



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E FÍSICA

CAMILA GONÇALVES RODRIGUES DO NASCIMENTO BARBOSA

OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO PARA
DETERMINAÇÃO DA SULFANILAMIDA NA FORMA FARMACÊUTICA LÍQUIDA

AREIA, PB

2017

CAMILA GONÇALVES RODRIGUES DO NASCIMENTO BARBOSA

OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO PARA
DETERMINAÇÃO DA SULFANILAMIDA NA FORMA FARMACÊUTICA LÍQUIDA

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Curso de Licenciatura em Química da
Universidade Federal da Paraíba como requisito
para a obtenção do Título de Licenciatura em
Química.

Orientador: Prof. Dr. José Luiz Rufino

AREIA, PB

2017

*Ficha Catalográfica Elaborada na Seção de Processos Técnicos da
Biblioteca Setorial do CCA, UFPB, campus II, Areia - PB*

B238o *Barbosa, Camila Gonçalves Rodrigues do Nascimento.*
*Otimização e validação de um método espectrofotométrico para determinação da
sulfanilamida na forma farmacêutica líquida / Camila Gonçalves Rodrigues do
Nascimento Barbosa. - Areia: UFPB/CCA, 2017.*
39 f.: il.

*Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Química) - Centro de Ciências
Agrárias. Universidade Federal da Paraíba, Areia, 2017.*

Bibliografia.

Orientador: Prof. Dr. José Luiz Rufino

*1. Química. 2. Indústria farmacêutica - medicamentos. 3. Espectrofotometria. 4.
Sulfanilamida. I. Rufino, José Luiz (Orientador) II. Título.*

UFPB/CCA

CDU: 54

CAMILA GONÇALVES RODRIGUES DO NASCIMENTO BARBOSA

**OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO
PARA DETERMINAÇÃO DA SULFANILAMIDA NA FORMA FARMACÊUTICA
LÍQUIDA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Curso de Licenciatura em Química da
Universidade Federal da Paraíba como requisito
para a obtenção do Título de Licenciatura em
Química.

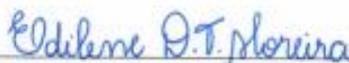
Aprovado em: 12/12/2017.

BANCA EXAMINADORA



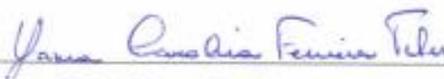
Prof. Dr. José Luiz Rufino

Orientador – DQF/CCA/UFPB



Prof. Dr. Edilene Dantas Teles Moreira

Examinadora – DQF/CCA/UFPB



Prof. Dr. Yanna Carolina Ferreira Teles

Examinadora – DQF/CCA/UFPB

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho de conclusão de curso primeiramente à Deus, a meus pais, meu marido, minha filha, irmãos, sobrinhos, toda a minha família e todos os meus amigos pelo incentivo e apoio, para que esse trabalho fosse realizado.

“Até aqui nos ajudou o Senhor.”

(BÍBLIA, 1 Samuel, 7, 12)

AGRADECIMENTOS

Inicialmente agradeço a Deus, minha rocha e fortaleza, por ter me dado o dom da vida, por ter segurado minha mão neste tempo todo. Por ser e me dar tudo que eu preciso. Por ter me escolhido dentre muitos para estar aqui. Por toda sabedoria e graça. Palavra alguma expressaria minha gratidão e o meu amor ao meu Pai todo poderoso!

Ao Orientador, Prof. José Luiz Rufino, pelos ensinamentos repassados, para que este projeto fosse concretizado.

A professora Maria Betania Hermenegildo, por todo auxílio, compreensão e atenção. Agradeço pela sua amizade e por todos os ensinamentos.

A minha filha, Liz Helena Rodrigues, por ter vindo ao mundo com intuito de me trazer paz e alegria. Por ser um dos motivos que mais me incentivou em seguir em frente. Em todos os momentos que pensei em desistir, você foi o motivo de continuar. Você é luz na minha vida. Obrigada filha amada.

Ao meu amado marido, Matheus Rodrigues, pelo amor e carinho, por me ouvir sempre que eu achei que não fosse conseguir concluir, pelo incentivo, por todas as palavras de carinho e, sobretudo, pelo amor e tempo dedicados a mim, amo você!

À minha família, base de toda minha educação. À minha amada mãe, Eudilene Gonçalves, pelas orações em me ver saindo sempre de casa para caminhar sozinha. Por todas as ligações, por toda preocupação, por todo amor.

Ao meu pai, José Ferreira, por tudo que fez e trabalhou para me dar condições de concluir um curso superior, pela confiança empregada em mim, pelo amor.

À minha amada e querida irmã Elayne Gonçalves, por todas as orações, pelas risadas, pela paciência, por acreditar em mim e sempre me aconselhar!

À minha irmã gêmea Carolina Gonçalves, por todo companheirismo e ajuda. Obrigada por sempre estar comigo.

Ao meu irmão Adriano Gonçalves e minha cunhada Jaqueline Rodrigues por todo incentivo e momentos divididos comigo.

Ao meu irmão José Ferreira N. Júnior (in memorian), pois acredito que se estivesse aqui estaria junto comigo torcendo pela minha vitória.

Aos meus doces e amados avós Maria Marlene Medeiros e Euclides Gonçalves, por todas as orações e por tudo que fizeram e fazem por mim.

A minha Tia Sueli Gonçalves, por todo apoio e ajuda.

Aos meus sogros Eliziane Rodrigues e José Barbosa, por todo incentivo e apoio. Muito obrigada por estarem sempre ao meu lado.

Aos meus amigos mais chegados, que durante o tempo de curso estiveram comigo, me fazendo rir, chorando junto, estudando junto. Obrigada minha flor Idaíris Andrade, minha flor Fabrícia Vieira, Gustavo Nascimento, Luciano Bernardo, Josinaldo Maranhão. O sucesso de vocês será também o meu.

Aos meus amigos e parceiros de laboratório Joabel Freire e Leandro dos Santos, por todo companheirismo e ajuda. Pela disponibilidade quando mais precisei.

A minha querida Tereziana, técnica do laboratório de Química, que sempre me auxiliou.

A todos os professores do Curso de Química (UFPB), que contribuíram para minha formação acadêmica. Por fim, a todos que de modo direto ou indireto torceram e ainda torcem muito por mim.

RESUMO

O controle de qualidade nas indústrias farmacêuticas objetiva averiguar que os produtos estejam dentro dos padrões de qualidade requeridos. As principais vantagens neste controle envolvem a otimização de processos, padronização de procedimentos, qualidade do ambiente, dos insumos de matéria-prima e dos produtos finais. Vários ensaios são realizados para garantir a qualidade de medicamentos, impedindo a viabilidade de medicamento falsificado. Para a quantificação de sulfanilamida em forma farmacêutica líquida deve-se utilizar metodologias analíticas validadas que gere informações confiáveis sobre a amostra. Diante do exposto, o presente estudo teve como objetivo otimizar e validar um método analítico para determinação de sulfanilamida em forma farmacêutica líquida com detecção espectrofotométrica na região do visível. O método é baseado na reação de diazotização da sulfamilamida com íon nitroso produzido *in situ* e posterior acoplamento com o agente cromogênico 8-oxiquinolino em meio básico. Os parâmetros experimentais foram cuidadosamente estudados e otimizados através do método univariado. A curva analítica apresentou boa linearidade com concentração entre $2,90 \times 10^{-6}$ a $4,06 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e correlação de 0,9999. Os limites de detecção ($6,60 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$) e quantificação ($2,20 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$) ficaram abaixo do intervalo de concentração investigado. Para o estudo de efeito de matriz foi utilizado o método de adição de padrão, onde a porcentagem de recuperação foi de 100,7 a 102,0%. O método apresentou erro de +2,8, e coeficiente de variação de 0,1% para a amostra com intervalo de confiança de 95%. Os resultados obtidos pela aplicação do método apresentaram excelentes resultados, mostrando que o método desenvolvido é preciso e exato.

Palavras-chave: Controle de qualidade, espectrofotometria, sulfanilamida.

ABSTRACT

Quality control in the pharmaceutical industry aims to ensure that products meet the required quality standards. The main advantages in this control are the optimization of processes, standardization of procedures, quality of the environment, raw material inputs and final products. Several trials are conducted to ensure the quality of medicines, preventing the viability of counterfeit medicine. For quantification of sulfanilamide in liquid pharmaceutical form, validated analytical methodologies should be used to generate reliable information about the sample. In view of the above, the present study aimed to optimize and validate an analytical method for the determination of sulfanilamide in liquid pharmaceutical form with spectrophotometric detection in the visible region. The method is based on the diazotization reaction of sulfamylamide with nitrous ion produced in situ and subsequent coupling with the chromogenic agent 8-oxiquinolono in basic medium. The experimental parameters were carefully studied and optimized through the univariate method. The analytical curve showed good linearity with concentration between 2.90×10^{-6} to 4.06×10^{-5} mol L⁻¹ and correlation of 0.9999. Detection limits (6.60×10^{-9} mol L⁻¹) and quantification (2.20×10^{-8} mol L⁻¹) were below the concentration range investigated. For the matrix effect study, the standard addition method was used, where the recovery percentage was 100.7 to 102.0%. The method presented error of +2.8, and coefficient of variation of 0.1% for the sample with 95% confidence interval. The results obtained by the application of the method presented excellent results, showing that the method developed is accurate and accurate.

