MARIA INÊS ROCHA MIRITELLO SANTORO

ESTUDO DE MÉTODOS PARA A DETERMINAÇÃO DA
GLICOSE, BICARBONATO DE SÓDIO, CITRATO DE SÓDIO
E 5-HIDROXIMETILFURFURAL EM REIDRATANTES ORAIS

Tese apresentada para o Concurso de Livre-Docência
em Controle de Qualidade de Medicamentos do
Departamento de Farmácia da Faculdade de Ciências
Farmacêuticas da Universidade de São Paulo

SÃO PAULO
1984

Armando, Carla, Márcio, meus pais e sogros.
Pela compreensão e paciência.

"Aqueles que amamos e que perdemos, já não estão onde estavam, mas estão sempre onde estamos".

Homenagem à memória dos Professores Doutores Quintino Mingoia e Paulo Carvalho Ferreira.

AGRADECIMENTOS

Aos Profs. Drs. *Quintino Mingoia* e *Paulo Carvalho Ferreira*.

Aos Profs. Drs. *José Carlos Barbério* e *João Haikal Helou*, pela força e apoio que me proporcionaram.

Ao Prof. Dr. *João Fernandes Magalhães*, pelas valiosas sugestões, revisão do texto e constante incentivo.

À Dra. *Erika Rosa Maria Hackmann*, pelo inestimável auxílio prestado na parte experimental.

Ao colega *Jorge Luiz Seferin Martins*, pela cooperação nas titulações iodométricas.

Aos Drs. *Wolfgang Seidel* e *Riva Moscovici*, pela revisão do texto.

Ao Dr. *Marcelo Jorge Vernengo*, que me deu oportunidade, através de bolsa da Organização Pan-Americana da Saúde, de estagiar nos Laboratórios da Farmacopéia Americana, em Maryland, Estados Unidos.

À *Márcia Vallim*, pelo auxílio na datilografia e à técnica de laboratório *Shirlei Gonçalves Silva*.

À Sra. *Maria Teresa Rocha Belderrain*, pela revisão da linguagem.

A todas as funcionárias da biblioteca do Conjunto das Químicas, pela constante atenção. Às bibliotecárias *Leda Maria Brunelli*, *Inês Maria M. Imperatriz* e *Maria do Carmo de Carvalho*, pela revisão das referências bibliográficas. À Sra. *Nair de Oliveira*, por todos esses anos de amizade e cooperação.

Ao *Armando, Carla e Márcio*, pela difícil missão de serem marido e filhos de professora universitária. Agradeço a compreensão, interesse e paciência, sem o que, teria sido impossível a realização deste trabalho.

A todos os meus amigos.

São Paulo, Março de 1984

S U M Á R I O

	Página
CAPÍTULO I. INTRODUÇÃO	1
CAPÍTULO II. REVISÃO DA LITERATURA	7
2.1 REIDRATANTES ORAIS EMPREGADOS NA TERAPÊUTICA	7
2.2 PRODUTOS RESULTANTES DA DECOMPOSIÇÃO DA GLI- COSE NAS REAÇÕES DE ESCURECIMENTO	8
2.3 SÍNTESES DO 5-HIDROXIMETILFURFURAL (HMF) ...	17
2.4 ASPECTOS TOXICOLÓGICOS DO HMF	18
2.5 METODOLOGIA ANALÍTICA	25
2.5.1 Metodologia analítica para a determi- nação do HMF	26
2.5.2 Metodologia analítica para a determi- nação da glicose	41
2.5.3 Metodologia analítica para a determi- nação do bicarbonato de sódio	51
2.5.4 Metodologia analítica para a determi- nação do citrato de sódio	51
CAPÍTULO III. PROPOSIÇÃO	54
CAPÍTULO IV. PARTE EXPERIMENTAL	56
4.1 PLANEJAMENTO	56
4.2 MATERIAL	57

	Página
4.2.1 Reagentes, soluções e solventes	57
4.2.2 Amostras	60
4.2.3 Acondicionamento e tratamento das amostras	62
4.2.4 Aparelhos	62
4.3 PROCEDIMENTOS ANALÍTICOS	63
4.3.1 Metodologia para a análise do HMF ...	63
4.3.1.1 Tentativas para a determinação do HMF por espectrofotometria no ultravioleta	63
4.3.1.2 Determinação do HMF pelo método colorimétrico após reação com ácido 2-tiobarbitúrico	66
4.3.2 Metodologia para a análise da glicose	73
4.3.2.1 Método iodométrico	73
4.3.2.2 Método enzimático	73
4.3.3 Metodologia para a análise do bicarbonato de sódio	76
4.3.4 Metodologia para a análise do citrato de sódio	77
4.3.5 Metodologia para a determinação da água	80
4.3.6 Cromatografia em camada delgada para detecção do HMF	81
CAPÍTULO V. RESULTADOS	84
5.1 TENTATIVA PARA A DETERMINAÇÃO DO HMF POR ESPECTROFOTOMETRIA NO ULTRAVIOLETA	84

5.2	DETERMINAÇÃO DO HMF PELO MÉTODO COLORIMÉTRICO APÓS REAÇÃO COM ÁCIDO 2-TIOBARBITÚRICO ..	86
5.3	DETERMINAÇÃO DA GLICOSE PELO MÉTODO IODOMÉTRICO	88
5.4	DETERMINAÇÃO DA GLICOSE PELO MÉTODO ENZIMÁTICO	88
5.5.	DETERMINAÇÃO DO BICARBONATO DE SÓDIO	89
5.6	DETERMINAÇÃO DO CITRATO DE SÓDIO	90
5.7	DETERMINAÇÃO DA UMIDADE PELO MÉTODO KARL-FISCHER	91
5.8	CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA	91
CAPÍTULO VI. DISCUSSÃO		120
CAPÍTULO VII. CONCLUSÕES		136
RESUMO		139
SUMMARY		142
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS		145

Capítulo I

1. INTRODUÇÃO

Está em pleno desenvolvimento o programa da luta contra as enfermidades diarrêicas (ED), iniciado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) em Maio de 1978. O objetivo de tal programa é reduzir a mortalidade provocada por diarréias agudas, a consequente desidratação, assim como os efeitos prejudiciais a elas associados. Atenção especial tem sido dada à nutrição das crianças e, em alguns países em desenvolvimento, procura-se incentivar a responsabilidade na área de saúde e outros serviços sociais.

O programa de Controle de En^ufermidades Diarrêicas (CED) da OMS (149) consta de duas metas principais: a pesquisa e a prestação de serviços de saúde. Na área de saúde é visada a integração das quatro estratégias básicas do programa, isto é, aumento da eficiência no tratamento dos casos de desidratação pela terapia da reidratação oral (TRO) e pela dieta adequada; melhora do relacionamento materno-infantil; abastecimento de água e saneamento básico mais adequados; e maior vigilância epidemiológica.

Os serviços de saúde e de pesquisa estão intimamente ligados a fim de que possam atender às

necessidades dos programas nacionais no menor espaço de tempo possível.

Com respeito aos serviços de saúde, 46 países têm atualmente planos de operações para os programas nacionais da luta contra as ED e, em 33, já se iniciou sua execução. Foi estabelecido recentemente um sistema de informações sobre o tratamento destas enfermidades com a finalidade de que se possam aplicar as estratégias do tratamento de maneira mais eficaz, nos programas nacionais (166).

Com relação às pesquisas, a OMS está dando apoio a cerca de 150 projetos, dos quais 65% estão sendo executados em países em desenvolvimento.

A formulação do sal de reidratação oral (SRO) da OMS foi anunciada como novo e simples tratamento da diarreia com a possibilidade de redução do índice de mortalidade infantil que, em 1980, atingiu níveis alarmantes na América Latina, África e Ásia. É um método simples e barato, podendo ser ministrado a domicílio, assim que a mãe da criança tenha aprendido a maneira correta de preparação. O tratamento deve ser iniciado o mais breve possível após o início da diarreia porque o desenvolvimento de desidratação fatal pode ser muito rápido.

Medidas foram tomadas de maneira a se aumentar

a fabricação dos SRO nos países em desenvolvimento; 24 destes países iniciaram sua produção industrial ou o estão produzindo em pequena escala. A "United Nations Children's Fund" (UNICEF) tem desempenhado uma função muito ativa no fornecimento de equipamentos e matérias-primas e financia, em conjunto com a OMS, um cargo de engenheiro industrial no programa.

Em alguns países, segundo dados da OMS, até 40% da mortalidade de crianças com menos de cinco anos de idade está relacionada com as ED. Sabe-se que, ainda hoje, nos países em desenvolvimento, uma em cada dez crianças morre de diarreia antes de chegar aos cinco anos de idade. No Brasil, apenas para serem lembrados alguns números, foram internadas, em 1980, perto de 6,3 milhões de crianças desnutridas, com diarreia. Essas crianças permaneceram em média seis dias no hospital, e o tratamento custou ao País nada menos que Cr\$ 56.876.000.000,00. Calcula-se que este novo tipo de reidratação oral consiga, em pouco tempo, evitar cerca de 80% dos internamentos hoje necessários.

Devido aos esforços das autoridades médicas no Brasil, a incidência de mortes causadas pelas ED foi bastante reduzida no decorrer dos últimos anos.

A doença ocorre raramente em cidades como São Paulo e Rio de Janeiro, que dispõem de serviços

sanitários iguais aos encontrados em qualquer outra grande metrópole do mundo, excetuando-se suas "favelas". A incidência é alta nas regiões mais pobres do nordeste do País.

Até recentemente, na maioria dos casos, a desidratação era tratada quase sempre com infusões intravenosas. Esta prática, além de exigir internamento, pode provocar, nas crianças debilitadas, morte devido a infecções secundárias.

Embora já existam no comércio formulações sólidas de reidratantes, a lançada pela OMS é muito simples e sua solução pode ser facilmente preparada por enfermeiras ou até mesmo pelos pais das crianças doentes.

A terapia da reidratação oral combinada com orientação sobre prática de alimentação apropriada é a estratégia básica por meio da qual o programa para CED da OMS está tentando alcançar uma redução imediata na mortalidade relacionada com as diarreias e má nutrição infantil.

Foram preparadas pela OMS, normas para auxiliar as autoridades nacionais na produção dos SRO (217). As normas foram estabelecidas e sugeridas adaptações de acordo com as necessidades e condições do país e do local onde será ou está sendo produzido

o medicamento.

O reidratante da OMS é uma mistura constituída por glicose e sais minerais que é dissolvida em água potável e administrada por via oral. Este produto deve ser considerado como "medicamento essencial" para países em desenvolvimento.

Os componentes ativos em um envelope de SRO para preparar 1 litro de solução oral são:

Glicose anidra	20,0 g
Cloreto de sódio	3,5 g
Bicarbonato de sódio	2,5 g
Cloreto de potássio	1,5 g

Esta formulação tem sido usada com sucesso no tratamento de desidratação devido a diarreias agudas, incluindo o cólera, em todos os grupos etários.

Foi sugerida, também pela OMS, uma outra formulação, na qual o bicarbonato de sódio é substituído pelo citrato de sódio:

Glicose anidra	20,0 g
Cloreto de sódio	3,5 g
Citrato trissódico diidratado.	2,9 g
Cloreto de potássio	1,5 g

Sendo a desidratação sério problema em nosso País, onde, devido ao clima tropical, podem aparecer problemas quanto à estabilidade dos medicamentos, fui solicitada pela OMS para coordenar um projeto cuja finalidade seria a de estudar a estabilidade da glicose nestas formulações. O estudo foi efetuado com o objetivo de estabelecerem-se métodos analíticos para determinação dos componentes da formulação e de um dos produtos de decomposição da glicose, o 5-hidroximetilfurfural (HMF). A pesquisa foi realizada trabalhando-se com grande número de amostras por nós preparadas, acondicionadas em ampolas fechadas, mantidas em condições adversas de armazenagem, com a finalidade de avaliar-se a influência da temperatura e da umidade sobre a estabilidade dos SRO.

Segundo a orientação da OMS, todos os métodos analíticos empregados deveriam ser de fácil execução e efetuados em equipamentos não sofisticados, pois se destinariam ao emprego em laboratórios de países em desenvolvimento.

Este trabalho constitui o relato dos resultados obtidos para atendimento dos objetivos visados na solicitação da OMS.

Capítulo II

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 REIDRATANTES ORAIS EMPREGADOS NA TERAPÊUTICA

Foi feita uma pesquisa no Dicionário de Especialidades Farmacêuticas de 1982/83 (47) e no Compêndio Médico de 1982 (148) com a finalidade de verificar quais os medicamentos já empregados como reidratantes orais no Brasil. Observou-se que já estão comercializados cerca de duas dezenas de produtos e basicamente estão sempre presentes nas formulações os seguintes componentes: glicose, cloreto de sódio, cloreto de potássio e também, com certa variação, gluconato de cálcio, lactato de cálcio, fosfato de sódio, citrato de magnésio, citrato de sódio e outros. Em alguns casos, são incluídos antieméticos, vitaminas e antibióticos.

Constam da relação de medicamentos básicos da Central de Medicamentos (CEME) três produtos sob a forma de comprimidos, solução oral e pó. A composição dos dois primeiros produtos é semelhante à da maioria dos medicamentos comercializados enquanto que a formulação do pó é aquela proposta pela OMS.

Alguns produtos para reidratação são oficializados nos códigos farmacêuticos. Entre eles destacam-se

o da Farmacopéia Inglesa, edição 1980 (25), sob a forma de um pó contendo em sua formulação cloreto de sódio, cloreto de potássio, bicarbonato de sódio e glicose, em proporções diferentes daquelas dos SRO da OMS. No compêndio Martindale (120) são indicadas formulações em pó para combater diarreias infantis, uma das quais é a da Farmacopéia Inglesa.

2.2 PRODUTOS RESULTANTES DA DECOMPOSIÇÃO DA GLICOSE NAS REAÇÕES DE ESCURECIMENTO

A formação de pigmentos em produtos contendo açúcares durante a armazenagem é fenômeno muito comum (18). Este escurecimento é considerado como sinal de deterioração. As reações que levam ao escurecimento são extremamente variáveis e complexas. Algumas, principalmente em alimentos, são catalisadas por enzimas e envolvem reações oxidativas nas quais participam compostos fenólicos. Este tipo de reação é conhecido como "escurecimento enzimático". Existe no entanto, outro tipo, o chamado "escurecimento não enzimático", que é no momento o que nos interessa. Exemplos deste tipo são numerosos, tanto em alimentos quanto em medicamentos. Três mecanismos distintos estão envolvidos no escurecimento não enzimático: reação de MAILLARD, reações envolvendo ácido ascórbico e caramelização de

açúcares, sendo que, no momento, nos interessa somente este último tipo de reação.

Os produtos resultantes das primeiras reações que levam ao escurecimento são incolores. Em determinado estágio, formam-se substâncias com espectros de absorção no ultravioleta característicos. De uma maneira geral, o desenvolvimento da reação é caracterizado pelo aumento da quantidade de substâncias redutoras. Formam-se compostos com ligações insaturadas e grupos carbonílicos cujas concentrações vão aumentando. A água é produzida nas sucessivas etapas onde ocorre a desidratação dos carboidratos presentes. Processos de degradação e quebra ocorrem em determinados estágios da decomposição, havendo liberação de dióxido de carbono. Os componentes voláteis formados como resultado destas quebras são os responsáveis pela produção do sabor característico que acompanha as reações de escurecimento. As etapas finais do processo envolvem reações de polimerização e como resultado, são produzidos pigmentos escuros. Como a polimerização prossegue, os pigmentos tornam-se cada vez mais escuros e menos solúveis em água.

Os estágios iniciais dos processos de escurecimento foram melhor estudados. A quantidade de produtos intermediários e o número de possíveis reações são tantos que existe ainda certa confusão no esclarecimento

do mecanismo em todas as fases.

Embora não fosse objetivo deste trabalho estudar todos os tipos de escurecimento, foi feito um levantamento bibliográfico sobre as reações não enzimáticas, com a finalidade apenas de fornecer algumas informações adicionais.

O químico francês Maillard foi o primeiro a estudar a condensação de açúcares com aminoácidos. Ele verificou que aquecendo-se estas misturas havia o aparecimento de substâncias de coloração marrom. A reação de Maillard foi amplamente estudada na revisão apresentada por ADRIAN (1).

O ácido ascórbico é o responsável por parte dos fenômenos de escurecimento observados em sucos de frutas concentrados, podendo sofrer diretamente polimerização ou então copolimerização com aminas produzindo os pigmentos pardos (18).

Os açúcares podem sofrer o processo de escurecimento na ausência de compostos amínicos e, neste caso, são necessárias temperaturas mais elevadas. A pirólise dos açúcares ou caramelização é muito conhecida em culinária para a produção de cor marrom e sabor característico. Os açúcares puros caramelizam-se rapidamente a temperaturas abaixo de 100°C. O mecanismo exato de caramelização não é bem conhecido. Admite-se

que seja similar ao do escurecimento que se verifica por meio da reação açúcar-amino, envolvendo, assim, enolização da hexose, desidratação e quebra.

As reações de escurecimento não enzimático são fortemente influenciadas por vários fatores, tais como, temperatura, pH, conteúdo de umidade, oxigênio e presença de catalisadores ou inibidores.

Foi observado que a proporção do escurecimento cresce com o aumento da temperatura. O efeito do pH nas reações de escurecimento é mais complexo. Dependendo dos constituintes, muitas vezes observa-se escurecimento rápido, tanto em sistemas de pH muito baixo ou muito alto, com velocidade mínima em valor médio de pH. Investigações de seu efeito sobre o escurecimento são dificultadas pelo fato do pH do sistema mudar à medida que as reações vão ocorrendo. O mecanismo que leva à formação dos pigmentos escuros pode ser diferente em sistemas tamponados e não tamponados. A velocidade da reação de escurecimento é muito variável em função do conteúdo de umidade.

No processo de escurecimento que envolve o ácido ascórbico, o oxigênio participa diretamente no andamento da reação. Substâncias como fosfatos, ácidos carboxílicos e seus sais aceleram o escurecimento não enzimático aumentando a intensidade final da cor. O

efeito dos metais não é uniforme. O zinco parece retardar o escurecimento não enzimático e o melhor inibidor destas reações é o dióxido de enxofre.

Existem algumas medidas práticas que podem prevenir o escurecimento, tais como a refrigeração e abaixamento do pH.

Um dos efeitos secundários do escurecimento não enzimático é a formação de substâncias voláteis. Muitos aldeídos são voláteis e possuem odor característico. Entre os responsáveis pelo odor característico de "açúcar queimado" estão o furfural e seus derivados.

Já em 1912, ANGELICO & COPPOLA (8) afirmaram que a ação dos ácidos sobre os hidratos de carbono podia dar origem a vários produtos, dependendo do ácido e das condições empregadas. Assim, por exemplo, verificaram que pela ação do ácido nítrico concentrado podiam ser obtidos derivados polinitrados, juntamente com produtos de oxidação; o ácido sulfúrico concentrado tinha a propriedade de carbonizar os hidratos de carbono e os ácidos diluídos forneciam derivados furânicos juntamente com ácidos, entre os quais, o ácido levulínico. Foi objeto de estudo destes autores, o derivado furânico, 5-hidroximetilfurfural (HMF), um dos produtos de decomposição das hexoses.

TEUNISSEN (194) estudou a hidrólise do HMF efetuando medidas da velocidade da reação. Fez também um estudo empregando como catalisadores vários ácidos, em diferentes concentrações. O mesmo autor (195) efetuou medidas de velocidade da hidrólise do HMF, em misturas de álcoois etílico e metílico com água e algumas medidas da abertura do anel furânico em álcool furfurílico, chegando ao ácido levulínico.

PUMMERER e colaboradores (168) estudaram a formação do HMF a partir de hexoses e o mecanismo de formação do ácido levulínico a partir do HMF.

O efeito do calor sobre soluções aquosas de sacarose e outros carboidratos foi estudado por MONTGOMERY & WIGGINS (133). Os autores observaram que quando a sacarose era aquecida em autoclave e em atmosfera de hidrogênio, verificava-se sua inversão e, em seguida, formação de HMF.

A química das reações de escurecimento foi bastante estudada. HODGE, em 1953, (88) apresentou revisão das teorias sobre essas reações; afirmou que existem muitos tipos diferentes de reações orgânicas que levam à produção dos pigmentos castanhos, em temperaturas moderadas.

Os vários tipos de escurecimento, os diferentes reagentes e reações envolvidos e o grande número de

variáveis que devem ser levadas em conta nestes tipos de reações, fazem da química do escurecimento, assunto bastante complexo. Assim, muitos autores têm estudado e apresentado os mecanismos para estas reações (6, 7, 80, 136, 137, 152, 174, 216).

Em revisão recentemente publicada por FONT (62) são discutidas as várias teorias e apresentadas reações que ocorrem nos escurecimentos enzimático e não enzimático. Neste mesmo trabalho, o autor apresenta um esquema da fase inicial da caramelização:

D-glicose

aldeído

Este mecanismo é favorecido pela presença de ácidos carboxílicos, metais, fosfatos e pode ocorrer tanto em pH alcalino como em pH ácido. O meio alcali no favorece a enolização e a fragmentação dos açúcares, produzindo menos derivados furânicos e portanto menos cor. Ao contrário, o meio ácido dá lugar a mais derivados furânicos e menos fragmentação. Entre pHs 5-6, a velocidade de reação é mínima.

O grupo éter do HMF pode ser rompido em meio ácido dando origem aos ácidos fôrmico e levulínico (136):

Os mecanismos das reações de escurecimento foram muito estudados por diversos autores que apresentaram novas hipóteses, confirmaram teorias anteriormente propostas ou ainda isolaram os compostos de degradação em determinados materiais (17, 45, 48, 69, 77, 85, 114, 122, 135, 153, 154, 169, 178, 184, 191, 192, 193).

A reação da D-frutose em soluções aquosas em pH 4,5 e com aquecimento (163) dá origem ao HMF e a mais treze produtos, enquanto que com a D-glicose obtêm-se os mesmos compostos, com rendimentos menores.

Alguns autores estudaram o mecanismo, os produtos de decomposição das hexoses e sua cinética sob várias condições (95, 102, 105, 106, 143, 175, 214, 215).

Um dos produtos de decomposição que se forma a partir das hexoses é o 2-hidroxiacetilfurano, que pode ser obtido em rendimentos inferiores a 1% a partir da D-frutose e menores ainda a partir da D-glicose (78, 131, 172).

O HMF tem sido empregado recentemente para a preparação de polímeros (34).

2.3 SÍNTESES DO 5-HIDROXIMETILFURFURAL (HMF)

O 5-(hidroximetil)-2-furaldeído; 5-(hidroxime - til)-2-furancarboxaldeído; 5-(hidroximetil)-2-furan - carbonal; 5-(hidroximetil)-2-furfural; 5-hidroximetil -2-formil-furano, apresenta a fórmula bruta $C_6H_6O_3$ e peso molecular 126,11 (C = 57,14%, H = 4,80% e O = 38,06%) (127).

HMF

Quando cristalizado em éter etílico e éter de petróleo, apresenta-se sob a forma de agulhas (PF = 31,5°C). O con_ tato com os olhos deve ser evitado. Produz manchas amarelas na pele, sem gravi- dade. Possui odor de flores de camomila. Muito pouco volátil, quando comparado com o furfural. Suas prin- cipais características são: d_4^{25} 1,2062; $pe_{0,02}$ 110°C.; n_D^{18} 1,5627; UV max. 283 nm; calor de combustão 665 kcal/mol. Muito solúvel em água, metanol, etanol, ace_ tona, acetato de etila e dimetilformamida. Solúvel em éter etílico, benzeno e clorofórmio. Menos solúvel em tetracloreto de carbono. Pouco solúvel em éter de petróleo. Deve ser conservado protegido da luz e do ar. É muito usado na síntese de dialdeídos, glicóis, éteres, aminoalcóois e acetais.

As primeiras preparações do HMF, a partir de

hexoses, empregavam desidratação com catalisador ácido. Muitas modificações foram introduzidas nestes processos e continuam, até hoje, sendo feitas. A maioria das sínteses do HMF é efetuada a partir de carboidratos (39, 51, 52, 65, 79, 81, 82, 83, 99, 103, 107, 129, 134, 144, 175, 182); no entanto, em alguns casos, pode ser obtido de substâncias que não são carboidratos, como por exemplo, do gliceraldeído (136).

Nos últimos anos, vários processos de síntese, sempre a partir de carboidratos, têm sido apresentados por diversos autores (60, 71, 124, 125, 126, 141, 142, 145, 146, 189).

2.4 ASPECTOS TOXICOLÓGICOS DO HMF

Muito pouco se conhece sobre a toxicidade geral do HMF; no entanto, sabe-se que as soluções de glicose e de frutose empregadas em infusões podem apresentar derivados furânicos tóxicos produzidos durante o processo de esterilização.

