

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JULIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CAMPUS DE ARARAQUARA**

***ANÁLISE QUÍMICO-FARMACÊUTICA DE AZUMOLENO
SÓDICO***

MARCELO AUGUSTO CAVARETTI HIENE

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Hérica Regina Nunes Salgado

ARARAQUARA – SP

2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JULIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CAMPUS DE ARARAQUARA

ANÁLISE QUÍMICO-FARMACÊUTICA DE AZUMOLENO
SÓDICO

MARCELO AUGUSTO CAVARETTI HIENE

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Hérica Regina Nunes Salgado

ARARAQUARA – SP

2009

Ficha Catalográfica

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

H633a Hiene, Marcelo Augusto Cavaretti
Análise químico-farmacêutica de azumoleno sódico. / Marcelo Augusto Cavaretti Hiene. – Araraquara, 2009.
106 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas

Orientador: Hérica Regina Nunes Salgado

1. Azumoleno sódico. 2. Hipertermia maligna. 3. Métodos analíticos.
4. Validação. I. Salgado, Hérica Regina Nunes, orient. II. Título.

CAPES: 40300005

*"Deus nos concede, a cada dia, uma página de vida nova no livro do tempo. Aquilo que colocarmos nela, corre por nossa conta" **Chico Xavier***

"Antes de fazer a coisa para os homens, é preciso formar os homens para a coisa, como se formam obreiros, antes de lhes confiar um trabalho. Antes de construir, é preciso que nos certifiquemos da solidez dos materiais. Aqui os materiais sólidos são os homens de coração, de devotamento e abnegação"
Allan Kardec

*À minha **família**, agradeço por todo amor e ensinamentos que me ofereceram.*

AGRADECIMENTOS

No decorrer deste trabalho foram descobertas diversas conotações para a palavra colaboração. Pois trabalhar em conjunto neste caso poucas vezes significou cooperação técnica ou científica. Minha gratidão se difunde, portanto desde os momentos de auxílio para minha formação pessoal até a profissional.

De forma inevitável venho primeiramente demonstrar gratidão a Deus, o qual tem me guiado por todos os momentos de minha vida.

Meus pais, Carlos Henrique Hiene e Maria Alice Cavaretti Hiene que tenho como verdadeiros heróis, e considero a verdadeira base do que sou. De forma alguma conseguiria expressar tanto amor e gratidão por palavras ou atitudes nessa única vida.

Aos meus irmãos, Fernando e Patrícia que como eu, agraciados por magníficos pais, desempenham papéis únicos em meu cotidiano, com confidencialidade, companheirismo e diversão. À Andréia Vitorino, um indiscutível membro de minha família por todos os anos juntos à nossa casa.

Agradeço também a todos meus muitos parentes e aos meus avôs paternos Hayde e Hidalino e maternos, Francisco e Aparecida por acompanharem tão de perto e com tanto carinho a trajetória de todos seus netos.

Orientador, pela própria significância do contexto é aquele que gerencia um trabalho de forma sábia, cujas características teremos como base em um mundo acadêmico, logo, demonstro minha gratidão pelo aceite da Prof^a. Dr^a. Hérica Regina Nunes Salgado em não apenas acompanhar de perto o desenvolvimento dessa pesquisa, mas de deixar transparecer toda dignidade e seriedade com que desenvolve suas atividades na busca por uma melhor pós-graduação, para que nesses parâmetros profissionais tracemos nosso futuro.

Aos meus colegas de laboratório Flávia Angélica, Edith Cristina, Rudy, Josilene, Lucélia, Adam, Daniela, Andréia Moreno, Beatriz, Gabriela, Luana, Verônica, entre muitos outros, pela partilha de vivências na qual me guiou até a finalização da pesquisa e mesmo pelos momentos de companheirismo, no qual não posso deixar de citar Fátima Rodrigues, que através de sua simpatia, frequentes sorrisos e quando se fez necessária firmeza cativa a todos no laboratório e o mantém acessível para o desenvolvimento de nossas atividades.

A todos os amigos de longas datas e claro, aos que assim se mantiveram ao ingressar nessa etapa de minha vida, como os eternos companheiros e confidentes Leonardo Gorla Nogueira e Danilo Fuin Dignani. Também aos grandes amigos que fiz e aos que participaram de meu cotidiano como Olívia e Marcelo Gonzaga.

À Renata Maria Cury Rodrigues, amiga de longas datas, namorada de uma hora para outra, justamente como se nascem os mais intensos amores e destinada, de uma forma ou outra a ter-me ao seu lado, ora aprendendo, ora ensinando e ora calado, contemplando tudo aquilo que vivemos e planejando aquilo que desejamos viver, pois, a dois, não importa o caminho que cada um quer seguir, mas importa sim, o destino onde ele nos levará.

À Prof^a. Dr^a. Tais Maria Bauab pelo apoio e companheirismo desde antes de meu ingresso oficial no programa de mestrado e à Prof^a. Dr^a. Patrícia Mastroianni por depositar confiança e ceder participação e assistência em suas aulas.

À secretaria de pós-graduação, representado por Cláudia, Laura e Sônia, que de forma eficiente, paciente e divertida tornam possível o bom andamento do programa.

Ao Instituto Racine, ao qual demonstro profunda admiração, pela seriedade e eficácia de seu trabalho e oportunidades oferecidas que permeiam minha trajetória profissional.

Agradeço também ao aceite e pelas valiosas sugestões prestadas pela banca de qualificação composta pelo Prof. Dr. Leonardo Pezza e Prof^a. Dr^a. Maria Virgínia Scarpa e pela banca de defesa do mestrado, composta pela Prof^a. Dr^a. Maria José Vieira Fonseca e Prof^a. Dr^a. Maria Virgínia Costa Scarpa.

Toda a gratidão expressada nada é, se não um desabafo, breves comentários descritivos à parte daqueles que me prestaram o benefício de sua presença ou energias, e que, no momento em que me for permitido poderei reciprocamente e recompensar seu afeto.

Por fim devo agradecer ao Laboratório Cristália pela gentil doação da matéria-prima e substância de referência, se tratando de peça fundamental e indispensável da pesquisa e ao CNPQ pela concessão da bolsa de mestrado.

SUMÁRIO

	LISTA DE FIGURAS	<i>xi</i>
	LISTA DE TABELAS	<i>xiii</i>
	LISTA DE ABREVIATURAS	<i>xvi</i>
	RESUMO	<i>xvii</i>
	ABSTRACT	<i>xiii</i>
1.	INTRODUÇÃO	1
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1.	Hipertermia maligna	3
2.2.	Azumoleno	7
2.3.	Qualidade na indústria farmacêutica	9
2.4.	Validação de métodos analíticos	12
2.4.1.	Especificidade e seletividade	15
2.4.2.	Linearidade	16
2.4.3.	Intervalo	16
2.4.4.	Precisão	17
2.4.5.	Exatidão	18
2.4.6.	Limite de detecção	18
2.4.7.	Limite de quantificação	19
2.4.8.	Robustez	20
3.	OBJETIVOS	22
3.1.	Objetivos gerais	22
3.2.	Objetivos específicos	22
4.	MATERIAL E MÉTODOS	23

4.1.	Descrição	23
4.1.1.	Azumoleno sódico Substância Química de Referência (SQR).....	23
4.1.2.	Azumoleno sódico amostra	23
4.2.	Lista de equipamentos	24
4.3.	Análise qualitativa	24
4.3.1.	Características físicas	24
4.3.2.	Solubilidade	25
4.3.3.	Determinação do ponto de fusão	26
4.3.4.	Análise térmica	26
4.3.4.1.	Termogravimetria	27
4.3.4.2.	Análise térmica diferencial	28
4.3.5.	Espectrofotometria na região ultravioleta	28
4.3.6.	Espectrofotometria na região do visível	29
4.3.6.1.	Preparo do reagente ácido cloranílico 0,1%	29
4.3.7.	Espectroscopia de absorção na região do infravermelho.....	29
4.4.	Análise quantitativa	30
4.4.1.	Espectrofotometria na região do ultravioleta	30
4.4.1.1.	Realização da curva de Ringbom	30
4.4.1.2.	Obtenção da curva analítica	32
4.4.1.3.	Determinação da concentração de azumoleno sódico na amostra	33
4.4.1.3.1.	Cálculos do teor de azumoleno sódico na amostra	33
4.4.1.4.	Validação de metodologia analítica por espectrofotometria na região do ultravioleta	34
4.4.1.4.1.	Linearidade	34
4.4.1.4.2.	Precisão	34
4.4.1.4.3.	Exatidão	34
4.4.1.4.4.	Robustez	35
4.4.1.4.5.	Limite de detecção	36
4.4.1.4.6.	Limite de quantificação	36
4.4.2.	Espectrofotometria de absorção na região do visível.....	36
4.4.2.1.	Metodologia empregando ácido cloranílico	37
4.4.2.1.1.	Realização da curva de Ringbom	37

4.4.2.1.2.	Obtenção da curva analítica	39
4.4.2.1.3.	Determinação da concentração de azuloleno sódico na amostra	40
4.4.2.1.3.1.	Cálculos do teor de azuloleno sódico na amostra	40
4.4.2.1.4.	Validação de metodologia analítica por espectrofotometria na região do visível	40
4.4.2.1.4.1.	Linearidade	40
4.4.2.1.4.2.	Precisão	41
4.4.2.1.4.3.	Exatidão	41
4.4.2.1.4.4.	Robustez	42
4.4.2.1.4.5.	Limite de detecção	42
4.4.2.1.4.6.	Limite de quantificação	43
4.4.3.	Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	43
4.4.3.1.	Equipamentos e materiais	43
4.4.3.2.	Ensaio preliminares	44
4.4.3.3.	Obtenção da curva analítica	44
4.4.3.4.	Determinação da concentração de azuloleno sódico na amostra	45
4.4.3.4.1.	Cálculos do teor de azuloleno sódico na amostra	46
4.4.3.5.	Validação de metodologia analítica por CLAE	46
4.4.3.5.1.	Linearidade	46
4.4.3.5.2.	Precisão	46
4.4.3.5.3.	Exatidão	46
4.4.3.5.4.	Robustez	47
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
5.1.	Análise qualitativa	49
5.1.1.	Características físicas	49
5.1.2.	Solubilidade	49
5.1.3.	Determinação do ponto de fusão	50
5.1.4.	Análise térmica	50
5.1.5.	Espectrofotometria na região do ultravioleta	52
5.1.6.	Espectrofotometria de absorção na região do visível	56

5.1.7.	Espectroscopia de absorção na região do infravermelho.....	58
5.2.	Análise quantitativa	60
5.2.1.	Espectrofotometria na região do ultravioleta	60
5.2.1.1.	Obtenção da curva de Ringbom	60
5.2.1.2.	Obtenção da curva analítica	62
5.2.1.3.	Determinação da concentração de azumoleno sódico na amostra	66
5.2.1.4.	Validação de metodologia analítica por espectrofotometria na região do ultravioleta	67
5.2.1.4.1.	Especificidade e seletividade	67
5.2.1.4.2.	Linearidade	67
5.2.1.4.3.	Precisão	67
5.2.1.4.4.	Exatidão	68
5.2.1.4.5.	Robustez	68
5.2.1.4.6.	Limite de detecção	69
5.2.1.4.7.	Limite de quantificação	69
5.2.2.	Espectrofotometria de absorção na região do visível	69
5.2.2.1.	Obtenção da curva de Ringbom	69
5.2.2.2.	Obtenção da curva analítica	71
5.2.2.3.	Determinação da concentração de azumoleno sódico na amostra	75
5.2.2.4.	Validação de metodologia analítica por espectrofotometria na região do visível	76
5.2.2.4.1.	Especificidade e seletividade	76
5.2.2.4.2.	Linearidade	76
5.2.2.4.3.	Precisão	76
5.2.2.4.4.	Exatidão	77
5.2.2.4.5.	Robustez	77
5.2.2.4.6.	Limite de detecção	78
5.2.2.4.7.	Limite de quantificação	78
5.2.3.	Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	78
5.2.3.1.	Estudos preliminares	78
5.2.3.2.	Curva analítica	81
5.2.3.3.	Determinação da concentração de azumoleno na amostra...	85

5.2.3.4.	Validação de metodologia analítica por CLAE	85
5.2.3.4.1.	Especificidade e seletividade	85
5.2.3.4.2.	Linearidade	85
5.2.3.4.3.	Precisão	86
5.2.3.4.4.	Exatidão	86
5.2.3.4.5.	Robustez	87
5.2.3.4.6.	Limite de Detecção	87
5.2.3.4.7.	Limite de Quantificação	87
6.	DISCUSSÃO GERAL	88
6.1.	Análise comparativa das metodologias propostas para quantificação de azumoleno sódico	91
7.	CONCLUSÃO..	94
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	96

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1.	Estrutura química do azumoleno sódico	7
Figura 2.2.	Estrutura química do dantroleno sódico	8
Figura 5.1.	Curva TG e DTA do azumoleno sódico SQR em atmosfera de O ₂ com razão de aquecimento de 20°C/min	51
Figura 5.2.	Curva TG e DTA do azumoleno sódico amostra em atmosfera de O ₂ com razão de aquecimento de 20°C/min ...	51
Figura 5.3.	Espectro na região do ultravioleta de azumoleno SQR a 10,0 µg/mL em água purificada	53
Figura 5.4.	Espectro na região do ultravioleta de azumoleno SQR a 10,0 µg/mL em metanol	53
Figura 5.5.	Espectro na região do ultravioleta de azumoleno SQR a 10,0 µg/mL em ácido clorídrico 0,1 M	54
Figura 5.6.	Espectro na região do ultravioleta de azumoleno SQR a 10,0 µg/mL em hidróxido de sódio 0,1 M	55
Figura 5.7.	Espectro na região do ultravioleta de azumoleno sódico amostra a 10,0 µg/mL em água purificada.....	56
Figura 5.8.	Espectro de absorção da solução de azumoleno SQR com concentração de 10,0 µg/mL, na região do visível a 507 nm, utilizando acetonitrila como solvente e 1,0% ácido cloranílico como reagente.....	57
Figura 5.9.	Sobreposição dos espectros de absorção da solução de azumoleno SQR e amostra com concentração de 10,0 µg/mL, na região do visível a 507 nm, utilizando acetonitrila como solvente e 1,0% ácido cloranílico como reagente.....	57
Figura 5.10.	Espectro na região infravermelho de azumoleno SQR em pastilhas de KBr	58
Figura 5.11.	Espectro na região infravermelho de azumoleno amostra em pastilhas de KBr	59

Figura 5.12.	Espectro de infravermelho do dantroleno sódico segundo a British Pharmacopoeia (2009) e Japanese Pharmacopoeia (2001)	60
Figura 5.13.	Curva de Ringbom obtida pelo método espectrofotométrico na região do UV a 340 nm para solução aquosa de azumoleno sódico SQR.....	62
Figura 5.14.	Representação gráfica da curva analítica da solução de azumoleno pelo método espectrofotométrico na região do UV a 340 nm	64
Figura 5.15.	Curva de Ringbom obtida pelo método espectrofotométrico na região do visível para solução de azumoleno sódico SQR	71
Figura 5.16.	Representação gráfica da curva analítica da solução de azumoleno pelo método espectrofotométrico na região do visível a 507 nm	73
Figura 5.17.	Cromatograma obtido por de CLAE com fase móvel composta por metanol : água (50:50 v/v) de azumoleno sódico SQR 10,0 µg/mL a 340 nm.....	79
Figura 5.18.	Cromatograma obtido por de CLAE com fase móvel composta por metanol : água : acetonitrila (50:25:25 v/v/v) de azumoleno sódico SQR 10,0 µg/mL a 340 nm.....	79
Figura 5.19.	Cromatograma obtido por de CLAE com fase móvel composta por metanol : água (50:25 v/v) de azumoleno sódico SQR 10,0 µg/mL a 340 nm.....	79
Figura 5.20.	Cromatograma obtido por de CLAE com fase móvel composta por metanol : água (75:25 v/v) de azumoleno sódico SQR 10,0 µg/mL a 340 nm.....	80
Figura 5.21.	Cromatograma do azumoleno sódico SQR a 10,0 µg/mL em 340 nm obtido por CLAE com fase móvel composta por metanol : água (75:25 v/v) com ajuste para pH 3,0 por ácido fórmico.....	81
Figura 5.22.	Representação gráfica da curva analítica da solução de azumoleno por CLAE a 340 nm	83

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1.	Ensaio necessários para a validação do método analítico, segundo sua finalidade	14
Tabela 4.1.	Terminologia descritiva de solubilidade da Farmacopeia Brasileira (1988)	26
Tabela 4.2.	Valores obtidos para construção da curva de Ringbom no método espectrofotométrico na região do UV a 340 nm para azumoleno sódico SQR	31
Tabela 4.3.	Valores obtidos para construção da curva analítica no método espectrofotométrico na região do UV a 340 nm para azumoleno sódico SQR	32
Tabela 4.4.	Preparo das soluções para construção do teste de recuperação para azumoleno sódico por espectrofotometria na região do UV a 340 nm	35
Tabela 4.5.	Preparo da curva de Ringbom para leitura de azumoleno sódico SQR em espectrofotometria na região do visível a 507 nm com utilização de acetonitrila como solvente e ácido cloranílico 0,1% como reagente	38
Tabela 4.6.	Preparo da curva analítica de azumoleno sódico SQR por espectrofotometria na região visível a 507 nm com utilização de acetonitrila como solvente e ácido cloranílico 0,1% como reagente	39
Tabela 4.7.	Preparo das soluções para construção da teste de recuperação para azumoleno sódico por espectrofotometria na região do visível a 507 nm com utilização de acetonitrila como solvente e ácido cloranílico 0,1% como reagente	42
Tabela 4.8.	Preparo das soluções para construção da curva analítica no método CLAE a 340 nm para azumoleno sódico SQR..	45
Tabela 4.9.	Preparo das soluções para construção do teste de recuperação para azumoleno sódico por CLAE a 340 nm..	47

Tabela 5.1.	Solubilidade do azuloleno SQR em diferentes solventes a 25°C	49
Tabela 5.2.	Obtenção da curva de Ringbom do azuloleno sódico em água purificada para o método espectrofotométrico na região do UV a 340 nm	61
Tabela 5.3.	Absorvâncias determinadas na obtenção da curva analítica de azuloleno SQR pelo método espectrofotométrico na região do ultravioleta a 340 nm...	63
Tabela 5.4.	Análise de variância dos valores de absorvância determinados para obtenção da curva analítica de azuloleno sódico SQR, pelo método espectrofotométrico na região do ultravioleta a 340 nm	65
Tabela 5.5.	Parâmetros de tratamento estatístico da curva analítica de azuloleno sódico em água purificada pelo método espectrofotométrico na região do UV a 340 nm	66
Tabela 5.6.	Valores determinados para o doseamento de azuloleno sódico na amostra pelo método espectrofotométrico na região do ultravioleta a 340 nm	66
Tabela 5.7.	Valores obtidos no teste de recuperação para azuloleno sódico pelo método espectrofotométrico na região do UV a 340 nm	68
Tabela 5.8.	Valores da determinação da robustez do método espectrofotométrico na região do UV a 340 nm de azuloleno sódico pela variação do comprimento de onda	69
Tabela 5.9.	Obtenção da curva de Ringbom para o método espectrofotométrico na região do visível de solução de azuloleno sódico com ácido clorânico e acetonitrila a 507 nm	70
Tabela 5.10.	Absorvâncias determinadas na obtenção da curva analítica de azuloleno SQR pelo método espectrofotométrico na região do visível a 507 nm	72

Tabela 5.11.	Análise de variância dos valores de absorvância determinados para obtenção da curva analítica de azumoleno sódico SQR, utilizando método espectrofotométrico na região do visível a 507 nm	74
Tabela 5.12.	Parâmetros analíticos do método espectrofotométrico na região do visível com ácido cloranílico 0,1% e acetonitrila a 507 nm	75
Tabela 5.13.	Valores determinados para o doseamento de azumoleno sódico na amostra pelo método espectrofotométrico na região do visível a 507 nm	75
Tabela 5.14.	Valores obtidos no teste de recuperação para azumoleno sódico pelo método espectrofotométrico na região do visível a 507 nm	77
Tabela 5.15.	Valores da determinação da robustez do método espectrofotométrico na região do visível com ácido cloranílico 0,1% e acetonitrila de azumoleno sódico pela variação do comprimento de onda	78
Tabela 5.16.	Absorvâncias determinadas na obtenção da curva analítica de azumoleno SQR pelo método CLAE a 340 nm	82
Tabela 5.17.	Análise de variância dos valores de absorvância determinados para obtenção da curva analítica de azumoleno sódico SQR, utilizando CLAE a 340 nm	84
Tabela 5.18.	Parâmetros analíticos do método CLAE proposto para azumoleno sódico a 340 nm	84
Tabela 5.19.	Valores determinados para o doseamento de azumoleno sódico na amostra por CLAE a 340 nm	85
Tabela 5.20.	Valores obtidos no teste de recuperação para azumoleno sódico por CLAE a 340 nm	86
Tabela 6.1.	Análise comparativa dos métodos de análise propostos para azumoleno sódico	92
Tabela 6.2.	Valores obtidos no doseamento do azumoleno sódico para os métodos propostos	93