Keywords: Quality control, spectrophotometry, sulfanilamide.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fórmula estrutural da sulfanilamida.	18
Figura 2 – Composto de coloração alaranjada formado pela reação da sulfanilamida com os demais reagentes.....	27
Figura 3 - Reação de diazotação da sulfanilamida e acoplamento com o reagente cromogênico 8-oxiquinolina em meio alcalino.....	27
Figura 4 -.Gráfico de estabilidade do composto formado com a Sulfanilamida a temperatura ambiente (25°C).....	28
Figura 5 - Gráfico da otimização da concentração do NaNO ₂	29
Figura 6 - Gráfico da otimização da concentração do HCl.	30
Figura 7 - Gráfico da otimização da concentração da 8-oxiquinolina.....	30
Figura 8 - Gráfico da otimização da concentração do NaOH.	31
Figura 9 - Curva analítica para determinação da sulfanilamida.	32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Condições estudadas e otimizadas do método.....	31
Tabela 2 – Resultado das figuras de mérito do método.....	32
Tabela 3 – Resultado da adição de padrão da Sulfanilamida	33
Tabela 4 – Resultado obtido pela aplicação do método e tratamento estatísticos.....	34

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

BPF – Boas Práticas de Controle de Qualidade na Indústria Farmacêutica

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CRTR- Projeto de Reatores de mistura

CV – Coeficiente de Variação

HCl – Ácido clorídrico

HPLC-UV- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência na região do Ultra Violeta

IC – Intervalo de confiança

ISE'S – Eletrodos de Íons Seletivos

LOD – Limite de detecção

LOQ – Limite de quantificação

NaNO₂ – Nitrito de sódio

NaOH – Hidróxido de sódio

OMS – Organização Mundial de Saúde

SALLE – Extração Líquido-Líquido Miniaturizado em Sistema de Seringa

SFZ – Sulfametoxazol

SNA – Sulfanilamida

TLC – Cromatografia em Camada Fina

UV – Ultravioleta

VIS – Visível

$\lambda_{\text{máx}}$ – Comprimento de onda de máxima absorbância

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. OBJETIVO (S).....	17
2.1 Objetivo Geral:.....	17
2.2 Objetivos Específicos:.....	17
3. REFERENCIAL TEÓRICO	18
3.1 Medicamentos e Antibióticos.....	18
3.2 Métodos para Determinação da Sulfanilamida	19
3.3 Método Espectrofotométrico UV-VIS	21
3.4 Medidas espectrofotométricas para identificação de Sulfonamidas.....	22
3.5 Validação de Metodologias Analíticas.....	23
4.0 PARTE EXPERIMENTAL.....	24
4.1 Instrumentação básica	24
4.2 Reagentes e soluções.....	24
4.3 Preparo das soluções utilizadas	24
4.4 Estudo da reação e determinação do comprimento de onda de máxima absorbância.....	25
4.5 Estudo da estabilidade óptica dos produtos.....	25
4.6 Otimização das condições experimentais.....	25
4.7 Validação do método.....	25
4.8 Amostra	26
4.8.1 Preparo da amostra.....	26
4.9 Estudo de efeito de matriz.....	27
4.10 Aplicação analítica	27
5.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
5.1 Estudo da reação e determinação do comprimento de onda de máxima absorbância.....	27
5.2 Estudo da estabilidade óptica dos produtos.....	29
5.3 Otimização das variáveis.....	29
5.4 Construção da curva analítica	32
5.5 Estudo de efeito de matriz.....	34
5.6 Aplicação analítica	34
6.0 CONCLUSÕES.....	36
7.0 REFERÊNCIAS	37

1. INTRODUÇÃO

A realização do controle de qualidade nas indústrias farmacêuticas objetiva averiguar que os produtos estejam dentro dos padrões de qualidade requeridos. As principais vantagens neste controle envolvem a otimização de processos, padronização de procedimentos, qualidade do ambiente, dos insumos de matéria-prima e dos produtos finais (ROCHA; GALENDE, 2014).

É importante ressaltar que a segurança de um medicamento, independente da sua classe, está intimamente relacionada à sua qualidade. E, para isso são realizados vários ensaios, a partir do momento em que a matéria-prima chega à indústria, onde se verifica a identidade, até a pureza desta, impedindo a viabilidade de medicamento falsificado (SILVA et al., 2017).

Os medicamentos falsificados ou irregulares são aqueles que não apresentam em sua composição o princípio ativo ou uma quantidade inferior deste na formulação do medicamento. Entre os mais falsificados, pode-se destacar os antibióticos, antiprotozoários, hormônios e esteroides, provavelmente por serem os mais vendidos e os de maiores valores atribuídos. O faturamento obtido pela falsificação é enorme, levando em consideração os menores custos sem os padrões de qualidade (NOGUEIRA et al., 2011).

O crescimento do número de medicamentos falsificados e irregulares, segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), teve um aumento significativo a partir do ano de 2010 representando 7% a mais com relação aos anos anteriores (NOGUEIRA et al., 2011).

Dentre os fatores que facilitam a ocorrência de falsificações os mais comuns são: falta de legislação, sanções penais fracas, autoridades nacionais regulatórias deficientes ou ausentes, fraco cumprimento de leis relativas a medicamentos, falta de controle de medicamentos para exportação, entre outros (BRASIL, 2005). Nesse sentido, Roca et al. (2007) ressaltam a necessidade do desenvolvimento de métodos analíticos eficazes e confiáveis para o controle de qualidade dos medicamentos comercializados, tornando-se indispensável o desenvolvimento de rotinas de análises que, além de servirem para esse propósito, favoreçam sua implantação em comparação aos métodos usuais.

A ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) regulamenta por meio da Resolução RDC nº 17 de 16 de abril de 2010, as Boas Práticas de Controle de Qualidade na Indústria Farmacêutica (BPF) assegurando que os produtos produzidos e controlados estejam dentro dos padrões de qualidade apropriados para o uso pretendido e requerido pelo registro.

Em conformidade com as BPF, as empresas farmacêuticas devem identificar quais os trabalhos de qualificação e validação necessários para o controle de qualidade. Dentre esses destacam-se a validação dos procedimentos de limpeza, os sistemas computadorizados e os métodos analíticos (AMORIM et al., 2013; BRASIL, 2010a).

Segundo Valentini, Sommer e Matioli (2007), para que um método analítico seja aplicado no controle de qualidade de um fármaco específico, demonstrando confiabilidade, é necessário a sua validação. A validação significa a padronização, com a mesma qualidade e dentro das exigências requeridas. Dentre os principais parâmetros de validação destacam-se: exatidão, precisão, especificidade, limite de detecção, limite de quantificação, linearidade, intervalo de aceitação, robustez ou resistência e conformidade do sistema.

A qualidade de um método analítico é determinada pela peculiaridade de suas etapas, pelos seus erros experimentais e, também, pela técnica de amostragem utilizada. São comuns as interferências geradas pelos analitos e as incompatibilidades com seus respectivos equipamentos. Para tais problemas são empregados procedimentos de preparo da amostra, com os quais se procura isolar e concentrar os analitos a níveis adequados e obter um nível de limpeza da amostra que não comprometa a sua análise química. Desta forma, o preparo da amostra também inclui a sua adequação com a técnica que fornecerá os dados químicos (ROCA et al., 2007).

Dentro deste contexto é bastante significativo o suporte que a Química Analítica tem dado a indústria, no que diz respeito às rotinas nos laboratórios de controle de qualidade e de processos de produção. Logo, o desenvolvimento e aprimoramento de técnicas analíticas como a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e a espectrofotometria possuem grande aplicação em formulações farmacêuticas para o controle de qualidade, por serem métodos precisos e seletivos. Entretanto, a cromatografia é demorada e requer operações de pré-tratamento da amostra para poder ser aplicada com bons resultados. Ao contrário da espectrofotometria, que é uma técnica mais rápida, simples e facilmente automatizada (VALENTINI; SOMMER; MATIOLI, 2007; RUFINO, 2004; FERNANDES, 2011).