No organismo humano uma série de reações bioquímicas processa-se com grande exatidão e rapidez. Em estado normal de saúde, a concentração dos diferentes metabólitos é quase sempre constante. JELLUM e colaboradores (96) analisaram, por cromatografia gasosa

-espectrofotometria de massa (CG - MS), fluídos biológicos com a finalidade de detectarem vários metabólitos, tanto em indivíduos sadios como em doentes. Os autores verificaram que, ao analisarem soluções constituídas por misturas de glicose-frutose por CG - MS foi constatada a presença de HMF, 2-(2'-hidroxiacetil)-furano e ácido levulínico. Estes compostos, além de outro contaminante, o 2-ceto-3-deoxiglicose, são todos formados quando a frutose é aquecida em pH ácido, como no caso da esterilização. Outros estudos mostraram que cerca de 50% do HMF injetado é metabolizado e excretado na urina sob formas mais oxidadas, tais como o ácido 5-hidroximetil-2-furóico e ácido furan-2,5-dicarboxílico. Os outros 50% restantes dos derivados furânicos injetados permanecem no organismo, provavelmente ligados a proteínas.

É bom lembrar que os aldeídos em geral, são compostos bastante reativos, capazes de interagir com grupos tiol (-SH) e amino (-NH₂) das proteínas. Devido a essas propriedades, os aldeídos podem bloquear os grupos -SH, essenciais para a divisão celular, agindo assim como agentes citotóxicos. Os cetoaldeídos são inibidores mais ativos ainda, portanto mais reativos e, conseqüentemente, maiores inibidores mitóticos. Desta maneira, atenção especial deve ser dada ao cetoalcól, 2-(2'-hidroxiacetil)-furano que está

presente na mistura glicose-frutose. Este composto se
rã oxidado no organismo ao correspondente cetoaldeído,
que imediatamente reagirá com os grupos -SH das célu-
las e assim, certamente, causará efeitos indesejáveis.

O composto 2-ceto-3-deoxiglicose que também es-
tá presente na mistura da infusão, principalmente na
sua forma 1,5-piranose, não se comporta como cetoal-
deído típico e não interage prontamente com os grupos
amino e tiol das proteínas. Este composto, consequen-
temente, é excretado intacto pela urina, dando reação
redutora positiva. Pelos resultados do trabalho fi-
cou claro que o HMF e o 2-(2'-hidroxiacetil) - furano
são dois compostos potencialmente tóxicos que devem
ser evitados em misturas usadas para nutrição intrave-
nosa. Estes compostos são formados inevitavelmente e
em quantidades consideráveis se uma solução de fruto-
se com pH abaixo de 3,5 for aquecida a 110-130°C por
1 ou 2 horas. Infelizmente, tais condições são as em
pregadas por algumas firmas farmacêuticas para a este
rilização de soluções de açúcares.

Foi estudada a ação de algumas lactonas e com-
postos correlatos sobre os cromossomas humanos (213).
A atividade carcinogênica de 35 compostos deste tipo
foi testada, sendo que a aflatoxina foi a mais ativa.
A terminação furfural desta molécula, por si mesma,
parece ter atividade carcinogênica.

LANG e colaboradores (112) acrescentaram na dieta de ratos, durante 40 dias, quantidades de 0 a 250 mg/kg de HMF. O consumo e a eficiência do alimento administrado não foram influenciados pelo HMF. Os exames histológicos do fígado, rins, coração e baço não mostraram anormalidades. Após a administração de 1 g de HMF em coelhos, 12 mg de HMF foram excretados na urina. Nenhum metabólito foi detectado na urina. O HMF não foi oxidado por homogeneizados do fígado, mitocôndrias, ou sobrenadantes. A oxidação do succinato e glutamato pelas mitocôndrias do fígado não foi influenciada pela adição de HMF.

Alguns efeitos farmacológicos foram estudados com o HMF numa série de experiências com animais(42). Após a administração intravenosa, a DL50 em ratos foi de 0,751 g/kg de peso e após a administração intraperitônea foi de 0,842 g/kg de peso. Não foram observados efeitos letais pela administração oral de até mais de 2 g/kg; no entanto, 50, 100 e 200 mg de HMF/kg de peso administrados oralmente, ocasionam um aumento, dependendo da dosagem, na atividade espontânea e na motilidade intestinal de camundongos, assim como um aumento no fluxo da bile, em ratos. O HMF desaparece muito rapidamente no trato intestinal. Apesar disto, somente traços do composto podem ser detectados no sangue e na urina. Isto parece indicar que o

HMF é convertido em substâncias biologicamente ativas antes da absorção e que essas substâncias são as responsáveis pelos efeitos biológicos.

A citotoxicidade do HMF foi testada *in vitro* empregando-se culturas de fibroblastos de embrião de galinha (111). Os danos celulares foram observados numa concentração de 0,5 mg HMF/ml do meio e parada de crescimento com 1 mg/ml.

TOVERUD & KARLSEN (197) efetuaram um estudo sobre o conteúdo de HMF em duas soluções oficializadas na Farmacopéia Nórdica e dois produtos comerciais empregados para nutrição intravenosa. Os resultados mostraram que a quantidade de HMF formada estava bem abaixo dos níveis tóxicos relatados e que as condições durante o período de esterilização deveriam ser cuidadosamente controladas.

Estudando a degradação térmica da glicose, FUKUCHI e colaboradores (64), relataram que o HMF pode causar destruição da função do fígado.

O efeito do HMF sobre a respiração, circulação, gases sanguíneos e parâmetros clínico-químicos foi estudado em cães por KLIMMEK & WEGER (100). Foram injetadas quantidades que variaram de 5 g a 50 mg/hora. A dose mais alta não afetou a pressão sanguínea mas abaixou a pressão do gás carbônico sanguíneo, pH,

bicarbonato e aumentou o batimento cardíaco, o volume mínimo respiratório e a concentração do lactato sanguíneo. Não houve nenhuma alteração na hemoglobina, hematócrito, atividade de várias enzimas do sangue ou nas concentrações de uréia, nitrogênio urêico, creatinina e bilirrubina total. A dose menor de HMF não provocou mudança em nenhum dos parâmetros acima citados. O HMF pode causar acidose pela sua possível conversão a ácidos. No entanto, não existem indicações de que ele possa causar toxicidade aguda nas possíveis concentrações presentes nas soluções empregadas para infusão.

A presença do HMF foi também identificada em fumaça de cigarro, e vários estudos bioquímicos foram efetuados (61, 155).

A glicosilação não enzimática de proteínas renais e dos eritrócitos, após aquecimento em meio fracamente ácido, foi medida pela formação de HMF (31).

O furfural, maltol e HMF, três dos produtos da reação de escurecimento, inibem a produção de dióxido de carbono pelo Saccharomyces cerevisiae (12).

O teste de Ames para a Salmonella foi usado para verificar o possível efeito mutagênico que poderiam apresentar alimentos aquecidos. Foi verificado que o HMF não é agente mutagênico (2).

RASMUSSEM e colaboradores (170) estudaram a toxicidade geral e as propriedades danificantes nas veias, pelo HMF, em coelhos. Sabe-se que pelo aquecimento de glicose e frutose forma-se além do HMF, ácido levulínico e 2-ceto-3-deoxiglicose. O efeito irritante do HMF sobre as veias não havia sido estudado antes que estes autores verificassem, em coelhos, a toxicidade geral provocada por injeções subcutâneas de HMF e a toxicidade local, por infusões intravenosas de HMF. Foram feitos pelos autores testes de laboratório e exames histológicos dos tecidos do fígado. O exame histológico mostrou apenas mudanças muito pequenas. Nunca foram observados sinais de danos crônicos no fígado.

Para a verificação da toxicidade geral (170), 400 mg de HMF foram administrados a coelhos por via subcutânea, duas vezes por dia, durante uma semana. Não foi possível demonstrar nenhum efeito nocivo das injeções nos seguintes parâmetros: peso, hemoglobina, leucócitos, plaquetas, proteínas séricas, alanina sérica, amino-transferase, fosfatase alcalina, necrose das células do fígado ou esteatose hepática, em comparação com o grupo de controle.

Os efeitos sobre o sistema venoso foram estudados injetando-se em coelhos solução isotônica de cloreto de sódio, na qual foram adicionadas 200 mg de

HMF/1. Esta solução não aumentou o efeito irritante sobre as veias, quando administrada continuamente por via intravenosa durante um período de cinco horas. As quantidades de HMF empregadas neste estudo excederam de muito aquelas que os pacientes recebem com as soluções de glicose.

2.5 METODOLOGIA ANALÍTICA

O estudo da degradação de uma substância exige métodos de análise adequados não só para o produto íntegro como também para os eventuais produtos de degradação. Estes estudos podem ser efetuados em condições normais ou mediante experiências "modelo" para determinar compostos de degradação (62).

A determinação das substâncias formadas pelo escurecimento das formulações contendo glicose são feitas através de várias técnicas analíticas. Com relação às análises físico-químicas convencionais deve-se ter em conta que a aparição do furfural e derivados é observada nas primeiras etapas da reação, podendo ser feitas determinações espectrofotométricas em soluções injetáveis de glicose na região entre 227-285 nm, conforme o pH e o solvente.

O grau de escurecimento propriamente dito pode

ser lido espectrofotometricamente, medindo-se o coeficiente de extinção de soluções aquosas ou hidroalcoólicas a 380-400-420 nm e também a 470-475 nm. As melanoidinas absorvem a 540-560 nm.

Uma maneira para diferenciar pentoses de hexoses é a conversão, respectivamente, a furfural e a HMF. Análises específicas para estes compostos são requeridas quando misturas de açúcares estão sendo analisadas. Devido à importância da determinação de tais compostos em alimentos, medicamentos e em indústrias de açúcar, muito se tem feito para se obter métodos analíticos para a detecção destes compostos, isolados ou em misturas.

2.5.1 Metodologia analítica para a determinação do HMF

Entre as reações coloridas que o HMF apresenta (136), podemos citar aquelas com a -OH fenólica e -NH₂ aromático. Estas reações não apresentam, no entanto, grande sensibilidade.

Tanto na Farmacopéia Britânica como na Farmacopéia Americana, existem testes limites para a determinação de HMF e substâncias correlatas para a infusão intravenosa de cloreto de sódio e glicose e solução injetável de glicose (24, 156). O método, nos dois

compêndios, é praticamente o mesmo e consiste em se diluir um volume equivalente a 1,0 g de glicose monoi dratada em 250 ml de água. A absorbância da solução é determinada numa cela de 1,0 cm a 284 nm, empregando água como branco e não deve ser maior que 0,25.

Métodos para a determinação de HMF nas mais variadas amostras têm sido estudados e propostos. Seleccionamos aqui, apenas para fins ilustrativos, alguns dos materiais de análise em que este composto tem sido determinado. Assim, em muitos casos têm sido estudados métodos de análise para a determinação de HMF em frutas, sucos de frutas e bebidas não alcoólicas (19, 76, 113, 118, 128, 173); em molhos e pastas de tomate (5, 115); em mel, onde muitas vezes é empregado em análises para indicar sua adulteração (11, 46, 63, 72, 73, 179, 200, 207, 208, 209, 210, 212); em leite e derivados (97, 98, 138, 139, 164); em pão(151); em cerveja (43) e bebidas em geral (20, 32, 91); em caramelos (2); em café (186); em vinho (181); em gelatina (109); em carne (180) e em xaropes (13, 169). Foi também detectado e analisado em fumaça de cigarro (121); celulose de algodão (70); plantas (101, 177) e vísceras (14). Existem também métodos para sua determinação no soro humano (123) e no sangue (204).

Para medicamentos, o maior número de referências está relacionado com a determinação do HMF em

injetáveis (87, 89, 95, 130, 140, 147, 150, 188, 192, 202, 203). Encontra-se métodos para sua determinação em pós (92), comprimidos, elixires e xaropes (84). Foi verificada sua presença num antibiótico, a patulina (176).

Pela revisão bibliográfica efetuada, pudemos observar que os principais métodos de doseamento do HMF podem ser classificados em três grupos:

1. Métodos espectrofotométricos no visível
2. Métodos espectrofotométricos no ultravioleta
3. Métodos cromatográficos

Foram descritas também determinações gravimétricas, como a proposta por JAYME & SARTEN (94), determinações titulométricas (9), polarográficas (11) e, mais recentemente, por fluorimetria (204) e ressonância magnética protônica (177).

1. Métodos espectrofotométricos no visível

O método de FIEHE (59) é baseado na coloração vermelha dada pelo HMF com resorcina clorídrica. Esta reação foi empregada por VAN EKENSTEIN & BLANKSMA (200), já em 1910, para distinguir mel natural de mel artificial.

A difenilamina foi empregada por DISCHE (49) há muito tempo, para doseamento da sacarose. Foi demonstr

trado, no entanto, que o HMF interferia na dosagem e que era possível determiná-lo utilizando-se a difenilamina, após extração com éter. O HMF dá com a difenilamina, em meio ácido e a quente, uma coloração a azul cujo ponto máximo de absorção é 650 nm. Esta coloração é instável e o composto deve ser extraído com clorofórmio o mais rapidamente possível. O limite de sensibilidade é 100 µg de produto de degradação dos açúcares expresso em HMF.

FEDER (58), utilizou a reação do furfural e seus derivados, como o HMF, com a anilina em meio ácido, obtendo coloração vermelha, para detectar sua presença em mel.

Também aplicado à análise do mel, WINKLER (212) utilizou a propriedade do HMF de dar coloração vermelho cereja com ácido barbitúrico, após a reação com *p*-toluidina. A coloração é instável, eis porque WINKLER recomenda fazer a leitura 3 minutos exatamente após a adição do ácido barbitúrico.

A reação colorida de DISCHE (49) para caracterização de α -cetoaldeídos, compostos furânicos e glicocorticóides com difenilamina, N-metildifenilamina e bis(2,4-dimetilfenilamina) é até hoje muito discutida (201) e seu emprego para determinação espectrofotométrica do HMF é de grande importância.

LANDUCCI (109, 110) pesquisou os aldeídos existentes nas gelatinas, concluindo que as duas bandas de absorção (445 ± 2 nm e 535 ± 1 nm) observadas quando fazia reagir o ácido 2-tiobarbitúrico com as gelatinas, eram devidas, muito provavelmente, à presença no meio reacional, dos mesmos produtos de degradação de açúcares, quando em meio básico, já que se podia observar o mesmo fenômeno com açúcares puros degradados pelo calor.

Em 1955, WINKLER (212) conseguiu a detecção e determinação do HMF em mel e mel artificial. Para tanto, empregou dois métodos: colorimétrico e no ultravioleta. Na determinação colorimétrica, adicionou à amostra uma solução de *p*-toluidina e ácido acético a dois tubos. Em um deles juntou solução de ácido barbitúrico, agitou e depois de 3-4 minutos fez a leitura em 550 nm. No método ao ultravioleta, adicionou certa quantidade de amostra, água e reagente de Carrez. Foi lida a absorbância da amostra comparada com o branco a 325, 285 e 245 nm.

LOVE (114) efetuou estudos acompanhando espectrofotometricamente no ultravioleta (350 a 200 nm) a conversão de um certo número de açúcares aos correspondentes derivados do furfural em ácido sulfúrico a 60°C. Foram também observadas as mudanças dos espectros no visível (350 a 550 nm), após aquecimento a 100°C.

Um método quantitativo para a determinação de HMF

foi apresentado por KEENEY & BASSETTE (97, 98), baseada na medida espectrofotométrica do produto da reação com ácido 2-tiobarbitúrico. Como a determinação foi feita em leite, uma digestão seletiva do leite com ácido oxálico foi indicada para converter os primeiros intermediários da reação de escurecimento a HMF. O método foi sugerido para detectar de maneira sensível os primeiros indícios da reação de escurecimento. Este método foi empregado para a determinação de HMF em produtos contendo lactose (28).

AESCHLIMANN e colaboradores (3) estudaram as reações de vários aldeídos, entre os quais o HMF com fenóis. As reações foram efetuadas tanto sob o ponto de vista qualitativo, como quantitativo. As colorações obtidas variaram de acordo com os fenóis empregados. Foram efetuadas medidas por espectrofotometria na região do visível.

A determinação do HMF, ainda em mel, foi feita por DHAR & ROY (46) envolvendo o emprego de coluna de adsorção com carvão ativado. O HMF fica adsorvido na coluna e é eluído com acetona; após evaporação do solvente foi efetuada determinação colorimétrica, pela reação colorida com *p*-toluidina -ácido barbitúrico ou medida espectrofotométrica no ultravioleta a 285 nm.

O emprego dos reativos de DISCHE (difenilamina

em ácido acético e ácido sulfúrico) e DISCHE modificado segundo BURTON (difenilamina em ácido acético, ácido sulfúrico e acetaldeído), constituiu outro método de doseamento do HMF com a vantagem de que o furfural não pode ser doseado nas mesmas condições (91). Este método pode ser empregado para doseamento do HMF em bebidas alcoólicas e suco de frutas.

Foi proposto um método colorimétrico para a determinação dos precursores da reação de escurecimento em sucos de laranja, baseado na reação colorida do ácido 2-tiobarbitúrico com HMF (128).

Foram efetuados por WHITE JUNIOR & SICILIANO (210) estudos sobre a determinação do HMF em várias amostras de mel com a finalidade de verificar adulterações do produto. A detecção de xarope de açúcar invertido adicionado ao mel tem sido problema há quase um século. O método empregado para o doseamento do HMF foi o de WINKLER (*p*-toluidina-ácido barbitúrico).

Para estudar a estabilidade de medicamentos reidratantes, IZGÜ & BAYKARA (92) empregaram o método do ácido 2-tiobarbitúrico, sem conseguir bons resultados.

Empregando ainda o mesmo método, isto é, do ácido 2-tiobarbitúrico, MÉNEZ e colaboradores (123) dosearam, com sucesso, o HMF em material biológico.

2. Métodos espectrofotométricos no ultravioleta

Os espectros de absorção do HMF em solução aquosa são geralmente efetuados de 210 a 320 nm e apresentam dois pontos de máximo: um é muito fraco, situado entre 228 - 230 nm, o outro intenso, entre 282-285 nm e um mínimo a 245 nm (32).

SCALLET & GARDNER (178), aquecendo uma solução aquosa de glicose, observaram a formação de pequenas quantidades de HMF que foram determinadas por meio de absorção no ultravioleta.

WOLFROM e colaboradores (216) estudaram a formação do HMF a partir da glicose, na ausência ou presença de ácido clorídrico. Esta formação foi seguida por medidas espectrofotométricas no ultravioleta e com base nos espectros de absorção foram propostas estruturas para alguns intermediários.

SINGH e colaboradores (184) demonstraram que a maior parte do HMF e das substâncias coloridas que aparecem em hidrolisados de amido são provenientes da destruição da molécula da glicose. Entre os produtos de degradação está o HMF que foi identificado pelo espectro de absorção no ultravioleta, onde apresenta dois picos, um maior por volta de 284 nm e um menor, ao redor de 230 nm.

HAAS e colaboradores (76) observaram que grande

variedade de alimentos, como frutas secas tipo abri-cô, apresentavam uma banda característica em 285 nm.

MACKINNEY & TEMMER (118), por meio de evidências espectroscópicas na região do ultravioleta puderam observar a presença dos derivados do furfural em frutas dessecadas.

Ainda empregando a absorção no ultravioleta foi estudada a relação do HMF com a formação de cor, aquecendo-se soluções de sacarose (17).

As mudanças que ocorrem durante a esterilização de soluções aquosas de glicose foram determinadas espectroscopicamente. Sob as condições de esterilização empregadas apareceu um pico em 284 nm que aumentava com o tempo e com a temperatura (87).

A análise de HMF e compostos correlatos foi feita empregando-se a absorção no ultravioleta. TURNER e colaboradores (199) estudaram o comportamento espectrofotométrico do HMF e vários derivados sintéticos.

Para estudar cineticamente a decomposição da glicose foi sempre muito utilizada, em diferentes condições, a espectrofotometria no ultravioleta (41, 48, 68, 85, 169, 179, 190, 192, 205).

Estudos sobre os espectros no ultravioleta do furfural e do HMF em soluções tamponadas aquosas foram

efetuados por PSARRAS e colaboradores (167) que concluíram que, para ambos os compostos, tanto a extinção quanto o comprimento de onda máximo (furfural = 277 nm e HMF = 284 nm) não eram afetados por modificações no pH, numa faixa entre 3-10. A extinção, após certo tempo, diminui um pouco para as duas soluções. Este fato salientou a importância de se efetuar a determinação espectrofotométrica logo após o preparo das soluções.

Muitas vezes, a detecção do HMF, empregando vários métodos, inclusive espectrofotometria no ultravioleta, é feita com soluções puras de frutose (108). MILLAR & MACLEOD (130) efetuaram estudo para verificar os níveis de HMF em soluções injetáveis de sacarose após autoclavagem e armazenagem.

MURTY e colaboradores (140) pesquisaram os níveis do HMF na solução injetável de glicose, inscrita na Farmacopéia Americana, empregando a espectrofotometria no ultravioleta. Uma solução de glicose recentemente preparada (1,0 g/2,0 ml) apresentou um nível de HMF de 0,10 µg/ml. O nível em uma solução injetável de glicose a 50%, após 24 horas de preparação, era 0,72 µg/ml. O nível de HMF numa solução de glicose 50% após armazenagem durante 4 anos a 21°C era 5,80 µg/ml. Também foram fornecidos dados para soluções injetáveis de frutose a 10%. Os autores concluíram

que podia ser estabelecido o limite para os níveis de HMF em preparações comerciais. Foi recomendado um procedimento quantitativo para determinar esta impureza no controle de qualidade de soluções injetáveis de glicose.

STURGEON e colaboradores (188) estudaram experimentalmente a decomposição da glicose após esterilização. Foram considerados os efeitos da temperatura, concentração e tempo de aquecimento sobre a proporção de degradação de soluções aquosas de glicose. A decomposição foi acompanhada espectrofotometricamente, controlando-se a formação do HMF e outros intermediários.

VÖLKSEN (202) estudou as condições ideais para a esterilização de soluções de glicose e, a seguir, efetuou estudo analítico para detectar os produtos de decomposição durante a esterilização empregando a espectrofotometria no ultravioleta e também no visível (203).

Foi descrito por WHITE JUNIOR (208) um método para a determinação de HMF no mel. A exatidão e a precisão deste método foram aumentadas em relação aos métodos óticos e químicos mais empregados. Com solução clarificada de mel contendo 0,1% de bissulfito de sódio, empregada como referência e outra similar, sem

bissulfito, representando a amostra, foi obtido um espectro diferencial que representa somente o HMF contido na amostra, sem a absorção interferente do mel. A média de recuperação foi 97,5% para 24 adições ao mel de 0,8-40,0 mg de HMF/100 g.

A determinação do HMF no mel é de tal importância que têm sido realizados estudos colaborativos nos quais são avaliados vários métodos analíticos (207 , 209).

3. Métodos cromatográficos

Dentre os métodos cromatográficos, alguns indicam colunas para separação de derivados furânicos. DE LA BURDE e colaboradores (44) demonstraram que os produtos de degradação dos carboidratos podem ser facilmente separados por cromatografia em coluna de óxido de alumínio ativado. Os solventes empregados foram acetona, acetato de etila, metanol e água. Para estabelecer a presença dos compostos individualmente, cada eluente foi concentrado a vácuo e cromatografado em papel Whatman nº 1.

CHRISTOFFERSON (33) efetuou a separação de aldeídos por meio de cromatografia de permuta iônica em colunas de bissulfito.

Foi patenteado (185) método automático para a

separação e determinação quantitativa de furfurais e/ou aldeídos alifáticos, em misturas com açúcares. A amostra foi passada através de coluna cromatográfica constituída por substância de permuta iônica forte - mente básica, sob a forma de borato. A eluição foi feita em gradiente com solução tampão de borato sendo a detecção processada por espectrofotometria no ultra violeta.

HUNG & TAYLOR (90) estudaram o mecanismo de retenção de solutos ácidos por meio de octadecil-sílica usando íons de amônio quaternário, como trocadores de íons. O comportamento cromatográfico do HMF foi examinado.

Vários métodos utilizando a cromatografia em papel também são citados na literatura. Entre eles, o de LUKESCH (116) que empregou cromatografia descendente em papel, detectando o HMF e outros produtos de decomposição da sacarose.

POTTER & PATTON (164) detectaram a presença de HMF, por cromatografia em papel, em leite evaporado, empregando papel de filtro Whatman nº 1 e fluxo descendente. Como solventes, foram empregados álcool isoamílico e ácido fórmico 5 N (1:1); álcool isoamílico, amônia concentrada e água (30:15:5) e acetato de etila, piridina e água (5:2:7) e como reveladores 2,4

-dinitrofenilidrazina em ácido clorídrico; benzidina em ácido acético e álcool etílico; mistura de quantidades iguais de floroglucinol alcoólico e ácido tricloroacético aquoso a 20% e orcinol e ácido tricloroacético em butanol saturado com água.

