



IPG

Politécnico
da Guarda
Escola Superior
de Saúde

IV Simpósio de Farmácia

1st International Symposium of Pharmacy

“Biotecnologia e Farmácia”

“Biotechnology and Pharmacy”

6 de Julho
2012

6th July 2012



Guia do IV Simpósio de Farmácia

Guide for the 1st International Symposium of Pharmacy

Título /Title

Guia do IV Simpósio de Farmácia

Guide for the 1st International Symposium of Pharmacy

Editor/Edited by

Comissão organizadora do IV Simpósio de Farmácia

Publicado/Published by

Intituto Politécnico da Guarda

Guarda Polytechnic Institute

Av. Dr. Francisco Sá Carneiro, n.º 50

6300-559 Guarda

Portugal

Tipo

Monografia Digital

Depósito Legal: 346379/12

ISBN: 978-972-8681-44-9

Data/Ano: 07/2012

Nota: Os resumos/abstract são da responsabilidade dos autores, não refletindo necessariamente as opiniões dos revisores.

Comissão Organizadora

The Organizing Committee

Prof. Cristina Granado

Prof. Maximiano Ribeiro

Prof. Sandra Ventura

Estudantes do 4^o ano do curso de
Farmácia – 1^o ciclo da ESS/IPG

Comissão Científica

Awards Committee

Prof. Doutor André Araújo

Prof. Fátima Roque

Prof. Doutor Ilídio Correia

Prof. Doutora Luiza Granadeiro

Prof. Doutora Paula Coutinho

Patrocínios e Agradecimentos

Sponsors and Acknowledgments



Mensagem de Boas Vindas

Welcome Message

Os estudantes do 4º ano do Curso de Farmácia da Escola Superior de Saúde do Instituto Politécnico da Guarda, em colaboração com a Direção de Curso e a Unidade Técnico Científica de Tecnologias da Saúde organizam o IV SIMPÓSIO SOBRE FARMÁCIA.

Na era atual, o Profissional de Saúde constitui uma pedra basilar na sociedade centrada na prestação de vários serviços e cuidados de saúde, abrangendo uma multidisciplinaridade de papéis, onde o ramo do desenvolvimento farmacêutico e a investigação assume cada vez mais um papel de maior preponderância. Sob o tema **“BIOTECNOLOGIA E FARMÁCIA”** propomos discutir os novos desafios colocados pelo avanço científico-tecnológico em todas as suas intersecções com o papel do Profissional de Saúde, no âmbito da Farmácia e Tecnologia.

Tirando partido da referida natureza interdisciplinar do Profissional de Saúde, organizamos um encontro que esperamos pleno de atualidade, baseado num programa dinâmico que inclui painéis de conferências e apresentação de posters, onde investigadores, professores e profissionais notabilizados nas respetivas áreas de intervenção apresentam, analisam e discutem os temas de Biotecnologia, Novos sistemas terapêuticos e Startups e Empreendedorismo em Biotecnologia.

Comissão Organizadora
The Organizing Committee

Programa *Program*

9.30h - Abertura do Secretariado

9.30 am - Opening of the secretariat

10.00 – Sessão de abertura

10.00 am - Opening Session

Prof. Doutor Gonçalo Poeta (Vice-Presidente do Instituto Politécnico da Guarda)

Prof. Fátima Roque (Diretora do Curso de Farmácia da Escola Superior de Saúde- Instituto Politécnico da Guarda)

10.30 – Painel I “Novos sistemas Terapêuticos”

10.30 am – Session 1 “New therapeutic approaches”

“Cell Internalizing and pH-responsive Nanoparticles for Improved Delivery of DNA Biopharmaceuticals”; VM Gaspar¹, F Sousa¹, RO Louro², JA Queiroz¹, IJ Correia¹; ¹ CICS-Universidade da Beira Interior, ²ITQB-Universidade Nova.

“Design and Production of New Nanodevices for Future Application in Cancer Therapy”; Silva, Ana S M¹, Bonifácio, Vasco D.B. ², Ricardo, Ana Aguiar², Mendonça AJ¹, Correia, Ilídio J¹; ¹CICS-Universidade da Beira Interior, ²REQUIMTE-Universidade Nova.

“Production of electrospun nanofibers for tissue engineering and other biotechnologic applications”; T Correia¹, P Coutinho^{1,2}, IJ Correia¹; ¹ CICS-Universidade da Beira Interior, ² UDI-Instituto Politécnico da Guarda.