Por conseguinte, esse estudo contribuirá relevantemente para demonstrar por meio de métodos como realizar determinação de fármaco com o menor custo possível. A pesquisa torna-se ainda mais importante tendo em vista que a sulfanilamida (SNA) ainda hoje é usada em países em desenvolvimento devido à acessibilidade da droga. Deste modo, o vasto sucesso comercial desses agentes medicinais tem feito a química das sulfas se tornar uma área importante de pesquisa (JINZHANG et al., 2007; NAGARAJA et al., 2002).

Todavia, as diversas pesquisas já elaborada com o uso da espectrofotometria UV-VIS não foram aplicadas até então na quantificação do fármaco em estudo, (SNA), em formulações farmacêuticas.

2. OBJETIVO (S)

2.1 Objetivo Geral:

Otimizar e validar um método espectrofotométrico com detecção na região do visível para determinação da sulfanilamida na forma farmacêutica líquida.

2.2 Objetivos Específicos:

- Otimizar os parâmetros experimentais envolvidos no método proposto e posterior validação das metodologias desenvolvidas (seletividade, sensibilidade, exatidão, precisão, limite de detecção, limite de quantificação, linearidade, etc).
- Utilizar a espectrofotometria para a quantificação de antibiótico da classe das sulfonamidas na região visível do espectro eletromagnético.
- Aplicar o método na determinação de sulfanilamida em amostra comercial de uso animal na forma farmacêutica líquida.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Medicamentos e Antibióticos

De acordo com a Resolução RE nº 49 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2010b), medicamento é “o produto farmacêutico, tecnicamente, obtido, ou elaborado, que contém um ou mais fármacos e outras substâncias, com finalidade profilática; curativa; paliativa; ou para fins de diagnóstico”.

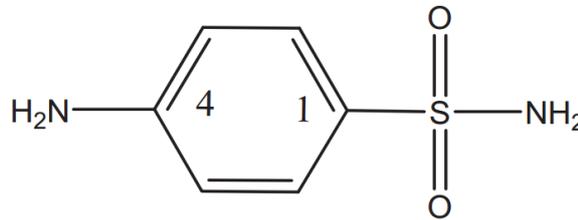
Os medicamentos utilizados para o tratamento de doenças infecciosas são os antimicrobianos, compostos naturais ou sintéticos capazes de inibir ou causar morte de fungos ou bactérias, sendo classificados como bactericidas, quando causam a morte da bactéria, ou bacteriostáticos, quando promovem a inibição do crescimento microbiano (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010; RUFINO, 2009).

Por serem substâncias quimicamente diferentes permite a classificação dos antibióticos em classes, tais como: os lactâmicos (penicilinas e cefalosporinas), as tetraciclina (tetraciclina, doxiciclina, etc.), os aminoglicosídeos (estreptomicina, neomicina e gentamicina), as sulfonamidas (sulfametazina, sulfacetamida, sulfadiazina, dapsona, sulfanilamida) e as quinolonas (norfloxacin, ciprofloxacina, lomefloxacina, perfloxacina, amifloxacina) (DIAS JUNIOR, 2017; RUFINO, 2009).

As sulfonamidas (também chamadas de sulfas) são compostos sintéticos comumente usados na medicina humana e veterinária para o tratamento de infecções. Estes fármacos são agentes bacteriostáticos e quando usados em alta concentração possui efeito bactericida. O sulfametoxazol, por exemplo, é utilizado na medicina para tratamentos de infecções e contra infecções oportunistas em pacientes com o vírus HIV (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010; FERNANDES, 2011).

Estes fármacos são derivados da sulfanilamida (Figura 1), apresentam em comum um anel benzênico substituído por dois grupos orientados nas posições 1 e 4, respectivamente. Na posição 4 encontra-se um grupo amino, na posição 1 o substituinte, o qual modifica as características químicas e farmacológicas do composto (FERNANDES, 2011).

Figura 1: Estrutura da sulfanilamida.



Fonte: Brasil (2010c).

3.2 Métodos para Determinação da Sulfanilamida

De acordo com a Farmacopeia Brasileira, o método oficial para a identificação da Sulfanilamida é a Espectrofotometria no infravermelho (BRASIL, 2010b).

Em levantamento bibliográfico, realizado por Fernandes (2011), no período de 1937 a 2011, foram encontrados aproximadamente 4620 métodos analíticos propostos para a determinação de sulfonamidas.

Em maior número de publicação encontram-se os métodos analíticos baseados em técnicas espectrofotométricas ou eletroquímicas. Possuem grande aplicação em formulações farmacêuticas para controle de qualidade e em alguns casos aplicados em diversas matrizes, tais como: fluídos biológicos (urina, sangue e plasma), alimentos de origem animal (leite, ovos, carnes e mel) e em amostras de água (FERNANDES, 2011).

Sereshti et al. (2014) realizaram um estudo utilizando o método de extração líquido-líquido miniaturizado em sistema de seringa (SALLE) acoplada com cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC-UV), para a extração de sulfanilamida como produtos farmacêuticos polares a partir de amostras de água complexas. A extração foi realizada por injeção rápida do solvente de extração numa solução de amostra salina. O sistema de extração proposto é muito simples, barato e tem potencialidade para ser automatizado. O método foi validado com uma boa linearidade e uma precisão satisfatória.

Kilinc et al. (2009) realizaram uma determinação cromatográfica da sulfanilamida em urina humana. As soluções de sulfanilamida em diferentes concentrações foram manchadas em placa de alumínio HPLC pré-revestida com Silica Gel. As análises espectrofotométricas foram realizadas com o Scanner III no modo absorvente. Foi obtida uma boa correlação ($r = 0,9989$) entre o padrão e a amostra de espectros sobrepostos de

sulfanilamida. Quando o método proposto foi aplicado à urina humana, obteve alta recuperação e análise de componentes sem interferência. Sendo assim, este método pode ser usado para determinar a pureza do medicamento disponível de várias fontes através da detecção de impurezas relacionadas.

Sánchez et al. (2008) desenvolveram um estudo para a análise quantitativa rápida de pós farmacêuticos, evitando o passo demorado de preparação de amostras. As amostras em pó foram medidas numa célula rotativa pelo método da Espectroscopia Raman, utilizando um modelo de calibração univariada simples para a determinação quantitativa de sulfatiazol e sulfanilamida. Valores de desvio padrão relativo (RSD) de 3,35% e 3,46% para sulfatiazol e sulfanilamida, respectivamente, demonstram a boa reprodutibilidade da técnica de medição com a célula rotativa. Conforme estudo, a espectroscopia Raman é uma excelente alternativa para estas análises. Em contrapartida é uma técnica instrumental cara e de baixa sensibilidade.

Jinzhang et al. (2007) utilizaram um método conveniente e sensível para a determinação da sulfanilamida com base na reação química oscilante catalisada por Mn (II). Estudos foram realizados dentro de um reator de 50 mL envolto em um revestimento de recirculação de água. Os reativos foram distribuídos para o CSTR (Projeto de reatores de mistura) e os produtos removidos dele usando uma bomba peristáltica de quatro canais. Os sinais foram registrados como função do tempo a intervalos de 0,1 s. Uma micro-seringa também foi utilizada no experimento para injetar diferentes quantidades de amostras de sulfanilamida. Logo, este método atendeu a essa necessidade, onde apresentou um intervalo amplamente linear ($10^{-8} \sim 10^{-6}$ mol. L⁻¹) e um limite de detecção inferior (10^{-8} mol. L⁻¹).

Nagaraja et al. (2002, 2003, 2007) desenvolveram métodos espectrofotométricos baseados na reação de diazotização para determinação da sulfanilamida com vários compostos orgânicos (fenóis, aminas aromáticas, etc.) utilizando diferentes reagentes de acoplamento. O método não utilizou qualquer oxidante ou catalisador, evitando possíveis erros na determinação de sulfamidas. Os resultados obtidos neste estudo indicaram reprodutibilidade e precisão do método.

Kharitonov e Gorelov (2000) utilizaram o método de Eletrodos de Íons Seletivos (ISE'S) para determinação de algumas drogas de sulfanilamida. Para a síntese das substâncias com eletrodos ativos utilizaram sais de amônio quaternário sintetizado e purificado. O eletrodo foi condicionado durante 24 h em uma solução do fármaco correspondente com concentração 0,01 mol L⁻¹. As medidas potenciométricas foram feitas em um Ionômetro digital eletrônico I-135 e os espectros de infravermelho das substâncias ativas do eletrodo

foram retiradas num Espectrofotômetro Specord 75 IR. As amostras foram preparadas como uma suspensão das substâncias no óleo de vaselina. Assim, este método mostrou que a natureza do grupo ativo do permutador de íons afeta fortemente as propriedades do seu eletroanalítico.