LISTA DE ABREVIATURAS

ACN	acetonitrila
ANOVA	análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC	<i>Association of Official Analytical Chemists</i>
API	<i>Active Pharmaceutical Product</i>
BPF	Boas Práticas de Fabricação
CAS	<i>Chemical Abstracts Service</i>
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CV%	Coefficiente de Variação percentual
DCB	Denominação Comum Brasileira
DMSO	dimetilsulfóxido
DPR	Desvio Padrão Relativo
DTA	Análise Térmica Diferencial
e.p.m.	erro padrão da média
EURACHEM	Enfoque para química analítica na Europa
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GMP	<i>Good Manufacturing Practice</i>
ICH	<i>International Conference on Harmonization</i>
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
<i>r</i>	coeficiente de correlação ou de Pearson
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
SQR	Substância Química de Referência
TG	Termogravimetria
USP	<i>The United States Pharmacopeia</i>
UV	ultravioleta
v/v	volume em volume

RESUMO

O azumoleno sódico é um fármaco desenvolvido para combater a hipertermia maligna, que é caracterizada por predisposição genética e desencadeada pelo uso de agentes anestésicos inalatórios em processos cirúrgicos podendo levar a óbito 70% dos enfermos. Este fármaco mostra-se como congênere do dantroleno sódico, e devido à sua solubilidade ser 30 vezes maior, apresenta vantagens durante seu uso emergencial. Por tratar-se de um novo fármaco, há poucos estudos relacionados às suas características físico-químicas, impurezas e métodos de análises. Os objetivos são desenvolver e validar métodos analíticos eficazes na identificação e na quantificação de azumoleno sódico. A análise qualitativa foi realizada por análise térmica, espectrofotometria de absorção na região do ultravioleta, espectroscopia na região do infravermelho e espectrofotometria de absorção na região do visível com utilização de ácido clorânico 0,1% como reagente, permitindo a identificação do azumoleno sódico. Os métodos de análise quantitativos desenvolvidos e validados envolveram: (i) espectrofotometria no UV, com comprimento de onda a 340 nm, que apresentou resposta linear entre a faixa de concentração de 7,0 e 12,0 µg/mL, na qual foram analisados satisfatoriamente os parâmetros de precisão, exatidão, robustez, limite de detecção e limite de quantificação, com teor médio de 98,86% e CV de 0,62 %; (ii) espectrofotometria na região visível, com utilização de ácido clorânico 0,1% como reagente e acetonitrila como solvente, com comprimento de onda a 507 nm e faixa de concentração linear de 8,0 a 13,0 µg/mL, com avaliação dos parâmetros de precisão, exatidão, robustez, limite de detecção e limite de quantificação, com teor médio de 98,15% e CV de 0,66 %; (iii) cromatografia líquida de alta eficiência, a qual utilizou coluna de fase reversa C₁₈ e fase móvel composta por metanol : água (75:25, v/v) com ajuste para pH 3,0 com auxílio de ácido fórmico, vazão de 1,0 mL/min e 20 µL de volume de injeção, com leituras a 340 nm, apresentando linearidade em faixa de concentração de 5,0 a 15,0 µg/mL, com avaliação dos parâmetros de precisão, exatidão e robustez, com teor médio de 98,80 % e CV de 0,85 %.

Palavras-chave: azumoleno sódico, hipertermia maligna, validação de metodologia analítica

ABSTRACT

Azumolene sodium is a drug designed to fight malignant hyperthermia, which is characterized by genetic predisposition and triggered by the use of inhalational anesthetics in surgical procedures can lead to death 70% of patients. This drug is shown as a congener of dantroleno sodium, and due to its solubility is 30 times larger, has advantages for its emergency use. As this is a new drug, there are few studies related to their physical and chemical characteristics, impurities and methods of analysis. The objectives are to develop and validate analytical methods effective in the identification and quantification of azumolene sodium. Qualitative analysis was performed by thermal analysis, absorption spectrophotometry in ultraviolet and visible region using 0.1% chloranilic acid as reagent and spectroscopy infrared absorption, allowing the identification of azumolene sodium. The methods of analysis developed and validated involved: (i) UV spectrophotometry, with wavelength at 340 nm, which showed linear response the concentration range of 7.0 and 12.0 $\mu\text{g/mL}$, which were analyzed satisfactorily the parameters of precision, accuracy, robustness, limit of detection and limit of quantitation, with percentage average of 98.86% and CV 0.62%, (ii) visible spectrophotometry, using 0.1% chloranilic acid reagent and acetonitrile as solvent, at 507 nm and linear concentration range from 8.0 to 13.0 mg/mL, with evaluation of precision, accuracy, robustness, limit of detection and limit of quantification, showed the percentage average of 98.15% and CV 0.66%, (iii) high performance liquid chromatography, which used reverse-phase column C_{18} and a mobile phase consisting of methanol: water (75:25, v/v) adjusted to pH 3.0 using acid formic, flow rate 1.0 mL/min and 20- μL injection volume, at 340 nm, with linearity in the concentration range from 5.0 to 15.0 mg/mL, with evaluation of precision, accuracy and robustness. The percentage of HPLC method average was 98.80% and CV 0.85%.

Key words: azumolene sodium, malignant hyperthermia, validation of analytical methodology

1. INTRODUÇÃO

A hipertermia maligna, descrita inicialmente nos anos 60, apresenta caráter hereditário e é desencadeada pela exposição de anestésicos inalatórios específicos, podendo inclusive levar ao óbito. Acomete de 1/20.000 a 1/100.000 usuários destes agentes desencadeantes, sem distinção de raça ou sexo (ALMEIDA NETO, 1992; SIMÕES *et al.*, 2003; MANICA, 2004).

O fármaco disponível no mercado farmacêutico para tratamento específico desta afecção é o dantroleno sódico, porém, apresenta algumas desvantagens como, por exemplo, baixa solubilidade, dificultando sua aplicação parenteral. Já o azumoleno sódico, que se encontra fora do prazo de patente, com a vantagem de uma melhor solubilidade.

Todos os estabelecimentos de saúde que contemplam em suas atividades procedimentos cirúrgicos com administração de anestésicos inalatórios devem obrigatoriamente ter posse dessa classe de medicamentos (BRASIL, 2002).

A realização do trabalho em questão parte da ausência na literatura de referências sobre métodos de análise do azumoleno sódico, embora seja uma substância com patente por White e Ellis, em 1989.

Os medicamentos devem, sobretudo, possuir qualidade e eficácia assegurada, e por tais razões é essencial o desenvolvimento de validação de metodologias analíticas adequadas, resultando em maior confiabilidade dos métodos propostos, minimizando decisões contraditórias e prejuízos financeiros (RIBANI *et al.*, 2003; LA ROCA *et al.*, 2007).

A importância do controle da qualidade na indústria farmacêutica tem seu início muito antes das análises para liberação do produto final a ser comercializado, e envolve como ponto chave a qualidade dos insumos (ativos ou adjuvantes) e do controle em processo.

Em se tratando do conceito de qualidade, deve-se entender ainda que ao buscar a utilização de um fármaco de qualidade, a população é cada vez mais consciente de que sua produção não tenha gerado impactos ambientais consideráveis, como por exemplo, degradação de recursos hídricos. Assim

sendo, o desenvolvimento de métodos analíticos busca ainda a redução dos impactos ambientais ligado a um sólido sistema de gestão ambiental (MACEDO, 2000).

A busca por métodos simples e confiáveis de análise deve ser base de estudo para as empresas farmacêuticas, viabilizando uma estrutura confiável controle de qualidade.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Hipertermia maligna

Descrita na primeira metade dos anos 60, a hipertermia maligna passou a ser mais bem compreendida nas duas décadas seguintes, sendo que as bases para o diagnóstico e tratamento eficaz solidificaram-se a partir de 1980. Apenas a partir dos anos 90 passou a existir a preocupação em difundir informações sobre a hipertermia maligna no Brasil (DENBOROUGH *et al.*, 1962; ALMEIDA NETO, 1992).

Os primeiros casos da impregnação maligna, como era conhecida anteriormente, foram relatados em torno de 1900 por diversos autores, que tiveram seus estudos de casos publicados na Revista da Associação Médica Americana (JAMA) (BRITT, 1988; GUERRA, 2002).

A hipertermia maligna, que até então não apresenta cura definida, é conhecida também por febre maligna, hiperpirexia maligna e febre anestésica, é afecção hereditária (autossômica dominante) e latente, caracterizada por resposta hipermetabólica aos anestésicos voláteis (halotano, isoflurano, sevoflurano, isoflurano, enflurano e desflurano) e succinilcolina, resultando inicialmente de um desarranjo da homeostase intracelular do cálcio (MERLI e BELL, 1987; ROSENBERG *et al.*, 1992; ALLEN, 1993; DENBOROUGH, 1998).

Pode ocorrer em qualquer momento da anestesia e até mesmo algumas horas após. A incidência tem sido descrita com variações de 1/20.000 a 1/100.000 dos usuários de agentes anestésicos desencadeantes citados anteriormente. A incidência da hipertermia maligna em processos anestésicos é de 1/15.000 em crianças e 1/50.000 em adultos. Existem estudos que relatam que 50% dos casos ocorrem com indivíduos com menos de 15 anos (KRIVOSIC- HORBER e ADNET, 1992; STRAZIS e FOX, 1993; MANICA, 2004).

A doença ocorre na condição de uma mutação no gene (cromossomo 19) que codifica o receptor da rianodina no músculo esquelético, sendo que, ligada aos centros reguladores de entrada de cálcio, faz com que ocorra liberação

excessiva do íon e diminuição de sua recaptação pelo retículo sarcoplasmático durante a contração muscular ativada por estresse, gerando aumento excessivo da temperatura muscular. Essa condição ocorre no homem após consecutivas mutações do gene para o receptor, sendo que em suínos basta uma única mutação (ALLEN, 1993; GANONG, 2006; ZHAO *et al.*, 2006).

A afecção é considerada em humanos como uma herança dominante, associando mais de um gene, sendo ainda que, nem todos os indivíduos suscetíveis à anomalia compartilham do mesmo padrão genético, e, mesmo com a observação de alterações em diversos tecidos é considerada doença primária do músculo esquelético (ROEWER *et al.*, 1995; IAIZZO *et al.*, 1996; LERMAN e SIMS, 1996).

As crises resultantes da afecção apresentam hiperatividade contrátil, hipertermia, aumento do consumo de oxigênio e da produção de gás carbônico, acúmulo de ácido láctico, desacoplamento da fosforilação oxidativa, lise celular e extravasamento do conteúdo do citoplasma remetendo às manifestações como taquicardia, rigidez muscular (catatonia), instabilidade hemodinâmica, taquipnéia e cianose (BRITT, 1983; ALLEN, 1993; GUERRA, 2002).

A alteração da temperatura corpórea do indivíduo acaba sendo, ao lado de presença de taquicardia e rigidez muscular, a manifestação clínica mais utilizada para fins de diagnósticos da hipertermia, no entanto a elevação da temperatura pode ser tardia, sendo assinalada como manifestação inicial em apenas 30% dos casos (BRITT, 1983; MANICA, 2004).

Outro fator de interesse diagnóstico é que a rigidez muscular pode inexistir em 25% dos casos e a hipertermia maligna ser registrada em apenas um terço deles (HEIMAN-PATTERSON, 1993).

Causas de hipertermia durante procedimentos operatórios podem incluir: atropinização, hipertireoidismo, infecção, traumatismo craniano, excessivo aquecimento externo e, com certeza, a mais temida delas, a hipertermia maligna (TONELLI e TOLDO, 1994).

Como forma precoce da identificação de um episódio de hipertermia deve haver acompanhamento da pressão parcial de gás carbônico no sangue

arterial e na mistura exalada, pois quando elevada reflete o quadro hipermetabólico, característico da doença (MACCANI *et al.*, 1996).

O exame específico para o diagnóstico preciso é a biópsia muscular com o teste de contração pela cafeína (O'FLYNN *et al.*, 1994; MANICA, 2004).

Deve-se levar em consideração o histórico de suscetibilidade dos familiares do paciente à doença ou de doença músculo-esquelético, justamente por se tratar de uma doença hereditária, podendo levar à possibilidade de escolha de outros agentes anestésicos que não sejam possíveis indutores às crises (MANICA, 2004).

Considerando que a evolução da doença pode ser letal e ocorre rapidamente, o diagnóstico precoce e o tratamento específico são de grande importância, reduzindo a mortalidade de 80% para menos de 10% dos casos, logo, deparando-se com os sinais apresentados e o fator do uso de agentes anestésicos voláteis deve-se considerar a possibilidade de um caso de hipertermia maligna e dar início aos protocolos de tratamento específico (BRITT, 1984; KRAUSE *et al.*, 2004).

Deve haver interrupção imediata da exposição dos possíveis agentes desencadeantes, levando em consideração a substituição por agentes seguros, seguida da administração de dantroleno sódico ou azumoleno sódico, visando correção da alteração do metabolismo celular de cálcio, além do controle da respiração, função cardíaca e temperatura corporal (KAPLAN, 1991; MANICA, 2004; TORPY, 2005; SUDO *et al.*, 2008).

Embora não tenha ação central, o dantroleno, derivado da hidantoína, atua como relaxante muscular central, com sítio de ligação do receptor rianodina, onde atua através de mecanismo inibitório (CAMPOS *et al.*, 1985; KRAUSE *et al.*, 2004).

A administração do dantroleno sódico deve ocorrer na dose de 2,0 a 3,0 mg/kg por via intravenosa, até que os sinais clínicos se normalizem ou até a dose máxima de 10,0 mg/kg. Pode, ainda, ser administrado por via oral, na dose de 2 mg/kg/dia, por 48 horas (MANICA, 2004).

No entanto, Blank e Boggs (1993), relatam sucesso no tratamento da hipertermia maligna com administração de doses atípicas de dantroleno sódico, como, por exemplo, casos de 42 mg/kg e 1,0 mg/kg.

Vem sendo discutida a hipótese da administração profilática do dantroleno sódico. Havendo opção pelo uso, recomenda-se doses de 6 mg/kg, por via oral, na véspera do processo cirúrgico (MANICA, 2004).

Goto e colaboradores (1993), trazem referência à administração profilática do dantroleno com dose de 75 mg através de via oral por 3 dias antes do processo anestésico, 1,2 mg/kg endovenoso em dose única durante o ato e de 0,6 mg/kg endovenoso em pós-operatório.

Existem controvérsias em relação à administração profilática do dantroleno sódico, que se baseiam nos efeitos colaterais do fármaco, como características de hepatotoxicidade, fraqueza muscular, complicações respiratórias, letargia, náuseas e vômitos (WARD *et al.*, 1986; KAPLAN, 1991; GANELLIN e TRIGGLE, 1996).

Em 2002, através do Decreto nº 46.601 foi criado o Programa Estadual de Prevenção, Diagnóstico e Tratamento da Hipertermia maligna (PROPREV-HM), descrito e aprovado sob a Política de Prevenção, Diagnóstico e Tratamento da Hipertermia maligna do estado de São Paulo, sob a coordenação da Secretaria da Saúde (BRASIL, 2002).

A legislação veio estabelecer critérios de organização de dados no Cadastro Estadual de Informações sobre a incidência, prevalência e óbitos decorrentes da doença e protocolo específico para a investigação clínico-epidemiológica dos casos. Ficou oficializado, então, que as entidades de assistência à saúde do Estado de São Paulo devem garantir tratamento específico imediato dos pacientes que vierem a apresentar hipertermia maligna, responsabilizando-se civil e criminalmente pela eventual omissão (BRASIL, 2002).

Em Resolução específica do Conselho Federal de Medicina intitulada como RE CFM nº 1.802, ficou atribuída à prática médica baseada em processos de anestesia, a monitoração da ventilação e/ou exposição a agentes capazes de desencadear a hipertermia maligna (BRASIL, 2006).

2.2. Azumoleno

O nome químico do azumoleno sódico é 1-(((5-(4-bromofenil)-2-oxazolil)metileno)amino)-2,4-imidazolidinedione sódico, apresenta fórmula molecular $C_{13}H_9BrN_4NaO_3$ e peso molecular 372,13.

O azumoleno apresenta fórmula molecular $C_{13}H_9BrN_4O_3$ e peso molecular de 349,1 (GANELLIN e TRIGGLE, 1996).

A substância azumoleno apresenta CAS n° 64748-79-4 e DCB n° 01006 e o azumoleno sódico apresenta CAS n° 105336-14-9 (BRASIL, 2005).

A molécula do azumoleno sódico é apresentada na Figura 2.1.

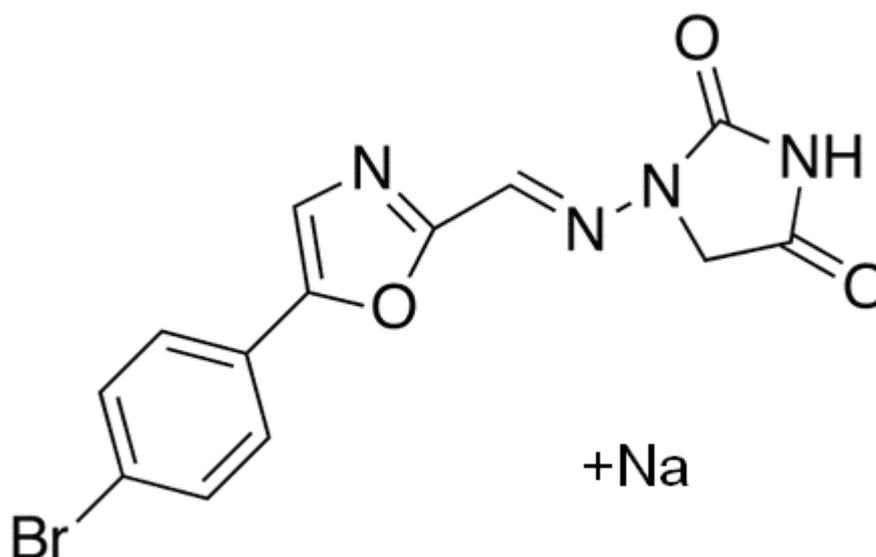


Figura 2.1. Estrutura química do azumoleno sódico.

O dantroleno apresenta CAS n° 7261-97-4 e DCB n° 02679. O dantroleno sódico apresenta CAS n° 14663-23-1 e DCB n° 02680 e o dantroleno sódico hemiheptaidratado apresenta o CAS n° 24868-20-0 (MARTINDALE, 2009).

O nome químico do dantroleno sódico, cuja molécula pode ser observada na Figura 2.2., é 1-[[[5-(4-Nitrofenil)-2-furanil]metileno]amino]-2,4-imidazolidinedione sódico, fórmula estrutural é $C_{14}H_9N_4NaO_5$ e seu peso molecular de 399,3 (MARTINDALE, 2009; BRITISH PHARMA COPOEIA, 2009).

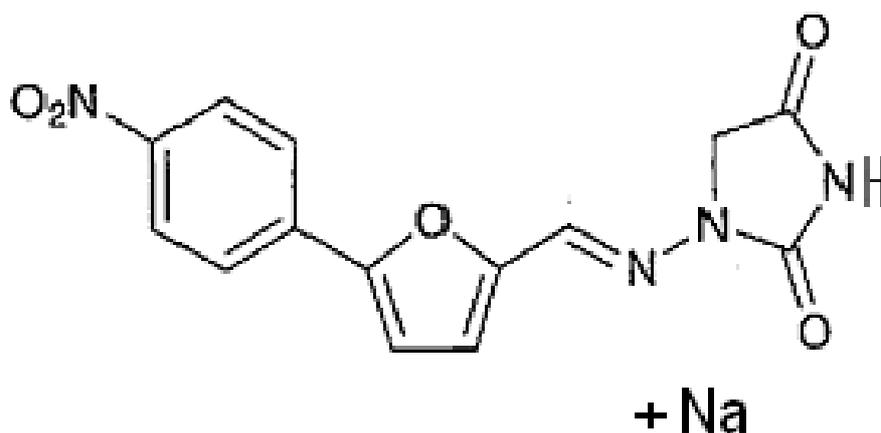


Figura 2.2. Estrutura química de dantroleno sódico.

