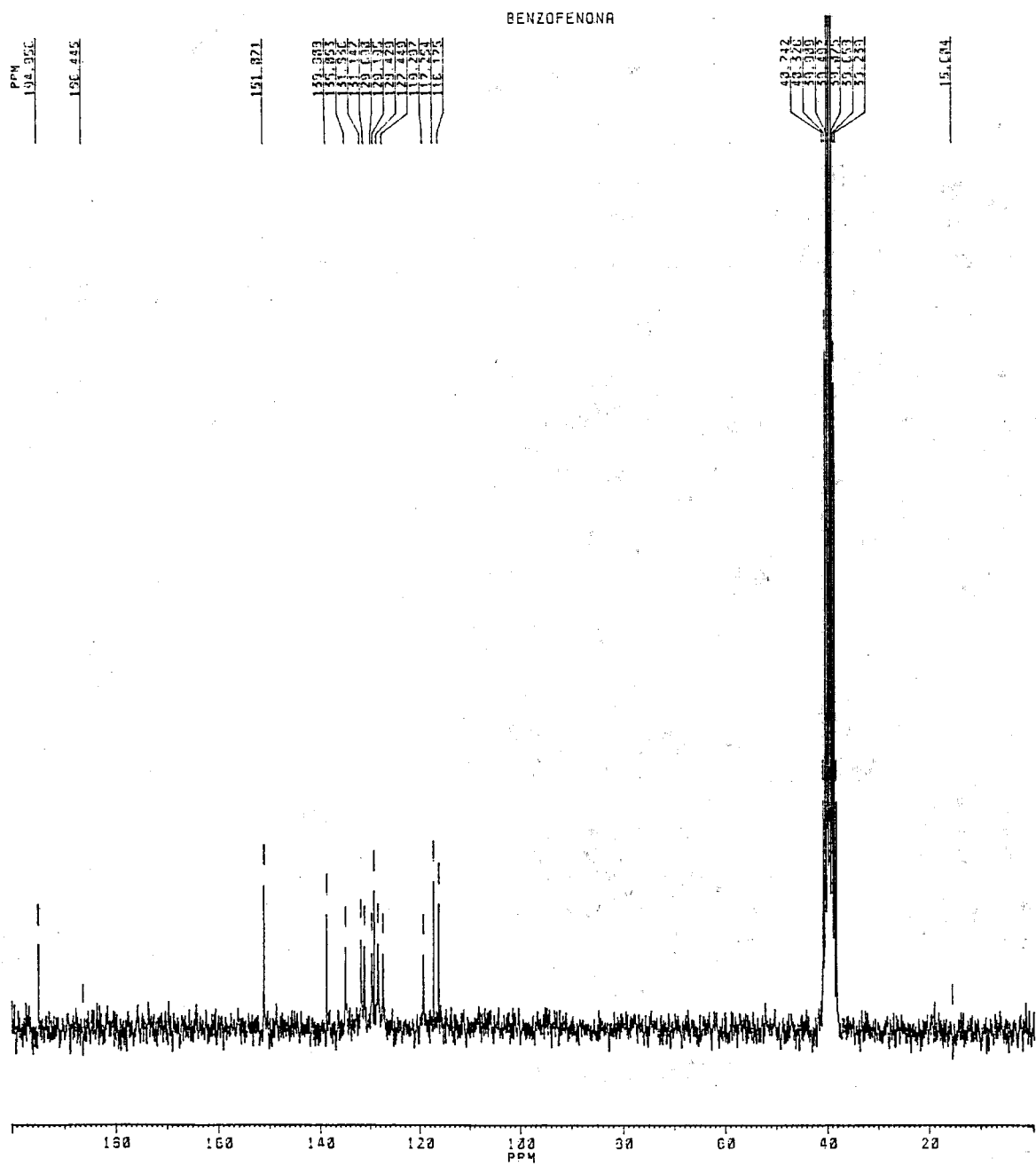


Figura 98 - Espectro de RMN de ^{13}C (50,3 MHz, DMSO) do 2-amino-5,2'-diclorobenzofenona.