Outro método utilizado para determinação de outras sulfonamidas tais como uma combinação sulfametrol-trimetoprim, sulfanilamida ou sulfafurazole em diferentes dosagens, é o método TLC-densitométricos (Cromatografia em Camada fina). O método densitométrico quantitativo apresentou-se simples, rápido e suficientemente preciso para determinar vestígios de preparações farmacêuticas. A separação por TLC de sulfametoxazol e trimetoprim com medidas densitométricas subsequentes foi descrita utilizando o método de um único padrão. (AGBABA et al., 1996).

3.3 Método Espectrofotométrico UV-VIS

A espectrofotometria é uma técnica de análise largamente utilizada em laboratórios devido às vantagens de ser simples, envolver o uso de equipamento de baixo custo e poder ser facilmente manuseada (WEINERT; PEZZA, L; PEZZA, H, 2008).

Esta técnica instrumental se encaixa em um método físico-químico que está fundamentada na absorção da energia eletromagnética por moléculas que depende tanto da concentração quanto da estrutura das mesmas. De acordo com o intervalo de frequência da energia eletromagnética aplicada, a espectrofotometria de absorção pode ser dividida em ultravioleta, visível e infravermelha, podendo ser utilizada na identificação e quantificação de diversas amostras (BRASIL, 2010b; HURTADO; LASMAR, 2014).

Na espectrofotometria UV-VIS o principal modo de aquisição dos espectros é a transmissão. A transmissão é a medida da diminuição da intensidade da radiação em determinados comprimentos de onda quando a radiação passa através da amostra. Podendo ser calculada pela fórmula a seguir (BRASIL, 2010b; SKOOG et al., 2006):

$$T = \frac{I}{I_0} \quad (\text{Equação 1})$$

, onde I_0 é a intensidade da radiação incidente; e I é a intensidade da radiação transmitida.

Os espectros em transmissão podem ser convertidos para absorbância:

$$A = \text{Log}_{10}\left(\frac{I_0}{I}\right) \quad (\text{Equação 2})$$

Por sua vez, a absorvância de uma solução está relacionada com a radiação transmitida de forma logarítmica, como mostrado na Equação (2). Observe que quando a absorvância de uma solução aumenta, a transmitância diminui.

A análise espectrofotométrica quantitativa por absorção tem como princípio a relação direta entre a quantidade de luz absorvida e a concentração da substância, conhecida como lei de Lambert-Beer. A equação é expressa abaixo (BRASIL, 2010b; SKOOG et al., 2006):

$$A = \varepsilon b c \quad (\text{Equação 3})$$

, sendo A a absorvância, ε a absorvidade molar, b o caminho ótico e c a concentração (mol.L^{-1}).

Esta lei de absorção estabelece que quando a luz atravessa um meio contendo um analito que absorve, um decréscimo na intensidade do feixe de luz ocorre na mesma proporção que o analito é excitado. Assim, quanto maior a concentração do analito, maior será sua absorção de radiação (SKOOG et al., 2006).

Neste contexto, conclui que a identificação de diversas substâncias farmacêuticas pode ser feita utilizando este método, de maneira que a espectrofotometria nas regiões UV-VIS requer soluções com concentração na ordem de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ da substância (BRASIL, 2010b).

3.4 Medidas espectrofotométricas para identificação de Sulfonamidas

Entre os procedimentos baseados em medidas espectrofotométricas reproduzidos para identificação das drogas de Sulfonamidas, observa-se que a maioria baseia-se na reação de diazotação das sulfas com um respectivo agente cromogênico. Nesta reação, ocorre um acoplamento da sulfonamida com um específico agente cromogênico, obtendo um sal diazônio. Em seguida, o sal diazônio é acoplado com fenóis ou aminas aromáticas, obtendo como produto uma solução colorida, a qual é espectrofotometricamente monitorada (FERNANDES, 2011).

A reação de diazotação é comum para a determinação de sulfonamidas com variações no reagente de acoplamento empregado. Na literatura são encontradas várias outras reações para a determinação espectrofotométrica de Sulfas.

Raja et al. (2008) apresentaram um método espectrofotométrico simples e rápido para determinação de sulfametoxazol (SFZ) usando cloreto de ferro e ferrocianeto de potássio, como reagentes. Amin e Zareh (1996) propuseram o uso da mistura formaldeído – acetilcetona como reagente cromogênico para a determinação de Sulfas. Al-Abachi et. al.

(1990) sugeriram o uso da reação de acoplamento oxidativo utilizando cloridrato de prometazina para a determinação de sulfas em formulações farmacêuticas.

3.5 Validação de Metodologias Analíticas

A validação de um método analítico tem como finalidade fornecer dados oportunos, precisos e confiáveis para descoberta, desenvolvimento e fabricação de produtos farmacêuticos, entre outros. Os dados obtidos nas análises devem servir para estudos de apoio no monitoramento da estabilidade de fármacos, assim como, para as novas formulações. Logo, validar um método analítico significa averiguar se a metodologia é adequada as condições de uso (VALENTINI; SOMMER; MATIOLI, 2007).

As metodologias analíticas usadas para avaliar a conformidade de produtos farmacêuticos com especificações estabelecidas devem atingir padrões adequados de seletividade, sensibilidade, exatidão, precisão, limite de detecção, limite de quantificação, linearidade, faixa de aplicação e robustez (ROCA et al., 2007).

A seletividade é definida como sendo a aptidão de medir exata e especificamente o fármaco na presença de outros constituintes da amostra. A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados por ele obtido comparado ao valor verdadeiro. A precisão é o grau de conformidade entre os resultados de medidas independentes em torno de um valor central, efetuada repetidamente em uma mesma amostra homogênea. A exatidão e a precisão estão entre os principais atributos, porém, há diversos fatores que conseguem comprometê-los causando erros ocasionais, por exemplo, a calibração de equipamentos, temperatura irregular do laboratório, umidade, componentes da amostra, entre outros (RUBIM et al., 2012).

O limite de detecção e quantificação são outras especificações da validação analítica. O primeiro refere-se a menor quantidade de uma substância presente em uma amostra que possa ser detectado, porém sem quantificá-lo. O segundo, está relacionado a menor quantidade de um composto presente em uma amostra que possa ser definido com precisão e conformidade aceitáveis sob condições experimentais evidentes (RUBIM et al., 2012).

A linearidade de um método valida se os resultados atingidos são diretamente proporcionais à concentração do fármaco na amostra, dentro de um intervalo especificado. E a robustez de um método analítico mede sua sensibilidade acerca de pequenas variações que podem advir durante as análises (GOMES; CUNHA JÚNIOR, 2012).

Assim, a validação de todas essas especificações torna-se um instrumento de extrema relevância para o controle de qualidade e êxito de uma pesquisa analítica.

4.0 PARTE EXPERIMENTAL

4.1 Instrumentação básica

- Balança analítica Marte, modelo AW-220;
- Espectrofotômetro FEMTO Cirrus 80MB;
- Micropipetas de (10 – 100 μL); (100 – 1000 μL) e de (1000 – 5000 μL)
- Papel de filtro qualitativo QUALY.

4.2 Reagentes e soluções

- 8-oxiquinolina (Riedel-de Haen A-G, Alemanha);
- Ácido clorídrico PA;
- Amostra comercial de uso animal da Sulfanilamida;
- Sulfanilamida (Henrifarma, Brasil), Pureza 100,2 %;
- H_2O destilada;
- Nitrito de sódio cristalizado (Proquímicos, Brasil);
- Hidróxido de sódio PA.

4.3 Preparo das soluções utilizadas

- Soluções de Sulfanilamida - SNA ($5,81 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$):** dissolução de 0,05 g de SNA, em 10 mL de etanol e completou-se o volume com água destilada num balão volumétrico de 50 mL.
- Solução de ácido clorídrico - HCl ($1,80 \times 10^{-1} \text{ mol L}^{-1}$):** foi preparada com adição de 9 mL de HCl e completou-se o volume de 500 mL com água destilada. Esta solução foi padronizada a partir de uma solução de hidróxido de sódio e armazenada em um frasco de vidro.
- Solução de nitrito de sódio – NaNO_2 ($1,04 \times 10^{-1} \text{ mol L}^{-1}$):** dissolução de 0,36 g de nitrito de sódio em 50 ml água destilada em balão aferido. A solução foi mantida em um balão volumétrico.
- Solução de hidróxido de sódio - NaOH ($2,00 \times 10^{-1} \text{ mol L}^{-1}$):** dissolução de 4,4 g de NaOH e completou-se o volume de 500 mL com água destilada. Esta solução foi

padronizada a partir de uma solução de biftalato de potássio e foi armazenada em um frasco de plástico.

- e) **Solução de 8-oxiquinolina, 50 mg / 50 ml ($7,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$):** dissolução de 0,05 g de 8-oxiquinolina em etanol.