O azumoleno sódico, além de estrutura química apresenta também potência e eficácia semelhantes ao dantroleno sódico, prevenindo ou invertendo a hipertermia maligna através de metodologias *in vitro* ou *in vivo* (SCHWE, 1989; SUDO *et al.*, 2008).

Segundo Zhao e colaboradores (2006), ambos os fármacos são satisfatórios e equivalentes nas aplicações de correção nas atividades de liberação irregular de cálcio pelo retículo endoplasmático.

O uso do azumoleno sódico apresenta vantagens em relação ao seu congêneres dantroleno, uma vez que esse último se mostra pouco solúvel em água, sendo necessária uma diluição de 20 mg do fármaco liofilizado em 60 mL de água para injetáveis, fato este que se torna indesejável quando consideramos a situação emergencial de qual se trata, e o primeiro é mais solúvel em seu veículo de administração, facilitando a administração (DHILLON *et al.*, 1992; ABRAHAM *et al.*, 1998; KRAUSE *et al.*, 2004).

O efeito relaxante muscular de ambos os fármacos são específicos para o músculo esquelético, e, as razões para esta especificidade ocorrem devido a diferenças básicas na fisiologia do músculo esquelético liso (DHILLON *et al.*, 1992).

A patente do tratamento da hipertermia maligna através do uso do azumoleno foi estabelecida em 1989 por White e Ellis, bem como Schwe (1989), em sua patente de forma e dosagem de administração do fármaco, estando notadamente, fora do prazo de patente.

Não são encontrados estudos de controle de qualidade e metodologias analíticas para o azumoleno sódico.

2.3. Qualidade na indústria farmacêutica

A qualidade e a eficácia dos medicamentos são, cada vez mais, motivo de preocupação e de milhares de pesquisas realizadas mundialmente, sobretudo com relação ao controle de qualidade (LA ROCA *et al.*, 2007).

De acordo com Moretto (2001), o conceito de Boas Práticas de Fabricação (BPF) ou *Good Manufacturing Practice* (GMP) surgiu em 1963, sendo uma recomendação do FDA, que passou a ter efeito legal apenas em 1973. Antes disso, em 1968 a OMS divulgou as GMP's como um informe representativo de um grupo de especialistas, ainda não valendo como critério organizacional.

Como anteriormente publicada, a Portaria SVS/MS nº 16, de 06 de março de 1995 foi atualizada para a RDC nº 134, de 13 de julho de 2001 determina e oficializa pela primeira vez a necessidade de cumprimento do regulamento de padrões de qualidade por base dos fabricantes de medicamentos no Brasil. Trazendo mais complexidade à prática do setor farmacêutico, surgiu em 2003 a RDC nº 210 (BRASIL, 1995; BRASIL, 2001; TORRES, 2002;).

O conceito de controle de qualidade é aplicado aos processos utilizados para fornecer provas de qualidade e confiança nos resultados analíticos.

Um resultado de uma medição é sempre representado pelo valor mais provável do analito dentro de uma região de proximidade que caracteriza a dispersão dos valores que podem ser atribuídos a este mensurado (INMETRO, 1995).

As características de análise que fazem parte do Controle de Qualidade são instrumentação, controle de reagentes, manutenção e calibração de equipamentos, bem como os procedimentos de controle e cálculos. Por tais razões, é de grande importância o desenvolvimento de métodos analíticos eficazes e confiáveis para o controle de qualidade dos medicamentos comercializados, tornando-se imprescindível o desenvolvimento de rotinas de análises (PRICHARD, 2001; LA ROCA *et al.*, 2007).

De uma forma mais complexa que a produção de medicamentos acabados, a fabricação de *Active Pharmaceutical Ingredients* (API) envolvem frequentemente diversos processos químicos e operações. Estas operações podem ir desde purificações, processos complexos através de múltiplas sínteses orgânicas, isolamentos e acondicionamento final dos API. Logo, a qualidade da matéria-prima deve ser assegurada e documentada desde o início de seu processo de fabricação até as etapas e ensaios finais, como uma forma de garantir que cumpre sua especificação como identidade, potência e limites de pureza (FDA, 2000; ICH, 2001; NALLY, 2007).

A qualidade final de uma matéria-prima farmacêutica é uma consequência de um controle em processo de fabricação rigoroso, onde deve haver verificações e controles sistemáticos dos diversos parâmetros estabelecidos no plano mestre de produção, pois é nesta etapa de produção que podem ocorrer modificações na molécula, provocando alterações em sua biodisponibilidade e eficácia. Devido a este fato também é importante verificar a presença de polimorfos que possam ser formados na última etapa do desenvolvimento do composto (STRENG, 1997; ICH, 2001).

As especificações das matérias-primas devem ser estabelecidas levando-se em consideração as normas vigentes e ainda em coerência com seu processo de produção, devendo incluir principalmente limites ou identidades de

controle de impurezas (orgânicas, inorgânicas, solventes e resíduos) (ICH, 2001).

Critérios de especificações estabelecidos por compêndios oficiais podem ser classificados como objetivos ou subjetivos. Podem-se enquadrar como critérios objetivos aqueles que permitem estabelecer valores definidos ou que podem ser expressos como resposta, seja qualitativamente (identificação ou ensaios de coloração) quanto quantitativamente (pureza e teor). Os critérios subjetivos levam em consideração a interpretação dos analistas, uma vez que não são obtidos de procedimentos analíticos, como, por exemplo, características organolépticas de um composto (MORETTO e ALBUQUERQUE, 2009).

Entre tantas farmacopeias e compêndios aceitos como oficiais pela ANVISA pela RDC nº 37 de julho de 2009, cabe ao setor de controle de qualidade da indústria farmacêutica avaliar os critérios e definir as especificações das matérias-primas, ou quando necessário desenvolver outras (WEBER, 2008; BRASIL, 2009).

Devem estar disponíveis informações a respeito de equipamentos e instrumentos a serem utilizados, tais como seus parâmetros ideais de funcionamento (FDA, 2000).

O controle de reagentes é também importante, devendo ser de conhecida pureza (graus analíticos), seu modo de conservação, orientações para seu seguro manuseio, período de validade ou modo de preparo quando aplicável (FDA, 2000).

De acordo com Moretto e Shib (2000), pode-se imaginar uma divisão em cinco eras da temática da qualidade, sendo a primeira a era da inspeção de qualidade, a segunda a era do controle estatístico da qualidade, a terceira sendo a era da garantia da qualidade e a quarta como a era da gestão estratégica da qualidade. Entramos hoje, na quinta era, no que se diz da era da validação.

2.4. Validação de métodos analíticos

O objetivo da validação de metodologia analítica é demonstrar que o método é apropriado para a finalidade pretendida, baseando-se na determinação qualitativa, semi-quantitativa e/ou quantitativa de fármacos e outras substâncias em produtos farmacêuticos, devendo conter informações de apoio apropriadas aos procedimentos analíticos utilizados (FDA, 2000; BRASIL, 2003).

Na década de 1980 começou a ocorrer uma grande cooperação entre diversas organizações internacionais, com objetivo da harmonização de protocolos que contemplassem informações, características e desempenho de métodos de análise. Entre essas organizações podemos citar a *Association of Official Analytical Chemists (AOAC)*, Organização Mundial de Saúde (*WHO*), *International Standardization on Organization (ISO)*, *Academic Writing Consulting (WAC)*, *International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC)*, *Individual Discipline Feasible (IDF)* e *Food and Agriculture Organization (FAO)*. O resultado desta iniciativa foi a elaboração do documento "*Protocol for the Design, Conduct and Interpretation of Method Performance Studies*", sendo utilizado por muitos anos como base para acreditação de métodos analíticos (FAJGELJ e AMBRUS, 2000).

Segundo Ribani e colaboradores (2003), a definição da validação no laboratório (*in house validation*) consiste na validação de um novo método desenvolvido por laboratório interno e específico ou ainda para a verificação e aplicabilidade de métodos já existentes. Essa validação precede etapas da validação completa (*full validation*) que envolve estudos interlaboratoriais com verificação da reprodutibilidade da metodologia e incerteza sobre o método como um todo, para que, desta forma, esse se torne um método oficial.

Usualmente a validação dos métodos analíticos de matérias-primas farmacêuticas baseia-se entre: testes de identificação, testes quantitativos para as impurezas, ensaios-limite de controle de impurezas e testes quantitativos do ingrediente ativo em amostras da substância (ICH, 2005).

Como um dos fatores de maior importância para o Controle de Qualidade, os métodos analíticos devem ser validados, a menos que o método utilizado esteja incluído em farmacopeias oficiais, ou seja, normalizado (com exceção de serem usados fora dos escopos para os quais foram concebidos), no caso de serem desenvolvidos no próprio laboratório e no caso de ampliações e modificações. A adequação dos métodos utilizados deve, no entanto, verificar as condições reais de utilização. Com o objetivo de confirmar que os métodos são apropriados para o uso pretendido, o laboratório deve validá-los (ABNT, 2001; ICH, 2001; RIBANI *et al.*, 2003).

Segundo a FDA (2000), ainda que haja uma metodologia analítica farmacopeica, pode-se apresentar uma metodologia alternativa, desde que seja comprovado rendimento igual ou superior ao oficial.

Durante a validação de metodologia analítica de um insumo ativo deve-se levar em consideração e avaliar as características e atributos da substância farmacêutica, observar parâmetros críticos dos processos que possam alterar sua natureza ou qualidade e determinação do intervalo de validação de processo, sendo um fator de alta importância na qualidade final das matérias-primas (ICH, 2001).

Preferencialmente, opta-se pela utilização de padrões primários como substância química de referência, que podem ser obtidos a partir de órgãos oficiais. No entanto, o uso de padrões secundários ou de trabalho é aceito, desde que seja comprovada sua identidade, qualidade, potência e pureza através de ensaios comparativos com o padrão primário (FDA, 2000; ICH, 2001).

Uma metodologia analítica pode ser empregada de acordo com quatro finalidades (BRASIL, 2003; ICH, 2005; USP 31, 2008):

- Categoria I – Testes quantitativos para a determinação da substância ativa em produtos farmacêuticos ou matérias-primas.
- Categoria II – Testes quantitativos ou ensaio limite para a determinação de impurezas e produtos de degradação em produtos farmacêuticos e matérias-primas.

- Categoria III – Testes de performance (por exemplo: dissolução, liberação do ativo).

- Categoria IV – Testes de identificação.

Para cada categoria de elaboração de métodos analíticos desenvolvidos, um conjunto de ensaios é exigido, como observado na Tabela 2.1.

Tabela 2.1. Ensaios necessários para a validação do método analítico, segundo sua finalidade

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

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

**se houver comprovação da reprodutibilidade não é necessária a comprovação da Precisão Intermediária.

(BRASIL, 2003).

Como documentos disponíveis no Brasil que trazem informações de validação de metodologia analítica, pode-se citar a RE nº 899/2003 (BRASIL,

2003) e o DOQ-CGCRE-008 (INMETRO, 2007), tidos como guias para validação de métodos analíticos.

De acordo com a EURACHEM (2000), os estudos de validação de métodos consistem na determinação dos parâmetros totais de desempenho. Estes parâmetros são obtidos no decorrer do desenvolvimento das metodologias ou estudos interlaboratoriais ou de acordo com protocolos internos de validação, quando incertezas devem ser investigadas comparativamente à precisão do método.

2.4.1. Especificidade e seletividade

Podem ser interpretados como a capacidade de avaliar inequivocamente o analito na presença de componentes que podem interferir na medição, ou seja, o método deve apresentar resposta para apenas o analito específico em questão. Entretanto, um método que produz respostas para vários analitos e que possui capacidade de distinguir a resposta entre eles, é tido como seletivo (BRASIL, 2003; ICH, 2005; INMETRO, 2007).

Convencionalmente, de acordo com a IUPAC é recomendável utilizar o termo seletividade para se tratar desta definição, como meio de evitar confusão desnecessária (VESSMAN *et al.*, 2001).

Os ensaios de especificidade requerem um conhecimento amplo de toda natureza do produto a ser estudado, como, por exemplo, excipientes e suas características, impurezas de síntese e degradação, onde muitas vezes faz-se necessário expor os produtos a condições de estresse para avaliar a formação dos compostos formados por degradação acelerada (INMETRO, 2007).

Muitas vezes pode haver interferência do desempenho da medição de determinada técnica analítica sem alteração em ensaios de especificidade. Para isso, os ensaios de seletividade devem ser conduzidos com disponibilidade e avaliação do analito, da matriz sem o analito e de amostras de referência nas concentrações de interesse para então, a aplicação dos testes F (*Snedecor*) de homogeneidade de variâncias e o teste t (*Student*) de comparação de médias,

ou ainda realizada a análise dos desvios em relação aos valores de referência (INMETRO, 2007).

Quando não se assegura que um método é analiticamente seletivo, pode-se dizer que a precisão, exatidão e linearidade estão também comprometidos (RIBANI *et al.*, 2003).

2.4.2. Linearidade

Quando se diz que um procedimento analítico apresenta linearidade significa que possui capacidade, em um específico intervalo ou faixa de aplicação, de obter resultados proporcionais à concentração do analito na amostra, característica esta, mínima para quantificação de fármacos (ICH, 2005; INMETRO, 2007).

É recomendado por BRASIL (2003) e ICH (2005), que a linearidade seja determinada por no mínimo 5 concentrações diferentes, sendo que, para determinação quantitativa do analito em matérias-primas ou em formas farmacêuticas utilize-se uma faixa de 80 a 120 % da concentração teórica do teste.

2.4.3. Intervalo

A especificação do intervalo é uma derivação dos ensaios de linearidade, exatidão e precisão. No limite inferior da faixa de concentração, os fatores limitantes são os valores dos limites de detecção e de quantificação. No limite superior, os fatores limitantes dependem do sistema de resposta do equipamento de medição (ICH, 2005; INMETRO, 2007).

2.4.4. Precisão

O ensaio de precisão visa a avaliação da dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, em condições pré-estabelecidas (INMETRO, 2007).

Para este teste é aconselhável a realização de um ensaio com no mínimo 7 leituras, pois a opção pelos cálculos estatísticos de 6 amostras e não 7, significa dizer uma redução de 2,8% na confiabilidade dos desvios padrão (INMETRO, 2007; SARAIVA, 2009).

Denomina-se repetibilidade (intra-corrída ou intra-dia) como o grau de concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo mensurando, efetuadas sob as mesmas condições de medição como procedimento operacional, analista, instrumentação, local e espaçamento de tempo pré definido (BRASIL, 2003; LANÇAS, 2004; INMETRO, 2007).

A precisão intermediária ou precisão inter-corrída (inter-dia), pode ser definida como a concordância entre os resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes, com analistas diferentes e/ou equipamentos diferentes (BRASIL, 2003).

Já o termo reprodutibilidade é utilizado como o grau de concordância entre os resultados das medições de um mesmo mensurando, efetuadas sob condições variadas de medição, como, por exemplo, um ensaio interlaboratorial (ICH, 2005; INMETRO, 2007).

Os coeficientes de variação dos dados obtidos nos ensaios de precisão devem ser calculados estatisticamente através da obtenção do Desvio Padrão Relativo (DPR) ou Coeficiente de Variação (CV%) podendo ser observado na Equação 1.

$$\text{DPR} = \text{DP} / \text{CMD} \cdot 100$$

Equação 1

Em que:

DP = desvio padrão

CMD = concentração média determinada

2.4.5. Exatidão

A exatidão é obtida pelo estudo da média de uma grande série de valores obtidos, comparativamente com os valores reais (JAPANESE PHARMACOPOEIA, 2001; BRASIL, 2003).

De acordo com o ICH (2005), a exatidão pode ser definida, uma vez que a linearidade, a precisão e a especificidade foram alcançadas.

Pode ser obtida pelo do ensaio de recuperação, no qual adiciona-se quantidades conhecidas de padrão a uma solução contendo o analito e então mensura-se o obtido com cálculos baseados na concentração teórica (INMETRO, 2007).

Para a obtenção dos resultados no ensaio, a percentagem de recuperação (R%) deve ser calculada pela expressão descrita pela Association of Official Analytical Chemists, apresentada na Equação 2 (AOAC, 1990).

$$R\% = [(C_f - C_u) / C_a] \cdot 100 \quad \text{Equação 2}$$

Na qual:

C_f = Concentração da substância de referência + concentração da amostra

C_u = Concentração da amostra

C_a = Concentração da substância referência adicionada

2.4.6. Limite de detecção

O limite de detecção é a menor quantidade do analito que pode ser detectada em uma amostra, porém não necessariamente quantificada. Pode ser obtido de diversas maneiras, levando-se em consideração também se o método é ou não instrumental (BRASIL, 2003; ICH, 2005).

Dependendo do método utilizado pode ser estabelecida como análise visual, pelo sinal-ruído do equipamento ou ainda a partir da inclinação da curva analítica e dos desvios padrões provenientes, sendo que esta última é tida

como estatisticamente mais confiável para o estabelecimento do limite de detecção e limite de quantificação (RIBANI *et al.*, 2003; ICH, 2005).

Para o desenvolvimento dos ensaios deste trabalho foi utilizado o método que se baseia nos parâmetros da curva analítica através da Equação 3.

$$LD = 3,3 \cdot s / S$$

Equação 3

Na qual:

LD = Limite de detecção

s = estimativa do desvio padrão da resposta obtida do coeficiente linear da equação

S = coeficiente angular da curva analítica

2.4.7. Limite de quantificação

O limite de quantificação ou limite de determinação é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas (BRASIL, 2003; INMETRO, 2007).

Não é recomendada a utilização da técnica sinal-ruído para obtenções dos limites de detecção e quantificação em métodos cromatográficos e eletroforéticos, uma vez que, a curva analítica não é obtida apenas com o sinal do detector, mas também com a área dos picos, podendo alterar resultados desses dois parâmetros analíticos (RIBANI *et al.*, 2003).

Para o desenvolvimento dos ensaios deste trabalho foi utilizado o método que se baseia nos parâmetros da curva analítica através da Equação 4.

$$LQ = 10 \cdot s / S$$

Equação 4

Na qual:

LQ = Limite de quantificação

s = estimativa do desvio padrão da resposta obtida do coeficiente linear da equação

S = coeficiente angular da curva analítica

2.4.8. Robustez

É a capacidade que um procedimento analítico apresenta de se manter inalterado ou insensível com pequenas variações das condições das análises (FDA, 2000; INMETRO, 2007).

De acordo com a Farmacopeia Japonesa e com o guia Brasil (2003), a robustez deve ser considerada durante o desenvolvimento de um método analítico, de forma a estabelecer solidez e precauções na elaboração dos procedimentos e realização dos ensaios (JAPANESE PHARMACOPOIEA, 2001).

Considera-se, inclusive, como robustez intrínseca, a precisão e exatidão do método quando há, no desenvolvimento deste, mudança de fornecedores de reagentes ou ainda da marca de equipamentos (RIBANI *et al.*, 2003).

É importante que o processo de validação seja desenvolvido de acordo com as necessidades de sua intenção, levando em consideração os parâmetros mínimos normativos. Por exemplo, não há necessidade da utilização de equipamentos diversos ou testes de reprodutibilidade quando não se pretende utilizar uma determinada metodologia em laboratórios diferentes de onde ocorreu o desenvolvimento (RIBANI *et al.*, 2003).

Segundo a FDA (2000), as informações apresentadas na validação de metodologia analítica devem contemplar também:

- Demonstração da estabilidade dos reagentes e amostras utilizados ao menos até a finalização das análises;
- Apresentação dos dados obtidos durante a validação, como, por exemplo, cromatogramas;
- Representação dos cálculos utilizados na íntegra;

- Informações obtidas em estudos de estresse (quando aplicável), bem como sua respectiva identificação de impurezas detectadas;

A utilização generalizada de equipamentos de cromatografia de diferentes marcas e modelos tem dificultado a comparabilidade entre processos analíticos. Como exemplo é possível citar a variedade de colunas (material, diâmetro interno, comprimento, tipo de filtro e uso de pré-colunas) que possuem a propriedade de reproduzir uma metodologia com exatidão e precisão (FDA, 2000).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivos gerais

Desenvolvimento e validação de métodos analíticos para determinação qualitativa e quantitativa do azumoleno sódico.

3.1. Objetivos específicos

- Avaliar a faixa de fusão do azumoleno sódico substância química de referência (SQR);
- Analisar o azumoleno sódico SQR e amostra através de análise térmica;
- Avaliar a solubilidade do azumoleno sódico substância química de referência (SQR) em diferentes solventes;
- Analisar qualitativamente o azumoleno sódico por espectroscopia na região do infravermelho;
- Desenvolver método por espectrofotometria na região ultravioleta para determinação qualitativa do azumoleno sódico;
- Desenvolver método por espectrofotometria na região visível para determinação qualitativa do azumoleno sódico;
- Desenvolver e validar método por espectrofotometria na região do ultravioleta para determinação quantitativa do azumoleno sódico;
- Desenvolver e validar método por espectrofotometria na região do visível para determinação quantitativa do azumoleno sódico;
- Desenvolver e validar método por cromatografia líquida de alta eficiência para determinação quantitativa do azumoleno sódico;
- Realizar análise comparativa dos métodos quantitativos desenvolvidos e validados para análise do azumoleno sódico.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Descrição

4.1.1. Azumoleno substância química de referência

Foi utilizado azumoleno sódico, substância química de referência, lote PD_0145, gentilmente fornecido pelo Laboratório Cristália (Itapira, Brasil).