11.30 – Coffee break

12.00 – Sessão de Posters

12.00 pm – Poster Session

12.30 – Almoço

12.30 pm – Lunch

14.00 – Painel II “Biotecnologia”

2.00 pm – Session 2 “Biotechnology”

“Production of antimicrobial bacteriocin by *Lactobacillus acidophilus* from Gynoflor®”; Gaspar C. ¹, Martinez-de-Oliveira J. ¹, Gouveia P. ¹, Palmeira-de-Oliveira R ¹, Palmeira-de-Oliveira A.¹; ¹CICS-Universidade da Beira Interior.

“Propriedades antimicrobianas e citotóxicas de extractos metanólicos de *Hakea sericea* Schrader”; Ângelo Luís¹, Luiza Breitenfeld¹, Susana Ferreira¹, Ana Paula Duarte¹, Fernanda Domingues¹; ¹ CICS-Universidade da Beira Interior.

“Avaliação do papel de inibidores da reparação do DNA na citotoxicidade induzida pela glicidamida em células mamárias não tumorais”; Maria Ines Antão Magro¹, ¹ FF-Universidade de Lisboa.

“Determinação de ácido ascórbico e ácido acetilsalicílico em formulações comerciais através de uma Língua Electrónica”; Cláudia Gomes¹, Cristina Gonçalves², Diana Borlido³, Marta Batista⁴, Tatiana Teixeira⁵, Luís G.Dias⁶, Olívia R. Pereira⁷; ¹ Farmácia Avenida- Lamego, ² Farmácia Macinhata- Macinhata do Vouga, ³ Farmácia Beirão Rendeiro-Caminha, ⁴ Farmácia São João-São João da Ribeira, ⁵ Pembury Hospital Wells-UK, ⁶ CIMO- Instituto Politécnico de Bragança, ⁷ DTD- Instituto Politécnico de Bragança.

15.45 – Coffee break

03.45 pm Coffee break

16.20 – Painel III “Startups e Empreendedorismo em Biotecnologia”

04.20 pm – Session 3 “Startups and Entrepreneurship in Biotechnology”

“Aqualgae – uma empresa de base Tecnológica”; Pedro Seixas¹;
¹Aqualgae

“The role of EQ-5D In the Economic Evaluation of dermatological Conditions and Therapies”; Flávia Pereira¹ and Rui Cruz¹; ¹ESTeSC-
Instituto Politécnico de Coimbra.

“Empreendedorismo no Ensino Superior - a Experiência do IPG”; Pedro Tadeu¹ e Teresa Paiva¹; ¹UDI-Instituto Politécnico da Guarda.

17.45– Sessão de Encerramento

05.45 pm - Conference closing

Prof. Doutora Paula Coutinho (Diretora da Escola Superior de Saúde-
Instituto Politécnico da Guarda)

Sessão **D**e **P**osters
Posters Session

VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO UV PARA DETERMINAÇÃO DE FUROSEMIDA EM MEDICAMENTOS GENÉRICOS E COMERCIAL

Correia B¹, Ferreira M², Gomes A³, Marçal L⁴, Dias L⁵, Pinto I⁶

¹ - Farmácia Pacheco de Medeiros, Ponta Delgada; beatriz_713_8@hotmail.com

² - Farmácia Chaves Ferreira, Vila Real; marta_mccf@hotmail.com

³ - Farmácia Caçola, Lousada; ana_gomes@hotmail.com

⁴ - Farmácia Pinheiro, Loulé; lylifarm@hotmail.com

⁵ - CIMO, Escola Superior Agrária, Instituto Politécnico de Bragança; ldias@ipb.pt

⁶ - Departamento de Tecnologias de Diagnóstico e Terapêutica, Escola Superior de Saúde, Instituto Politécnico de Bragança; isabel.pinto@ipb.pt

Resumo

O objetivo deste trabalho foi otimizar e validar um método analítico por espectrofotometria UV para determinação de furosemida em fármacos. A furosemida foi doseada em comprimidos Lasix[®], Cinfa, Ratiopharm, Sandoz e Winthrop. Foi utilizado um modelo de calibração por padrões externos e avaliaram-se critérios internacionalmente aceites para validação metodológica. O estudo da linearidade foi efetuado em concentrações de 0,8mg/L-15,1mg/L. Obteve-se uma relação linear entre os sinais de absorvância medidos a 238nm e as concentrações dos padrões de furosemida, com coeficientes de correlação >0,995. A exatidão, precisão intermédia do método e repetibilidade foram aceitáveis para soluções de controlo de qualidade e amostras.