4.4 Estudo da reação e determinação do comprimento de onda de máxima absorbância

Inicialmente, foram avaliadas as condições de ocorrência da reação de diazotação do antibiótico sulfanilamida com nitrito de sódio em meio ácido e posterior acoplamento do reagente cromogênico 8-oxiquinolina na presença de hidróxido de sódio. O procedimento baseia-se na reação de Griess (RAMOS et al., 2006). Para determinação do comprimento de onda de máxima absorbância ($\lambda_{\text{máx}}$) realizou-se a varredura do espectro eletromagnético no espectrômetro UV-Vis de 200 nm à 800 nm com caminho óptico de 1 cm.

4.5 Estudo da estabilidade óptica dos produtos

Realizou-se o estudo da estabilidade óptica dos produtos formados pela reação em temperatura ambiente (25 °C) durante 60 minutos, em intervalos de 5 minutos.

4.6 Otimização das condições experimentais

Os parâmetros envolvidos foram otimizados por um método univariado (p.ex: as melhores condições de estabilidade dos compostos, concentração dos reagentes, ordem de adição dos reagentes) e o programa Origin 6.0 foi utilizado para tratamento dos dados obtidos.

4.7 Validação do método

O método proposto foi validado a partir da avaliação dos parâmetros de: linearidade, limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ), precisão e exatidão.

A linearidade de um método analítico está relacionada com a sua capacidade de originar sinais que são diretamente proporcionais à concentração do analito, num determinado intervalo (PIMENTA, 2003). Para a determinação deste, o número de níveis de concentração das soluções foram de oito. Cada nível de concentração teve sua solução preparada três vezes. Isso resultou em um número total de vinte e quatro soluções de calibração independentes, as quais foram medidas no espectrofotômetro UV-VIS.

O limite de detecção é definido como a mais baixa concentração de analito numa amostra que pode ser detectado, mas não necessariamente quantificado, e o limite de

quantificação como a menor concentração de analito que pode ser quantificada com níveis de precisão e exatidão previamente definidos, nas condições experimentais estabelecidas (ICH et al., 2005; SKOOG et al., 2006;):

$$\text{LOD} = 3,3 \sigma / s \quad (\text{Equação 4})$$

$$\text{LOQ} = 10 \sigma / s \quad (\text{Equação 5})$$

onde “ σ ” é o desvio padrão do branco e “ s ” é o coeficiente angular da reta.

O erro absoluto de uma medida é a diferença entre o valor analisado e o valor verdadeiro da medida (SKOOG et al., 2006):

$$E = x_i - x_v \quad (\text{Equação 6})$$

onde “ x_i ” é o valor analisado e o “ x_v ” é o valor verdadeiro.

O coeficiente de variação (CV) é o desvio padrão relativo em termos percentuais (SKOOG et al., 2006; PIMENTA, 2003):

$$\text{CV} = (s / \bar{x}) \cdot 100\% \quad (\text{Equação 7})$$

onde “ s ” é o desvio padrão e “ \bar{x} ” é média das medidas.

E o intervalo de confiança de 95% (IC 95%) é a faixa entre os quais se espera que a média da medida x esteja contida em certo grau de probabilidade (SKOOG et al., 2006):

$$\text{IC para } x = \bar{x} \pm (t \cdot s) / \sqrt{N} \quad (\text{Equação 8})$$

onde “ \bar{x} ” é a média das medidas, “ t ” é o valor relacionado ao nível de confiança, “ s ” é o desvio padrão e “ N ” é o número de medidas.

4.8 Amostra

Foi utilizado uma amostra comercial de uso animal usada no tratamento tópico das otites simples e infecciosas sensíveis à sulfanilamida para cães, com concentração equivalente a 10 mg/mL.

4.8.1 Preparo da amostra

Foram preparadas três amostras a partir da amostra estoque. A amostra estoque foi preparada em um balão volumétrico com 500 μL do medicamento completando-se o volume

de 25 mL com etanol. Para o preparo das amostras, transferiu-se com micropipetas 400 μL da amostra estoque para um balão volumétrico de 25 mL, em seguida, adicionou-se 500 μL de NaNO_2 , 860 μL de HCl , 250 μL de 8-oxiquinolina e 790 μL de NaOH e o volume completado com água destilada. O sinal de absorvância foi medido em 500 nm contra um branco de reagentes preparado nas mesmas condições que a amostra, exceto pela ausência da amostra.

4.9 Estudo de efeito de matriz

Efeito Matriz é um estudo de seletividade que tem como objetivo verificar possíveis interferências causadas pelas substâncias que compõem a matriz amostral gerando ampliação ou diminuição do sinal instrumental. Assim, esse estudo foi realizado pelo método de adição-padrão. Onde, incrementos de 0, 50, 100, 150 e 200% de solução-padrão foram adicionados a alíquotas das amostras contendo mesmo volume. Entretanto, a curva de adição-padrão obteve cinco níveis de concentração (BRASIL, 2011; SKOOG et al., 2006).

4.10 Aplicação analítica

O método foi aplicado para determinação de sulfanilamida em amostra farmacêutica líquida, com posterior tratamento estatístico dos dados.

5.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Estudo da reação e determinação do comprimento de onda de máxima absorvância

No estudo da reação observou-se a formação de um composto de coloração alaranjada (Figura 2).

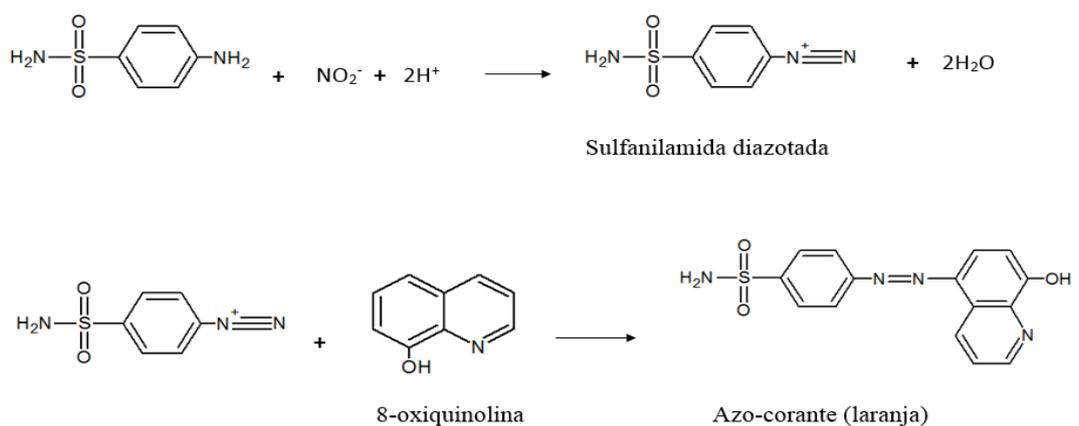
Figura 2: Composto de coloração alaranjada formado pela reação da sulfanilamida com os demais reagentes.



Fonte: Própria.

Nesta reação, ocorre a reação de diazotação da sulfanilamida com o íon nitroso, gerado in situ pela adição de ácido clorídrico e nitrito de sódio e posterior acoplamento com o agente cromogênico 8-oxiquinolina em meio alcalino formando, então, o produto colorido que foi espectrofotometricamente monitorado no intervalo de 200-800 nm.

Figura 3: Reação de diazotação da sulfanilamida e acoplamento com o reagente cromogênico 8-oxiquinolina em meio alcalino.



Fonte: Própria.

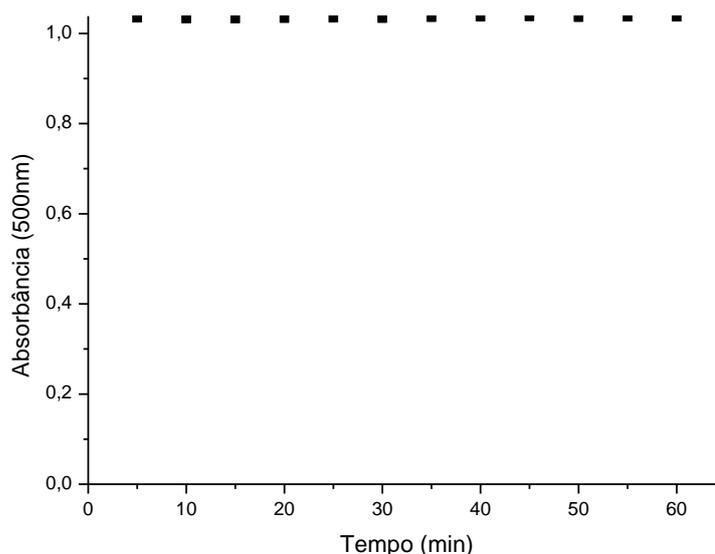
Após a varredura do espectro observou-se que a máxima absorvância do composto ocorreu em 500 nm.