O preparo das soluções-estoque de azumoleno sódico substância química de referência para a maior parte dos ensaios utilizados para o desenvolvimento e validação dos métodos analíticos em espectrofotometria de absorção na região do ultravioleta e visível e cromatografia líquida de alta eficiência ocorreu de forma padronizada.

Sistematicamente foram pesados 10,0 mg de azumoleno sódico SQR em balança analítica METTLER, modelo H10, sendo transferidos com auxílio de água purificada a balão volumétrico de vidro devidamente calibrado com capacidade de 100 mL. Levou-se ao ultra-som (UNIQUE, Ultra sonic clear) por cerca de 5 minutos para garantir total dissolução, finalmente completando-se o volume com água purificada, obtendo-se solução de azumoleno sódico SQR de concentração final de 100,0 µg/mL.

As estabilidades das soluções de azumoleno sódico SQR e amostra são de extrema importância para a condução dos estudos analíticos e de validação, tornando-se imprescindível a preparação no momento do uso.

4.1.2. Azumoleno sódico amostra

Foi utilizado azumoleno sódico amostra (matéria-prima) de lote AZM12_016, gentilmente fornecido pelo Laboratório Cristália (Itapira, Brasil).

O preparo das soluções-estoque de azumoleno sódico amostra para a maior parte dos ensaios utilizados para o desenvolvimento e validação dos métodos analíticos em espectrofotometria de absorção na região do ultravioleta

e visível e cromatografia líquida de alta eficiência ocorreu de forma sistemática e padronizada da mesma forma como citado no item 4.1.1.

4.2. Lista de equipamentos

- Balança analítica METTLER, modelo H10
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência Waters®
 - Bomba cromatográfica gradiente binária Waters® 1525
 - Injetor manual Rheodyne Breeze 7725i
 - Detector UV-Vis Waters® 2487
 - Coluna Symmetry C18 Waters® 5 µm (250 x 4,6 mm)
 - Software Empower
- Equipamento de análise térmica SDT 2960 TA Instruments
- Espectrofotômetro SHIMADZU FTIR, modelo 3000 (Columbia, USA)
- Espectrofotômetro UV/Vis SHIMADZU, modelo UV mini-1240
- Medidor de ponto de fusão PF 1500 GEHAKA
- Sistema de purificação de água Millipore (Direct-Q 3)
- Micro-pipetador HUAWEI P1000
- Ultra-som (UNIQUE, Ultra sonic clear)

4.3. Análise Qualitativa

4.3.1. Características físicas

Analisou-se o azumoleno sódico SQR visualmente em relação ao aspecto, cor e odor. A importância das análises de aspecto ou características físicas, bem como ensaios de avaliação qualitativa da matéria-prima podem em alguns casos, com bom treinamento técnico e monografia adequadamente descritiva, levantar logo no início dos testes dúvidas em relação à pureza e ao tipo de estruturas polimórficas presentes, trazendo a necessidade de estudos mais aprofundados (MORETTO, ALBUQUERQUE, 2009).

4.3.2. Solubilidade

Transferiram-se 20,0 mg de azumoleno sódico SQR para tubos de ensaio com acréscimo de alíquotas crescentes de cada solvente, sob agitação constante até completa solubilização.

A realização do teste seguiu em ambiente com temperatura constante de 25°C e especificações de ensaio de acordo com a Farmacopeia Brasileira (1988). Os solventes utilizados, sendo todos de grau analítico, foram:

- Acetato de etila (Synth, Brasil);
- Acetona (Synth, Brasil);
- Ácido clorídrico (HCl) 0,1 M (Merck, Alemanha);
- Água purificada obtida por sistema milli-Q;
- Clorofórmio (QUEMIS, Brasil);
- Etanol 96% (Merck, Alemanha);
- Hidróxido de sódio (NaOH) 0,1 M (Synth, Brasil);
- Isopropanol (Quimex, Brasil);
- Metanol (Quimex, Brasil);
- DMSO (Vetec, Brasil);
- Éter etílico (Quimis, Brasil);
- Acetonitrila (ACN) (J.T. Baker, USA).

A Farmacopeia Brasileira (1988) estabelece parâmetros de solubilidade considerando quantidade de solvente necessária para solubilizar um sólido, se referindo a partes, ou seja, 1 grama do sólido equivale para fins de análise a 1,0 mL do solvente líquido. Os parâmetros observados para critério de solubilidade estão apresentados na Tabela 4.1.

Tabela 4.1. Terminologia descritiva de solubilidade da Farmacopeia Brasileira (1988)

Termo Descritivo	Solvente
Muito Solúvel	Menos de 1 parte
Facilmente Solúvel	De 1 a 10 partes
Solúvel	De 10 a 30 partes
Ligeiramente Solúvel	De 30 a 100 partes
Pouco Solúvel	De 100 a 1000 partes
Muito Pouco Solúvel	De 1000 a 10000 partes
Praticamente insolúvel ou insolúvel	Mais de 10000 partes

4.3.3. Determinação do ponto de fusão

O ponto de fusão foi determinado no azumoleno SQR utilizando-se equipamento PF 1500 GEHAKA. A amostra foi dessecada e colocada em tubos capilares de vidro, com 1 mm de espessura e 6 cm de comprimento. Três capilares foram introduzidos no equipamento para serem analisados simultaneamente.

4.3.4. Análise térmica

A utilização da análise térmica é extremamente ampla na área farmacêutica como ferramenta útil e essencial para avaliar, por exemplo, possíveis interações entre componentes ativos e excipientes em estudos de compatibilidade de pré-formulações, além de avaliar a existência de polimorfismos, compostos de inclusão e dispersões sólidas, determinação de pureza química, estudos de reações no estado sólido, análise de formas farmacêuticas sólidas e controle de qualidade (CANOTILHO *et al.*, 1992; GUPCHUP *et al.*, 1992; CORDELLA *et al.*, 2002; RODANTE *et al.*, 2002; LAMBI *et al.*, 2003; TOMASSETTI *et al.*, 2005).

A aplicação de métodos térmicos de análise, em especial o DSC e a TG tem sido de fundamental importância no estudo de caracterização, desenvolvimento e controle de qualidade de produtos farmacêuticos, sendo que, as principais aplicações nessa área têm visado a caracterização de matérias-primas e produtos acabados (BUCKTON *et al.*, 1991; BROWN *et al.*, 1999; THOMPSON, 2000).

Nos sistemas termo analíticos a amostra é colocada em ambiente cuja temperatura é controlada por um dispositivo programador e suas alterações são monitoradas através de transdutores adequados que produzem um sinal elétrico de saída análogo à transformação ocorrida. Este sinal de saída após a amplificação adequada é aplicado a instrumentos de leitura (IONASHIRO, 2005).

Dentre as técnicas difundidas e utilizadas estão: Termogravimetria, Termogravimetria Derivada (TG, DTG), Análise Térmica Diferencial (DTA), Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC), Detecção de gás desprendido (EGA) e Análise termomecânica (TMA). Estas técnicas permitem obter informações com respeito à: variação de massa, estabilidade térmica; água livre e; água ligada; pureza, ponto de fusão, ponto de ebulição, calores de transição, calores específicos, diagramas de fase, cinética da reação, estudos de catalisadores, transições vítreas, entre outras.

4.3.4.1. Termogravimetria (TG)

A termogravimetria (TG) permite registrar as variações (perda e ganho) de massa de uma amostra em função do tempo do ciclo de aquecimento ou arrefecimento e/ou temperatura, sendo que, desta forma, as curvas obtidas (termogramas) podem fornecer informações referentes à estabilidade térmica e à pureza das substâncias (GIRON, 1990; CANOTILHO *et al.*, 1992; SALGADO *et al.*, 2005).

Entretanto, de acordo com Brown (2001), nem todos os eventos térmicos que ocorrem durante o aquecimento de uma amostra são acompanhados de mudança de massa.

4.3.4.1. Análise térmica diferencial (DTA)

Segundo Wendlandt (1986), a análise térmica diferencial (DTA) é uma técnica que inclui métodos analíticos que determinam propriedades físicas de substâncias em função de alterações na temperatura, no momento em que estas são controladas.

As curvas de Termogravimetria (TG) e de Análise Térmica Diferencial (DTA) foram obtidas no equipamento de análise térmica SDT 2960 TA Instruments, no Laboratório de Análise Térmica Ivo Giolito, no Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista (IQ-UNESP), Araraquara, SP, com colaboração do Prof. Dr. Massao Ionashiro.

A faixa de temperatura utilizada no ensaio foi de 30 a 1000 °C, sob atmosfera dinâmica de ar (vazão de 100 mL/min), razão de aquecimento de 20 °C/min e massa de amostra de 7,1894 para azuloleno sódico SQR e 7,1373 para azuloleno sódico amostra. As amostras foram acondicionadas em cadinho de alumina.

4.3.5. Espectrofotometria na região ultravioleta

O espectrofotômetro foi utilizado para obtenção dos espectros de absorção na região do ultravioleta entre 200 e 400 nm com auxílio de cubetas de quartzo de 1 cm de caminho óptico. Foi preparada solução do azuloleno sódico SQR como descrito no item 4.1.1., na concentração de 100,0 µg/mL em água purificada. A partir desta foram retiradas alíquotas de 1,0 mL, sendo transferidas para balões volumétricos de 10 mL com seus volumes completados com os solventes: água purificada, ácido clorídrico 0,1 M, hidróxido de sódio 0,1 M e metanol.

Após a determinação do solvente de escolha procedeu-se com a leitura no espectro de absorção na região do ultravioleta do azuloleno sódico amostra (matéria-prima), com finalidade de qualificação ou identificação em comparação com o espectro do azuloleno sódico SQR.

4.3.6. Espectrofotometria na região do visível

O espectrofotômetro foi utilizado para obtenção dos espectros de absorção na região visível entre 380 a 800 nm com auxílio de cubetas de quartzo de 1 cm de caminho óptico. Após o preparo da solução de azumoleno SQR 100 µg/mL descrita no item 4.1.1., foi transferido 1,0 mL desta solução e 1,0 mL da solução de ácido cloranílico 0,1%, conforme preparo no item 4.2.5.1. em balão volumétrico de 10 mL, completando-se o volume do balão com acetonitrila (ACN) (Merck). Procedeu-se a leitura no espectrofotômetro na região do visível (380 a 800 nm) contra a solução branco preparada da mesma forma, exceto pela presença do fármaco.

4.3.6.1. Preparo do reagente ácido cloranílico 0,1%

Foram transferidos 150,0 mg de ácido cloranílico (Merck, Alemanha) para balão volumétrico de 150 mL com auxílio de acetonitrila (ACN) (J.T. Baker, USA). Levou-se ao ultra-som por 10 minutos para garantir a dissolução e completou-se com acetonitrila, obtendo-se o reagente com concentração final de 0,1%.

4.3.7. Espectroscopia de absorção na região do infravermelho

Os espectros foram obtidos em espectrofotômetro SHIMADZU FTIR, modelo 3000 (Columbia, USA), pesando-se 10 mg de azumoleno sódico SQR de amostra, sendo preparadas em pastilha de 250 mg de brometo de potássio (KBr), sendo ambos dessecados previamente.

A amostra foi preparada através de trituração e homogeneização em almofariz e o sistema de preparo das pastilhas envolve basicamente uma bomba a vácuo e a prensa, ambos com pressão controlada e pré-estabelecida.

4.4. Análise quantitativa

4.4.1. Espectrofotometria na região do ultravioleta

O espectrofotômetro descrito no item 4.2. foi utilizado para obtenção dos espectros de absorção na região do ultravioleta de 340 nm com auxílio de cubetas de quartzo de 1 cm de caminho óptico. Foram preparadas soluções de azumoleno sódico SQR a 10,0 µg/mL em água purificada. O solvente de escolha foi a água devido a leitura de todos os solventes apresentar espectros de absorção no ultravioleta uniformes, com observação de picos semelhantes. No entanto, sua escolha ocorreu preferencialmente pelo fato de gerar resíduos com maior facilidade de tratamento e do uso de solventes de custos reduzidos.

4.4.1.1. Realização da curva de Ringbom

A realização da curva de Ringbom visou a determinação da faixa de concentração na qual o método espectrofotométrico na região do ultravioleta se apresenta linear.

A partir da solução de azumoleno sódico SQR de 100 µg/mL descrita no item 4.1.1. foram transferidas alíquotas para obtenção da curva de Ringbom com 21 pontos de concentrações crescentes, com auxílio de micro-pipetador automático. As alíquotas foram adicionadas em balões volumétricos de 10 mL, tendo seus volumes completados com água purificada, obtendo-se soluções com concentrações de 1,0 a 50,0 µg/mL de azumoleno sódico SQR, como apresentado na Tabela 4.2.

Tabela 4.2. Valores obtidos para construção da curva de Ringbom no método espectrofotométrico na região do UV a 340 nm para azumoleno sódico SQR

Pontos	Volume da solução de 100 µg/mL de azumoleno sódico SQR (mL)	Concentração final (µg/mL)
1	0,1	1,0
2	0,2	2,0
3	0,3	3,0
4	0,4	4,0
5	0,5	5,0
6	0,6	6,0
7	0,7	7,0
8	0,8	8,0
9	0,9	9,0
10	1,0	10,0
11	1,1	11,0
12	1,2	12,0
13	1,3	13,0
14	1,4	14,0
15	1,6	16,0
16	1,8	18,0
17	2,0	20,0
18	2,5	25,0
19	3,0	30,0
20	4,0	40,0
21	5,0	50,0

4.4.1.2. Obtenção da curva analítica

A partir da solução de azumoleno sódico SQR de 100 µg/mL descrita no item 4.1.1. foram transferidas alíquotas com auxílio de micro-pipetador automático para obtenção de soluções com concentrações de 7,0 a 12,0 µg/mL de azumoleno SQR, como pode-se observar na Tabela 4.3. Os volumes dos balões (10mL) foram completados com água purificada.

Tabela 4.3. Valores obtidos para construção da curva analítica no método espectrofotométrico na região do UV a 340 nm para azumoleno sódico SQR

Pontos	Volume da solução de 100 µg/mL de azumoleno sódico SQR (mL)	Concentração final (µg/mL)
1	0,7	7,0
2	0,8	8,0
3	0,9	9,0
4	1,0	10,0
5	1,1	11,0
6	1,2	12,0

Após a realização da curva analítica foi possível a obtenção da equação da reta, que relaciona a resposta medida, com a concentração e a inclinação da curva (sensibilidade).

A fórmula da equação da reta pode ser observada na Equação 5.

$$y = ax + b$$

Equação 5

Em que:

y = resposta medida;

x = concentração;

a = inclinação da curva analítica;

b = interseção com o eixo y , quando $x = 0$.

4.4.1.3. Determinação da concentração de azumoleno sódico na amostra

Foi preparada solução de azumoleno sódico SQR em concentração de 100,0 µg/mL de acordo com o item 4.1.1. e de azumoleno sódico amostra em mesma concentração de acordo com o item 4.1.2.

A partir dessas soluções foram transferidas 7 alíquotas de 1,0 mL para balões volumétricos de 10 mL e os volumes foram completados com água purificada, obtendo concentrações finais de 10,0 µg/mL.

A escolha da condução do estudo de azumoleno sódico em concentração de 10,0 µg/mL é justificada como sendo o ponto intermediário da faixa de trabalho estabelecida nos ensaios de linearidade (INMETRO, 2007).

Três leituras foram realizadas em dias diferentes, em consonância com os ensaios de precisão do método em espectrofotômetro a 340 nm, com utilização de cubeta de quartzo de 1 cm de caminho óptico e água purificada como branco.

4.4.1.3.1. Cálculos do teor de azumoleno sódico na amostra

A concentração da solução amostra foi obtida pela Equação 6.

$$C_A = A_A \cdot C_{SR} / A_{SR} \quad \text{Equação 6}$$

Na qual:

C_A = Concentração de azumoleno sódico na amostra (µg/mL)

A_A = Absorvância da amostra

C_{SR} = Concentração de azumoleno sódico da substância referência

A_{SR} = Absorvância da substância referência

O teor percentual foi calculado pela Equação 7.

$$C_A\% = C_A \cdot 100 / C_t$$

Equação 7

Em que:

C_A = Concentração de azuloleno sódico na amostra ($\mu\text{g/mL}$)

C_t = Concentração teórica do azuloleno sódico na amostra

4.4.1.4. Validação de metodologia analítica por espectrofotometria na região do ultravioleta

4.4.1.4.1. Linearidade

Os dados obtidos na construção da curva analítica foram analisados para obtenção da equação da reta pelo método dos mínimos quadrados e a verificação da linearidade foi constatada pela ANOVA.

4.4.1.4.2. Precisão

A precisão foi analisada pela realização de ensaios de determinação de azuloleno sódico SQR em 7 amostras de concentração 10,0 $\mu\text{g/mL}$, durante três dias consecutivos. Os coeficientes de variação dos dados foram calculados estatisticamente através da obtenção do Desvio Padrão Relativo (DPR) ou Coeficiente de Variação (CV%) podendo ser observado na Equação 1.

4.4.1.4.3. Exatidão

A exatidão do método foi determinada pelo ensaio de recuperação.

Foi preparada solução de azuloleno sódico SQR em concentração de 100,0 $\mu\text{g/mL}$ de acordo com o item 4.1.1. e de azuloleno sódico amostra em mesma concentração de acordo com o item 4.1.2.

Para o referido ensaio foram transferidas alíquotas de 1,75 mL da solução amostra para balões volumétricos de 25 mL, denominados A, R1, R2 e R3. Nos balões denominados R1, R2 e R3 foram adicionados, respectivamente 0,25; 0,75 e 1,25 mL de solução de azumoleno sódico SQR, completando-se o volume com água purificada obtendo-se as concentrações finais apresentadas na Tabela 4.4.

Tabela 4.4. Preparo das soluções para construção do teste de recuperação para azumoleno sódico por espectrofotometria na região do UV a 340 nm

	Volume adicionado de amostra (100 µg/mL) (mL)	Volume adicionado de AZ SQR (100 µg/mL) (mL)	Concentração final (µg/mL)*
Amostra	1,75	-	7,0
R1	1,75	0,25	8,0
R2	1,75	0,75	10,0
R3	1,75	1,25	12,0

* Cálculos para preparo em balão volumétrico de 25 mL

A porcentagem de recuperação (R%) foi calculada pela expressão descrita pela *Association of Official Analytical Chemists*, apresentada na Equação 2 (AOAC, 1990).

4.4.1.4.4. Robustez

A robustez do método foi determinada pela comparação dos resultados obtidos pela variação de dois analistas e de acordo com variação na leitura de espectros com variação de comprimento de onda (338 e 342 nm) em triplicata na concentração de 10,0 µg/mL, analisando e comparando-se ao comprimento de onda utilizado no desenvolvimento da metodologia.

4.4.1.4.5. Limite de detecção

O limite de detecção é a menor quantidade de um analito que pode ser identificada em uma amostra, porém não necessariamente quantificada, podendo ser calculado de três maneiras diferentes: método visual, método relação sinal-ruído, método baseado em parâmetros da curva analítica (ICH, 2005, RIBANI *et al.*, 2003; BRASIL, 2003).

Foi utilizado o método que se baseia nos parâmetros da curva analítica pela Equação 3.

4.4.1.4.6. Limite de quantificação

É a menor concentração em que uma substância pode ser medida (quantificada) com precisão e exatidão em uma amostra.

O modo mais confiável estatisticamente de estabelecimento do Limite de Detecção e Limite de Quantificação é utilizar o método baseado nos parâmetros da curva analítica (RIBANI *et al.*, 2003).

Foi utilizado o método que se baseia nos parâmetros da curva analítica como descrito na Equação 4.

4.4.2. Espectrofotometria de absorção na região do visível

Novos métodos de análise de caráter quantitativo são desenvolvidos sempre à medida do desenvolvimento de nova aparelhagem e equipamentos de medição com satisfatória confiabilidade analítica e metrológica.

A espectrofotometria na região do visível envolve a radiação absorvida por uma solução por luz monocromática em um comprimento de onda específico (380 a 700 nm). Essa análise é recomendada pela Farmacopeia Brasileira 3ª edição (1976) para substâncias coradas de forma natural ou ainda para aquelas que se transformam por reações químicas, obtendo coloração.