MCKIBBINS e colaboradores (117) propuseram e desenvolveram um aplicador simples para cromatografia em papel e seu uso para análise de HMF e ácido levulínico.

GAUTIER e colaboradores (72) efetuaram um estudo crítico da cromatografia em papel para pesquisa de açúcar invertido no mel. A mistura de solventes empregada foi butanol-etanol-água (40:11:19) e o revelador, naftoresorcinol em ácido clorídrico.

A cromatografia em camada delgada é também muito empregada para a análise do HMF. Vários autores a indicam como técnica para sua detecção ou determinação quantitativa em vários tipos de amostras(35, 172, 211).

Os efeitos da armazenagem sobre sucos de laranja em pó foram estudados aplicando-se a cromatografia em camada delgada. Depois da eluição das manchas correspondentes ao HMF, foram feitas análises por espectrofotometria no ultravioleta, infravermelho e espectrofotometria de massa (19).

Empregando sílica gel GF-254 e três sistemas de solventes (clorofórmio-etanol (80:15); benzeno-metanol (5:2) e benzeno-metanol (9:1)), o HMF foi detectado empregando-se como revelador a 2,4-dinitrofenilidrazina (68).

JACIN e colaboradores (93), empregando cromatografia gasosa, desenvolveram um método para a determinação quantitativa do HMF. É rápido, quantitativo, reprodutível e livre da interferência de furfural ou carboidratos. A análise foi feita empregando-se detector de ionização de chama.

Um sistema, empregando cromatografia gasosa-espectrofotometria de massa, tem sido aplicado para a análise de HMF em fluídos biológicos (96).

Ainda empregando a mesma técnica, isto é, cromatografia gasosa-espectrofotometria de massa, JELLUM e colaboradores (95) detectaram a presença de derivados furânicos em pacientes que estavam recebendo soluções intravenosas contendo frutose.

O HMF e o ácido levulínico, provenientes da decomposição da D-frutose, foram determinados por cromatografia gasosa através de derivados O-trimetilsilil (104). Empregando também cromatografia gasosa-espectrofotometria de massa, o HMF foi identificado por OGATA e colaboradores (147), em soluções parenterais

de glicose.

Outros métodos são descritos utilizando-se a cromatografia gasosa para análise de HMF, em vários tipos de amostras e em presença de outras substâncias (180, 181).

Mais recentemente, com o advento da cromatografia líquida de alto desempenho na análise de vários tipos de amostras, inúmeros métodos baseados nesta técnica têm sido citados para a determinação do HMF, nos mais diferentes tipos de amostras (4, 5, 20, 43, 84, 89, 101, 176, 186, 193).

2.5.2 Metodologia analítica para a determinação da glicose

Para fins farmacêuticos, a glicose pode ser empregada tanto na forma anidra como na forma monoidratada. Quimicamente, a glicose anidra é a α -D-glicopiranosose ($C_6H_{12}O_6$). A glicose, também conhecida como dextrose, quando empregada para fins farmacêuticos, deve satisfazer algumas exigências. Suas qualidades são descritas nos compêndios oficiais, como por exemplo, na Farmacopéia Internacional (161).

O método de análise oficializado na Farmacopéia Internacional 3 ed. (162) e na Farmacopéia Brasileira

3 ed. (55) é o clássico método iodométrico, que consiste em dissolver em água uma quantidade exatamente pesada da amostra, adicionar soluções de iodo 0,1 N e de carbonato de sódio (SR) e deixar em repouso no escuro durante 20 minutos; em seguida, juntar solução de ácido sulfúrico ou ácido clorídrico diluídos e titular o excesso de iodo com solução de tiossulfato de sódio 0,1 N, empregando amido como indicador. Deve-se fazer paralelamente um ensaio em branco e efetuar a correção necessária. Cada ml da solução de iodo 0,1 N corresponde a 9,008 mg de $C_6H_{12}O_6$ e a 9,908 mg de $C_6H_{12}O_6 \cdot H_2O$.

Na Farmacopéia Americana ed.20 (156, 159) e na Farmacopéia Britânica (21, 24, 26) é oficializado o método polarimétrico para a determinação da glicose. O poder rotatório da glicose pura, calculado para a base anidra, deve estar entre +52,5° e +53,0°. Basicamente, o método consiste em se medir uma quantidade do injetável que contenha de 2,0 a 5,0 g de glicose, juntar 0,2 ml de solução de hidróxido de amônio 6 N (156) ou 5 M (24) e água suficiente para completar o volume para 100 ml. Na solução, depois de agitada e deixada em repouso por 30 minutos, é feita a medida da rotação angular em aparelho conveniente.

Existem nos compêndios especializados várias técnicas pelas quais se pode determinar carboidratos

(86). O método mais empregado para a análise de monossacarídeos é o polarimétrico; no entanto, a oxidação seletiva provou ser de muito valor na análise de açúcares. A oxidação dos grupos hidroxilas vicinais com reagentes, como o ácido periódico, produz dois fragmentos aldeídicos, de acordo com a seguinte equação:

Faz-se depois a análise do ácido periódico restante, com iodeto, seguida da determinação do iodo libertado, ou então, determina-se a quantidade do aldeído produzido. Se um grupo carbonílico e hidroxila estão vizinhos, a oxidação periódica é eficiente, dando origem às funções carboxila e carbonila, respectivamente. Esta oxidação é conhecida como reação de Malaprade.

Várias reações de açúcares mostraram ser eficientes, quando adaptadas para análises quantitativas. Um exemplo disto é o método de oxidação, anteriormente citado. A natureza do grupo carbonílico é a base de métodos de análise, tanto colorimétricos como titulo-

métricos. Outra propriedade que foi adaptada para análises colorimétricas de carboidratos é a formação de furfural ou do derivado de substituição do furfural, obtida por aquecimento de pentose ou hexose, na presença de ácido. O furfural resultante é depois condensado, com compostos fenólicos ou amínicos, para dar origem a produtos de condensação coloridos.

Vários métodos colorimétricos têm sido usados para a análise de carboidratos. As reações coloridas mais comuns dos carboidratos que podem ser usadas para a análise podem ser vistas no quadro seguinte(86):

QUADRO 1. Reações Coloridas Comuns dos Carboidratos

REAGENTES	NOME DA TÉCNICA	APLICAÇÃO
Antrona e ácido sulfúrico	-	Carboidratos em geral
α -naftol e ácido sulfúrico	MOLISCH	Carboidratos em geral
Timol e ácido sulfúrico	-	Carboidratos em geral
Resorcinol e ácido clorídrico	SELIVANOFF	Cetoses
Floroglucinol e ácido clorídrico	TOLLENS	Pentoses, galactose e ácido glicurônico
Orcinol e ácido clorídrico	BIAL	Pentoses, galactose e ácido glicurônico
Benzidina em ácido acético glacial	TAUBER	Aldopentoses

Outros procedimentos colorimétricos empregam o ácido 3,4-dinitrobenzôico, ácido pícrico em meio alcalino, formação de osazona com fenilidrazina e acetato de anilina seguida de tratamento ácido. Este último método é muito eficiente para determinação de pentoses, como por exemplo, xilose.

Além dos procedimentos colorimétricos, baseados na condensação de compostos fenólicos com o furfural, formado pela hidrólise de carboidratos, têm sido usadas, também, as reações de redução. Determinação colorimétrica muito sensível para a glicose é a baseada na redução de íons ferricianetos; o intervalo da aplicação prática é de 1,0 a 9,0 μ g de glicose em 1,0 a 3,0 ml de amostra. A redução de íons cúpricos por carboidratos, seguida da reação dos íons cúpricos residuais com arsenomolibdato, dá origem a uma cor cuja intensidade pode ser medida a 500 nm.

O complexo azul característico amido-iodo pode ser medido espectrofotometricamente, sob certas condições, e os valores das absorbâncias usados para avaliar quantitativamente as concentrações de amido.

Algumas das reações de redução dos carboidratos são apresentadas no quadro seguinte (86):

QUADRO 2. Reações de Redução dos Carboidratos

REAGENTES	NOME DA TÉCNICA
Sulfato de cobre, hidróxido de sódio, tartarato duplo de sódio e potássio	FEHLING
Sulfato de cobre, carbonato de sódio, citrato de sódio	BENEDICT
Acetato de cobre, ácido acético ou ácido lático	BARFOED
Ferricianeto de potássio, carbonato de sódio	HAGEDORN-JENSEN

A aplicação quantitativa da reação da cianidrina tem sido usada para determinação de aldoses; a amônia, proveniente da hidrólise, é recebida em ácido padrão e determinada por titulação (86).

A gasometria é ainda outra variação aplicável à análise de carboidratos. É empregada a reação de açúcares com ferricianeto (reação de HAGEDORN-JENSEN), seguida da reação com hidrazina, medindo-se o volume de nitrogênio gasoso produzido. Outra reação empregada é a redução do grupo carbonílico com excesso conhecido de boroidreto de sódio que, por sua vez, é titulado com ácido para produzir hidrogênio gasoso, cujo volume é medido (86).

Um procedimento bioquímico que mostrou ser útil

na identificação e diferenciação de carboidratos é o comportamento na fermentação. O Saccharomyces cerevisiae fermenta a glicose, frutose, manose, maltose e sacarose, com facilidade. A galactose, lactose e pentoses não apresentam esta propriedade (86).

Empregando-se técnicas cromatográficas como cromatografia em coluna, cromatografia por permuta iônica, cromatografia em papel, cromatografia em camada delgada, cromatografia gasosa e cromatografia líquida de alto desempenho, foram desenvolvidos vários métodos de análise para açúcares (86).

A análise quantitativa de açúcares é uma importante aplicação da polarimetria (36). Os açúcares têm mais de um átomo de carbono assimétrico; assim, cada estrutura pode existir em algumas formas estereoisoméricas.

Existem métodos enzimáticos para a determinação da glicose. Um dos exemplos é a análise enzimática da glicose-1-fosfato (37).

Nas preparações farmacêuticas, normalmente, são requeridas análises das misturas mais simples de açúcares (67). Assim, é importante e suficiente que se discutam os métodos mais empregados para açúcares simples ou misturas de sacarose, glicose e lactose.

Vários métodos de análise, aplicáveis à determinação da glicose, são citados nos compêndios da AOAC (Association of Official Analytical Chemists), de acordo com o tipo de amostra (10).

GRAUER (74) verificou que as aldo- e ceto-hexoses produzem com β -metilindol um pigmento que é solúvel em clorofórmio, dando coloração azul. A mesma reação se aplica ao HMF. As pentoses e os ácidos urônicos, assim como o furfural, produzem coloração verde oliva. As metilpentoses e o metilfurfural produzem um pigmento vermelho, sendo que o extrato clorofórmio apresenta coloração avermelhada. O comportamento das heptoses não é característico.

STAHL & KALTENBACH (187), por meio da cromatografia em camada delgada com sílica gel G, tornaram possível a separação de vários açúcares em 25-30 minutos, empregando como fase móvel, acetato de etila-isopropanol (65:35 v/v) e *p*-anisaldeído-ácido sulfúrico, como revelador.

Para determinação da sacarose em mel emprega-se um método por cromatografia líquida de alto desempenho, utilizando coluna de fase normal (196). O método também pode ser aplicado, com sucesso, em análises de várias amostras que contenham frutose. O mel diluído é filtrado através de membrana filtrante (0,45 μ m) e

injetado diretamente no cromatógrafo. A média da recuperação da sacarose foi de 97%. Neste método foi empregado um sistema cromatográfico em fase normal para separar e quantificar simultaneamente os monossacarídeos (frutose e glicose) e dissacarídeos (sacarose e maltose) que são encontrados em muitas amostras de mel.

Um método para detecção dos produtos de decomposição da sacarose, após fusão, foi estudado por LUKESCH (116), empregando a cromatografia descendente em papel. A fase móvel empregada foi uma mistura de butanol-ácido acético-água (50:10:40), à temperatura de 20°C. Dois reveladores foram usados. Um deles, solução de nitrato de prata a 5% em acetona, seguida de solução alcoólica de hidróxido de potássio 0,5 N e lavagem com amoníaco e água; após secagem, obtêm-se manchas de coloração parda. Com o outro revelador, solução de resorcinol em ácido clorídrico alcoólico a 1%, as manchas coram-se de rosa. Assim, foram detectadas as seguintes substâncias: glicose, frutose, gliceraldeído, dioxiacetona, metilglioxal, HMF e ácido pirúvico.

Métodos de análise por cromatografia líquida de alto desempenho foram estudados colaborativamente para a glicose, frutose e sacarose no mel (207). Os resultados obtidos apresentaram melhor precisão do que

a dos métodos oficiais modificados.

DOYLE & BURGAN (50) empregaram um método espectrofotométrico no ultravioleta para determinar grande número de monossacarídeos. Vários estudos foram efetuados com o objetivo de determinar-se a aplicabilidade do método no ultravioleta para quantificar diferentes açúcares.

GARRETT & YOUNG (69) desenvolveram procedimento simples para a análise simultânea de misturas de glicose, frutose e sacarose. O método é baseado na determinação do teor de HMF formado pela acidificação da amostra.

A dosagem colorimétrica de glicídeos (frutose, sacarose e lactose) foi proposta por BATISTA & BAETA (16). A técnica consiste na determinação espectrofotométrica do composto amarelo-alaranjado, resultante da reação com solução fenólica e ácido sulfúrico concentrado. A coloração aparece por aquecimento e alguns segundos após a adição dos reagentes. A intensidade da cor é determinada a 490 nm (frutose e lactose) ou a 480 nm (sacarose).

TRINDER (198) efetuou a determinação da glicose em sangue, empregando glicose-oxidase como aceptor de oxigênio alternativo. Este método enzimático é baseado na liberação seletiva de peróxido de hidrogênio

da glicose existente na amostra, pela glicose-oxidase (GOD). O peróxido formado em presença de peroxidase (POD) é o agente oxidante da reação entre 4-aminofenol e fenol, dando origem a um composto colorido que é determinado espectrofotometricamente em 510 nm.

Para detecção de adulteração em mel, vem sendo empregado o método enzimático com glicose-oxidase para a análise de carboidratos (206). Outro método enzimático para determinação de glicose em polissacarídeos hidrolisados foi descrito por CREMONESI e colaboradores (40).

2.5.3 Metodologia analítica para a determinação do bicarbonato de sódio

O método clássico para a determinação do bicarbonato de sódio é aquele no qual, após a dissolução da amostra dessecada, em água, processa-se titulação com solução de ácido sulfúrico N (53, 157) ou com solução de ácido clorídrico M (22), empregando-se como indicador, em ambos os casos, solução de alaranjado de metila.

2.5.4 Metodologia analítica para a determinação do citrato de sódio

O método de análise indicado na monografia do

citrato de sódio, na Farmacopéia Brasileira II (56), é o método geral para doseamento de sais alcalinos de ácidos orgânicos.

De uma maneira geral, os citratos de metais alcalinos podem ser determinados por titulação em meio não aquoso, com solução padrão de ácido perclórico em ácido acético, empregando cristal violeta ou α -naftolbenzeína como indicador (66).

A Farmacopéia Brasileira III (54), indica o doseamento em meio não aquoso, com determinação potenciométrica da viragem. A amostra, depois de dessecada, é dissolvida em ácido acético glacial e titulada com ácido perclórico 0,1 N (SV). Cada ml de ácido perclórico 0,1 N equivale a 8,602 mg de $C_6H_5Na_3O_7$.

A técnica indicada pela Farmacopéia Internacional (160) é também por meio não aquoso. A amostra é dissolvida em quantidade conveniente de ácido acético glacial, previamente neutralizado, aquecendo-se e resfriando-se, se necessário. Quando o ponto final é determinado visualmente pela mudança de coloração, são adicionadas 2-3 gotas de solução de cristal violeta. A titulação é feita com solução de ácido perclórico em ácido acético. Quando o ponto de equivalência não pode ser verificado visualmente, a neutralização e a padronização da solução titulante são feitas potencio

metricamente.

O método oficializado na Farmacopéia Americana (158) é também o doseamento por meio não aquoso, de terminando-se o ponto final potenciométricamente.

Na Farmacopéia Britânica são indicados dois métodos. Para a determinação do citrato de sódio em comprimidos (27), o método consiste em se pesar e pulverizar 20 comprimidos. Em seguida, uma quantidade de pó equivalente a 2,0 g de citrato de sódio é aquecida até carbonização, resfriada e o resíduo fervido com 50,0 ml de água e 50,0 ml de solução de ácido clorídrico 0,5 M. A mistura é filtrada, o filtro lavado com água e o excesso de ácido é titulado no filtrado e águas de lavagem, com solução de hidróxido de sódio 0,5 M, empregando alaranjado de metila como indicador. O outro método é a titulação em meio não aquoso, empregando-se solução de α -naftolbenzeína como indicador (23).

Capítulo III

3. PROPOSIÇÃO

Como foi observado na revisão bibliográfica efetuada, o problema da decomposição da glicose sempre foi muito estudado e discutido e, para tanto, foram apresentadas várias teorias, restando ainda muitas dúvidas.

Esta pesquisa foi planejada visando os seguintes objetivos:

1. Preparar dois tipos de formulações dos SRO, um contendo bicarbonato de sódio, cloreto de sódio, cloreto de potássio e glicose anidra; outro, com a mesma composição, substituindo-se o bicarbonato de sódio por citrato de sódio. Preparar outras duas formulações, iguais às anteriores, mas contendo aproximadamente 10% de água.

2. Estudar e padronizar métodos analíticos para a determinação dos componentes das formulações dos SRO e para o HMF, um dos principais produtos de decomposição da glicose. Detectar outros produtos de degradação da glicose.

3. Submeter as amostras a condições adversas de armazenagem e, de tempos em tempos, analisar os com

ponentes da formulação e o HMF por métodos analíticos selecionados e padronizados.

4. Avaliar a estabilidade das preparações em função dos resultados analíticos obtidos e sugerir condições de preparação, limites de decomposição dos componentes, acondicionamento, transporte e armazenagem dos medicamentos.

Capítulo IV

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1 PLANEJAMENTO

Em função dos objetivos visados na pesquisa, o trabalho foi planejado para ser executado em diversas fases:

- a. *Preparação e tratamento das amostras.* Estudo das condições mais adequadas para a mistura dos componentes das amostras, a fim de se obter um produto uniforme; seleção do material de acondicionamento para submeter-se as amostras às condições de armazenagem; escolha do teor de água nas amostras e temperatura a ser empregada durante o estudo.
- b. *Seleção e emprego dos métodos de análise.* Estudo dos métodos indicados na literatura especializada, considerados os mais adequados para os tipos de amostras empregadas na pesquisa; seleção do método mais conveniente para cada componente da formulação.
- c. *Análise das amostras.* Análise durante 360 dias, a intervalos pré-estabelecidos, das amostras armazenadas em condições drásticas.
- d. *Deteção por cromatografia em camada delgada dos*

produtos de decomposição da glicose. Estudo de diferentes sistemas cromatográficos para identificar a presença de produtos de decomposição.

4.2 MATERIAL

4.2.1 Reagentes, Soluções e Solventes

Acetato de etila Merck p.a.

Acetato de zinco diidratado Merck p.a.

Acetona Merck p.a.

Ácido acético glacial Merck p.a.

Ácido clorídrico (37%) Merck p.a.

Ácido fórmico Merck p.a.

Ácido levulínico Merck p.a.

Ácido oxálico Merck p.a.

Ácido perclórico Baker p.a.

Ácido sulfúrico (95-97%) Merck p.a.

Ácido 2-tiobarbitúrico Merck p.a.

Ácido tricloroacético Fluka p.a.

Alaranjado de metila Harleco p.a.

Amido solúvel Merck p.a.

p-Anisaldeído Merck

Benzeno Merck p.a.

Bicarbonato de sódio Carlo Erba p.a.

Bissulfito de sódio Mallinckrodt p.a.

Carvão ativado Merck p.a.
Cicloexano Merck p.a.
Citrato trissódico diidratado Carlo Erba p.a.
Cloreto de sódio Merck p.a.
Cloreto de potássio Merck p.a.
Clorofórmio Merck p.a.
Cristal violeta Merck p.a.
2,4-dinitrofenilidrazina Merck p.a.
Etanol absoluto Merck p.a.
Etanol 95% Carlo Erba p.a.
Ferrocianeto de potássio triidratado Merck p.a.
Frutose Merck p.a.
Glicose anidra Merck p.a.
Glicose monidratada Merck p.a.
Hidróxido de amônio (amônia líquido 25%) Merck p.a.
5-hidroximetilfurfural Aldrich p.a. e Fluka p.a.
Iodo ressublimado Merck p.a.
Isopropanol Carlo Erba p.a.
Manose Carlo Erba p.a.
Metanol Carlo Erba p.a.
 α -naftolbenzeína Merck p.a.
Nitrato de prata Baker
Reagente Carrez I: Solução de ferrocianeto de potássio 15% (208).
Reagente Carrez II: Solução de acetato de zinco 30% (208).
Reagente GOD-PAP para determinação enzimática

da glicose (Boehringer Mannheim Bioquímica S/A), contendo: glicose-oxidase, 4-aminofenazona, fenol e peroxidase.

Reagente de Karl-Fischer integral Queel.

Sílica gel Merck GF-254 (tipo 60) para cromatografia em camada delgada.

Solução de ácido sulfúrico 10%, m/v.

Solução de *p*-anisaldeído 5% (187): Adicionar a 9,0 ml de álcool etílico, 0,5 ml de ácido sulfúrico concentrado e 0,5 ml de *p*-anisaldeído.

Solução amoniaca de nitrato de prata 2,5% (15, 57, 165): Dissolver 2,5 g de nitrato de prata em 80 ml de água; adicionar gota a gota, sob agitação, amônia SR até redissolução quase completa do precipitado formado. Após repouso e decantação, completar o volume para 100 ml e filtrar.

Conservar em frascos escuros.

Solução de ácido oxálico 0,3 N.

Solução de ácido 2-tiobarbitúrico 0,05 M.

Solução de ácido tricloroacético 40%.

Solução de carbonato de sódio 5%.

Solução de 2,4-dinitrofenilidrazina 0,1% (68, 171): Pesar 0,1 g de 2,4-dinitrofenilidrazina, previamente seca em estufa a 105°C; adicionar 1,0 ml de ácido clorídrico concentrado e completar o volume para 100 ml com etanol.

Solução indicadora de alaranjado de metila 0,1%.

Solução indicadora de amido solúvel 0,5%.

Solução indicadora de cristal violeta 0,5% em

ácido acético (66).

Solução de indicador misto (119): Vermelho de metila 0,1% em etanol - verde de bromocresol 0,1% em etanol (10:50).

Solução indicadora de α -naftolbenzeína 0,2% em ácido acético (66).

Solução de vanilina 1% (75): Pesar 0,5 g de vanilina; adicionar 1,1 ml de ácido sulfúrico concentrado e completar o volume para 50 ml com etanol.

Solução volumétrica de ácido perclórico em ácido acético 0,1 N.

Solução volumétrica de ácido sulfúrico 0,1 N.

Solução volumétrica de iodo 0,1 M.

Solução volumétrica de tiosulfato de sódio 0,1M.

Soluções de bissulfito de sódio 0,2% e 10% (preparação extemporânea).

Tiosulfato de sódio pentaidratado Merck p.a.

Vanilina Baker p.a.

Verde de bromocresol p.a.

4.2.2. Amostras

Para facilitar o trabalho, as amostras foram sempre preparadas em pequena escala, cerca de 30 g de cada vez. Os componentes foram pesados e misturados num gral e depois transferidos para frascos de 250 ml. Estes foram submetidos a movimentos rotatórios regula-

res por cerca de 10-15 minutos.

Considerando a possibilidade de se empregar a glicose monoidratada para a preparação dos pós e que as amostras mantidas num ambiente de clima tropical pudessem absorver altos teores de umidade, foram efetuados alguns testes que melhor se ajustassem ao estudo proposto. Após algumas experiências, constatamos que 10% de água seria o teor mais apropriado.

As amostras foram preparadas com a seguinte composição:

AMOSTRA A: Cloreto de potássio, KCl 1,5 g
 Cloreto de sódio, NaCl 3,5 g
 Bicarbonato de sódio, NaHCO_3 2,5 g
 Glicose anidra, $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ 20,0 g

AMOSTRA B: A mesma amostra A, na qual foram adicionados 10% de água.

AMOSTRA C: Cloreto de potássio, KCl 1,5 g
 Cloreto de sódio, NaCl 3,5 g
 Citrato de sódio diidratado
 $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2,9 g
 Glicose anidra, $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ 20,0 g

AMOSTRA D: A mesma amostra C, na qual foram adicionados 10% de água.