Palavras-chave: furosemida, espectrofotometria UV, validação, fármacos

1. Introdução

O doseamento do fármaco é um dos testes realizados no controlo de qualidade de um medicamento, sendo importante desenvolver e validar métodos de doseamento alternativos, mais rápidos, baratos e com a mesma fiabilidade dos convencionais ¹.

Os métodos analíticos usados para a determinação de furosemida podem ser: titulação em meio aquoso, espectrofotometria no ultravioleta e colorimetria, métodos cromatográficos e métodos potenciométricos ².

A furosemida é um fármaco que atua no aparelho cardiovascular, estando incluída no grupo dos anti-hipertensores e sub-grupo dos diuréticos da ansa de Henle ³. Este princípio activo encontra-se na formulação comercial de marca: Lasix[®] e nos genéricos dos laboratórios Cinfa, Ratiopharm, Sandoz, Winthrop.

A cromatografia de camada fina, TLC (“Thin-Layer Chromatography”), é um dos métodos cromatográficos de rotina usados na química analítica. Esta técnica pode ser aplicada na indústria farmacêutica, química clínica forense, bioquímica, cosmética, análises alimentares, ambientais e de substâncias inorgânicas e noutras áreas como a tecnologia eletrolítica ⁴.

A espectrofotometria é uma das técnicas analíticas mais utilizadas, em função de robustez, tendo como vantagens o custo relativamente baixo e grande número de aplicações desenvolvidas. Os procedimentos envolvem medidas diretas de espécies que absorvem radiação, medidas após derivação química e acoplamento a diversas técnicas ou processos, como cromatografia, eletroforese e análises em fluxo ⁵. Esta técnica é fundamentada na lei de Lambert-Beer, que é a base matemática para medidas de absorção de radiação por amostras no estado sólido, líquido ou gasoso, nas regiões ultravioleta, visível e infravermelho do espectro eletromagnético ⁶. A furosemida absorve na região ultravioleta do espectro eletromagnético (190 a 340 nm), sendo a absorvância máxima ao comprimento de onda de 238 nm ⁷.

A quantificação de furosemida carece do desenvolvimento e validação de um método analítico. O objetivo deste estudo é validar um método analítico utilizando espectroscopia UV para controlo de qualidade, o qual possa ser perfeitamente adaptado à rotina de análises de matéria-prima e produto acabado, nomeadamente no doseamento da furosemida em comprimidos comerciais e genéricos.

2. Material e Métodos

No que concerne o material, o metanol (qualidade HPLC) foi adquirido pela Fisher Scientific, o propan-2-ol, o acetato de etilo e o éter de petróleo foram adquiridos pela LAB-SCAN, o éter dietílico e o etanol absoluto foram adquiridos pela Panreac Química SAU. No âmbito da técnica TLC foram utilizadas placas TLC sílica gel 60 F254, folhas de alumínio 20x20 cm adquiridas pela MERCK. Na espectrofotometria UV utilizou-se o espectrofotómetro Specord 200 UV/VIS/NIR da Analytik Jena e cuvettes de quartzo. Todos os reagentes usados neste estudo (metanol, propan-2-ol, éter dietílico, éter de petróleo, acetato de etilo e etanol) foram de qualidade analítica.

As amostras (4 fármacos genéricos dos laboratórios Winthrop, Cinfa, Ratiopharm e Sandoz e 1 fármaco comercial de marca Lasix[®]) foram cedidas por profissionais de saúde que trabalham no sector farmacêutico e a furosemida padrão foi adquirida à Sigma Aldrich Química S.A. (Sintra, Portugal).

As soluções foram preparadas, pesando 0,1 g do comprimido total, previamente pulverizado em almofariz de porcelana, para um balão volumétrico de 25 ml aferido com metanol (solução mãe para cada amostra). Seguiu-se uma filtração da suspensão, uma vez que as amostras possuem excipientes que são insolúveis em metanol. Depois de filtrado, transferiu-se 1ml das amostras Lasix[®], Winthrop, Ratiopharm e 2 ml das amostras Cinfa e Sandoz para um balão volumétrico de 100 ml. A solução padrão mãe foi obtida medindo a massa 0,1g de furosemida pura que foi transferida para um balão volumétrico de 100 ml e

solubilizada em metanol. A partir desta fez-se a solução mãe diluída (25ml de solução-mãe em 100 ml de metanol) e foram efetuadas diluições apropriadas da solução padrão para preparar 5 soluções padrão para a execução do estudo de validação (tabela 2). Os volumes foram completados com metanol, obtendo-se soluções com concentrações a variar entre 5 e 15 mg/L. Para obter níveis mais baixos de concentração, prepararam-se 2 novas soluções a partir da solução padrão de concentração 10 mg/l.