4.4.2.1. Metodologia empregando ácido cloranílico

O espectro na região do visível foi obtido utilizando-se o espectrofotômetro descrito no item 4.2.4. e cubetas de quartzo de 1 cm de caminho óptico, com leituras de 380 a 800 nm. Utilizou-se como solvente acetonitrila (ACN) (J.T. Baker, USA) e como reagente ácido cloranílico 0,1% (Merck, Alemanha).

4.4.2.1.1. Realização da curva de Ringbom

A realização da curva de Ringbom visou a determinação da faixa de concentração na qual o método espectrofotométrico na região do visível apresenta-se linear.

Foi preparada solução de azuloleno sódico SQR em concentração de 100,0 µg/mL de acordo com o item 4.1.1.

A partir desta solução foram transferidas alíquotas para obtenção da curva de Ringbom com 20 pontos de concentrações crescentes, com auxílio de micro-pipetador automático. As alíquotas foram adicionadas em balões volumétricos de 10 mL, com acréscimo de 1,0 mL de ácido cloranílico 0,1%, descrito no item 4.3.6.1., tendo seus volumes completados com acetonitrila, obtendo-se soluções com concentrações de 0,5 a 20,0 µg/mL de azuloleno sódico SQR, como apresentado na Tabela 4.5.

Tabela 4.5. Preparo da curva de Ringbom para leitura de azumoleno sódico SQR em espectrofotometria na região do visível a 507 nm com utilização de acetonitrila como solvente e ácido clorânico 0,1% como reagente

Pontos	Volume da solução de 100 µg/mL de azumoleno sódico SQR (mL)	Concentração final (µg/mL)
1	0,05	0,5
2	0,1	1,0
3	0,2	2,0
4	0,3	3,0
5	0,4	4,0
6	0,5	5,0
7	0,6	6,0
8	0,7	7,0
9	0,8	8,0
10	0,9	9,0
11	1,0	10,0
12	1,1	11,0
13	1,2	12,0
14	1,3	13,0
15	1,4	14,0
16	1,5	15,0
17	1,6	16,0
18	1,7	17,0
19	1,8	18,0
20	1,9	19,0
21	2,0	20,0

4.4.2.1.2. Obtenção da curva analítica

Foi preparada solução de azumoleno sódico SQR em concentração de 100,0 µg/mL de acordo com o item 4.1.1. A partir desta solução, foram transferidas alíquotas com auxílio de micro-pipetador automático para balões de 10 mL, para obtenção de soluções com concentrações de 8,0 a 13,0 µg/mL de azumoleno SQR com 1 mL de ácido clorânico 0,1% e volume completado com acetonitrila para 10 mL em balão volumétrico, podendo ser observada na Tabela 4.6.

Tabela 4.6. Preparo da curva analítica de azumoleno sódico SQR por espectrofotometria na região visível a 507 nm com utilização de acetonitrila como solvente e ácido clorânico 0,1% como reagente

Pontos	Volume da solução de 100 µg/mL de azumoleno sódico SQR (mL)	Concentração final (µg/mL)
1	0,8	8,0
2	0,9	9,0
3	1,0	10,0
4	1,1	11,0
5	1,2	12,0
6	1,3	13,0

Após a realização da curva analítica foi possível a obtenção da equação da reta, que relaciona a resposta medida, com a concentração e a inclinação da curva (sensibilidade).

A fórmula da equação da reta está apresentada na Equação 5.

4.4.2.1.3. Determinação da concentração de azumoleno sódico na amostra

Foi preparada solução de azumoleno sódico SQR em concentração de 100,0 µg/mL de acordo com o item 4.1.1. e de azumoleno sódico amostra em mesma concentração de acordo com o item 4.1.2.

A partir dessas soluções foram transferidas alíquotas de 1,0 mL para balão volumétrico de 10 mL, com acréscimo de 1,0 mL de ácido clorânico 0,1% e o volume foi completado com acetonitrila, obtendo concentrações finais de 10,0 µg/mL. As soluções foram preparadas em sete réplicas.

A escolha da condução do estudo do azumoleno sódico em concentração de 10,0 µg/mL é justificada como sendo o ponto intermediário da faixa de trabalho estabelecida nos ensaios de linearidade (INMETRO, 2007).

As leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 507 nm, com utilização de cubetas de quartzo de 1 cm de caminho óptico e acetonitrila. Foi utilizado 1,0 mL de ácido clorânico 0,1% como branco.

4.4.2.1.3.1. Cálculos de teor de azumoleno sódico na amostra

A concentração da solução amostra foi obtida pela Equação 6. e o teor percentual foi calculado pela Equação 7.

4.4.2.1.4. Validação de metodologia analítica por espectrofotometria na região do visível

4.4.2.1.4.1. Linearidade

Os dados obtidos na construção da curva analítica foram analisados para obtenção da equação da reta pelo método dos mínimos quadrados e a verificação da linearidade foi constatada pela ANOVA.

4.4.2.1.4.2. Precisão

A precisão foi analisada pela realização de ensaios da determinação de azumoleno sódico SQR em 7 réplicas de concentração 10,0 µg/mL, durante três dias consecutivos. Os coeficientes de variação dos dados foram calculados estatisticamente pelo Desvio Padrão Relativo (DPR) ou Coeficiente de Variação (CV%), descrito na Equação 1.

4.4.2.1.4.3. Exatidão

A exatidão do método foi determinada pelo ensaio de recuperação.

Foi preparada solução de azumoleno sódico SQR em concentração de 100,0 µg/mL de acordo com o item 4.1.1. e de azumoleno sódico amostra em mesma concentração de acordo com o item 4.1.2.

Para o referido ensaio foram transferidas alíquotas de 1,75 mL da solução amostra a 100 µg/mL para balões volumétricos de 25 mL, denominados A, R1, R2 e R3. Nos balões denominados R1, R2 e R3 foram adicionados respectivamente 0,25; 0,75 e 1,25 mL de solução de azumoleno sódico SQR, completando-se todos com água purificada obtendo-se as concentrações finais apresentadas na Tabela 4.7.

Tabela 4.7. Preparo das soluções para construção da teste de recuperação para azumoleno sódico por espectrofotometria na região do visível a 507 nm com utilização de acetonitrila como solvente e ácido clorânico 0,1% como reagente

	Volume adicionado de amostra (100 µg/mL) (mL)	Volume adicionado de AZ SQR (100 µg/mL) (mL)	Concentração final (µg/mL)*
Amostra	1,75	-	7,0
R1	1,75	0,25	8,0
R2	1,75	0,75	10,0
R3	1,75	1,25	12,0

* Cálculos para preparo em balão volumétrico de 25 mL

A percentagem de recuperação (R%) foi calculada pela expressão descrita pela *Association of Official Analytical Chemists*, apresentada na Equação 2 (AOAC, 1990).

4.4.2.1.4.4. Robustez

A robustez do método foi determinada pela comparação dos resultados obtidos pela variação de dois analistas e de acordo com variação na leitura de espectros com variação de comprimento de onda (505 e 509 nm) de concentração 10,0 µg/mL, analisando e comparando-se ao comprimento de onda de 507 nm utilizado no desenvolvimento do método.

4.4.2.1.4.5. Limite de detecção

O limite de detecção é a menor quantidade de um analito que pode ser identificada em uma amostra, porém não necessariamente quantificada,

podendo ser calculado de três maneiras diferentes: método visual, método relação sinal-ruído, método baseado em parâmetros da curva analítica (RIBANI *et al.*, 2003; BRASIL, 2003; ICH, 2005).

Foi utilizado o método que se baseia nos parâmetros da curva analítica descrita na Equação 3.

4.4.2.1.4.6. Limite de quantificação

É a menor concentração em que uma substância pode ser medida (quantificada) com precisão e exatidão em uma amostra.

O modo mais confiável estatisticamente de estabelecimento do Limite de Detecção e Limite de Quantificação é utilizar o método baseado nos parâmetros da curva analítica (RIBANI *et al.*, 2004).

Foi utilizado o método que se baseia nos parâmetros da curva analítica descrita na Equação 4.

4.4.3. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

4.4.3.1. Equipamentos e materiais

Foram utilizados azumoleno sódico SQR e azumoleno sódico amostra descritos nos itens 4.1.1. e 4.1.2.

Utilizaram-se como solventes: metanol grau CLAE (MetOH), água purificada (Milli-Q®) e ácido fórmico PA (HAc) (Synth, Brasil) para ajuste de pH. Os solventes foram filtrados através de membrana de nitrato de celulose de 0,45 µm (Sartorius) e degaseificados em ultra-som (UNIQUE, Ultra sonic clear) durante 30 minutos.

O sistema cromatográfico consiste em cromatógrafo líquido de alta eficiência Waters®, composto de bomba cromatográfica gradiente binária Waters® 1525, injetor manual Rheodyne Breeze 7725i e detector UV-Vis Waters® 2487. Foi utilizada coluna Symmetry C18 Waters® 5 µm (250 x 4,6 mm).

4.4.3.2. Ensaios preliminares

Diversas condições cromatográficas foram avaliadas com o objetivo de obter uma quantificação confiável do azumoleno sódico, reduzir a assimetria do pico e de danos à coluna cromatográfica, bem como minimizar a geração de resíduos danosos ao ambiente.

Foram testadas as fases móveis metanol : água (50:50 v/v); metanol : água (50:25 v/v); metanol : água (75:25 v/v); metanol : água : acetonitrila (50:25:25 v/v) e metanol : água (75:25, v/v) com pH 3,0 ajustado com de ácido fórmico sendo previamente filtradas por membrana de 0,45 μm de tamanho de poro e 47 mm de diâmetro, sob vácuo, e desgaseificadas durante 30 minutos. Após a estabilização do sistema, foram injetados volumes pré-fixados de 20,0 μL da solução previamente filtrada em membrana para obtenção das leituras a 340 nm, com vazão de 1,0 mL/min.

Os solventes utilizados foram de grau HPLC, sendo acetonitrila (J.T. Baker, USA) e metanol (J.T. Baker, USA).

Foi utilizada coluna Waters C18 (WAT 054275), com vazão de 1,0 mL/min, 20°C \pm 1°C e sensibilidade de detecção de 0,5 AUFS.

A escolha da fase móvel a ser utilizada em determinado método cromatográfico é de extrema importância, uma vez que se pode obter espectros de picos mais bem definidos, com tempo de retenção mais reduzido, maior sensibilidade e afinidade com a substância que se deseja estudar.

4.4.3.3. Obtenção da curva analítica

Foi preparada solução de azumoleno sódico SQR em concentração de 100,0 $\mu\text{g/mL}$ de acordo com o item 4.1.1. e a partir dessa solução foram transferidas, em triplicata, alíquotas de 0,5 a 1,5 mL com auxílio de micropipetador automático para balões de 10 mL, para obtenção de soluções com concentrações de 5,0 a 15,0 $\mu\text{g/mL}$ de azumoleno SQR. A fase móvel metanol : água (75:25, v/v) com pH 3,0 ajustado com de ácido fórmico foi filtrada por

membrana de 0,45 μm de tamanho de poro e 47 mm de diâmetro, sob vácuo, e desgaseificada durante 30 minutos. Pode-se observar o preparo das soluções para a obtenção da curva analítica na Tabela 4.8.

Tabela 4.8. Preparo das soluções para construção da curva analítica no método CLAE a 340 nm para azumoleno sódico SQR

Pontos	Volume da solução de 100 $\mu\text{g/mL}$ de azumoleno sódico SQR (mL)	Concentração final ($\mu\text{g/mL}$)
1	0,5	5,0
2	0,7	7,0
3	0,9	9,0
4	1,1	11,0
5	1,3	13,0
6	1,5	15,0

Após a realização da curva analítica foi possível a obtenção da equação da reta, que relaciona a resposta medida, com a concentração e a inclinação da curva (sensibilidade).

A fórmula da equação da reta está apresentada na Equação 5.

4.4.3.4. Determinação da concentração de azumoleno sódico na amostra

Foi preparada solução de azumoleno sódico SQR em concentração de 100,0 $\mu\text{g/mL}$ de acordo com o item 4.1.1. e de azumoleno sódico amostra em mesma concentração de acordo com o item 4.1.2. A partir de cada solução foram transferidas 7 alíquotas de 0,9 mL para balão volumétrico de 10 mL, obtendo-se soluções de azumoleno sódico SQR e amostra de 9,0 $\mu\text{g/mL}$.

A escolha da condução do estudo do azumoleno sódico em concentração de 9,0 µg/mL é justificada como sendo o ponto intermediário da faixa de trabalho estabelecida nos ensaios de linearidade (INMETRO, 2007).

As leituras das soluções foram realizadas em cromatógrafo líquido de alta eficiência com detector UV no comprimento de onda de 340 nm.

4.4.3.4.1. Cálculos de teor de azumoleno sódico na amostra

A concentração da solução amostra foi obtida pela Equação 6. e o teor percentual foi calculado pela Equação 7.

4.4.3.5. Validação de metodologia analítica por CLAE

4.4.3.5.1. Linearidade

Os dados obtidos na construção da curva analítica foram analisados para obtenção da equação da reta pelo método dos mínimos quadrados e a verificação da linearidade foi constatada pela ANOVA.

4.4.3.5.2. Precisão

A precisão foi analisada pela realização de ensaios de determinação de azumoleno sódico SQR em 7 amostras de concentração 9,0 µg/mL, durante três dias consecutivos. Os coeficientes de variação dos dados foram calculados estatisticamente pela obtenção do Desvio Padrão Relativo (DPR) ou Coeficiente de Variação (CV%) podendo ser observado na Equação 1.

4.4.3.5.3. Exatidão

A exatidão do método foi determinada pelo teste de recuperação.

Foi preparada solução de azumoleno sódico SQR em concentração de 100,0 µg/mL de acordo com o item 4.1.1. e de azumoleno sódico amostra em mesma concentração de acordo com o item 4.1.2.

Para o referido ensaio foram transferidas alíquotas de 1,75 mL da solução amostra a 100 µg/mL para balões volumétricos de 25 mL, denominados A, R1, R2 e R3. Nos balões denominados R1, R2 e R3 foram adicionados respectivamente 0,25; 0,75 e 1,25 mL de solução de azumoleno sódico SQR, completando-se todos com água purificada obtendo-se as concentrações finais apresentadas na Tabela 4.9.

Tabela 4.9. Preparo das soluções para construção do teste de recuperação para azumoleno sódico por CLAE a 340 nm

	Volume adicionado de amostra (100µg/mL) (mL)	Volume adicionado de AZ SQR (100 µg/mL) (mL)	Concentração final (µg/mL)*
Amostra	1,75	-	7,0
R1	1,75	0,25	8,0
R2	1,75	0,75	10,0
R3	1,75	1,25	12,0

* Cálculos para preparo em balão volumétrico de 25 mL

A porcentagem de recuperação (R%) foi calculada pela expressão descrita pela *Association of Official Analytical Chemists* que está apresentada na Equação 2 (AOAC, 1990).

4.4.3.5.4. Robustez

A robustez do método foi determinada pela comparação dos resultados obtidos da análise do azumoleno sódico SQR em concentração 9,0 µg/mL pela variação de dois analistas em dias diferentes e variação da vazão do

equipamento com variação de 0,9 mL/min e 1,1 mL/min, em comparação à 1,0 mL/min (vazão padrão utilizada no desenvolvimento do método proposto por CLAE).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Análise qualitativa

5.1.1. Características físicas

A amostra analisada apresenta-se como um pó branco, diferentemente de seu congêneres dantroleno, que se apresenta como um pó cristalino amarelo alaranjado ou laranja (BRITISH PHARMACOPOEIA, 2009).

5.1.2. Solubilidade

O teste de solubilidade foi realizado de acordo com o item 4.2.2.

A Tabela 5.1. apresenta os resultados obtidos no teste de solubilidade para o azumoleno SQR nos solventes avaliados.

Tabela 5.1. Solubilidade do azumoleno SQR em diferentes solventes a 25°C

Solventes	Termo Descritivo Resultante
acetato de etila	praticamente insolúvel ou insolúvel
acetona	muito pouco solúvel
acetonitrila	muito pouco solúvel
ácido clorídrico 0,1 M	muito pouco solúvel
água purificada	pouco solúvel
clorofórmio	muito pouco solúvel
dimetilsulfóxido (DMSO)	muito pouco solúvel
etanol 96%	muito pouco solúvel
éter etílico	pouco solúvel
hexano	muito pouco solúvel
hidróxido de sódio 0,1 M	muito pouco solúvel
isopropanol	muito pouco solúvel
metanol	pouco solúvel

A solubilidade do dantroleno sódico apresenta-se, segundo a Farmacopeia Britânica, como muito pouco solúvel em água, ligeiramente solúvel em etanol (96%), moderadamente solúvel em metanol e praticamente insolúvel em acetona (BRITISH PHARMACOPOEIA, 2009).

Segundo a Farmacopeia Japonesa, o dantroleno sódico é solúvel em propilenoglicol, moderadamente solúvel em metanol, ligeiramente solúvel em água e em ácido acético e praticamente insolúvel em tetrahydrofurano e éter (JAPANESE PHARMACOPOEIA, 2001).

Pode-se observar que os resultados referentes aos ensaios de solubilidade do azumoleno sódico mostram comportamento similar às referências de solubilidade do seu análogo, dantroleno sódico das farmacopeias britânica e japonesa (JAPANESE PHARMACOPOEIA, 2001; BRITISH PHARMACOPOEIA, 2009).

5.1.3. Determinação do ponto de fusão

O ponto de fusão do azumoleno sódico indicado por Ganellin e Triggle (1996) é de 240 a 242°C. Já os ensaios apresentados resultaram em resultando em uma média de 242,5°C para a SQR e de 241,9°C para a amostra.

O ponto de fusão pode ser empregado na caracterização de um composto e comparado a uma especificação ou padrão de referência, é um importante indicativo de pureza, pois uma pequena quantidade de impureza pode causar abaixamento do ponto de fusão ou ainda alargar a faixa de fusão de compostos farmacêuticos (GRAHAM, 1995).

5.1.4. Análise térmica

As curvas obtidas nas análise térmicas TG e DTA para o azumoleno sódico SQR e amostra apresentaram-se semelhantes, como se pode observar nas Figuras 5.1. e 5.2. respectivamente.

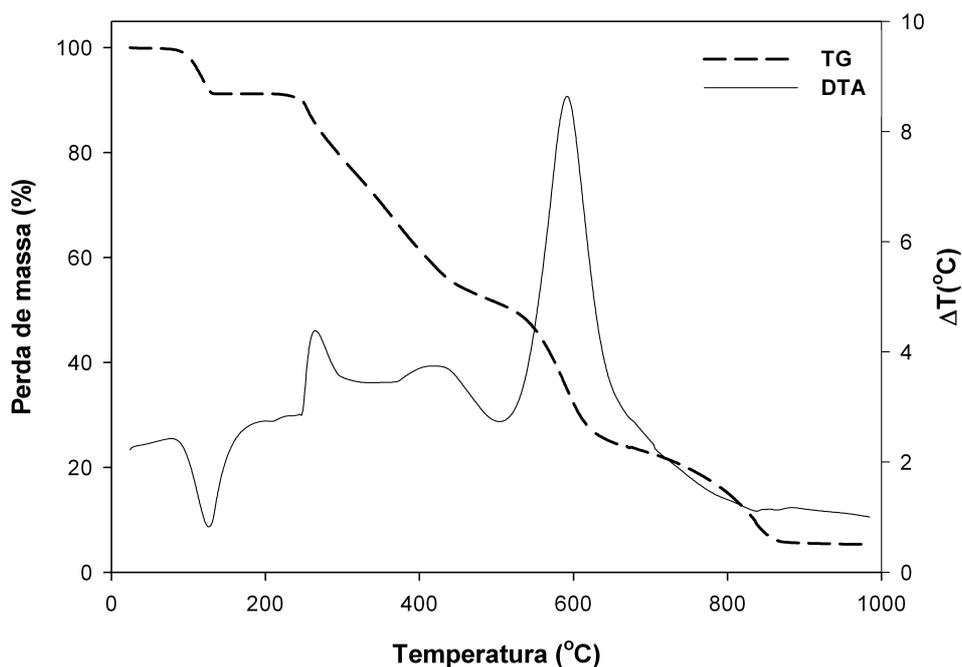


Figura 5.1. Curva TG e DTA do azumoleno sódico SQR em atmosfera de O_2 com razão de aquecimento de $20^{\circ}\text{C}/\text{min}$.