4.2.3 Acondicionamento e tratamento das amostras

Para manter constante a composição das amostras, desde a preparação até o momento da análise, principalmente as com alto teor de umidade (amostras B e D) e, após alguns ensaios prévios, foi verificado que a melhor maneira de acondicioná-las seria em ampolas fechadas. Assim, após a mistura dos pós, cerca de 1,0 a 2,0 g foram distribuídos em ampolas para injetáveis de 10 ml, que imediatamente foram fechadas a fogo direto. Algumas experiências iniciais foram realizadas logo após o fechamento das ampolas para a escolha da temperatura de armazenagem. Algumas ampolas foram mantidas à temperatura ambiente, a 37°C, a 50°C e a 80°C, por 90 dias. Com base nos resultados das análises da glicose ficou evidenciado que, para as amostras que seriam analisadas durante 360 dias, a temperatura mais adequada seria a de 50°C.

4.2.4 Aparelhos

Espectrofotômetro VARIAN modelo 634, com cubetas de 1 cm.

Registrador gráfico potenciométrico ECB (Equipamentos Científicos do Brasil) RB - 101.

Titulador automático Karl-Fischer METROHM modelo 633.

4.3 PROCEDIMENTOS ANALÍTICOS

4.3.1 Metodologia para análise do HMF

4.3.1.1 Tentativas para a determinação do HMF por espectrofotometria no ultravioleta

Como o HMF apresenta espectro de absorção característico na região do ultravioleta, com picos de máxima absorção em 284 e 228 nm, pensamos em analisá-lo nas amostras, empregando este método. Para tanto, foi feita a padronização das condições experimentais: de uma solução padrão de HMF em água contendo 27,15 µg/ml, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0 e 6,5 ml foram transferidos, sucessivamente, para balões volumétricos de 25 ml e os volumes completados com água. Determinaram-se os espectros de absorção entre 320 e 200 nm empregando-se água como branco. Com os valores das absorbâncias em 284 nm foi calculada a reta de calibração, pelo método dos quadrados mínimos.

Soluções das amostras A e B mantidas à temperatura ambiente, a 37°C e 50°C por 90 dias, foram preparadas contendo 6,5 mg do pó/ml. Os espectros de absorção foram determinados como descrito anteriormente para o HMF.

Foi efetuado um teste de recuperação do HMF, da seguinte maneira: de uma ampola do SRO, amostra B, mantida em estufa a 50°C por 24 dias, foi preparada uma solução contendo 4,1 mg do pó/ml. Outra solução desta mesma amostra foi preparada na mesma concentração, mas contendo também 8,0 µg de HMF/ml. Os espectros de absorção foram determinados como descrito anteriormente.

Como poderia haver influência do pH nos espectros de absorção e tendo sido verificado que o pH das soluções das amostras era muito diferente daquele da solução de HMF padrão, realizamos a seguinte experiência: foram preparadas soluções da amostra mantida a 50°C, durante 24 dias, contendo 3,6 mg do pó/ml (pH = 8,0); da amostra recém-preparada, contendo 18,1 mg de pó/ml (pH = 8,2); do padrão de HMF com 4,0 µg/ml (pH = 4,5) e do padrão de HMF com 4,0 µg/ml, cujo pH foi ajustado para 8,0 com solução de hidróxido de sódio 0,01 N. Os espectros foram determinados empregando-se água como branco.

O método descrito por WHITE JUNIOR(208), empregado originalmente para analisar HMF em mel e que se fundamenta na espectrofotometria diferencial no ultravioleta, foi testado da seguinte maneira: 500,0mg do pó da amostra A, mantida a 80°C durante 30 dias, foram dissolvidos em água suficiente para perfazer o

volume de 50 ml. Desta solução, 5,0 ml foram transferidos para um balão de 50 ml, aos quais foram adicionados 1,0 ml do reagente Carrez I e mais 1,0 ml do reagente Carrez II. O volume foi completado para 50 ml, com água. Desta solução, duas alíquotas de 5,0 ml foram transferidas para tubos de ensaio. Em um foram adicionados 5,0 ml de água e no outro 5,0 ml de solução de bissulfito de sódio 0,2%. Foi determinado o espectro de absorção da solução do primeiro tubo, empregando-se a solução do segundo como branco. Os espectros de absorção de ambas as soluções foram também determinados, empregando-se água como branco.

O método indicado por DHAR & ROY (46), inicialmente empregado para a análise de HMF em mel, foi experimentado para analisar o HMF nas amostras em estudo. A coluna necessária para a passagem da amostra, com a finalidade de reter o HMF nela contido, foi preparada com 1,0 g de carvão ativado que foi umedecido com água e deixado em repouso durante uma noite. Cerca de 500,0 mg da amostra A, mantida a 50°C durante 30 dias, foram dissolvidos em água suficiente para perfazer o volume de 50 ml. Uma alíquota de 20,0 ml desta solução foi passada pela coluna e recebida num balão volumétrico de 50 ml. Com esta solução foi determinado o espectro de absorção no intervalo de 320 a 200 nm. O material da coluna foi eluído com 150 ml

de acetona, evaporado à secura e o resíduo dissolvido em 10 ml de água. Desta solução, foi retirada uma a líquota de 2,0 ml para balão volumétrico de 25 ml; de pois de completado o volume, foi determinado o espectro de absorção no ultravioleta.

4.3.1.2 Determinação do HMF pelo método colorimétrico após reação com ácido 2-tiobarbitúrico

Este método foi adaptação do proposto por KEENEY & BASSETTE (97), originalmente empregado para a determinação do HMF em leite. Após a preparação da amostra com ácido oxálico e aquecimento a refluxo durante 1 hora ou diretamente, o HMF presente reage com ácido 2-tiobarbitúrico dando origem a um produto de coloração amarela, cuja concentração é determinada es pectrofotometricamente a 443 nm. O produto colorido obtido é formado segundo a reação:

hidroximetilfurfuralmaloniltiourêia

Tendo em vista que os SRO e leite são amostras de natureza bem diferentes, resolvemos estudar as condições experimentais para padronização do método, tendo como objetivo sua aplicação nas formulações farmacêuticas ensaiadas. Este estudo foi desenvolvido da seguinte maneira:

a. Influência do aquecimento prévio com ácido oxálico

Mantendo-se basicamente as condições indicadas no método original, a reação foi experimentada com as variações indicadas no esquema seguinte:

QUADRO 3. Esquema das experiências efetuadas para verificação da influência do aquecimento prévio com ácido oxálico na determinação do HMF pelo método colorimétrico com ácido 2-tiobarbitúrico.

QUADRO 3.

Balões	Solução padrão de HMF(7,59µg/ml) ml (µg)	Água (ml)	Ácido oxálico 0,3 N (ml)
1	5,0 (37,95)	5,0	—
2	—	10,0	—
3	5,0 (37,95)	—	5,0
4	—	5,0	5,0
5	5,0 (37,95)	5,0	—
6	—	10,0	—
7	5,0 (37,95)	—	5,0
8	—	5,0	5,0

Para todos os balões foram adicionados 5,0 ml de solução de ácido tricloroacético 40%. Após agitação, foram transferidos sucessivamente 4,0 ml de cada solução para tubos de ensaio e a todos foi adicionado 1,0 ml de solução de ácido 2-tiobarbitúrico 0,05 M. Estes tubos foram depois aquecidos em banho-maria a 40°C durante 35 minutos. As leituras foram efetuadas a 443 nm empregando-se água como branco. Foram determinados os espectros de absorção no intervalo de 520 a 360 nm.

b. *Estabilidade da solução de HMF em água*

Foram feitas duas experiências com a fina

lidade de verificar-se por quanto tempo é estável a solução de HMF em água, mantida em refrigerador. Para tanto foi empregada uma solução padrão de HMF contendo 10,0 µg/ml e, a intervalos regulares de tempo, alíquotas foram retiradas e a reação com ácido 2-tiobarbitúrico, com e sem aquecimento com ácido oxálico, foi processada da maneira habitual. As leituras das absorbâncias foram efetuadas a 443 nm, empregando-se água como branco.

c. *Estabilidade do produto colorido após reação do HMF com ácido 2-tiobarbitúrico*

Para verificação do período de tempo adequado para realização das leituras espectrofotométricas, após formação do produto colorido, foram efetuadas duas experiências. Foi empregada a mesma solução de HMF contendo 10,0 µg/ml e que permaneceu 25 dias em refrigerador. Alíquotas desta solução foram retiradas e as reações com ácido 2-tiobarbitúrico, com e sem aquecimento prévio com ácido oxálico, foram processadas como nas experiências do item precedente.

d. *Reatividade da glicose e da frutose com ácido oxálico*

A experiência foi feita com o objetivo de

verificarmos se a glicose nas condições empregadas no método de análise escolhido, dava origem ao HMF. Um teste foi feito também com a frutose, para mostrar a diferença de comportamento entre as duas oses. Para desenvolvimento da experiência, 0,65 g de glicose e a mesma quantidade de frutose, foram separadamente dissolvidas em água e os volumes completados para 50 ml. Destas duas soluções foram retiradas alíquotas de 5,0 ml e o método com ácido oxálico e aquecimento a refluxo foi desenvolvido da maneira habitual. As leituras foram efetuadas a 443 nm, empregando água como branco. A solução final referente à frutose foi diluída cinco vezes antes da leitura.

e. Padronização do método sem ácido oxálico e sem aquecimento prévio a refluxo

Uma vez observadas as condições ideais da reação colorida, foi efetuada a padronização do método. Partiu-se de uma solução padrão de HMF em água contendo 10,0 µg/ml. Desta solução foram retiradas dez alíquotas de 1,0 a 10,0 ml. Os volumes foram, a seguir, completados para 10ml com água. Em outro tubo, empregado como branco, foram transferidos 10,0 ml de água. A todos os tubos foram adicionados 5,0 ml de solução de ácido tricloroacético. Após agitação, alíquotas de 4,0 ml de cada tubo foram transferidas para outros e a

seguir adicionou-se 1,0 ml da solução de ácido 2-tio-barbitúrico a cada tubo. Em seguida, todos os tubos foram aquecidos em banho-maria a 40°C, por 35 minutos, e após 15 minutos foram efetuadas as leituras em 443 nm, empregando-se água para ajustar o aparelho. A reta de calibração foi calculada pelo método dos quadrados mínimos. Os resultados foram submetidos à análise estatística.

f. *Padronização do método com ácido oxálico e com aquecimento prévio a refluxo*

Neste caso, partiu-se de uma solução padrão de HMF em água contendo 20,0 µg/ml e desta solução foram transferidas, para balões de 100 ml, dez alíquotas que variaram de 0,5 a 5,0 ml e prosseguiu-se com o tratamento habitual do método. A reta de calibração foi calculada pelo método dos quadrados mínimos. Os resultados foram submetidos à análise estatística.

g. *Determinação do HMF nos SRO*

Foram empregadas nesta experiência amostras contendo os diferentes tipos de SRO, mantidas em estufa a 50°C. Em determinados intervalos de tempo, estas amostras foram diluídas convenientemente e submetidas a análise pelo método colorimétrico para a deter

minação do HMF nas duas condições padronizadas, isto é, sem adição de ácido oxálico e portanto sem aquecimento e com adição de ácido oxálico e aquecimento, a refluxo, durante 1 hora. No primeiro caso, foi determinada a quantidade de HMF livre contida nas amostras e, no segundo caso, a quantidade de HMF potencial existente nas mesmas amostras.

h. Testes de recuperação

A confirmação da eficiência do método foi verificada executando-se testes de recuperação.

De uma amostra do pó recém-preparado (amostra A), 1,2 g foram transferidos para balão de 100 ml; após dissolução com água, o volume foi completado. Desta solução, 25,0 ml foram transferidos para balão de 50 ml e, após adição de 5,0 ml de solução padrão de HMF contendo 201,6 µg/ml (I), o volume foi completado (II). Outra solução foi preparada diluindo-se 25,0 ml da solução da amostra para 50 ml (III). Alíquotas das soluções I, II e III foram submetidas a análise nas condições já descritas, para a aplicação do método.

4.3.2 Metodologia para a análise da glicose

4.3.2.1 Método iodométrico

A técnica para as análises das amostras foi a inscrita na 3 ed. da Farmacopéia Internacional (162). As ampolas, mantidas em estufa a 50°C, foram retiradas de tempos em tempos e os conteúdos diluídos de maneira conveniente. Alíquotas foram transferidas para "erlenmeyers" de 250 ml e, após adição de 25,0 ml de solução de iodo 0,1 M e 10,0 ml de solução de carbonato de sódio 5% e repouso por 20 minutos, 15,0 ml de solução de ácido sulfúrico 10% foram adicionados. O excesso de iodo foi titulado com solução de tiossulfato de sódio 0,1 M, empregando-se solução de amido como indicador. Foi efetuado sempre o branco e feitas as correções necessárias. Cada ml de solução de iodo 0,1 M é equivalente a 9,008 mg de $C_6H_{12}O_6$.

4.3.2.2 Método enzimático

O método de TRINDER (198), empregado normalmente para a determinação da glicose em sangue, soro e plasma foi adaptado para análise da glicose, nas amostras estudadas. Este método é baseado na liberação seletiva de peróxido de hidrogênio pela glicose-oxidase (GOD). A reação colorimétrica ocorre entre

a 4-aminofenazona e o fenol em presença de oxigênio liberado pela peroxidase (POD). O composto, de coloração vermelha, é determinado espectrofotometricamente em 510 nm. Para a padronização do método, alguns estudos foram efetuados visando-se estabelecer as condições ideais de análise.

a. *Estudo da reatividade dos outros componentes presentes nos SRO*

Foram preparadas amostras do tipo A e C contendo os componentes das formulações dos SRO nas mesmas quantidades, mas sem glicose. Tomadas de ensaio de cerca de 0,3 g dos dois pós foram transferidas para balões de 50 ml, onde após dissolução com água, o volume foi completado. De ambas as soluções foram preparadas outras, diluídas 20.000 vezes. Destas soluções finais transferiram-se alíquotas de 1,0 ml para tubos e adicionados aos mesmos, inclusive o empregado como branco, que continha 1,0 ml de água, 4,0 ml do reagente colorimétrico enzimático GOD-PAP. Todos os tubos foram aquecidos em banho-maria a 37°C durante 15 minutos e, imediatamente após, efetuadas as leituras em 510 nm, empregando água para ajuste do aparelho.

b. *Padronização do método*

Para a padronização do método empregou-se

uma solução de glicose anidra em água contendo 50,0 mg por 100 ml. Desta solução foram feitas dez tomadas de ensaio de 5,0 a 14,0 ml em balões volumétricos de 100 ml. Os volumes foram completados e, destas soluções, alíquotas de 1,0 ml foram transferidas para dez tubos. Para outro tubo, usado como branco, foi pipetado 1,0 ml de água. Após a adição de 4,0 ml do reagente colorimétrico enzimático GOD-PAP aos tubos, todos foram mantidos em banho-maria a 37°C durante 15 minutos. As leituras foram efetuadas a 510 nm, empregando - se o branco para ajuste do aparelho. A concentração da solução de leitura de glicose variou de 5,0 a 14,0 µg/ml. A reta de calibração foi calculada pelo método dos quadrados mínimos. Os resultados foram submetidos a análise estatística. Foi determinado o espectro de absorção do produto colorido formado, com o tubo de concentração 14,0 µg/ml, entre 650 e 330 nm.

c. Aplicação do método na análise das amostras

O método foi aplicado na análise da glicose nas amostras A, B, C e D dos SRO, mantidas em estufa a 50°C. O conteúdo das ampolas, retiradas da estufa, de tempos em tempos, foi dissolvido em água e após as diluições convenientes o método de análise foi aplicado como já descrito anteriormente.

d. *Testes de recuperação*

A confirmação da eficiência do método foi verificada executando-se testes de recuperação com as amostras A e C. Destas amostras, foram preparadas soluções contendo 70,0 $\mu\text{g/ml}$ de glicose, e também uma solução padrão contendo 1750 $\mu\text{g/ml}$ de glicose.

Alíquotas das soluções das amostras foram transferidas para balões de 50 ml; adicionaram-se diferentes alíquotas da solução do padrão e o volume foi completado. De cada solução foi transferido 1,0 ml para uma série de tubos e adicionados 4,0 ml do reagente. Após o procedimento descrito anteriormente, os cálculos foram efetuados comparando-se as absorbâncias das amostras com as do padrão.

4.3.3 Metodologia para a análise do bicarbonato de sódio

A determinação do bicarbonato de sódio foi feita aplicando-se o método titulométrico clássico. As amostras A e B analisadas foram mantidas a 50°C, acondicionadas em ampolas. Devido ao escurecimento pro-gressivo do pó, com o decorrer do tempo, foi necessário, antes da titulação, tratar as amostras com carvão ativado. Desta maneira, empregou-se a seguinte

técnica: a tomada de ensaio do pó foi dissolvida com 25 ml de água e adicionou-se cerca de 1,0 g de carvão ativado. Agitou-se e deixou-se em repouso durante 10 minutos. Após filtração, titulou-se com solução de ácido sulfúrico 0,1 N, empregando-se alaranjado de metila como indicador. Cada ml de ácido sulfúrico 0,1 N equivale a 8,401 mg de bicarbonato de sódio.

Foram efetuados ensaios com solução de bicarbonato de concentração conhecida, com e sem carvão ativado, para verificar-se a influência deste adsorvente nos resultados da análise.

4.3.4 Metodologia para a análise do citrato de sódio

Dois métodos alcalimétricos foram empregados para a análise deste componente na formulação: titulação em meio não aquoso e titulação em meio aquoso.

a. *Titulação em meio não aquoso* (66, 160)

Para testar a viabilidade de aplicação do método foram empregadas amostras da matéria-prima e amostra C do SRO, recém-preparada. Tomadas correspondentes a 5,0 g de citrato de sódio foram tratadas com

300 ml de ácido acético glacial, com ligeiro aquecimento. Após filtração, quando necessária, o volume foi completado para 500 ml. Aliquotas de 20,0 ml (contendo 200,0 mg de citrato de sódio) foram transferidas para "erlenmeyers" de 250 ml e tituladas com solução de ácido perclórico 0,1 N em ácido acético, empregando-se α -naftolbenzeína 0,2% ou cristal violeta 0,5%, como indicador. Cada ml de ácido perclórico 0,1 N é equivalente a 9,804 mg de citrato de sódio diidratado.

b. *Titulação em meio aquoso*

A titulação em meio aquoso, empregando-se indicador misto (119), foi experimentada visando-se facilitar a análise deste componente. Como no caso anterior, tomadas de ensaio das amostras C, correspondentes a 5,0 g de citrato de sódio foram dissolvidas em água e o volume completado para 500 ml. Aliquotas de 20,0 ml (contendo 200,0 mg de citrato de sódio) foram transferidas para "erlenmeyers" de 250 ml e tituladas com solução de ácido sulfúrico 0,1 N, empregando-se 0,4 ml da solução do indicador. Cada ml de ácido sulfúrico 0,1 N é equivalente a 14,706 mg de citrato de sódio diidratado.

c. *Estudo da interferência dos outros componentes da formulação*

Para aplicação dos métodos a. e b. foram efetuadas experiências, com a finalidade de se verificar se os outros componentes da formulação interferiam nos resultados do doseamento. Assim, foram preparadas amostras do pó, contendo todos os componentes da formulação, excetuando-se o citrato de sódio. Estas amostras foram analisadas pelos dois métodos, como descritos anteriormente.

d. *Aplicação dos métodos a. e b. na análise das amostras*

As amostras das séries C e D, mantidas a 50°C, foram analisadas, de tempos em tempos, pelos dois métodos, após dissolução e diluições convenientes.

e. *Testes de recuperação*

Para se efetuar o teste de recuperação no pó, aplicando-se o método em meio não aquoso prepararam-se duas soluções: uma, da amostra contendo 10,0 mg de citrato de sódio/ml e outra, padrão de citrato de sódio contendo 20,0 mg/ml. Alíquotas de 10,0 ml da solução da amostra foram transferidas para "erlenmeyers" de 250 ml e outras alíquotas, contendo quantidades diferentes da solução do padrão lhes foram adicionadas. Procederam-se às titulações com solução volumétrica de

ácido perclórico 0,1 N, empregando-se como indicador solução de α -naftolbenzeína ou cristal violeta.

O teste de recuperação na amostra, aplicando-se a alcalimetria em meio aquoso, foi efetuado empregando-se a mesma programação anterior e as soluções finais foram tituladas com solução volumétrica de ácido sulfúrico 0,1 N e solução de indicador misto.

4.3.5 Metodologia para a determinação da água

Após a preparação das amostras A e C foi feita a determinação da quantidade de água existente nestes dois tipos de formulações, empregando-se o método de Karl-Fischer. Primeiramente, foi feita a padronização do reagente com água.

Foram feitas a seguir, as determinações de umidade nas amostras A e C recém-preparadas e antes de serem ampoladas, pesando-se quantidades dos pós que variavam entre 100,0 e 170,0 mg. As amostras foram adicionadas a metanol, previamente neutralizado, e tituladas com o reagente de Karl-Fischer. O teor de água foi calculado em função do título do reagente.

4.3.6 Cromatografia em camada delgada para detecção do HMF

Com a finalidade de serem testados alguns sistemas por cromatografia em camada delgada, tendo como principal objetivo a detecção do HMF nas amostras dos SR0, foram preparadas as amostras B e D. Quantidades que variavam em torno de 1,0 g foram pesadas e transferidas para ampolas. As ampolas, depois de fechadas, foram mantidas a 50°C, de 13 a 27 dias e, de tempos em tempos, retiradas da estufa e diluídas com água para 10 ml, em balões volumétricos. Estas soluções foram aplicadas nas placas cromatográficas.

Além das amostras, foram cromatografadas também soluções padrão de HMF, glicose, manose, frutose, ácido levulínico e ácido fórmico. As soluções de HMF, dos ácidos levulínico e fórmico foram preparadas em metanol e as outras, em água. Todas essas soluções foram preparadas diariamente.

As placas recobertas com sílica gel GF-254 Merck foram sempre ativadas durante 1 hora, a 105°C, antes de serem usadas. As soluções das amostras e padrões foram aplicadas a 2,0 cm da margem inferior da placa e a linha de chegada do solvente foi fixada em 15,0 cm.

Foram testadas as seguintes fases móveis:

- A. Etanol - clorofórmio - hidróxido de amônio concentrado - água (5:3:1,5:0,5) (29).
- B. Benzeno - metanol (5:2) (68).
- C. Benzeno - metanol (9:1) (68).
- D. Acetato de etila - isopropanol - água (65:23:12) (187).
- E. Acetato de etila - cicloexano (15:85) (75).
- F. Clorofórmio - metanol (4:1) (75).

Para a revelação das placas foram empregados os reveladores:

1. p-anisaldeído - ácido sulfúrico (187).
2. vanilina etanólica a 1% + 5% de ácido sulfúrico (75).
3. solução de nitrato de prata amoniacal (15, 57, 165).
4. solução etanólica de 2,4-dinitrofenilidrazina (68, 171).

Todas as placas, antes de serem reveladas, foram observadas na luz ultravioleta a 254 e 366 nm. Depois de borrifadas com os reagentes reveladores, com exceção da solução etanólica de 2,4-dinitrofenilidrazina, foram mantidas a 105°C durante 10 a 15 minutos, para visualização da coloração.

Foram realizadas experiências, com o objetivo de detectar-se o HMF em amostras dos SRO, alteradas pelo aquecimento. Amostra do tipo A (0,8 g), mantida duran

te 110 dias a 50°C, foi dissolvida com 10 ml de água. Desta solução, 2,0 ml foram aquecidos por 1 hora a refluxo com 2,0 ml de solução de ácido oxálico 0,3 N. Após resfriamento, foi feita extração com 10 ml de clorofórmio; o extrato foi concentrado até 1 ml e cromatografado, empregando-se a fase móvel C e o revelador *p*-anisaldeído-ácido sulfúrico, escolhidos em função dos resultados experimentais previamente obtidos.

Capítulo V

5. RESULTADOS

5.1 TENTATIVA PARA A DETERMINAÇÃO DO HMF POR ESPECTROFOTOMETRIA NO ULTRAVIOLETA

Os espectros de absorção e a reta de calibração podem ser vistos nas *Figuras 1 e 2*. A precisão do método foi de 0,06%. A tentativa de aplicação do método nas amostras para determinação do HMF no ultravioleta não foi bem sucedida. Com a amostra mantida à temperatura ambiente não apareceu nenhum pico de absorção no espectro, enquanto que, com a amostra a 37°C, pequenos valores de absorbância foram observados próximos a 284 nm. Um pico de absorção bem definido, mas em 270 nm, foi obtido com a amostra mantida a 50°C. Neste caso, para possibilitar a leitura, a solução foi diluída 10 vezes e o valor da absorbância foi de 0,498.

Não foi possível calcular o teor de HMF no teste de recuperação efetuado. O espectro de absorção da amostra na qual adicionou-se o HMF foi muito semelhante àquele do padrão; entretanto, a absorbância foi muito superior à que corresponderia ao valor esperado. A amostra sem HMF apresentou o pico deslocado para 270 nm e a absorbância, neste ponto, foi de 0,407.