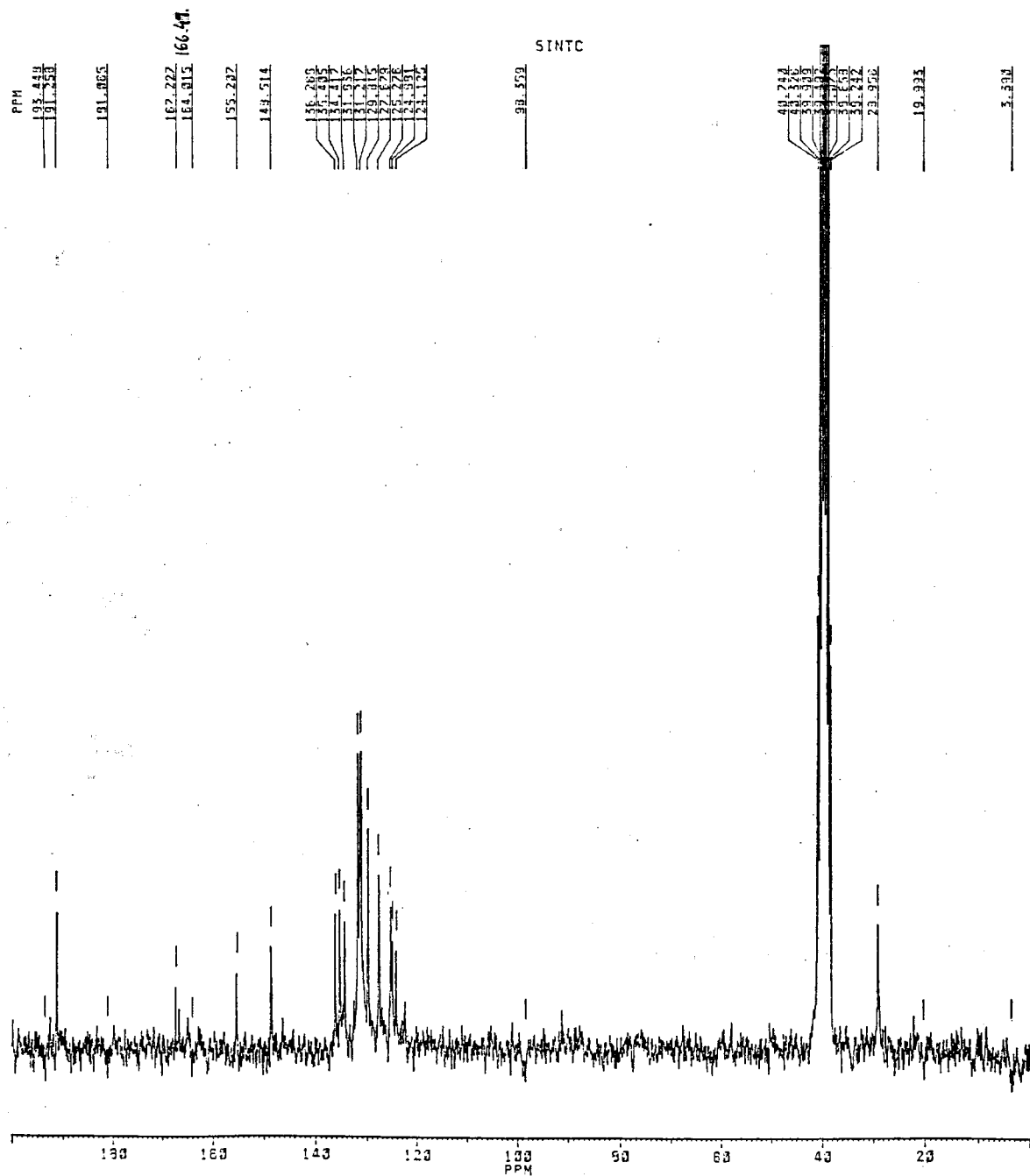


Figura 99 - Espectro de RMN de ^{13}C (50,3 MHz, DMSO) do produto de hidrólise.