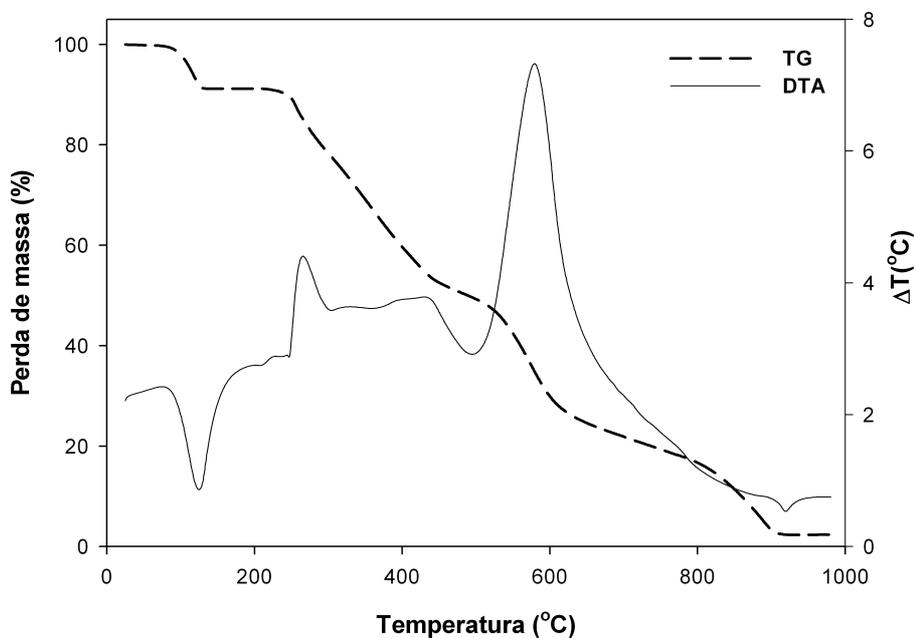


Figura 5.2. Curva TG e DTA do azumoleno sódico amostra em atmosfera de O_2 com razão de aquecimento de $20^{\circ}\text{C}/\text{min}$.

É possível notar em ambos os gráficos termoanalíticos uma divisão em três etapas de degradação. Na curva do azumoleno sódico SQR a primeira etapa de degradação tem seu início em torno de 240°C e término aproximadamente em 450°C. A segunda etapa tem início ao final da primeira e término em 625°C, onde inicia a terceira, com término em torno de 860°C. A curva do azumoleno sódico amostra se reproduz graficamente, porém, com término da terceira etapa de degradação em torno de 910°C.

É possível ainda observar nas curvas termoanalíticas em torno de 126°C uma perda de massa de 8,71% para o SQR e 8,78% para a amostra, podendo-se concluir pela referente temperatura do fenômeno e perda de massa (equivalente a dois moles de água) que o evento se trata de desidratação, onde a substância se torna anidra e permanece com massa constante até 240°C, onde se inicia a primeira etapa de degradação.

Ao final da primeira etapa de degradação pôde-se observar uma perda de massa total de 45,8% para o azumoleno SQR e 47,33% para a amostra. Ao final da segunda etapa houve uma perda total de 73,08% para a SQR e 73,86% para a amostra. A perda de massa total após a terceira etapa foi de 94,69% para a SQR e 97,65% para a amostra, podendo-se explicar tal diferença pela variação entre a extensão da terceira etapa, sendo que a primeira avançou até 860°C e a segunda até 910°C, como dito anteriormente.

5.1.5. Espectrofotometria na região do ultravioleta

A análise dos espectros de absorção na região do ultravioleta (200-400 nm) de uma substância pode possibilitar sua identificação. Foram avaliados espectros do azumoleno sódico SQR nos solventes: água purificada, metanol, ácido clorídrico 0,1 *M* e hidróxido de sódio 0,1 *M*.

A absorção máxima observada de azumoleno sódico SQR em solução com água purificada na concentração de 10 µg/mL ocorreu no comprimento de onda de 339 nm, podendo-se notar um segundo pico a 260 nm na Figura 5.3.

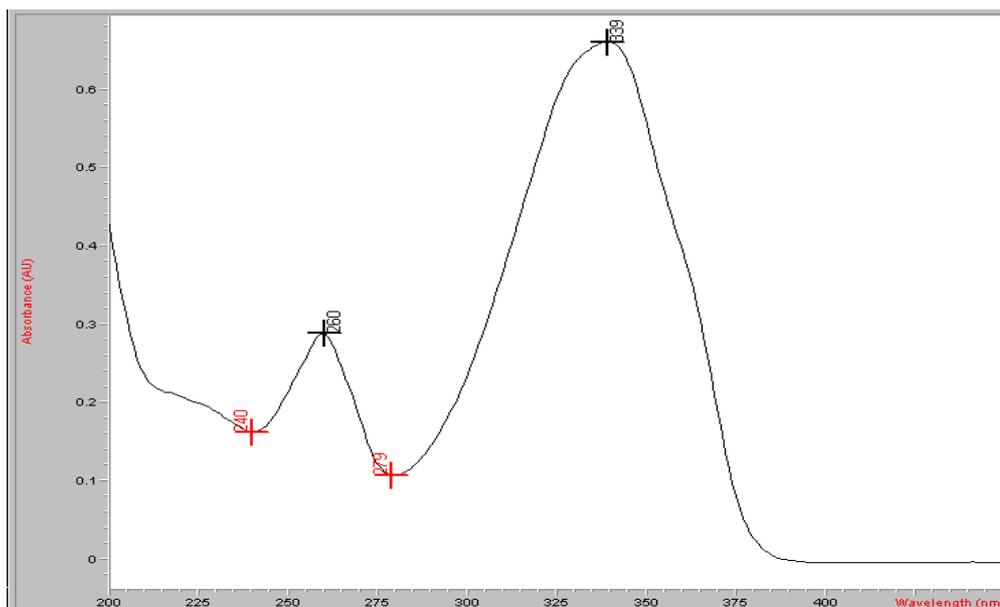


Figura 5.3. Espectro na região do ultravioleta de azumoleno sódico SQR a 10,0 µg/mL em água purificada.

A absorção máxima observada de azumoleno sódico SQR em solução com metanol na concentração de 10 µg/mL ocorreu no comprimento de onda de 337 nm, podendo notar um segundo pico a 259 nm na Figura 5.4.

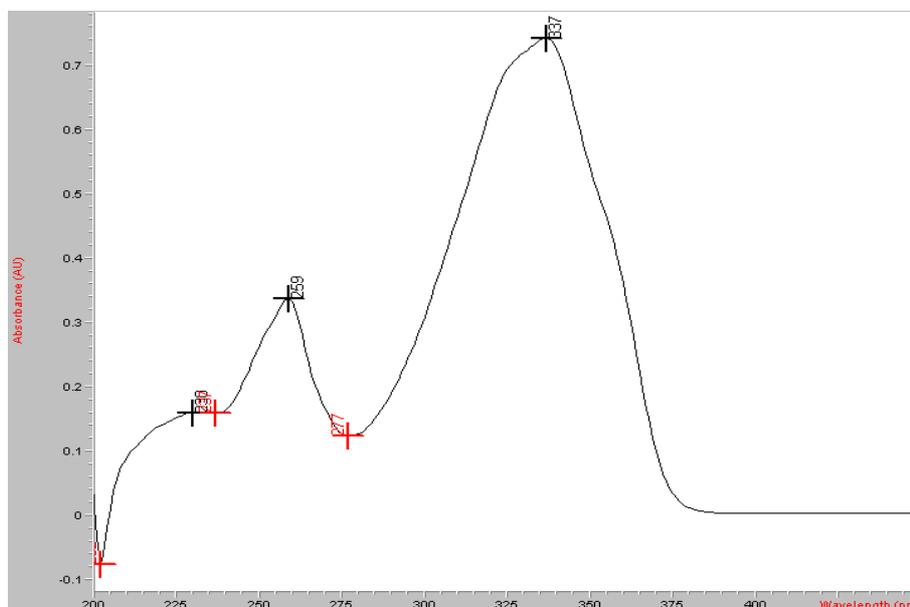


Figura 5.4. Espectro na região do ultravioleta de azumoleno sódico SQR a 10,0 µg/mL em metanol.

A absorção máxima observada de azuloleno sódico SQR em solução com ácido clorídrico 0,1 M na concentração de 10 µg/mL ocorreu no comprimento de onda de 338 nm, podendo-se notar outros picos a 259 e 203 nm na Figura 5.5.

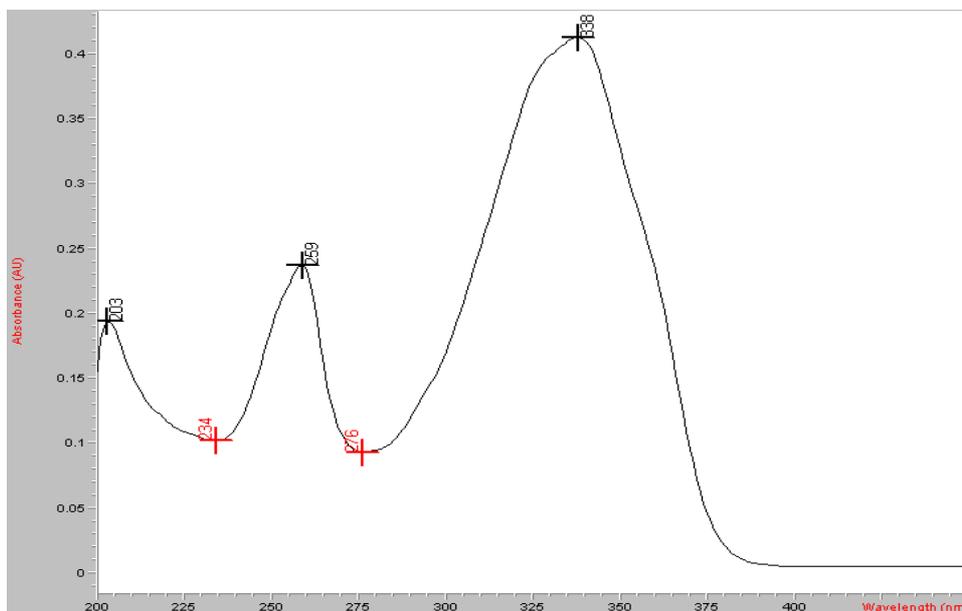


Figura 5.5. Espectro na região do ultravioleta de azuloleno sódico SQR a 10,0 µg/mL em ácido clorídrico 0,1 M.

A absorção máxima observada de azuloleno sódico SQR em solução com hidróxido de sódio 0,1 M na concentração de 10 µg/mL ocorreu no comprimento de onda de 342 nm, podendo-se notar outros picos à 266 e 225 nm na Figura 5.6.

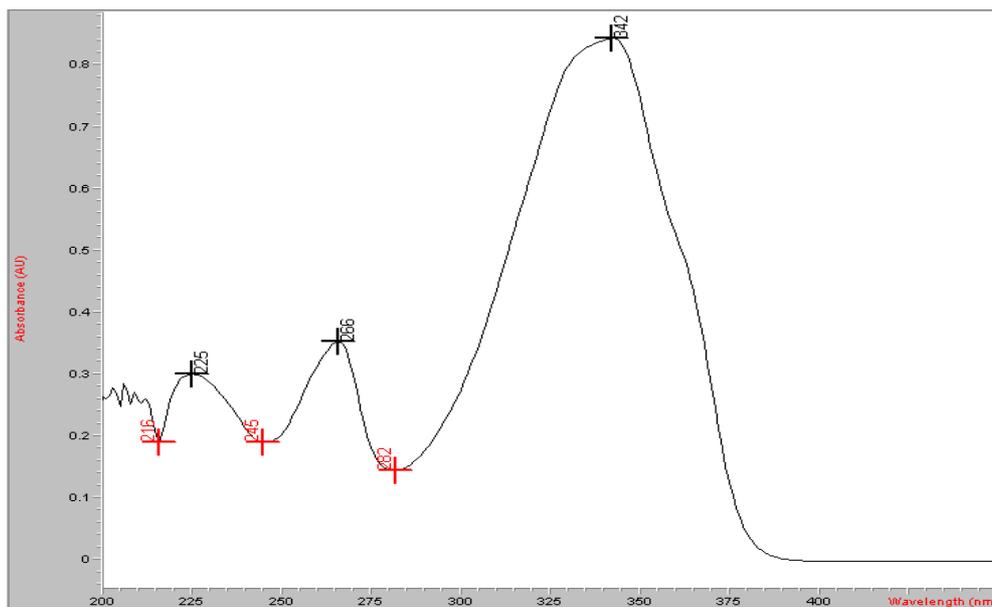


Figura 5.6. Espectro na região do ultravioleta de azuloleno sódico SQR a 10,0 $\mu\text{g/mL}$ em hidróxido de sódio 0,1 M .

A absorção molecular na região do ultravioleta do espectro depende da estrutura eletrônica da molécula. Portanto, a identificação do fármaco pode ser feita pela determinação de suas características de absorção em diferentes solventes no espectro (SILVERSTEIN e WEBSTER, 2000).

De acordo com a Farmacopeia Japonesa (2001), a identificação do dantroleno sódico em espectrofotometria de absorção na região do ultravioleta deve ser avaliada em solução de metanol, no entanto, neste trabalho, optou-se pela utilização da água purificada como solvente por possuir vantagens econômicas e ecológicas, tais como ser de fácil aquisição, baixo custo e fácil descarte.

Após a determinação do solvente de escolha (água purificada) procedeu-se com a leitura no espectro de absorção na região do ultravioleta do azuloleno sódico amostra (matéria-prima), com finalidade de qualificação ou identificação através do respectivo método, obtendo um espectro similar ao do azuloleno sódico SQR, como se pode observar na Figura 5.7.

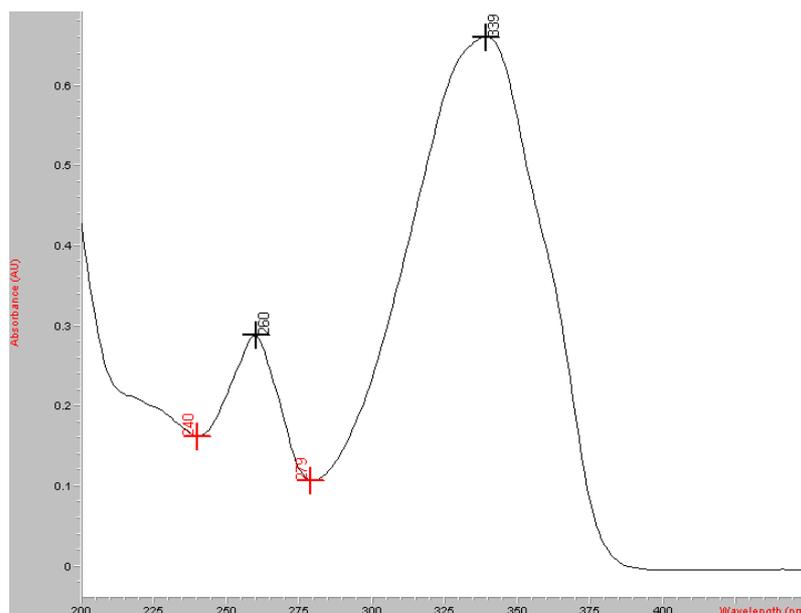


Figura 5.7. Espectro na região do ultravioleta de azumoleno sódico amostra a 10,0 µg/mL em água purificada.

5.1.6. Espectrofotometria de absorção na região do visível

A escolha do uso da acetonitrila, de acordo com Melby e colaboradores (1962), ocorreu devido ao seu alto poder ionizante.

A coloração violeta pode ser observada imediatamente após adição do ácido clorânico 0,1% no balão volumétrico contendo solução de azumoleno sódico SQR em concentração de 10 µg/mL.

Pode-se observar as características do espectro do azumoleno SQR na região do visível na Figura 5.5. com formação de pico a 507 nm, e os espectros do azumoleno amostra e SQR sobrepostos na Figura 5.8.

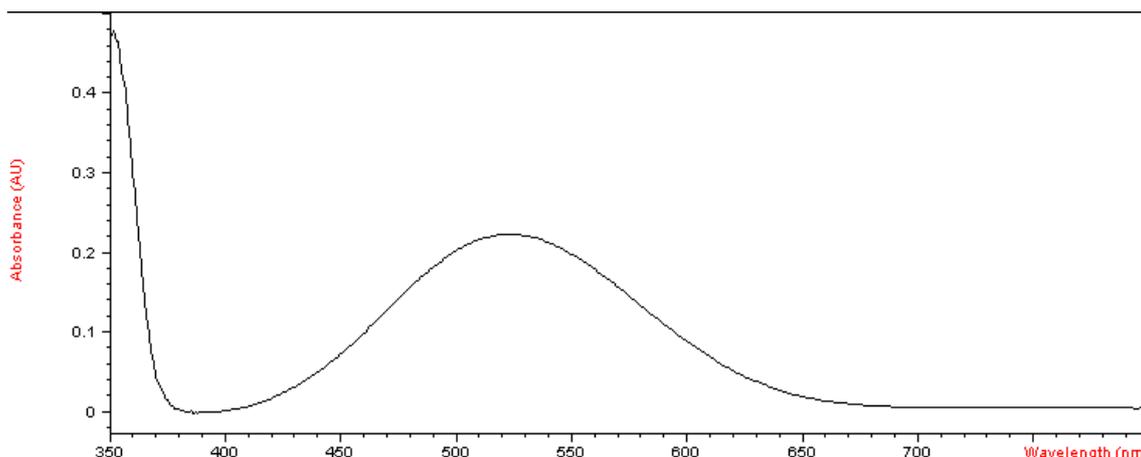


Figura 5.8. Espectro de absorção da solução de azumoleno SQR com concentração de 10,0 $\mu\text{g/mL}$, na região do visível a 507 nm, utilizando acetonitrila como solvente e 1,0% ácido cloranílico como reagente.

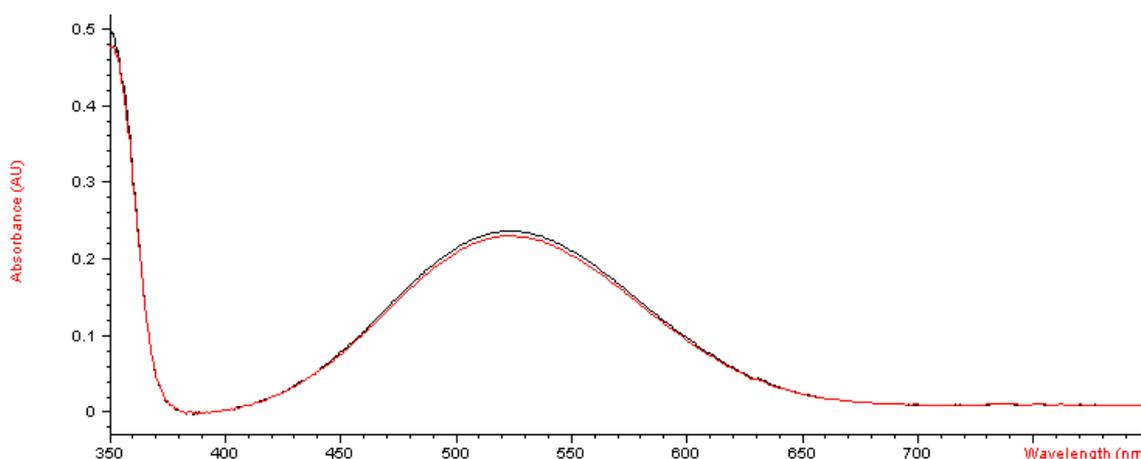


Figura 5.9. Sobreposição dos espectros de absorção da solução de azumoleno SQR e amostra com concentração de 10,0 $\mu\text{g/mL}$, na região do visível a 507 nm, utilizando acetonitrila como solvente e 1,0% ácido cloranílico como reagente.

Reações de transferência de cargas podem ser ideais para esta metodologia de análise. O ácido cloranílico é um aceptor de elétrons amplamente utilizado por exemplo para análises fotométricas na região do visível para as penicilinas (LEMING *et al.*, 2003), cefalosporinas (SALEH *et al.*, 2001), antimaláricos (ONAH, ODEIANI, 2002), antifúngicos (KHASHBA *et al.*,

2000) e do propranolol (EL-REIS *et al.*, 2000). Em uma busca na literatura do azumoleno sódico não foi encontrada a associação com essa substância.

É possível verificar absorção do ácido cloranílico com acetonitrila em região próxima a 390 nm. A adição de azumoleno sódico na solução produz imediatamente uma mudança da coloração amarelada para a cor violeta resultando em uma absorção máxima a 507 nm devido à ocorrência do pareamento iônico (FAHELELBOM, 2008).

As bandas largas que podem ser observadas nos espectros da Figura 5.8. e 5.9. deixam claro que houve formação de um complexo resultante da transferência de cargas.