A solução de controlo de qualidade mãe foi preparada dissolvendo 0,1g furosemida padrão em 100 ml metanol. A partir desta, preparou-se uma SCQ mãe diluída (10 ml de SCQ mãe/100 ml metanol) que permitiu preparar 3 soluções de controlo de qualidade com diferentes níveis de concentração de furosemida.

Relativamente aos procedimentos experimentais, cada experiência de TLC envolve a realização de 4 etapas: a preparação das placas, a aplicação da amostra, o desenvolvimento do cromatograma e a visualização. A preparação das placas envolve o corte das mesmas de forma a terem o tamanho conveniente, seguindo-se a marcação muito leve do ponto de aplicação da amostra (linha de origem) que deve estar cerca de 1,5 cm acima da margem de apoio da placa. Após dissolvidas nos diferentes solventes, as amostras e padrões foram aplicadas na placa, com o auxílio de um capilar, no ponto de origem, seguindo-se um período de espera para secagem dos mesmos. No desenvolvimento do cromatograma as placas foram colocadas numa câmara cromatográfica de vidro, contendo o solvente. Esta foi devidamente tapada de modo a promover a estabilização e controlo de vários parâmetros experimentais (composição, grau de saturação da atmosfera, evaporação do eluente e temperatura). Após terminada a “corrida”, as placas foram retiradas da câmara, marcando a frente do solvente com um lápis e posteriormente colocada na estufa para evaporação do solvente. A visualização consistiu em expor as placas à luz UV observando-se o aparecimento de manchas referente a absorção de radiação pelas amostras.

As análises usando espectrofotometria UV foram efetuadas em 3 etapas: preparação das soluções/filtração, calibração do aparelho e recolha dos resultados. Na preparação das soluções/filtração utilizaram-se dois tipos de soluções: amostras e padrão. Ambas as soluções foram preparadas usando o metanol como solvente. No caso das amostras foi feita uma filtração antes da medição no espectrofotómetro, com o intuito de se medir a absorvância sem a interferência de partículas em suspensão (excipientes não dissolvidos). A calibração do aparelho consistiu na obtenção da relação entre os valores das absorvância e a concentração de um determinado número de padrões de calibração. Em todas as calibrações efetuava-se a leitura do branco, antes das leituras das amostras e soluções padrão. Na recolha de resultados, após a obtenção das absorvâncias, obtinha-se uma reta de calibração que foi utilizada para determinar as concentrações de soluções de controlo de qualidade e de amostras, medidas nas mesmas condições experimentais.

Para a validação do método experimental, o comprimento de onda de maior absorvância da furosemida foi determinado em espectrofotometria UV, entre os comprimentos de onda de 200 a 320 nm, usando uma solução de furosemida de concentração adequada. O comprimento de onda selecionado (confirmação do que estava referido na bibliografia) para a análise da furosemida foi 238 nm.

3. Resultados

Na análise por TLC foi possível visualizar que nos extratos metanólicos das amostras foi extraído o princípio ativo, a furosemida, não havendo qualquer evidência de contaminações por outras substâncias que fazem parte dos medicamentos (excipientes). Assim, esta técnica permitiu confirmar que existe furosemida em todas as formulações em estudo, uma vez que esta foi arrastada pela fase móvel (metanol), obtendo-se uma mancha equivalente ao padrão.

Deste modo, não havendo interferência nos extratos metanólicos, considerou-se efetuar a análise da furosemida em fármacos pelo método espectrofotométrico UV.

A validação do método espectrofotométrico para a análise da furosemida em fármacos, implica o estudo da linearidade, LD e LQ, precisão intermédia e repetibilidade, exatidão e robustez.

Na seleção do comprimento de onda o espectro mostra que a furosemida tem um pico máximo de absorção no intervalo de comprimento de onda de 237 a 238 nm. Assim sendo, foi selecionado o comprimento de onda de 238 nm que corresponde ao valor indicado na farmacopeia portuguesa ⁷.