5.2 Estudo da estabilidade óptica dos produtos

Para este estudo, 70 μL da solução estoque de sulfanilamida foi transferida para um balão volumétrico de 10 mL, seguido de 250 μL de NaNO_2 , 250 μL de HCl , 250 μL de 8-oxiquinolina, 250 μL de NaOH e o volume completado para 10 mL com água destilada. Os valores de absorvância dos produtos foram monitorados durante 60 minutos, em intervalos de 5 minutos no comprimento de onda de máxima absorvância ($\lambda_{\text{máx}} = 500 \text{ nm}$) a temperatura ambiente ($25 \text{ }^\circ\text{C}$).

Pode-se observar que o produto formado da reação da sulfanilamida permaneceu estável por pelo menos 60 minutos, pois não houve variação significativa nos valores de absorvância que foram avaliados, como representado na Figura 4.

Figura 4: Gráfico do estudo da estabilidade do composto formado com a sulfanilamida a temperatura ambiente ($25 \text{ }^\circ\text{C}$).



Fonte: Própria.

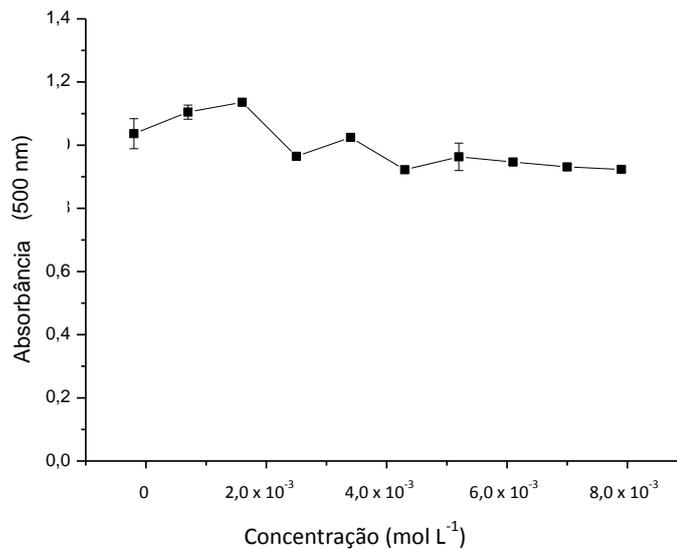
5.3 Otimização das variáveis

A otimização das variáveis neste trabalho teve como objetivo maximizar os resultados das absorvâncias dos reagentes, com o intuito de melhorar as condições para se traçar a curva analítica e minimizar o desperdício de reagente.

Inicialmente foi realizado o estudo da concentração do nitrito de sódio. Para isto, o volume de sulfanilamida 70 μL ($4,10 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$), ácido clorídrico 250 μL ($4,50 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$), 8-oxiquinolina 250 μL ($1,75 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) e NaOH 250 μL ($5,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) foram

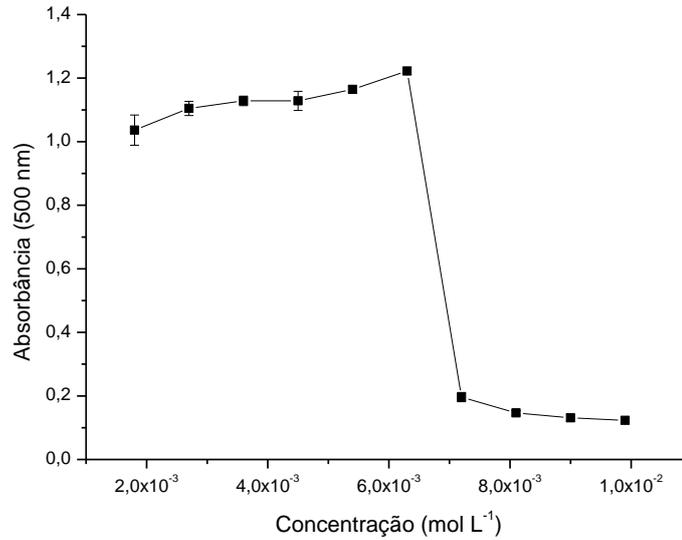
fixados, e realizada a variação do NaNO_2 , na faixa $1,00 \times 10^{-3}$ a $5,50 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. Observe-se na Figura 5 que houve um aumento no sinal da absorbância com o aumento da concentração até aproximadamente $2,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, acima desse valor ocorre um decréscimo na absorbância da solução. Diante desta observação, o valor de $2,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ foi fixado para os demais experimentos.

Figura 5: Gráfico da otimização da concentração do NaNO_2



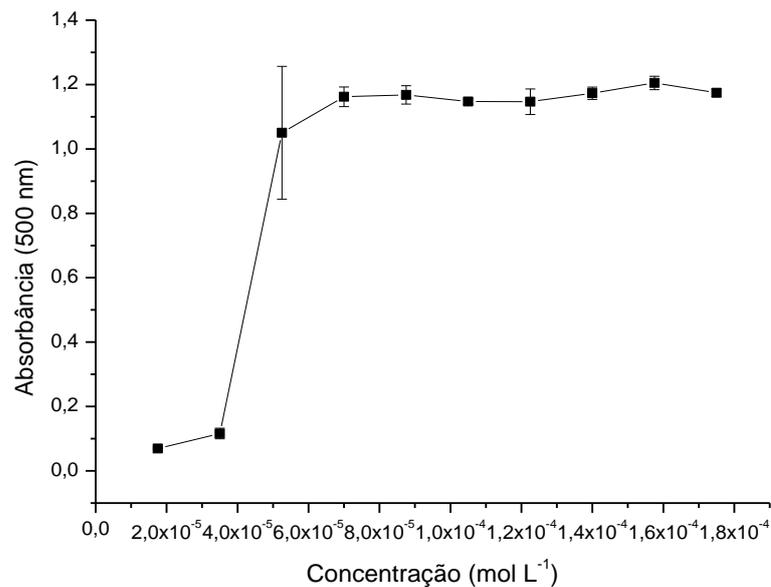
Fonte: Própria

O volume de sulfanilamida $70 \mu\text{L}$ ($4,10 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$), nitrito de sódio $200 \mu\text{L}$ ($2,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$), 8-oxiquinolina $250 \mu\text{L}$ ($1,75 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) e NaOH $250 \mu\text{L}$ ($5,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) foram fixados, e realizada a variação do ácido clorídrico, na faixa $1,80 \times 10^{-3}$ a $9,90 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e apresentou um aumento na absorbância até a concentração de $6,30 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ como representado na Figura 6.

Figura 6: Gráfico da otimização da concentração do HCl.

Fonte: Própria.

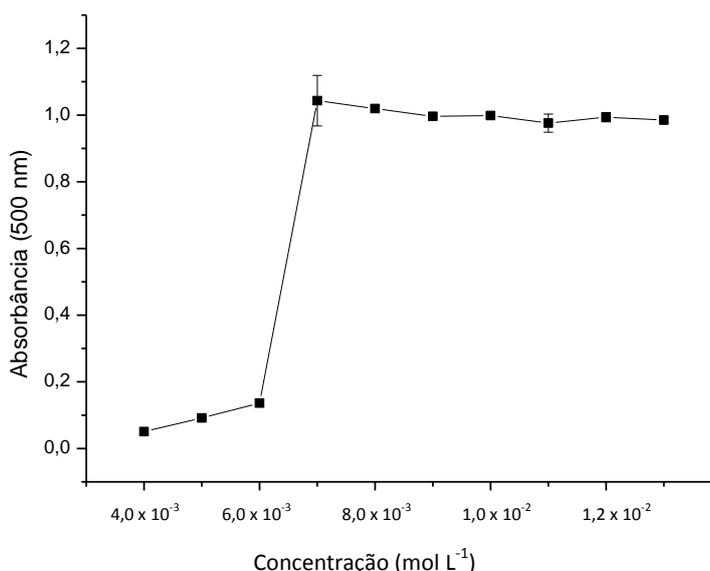
Posteriormente, o volume de sulfanilamida 70 μL ($4,10 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) nitrito de sódio 200 μL ($2,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) ácido clorídrico 350 μL ($6,30 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) e NaOH 350 μL ($7,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) foram fixados e avaliados o reagente cromogênico 8-oxiquinolina (Figura 7), na faixa de concentração de $1,75 \times 10^{-5}$ a $1,75 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$.e apresentou um aumento na absorbância até a concentração de $7,00 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ como representado na Figura 7.

Figura 7: Gráfico da otimização da concentração da 8-oxiquinolina.

Fonte: Própria.