5.1.7. Espectroscopia de absorção na região do infravermelho

Os espectros obtidos com azumoleno sódico SQR e amostra, utilizando-se pastilhas de brometo de potássio, podem ser observados nas Figuras 5.10. e 5.11., respectivamente.

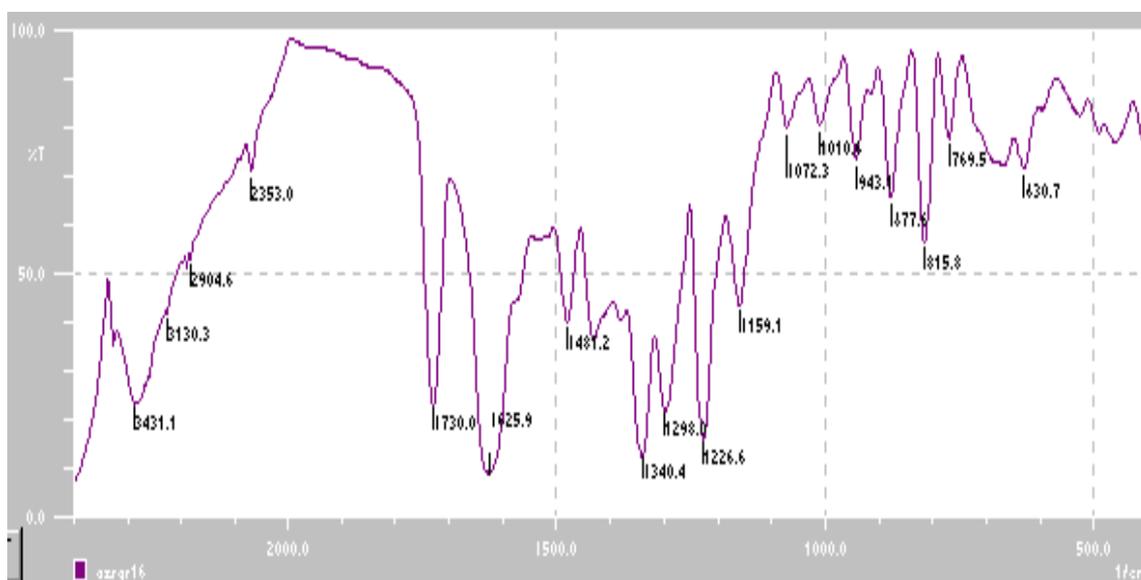


Figura 5.10. Espectro na região infravermelho de azumoleno SQR em pastilhas de KBr.

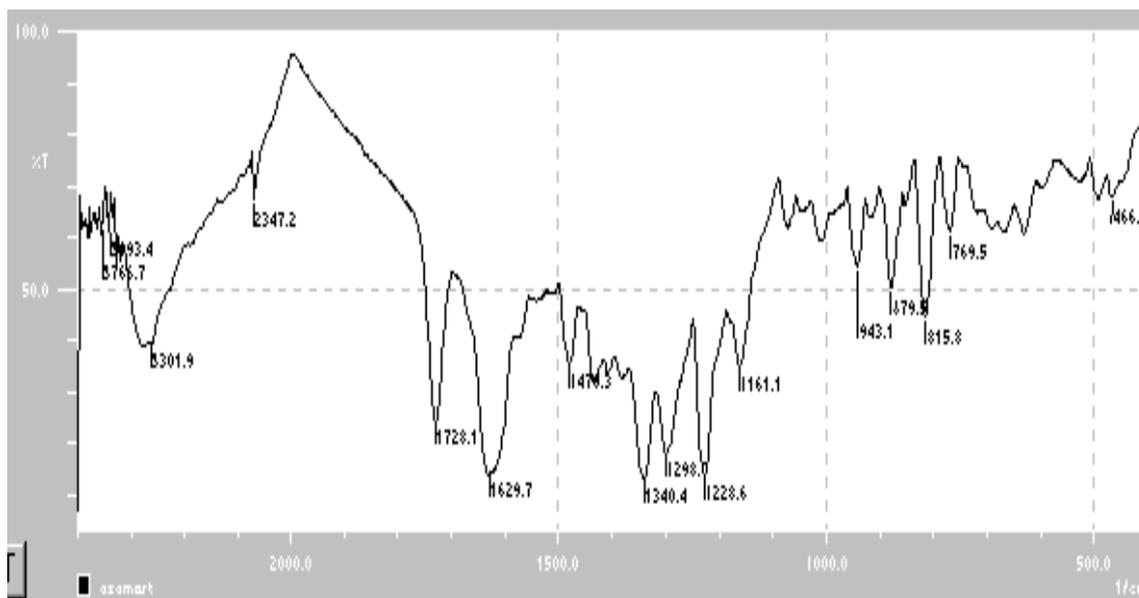


Figura 5.11. Espectro na região infravermelho de azumoleno amostra em pastilhas de KBr.

A radiação eletromagnética envolvida na espectroscopia no infravermelho varia entre 500 a 4000 cm^{-1} (2500 a 20000 nm) e é transmitida através da absorção e deformação das moléculas de uma amostra (WATSON, 1999).

Pode-se avaliar correlação das principais bandas de absorção, sendo comparadas e analisadas de acordo com dados apresentados na literatura.

O espectro de absorção na região do infravermelho apresentou bandas características de 1750 a 1725 cm^{-1} que se atribuem ao estiramento do grupo carbonila (C=O). As quatro bandas formadas entre 1600 a 1475 cm^{-1} ocorreram devido à deformação axial de C=C do anel aromático. Entre 1350 a 1000 cm^{-1} pode-se observar a deformação axial de C-N. A deformação axial de C=O do grupamento amida pode ser observada na banda entre 1680 a 1630 cm^{-1} e a deformação axial dos grupamentos N-H gera bandas entre 3600 a 3250 cm^{-1} .

Pode-se observar a semelhança das bandas apresentadas dos espectros de azumoleno sódico com o espectro de dantroleno sódico na Figura 5.12, obtido nas Farmacopeias Britânica e Japonesa (BRITISH PHARMACOPEIA, 2009; FARMACOPEIA JAPONESA, 2001).

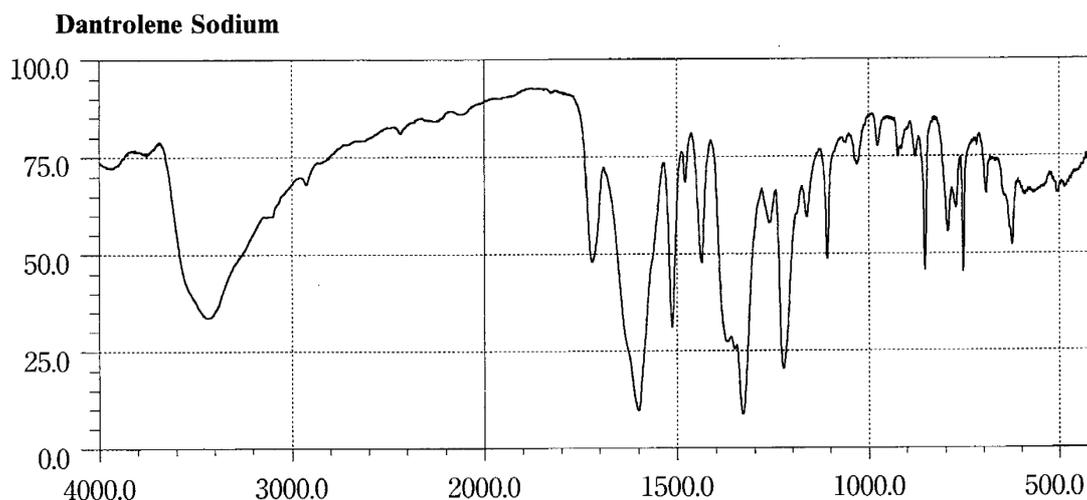


Figura 5.12. Espectro de infravermelho do dantroleno sódico segundo a British Pharmacopoeia (2009) e Japanese Pharmacopoeia (2001).

De acordo com Moffat (1986), o espectro de infravermelho do dantroleno apresenta os principais picos nos comprimentos de onda de 1600, 1225, 1510, 850, 1713, 1108, em pastilhas de brometo de potássio.

5.2. Análise quantitativa

5.2.1. Espectrofotometria na região do ultravioleta

5.2.1.1. Obtenção da curva de Ringbom

A Tabela 5.2. apresenta as absorvâncias obtidas para as soluções de azumoleno em água purificada. O resultado de cada concentração é a média de três determinações.

Tabela 5.2. Obtenção da curva de Ringbom do azumoleno sódico em água purificada para o método espectrofotométrico na região do UV a 340 nm

Pontos	Concentração de azumoleno sódico SQR ($\mu\text{g/mL}$)	Log da Concentração	Absorvância *
1	1,0	0	0,058
2	2,0	0,3010	0,141
3	3,0	0,4771	0,205
4	4,0	0,6021	0,349
5	5,0	0,6990	0,425
6	6,0	0,7782	0,485
7	7,0	0,8451	0,564
8	8,0	0,9031	0,629
9	9,0	0,9542	0,739
10	10,0	1,0000	0,828
11	11,0	1,0414	0,863
12	12,0	1,0792	0,986
13	13,0	1,1139	1,051
14	14,0	1,1461	1,161
15	16,0	1,2041	1,33
16	18,0	1,2553	1,492
17	20,0	1,3010	1,644
18	25,0	1,3979	2,027
19	30,0	1,4771	2,382
20	40,0	1,6021	2,913
21	50,0	1,6990	3,311

* Média de 3 determinações

A curva de Ringbom foi expressa como o logaritmo da concentração ($\mu\text{g/mL}$) expresso como Log da concentração x absorvância, como representada na Figura 5.13.

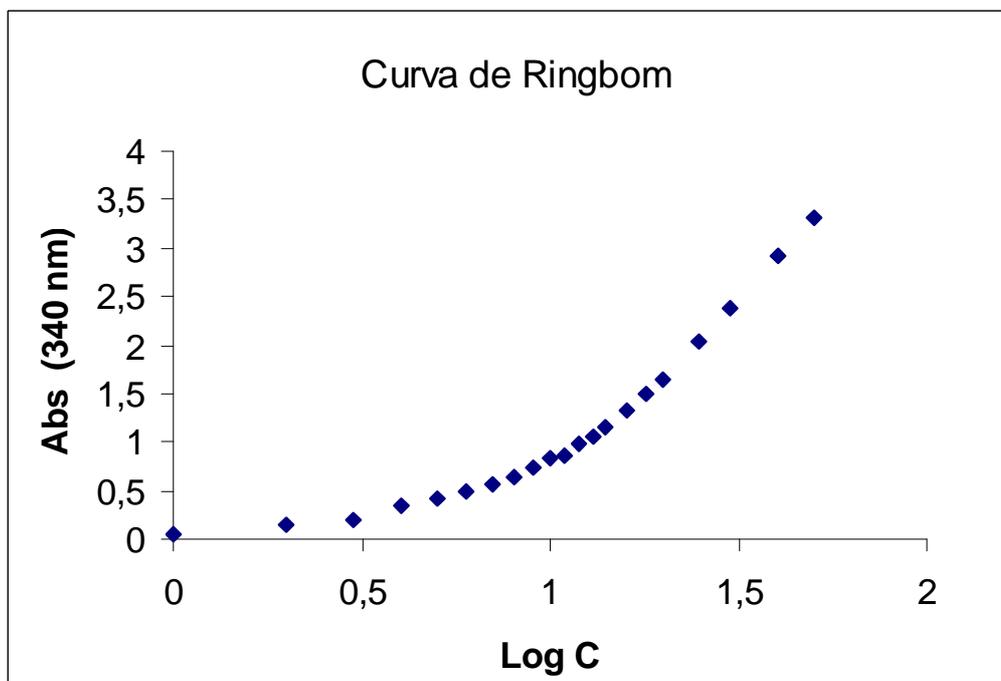


Figura 5.13. Curva de Ringbom obtida pelo método espectrofotométrico na região do UV a 340 nm para solução aquosa de azuleno sódico SQR.

5.2.1.2. Obtenção da curva analítica

A Tabela 5.3. apresenta as leituras de absorvância obtidas para a curva analítica de azuleno sódico em comprimento de onda de 340 nm com solvente água purificada.

Tabela 5.3. Absorvâncias determinadas na obtenção da curva analítica de azumoleno SQR pelo método espectrofotométrico na região do ultravioleta a 340 nm

Concentração de azumoleno sódico SQR ($\mu\text{g/mL}$)	Absorvância	Absorvância média \pm e.p.m.	DPR (%)
7,0	0,558	0,559 \pm 0,0019	0,32
	0,563		
	0,557		
8,0	0,661	0,652 \pm 0,0047	0,81
	0,651		
	0,645		
9,0	0,758	0,745 \pm 0,0082	1,42
	0,729		
	0,751		
10,0	0,841	0,831 \pm 0,0071	1,23
	0,817		
	0,834		
11,0	0,906	0,909 \pm 0,0007	0,12
	0,908		
	0,910		
12,0	1,001	0,995 \pm 0,0030	0,51
	0,991		
	0,993		

e.p.m. = erro padrão da média

DPR % = desvio padrão relativo percentual

A representação gráfica da curva analítica e o coeficiente de regressão das soluções de azumoleno SQR em concentrações de 7,0 a 12,0 µg/mL pelo método espectrofotométrico na região do ultravioleta a 340 nm estão representados na Figura 5.14.

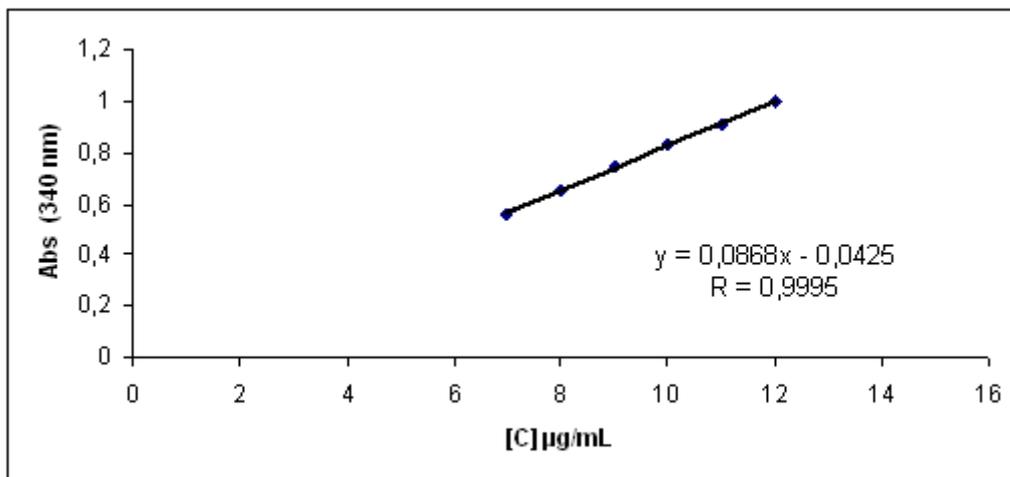


Figura 5.14. Representação gráfica da curva analítica da solução de azumoleno pelo método espectrofotométrico na região do UV a 340 nm.

A equação da reta, determinada através do método dos mínimos quadrados, é: $y = 0,0868x - 0,0425$, com um coeficiente de correlação (r) igual a 0,999.

Segundo BRASIL (2003), o critério mínimo aceitável do coeficiente de correlação (r) deve ser = 0,99.

A ANOVA calculada para os dados da curva analítica do azumoleno são mostrados na Tabela 5.4.

Tabela 5.4. Análise de variância dos valores de absorvância determinados para obtenção da curva analítica de azumoleno sódico SQR, pelo método espectrofotométrico na região do ultravioleta a 340 nm

Fontes de variação	Grau de Liberdade	Soma dos quadrados	Variância		
			(Quadrados médios)	F calc.	F tab.
Entre doses	5	0,39438	0,07888	85,93*	3,11
Regressão	1	0,39358	0,39358	428,77*	4,75
Desvio da linearidade	4	0,00080	0,00020	0,22	4,79
Resíduo (Dentro)	12	0,00092	0,00008	-	-
Total	17	0,39530	-	-	-

*Significativo para $p < 5\%$

A absorvidade molar (ϵ) foi calculada pela Equação 8.

$$\epsilon = A / (c.b)$$

Equação 8.

Na qual:

A = absorvância

c = concentração molar (mol/L)

b = caminho óptico da cubeta (cm)

Os parâmetros do tratamento estatístico sobre os valores experimentais obtidos para a curva analítica de azumoleno sódico encontram-se na Tabela 5.5.

Tabela 5.5. Parâmetros de tratamento estatístico da curva analítica de azumoleno sódico em água purificada pelo método espectrofotométrico na região do UV a 340 nm

Parâmetros	Resultados
λ (nm)	340
ϵ (L/mol.cm)	3320,18
Faixa de concentração utilizada ($\mu\text{g/mL}$)	7,0 – 12,0
Equação: $y = ax + b$	
a	0,0868
b	- 0,0425
r (coeficiente de correlação)	0,999
n	6

5.2.1.3. Determinação da concentração de azumoleno sódico na amostra

Os valores de teor de azumoleno sódico na amostra foram obtidos durante os ensaios de precisão do método proposto estão representados na Tabela 5.6.

Tabela 5.6. Valores determinados para o doseamento de azumoleno sódico na amostra pelo método espectrofotométrico na região do ultravioleta a 340 nm

dia	teor de azumoleno ¹		teor médio \pm e.p.m. ²	CV (%)
	$\mu\text{g/mL}$	[C %]		
1	9,816	98,16		
2	9,889	98,89	98,86 \pm 0,35	0,62
3	9,920	99,22		

¹Cada valor corresponde a média de três determinações.

²e.p.m. – erro padrão da média.

5.2.1.4. Validação de metodologia analítica por espectrofotometria na região do ultravioleta

5.2.1.4.1. Especificidade e Seletividade

Os ensaios de especificidade e seletividade para espectrofotometria de absorção na região do ultravioleta não foram realizados, uma vez que a substância analisada é um insumo ativo farmacêutico (API), não havendo matriz ou interferência de excipientes ou mesmo pela inexistência de substância padrão de produtos de degradação para esse fármaco até o presente momento.

5.2.1.4.2. Linearidade

Pelos parâmetros da curva analítica apresentados na Tabela 5.3. e na Figura 5.12., é possível observar que a linearidade do método, obtida na faixa de concentração de 7,0 a 12,0 µg/mL, apresenta coeficiente de correlação de 0,9995, com coeficiente de variação entre as determinações inferior a 5%, demonstrando haver excelente correlação linear entre os dados analisados.

5.2.1.4.3. Precisão

A precisão do método foi avaliada pelos ensaios de repetibilidade (intradia e interdia) realizada durante três dias diferentes, nos quais foram analisadas sete amostras preparadas individualmente. As médias das absorvâncias nas leituras estão próximas, com coeficiente de variação de 0,83 e 0,76% no ensaio intradia e interdia, respectivamente, estando os desvios dentro do permitido comprovando a precisão do método (BRASIL, 2003a).

5.2.1.4.4. Exatidão

Na Tabela 5.7. estão apresentados os valores de recuperação do método espectrofotométrico na região do ultravioleta de azumoleno sódico obtidos para cada nível de concentração testado pelo método espectrofotométrico, utilizando água purificada como solvente, a 340 nm.

Tabela 5.7. Valores obtidos no teste de recuperação para azumoleno sódico pelo método espectrofotométrico na região do UV a 340 nm

	Azumoleno sódico SQR adicionado (µg/mL)	Azumoleno sódico SQR encontrado (µg/mL)	Recuperação (%)	Recuperação média (%)
R1	1,0	0,986	98,62	
R2	3,0	2,960	98,60	98,10
R3	5,0	4,890	97,08	

5.2.1.4.5. Robustez

A robustez do método foi determinada pela comparação dos resultados obtidos pela variação de dois analistas podendo ser observada na Tabela 5.8. e da variação dos comprimentos de onda.

As médias de absorvâncias obtidas do ensaio de robustez com variação de dois analistas foi de 0,829 para o primeiro analista e 0,838 para o segundo. A média das absorvâncias dos dois analistas foi de 0,834 e o coeficiente de variação de 0,7%.

Tabela 5.8. Valores da determinação da robustez do método espectrofotométrico na região do UV a 340 nm de azumoleno sódico pela variação do comprimento de onda

Comprimento de onda (nm)	Absorvância *	Média das Absorvâncias	CV (%)
338	0,808		
340	0,833	0,813	2,22
342	0,798		

*Valor obtido da média de 3 análises

5.2.1.4.6. Limite de detecção

O limite de detecção foi calculado pelo desvio padrão do coeficiente linear das três curvas analíticas obtidas (0,006327), sendo que o coeficiente angular da curva analítica final representada é de 0,0868. O limite de detecção encontrado nessas condições e parâmetro é de 0,24 µg/mL.