Nos espectros da furosemida dissolvida nos solventes metanol e água, observa-se que os dois perfis são diferentes, isto é, em metanol os espectros das amostras possuem um espectro visual semelhante, ao contrário do que acontece em água, em que os espectros apresentam maior variação, talvez, resultante da dissolução parcial de compostos excipientes dos fármacos.

A linearidade foi estudada através de calibrações usando soluções de concentração a variar entre 0,80 mg/L a 15,1 mg/L. Foi estudada através de nove retas de calibração com nove níveis de concentração e efetuadas em 6 dias diferentes.

Os resultados dos declives (m), ordenada na origem (b) e coeficiente de correlação (R) obtidos da regressão linear referente à relação entre os sinais (absorvâncias) e os valores de concentração (mg/L) das soluções padrão de calibração de furosemida preparadas, mostram que os declives variam entre os valores 0,0627 e 0,0742, tendo um valor médio de 0,070 (+/-0,003), correspondendo a uma variação de 1,2%. Obteve-se um valor médio de -0,030 (+/-0,009) para a ordenada na origem. Os valores dos coeficientes de correlação variam entre 0,9955 e 0,9998, mostrando que a curva de calibração segue uma tendência linear. Globalmente estes resultados refletem uma variabilidade considerável. Como foram os primeiros resultados obtidos será aconselhável, num

trabalho futuro, estabelecer gráficos de controlo de qualidade para controlar e diminuir a variabilidade dos dados experimentais, o que permitirá otimizar o método experimental.

Os limites de deteção e de quantificação para a furosemida foram estabelecidos a partir dos dados do desvio padrão (s) e do declive (m), obtidos a partir de 9 rectas de calibração, de acordo com as equações 1 e 2, respetivamente. Os resultados mostram que o LD varia entre 0,24 e 1,21 mg/L e o LQ entre 0,74 e 3,67 mg/L, sendo o valor médio de 0,4 (+/- 0,3) e 1,3 (+/- 0,9) mg/L, respetivamente. Pode-se constatar que existe uma grande amplitude entre valores de LD e entre valores de LQ, resultado da execução das calibrações em vários dias.

Para o estudo da exatidão e da precisão, analisaram-se 3 soluções de controlo de qualidade de furosemida com 3 níveis de concentração diferentes (2, 8 e 15 mg/L correspondendo à SCQ3, SCQ2 e SCQ1, relativamente). Como critério de classificação, calcularam-se os valores de Er% e sr%, respetivamente.

No que respeita os valores médios da concentração, do desvio padrão e do desvio padrão relativo para cada uma das SCQ, para o estudo da precisão intermédia, obtiveram-se para a SCQ1 e SCQ2 valores de sr% inferiores a 5% pelo que se pode afirmar que a precisão é aceitável. Na SCQ3 chegou-se a um valor de sr% de 18%, pelo que se pode dizer que tem uma má precisão. Para o estudo da repetibilidade (calibrações realizadas no mesmo dia), tal como nos resultados anteriores, a precisão das análises às soluções SCQ 1 e SCQ 2 foi aceitável e para a SCQ 3 foi má.

No estudo da exatidão das análises usaram-se os valores das concentrações obtidas para as três SCQ. Os erros relativos percentuais obtidos nas determinações de furosemida nas soluções SCQ1 e SCQ2 foram inferiores a 2% e na SCQ3, inferiores a 5%. Globalmente, a exatidão foi aceitável. Estes resultados mostram que, embora para níveis baixos de furosemida a precisão não seja razoável, na exatidão conseguiu-se nos três níveis de concentração, resultados aceitáveis. No

que respeita a robustez o método utilizado não sofreu oscilações ou interferências secundárias pelo que se pode considerar o método utilizado, robusto.

As análises às amostras dos fármacos foram efetuadas em vários dias, de forma a avaliar a sua precisão intermédia. Globalmente verifica-se que a precisão na análise do fármaco Sandoz é Aceitável ($sr\%=2,38$), Razoável para os fármacos Winthrop, Cinfa e Ratiopharm ($sr\%$ inferior 7,20) e má para as análises no fármaco Lasix[®] ($sr\%=11,20$). Os resultados obtidos para a concentração de furosemida nos fármacos foram comparados com os descritos no folheto informativo (40 mg de furosemida no comprimido). De um modo geral, verifica-se que a massa total determinada para as amostras em estudo, aproxima-se do valor descrito no folheto informativo das mesmas. Verifica-se uma maior variação entre o valor esperado e o valor medido experimental na amostra do laboratório Cinfa, resultando uma exatidão má ($Er\%=17,1\%$).