Não houve diferença significativa nos espectros das soluções de HMF padrão em pHs 4,5 e 8,0, na região correspondente ao pico em 284 nm; mas em relação ao pico em 228 nm, a absorbância da solução de pH 8,0 foi menor do que a da solução em pH 4,5. A solução da amostra recém-preparada não apresentou nenhum pico característico, enquanto que a da amostra mantida a 50°C por 24 dias, confirmou os resultados anteriores. Na *Figura 3* podem ser observados os espectros de absorção.

Nas experiências empregando-se o método de WHITE JUNIOR (208) e solução de bissulfito de sódio como branco não houve evidência de nenhum espectro de absorção. Quando as leituras foram realizadas empregando-se água como branco, ambas as soluções, com e sem bissulfito, apresentaram nos comprimentos de onda, 284 nm e 336 nm, os mesmos valores e os espectros de absorção foram praticamente idênticos.

Os resultados da aplicação do método de DHAR & ROY (46) não foram satisfatórios quando empregamos a técnica para a análise da amostra, pois, o pico de absorção máxima apareceu em 264 nm e não em 284 nm, que é característico do HMF, conforme pode ser visto na *Figura 4*.

5.2 DETERMINAÇÃO DO HMF PELO MÉTODO COLORIMÉTRICO APÓS REAÇÃO COM ÁCIDO 2-TIOBARBITÚRICO (97)

a. *Influência do aquecimento prévio a refluxo com ácido oxálico*

Os resultados obtidos nas experiências para verificar a influência do ácido oxálico e do aquecimento podem ser observados na TABELA 1. Os valores das absorbâncias praticamente não sofreram variações significativas, em relação aos fatores estudados. Os espectros de absorção em todos os casos foram praticamente idênticos. Na *Figura 5* pode ser observado o espectro de absorção do composto colorido.

b. *Estabilidade da solução de HMF em água*

As soluções de HMF são pouco estáveis, pois em alguns dias, o valor das absorbâncias do produto colorido obtido de tempos em tempos e formado pela reação com o ácido 2-tiobarbitúrico vai diminuindo, de acordo com os dados das TABELAS 2 e 3.

c. *Estabilidade do produto colorido após reação do HMF com ácido 2-tiobarbitúrico*

Após a reação do HMF com o ácido 2-tiobarbitúrico, a absorbância do produto colorido mantém-se cons-

tante, no mínimo por 90 minutos. Nas TABELAS 4 e 5 estão reunidos os resultados das experiências realizadas.

d. *Reatividade da glicose e da frutose com ácido oxálico*

As experiências realizadas com este objetivo, mostraram-nos que a glicose, quando aquecida com solução de ácido oxálico, nas condições em que é feita a determinação analítica, não dá origem a HMF. A frutose, no entanto, deu reação positiva e a absorbância em 443 nm foi de 0,486.

e. *Padronização do método com e sem ácido oxálico*

As absorbâncias obtidas pela padronização do método colorimétrico nas duas condições estudadas, assim como o intervalo de concentração no qual foram efetuadas as leituras, estão na TABELA 6.

Calculando-se a reta teórica pelo método dos quadrados mínimos pode-se determinar a proporcionalidade entre concentração de HMF e absorbância. Os resultados obtidos estão representados na *Figura 6*.

A precisão do método com ácido oxálico foi de 0,04% e de 0,01% para o método sem ácido oxálico.

f. *Determinação do HMF nos SRO*

Os resultados da aplicação dos métodos nas amostras estão apresentados nas TABELAS 13, 14, 15 e 16.

g. *Testes de recuperação*

A reação entre o HMF e o ácido 2-tiobarbitúrico ocorreu de maneira semelhante à do procedimento do método para análise das amostras. Os teores de HMF foram calculados comparando-se as absorbâncias das soluções das amostras com a do padrão e estão reunidos na TABELA 7.

5.3 DETERMINAÇÃO DA GLICOSE PELO MÉTODO IODOMÉTRICO

Os resultados, aplicando-se este método nas amostras analisadas, estão reunidos nas TABELAS 13, 14, 15 e 16.

5.4 DETERMINAÇÃO DA GLICOSE PELO MÉTODO ENZIMÁTICO

a. *Estudo da reatividade dos outros componentes presentes nos SRO*

Em nenhuma das amostras preparadas sem glicose a aplicação do método permitiu a determinação das absorbâncias, uma vez que a reação colorida foi negativa.

b. *Padronização do método*

As absorbâncias obtidas na padronização do método do colorimétrico enzimático para a determinação da glicose, assim como o intervalo de concentração no qual foram efetuadas as leituras, podem ser observadas na TABELA 8. A precisão do método é de 0,04%. O espectro de absorção do composto colorido pode ser visto na *Figura 7* e a reta de calibração na *Figura 8*.

c. *Aplicação do método nas amostras*

Os resultados da aplicação do método colorimétrico enzimático nas amostras podem ser observados nas TABELAS 13, 14, 15 e 16.

d. *Testes de recuperação*

O teste de recuperação da análise da glicose, adicionada às amostras dos medicamentos, forneceu resultados satisfatórios. Os dados foram reunidos e podem ser observados nas TABELAS 9 e 10. A média das porcentagens de recuperação da glicose na amostra A foi de 98,12% e na amostra C, 101,59%.

5.5 DETERMINAÇÃO DO BICARBONATO DE SÓDIO

Nas condições de emprego do método titulométrico

para a análise do bicarbonato de sódio, o carvão ativado não influenciou na aplicação da técnica.

Os resultados das análises do bicarbonato de sódio contido nas formulações dos SRO estão apresentados nas TABELAS 13 e 14.

5.6 DETERMINAÇÃO DO CITRATO DE SÓDIO

Os resultados da padronização dos métodos em meio não aquoso e em meio aquoso, para análise do citrato de sódio, estão reunidos na TABELA 11.

Pelos testes efetuados com amostras contendo todos os componentes, excetuando-se o citrato de sódio, foi verificado que não havia consumo das soluções titulantes.

Os resultados das análises do citrato de sódio contido nas formulações dos SRO estão apresentados nas TABELAS 15 e 16.

As médias das porcentagens de recuperação na análise do citrato de sódio foram, respectivamente, 98,54% na titulação em meio não aquoso e 99,45% na titulação em meio aquoso. Os resultados das análises estão reunidos na TABELA 12.

5.7 DETERMINAÇÃO DA UMIDADE PELO MÉTODO DE KARL-FISCHER

Os resultados das análises do teor de umidade nas amostras A e C, recém preparadas, podem ser vistos nas TABELAS 13 e 15.

5.8 CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA

A observação das placas cromatográficas, após eluição com os sistemas de solventes empregados com luz ultravioleta, só possibilitou a detecção nítida no caso do HMF. Os outros reveladores foram adequados para detecção do HMF e das outras substâncias. No entanto, o revelador que melhor diferenciou os diversos produtos foi o *p*-anisalaldeído-ácido sulfúrico. Nas TABELAS 17, 18, 19 e 20 estão reunidos os resultados das análises cromatográficas.

A experiência para detecção cromatográfica do HMF em amostra do tipo A, alteradas pelo aquecimento e tratadas com ácido oxálico e posterior extração com clorofôrmio, foi bem sucedida. A presença do HMF foi comprovada por comparação com o padrão.

Fíguas

Figura 1. Espectros de absorção no ultravioleta do HMF em diferentes concentrações de leitura (1: 2,17 $\mu\text{g/ml}$; 2: 2,71 $\mu\text{g/ml}$; 3: 3,25 $\mu\text{g/ml}$; 4: 3,80 $\mu\text{g/ml}$; 5: 4,34 $\mu\text{g/ml}$; 6: 4,88 $\mu\text{g/ml}$; 7: 5,43 $\mu\text{g/ml}$; 8: 5,97 $\mu\text{g/ml}$; 9: 6,51 $\mu\text{g/ml}$ e 10: 7,05 $\mu\text{g/ml}$).

Figura 2. Reta de calibração para a determinação do HMF em 284 nm em solução aquosa. Intervalo de concentração do HMF: 2,1 a 7,0 $\mu\text{g/ml}$.

Figura 3. Espectros de absorção do HMF e amostras na região do ultravioleta para evidenciar a influência do pH no pico em 228 nm verificada nas soluções padrão de HMF (1: solução padrão de HMF, 4,0 $\mu\text{g/ml}$, pH = 4,5; 2: solução padrão de HMF, 4,0 $\mu\text{g/ml}$, pH = 8,0; 3: solução da amostra a 50°C durante 24 dias, 3,6 mg do pó/ml, pH = 8,0).

Figura 4. Espectro de absorção do eluido da coluna de carvão ativado, empregada na aplicação do método DHAR & ROY (46) para análise do HMF nas amostras.

Figura 5. Espectro de absorção do produto colorido obtido da reação entre HMF e ácido 2-tio_{barbitúrico} (concentração final de leitura: 2,0 $\mu\text{g/ml}$), empregando-se água como branco.

Figura 6. Retas de calibração obtidas para a determinação do HMF pelo método colorimétrico com ácido 2 - tiobarbitúrico. Intervalo de concentração de HMF: 0,5 a 5,3 $\mu\text{g/ml}$. Leituras efetuadas a 443 nm (--- com ácido oxálico e aquecimento prévio a refluxo, — sem ácido oxálico e sem aquecimento prévio a refluxo). Médias de duas determinações.

Figura 7. Espectro de absorção do composto obtido pela reação de 1,0 ml de solução de glicose contendo 70 $\mu\text{g/ml}$ com 4,0 ml do reagente GOD-PAP.

Figura 8. Reta de calibração para determinação da glicose pelo método colorimétrico enzimático. Intervalo de concentração da glicose: 5,0 a 14,0 µg/ml. Leituras efetuadas a 510 nm, empregando-se água para ajuste do aparelho.

Tabelas

TABELA 1. Influência do aquecimento prévio a refluxo com ácido oxálico. Resultados obtidos empregando-se o método colorimétrico para determinação do HMF, após reação com ácido 2-tiobarbitúrico. Leituras efetuadas a 443 nm, empregando-se água como branco e concentração final de leitura = 2,0 µg/ml.

TUBOS	ABSORBÂNCIAS
1	0,570
2	0,107
3	0,570
4	0,108
5	0,492
6	0,102
7	0,546
8	0,095

TABELA 2. Estabilidade da solução de HMF em água, determinada pela reação sem ácido oxálico e sem aquecimento prévio a refluxo. Leituras efetuadas a 443 nm e 15 minutos após o término do aquecimento a 40°C, por 35 minutos. Concentração final de HMF = 2,66 µg/ml.

TEMPO (horas)	ABSORBÂNCIAS		
	Solução padrão de HMF	Branco	Real
0	0,773	0,082	0,691
8	0,755	0,074	0,681
24	0,700	0,030	0,670
96	0,710	0,041	0,669
168	0,712	0,037	0,675
312	0,700	0,034	0,666
336	0,645	0,035	0,610
720	0,472	0,044	0,428

TABELA 3. Estabilidade da solução de HMF em água, determinada pela reação com ácido oxálico e com aquecimento prévio a refluxo. Leituras efetuadas a 443 nm e 15 minutos após o término do aquecimento a 40°C, por 35 minutos. Concentração final de HMF = 2,14 µg/ml.

TEMPO (horas)	ABSORBÂNCIAS		
	Solução padrão de HMF	Branco	Real
0	0,629	0,067	0,562
24	0,592	0,042	0,550
48	0,559	0,046	0,513
72	0,573	0,040	0,533
192	0,575	0,048	0,527
240	0,528	0,037	0,491
336	0,487	0,032	0,455
720	0,089	0,014	0,075

TABELA 4. Estabilidade do produto colorido formado na reação sem ácido oxálico e sem aquecimento prévio a refluxo. Leituras a 443 nm e concentração final de HMF = 2,66 µg/ml.

TEMPO (min)	ABSORBÂNCIAS		
	Padrão	Branco	Real
0	0,490	0,044	0,446
2	0,482	0,044	0,438
4	0,474	0,044	0,430
6	0,472	0,044	0,428
8	0,472	0,044	0,428
10	0,472	0,044	0,428
15	0,472	0,044	0,428
20	0,476	0,046	0,430
25	0,480	0,046	0,434
30	0,482	0,046	0,436
40	0,485	0,046	0,439
50	0,488	0,048	0,440
60	0,488	0,047	0,441
90	0,484	0,046	0,438

TABELA 5. Estabilidade do produto colorido formado na reação com ácido oxálico e com aquecimento prévio a refluxo. Leituras a 443 nm e concentração final de HMF = 2,15 µg/ml.

TEMPO (min)	ABSORBÂNCIAS		
	Padrão	Branco	Real
0	0,431	0,026	0,405
2	0,425	0,027	0,398
4	0,422	0,028	0,394
6	0,420	0,026	0,394
8	0,420	0,026	0,394
10	0,418	0,027	0,391
15	0,419	0,026	0,393
20	0,421	0,026	0,395
25	0,422	0,026	0,396
30	0,423	0,026	0,397
40	0,423	0,026	0,397
50	0,421	0,026	0,395
60	0,420	0,026	0,394
90	0,409	0,028	0,381

TABELA 6. Resultados obtidos na padronização dos métodos sem ácido oxálico e com ácido oxálico e aquecimento prévio a refluxo, empregando o método colorimétrico com o ácido 2-tiobarbitúrico. Leituras efetuadas a 443 nm, 15 minutos após o aquecimento a 40°C, durante 35 minutos, empregando - se água para ajuste do aparelho. Médias de duas determinações.

TUBOS	ABSORBÂNCIAS		
	Concentração final de leitura (µg/ml)	Sem ácido oxálico	Com ácido oxálico
1	0,53	0,138	0,152
2	1,06	0,283	0,296
3	1,60	0,411	0,425
4	2,13	0,556	0,560
5	2,66	0,691	0,708
6	3,20	0,832	0,861
7	3,73	0,968	0,998
8	4,26	1,098	1,118
9	4,80	1,240	1,283
10	5,33	1,368	1,423

TABELA 7. Resultados do teste de recuperação do HMF adicionado à amostra do medicamento. Método de análise: reação colorimétrica com ácido 2-tiobarbitúrico. Médias de duas determinações.

Tipo da reação	Quantidades de HMF adicionadas ao pó (µg)	Valores encontrados (µg)	Recuperação (%)
Reação sem ácido oxálico	40,32	41,76	103,57
	100,80	101,37	100,56
Reação com ácido oxálico e aquecimento prévio a refluxo	20,16	19,65	97,48
	40,32	39,23	97,30

TABELA 8. Resultados obtidos na padronização do método colorimétrico enzimático para análise da glicose. Leituras efetuadas em 510 nm, após aquecimento em banho-maria a 37°C, durante 15 minutos.

Tubos	Concentração final de leitura (µg/ml)	Absorbâncias
1	5,0	0,179
2	6,0	0,214
3	7,0	0,251
4	8,0	0,290
5	9,0	0,325
6	10,0	0,361
7	11,0	0,400
8	12,0	0,434
9	13,0	0,464
10	14,0	0,505

TABELA 9. Resultados do teste de recuperação da glicose na formulação contendo bicarbonato de sódio (Amostra A). Método de análise: reação colorimétrica enzimática.

Experiência (nº)	Quantidades de glicose (µg)		Valores encontrados (µg)	Recuperação (%)
	no pó	adicionada total		
1	1750	875 2625	2579	98,27
2	1750	1750 3500	3395	97,01
3	1750	2625 4375	4357	99,60
4	3500	— 3500	3416	97,60

TABELA 10. Resultados do teste de recuperação da glicose na formulação contendo citrato de sódio diidratado (Amostra C). Método de análise: reação colorimétrica enzimática

Experiência (nº)	Quantidades de glicose (µg)		Valores encontrados (µg)	Recuperação (%)
	no pó	adicionada total		
1	1750	875 2625	2537	96,67
2	1750	1750 3500	3555	101,59
3	1750	2625 4375	4503	102,94
4	3500	— 3500	3681	105,17

TABELA 11. Resultados da padronização dos métodos para análise do citrato de sódio em meio não aquoso e em meio aquoso. Médias de dez determinações.

Métodos	Matéria prima		Amostras
	com α -naftolbenzeína violeta	com α -naftolbenzeína violeta	com cristal violeta
Meio não aquoso	98,6 $\pm$ 0,5%	100,0 $\pm$ 1,0%	100,7 $\pm$ 0,5% 101,2 $\pm$ 1,0%
Meio aquoso	97,5 $\pm$ 1,6%	97,5 $\pm$ 2,5%	

TABELA 12. Resultados do teste de recuperação do citrato de sódio adicionado à amostra C. Métodos de análise: alcalimetria em meio não aquoso e em meio aquoso

EXPERIÊNCIA QUANTIDADES DE CITRATO (mg)				MÉTODOS			
(nº)	no pó	adicionadas	total	Meio não aquoso		Meio Aquoso	
				Valor encontrado (mg)	Recuperação (%)	Valor encontrado (mg)	Recuperação (%)
1	100,0	—	100,0	101,00	101,00	99,37	99,37
2	100,0	—	100,0	101,00	101,00	99,37	99,37
3	100,0	20,0	120,0	116,08	96,74	119,04	99,20
4	100,0	40,0	140,0	137,55	98,25	141,26	100,90
5	100,0	60,0	160,0	160,96	100,60	158,73	99,20
6	100,0	80,0	180,0	176,57	98,09	177,77	98,76
7	100,0	100,0	200,0	198,03	99,01	198,41	99,20

TABELA 13. Resultados das análises da Amostra A, mantida a 50°C em ampolas fechadas. Umidade inicial (Karl-Fischer) = 1,88%. Quantidades teóricas dos componentes: glicose 72,72% e bicarbonato de sódio 9,09%.

AMOSTRA (nº)	TEMPO (dias)	pH ^a	ANÁLISES				HMF	
			GLICOSE		BICARBONATO DE SÓDIO (%)	livre (%)		potencial (%)
			iodométrico (%)	enzimático (%)				
inicial	0	8,3	75,10	73,77	9,01	traços	0,0016	
1	10	<i>b</i>	67,95	66,62	<i>b</i>	0,0022	0,0194	
2	20	8,0	69,39	60,65	<i>b</i>	0,0020	0,0261	
3	30	8,0	67,47	61,21	7,87	0,0049	0,0396	
4	60	7,8	66,49	59,86	<i>b</i>	0,0098	0,0598	
5	90	7,7	63,34	49,39	<i>b</i>	0,0108	0,0552	
6	120	7,8	60,16	54,83	7,55	0,0114	0,0690	
7	180	7,7	58,87	51,08	7,65	0,0154	0,0811	
8	360	7,0	52,60	39,11	6,48	0,0313	0,0917	

^a A determinação do pH foi feita sempre dissolvendo-se a amostra (1,0 g) em água e completando-se o volume para 50 ml; em seguida, foram feitas a partir desta solução, as diluições convenientes para a realização das outras análises.

^b Não determinado.

TABELA 14. Resultados das análises da Amostra B, mantida a 50°C em ampolas fechadas. Unidade inicial= 11,88%. Quantidades teóricas dos componentes: glicose 72,72% e bicarbonato de sódio 9,09%.

AMOSTRA (nº)	TEMPO (dias)	ANÁLISES					
		pH ^a	GLICOSE		BICARBONATO DE SÓDIO (%)	HMF	
			iodométrico (%)	enzimático (%)		livre (%)	potencial (%)
inicial	0	8,3	75,10	73,77	9,01	traços	0,0016
1	10	<i>b</i>	63,95	61,08	<i>b</i>	0,0022	0,0314
2	20	8,2	59,95	53,04	<i>b</i>	0,0018	0,0726
3	30	8,1	58,39	51,07	7,87	0,0049	0,1062
4	60	7,9	52,12	42,03	<i>b</i>	0,0096	0,1746
5	90	7,7	49,45	33,10	<i>b</i>	0,0130	0,1750
6	120	7,6	41,44	28,97	7,20	0,0152	0,2799
7	180	7,3	40,91	22,92	7,38	0,0223	0,2468
8	360	5,3	35,72	13,92	6,61	0,0438	<i>b</i>

^a A determinação do pH foi feita sempre dissolvendo-se a amostra (1,0 g) em água e completando-se o volume para 50 ml; em seguida, foram feitas a partir desta solução, as diluições convenientes para a realização das outras análises.

^b Não determinado.

TABELA 15. Resultados das análises da Amostra C, mantida a 50°C em ampolas fechadas. Unidade inicial (Karl-Fischer) = 1,20%. Quantidades teóricas dos componentes: glicose 71,68% e citrato de sódio 10,39%.

AMOSTRA (nº)	TEMPO (dias)	pH ^a	ANÁLISES				
			GLICOSE		CITRATO DE SÓDIO (%)	HMF	
			iodométrico (%)	enzimático (%)		livre (%)	potencial (%)
inicial	0	7,2	71,12	72,54	10,35	traços	0,0015
1	10	<i>b</i>	70,65	70,58	<i>b</i>	traços	0,0036
2	20	<i>b</i>	70,25	69,12	<i>b</i>	traços	0,0031
3	30	<i>b</i>	69,99	71,54	<i>b</i>	traços	0,0043
4	60	6,9	72,72	72,32	<i>b</i>	traços	0,0080
5	90	6,8	71,83	63,88	10,31	0,0009	0,0065
6	120	6,8	72,94	66,09	<i>b</i>	0,0008	0,0103
7	180	6,7	69,53	66,61	<i>b</i>	0,0030	0,0111
8	360	6,5	67,15	63,99	10,28	0,0064	0,0346

^a A determinação do pH foi feita sempre dissolvendo-se a amostra (1,0 g) em água e completando-se o volume para 50 ml; em seguida, foram feitas a partir desta solução, as diluições convenientes para a realização das outras análises.

^b Não determinado.

TABELA 16. Resultados das análises da Amostra D, mantida a 50°C em ampolas fechadas. Unidade inicial= 11,20%. Quantidades teóricas dos componentes: glicose 71,68% e citrato de sódio 10,39%.

AMOSTRA (nº)	TEMPO (dias)	pH ^a	ANÁLISES				
			GLICOSE		CITRATO DE SÓDIO (%)	HMF	
			iodométrico (%)	enzimático (%)		livre (%)	potencial (%)
inicial	0	7,2	71,12	72,54	10,35	traços	0,0015
1	10	<i>b</i>	67,13	66,97	<i>b</i>	traços	0,0218
2	20	<i>b</i>	68,75	67,37	<i>b</i>	traços	0,0319
3	30	<i>b</i>	66,59	67,10	<i>b</i>	traços	0,0444
4	60	6,6	64,19	64,44	<i>b</i>	traços	0,0520
5	90	6,5	62,08	54,56	10,55	0,0022	0,0627
6	120	6,3	62,54	54,19	<i>b</i>	0,0034	0,0952
7	180	6,2	58,72	55,73	<i>b</i>	0,0093	0,1133
8	360	5,9	57,65	49,39	10,46	0,0167	0,1175

^a A determinação do pH foi feita sempre dissolvendo-se a amostra (1,0 g) em água e completando-se o volume para 50 ml; em seguida, foram feitas a partir desta solução, as diluições convenientes para a realização das outras análises.

^b Não determinado.

TABELA 17. Resultados obtidos na cromatografia em camada delgada, empregando-se a fase móvel A: etanol- clorofórmio - hidróxido de amônio concentrado - água (5:3:1,5:0,5).

SUBSTÂNCIAS	REVELADORES				hrf
	p-anisaldeído - ácido sulfúrico	vanilina- ácido sulfúrico	nitrato de prata amoniacal	2,4-dinitro- fenilidrazina	
Mancha principal das amostras	azul escuro	marrom	castanho	castanho	34
HMF padrão	azul escuro	marrom	marrom	laranja	92
Glicose padrão	azul amarelado	marrom	marrom	castanho	35
Manose padrão	azul esverdeado	marrom	marrom	castanho	36
Frutose padrão	azul escuro	marrom	marrom	castanho	40
Ácido levulínico padrão	marrom	bege	castanho	amarelo	74
Ácido fórmico padrão	cinza	—	marrom	—	70

TABELA 18. Resultados obtidos na cromatografia em camada delgada, empregando-se a fase móvel B: benzeno - metanol (5:2).

SUBSTÂNCIAS	REVELADOR	hRf
	<i>p</i> -anisaldeído-ácido sulfúrico	
Mancha principal das amostras	<i>azul escuro</i>	36
HMF padrão	<i>azul escuro</i>	86
Glicose padrão	<i>azul arroxeado</i>	38
Manose padrão	<i>azul esverdeado</i>	43
Frutose padrão	<i>azul escuro</i>	44
Ácido levulínico padrão	<i>marrom</i>	78
Ácido fórmico padrão	—	—

TABELA 19. Resultados obtidos na cromatografia em camada delgada, empregando-se a fase móvel C: benzeno - metanol (9:1).

SUBSTÂNCIAS	REVELADOR	hRf
	<i>p</i> -anisaldeído-ácido sulfúrico	
Mancha principal das amostras	<i>marrom escuro</i>	0
HMF padrão	<i>azul escuro</i>	24
Glicose padrão	<i>azul arroxeado</i>	0
Manose padrão	<i>azul esverdeado</i>	0
Frutose padrão	<i>azul escuro</i>	0
Ácido levulínico padrão	<i>marrom</i>	15
Ácido fórmico padrão	—	0

TABELA 20. Resultados obtidos na cromatografia em camada delgada, empregando-se a fase móvel D: acetato de etila - isopropanol - água (65:23:12).