Na última variável otimizada, o volume de sulfanilamida 70 μL ($4,10 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$), nitrito de sódio 200 μL ($2,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$), ácido clorídrico 350 μL ($6,30 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) e 8-oxiquinolina 100 μL ($7,00 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$). A influência do NaOH foi realizada na faixa de concentração entre $2,00 \times 10^{-3}$ a $1,10 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, na Figura 8 como podemos observar um aumento da absorbância até $7,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$.

Figura 8: Gráfico da otimização da concentração do NaOH.



Fonte: Própria.

Na Tabela 1, está representado os valores otimizados dos reagentes utilizados na reação com a sulfanilamida:

Tabela 1: Condições estudadas e otimizadas do método.

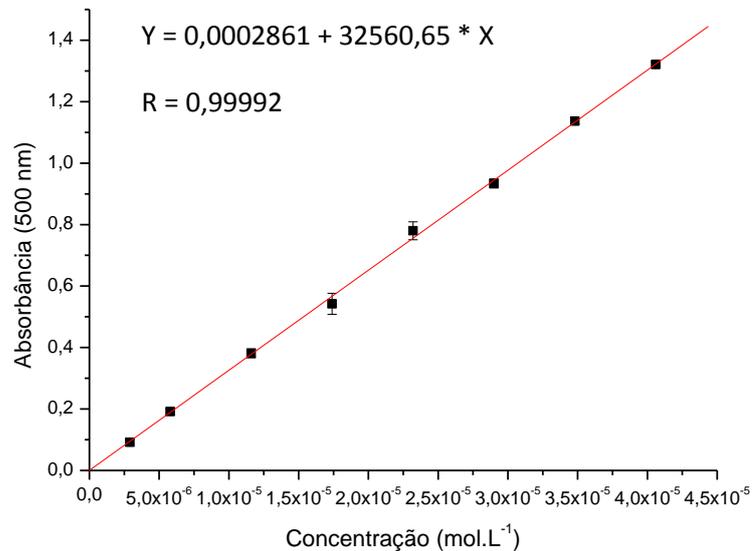
Variáveis estudadas	Faixa de concentração (mol L ⁻¹) estudada	Valores otimizados (mol L ⁻¹)
NaNO ₂	$1,00 \times 10^{-3}$ a $5,50 \times 10^{-3}$	$2,0 \times 10^{-3}$
HCl	$1,80 \times 10^{-3}$ a $9,90 \times 10^{-3}$	$6,3 \times 10^{-3}$
8-oxiquinolina	$1,75 \times 10^{-5}$ a $1,75 \times 10^{-4}$	$7,0 \times 10^{-5}$
NaOH	$2,00 \times 10^{-3}$ a $1,10 \times 10^{-2}$	$7,0 \times 10^{-3}$

5.4 Construção da curva analítica

Para a construção da curva analítica (Figura 9), foram utilizados soluções-padrão preparadas a partir de diluições da solução-padrão estoque, compreendendo concentrações na faixa de $2,90 \times 10^{-6}$ a $4,06 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$.

A partir das otimizações realizadas, a curva analítica foi construída e determinado os resultados das figuras de mérito do método, que estão ilustrados na Tabela 2.

Figura 9: Curva analítica para determinação da sulfanilamida.



Fonte: Própria.

Tabela 2: Resultado das figuras de mérito do método.

Parâmetros	Valores
λ (nm)	500
Faixa linear dinâmica / mol L ⁻¹	2,90 x 10 ⁻⁶ a 4,06 x 10 ⁻⁵
Limite de detecção / mol L ⁻¹	6,60 x 10 ⁻⁹
Limite de quantificação / mol L ⁻¹	2,20 x 10 ⁻⁸
Coefficiente linear (a)	2,86 x 10 ⁻⁴
Coefficiente angular (b)	3,25 x 10 ⁴
Coefficiente de correlação (R)	0,99992
Absortividade molar (ϵ) L mol ⁻¹ cm ⁻¹	3,26 x 10 ⁴

Nagaraja et al. (2002, 2003, 2007) desenvolveram métodos para determinação da sulfanilamida utilizando diferentes reagentes de acoplamento: a) Iminodibenzil apresentou o máximo de absorbância em 570 nm e seu intervalo linear equivalente a 0,1-5,0 $\mu\text{g/mL}$. b) 3-aminofenol apresentou o máximo de absorbância em 460 nm e seu intervalo linear variou de 0,1-5,0 $\mu\text{g/mL}$. c) O reagente 8-hidroxiquinolina apresentou o máximo de absorbância em 500 nm e seu intervalo linear foi de 0,2-6,0 $\mu\text{g/mL}$.

Assim, pode-se observar na Tabela 2 que o método desenvolvido aplicado na determinação da sulfanilamida apresentou uma ampla faixa de linearidade de $2,90 \times 10^{-6}$ a $4,06 \times 10^{-5}$ ($0,5$ a $7,0 \mu\text{g/mL}$) muito similar a outros métodos citados na literatura (NAGARAJA et al. 2002, 2003, 2007).

Logo, a relação linear apresentada (Tabela 2), demonstra que os resultados obtidos pela metodologia analítica possui uma linearidade superior em relação ao critério mínimo aceitável do coeficiente de correlação (r) que deve ser = 0,99 (BRASIL, 2003; BRASIL, 2017).

5.5 Estudo de efeito de matriz

O efeito de matriz foi analisado através da técnica de adição e recuperação de padrão. Dessa forma, foram incorporados valores de 0, 50, 100, 150 e 200% de solução-padrão à alíquotas das amostras de mesma concentração, e os resultados obtidos estão dispostos na Tabela 3.

Tabela 3 – Resultado da adição de padrão da sulfanilamida.

Amostra	Adicionado (mol L^{-1})	Recuperado (mol L^{-1}) \pm Sd	% Recuperada \pm Sd*
	0	-	-
1	$2,90 \times 10^{-6}$	$2,96 \times 10^{-6} \pm 1,86 \times 10^{-7}$	$102,0 \pm 6,4$
	$5,80 \times 10^{-6}$	$5,90 \times 10^{-6} \pm 1,88 \times 10^{-7}$	$101,6 \pm 3,2$
	$8,70 \times 10^{-6}$	$8,70 \times 10^{-6} \pm 3,46 \times 10^{-8}$	$100,0 \pm 0,4$
	$1,16 \times 10^{-5}$	$1,17 \times 10^{-5} \pm 2,08 \times 10^{-7}$	$100,7 \pm 1,8$

*Média \pm Desvio padrão (Sd), $n = 3$.

Como podemos observar na Tabela 3, a porcentagem média de recuperação da adição de padrão teve uma variação de 102,0 a 100,7% com desvio máximo de 6,4%. Esses resultados mostram que não houve efeito significativo de matriz, demonstrando uma boa exatidão e precisão do método (BRASIL, 2003; BRASIL, 2017).

5.6 Aplicação analítica

O método desenvolvido foi aplicado para determinação da sulfanilamida em amostra farmacêutica líquida e os resultados, assim como os tratamentos estatísticos estão ilustrados na Tabela 4.

Tabela 4 – Resultado obtido pela aplicação do método e tratamentos estatísticos.

Amostra	Valor nominal*	Resultados (%)	Média±Sd	Erro	CV	IC 95%
1	100,0 mg	102,8 103,0 102,8	102,8 ± 0,1	+2,8	0,1%	103,0 a 102,6

*100 mg/10 mL;

A precisão do método analítico avalia a proximidade dos resultados de medidas independentes em torno de um valor central, obtidos em uma série de medidas de uma amostra homogênea. O valor do Coeficiente de Variação (CV%), preconizado para este estudo é de 5,0%, segundo a resolução RE nº 899 (BRASIL, 2003; BRASIL, 2017). Conforme descrito na Tabela 4, o valor médio obtido nesta análise foi de 102,8% e coeficiente de variação de 0,1%, evidenciando a precisão do método.

Logo, realizar uma análise química que seja totalmente livre de erros ou incertezas é praticamente impossível. Apenas podemos desejar minimizar os erros e estimar sua grandeza com uma exatidão aceitável. A confiabilidade para este método estima o Intervalo de Confiança (IC) em um nível de 95%. O valor de IC obtido nesta análise variou de 102,6 a 103,0 %, demonstrando exatidão do método (SKOOG et al., 2006).

6.0 CONCLUSÕES

As condições analíticas estabelecidas no método por espectrofotometria na região do visível demonstraram seletividade, linearidade, precisão e exatidão, adequadas para a determinação quantitativa de sulfanilamida em amostra farmacêutica líquida.

O método desenvolvido é simples, rápido e fácil de ser executado. O mesmo apresentou boa linearidade na faixa de concentração de $2,90 \times 10^{-6}$ a $4,06 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Os limites de detecção ($6,60 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$) e quantificação ($2,20 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$) ficaram abaixo do intervalo de concentração investigado. Os resultados obtidos pela aplicação do método apresentaram excelentes resultados, mostrando que o método desenvolvido é preciso e exato.