Globalmente, a exatidão das análises é razoável, demonstrando que o método instrumental UV usado permite a análise da furosemida em fármacos.

4. Discussão e Conclusão

Os métodos de separação são essenciais para aplicações específicas, tanto a nível industrial como laboratorial. Esta técnica TLC permitiu confirmar que existe furosemida nos comprimidos, por comparação do cromatograma com o padrão de furosemida pura.

Através da análise dos espectros, utilizando como solventes a água e o metanol, verificou-se que a furosemida se dissolve em metanol e não em água. Pode-se afirmar que os excipientes presentes nos comprimidos não interferiram na análise, ao contrário do resultado obtido para a água.

Apesar das vantagens da utilização de TLC, esta não se revelou necessária, uma vez que apenas a furosemida se dissolve em quantidades significativas e quantificáveis. Deste modo, abandonou-se a

técnica de TLC, pois esta apresenta alto custo, passando-se a utilizar a técnica Espectrofotometria na região UV do espectro eletromagnético.

O método analítico espectrofotométrico foi proposto e validado para doseamento da furosemida a 238 nm, demonstrando ser simples, rápido, preciso, exato e reprodutível.

O método foi aplicado para quantificar a furosemida em comprimidos, após pulverização dos mesmos, sem interferência dos constituintes da formulação, constituindo, portanto, uma ferramenta alternativa útil, de baixo custo e fácil execução na rotina de controlo de qualidade da furosemida como matéria-prima e em formas farmacêuticas sólidas orais (comprimidos).

Para determinar o intervalo de concentrações utilizou-se como critérios de seleção a proximidade dos pontos, com a recta de calibração e com os valores de LD e LQ, calculados com parâmetros da reta de calibração. O intervalo dinâmico de concentração de furosemida usado foi de 0,804 mg/L a 15,08 mg/L. A equação da reta global, obtida da relação entre as absorvâncias e as concentrações das soluções padrão de furosemida, é $Abs=0,0701C-0,0303$. O limite de deteção calculado é de 0,4 mg/L e o de quantificação de 1,3 mg/L. Nas soluções controlo de qualidade, as análises de furosemida tinha precisão e exatidão razoáveis, embora a níveis baixos de concentração de furosemida (próximo do valor de LQ), a precisão seja má.

Nas amostras, os resultados das análises foram aceitáveis (precisão e exatidão) exceto no fármaco do laboratório Cinfa, onde se obtiveram valores de concentração de furosemida de exatidão má.

A reta de calibração determinada para a furosemida, obteve-se por regressão linear, pelo método dos mínimos quadrados, representando a absorvância vs concentração.

No que diz respeito à análise quantitativa de furosemida nos fármacos, pode-se concluir que regra geral os resultados obtidos foram próximos dos esperados. O ligeiro défice nas formulações genéricas e o ligeiro aumento da formulação comercial Lasix[®] pode ser explicado por erros

durante a execução da técnica como por exemplo erros de pipetagem, uma vez que foram utilizadas pipetas volumétricas, em vez de micropipetas, devido ao facto de não ser possível utilizá-las com o metanol.

5. Referências

1. LACHMAN, L.; LIEBERMAN, H. A.; KANIG, J. L. Teoria e Prática na Indústria Farmacêutica. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2001.
2. DIAS, I.L.T.; NETO, O.; MARTINS, J.L.S. Metodologias analíticas para determinação da furosemina. Revista Lecta, vol.22, n.1/2, Janeiro/Dezembro 2004.
3. CARMONA, M.; ESTEVES, A.; GONÇALVES, J.; MACEDO, T.; MEDONÇA, J.; OSSWALD, W. Prontuário terapêutico – 7. INFARMED - Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, IP/Ministério da Saúde, 2007.
4. HAHN-DEINSTROP, E. (2000). Applied Thin-Layer Chromatography. Germany: Wiley-VCH.
5. SECA, A. Bioquímica/Bioquímica I Prática - Introdução teórica (espectrofotometria), 2010. http://www.uac.pt/~anaseca/pdf_bioquimica/introd_espectrof.pdf
6. ROCHA, F.R.P.; TEIXEIRA, L.S.G. Estratégias para aumento de sensibilidade em espectrofotometria UV-Vis. Revista Química Nova vol.27 n.5 São Paulo, Setembro/Outubro2004.
7. INFARMED (2005), Ministério da Saúde. Farmacopeia Portuguesa VIII.