SÚBSTÂNCIAS	REVELADOR	hRf
	<i>p</i> -anisalaldeído-ácido sulfúrico	
Mancha principal das amostras	<i>azul escuro</i>	23
HMF padrão	<i>azul escuro</i>	93
Glicose padrão	<i>azul arroxeado</i>	36
Manose padrão	<i>azul esverdeado</i>	50
Frutose padrão	<i>azul escuro</i>	46
Ácido levulínico padrão	<i>marrom</i>	60
Ácido fórmico padrão	—	—

Capítulo VI

6. DISCUSSÃO

Quando um medicamento está alterado, alteração esta que pode ser devida a vários fatores, alguns inerentes à própria formulação ou então, ao ambiente e às condições nas quais está armazenado, vários problemas podem surgir. Esta situação, desde que sejam conhecidos os fatores que levam à degradação pode, frequentemente, ser contornada ou evitada. Na maioria das vezes, pode ser feita a previsão da estabilidade de determinada formulação farmacêutica.

Vários fatores podem influir na estabilidade dos medicamentos; mas aqueles considerados principais são: a temperatura, o pH, a umidade, a luz e o ar. Muito importante também é conhecer-se a reatividade e, de modo geral, as propriedades dos princípios ativos contidos nos medicamentos, assim como o mecanismo de decomposição dos fármacos e dos excipientes.

Do ponto de vista das autoridades sanitárias, a finalidade de estudos deste tipo é a determinação do prazo de validade dos produtos comerciais.

Os medicamentos estão sujeitos a deterioração e, portanto, declínio de atividade. A pesquisa sobre

a estabilidade de fármacos tem as seguintes metas principais: explorar a natureza, transcurso e a cinética do processo de degradação e estabelecer por quanto tempo se espera que o produto possa conservar a constituição original e permanecer em conformidade com os padrões de pureza, qualidade e potência.

O processo de degradação pode ser devido a fatores de natureza física, química e biológica. Quando os medicamentos são degradados por alterações físicas, estas mudanças podem ser detectadas facilmente e os ensaios a serem efetuados são relativamente simples. Quando a degradação é devida a decomposição química ou biológica, o problema da detecção é muito mais complicado. É muito importante, nestes casos, que se pesquisem e se padronizem métodos de doseamento muito específicos e sensíveis, de maneira a que se possa distinguir, sem sombra de dúvidas, o fármaco intacto de seus produtos de decomposição. As mesmas características são exigidas dos métodos para a análise dos produtos de degradação.

Os estudos de estabilidade de medicamentos são complexos, pois, normalmente, há formação contínua de produtos de decomposição, em proporções sempre crescentes. Nestas condições, a análise de medicamentos, em alto grau de decomposição, requer métodos muito mais discriminativos em relação aos empregados para análises

em Controle de Qualidade.

Entre os processos de degradação mais conhecidos está a quebra hidrolítica do grupamento éster fenólico da aspirina, que na presença de umidade dá origem ao ácido acético e ao ácido salicílico. A hidrólise se processa tanto em meio ácido, como neutro ou alcalino. Tal sensibilidade à quebra hidrolítica é observada em todos os ésteres fenólicos. Os ésteres de alcóois são mais estáveis, mas também são susceptíveis à hidrólise, especialmente em meio alcalino. Os ésteres de alcalóides são também vulneráveis à saponificação. Os esteróides são quase tão sensíveis à hidrólise quanto os ésteres fenólicos. As amidas são geralmente bem mais estáveis do que os ésteres, em sistemas aquosos.

Na fotólise de algumas substâncias, tais como a estrona e os corticóides, é necessária exposição à intensa irradiação ultravioleta. No entanto, a luz do dia, algumas vezes, induz a degradação oxidativa de vários medicamentos, como é o caso da reserpina ou de preparações que a contém. A racemização ou inversão de substâncias opticamente ativas em solução é uma possibilidade sempre presente, independentemente da exposição da substância à luz.

Dentre os compostos orgânicos mais vulneráveis ao ataque oxidativo estão os que contêm ligações insaturadas.

das, funções aldeído, hidroxilas fenólicas livres e grupos amínicos aromáticos. Moléculas contendo dois ou mais destes grupos são particularmente vulneráveis à oxidação. Devido a esses fatos, em muitas formulações, são adicionados antioxidantes.

Várias evidências revelam a necessidade de se estabelecer ensaios discriminativos, capazes de diferenciar princípios ativos intactos, de seus produtos de decomposição. Para tanto, vários métodos analíticos podem ser empregados.

Um método de ensaio para estudos de estabilidade deve ser definido como um procedimento que nos leva à determinação seletiva do princípio ativo na presença de seus produtos de decomposição. A maioria dos princípios ativos são substâncias orgânicas muito puras, cuja estabilidade depende das condições normais de armazenagem. A estabilidade pode ser prevista pela observação da estrutura química e das propriedades físicas e químicas da substância.

Deve ainda ser lembrado que a formulação farmacêutica pode ser comparada como contaminação deliberada do princípio ativo. Nesta formulação são visadas a uniformidade, a conveniência das doses, a identidade do produto e as propriedades físicas, de tal maneira que o mesmo possa ser produzido em grande quantidade.

de e enviado para o comércio.

Com poucas exceções, os métodos de análise de medicamentos são combinações entre operações para preparação da amostra e posterior medida quantitativa. A preparação das amostras pode, em alguns casos, ser muito simples, como a dissolução do princípio ativo contido numa formulação sólida, seguida de separação por filtração dos excipientes insolúveis. No entanto, como acontece na maioria dos casos, é muito mais complexa. A medida quantitativa pode ser também muito simples, como por exemplo, a pesagem de precipitado ou requerer técnica trabalhosa, instrumentação cara e sofisticada.

A seletividade do método analítico escolhido deve ser intimamente relacionada com a eficiência da operação de preparação da amostra e consequente separação do princípio ativo que está sendo analisado. O método de análise deve ser, portanto, considerado como um todo (30, 38, 132).

A Organização Mundial da Saúde demonstra grande interesse em estudos de estabilidade de medicamentos, principalmente em países de clima tropical. O sucesso destes programas está relacionado à produção, análise e distribuição dos medicamentos. Todos estes ítems estão intimamente ligados ao Controle de Qualidade.

Independentemente dos objetivos visados no pre -

sente trabalho, a maior preocupação foi no sentido do estabelecimento da metodologia analítica que deveria reunir características particulares. Esta metodologia, além de ser adequada para a análise quantitativa dos componentes dos sais de reidratação oral, deveria também ser apropriada para o emprego em países em desenvolvimento, onde os recursos técnicos e, principalmente, financeiros não são muito eficientes. Em função dos resultados analíticos fornecidos pelos métodos empregados é que está sendo desenvolvido todo o programa de produção, acondicionamento, armazenagem e distribuição dos SRO. SIEWERT & GNEKOW (183) publicaram recentemente estudos relativos ao material de embalagem para os SRO e chegaram à conclusão de que, embora a seleção da embalagem apropriada dependa das condições regionais, o polietileno parece ser aceitável em todos os casos.

O primeiro passo da pesquisa foi o levantamento bibliográfico, feito com a finalidade de se obter o maior número possível de informações, principalmente com referência aos métodos de análise empregados para a determinação do HMF e aos estudos de decomposição da glicose.

Para a execução do trabalho foi feito um planejamento, cuja primeira etapa foi a preparação e o tratamento das amostras. Era muito importante que estas

amostras fossem homogêneas, portanto, cuidados especiais foram tomados com relação à mistura dos componentes. Depois de alguns testes, verificou-se que o material de acondicionamento que melhor atenderia às necessidades e às condições da pesquisa a ser efetuada, seriam ampolas de injetáveis. As amostras dos SRO foram nelas acondicionadas e, desta maneira, poder-se-ia ter a certeza de que não haveria perda de material durante os 360 dias, período previsto para a realização da pesquisa.

Como os estudos deveriam ser feitos mantendo as amostras em ambiente de clima tropical, alguns testes foram feitos para estabelecer-se o teor de umidade mais adequado. Após algumas experiências, verificou-se que o teor de água mais apropriado seria de 10%, isto porque, embora em níveis menores ocorra decomposição da glicose, foi observado que não seria suficiente para a avaliação mais nítida da degradação. Por outro lado, quando o teor de umidade é maior do que 10%, as amostras tornam-se pastosas e as operações analíticas são dificultadas. Além disso, na prática, este nível de umidade é raramente ultrapassado.

Dentre as temperaturas estudadas para manter as amostras foi notado, com base nos resultados preliminares dos ensaios com glicose, que 50°C seria a temperatura mais indicada para as observações analíticas;

mesmo assim, séries de amostras foram mantidas à temperatura ambiente, a 37°C e a 80°C.

A segunda etapa do trabalho foi a seleção e o emprego dos métodos de análise. Foram experimentados alguns métodos com a finalidade de selecionar o mais conveniente, para cada componente da formulação, adaptando-o para a análise das amostras.

Para a análise do HMF formado nas amostras de SRO foram feitas tentativas para a determinação espectrofotométrica no ultravioleta que não foram bem sucedidas, por tratarem-se de amostras complexas. No entanto, soluções aquosas de glicose pura, empregadas para nutrição intravenosa, podem ser analisadas desta maneira (140).

Na análise das amostras de SRO, submetidas a 50°C durante algum tempo, não ficou evidente o pico de máxima absorção em 284 nm, que é característico do HMF (41, 48, 108, 150, 173, 178, 190, 192, 216). Em todos os casos foi observado um pico em 270 nm. Provavelmente, este deslocamento foi devido a outros produtos que se formaram no processo de decomposição (169).

A presença destes produtos de decomposição não identificados poderia explicar o insucesso das tentativas de análise do HMF, empregando-se a espectrofotometria no ultravioleta, como nos métodos de WHITE

JUNIOR (208) e de DHAR & ROY (46).

A glicose, a frutose e a manose não apresentam picos na região do ultravioleta e as amostras de SRO mantidas à temperatura ambiente não apresentaram o pico em 270 nm; portanto, este pico que apareceu na análise das amostras aquecidas não poderia ser da frutose e nem da manose, oses epímeras da glicose que, talvez, pudessem estar presentes nos primeiros estágios de decomposição.

O método escolhido para a determinação do HMF, após estudos preliminares, foi o descrito por KEENEY & BASSETTE (97), inicialmente empregado para a determinação do HMF no leite. A precisão, para o método com ácido oxálico e aquecimento prévio a refluxo, foi de 0,04% e, para o método sem ácido oxálico e sem aquecimento prévio a refluxo, foi de 0,01%. Os testes de recuperação efetuados com amostras dos SRO apresentaram resultados de 97,39% e 102,06% para os métodos com e sem ácido oxálico, respectivamente, valores compatíveis com as exigências dos critérios adotados em Controle de Qualidade de Medicamentos. Estabelecidas as condições ideais e feita a padronização, o método foi aplicado com bons resultados, em todas as amostras analisadas. A vantagem do método é que se pode determinar a quantidade de HMF, potencial ou livre, existente nas amostras.

É importante lembrar que na experiência efetuada aquecendo-se glicose pura com ácido oxálico, nas condições em que foram feitas as análises, não se obteve reação positiva para HMF. Por este fato, foi descartada a possibilidade da glicose, contida nas amostras dos SRO, reagir com o ácido oxálico e formar HMF, o que poderia dar origem a resultados errôneos.

Os resultados das análises das amostras dos SRO que estão apresentados nas TABELAS 13 - 16 mostram claramente que há grande diferença entre a porcentagem de degradação da glicose e a porcentagem de HMF formado; portanto, é admissível o fato de que vários outros produtos se formam durante a degradação. Em todos os casos ficou evidente, também, que a porcentagem de HMF potencial é sempre bem maior do que a livre. Isto significa que intermediários anteriores à fase de formação de HMF podem, quando aquecidos com ácido oxálico, dar origem a este produto. Deve ser ressaltado que a umidade influiu positivamente na formação do HMF. Nas amostras contendo bicarbonato de sódio o teor de HMF foi bem maior do que nas amostras contendo citrato de sódio.

Como pode ser observado, o HMF não é evidentemente o único produto de decomposição das hexoses, no nosso caso a glicose; mas sua determinação quantitativa em medicamentos e alimentos é muito importante, pois altas concentrações indicam que o produto está altera

do. Sua determinação consta também das monografias oficiais, isto é, das Farmacopéias. É por este motivo que demos ênfase na parte analítica para determinação deste produto nos SRO, cuja estabilidade nos propusemos a estudar.

A glicose contida nas formulações foi analisada sempre por dois métodos, o iodométrico e o enzimático. Observou-se que, com o passar do tempo, outras substâncias redutoras poderiam estar sendo formadas pela degradação e, portanto, o método iodométrico poderia dar origem a resultados mais altos do que os reais, isto é, poder-se-ia estar determinando juntamente com a glicose, outras substâncias redutoras, já que este não é um método específico para a glicose. Constatou-se, de fato, que os valores obtidos como resultados das análises da glicose empregando o método enzimático eram sempre mais baixos do que os obtidos com o método iodométrico. No método enzimático não houve interferência dos outros componentes da formulação. A precisão do método foi de 0,04% e a porcentagem de recuperação da glicose, na amostra de SRO contendo bicarbonato de sódio, foi de 98,12% e, na amostra de SRO contendo citrato de sódio, 101,59%.

Nas análises das amostras dos SRO, o teor de glicose em função do tempo de permanência sob aquecimento a 50°C como também o nível de umidade, sofreu decréscimo

mo muito acentuado. A substituição do bicarbonato de sódio pelo citrato de sódio conduziu a resultados muito favoráveis, isto é, o decréscimo da quantidade de glicose foi muito menor.

O limite de HMF admissível nas amostras de SRO pode ser estabelecido considerando-se os valores encontrados nas análises. Pelas TABELAS 13 - 16, verifica-se que os teores de HMF potencial, portanto, análises com ácido oxálico, são as mais indicadas para o objetivo visado; assim, teor de HMF de 0,01% corresponde a um decréscimo de cerca de 10,0% de glicose. Este valor poderia servir de limite máximo permitido para o teor de HMF em amostras de SRO, analisado pelo método indicado.

As alterações que as amostras de SRO sofrem quando acondicionadas em ampolas fechadas, mantidas a 50°C, são acompanhadas de abaixamento progressivo do valor do pH. A proporção desta diminuição está diretamente relacionada com a porcentagem de degradação da glicose; inclusive, é mais influenciada também pelo teor de unidade e pelo bicarbonato de sódio, comparativamente ao citrato de sódio. Esta variação do pH pode ser atribuída à presença de compostos de natureza ácida, formados durante o processo.

Em ensaios preliminares foi verificado que havia

queda do teor de bicarbonato de sódio contido nas formulações dos SRO; entretanto, o escurecimento das amostras após certo período de aquecimento a 50°C dificultava a observação da viragem do indicador, por ocasião da análise pelo método titulométrico. Nestas condições, foi necessário estudar uma maneira para contornar o problema. Após verificar que o carvão ativado não adsorvia o bicarbonato de sódio em solução de teor conhecido, as soluções das amostras dos SRO foram clarificadas pelo tratamento com este adsorvente, antes de serem tituladas. Com este procedimento foi possível determinar o teor de bicarbonato de sódio nas amostras.

Para a determinação do citrato de sódio, embora se tenha padronizado dois métodos titulométricos, um em meio não aquoso e outro em meio aquoso, deu-se preferência à titulação em meio aquoso, por motivos econômicos e de segurança, apesar deste método ter apresentado menor precisão. Em ambos os métodos, não houve interferência dos outros componentes presentes nas formulações.

A determinação da umidade nas amostras A e C recém-preparadas teve por objetivo a avaliação do teor inicial. Nestas amostras foi empregada glicose anidra e as operações para preparação dos pós não deveriam provocar aumento exagerado do teor de água. De fato, teores encontrados estão próximos dos limites previstos para a glicose anidra. Devido à composição das

amostras, o método de Karl-Fischer foi o mais adequado para esta análise.

Para complementação dos dados analíticos foram estudados alguns sistemas de cromatografia em camada delgada. Empregando-se a fase móvel A (etanol-cloro - fórmio-hidróxido de amônio concentrado-água(5:3:1,5:0,5)) obtiveram-se boas separações; no entanto, na mancha principal das amostras cujo R_f corresponde ao da glicose, podem existir alguns produtos de decomposição que não puderam ser separados. Entretanto, este meio foi favorável pois foi atingido o objetivo principal que era o de detectar o HMF, cujo R_f é bem diferente do da glicose. Desta maneira pode-se identificar este produto de decomposição desde que ele esteja presente nas amostras, em quantidades suficientes. Os melhores resultados foram obtidos com o revelador *p*-anisaldeído - ácido sulfúrico e portanto, esta solução foi adotada como revelador em todos os outros meios experimentados.

Utilizando-se a fase móvel B (benzeno - metanol (5:2)), foi possível também detectar-se nitidamente a presença do HMF padrão.

As amostras empregadas na análise não tinham ainda quantidades de HMF detectáveis mas, adicionando - se HMF numa delas, pôde-se constatar sua presença.

No meio C (benzeno-metanol (9:1)), a detecção do

HMF foi bem característica, pois todas as outras substâncias padrão, com exceção do ácido levulínico, permaneceram na origem. Em vista dos resultados obtidos com esta fase móvel, foi efetuada uma experiência, a partir da qual foi detectado o HMF formado numa amostra degradada, mantida durante 4 meses a 50°C, contendo bicarbonato de sódio, glicose anidra e os outros componentes. Esta amostra foi aquecida com ácido oxálico durante 1 hora, com a finalidade de se detectar a quantidade de HMF potencial. A solução resultante foi aplicada diretamente na placa em diferentes concentrações. Foi feita também uma extração desta solução com clorofórmio. O solvente foi evaporado e o resíduo aplicado na placa. Por comparação com padrão de HMF foi constatada sua presença, tanto no extrato clorofórmico como na solução aquosa, mas neste caso só quando em alta concentração.

A fase móvel D (acetato de etila-isopropanol-água (65:23:12)) foi testada com a finalidade de se detectar a presença de outras oses que poderiam formar-se por epimerização da glicose (frutose e manose), durante os primeiros estágios da degradação. Este meio foi também muito eficiente para a separação do HMF mas, não foi possível, no entanto, identificar outra ose na mancha principal.

Pela avaliação dos resultados analíticos obtidos

empregando-se todos os métodos selecionados e padronizados, pode-se verificar que a pesquisa atingiu os objetivos propostos. No entanto, neste mesmo campo, abre-se a perspectiva de novos trabalhos. No início da pesquisa foram preparadas e armazenadas quatro séries de amostras contendo bicarbonato de sódio que foram mantidas à temperatura ambiente, a 37°C, a 50°C e a 80°C. Os resultados das análises destas amostras não foram aqui apresentados, pois pretende-se completar estes estudos com a finalidade de se obter mais dados para estudar a cinética da decomposição da glicose.

A determinação de outros produtos de decomposição da glicose poderá constituir outra linha de pesquisa a ser desenvolvida, exigindo assim a seleção e padronização de outros métodos analíticos.

Outro ponto que merece destaque foi a bem sucedida padronização de métodos analíticos com as características solicitadas pela OMS, ou sejam, métodos simples, de fácil execução, precisos, exatos e seletivos.

Capítulo VII

7. CONCLUSÕES

Nas condições em que foi efetuada a pesquisa e pelos dados experimentais obtidos, concluiu-se que:

1. A espectrofotometria no ultravioleta não foi adequada para a determinação do HMF nas amostras dos SRO.
2. O método colorimétrico com ácido 2-tiobarbitúrico, com ou sem aquecimento prévio a refluxo com ácido oxálico, permitiu a análise do HMF potencial ou livre, nas amostras dos SRO. A precisão foi 0,04% e de 0,01% para o método com e sem ácido oxálico, respectivamente.
3. Para a análise da glicose, o método colorimétrico enzimático deu origem a resultados mais confiáveis do que os obtidos pelo método iodométrico.
4. O tratamento das amostras com carvão ativado, para a análise do bicarbonato de sódio, permitiu a aplicação do método titulométrico com ácido sulfúrico 0,1N, e os resultados foram satisfatórios.
5. Os dois métodos padronizados para a análise do citrato de sódio forneceram bons resultados; mas, por

razões econômicas e de segurança, preferiu-se adotar o método em meio aquoso.

6. As amostras dos SRO nas quais foram adicionados 10% de água sofreram decomposição mais acentuada da glicose do que as correspondentes que continham 1,88% e 1,20%.

7. O pH das soluções das amostras que, inicialmente era de 8,3 para as amostras contendo bicarbonato de sódio e de 7,2 para as amostras com citrato de sódio, sofreu abaixamento à medida que as amostras iam se decompondo.

8. A separação cromatográfica em camada delgada, nos sistemas testados, é adequada para a detecção do HMF, quando presente nas amostras.

9. Pelos resultados obtidos nas análises de todas as amostras verificou-se que aquelas que continham citrato de sódio no lugar de bicarbonato de sódio foram mais estáveis, durante os 360 dias em que foram observadas e analisadas.

10. A preparação dos SRO deve ser executada de maneira tal que a formulação final contenha teor de umidade menor do que 1%. O acondicionamento e a embalagem

devem ser realizados em ambientes secos e as embalagens testadas, quanto à vedação completa. No transporte e na armazenagem, a temperatura deve ser a menor possível, de preferência sob refrigeração.

11. Devem ser estabelecidos limites para o HMF, pois sua presença nas amostras indica a decomposição da glicose no medicamento. Este limite poderá ser de 0,01%, com relação ao HMF potencial, analisando-se as amostras dos SRO pelo método colorimétrico com ácido 2-tiobarbitúrico e aquecimento prévio a refluxo com ácido oxálico.

Resumo

RESUMO

A Organização Mundial da Saúde (OMS) desenvolve um programa de distribuição de sais de reidratação oral (SRO), principalmente para países de clima tropical, nos quais é grave o problema das enfermidades diarreicas. Esta pesquisa faz parte de amplo estudo, envolvendo vários países, coordenada pela OMS, que tem como objetivo a padronização da metodologia analítica para a determinação dos componentes da mistura reidratante e a verificação da estabilidade destas preparações.

Foram preparadas quatro formulações dos SRO, uma contendo bicarbonato de sódio, cloreto de sódio, cloreto de potássio e glicose anidra, e outra contendo os mesmos componentes, mas citrato de sódio no lugar de bicarbonato de sódio. As outras duas eram iguais às anteriores, mas contendo aproximadamente 10% de água. As amostras foram ampoladas e submetidas a condições adversas de armazenagem.

Após pesquisa e seleção de métodos analíticos para a determinação dos componentes das formulações e para o 5-hidroximetilfurfural (HMF), um dos principais produtos de decomposição da glicose, foi efetuada a padronização dos métodos escolhidos. Todos os métodos

analíticos selecionados apresentaram resultados confiáveis. A determinação do HMF nas amostras foi feita pelo método colorimétrico com ácido 2-tiobarbitúrico, com ou sem aquecimento com ácido oxálico. A precisão do método colorimétrico com ácido oxálico e aquecimento prévio a refluxo foi de 0,04% e a do sem ácido oxálico e sem aquecimento foi de 0,01%.

Para a determinação da glicose nas formulações foram empregados dois métodos, o iodométrico e o colorimétrico enzimático. A precisão deste último foi de 0,04%.

O bicarbonato de sódio e o citrato de sódio foram analisados por métodos titulométricos. A precisão dos métodos para o doseamento do citrato de sódio foi de 2,50%, empregando-se meio aquoso e de 0,50% e 1,00%, em meio não aquoso, utilizando-se como indicadores α -naftolbenzeína e cristal violeta, respectivamente.

Foi também empregada a cromatografia em camada delgada para detecção do HMF e outros produtos contidos nas amostras.

A partir dos resultados analíticos obtidos com as amostras analisadas, mantidas a 50°C durante um período de 360 dias, chegou-se à conclusão de que as formulações contendo citrato de sódio são mais estáveis do que as mesmas contendo bicarbonato de sódio; além

disto, em ambos os casos, as que contêm menos água são mais estáveis.

Foram propostos limites para o HMF e sugeridas as condições ideais de preparação, acondicionamento, em balagem, transporte e armazenagem para estes medicamentos.

Summary

SUMMARY

The World Health Organization (WHO) has been developing a programme of distribution of oral rehydration salts (ORS), chiefly in tropical climate countries where the problem of diarrhoeal diseases is serious. The present research is part of a large study involving many countries, coordinated by WHO, in order to carry out some studies about the analytical methodology for determination of rehydration mixture components and also to investigate the stability of these preparations.