7.0 REFERÊNCIAS

- AGBABA, D. et al. Simultaneous TLC Determination of Co-trimoxazole and Impurities of Sulfanilamide and Sulfanilic Acid in Pharmaceuticals. **Journal of Chromatographic Science**, v. 34, 1996.
- AL-ABACHI, M. Q. et. al. Application of promethazine hydrochloride as a chromogenic reagent for the spectrophotometric determination of certain sulphonamide drugs. **Fresenius J Anal Chem**, v. 227, p. 408-411, 1990.
- AMIN, A. S. ZAREH, M. M. Acetylacetone-formaldehyde reagent for the spectrophotometric determination of some sulfa drugs in pure and dosage forms. **Mikrochim, Acta**, v. 124, p. 227-233, 1996.
- AMORIM, S. R. et. al. Controle de qualidade na indústria farmacêutica: identificação de substâncias por espectroscopia no infravermelho. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 94, n. 3, p. 234-242, 2013.
- BÍBLIA, A. T. 1 Samuel. In BÍBLIA. Português. **Bíblia Sagrada**: Nova Tradução na Linguagem de Hoje. Barueri (SP): Sociedade Bíblica do Brasil, 2009. p. 257.
- BRASIL. Farmacopeia Brasileira, volume 1. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: **Anvisa**, 2010b.
- BRASIL. Farmacopeia Brasileira, volume 2. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: **Anvisa**, 2010c.
- BRASIL. Medicamentos falsificados: diretrizes para desenvolvimento de combates a medicamentos falsificados. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: **Anvisa**, 2005.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Guia de validação e controle de qualidade analítica: fármacos em produtos para alimentação e medicamentos veterinários**. Secretaria de Defesa Agropecuária. – Brasília: Mapa/ACS, 2011.
- BRASIL. Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC Nº 17 de 16 de abril de 2010a: Dispõe sobre as Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos**. Disponível em: <ftp://ftp.saude.sp.gov.br/ftpseesp/bibliote/informe_eletronico/2010/iels.abr.10/iels73/U_RS-MS-ANVISA-RDC-17_160410.pdf> Acesso em: 02 set 2017.
- BRASIL. Resolução RE nº 899, de 29/05/2003. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 02 de maio de 2003.
- BRASIL. Resolução RE nº 166, de 24/07/2017. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: **Anvisa**, 2017.
- DIAS JUNIOR, J. F. **Desenvolvimento e validação de um método espectrofotométrico para determinação de dapsona em formas farmacêuticas sólidas**. 2017. 41 f. Monografia (Bacharelado em Química) – Universidade Federal da Paraíba, Areia, 2017.

- FERNANDES, F. C. B. **Desenvolvimento de métodos limpos para screening e determinação de sulfonamidas em matrizes diversas**. 2011. 118 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Departamento de Química, Universidade Estadual Paulista de Araraquara, 2011.
- GOMES, E. C. L. CUNHA JUNIOR, A. S. Desenvolvimento e validação de método analítico para quantificação do fármaco bevacizumabe por cromatografia a líquido de alta eficiência. **Química Nova**, São Paulo, v. 35, n. 3, p. 608-611, 2012.
- GUIMARÃES, D. O. MOMESSO, L. S. PUPO, M. T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 3, p. 667-679, 2010.
- HURTATO, R. L. LASMAR, M. C. Medicamentos falsificados e contrabandeados no Brasil: panorama geral e perspectivas de combate ao seu consumo. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 30, n. 4, p. 891-895, abr, 2014.
- JINZHANG, G. et. al. Determination of sulfanilamide based on the Mn (II)-catalyzed oscillating chemical reaction. **Journal of Chemistry**, Central European, v. 5, n. 2, p. 581-589, 2007.
- KHARITONOV, S. V. GORELOVO, I. P. Ion-selective electrodes for determination of some sulfanilamide drugs. **Pharmaceutical Chemistry Journal**, v. 34, n. 12, 2000.
- KILINC, E. et al. Stability-Indicating High Performance Thin Layer Chromatographic Determination of Sulfanilamide in Human Urine. **Journal of Analytical Chemistry**, v. 64, n. 7, p. 714-720, 2009.
- International Conference on Harmonisation: ICH Harmonised Tripartite Guideline. **Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology**. Q2(R1), nov. 2005. p. 13.
- NAGARAJA, P. et al. 3-Aminophenol como um novo agente de acoplamento para o espectrofotométrico determinação de derivados de sulfonamida. **IL Farmaco**, v. 58, p. 1295-1300, 2003.
- NAGARAJA, P. et al. 3- A sensitive spectrophotometric method for the determination of sulfonamides in pharmaceutical preparations. **IL Farmaco**, v. 57, p. 333-342, 2007.
- NAGARAJA, P. et al. 3- Iminodibenzyl as a novel coupling agent for the spectrophotometric determination of sulfonamide derivatives. **IL Farmaco**, v. 53, p. 187-192, 2002.
- NOGUEIRA, E. et al. Falsificação de medicamentos e a lei n. 11.903/09: aspectos legais e principais implicações. **Revista de Direito Sanitário**, São Paulo, v. 12, n. 2, p. 112-139, 2011.
- PANDYA, J. et. al. Development and validation of differential spectrophotometric method for determination of Pantoprazole in tablete dosage form. **Journal of Pharmaceutical Science and Bioscientific Research (JPSBR)**, v. 2, n.1, 2012.

PIMENTA, A. M. **Controle de formulações farmacêuticas baseado em sistemas de exatidão aferida**. 2003. 209 f. Dissertação (Doutorado em Farmácia) – Departamento de Farmácia, Universidade do Porto, Portugal, 2003.

RAJA, G. V. et. al. Simple and rapid methods for the analysis of Sulfonamide bacteriostatic antibiotic in dosage forms. **Oriental Journal of Chemistry**, v. 24, n. 3, p. 1021-1024, 2008.

RAMOS, L. A. et al. Determinação de nitrito em águas utilizando extrato de flores. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 5, p. 1114-1120, 2006.

RÊGO, J. F. et. al. Determinação de Olanzapina em formulações farmacêuticas por espectrofotometria: desenvolvimento e validação. **Química Nova**, v. 33, n. 2, p. 471-477, 2010.

ROCA, M. F. et al. Desenvolvimento e validação de método analítico: passo importante na produção de medicamentos. **Revista Brasileira de Farmácia**, Rio de Janeiro, v. 88, n. 4, p. 177-180, 2007.

ROCHA, T. G. GALENDE, S. B. A importância do controle de qualidade na indústria farmacêutica. **Revista Uningá Review**, v. 20, n. 2, p. 97-103, 2014.

RUBIM, A. M. et al. Validação de metodologia por UV/VIS para quantificação de cetoconazol em comprimidos. **Revista Brasileira de Farmácia**, Rio de Janeiro, v. 93, n. 4, p. 510-514, 2012.

RUFINO, J. L. **Desenvolvimento de metodologias analíticas para controle de qualidade de fármacos, utilizando-se técnicas espectroscópicas (NIR e MID) e processos de calibração multivariada (pls)**. 2004. 116 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Departamento de Química, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2004.

RUFINO, J. L. **Desenvolvimento de métodos analíticos para determinação de tetraciclina, doxiciclina, azitromicina, norfloxacin e ciprofloxacina em formulações farmacêuticas**. 2009. 146 f. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista de Araraquara, São Paulo, 2009.

SÁNCHEZ, M. L. et al. Pharmaceutical powders analysis using FT- Raman spectrometry: simultaneous determination of sulfathiazole and sulfanilamide. **Talanta**, v. 74, p. 1603-1607, 2008.

SILVA, C. B. et. al. Desafios ao controle da qualidade de medicamentos no Brasil. **Cad. Saúde Coletiva**, v. 25, n. 3, p. 362-370, 2017.

SERESHTI, H. et al. Miniaturized salting-out liquid-liquid extraction in a coupled-syringe system combined with HPLC-UV for extraction and determination of sulfanilamide. **Talanta**, v. 121, p. 199-204, 2014.

SKOOG, A. D. et al. **Fundamentos de Química Analítica**, Tradução da 8ª Edição norte-americana, São Paulo: Editora Thomson, 2006. 1058 p.

VALENTINI, S. R. SOMMER, W. A. MATIOLI, G. Validação de métodos analíticos. **Arquivos do Mudi**, Maringá, v. 11, n. 2, p. 26-31, 2007.

WEINERT, P. PEZZA, L. PEZZA, H. R. Determinação espectrofotométrica de citrato de sildenafil em formulações farmacêuticas. **Química Nova**, São Paulo, v. 31, n. 5, p. 1112-1116, 2008.