Four formulations of ORS were prepared as follows: the first one contained sodium bicarbonate, sodium chloride, potassium chloride and anhydrous glucose; the second one contained the same components, but sodium citrate instead of sodium bicarbonate. The other two had the same composition of the previous mentioned ones, but in addition they contained approximately 10% of water. The samples were ampouled and submitted to adverse conditions of storage.

After searching and selecting the analytical methods for the determination of either the formulation components and the 5-hydroxymethylfurfural (HMF), one

of the main products of glucose degradation, the standardization of the selected methods was obtained. All these analytical methods presented reliable results.

The HMF determination in the samples was made by the colorimetric method with 2-thiobarbituric acid, either with or without heating with oxalic acid. The precision of the colorimetric method with oxalic acid and heating was 0.04% and the precision of the method without oxalic acid was 0.01%.

For the determination of glucose in the formulations two methods were used: the iodometric and the enzymatic colorimetric method. The precision of the last mentioned one was 0.04%.

Sodium bicarbonate and sodium citrate were analysed by titrimetric methods. The precision of the methods for the determination of sodium citrate was 2.50%, using aqueous titration and 0.50% and 1.00% in non aqueous titration, with α -naphtholbenzein and crystal violet as indicators, respectively.

The thin-layer chromatography was also used to detect HMF and other products contained in the samples.

On the basis of all the results obtained by the analysis of the samples, maintained at 50°C during a period of 360 days, we concluded that the formulations

containing sodium citrate were more stable than those with sodium bicarbonate. In both cases, those containing less water were more stable.

The limits of HMF were determined and suggestions were made concerning the ideal conditions of preparation, packing, transportation and storage of these pharmaceutical preparations.

Referências Bibliográficas

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS^{*}

1. ADRIAN, J. - Nutritional and physiological consequences of the Maillard reaction. World Rev. Nutr. Diet., New York, 19:71-122, 1974.
2. AESCHBACHER, H.U.; CHAPPUIS, C.; MANGANEL, M.; AESCHBACH, R. - Investigation of Maillard products in bacterial mutagenicity test systems. Prog. Food Nutr. Sci., Oxford, 5(1-6):279-93, 1981. Apud: Chem. Abstr., Columbus, 96:121024b, 1982.
3. AESCHLIMANN, F.; BETHGE, P.O.; EGGERS, J.H. - Zur colorimetrie des Furfurols. II. Mitteilung. Die Reaktion mit Phenolen vom Resorcintypus. Fresenius'Z. Anal. Chem., Wiesbaden, 172:241-56, 1960.

^{*} De acordo com as normas preconizadas pela ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). As abreviaturas dos títulos de periódicos seguem o CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE SOURCE INDEX, Columbus, 1907-1979.

4. ALFONSO, F.C.; MARTIN, G.E.; DYER, R.H. - High pressure liquid chromatographic determination of 5-(hydroxymethyl)-2-furaldehyde in caramel solution. J. Assoc. Off. Anal. Chem., Washington, 63(6):1310-3, 1980.
5. ALLEN, B.H. & CHIN, H.B. - Rapid HPLC determination of hydroxymethylfurfural in tomato paste. J. Assoc. Off. Anal. Chem., Washington, 63(5): 1074-6, 1980.
6. ANET, E.F.L.J. - 3-Deoxyglycosuloses (3-deoxyglycosones) and the degradation of carbohydrates. Adv. Carbohydr. Chem., New York, 19:181-218, 1964.
7. ANET, E.F.L.J. - Proton exchange during the conversion of hexose into 5-hydroxymethyl-2-furaldehyde. Aust. J. Chem., Melbourne, 23(11): 2383-5, 1970.
8. ANGELICO, F. & COPPOLA, A. - Sull'ossimetilfurfurolo. Gazz. Chim. Ital., Roma, 42(2):583-9, 1912.
9. ARKHIPOVICH, N.A. & CHERNYAKOVA, T.Ya. - Determination of the quantity of dehydration products of monosaccharides in the form of hydroxymethylfurfural and its derivatives. Sakh. Promst., Moscow, 3: 45-7, 1982. Apud: Chem. Abstr., Columbus, 96: 200019g, 1982.

10. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS.
Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 13.ed.
Washington, 1980. p.515.
11. BALTES, J.; SCHWEITZER, D.; WIERTZ, P. - Die polarographische Bestimmung von Oxymethylfurfurol on Honig und Kunsthonig. Fette Seifen Anstrichm., Hamburg, 55(7):457-61, 1953.
12. BANERJEE, N.; BHATNAGAR, R.; VISWANATHAN, L. - Development of resistance in Saccharomyces cerevisiae against inhibitory effects of browning reaction products. Enzyme Microb. Technol., Haywards Heath, 3(1):24-8, 1981. Apud: Chem. Abstr., Columbus, 94:99676a, 1981.
13. BARRY, R.H.; WEISS, M.; JOHNSON, J.B.; DeRITTER, E. - Stability of phenylpropanolamine hydrochloride in liquid formulations containing sugars. J. Pharm. Sci., Washington, 71(1):116-8, 1982.
14. BATCHELOR, T.M. & STEVENS, H.M. - Identification tests for acidic and neutral compounds extracted from putrefied viscera. J. Forensic Sci. Soc., London, 18(3-4):209-29, 1978. Apud: Chem. Abstr., Columbus, 91:187453u, 1979.

15. BATE-SMITH, E.C. & WESTALL, R.C. - Chromatographic behavior and chemical structure. I. Some naturally occurring phenolic substances. Biochim. Biophys. Acta, Amsterdam, 4:427-40, 1950.
16. BATISTA, M.T. & BAETA, M.L. - Dosagem colorimétrica de glúcidos. Bol. Fac. Farm. Coimbra, 2(1): 35-6, 1977.
17. BERGDOLL, M.S. & HOLMES, E. - The heating of sucrose solutions. I. The relationship of 5-(hydroxymethyl)-furfural to color formation. Food Res., Champaign, 16:50-6, 1951.
18. BERK, Z. - Braverman's introduction to the biochemistry of foods. Amsterdam, Elsevier, 1976. p.149-67.
19. BERRY, R.E. & TATUM, J.H. - 5-Hydroxymethylfurfural in stored foam-mat orange powders. J. Agric. Food Chem., Washington, 13(6):588-90, 1965.
20. BRICOUT, J.; KOZIET, Y.; DE CARPENTRIE, B. - Application de la chromatographie liquide liquide à haute performance à l'analyse des boissons. Ann. Nutr. Aliment., Paris, 32(5):947-55, 1978.

21. BRITISH pharmacopoeia. London, Her Majesty's Stationery Office, 1980. v.1, p.145.
22. BRITISH pharmacopoeia. London, Her Majesty's Stationery Office, 1980. v.1, p.406-7.
23. BRITISH pharmacopoeia. London, Her Majesty's Stationery Office, 1980. v.1, p.410.
24. BRITISH pharmacopoeia. London, Her Majesty's Stationery Office, 1980. v.2, p.664-5.
25. BRITISH pharmacopoeia. London, Her Majesty's Stationery Office, 1980. v.2, p.710-1.
26. BRITISH pharmacopoeia. London, Her Majesty's Stationery Office, 1980. v.2, p.A76.
27. BRITISH pharmacopoeia. London, Her Majesty's Stationery Office, 1980. v.2, p.821, A89.
28. BROWNLEY JR., C.A. & LACHMAN, L. - Browning of spray-processed lactose. J. Pharm. Sci., Washington, 53(4):452-4, 1964.
29. BUCHBAUER, G. - Zur Analytik pharmazeutisch wichtiger organischer Säuren. 4. Mitteilung. Sci. Pharm., Vienna, 40(4):263-6, 1972.

30. CHAFETZ, L. - Stability - indicating assay methods for drugs and their dosage forms. J. Pharm. Sci., Washington, 60:335-45, 1971.
31. CHANG, A.Y. & NOBLE, R.E. - 5-Hydroxymethylfurfural-forming proteins in the renal glomeruli of control and streptozotocin-diabetic rats. Life Sci., Elmsford, 26(16):1329-33, 1980.
32. CHARPENTIER, C. - Dosage de l'hydroxymethylfurfural (H.M.F.) dans les boissons fermentées, alcools et jus de fruits par spectrophotométrie d'absorption en U.V. Ann. Falsif. Expert. Chim., Paris, 687:271-86, 1969.
33. CHRISTOFFERSON, K. - Separations of aldehydes by means of ion-exchange chromatography on bisulfite columns. Anal. Chim. Acta, Amsterdam, 33(3): 303-10, 1965.
34. CHUNDURY, D. & SZMANT, H.H. - Preparation of polymeric building blocks from 5-hydroxymethyl- and 5-chloromethylfurfuraldehyde. Ind. Eng. Chem. Prod. Res. Dev., Washington, 20(1):158-63, 1981.
35. CLIFFORD, M.N. - Specificity of acidic phloroglucinol reagents. J. Chromatogr., Amsterdam, 94:321-4, 1974.

36. CONNORS, K.A. - A textbook of pharmaceutical analysis. New York, Wiley, 1967. p.250-3.
37. CONNORS, K.A. - A textbook of pharmaceutical analysis. New York, Wiley, 1967. p.514-5.
38. CONNORS, K.A.; AMIDON, G.L.; KENNON, L. - Chemical stability of pharmaceuticals: a handbook for pharmacists. New York, Wiley, 1979.
39. COPE, A.C. - 5-Hydroxymethylfurfural. US. 2,917, 520, Dec. 15, 1959. Apud: Chem. Abstr., Columbus, 54:P8851d, 1960.
40. CREMONESI, P.; BOVARA, R.; FOCHER, B.; D'ANGIURO, L. - A rapid enzymatic method for determining glucose in hydrolyzed polysaccharides. Cellul. Chem. Technol., Iasi, 11:341-7, 1977.
41. CROWELL, E.P.; POWELL, W.A.; VARSEL, C.J. - Characterization and determination of aldehydes by the ultraviolet spectral changes resulting from acetal formation. Anal. Chem., Washington, 35: 184-9, 1963.
42. CZOK, G. - Verträglichkeit von 5-Hydroxymethylfurfural (HMF). 2. Mitteilung: Pharmakologische Wirkungen. Z. Ernaehrungswiss, Darmstadt, 10(2):103-10, 1970.

43. DAVIS, D.P. & PALAMAND, S.R. - Application of high-performance liquid chromatography to the solution of flavour problems in beer caused by low-volatile compounds. J. Am. Soc. Brew. Chem., St. Paul, 34(2):55-9, 1976.
44. DE LA BURDE, R.; JARREL, J.E.; BAVLEY, A. - Column chromatographic method for separation of carbohydrate degradation products. Separation of furan derivatives on aluminum oxide. Anal. Chem., Washington, 35(10):1535-6, 1963.
45. DERIAZ, R.E.; STACEY, M.; TEECE, E.G.; WIGGINS, L.F.- Deoxy-sugars. Part I. The Dische reaction for 2-deoxypentoses. J. Chem. Soc., London, 1222-32, 1949.
46. DHAR, A.K. & ROY, B.R. - Determination of 5-hydroxymethyl-2-furaldehyde in honey. Analyst, London, 97:981-5, 1972.
47. DICIONÁRIO de especialidades farmacêuticas. 11.ed. Rio de Janeiro, Editora de Publicações Médicas, 1982/3.
48. DIEMAIR, W. & JURY, E. - Beitrag zur Veranderlichkeit und Bildung von 5-Hydroxymethylfurfuro1. Z. Lebensm.-Unter.-Forsch., Munich, 113(3):189-97, 1960.

49. DISCHE, Z. - "Über einige neue charakteristische Farbreaktionen der Thymonukleinsäure und eine Mikromethode zur Bestimmung derselben in tierischen Organen mit Hilfe dieser Reaktionen. Mikrochemie, Vienna, 8(2):4-32, 1930.
50. DOYLE, R.J. & BURGAN, H.M. - Use of ultraviolet absorption for determination of sugars. Anal. Biochem., Baltimore, 17:171-4, 1966.
51. ERDMANN, E. - "Über ω -Oxy-symm-methyl-furfurol und seine Beziehungen zu Cellulose. Ber. Dtsch. Chem. Ges., Heidelberg, 43:2391-8, 1910.
52. ERDMANN, E. & SCHAEFER, C. - Trockne Destillation von Cellulose. Ber. Dtsch. Chem. Ges., Heidelberg, 43:2398-406, 1910.
53. FARMACOPÉIA brasileira. 3.ed. São Paulo, Organização Andrei, 1977. p.149-51.
54. FARMACOPÉIA brasileira. 3.ed. São Paulo, Organização Andrei, 1977. p.215-6.
55. FARMACOPÉIA brasileira. 3.ed. São Paulo, Organização Andrei, 1977. p.373-5.

56. FARMACOPÉIA dos Estados Unidos do Brasil. 2.ed.
São Paulo, Siqueira, 1959. p.225-6.
57. FARMACOPÉIA dos Estados Unidos do Brasil. 2.ed.
São Paulo, Siqueira, 1959. p.1107.
58. FEDER, E. - A proposed test for factitious invert
sugar in honey. Z. Nahr.- Genussn., Berlin,
22:412, 1911. Apud: Chem. Abstr., Columbus, 6:
520, 1912.
59. FIEHE, J. - A reaction for recognizing and distin
guishing artificial honey from natural honey.
Z. Nahr.- Genussn., Berlin, 16:75-7, 1909.
Apud: Chem. Abstr., Columbus, 3:83, 1909.
60. FLECHE, G.; GASET, A.; GORRICHON, J.P.; TRUCHOT, E.;
SICARD, P. - 5-Hydroxymethylfurfural. Fr. Demande
FR 2,464,260 (C1.CO7D307/46), 06 Mar. 1981,
Appl. 79/22,251, 05 Sep. 1979; 16 pp. Apud: Chem.
Abstr., Columbus, 96:P6552k, 1982.
61. FLORIN, I.; RUTBERG, L.; CURVALL, M.; ENZELL, C.R. -
Screening of tobacco smoke constituents for muta
genicity using the Ames'test. Toxicology,
Amsterdam, 15(3):219-32, 1980.

62. FONT, A.M. - El pardeamiento y color de los alimentos. Alimentaria, Madrid, 19(136):13-30, 1982.
63. FRANZKE, C. & IWAINSKY, H. - "Über den Nachweis und die Bestimmung von Oxymethylfurfurol in Honigen und Kunsthonigen. Fette Seifen Anstrichm., Hamburg, 58(10):859-62, 1956.
64. FUKUCHI, H.; TSUKIAI, S.; OKADA, K.; TANIMOTO, T.- Thermal degradation products of a glucose solution. Masui To Sosei, Hiroshima, 13(1): 3-10, 1977. Apud: Chem. Abstr., Columbus, 88: 79025k, 1978.
65. GARBER, J.D. & JONES, R.E. - 5-(Hydroxymethyl) furfural from carbohydrates. U.S. 3,483,228 (Cl. 260-347.8; C 07d), 09 Dec. 1969, Appl. 26 Sep. 1963 - 18 Oct. 1966; 5pp. Apud: Chem. Abstr., Columbus, 72:P90257c, 1970.
66. GARRATT, D.C. - The quantitative analysis of drugs. 3.ed. London, Chapman & Hall, 1964. p.183, 792.
67. GARRATT, D.C. - The quantitative analysis of drugs. 3.ed. London, Chapman & Hall, 1964. p.602-7.

68. GARRETT, E.R. & BLANCH, J. - Sensitive direct spectrophotometric determination of fructose and sucrose after acid degradation. Anal. Chem., Washington, 39:1109-13, 1967.
69. GARRETT, E.R. & YOUNG, J.F. - Spectrophotometric analysis of glucose and mixtures of glucose, fructose, and sucrose. J. Pharm. Sci., Washington, 58(10):1224-7, 1969.
70. GARVES, K. - Dehydration and oxidation of cellulose hydrolysis products in acidic solution. J. Wood Chem. Technol., New York, 1(2):223-35, 1981.
Apud: Chem. Abstr., Columbus, 96:201446f, 1982.
71. GASET, A.; GORRICHON, J.P.; TRUCHOT, E. - Recent developments in processes for obtaining 5-hydroxymethyl-2-furancarboxaldehyde. Inf. Chim., Paris, 212:179-84, 1981. Apud: Chem. Abstr., Columbus, 95:61867w, 1981.
72. GAUTIER, J.A.; RENAULT, J.; ALVAREZ, M.J. - Recherche du sucre interverti dans le miel. Deuxième partie: étude critique de la chromatographie sur papier. Ann. Falsif. Expert. Chim., Paris, 54(629):253-60, 1961.

73. GAUTIER, J.A.; RENAULT, J.; ALVAREZ, M.J. - Recherche du sucre interverti dans le miel. Troisième partie: étude de la spectrophotométrie d'absorption dans l'ultra-violet et conclusions. Ann. Falsif. Expert. Chim., Paris, 54(633/634):397-411, 1961.
74. GRAUER, A. - The reaction of carbohydrates and uronic acids with β -methylinole. Anal. Chim. Acta, Amsterdam, 8:426-8, 1953.
75. GUVEN, K.C. & OZOL, T. - Identification of geranic, n-caproic and levulinic acids by paper and thin-layer chromatography. Eczacilik Bul., Istanbul, 16(5):75-80, 1974. Apud: Chem. Abstr., Columbus, 82:118603v, 1975.
76. HAAS, V.A.; STADTMAN, E.R.; STADTMAN, F.H.; MACKINNEY, G. - Deterioration of dried fruits. I. The effect of sugars and of furfurals. J. Am. Chem. Soc., Washington, 70(11):3576-9, 1948.
77. HARRIS, D.W. & FEATHER, M.S. - Intramolecular C-2 $\rightarrow$ C-1 hydrogen transfer reactions during the conversion of aldoses to 2-furaldehydes. J. Org. Chem., Washington, 39(5):724-5, 1974.

78. HARRIS, D.W. & FEATHER, M.S. - An intramolecular hydrogen transfer during the conversion of D-glucose to 2-(hydroxyacetyl)-furan. Tetrahedron Lett., Oxford, 47:4813-6, 1972.
79. HARRIS, J.F.; SAEMAN, J.F.; ZOCH, L.L. - Preparation and properties of hydroxymethylfurfural. For. Prod. J., Madison, 10:125-8, 1960. Apud: Chem. Abstr., Columbus, 54:10322a, 1960.
80. HAWORTH, W.N. & JONES, W.G.M. - The conversion of sucrose into furan compounds. Part I. 5-Hydroxymethylfurfuraldehyde and some derivatives. J. Chem. Soc., London, pt. 2:667-70, 1944.
81. HAWORTH, W.N. & WIGGINS, L.F. - 5-(Hydroxymethyl)-2-furfural. Brit. 600,871, April 21, 1948. Apud: Chem. Abstr., Columbus, 42:P7340g, 1948.
82. HAWORTH, W.N. & WIGGINS, L.F. - 5-Hydroxymethyl-2-furfural. U.S. 2,498,918, Feb. 28, 1950. Apud: Chem. Abstr., Columbus, 44:P4508g, 1950.
83. HAWORTH, W.N. & WIGGINS, L.F. - Levulinic acid and 5-(hydroxymethyl)furfural. Brit. 591,858, Sept. 1, 1947. Apud: Chem. Abstr., Columbus, 42:P1317d, 1948.

84. HEIDEMANN, D.R. - Rapid, stability - indicating, high-pressure liquid chromatographic determination of theophylline, guaiafenesin, and benzoic acid in liquid and solid pharmaceutical dosage forms. J. Pharm. Sci., Washington, 68(4):530-2, 1979.
85. HEIMLICH, K.R. & MARTIN, A.N. - A kinetic study of glucose degradation in acid solution. J. Am. Pharm. Assoc. Sci. Ed., Washington, 49(9): 592-7, 1960.
86. HIGUCHI, T. & BROCHMANN-HANSEN, E. - Pharmaceutical analysis. New York, Interscience, 1961. p.31-48.
87. HIRAYAMA, H. & KUBOTA, T. - Spectrophotometric studies of organic compounds. III. Reaction products of D-glucose solution by sterilization. Jpn. J. Pharm. Chem., Osaka, 23:387-90, 1951. Apud: Chem. Abstr., Columbus, 46:4748h, 1952.
88. HODGE, J.E. - Browning reaction theories integrated in review. Dehydrated foods. Chemistry of browning reactions in model systems. J. Agric. Food Chem., Washington, 1(15):928-43, 1953.

89. HUNG, C.T.; SELKIRK, A.B.; TAYLOR, R.B. - A chromatographic quality control procedure based on HPLC for 5-hydroxymethylfurfural in autoclaved D-glucose infusion fluids. J. Clin. Hosp. Pharm., Oxford, 7:17-23, 1982.
90. HUNG, C.T. & TAYLOR, R.B. - Mechanism of retention of acidic solutes by octadecyl silica using quaternary ammonium pairing ions as ion exchangers. J. Chromatogr., Amsterdam, 202(3):333-45, 1980.
91. IZARD-VERCHÈRE, C. & VIEL, C. - Nouvelle méthode de dosage de l'hydroxyméthyl-5-furfural. Bull. Soc. Chim. Fr., Paris, 5:2089-90, 1972.
92. IZGÜ, E. & BAYKARA, T. - The solid state stability of oral rehydration salts. J. Clin. Hosp. Pharm., Oxford, 6(2):135-44, 1981.
93. JACIN, H.; SLANSKI, J.M.; MOSHY, R.J. - Quantitative determination of 5-hydroxymethyl-2-furaldehyde. J. Chromatogr., Amsterdam, 36:359-62, 1968.
94. JAYME, G. & SARTEN, P. - "Über die quantitative Bestimmung von Furfurol. Pentosen und Pentosanen. III. Mitteilung: Bestimmung von Methyl- und Oxymethylfurfurol. Biochem. Z., Berlin, 312: 78-88, 1942.

95. JELLUM, E.; BØRRESEN, H.C.; ELDJARN, L. - The presence of furan derivatives in patients receiving fructose - containing solutions intravenously. Clin. Chim. Acta, Amsterdam, 47:191-201, 1973.
96. JELLUM, E.; STOKKE, O.; ELDJARN, L. - Application of gas chromatography, mass spectrometry, and computer methods in clinical biochemistry. Anal. Chem., Washington, 45(7):1099-106, 1973.
97. KEENEY, M. & BASSETTE, R. - Detection of intermediate compounds in the early stages of browning reaction in milk products. J. Dairy Sci., Urbana, 42(1): 945-60, 1959.
98. KEENEY, M. & BASSETTE, R. - Rapid chemical changes in reconstituted dry milk. Science, Washington, 126(3272):511-2, 1957.
99. KIERMAYER, J. - Ueber ein Furfurollderivat aus "Lävulose. Chem. Ztg., Berlin, 19(43):1003-5, 1895.
100. KLIMMEK, R. & WEGER, N. - The effect of 5-hydroxy methylfurfural on respiration, circulation, blood gases and clino-chemical parameters in dogs. Wehrmed. Monatsschr., Munich, 22(2):44-7, 1978.
Apud: Chem. Abstr., Columbus, 89:36706m, 1978.

101. KOSTENKO, V.G. - Quantitative determination of furan aldehydes by high-performance liquid chromatography in aqueous media. J. Anal. Chem. USSR, New York, 33(9):1422-4, 1978.
102. KUSTER, B.F.M. - The influence of water concentration on the dehydration of D-fructose. Carbohydr. Res., Amsterdam, 54(2):177-83, 1977.
103. KUSTER, B.F.M. & LAURENS, J. - Preparation of 5-hydroxymethylfurfural. Part II. Dehydration of fructose in a tube reactor using polyethylene glycol as solvent. Staerke, Stuttgart, 29(5): 172-6, 1977. Apud: Chem. Abstr., Columbus, 87:54806g, 1977.
104. KUSTER, B.F.M. & TEBBENS, L.M. - Analytical procedures for studying the dehydration of D-fructose. Carbohydr. Res., Amsterdam, 54(2): 159-64, 1977.
105. KUSTER, B.F.M. & TEMMINK, H.M.G. - The influence of pH and weak-acid anions on the dehydration of D-fructose. Carbohydr. Res., Amsterdam, 54(2): 185-91, 1977.
106. KUSTER, B.F.M. & VAN DER BAAN, H.S. - The influence on the initial and catalyst concentrations on the dehydration of D-fructose. Carbohydr. Res., Amsterdam, 54(2):165-76, 1977.

107. KUSTER, B.F.M. & VAN DER STEEN, H.J.C. - Preparation of 5-hydroxymethylfurfural. Part I. Dehydration of fructose in a continuous stirred tank reactor. Staerke, Stuttgart, 29(3):99-103, 1977. Apud. Chem. Abstr., Columbus, 87:53501s, 1977.
108. LALUCE, C.; CARVALHO, A.; MOLINARI, R. - Método espectrofotométrico rápido e simples para a dosagem de cetossacarídeos. Eclética Quím., Araraquara, 1:7-18, 1976.
109. LANDUCCI, J.M. - Recherche sur les aldéhydes existant dans les gélatines (2^e Mémoire). Bull. Soc. Chim. Fr. Mem., Paris, pt.1:120-4, 1954.
110. LANDUCCI, J.M. - Recherche sur les aldéhydes existant dans les gélatines (3^e Mémoire). Bull. Soc. Chim. Fr. Mem., Paris, pt.1:124-7, 1954.
111. LANG, K. & BICKEL, H. - Untersuchungen über die Verträglichkeit von 5-Hydroxymethylfurfural (HMF). 3. Mitteilung: Prüfung auf cytotoxische Wirkungen an Hühnerembryonen - Fibroblasten. Z. Ernährungswiss., Darmstadt, 10(2):153-4, 1970.

112. LANG, K.; KIECKEBUSCH, W.; BÄSSLER, K.H., GRIEM, W.; CZOK, G. - Untersuchungen "über die Verträglichkeit von 5-Hydroxymethylfurfural (HMF). 1. Mitteilung: Chronischer Fütterungsversuch mit HMF und Stoffwechsel der Substanz. Z. Ernaehrungswiss., Darmstadt, 10(2):97-101, 1970.
113. LIVINGSTON, G.E.; ESSELEN, W.B.; FELLERS, C.R. - Storage changes in processed apple sauce. Food Technol., Chicago, 8(2):116-20, 1954.
114. LOVE, R.M. - Spectroscopic studies of carbohydrates. 1. The action of sulphuric acid on sugars. Biochem. J., London, 55:126-32, 1953.
115. LUH, B.S.; LEONARD, S.; MARSH, G.L. - Objective criteria for storage changes in tomato paste. Food Technol., Chicago, 12(7):347-52, 1958.
116. LUKESCH, H. - Abbauprodukte der karamelisierten Saccharose. Naturwissenschaften, Berlin, 43(5): 108-9, 1956.
117. MCKIBBINS, S.W.; HARRIS, J.F.; SAEMAN, J.F. - A sample applicator for chromatographic paper and its use for 5-hydroxymethyl-2-furaldehyde and levulinic acid analysis. J.Chromatogr., Amsterdam, 5:207-16, 1961.

118. MACKINNEY, G. & TEMMER, O. - The deterioration of dried fruit. IV. Spectrophotometric and polarographic studies. J. Am. Chem. Soc., Washington, 70(11):3586-90, 1948.
119. MAGALHÃES, J.F. - Comportamento analítico de psicotrôpicos com anel heptagonal. São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, 1968. p.40 [Tese-doutorado] Orientador: Prof. Dr. Quintino Mingoia.
120. MARTINDALE, W.H. - The extra pharmacopoeia. 27.ed. London, Pharmaceutical Press, 1977. p.1451.
121. MATSUSHIMA, S.; ISHIGURO, S.; SUGAWARA, S. - Composition studies on some varieties of tobacco and their smoke. I. Major componentes in smoke condensate. Beitr. Tabakforsch. Int., Hamburg, 10(1):31-8, 1979. Apud: Chem. Abstr., Columbus, 93:22819w, 1980.
122. MEDNICK, M.L. - The acid-base-catalyzed conversion of aldohexose into 5-(hydroxymethyl)-2-furfural. J. Org. Chem., Washington, 27(2):398-403, 1962.
123. MÉNEZ, J.F.; MESKAR, A.; LUCAS, D.; DARRAGON, T.; FLOCH, H.H.; BARDOU, L.G. - Glycosylated hemoglobin and serum proteins: semi-automated estimation. Clin. Chem., Winston-Salem, 27(11):1947-8, 1981.

124. MERCADIER, D.; RIGAL, L.; GASET, A.; GORRICHON, J.P. -
Synthesis of 5-hydroxymethyl-2-furancarboxal-
dehyde catalyzed by cationic exchange resins.
Part 1. Choice of the catalyst and the charac-
teristics of the reaction medium. J. Chem.
Technol. Biotechnol., Oxford, 31(8):489-96,
1981. Apud: Chem. Abstr., Columbus, 96:52095m,
1982.
125. MERCADIER, D.; RIGAL, L.; GASET, A.; GORRICHON, J.P. -
Synthesis of 5-hydroxymethyl-2-furancarboxal-
dehyde catalyzed by cationic exchange resins.
Part 2. Analysis and discussion of the effect
of the main parameters on the HMF output. J.
Chem. Technol. Biotechnol., Oxford, 31(8):
497-502, 1981. Apud: Chem. Abstr., Columbus,
96:52096n, 1982.
126. MERCADIER, D.; RIGAL, L.; GASET, A.; GORRICHON, J.P. -
Synthesis of 5-hydroxymethyl-2-furancarboxal-
dehyde catalyzed by cationic exchange resins.
Part 3. Kinetic approach of the D-fructose
dehydration. J. Chem. Technol. Biotechnol.,
Oxford, 31(8):503-8, 1981. Apud: Chem. Abstr.,
Columbus, 96:51573d, 1982.

127. THE MERCK index: an encyclopedia of chemicals and drugs. 9.ed. Rahway, 1976. p.640.
128. MEYDAV, S. & BERK, Z. - Colorimetric determination of browning precursors in orange juice products. J. Agric. Food Chem., Washington, 26(1):282-5, 1978.
129. MIDDENDORP, J.A. - "Über Oxymethylfurfurol. Chem. Zentralbl., Berlin, 1:844-7, 1919.
130. MILLAR, B.W. & MACLEOD, T.M. - A study of 5-hydroxy methylfurfural levels in laevulose injections after autoclaving and during storage. J. Pharm. Pharmacol., London, 33(supl.):100P, 1981.
131. MILLER, R.E. & CANTOR, S.M. - 2-Hydroxy-acetylfuran from sugars. J. Am. Chem. Soc., Washington, 74:5236-7, 1952.
132. MOLLICA, J.A.; AHUJA, S.; COHEN, J. - Stability of pharmaceuticals. J. Pharm. Sci., Washington, 67:443-65, 1978.
133. MONTGOMERY, R. & WIGGINS, L.F. - The effect of heat on aqueous solutions of sucrose and other carbohydrates. J. Soc. Chem. Ind., London, 66(1):31-2, 1947.

134. MORIKAWA, S. - Synthesis of hydroxymethylfurfural and 2,5-furandicarboxaldehyde. Noguchi Kenkyusho Jiho, Tokyo, 21:25-33, 1978. Apud: Chem. Abstr., Columbus, 90:103740d, 1979.
135. MOYE, C.J. - The formation of 5-hydroxymethylfurfural from hexoses. Aust. J. Chem., Melbourne, 19(2):2317-20, 1966.
136. MOYE, C.J. - 5-Hydroxymethylfurfural. Rev. Pure Appl. Chem., Melbourne, 14(4):161-70, 1964.
137. MOYE, C.J. & KRZEMINSKI, Z.S. - The formation of 5-hydroxymethylfurfural from hexoses. Aust. J. Chem., Melbourne, 16(2):258-69, 1963.
138. MULCHANDANI, R.P.; JOSEPHSON, R.V.; HARPER, W.J. - Effects of processing on liquid infant milk formulas. I. Freshly processed products. J. Dairy Sci., Urbana, 62(10):1527-36, 1979.
139. MULCHANDANI, R.P.; JOSEPHSON, R.V.; HARPER, W.J. - Effects of processing on liquid infant milk formulas. II. Products stored six months. J. Dairy Sci., Urbana, 62(10):1537-45, 1979.

140. MURTY, B.S.R.; KAPOOR, J.N.; SMITH, F.X. - Levels of 5-hydroxymethylfurfural in dextrose injection. Am. J. Hosp. Pharm., Washington, 34(2):205-6, 1977.
141. NAKAMURA, Y. - Preparation of 5-(hydroxymethyl) furfural by selective dehydration of D-fructose. Noguchi Kenkyusho Jiho, Tokyo, 23:25-38, 1980. Apud: Chem. Abstr., Columbus, 94:156646s, 1981.
142. NAKAMURA, Y. - Preparation of 5-hydroxymethylfurfural. II. Continuous dehydration of D-fructose. Noguchi Kenkyusho Jiho, Tokyo, 24:42-9, 1981. Apud: Chem. Abstr., Columbus, 97:6078f, 1982.
143. NAKAMURA, Y. & MORIKAWA, S. - The dehydration of D-fructose to 5-hydroxymethyl-2-furaldehyde. Bull. Chem. Soc. Jpn., Tokyo, 53(12):3705-6, 1980.
144. NAKAMURA, Y. & MORIKAWA, S. - Hydroxymethylfurfural. Jpn. Kokai Tokkyo Koho 79,154,757 (Cl.C07 D307/46), 06 Dec. 1979, Appl. 78/63, 095, 26 May 1978; 6pp. Apud: Chem. Abstr., Columbus, 92:P215264z, 1980.

145. NOGUCHI INSTITUTE - 5-(Acyloxymethyl)furfurals.
Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP81,138,177 (Cl.C07
D307/48), 28 Oct. 1981, Appl. 80/40, 859,
28 Mar. 1980; 3pp. Apud: Chem. Abstr., Columbus,
96:85408u, 1982.
146. NOGUCHI INSTITUTE - 5-(Hydroxymethyl)-2-furancarbo-
xaldehyde. Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP 81,139,473
(Cl.C07D 307/46), 30 Oct. 1981, Appl. 80/43,
851, 02 Apr. 1980; 3pp. Apud: Chem. Abstr.,
Columbus, 96:P68801z, 1982.
147. OGATA, H.; SHIBAZAKI, T.; EJIMA, A.; MATSUURA, T.;
SHIMADA, F. - Furfural as a new decomposition
product of glucose solution under oxygen atmos-
phere. J. Pharm. Pharmacol., London, 30(10):
668, 1978.
148. ORGANIZAÇÃO ANDREI, São Paulo - Compêndio médico.
23.ed. São Paulo, 1982.
149. ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD. Reunión
del Grupo Científico de Trabajo sobre las En-
fermedades Diarreicas, 1., Washington, 1981.
Informe. Washington, 1981. 11p. [mimeogr.]

150. ORTLEPP, A. - Korrektur des pH - Wertes bei
"Infusionslösungen von Glucose, Fructose und
deren Mischungen mit Xylit. Krankenhaus -
Apotheke, Stuttgart, 29(9):81-3, 1980.
151. PANOV, I.; BRATOVANOVA, P.; PANOV, E.; KALEVA, S. -
Study of the diffusion coefficient of light
reflection and carbonyl flavor substances
of bread crust and pulp during baking. Khranit.
Promst., Sofia, 27(8):9-14, 1978. Apud: Chem.
Abstr., Columbus, 90:185133v, 1979.
152. PATTON, S. - Browning and associated changes in
milk and its products: a review. J. Dairy Sci.,
Urbana, 38(5):457-78, 1955.
153. PATTON, S. - Studies of heated milk. I. Formation
of 5-hydroxymethyl-2-furfural. J. Dairy Sci.,
Urbana, 33(5):324-8, 1950.
154. PATTON, S. - Studies of heated milk. III. Mode of
formation of certain furan compounds. J. Dairy
Sci., Urbana, 33(12):904-10, 1950.
155. PETTERSSON, B.; CURVALL, M.; ENZELL, C.R. - Effects
of tobacco smoke compounds on the noradrenaline
induced oxidative metabolism in isolated brown
fat cells. Toxicology, Amsterdam, 18(1):1-15, 1980.

156. PHARMACOPEIA of the United States of America.
20.ed.rev. Rockville, United States Pharmaco
peial Convention, 1979. p.218-9.
157. PHARMACOPEIA of the United States of America.
20.ed.rev. Rockville, United States Pharmaco
peial Convention, 1979. p.726.
158. PHARMACOPEIA of the United States of America.
20.ed.rev. Rockville, United States Pharmaco
peial Convention, 1979. p.51, 729-30.
159. PHARMACOPEIA of the United States of America.
20.ed.rev. Rockville, United States Pharmaco
peial Convention, 1979. p.967.
160. PHARMACOPOEA internationalis. 3.ed. Geneva, World
Health Organization, 1979. v.1, p.131-2, 203.
161. PHARMACOPOEA internationalis. 3.ed. Geneva, World
Health Organization, 1979. v.1, p.181.
162. PHARMACOPOEA internationalis. 3.ed. Geneva, World
Health Organization, 1981. v.2, p.135-7.

163. POPOFF, T. & THEANDER, O. - Formation of aromatic compounds from carbohydrates. Part III. Reaction of D-glucose and D-fructose in slightly acidic, aqueous solution. Acta Chem. Scand., Copenhagen, 30B(5):397-402, 1976.
164. POTTER, F.E. & PATTON, S. - Evidence of maltol and hydroxymethylfurfural in evaporated milk as shown by paper chromatography. J. Dairy Sci., Urbana, 39(7):978-82, 1956.
165. PREY, V.; BERBALK, H.; KAUSZ, M. - Beiträge zur Papierchromatographie organischer Substanzen. VII. Die Dünnschichtchromatographie einiger Kohlehydratderivate und - Abbauprodukte. Mikrochim. Acta, Vienna, 3:449-54, 1962.
166. PROGRAMA de lucha contra las enfermedades diarréicas. Cron. OMS , Ginebra, 36(6):256-8, 1982.
167. PSARRAS, T.; TEFTELLER, J.W.; ZIMMERMAN, H.K. - Ultraviolet absorption spectra of 1-furfural and of 5-hydroxymethylfurfural in aqueous buffers. Rec. Trav. Chim. Pays-Bas, The Hague, 80(3):232-6, 1961.

168. PUMMERER, R.; GUYOT, O.; BIRKOFER, L. - "Über den Mechanismus der Lävulinsäure - Bildung aus Hexosen. (II.Mitteil.) und über einen hydroxyl-freien glucosanartigen Körper. Ber. Dtsch. Chem. Ges., Heidelberg, 68B:480-93, 1935.
169. RAMCHANDER, S. & FEATHER, M.S. - Studies on the mechanism of color formation in glucose syrups. Cereal Chem., St. Paul, 52(2):166-73, 1975.
170. RASMUSSEN, A.; HESSOV, I.; BOJSEN-MØLLER, M. - General and local toxicity of 5-hydroxymethyl-2-furfural in rabbits. Acta Pharmacol. Toxicol., Copenhagen, 50:81-4, 1982.
171. REAGENZIE MERCK - Anfärbereagenzien für Dünnschicht und Papier Chromatographie. Darmstadt, E. Merck, 1970. p.34.
172. RÉDEI, G.P. - "Fructose effect" in higher plants. Ann. Bot., Roma, 38:287-97, 1974.
173. RESNIK, S. & CHIRIFE, J. - Effect of moisture content and temperature on some aspects of nonenzymatic browning in dehydrated apple. J. Food Sci., Chicago, 44(2):601-5, 1979.

174. REYNOLDS, T.M. - Chemistry of nonenzymic browning.
II. Adv. Food Res., New York, 14:167-283, 1965.
175. RIGAL, L.; GASET, A.; GORRICHON, J.P. - Selective conversion of D-fructose to 5-hydroxymethyl-2-furancarboxaldehyde using a water - solvent - ion - exchange resin triphasic system. Ind. Eng. Chem. Prod. Res. Dev., Washington, 20(4): 719-21, 1981.
176. RUGGIERI, G. & RUGGERI, P. - Sulla separazione mediante HPLC della patulina dal 5-idrossimetilfurfurolo. Rass. Chim., Roma, 34(3):121-4, 1982.
177. SANNAI, A.; FUJIMORI, T.; KATO, K. - Studies on flavor components of roasted chicory root. Agric. Biol. Chem., Tokyo, 46(2):429-33, 1982.
178. SCALLET, B.L. & GARDNER, J.H. - Formation of 5-hydroxymethylfurfural from D-glucose in aqueous solution. J. Am. Chem. Soc., Washington, 67(11): 1934-5, 1945.
179. SCHADE, J.E.; MARSH, G.L.; ECKERT, J.E. - Diastase activity and hydroxy-methyl-furfural in honey and their usefulness in detecting heat alteration. Food Res., Champaign, 23:446-63, 1958.

180. SHIBAMOTO, T.; KAMIYA, Y.; MIHARA, S. - Isolation and identification of volatile compounds in cooked meat: sukiyaki. J. Agric. Food Chem., Washington, 29(1):57-63, 1981.
181. SHIMIZU, J. & WATANABE, M. - Gas chromatographic analysis of furfural and hydroxymethylfurfural in wine. Agric. Biol. Chem., Tokyo, 43(6): 1365-6, 1979.
182. SHUR, A.M.; ROITBURD, G.V.; YAZLOVETSKII, I.G. - Preparative method of pure 5-hydroxymethylfurfuraldehyde. Tr. Kishinev Politekh. Inst., 5: 67-9, 1966. Apud: Chem. Abstr., Columbus, 67: 99923w, 1967.
183. SIEWERT, M. & GNEKOW, H. - "Über die stabilität von Glucose-Elektrolyt - Mischungen (Oral rehydration salts; ORS) zur Therapie von Durchfallerkrankungen). Pharm. Ztg., Frankfurt am Main, 22(2):1169-74, 1983.
184. SINGH, B.; DEAN, G.R.; CANTOR, S.M. - The role of 5-(hydroxymethyl)-furfural in the discoloration of sugar solutions. J. Am. Chem. Soc., Washington, 70:517-22, 1948.

185. SINNER, M. & DIETRICH, H.H. - Automatic separation and quantitative determination of furfuroles and/or lower aliphatic aldehydes in a mixture with sugars. Ger. Offen. 2,732,288, Feb. 01, 1979, Appl. Jul. 16, 1977; 36 pp. Apud: Chem. Abstr., Columbus, 90:179687n, 1979.
186. SMITH, R.M. - Determination of 5-hydroxymethylfurfural and caffeine in coffee and chicory extracts by high performance liquid chromatography. Food Chem., Barking, 7(1):41-5, 1981.
187. STAHL, E. & KALTENBACH, U. - "Dünnschicht-Chromatographie. VI. Mitteilung. Spurenanalyse von Zuckergemischen auf Kieselgur G-Schichten. J. Chromatogr., Amsterdam, 5:351-5, 1961.
188. STURGEON, R.J.; ATHANIKAR, N.K.; HARBISON, H.A.; HENRY, R.S.; JURGENS JR., R.W.; WELCO, A.D. - Degradation of dextrose during heating under simulated sterilization. J. Parenter. Drug Assoc., Philadelphia, 34(3):175-82, 1980.
189. SZMANT, H.H. & CHUNDURY, D.D. - The preparation of 5-hydroxymethylfurfuraldehyde from high fructose corn syrup and other carbohydrates. J. Chem. Technol. Biotechnol., Oxford, 31(3): 135-45, 1981. Apud: Chem. Abstr., Columbus, 95:152455b, 1981.

190. TAHER, A.M. & CATES, D.M. - A spectrophotometric investigation of the yellow color that accompanies the formation of furan derivatives in degraded-sugar solutions. Carbohydr. Res., Amsterdam, 34(2):249-61, 1974.
191. TÄUFEL, K. - Verhalten der Saccharose bei technologischen Prozessen. I. Modellversuche in saurer Lösung. Z. Anal. Chem., Berlin, 129: 352-65, 1949.
192. TAYLOR, R.B.; JAPPY, B.M.; NEIL, J.M. - Kinetics of dextrose degradation under autoclaving conditions. J. Pharm. Pharmacol., London, 24(2): 121-9, 1972.
193. TAYLOR, R.B. & SOOD, V.C. - An h.p.l.c. study of the initial stages of dextrose decomposition in neutral solution. J. Pharm. Pharmacol., London, 30(8):510-1, 1978.
194. TEUNISSEN, H.P. - Velocity measurements on the opening of the furane ring in the hydroxymethylfurfuraldehyde. Rec. Trav. Chim. Pays-Bas, The Hague, 49:784-826, 1930.

195. TEUNISSEN, H.P. - Velocity measurements on the opening of the furane ring in hydroxymethyl-furfuraldehyde. II. Rec. Trav. Chim. Pays-Bas, The Hague, 50:1-20, 1931.
196. THEAN, J.E. & FUNDERBURK JR., W.C. - High pressure liquid chromatographic determination of sucrose in honey. J. Assoc. Off. Anal. Chem., Washington, 60(4):838-41, 1977.
197. TOVERUD, E.L. & KARLSEN, J. - On the formation of furan derivatives in parenteral solutions. Medd. Nor. Farm. Selsk., Oslo, 36(3):107-16, 1974.
198. TRINDER, P. - Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor. Ann. Clin. Biochem., London, 6:24-7, 1969.
199. TURNER, J.H.; REBERS, P.A.; BARRICK, P.L.; COTTON, R.H. - Determination of 5-(hydroxymethyl)-2-furaldehyde and related compounds. Anal. Chem., Washington, 26(5):898-901, 1954.
200. VAN EKENSTEIN, W.A. & BLANKSMA, J.J. - Über des ω -Oxymethyl-furfurol als Ursache einiger Farbreaktionen der Hexosen. Ber. Dtsch. Chem. Ges., Heidelberg, 43(2):2355-61, 1910.

201. VIEL, C. - Hydroxymethyl-furfural and its color reactions. Inf. Chim., Paris, 218:255-60, 1981.
Apud: Chem. Abstr., Columbus, 96:79118h, 1982.
202. VÖLKSEN, W. - Veränderungen von Traubenzuckerlösungen bei der Sterilisation. I. Mitteilung: Die Verfärbung der Lösungen. Arch. Pharm. Ber. Dtsch. Pharm. Ges., Weinheim, 285(8):392-400, 1952.
203. VÖLKSEN, W. - Veränderungen von Traubenzuckerlösungen bei der Sterilisation. II. Mitteilung: Nachweis von Zersetzungsprodukten. Arch. Pharm. Ber. Dtsch. Pharm. Ges., Weinheim, 287(8):459-62, 1954.
204. WALMSLEY, T.A. & LEVER, M. - Fluorometric measurement of furfural and 5-hydroxymethylfurfural. Anal. Biochem., Baltimore, 124(2):446-51, 1982.
205. WEBB JR., N.E.; SPERANDIO, G.J.; MARTIN, A.N. - A study of the decomposition of glucose solutions. J. Am. Pharm. Assoc. Sci. Ed., Washington, 47(2): 101-3, 1958.
206. WHITE JR., J.W. - Detection of honey adulteration by carbohydrate analysis. J. Assoc. Off. Anal. Chem., Washington, 63(1):11-8, 1980.

207. WHITE JR., J.W. - Methods for determining carbohydrates, hydroxymethylfurfural, and proline in honey: collaborative study. J. Assoc. Off. Anal. Chem., Washington, 62(3):515-26, 1979.
208. WHITE JR., J.W. - Spectrophotometric method for hydroxymethylfurfural in honey. J. Assoc. Off. Anal. Chem., Washington, 62(3):509-14, 1979.
209. WHITE JR., J.W.; KUSHNIR, I.; DONER, L.W. - Charcoal column/thin layer chromatographic method for high fructose corn sirup and spectrophotometric method for hydroxymethylfurfural in honey: collaborative studies. J. Assoc. Off. Anal. Chem., Washington, 62(4):921-7, 1979.
210. WHITE JR., J.W. & SICILIANO, J. - Hydroxymethylfurfural and honey adulteration. J. Assoc. Off. Anal. Chem., Washington, 63(1):7-10, 1980.
211. WIJESEKERA, R.O.B. & CHICHESTER, C.O. - A method for the determination of 5-hydroxymethyl-2-furaldehyde in the presence of 2-furaldehyde (furfural). J. Food Sci., Chicago, 35(5):702, 1970.

212. WINKLER, O. - Detection and determination of hydroxymethylfurfural in honey and artificial honey. Z. Lebensm. - Unters. - Forsch., Munich, 102:161-7, 1955. Apud: Chem. Abstr., Columbus, 49:16259b, 1955.
213. WITHERS, R.F.J. - Action of some lactones and related compounds on human chromosomes. Mech. Mutat. Inducing Factors Proc. Symp., 1965. p.359-64. Prague, House of the Czech. Acad. Sci., 1966. Apud: Chem. Abstr., Columbus, 70:45665g, 1969.
214. WOLFROM, M.L.; BINKLEY, W.W.; SHILLING, W.L.; HILTON, H.W. - Action of heat on D-fructose. II. Structure of diheterolevulosan. II. J. Am. Chem. Soc., Washington, 73(8):3553-7, 1951.
215. WOLFROM, M.L. & BLAIR, M.G. - Action of heat on D-fructose. Isolation of diheterolevulosan and a new di-D-fructose dianhydride. J. Am. Chem. Soc., Washington, 70(7):2406-9, 1948.
216. WOLFROM, M.L.; SCHUETZ, R.D.; CAVALIERI, L.F. - Chemical interactions of amino compounds and sugars. III. The conversion of D-glucose to 5-(hydroxymethyl)-2-furaldehyde. J. Am. Chem. Soc., Washington, 70(2):514-7, 1948.

217. WORLD HEALTH ORGANIZATION - Programme for Control of Diarrhoeal Diseases. Guidelines for the production of oral rehydration salts. Geneva, s.d. 58p. (WHO/CDD/SER/80.3).