5.2.1.4.7. Limite de quantificação

O limite de quantificação foi calculado pelo desvio padrão do coeficiente linear das três curvas analíticas obtidas (0,006327), sendo que o coeficiente angular da curva analítica final representada é de 0,0868. O limite de quantificação encontrado nessas condições e parâmetro é de 0,73 µg/mL.

5.2.2. Espectrofotometria de absorção na região do visível

5.2.2.1. Obtenção da curva de Ringbom

A Tabela 5.9. apresenta as absorvâncias obtidas para cada concentração das soluções de azumoleno sódico, sendo que cada resultado corresponde a média de três determinações.

Tabela 5.9. Obtenção da curva de Ringbom para o método espectrofotométrico na região do visível de solução de azumoleno sódico com ácido cloranílico e acetonitrila a 507 nm

Pontos	Concentração de azumoleno sódico SQR (µg/mL)	Log da concentração	Absorvância *
1	1,00	0	0,0031
2	2,00	0,3010	0,0210
3	3,00	0,4771	0,0480
4	4,00	0,6021	0,0737
5	5,00	0,6990	0,1104
6	6,00	0,7782	0,1454
7	7,00	0,8451	0,1846
8	8,00	0,9031	0,2229
9	9,00	0,9542	0,2573
10	10,00	1,0000	0,2927
11	11,00	1,0414	0,3301
12	12,00	1,0792	0,3596
13	13,00	1,1139	0,3839
14	14,00	1,1461	0,4103
15	15,00	1,1761	0,4308
16	16,00	1,2041	0,4446
17	17,00	1,2304	0,4635
18	18,00	1,2553	0,4878
19	19,00	1,2788	0,4921
20	20,00	1,3010	0,5104

* Média de 3 determinações

A curva de Ringbom foi expressa como o logarítmo da concentração ($\mu\text{g/mL}$) expresso como Log da concentração x absorvância, como representada na Figura 5.15.

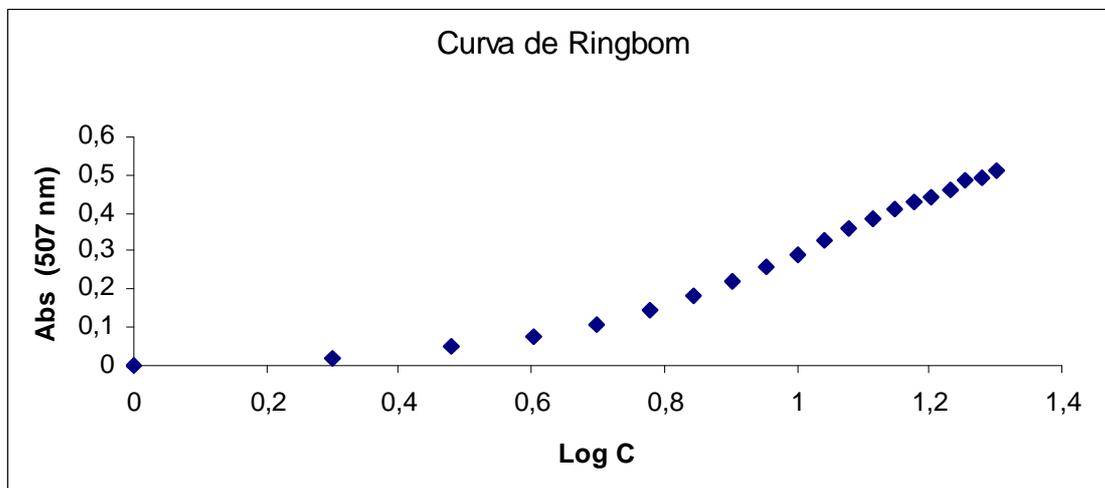


Figura 5.15. Curva de Ringbom obtida pelo método espectrofotométrico na região do visível para solução de azumoleno sódico SQR.

5.2.2.2. Obtenção da curva analítica

A Tabela 5.10. apresenta as leituras de absorvância obtidas para a curva analítica em comprimento de onda de 507 nm com 1,0 mL de ácido clorídrico 0,1% e acetonitrila.

Tabela 5.10. Absorvâncias determinadas na obtenção da curva analítica de azumoleno SQR pelo método espectrofotométrico na região do visível a 507 nm

Concentração de azumoleno sódico SQR (µg/mL)	Absorvância	Absorvância média ± e.p.m.	DPR (%)
8,0	0,1763	0,1742 ± 0,0027	2,69
	0,1775		
	0,1689		
9,0	0,2052	0,2060 ± 0,0027	2,26
	0,2110		
	0,2017		
10,0	0,2316	0,2325 ± 0,0021	1,58
	0,2366		
	0,2294		
11,0	0,2586	0,2577 ± 0,0026	1,73
	0,2616		
	0,2528		
12,0	0,2831	0,2805 ± 0,0025	1,57
	0,2829		
	0,2754		
13,0	0,3025	0,3032 ± 0,0005	0,29
	0,3042		
	0,3030		

e.p.m. = erro padrão da média

DPR % = desvio padrão relativo percentual

A representação gráfica da curva analítica e o coeficiente de regressão das soluções de azumoleno SQR em concentrações de 8,0 a 13,0 µg/mL através do método espectrofotométrico na região do visível a 507 nm estão representados na Figura 5.16.

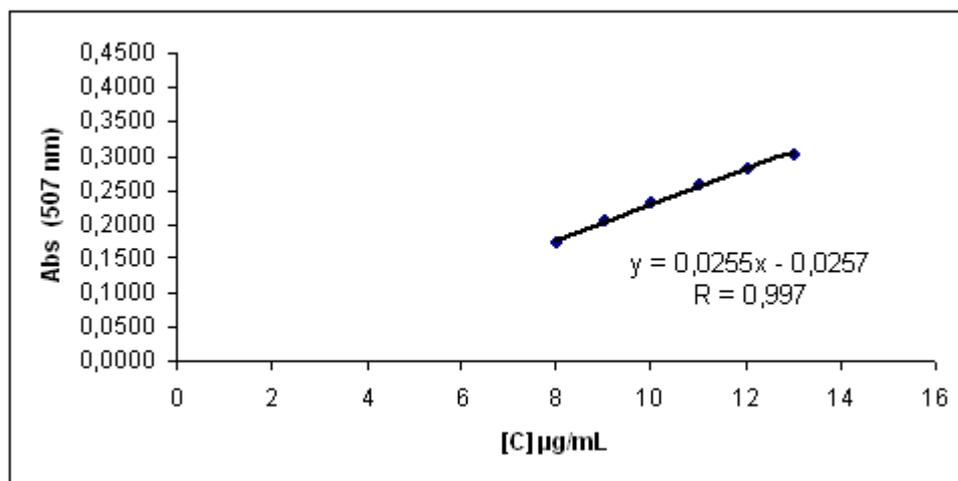


Figura 5.16. Representação gráfica da curva analítica da solução de azumoleno pelo método espectrofotométrico na região do visível a 507 nm.

A equação da reta, determinada pelo método dos mínimos quadrados, é: $y = 0,0255x - 0,0257$, com um coeficiente de correlação (r) igual a 0,997.

Segundo BRASIL (2003) o critério mínimo aceitável do coeficiente de correlação (r) deve ser = 0,99.

A ANOVA calculada para os dados da curva analítica do azumoleno sódico pelo método espectrofotométrico na região do visível são mostrados na Tabela 5.11.

Tabela 5.11. Análise de variância dos valores de absorvância determinados para obtenção da curva analítica de azumoleno sódico SQR, utilizando método espectrofotométrico na região do visível a 507 nm

Fontes de variação	Graus de Liberdade	Soma dos quadrados	Variância (Quadrados médios)	F calc.	F tab. (0,05)
Entre doses	5	0,03436	0,00687	35,28*	3,11
Regressão	1	0,03409	0,03409	174,97*	4,75
Desvio da linearidade	4	0,00028	0,00007	0,35	4,79
Resíduo (Dentro)	12	0,00019	0,00002	-	-
Total	17	0,03456	-	-	-

*Significativo para $p < 5\%$

A absorvidade molar (ϵ) foi calculada pela Equação 8.

$$\epsilon = A / (c.b)$$

Equação 8

Na qual:

A = absorvância

c = concentração molar (mol/L)

b = caminho óptico da cubeta (cm)

Os parâmetros do tratamento estatístico sobre os valores experimentais obtidos para a curva analítica encontram-se na Tabela 5.12.

Tabela 5.12. Parâmetros analíticos do método espectrofotométrico na região do visível com ácido cloranílico 0,1% e acetonitrila a 507 nm

Parâmetros	Resultados
λ (nm)	507
ϵ (L/mol.cm)	928,26
Faixa de concentração utilizada ($\mu\text{g/mL}$)	8,0 – 13,0
Equação: $y = ax + b$	
a	0,0255
b	- 0,0257
r (coeficiente de correlação)	0,997
n	6

5.2.2.3. Determinação da concentração de azumoleno sódico na amostra

Os valores de teor de azumoleno sódico na amostra foram obtidos durante os ensaios de precisão do método proposto estão representados na Tabela 5.13.

Tabela 5.13. Valores determinados para o doseamento de azumoleno sódico na amostra pelo método espectrofotométrico na região do visível a 507 nm

dia	teor de azumoleno ¹		teor médio \pm e.p.m. ²	CV (%)
	$\mu\text{g/mL}$	[C %]		
1	9,74	97,40	98,15 \pm 0,3758	0,66
2	9,86	98,57		
3	9,85	98,47		

¹Cada valor corresponde a média de três determinações.

²e.p.m. – erro padrão da média.

5.2.2.4. Validação de metodologia analítica por espectrofotometria na região do visível

5.2.2.4.1. Especificidade e seletividade

Os ensaios de especificidade e seletividade para espectrofotometria de absorção na região do visível não foram realizados, uma vez que a substância analisada é um insumo ativo farmacêutico (API), não havendo matriz ou interferência de excipientes ou mesmo pela inexistência de substância padrão de produtos de degradação para esse fármaco até o presente momento.

5.2.2.4.2. Linearidade

Pelos parâmetros da curva analítica apresentados na Tabela 5.10. e na Figura 5.14., é possível observar que a linearidade do método, obtida na faixa de concentração de 8,0 a 13,0 $\mu\text{g/mL}$, apresenta coeficiente de correlação de 0,997, com coeficiente de variação entre as determinações inferior a 5% de acordo com Brasil (2003), demonstrando haver excelente correlação linear entre os dados analisados.

5.2.2.4.3. Precisão

A precisão do método foi avaliada pelos ensaios de repetibilidade (intradia e interdia) realizada durante três dias diferentes, nos quais foram analisadas sete amostras preparadas individualmente. As médias das absorvâncias nas leituras estão próximas, com coeficiente de variação de 0,73 e 0,88% no ensaio intradia e interdia, respectivamente, estando os desvios dentro do permitido comprovando a precisão do método (BRASIL, 2003).

5.2.2.4.4. Exatidão

Na Tabela 5.14. são apresentados os valores de recuperação obtidos para cada nível de concentração testado pelo método espectrofotométrico na região do visível a 507 nm.

Tabela 5.14. Valores obtidos no teste de recuperação para azumoleno sódico pelo método espectrofotométrico na região do visível a 507 nm

	Azumoleno sódico SQR adicionado (µg/mL)	Azumoleno sódico SQR encontrado (µg/mL)	Recuperação (%)	Recuperação média (%)
R1	1,0	0,988	98,8	
R2	3,0	2,940	97,9	98,63
R3	5,0	4,960	99,2	

5.2.2.4.5. Robustez

A robustez do método foi determinada pela comparação dos resultados obtidos pela variação de dois analistas podendo ser observado na Tabela 5.15. e da variação dos comprimentos de onda.

As médias de absorvâncias obtidas do ensaio de robustez com variação de dois analistas foi de 0,2333 para o primeiro analista e 0,2355 para o segundo. A média das absorvâncias dos dois analistas foi de 0,2344 e o coeficiente de variância de 0,87%.

Tabela 5.15. Valores da determinação da robustez do método espectrofotométrico na região do visível com ácido cloranílico 0,1% e acetoneitrila de azumoleno sódico pela variação do comprimento de onda

Comprimento de onda (nm)	Absorvância *	Média das Absorvâncias	CV (%)
505	0,2319		
507	0,2308	0,2316	0,28
509	0,2320		

*Valor obtido da média de 3 análises

5.2.2.4.6. Limite de detecção

O limite de detecção foi calculado a partir do desvio padrão do coeficiente linear das três curvas analíticas obtidas (0,00975), sendo que o coeficiente angular da curva analítica final representada é de 0,0255. O limite de detecção encontrado nessas condições e parâmetro é de 1,26 µg/mL.

5.2.2.4.7. Limite de quantificação

O limite de quantificação foi calculado a partir do desvio padrão do coeficiente linear das três curvas analíticas obtidas (0,00975), sendo que o coeficiente angular da curva analítica final representada é de 0,0255. O limite de detecção encontrado nessas condições e parâmetro é de 3,82 µg/mL.

5.2.3. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

5.2.3.1. Estudos preliminares

Os espectros obtidos das análises em diferentes fases móveis do azumoleno sódico em solução aquosa a 10,0 µg/mL com leitura a 340 nm e vazão de 1,0 mL/min podem ser observadas das Figuras 5.17. à 5.21.

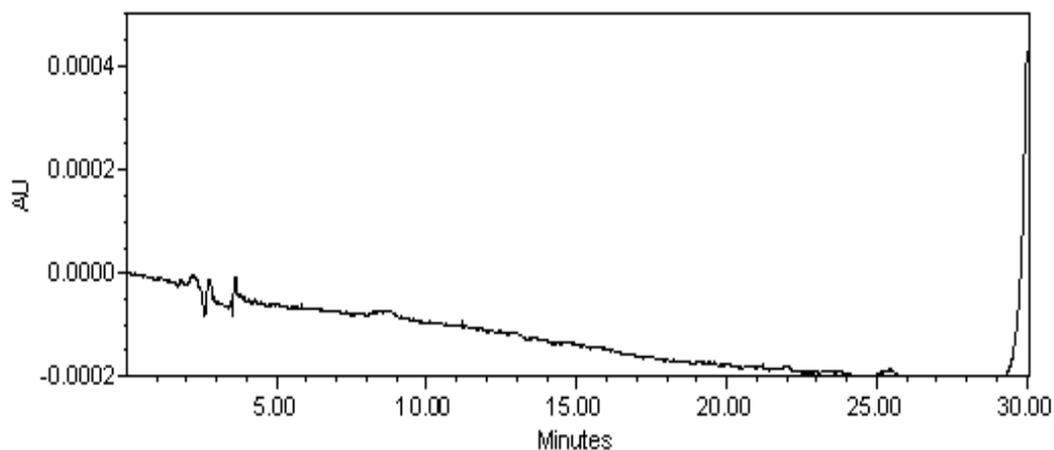


Figura 5.17. Cromatograma obtido por de CLAE com fase móvel composta por metanol : água (50:50 v/v) de azumoleno sódico SQR 10,0 µg/mL a 340 nm.

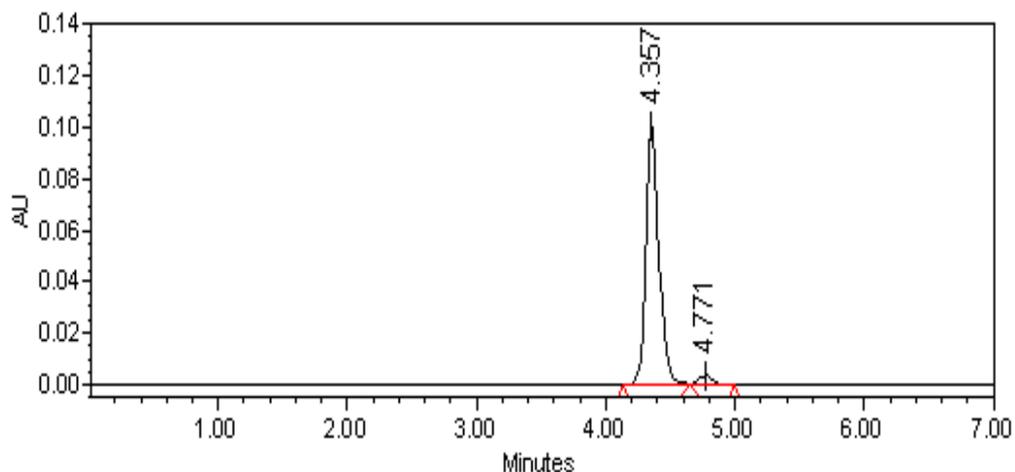


Figura 5.18. Cromatograma obtido por de CLAE com fase móvel composta por metanol : água : acetonitrila (50:25:25 v/v/v) de azumoleno sódico SQR 10,0 µg/mL a 340 nm.

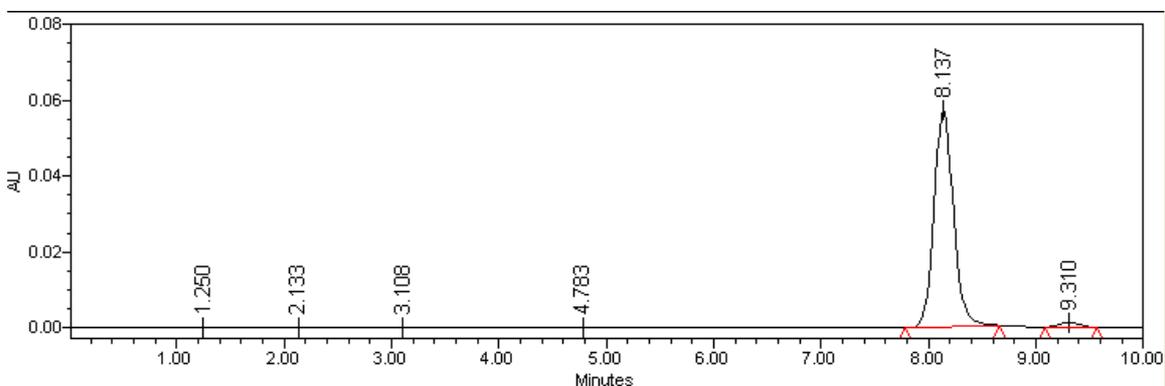


Figura 5.19. Cromatograma obtido por de CLAE com fase móvel composta por metanol : água (50:25 v/v) de azumoleno sódico SQR 10,0 µg/mL a 340 nm.

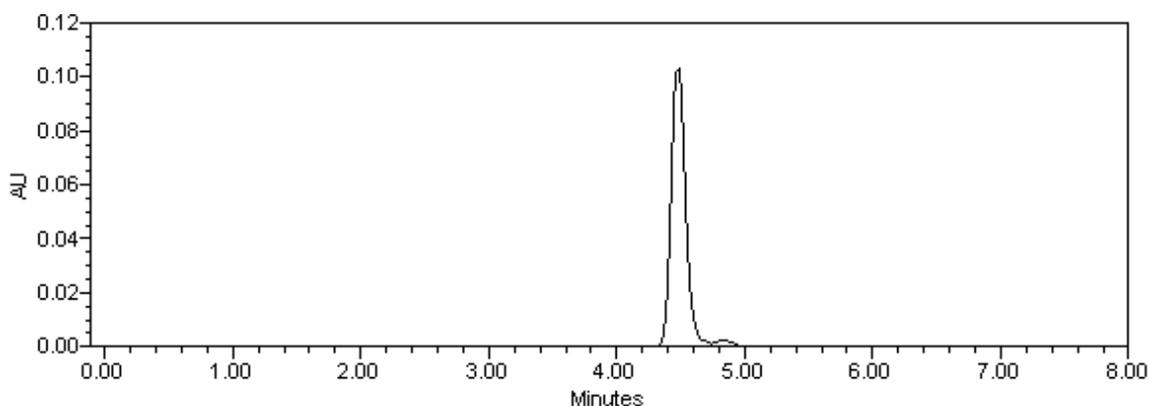


Figura 5.20. Cromatograma obtido por de CLAE com fase móvel composta por metanol : água (75:25 v/v) de azumoleno sódico SQR 10,0 $\mu\text{g/mL}$ a 340 nm.

A fase móvel de escolha para o desenvolvimento da validação de metodologia analítica por cromatografia líquida de alta eficiência foi metanol : água (75:25 v/v). A fase composta por três solventes (metanol : água : acetonitrila) foi descartada por apresentar um pico adjacente muito próximo ao pico de interesse do espectro que poderá interferir nas análises, além de apresentar o solvente acetonitrila, que eleva o custo das análises e maior geração de resíduos.

A escolha da fase móvel entre as variações de concentrações dos solventes metanol : água foi possível uma vez que a fase (50:50 v/v) apresentou a formação de um pico em torno de 30 minutos, tido como um tempo longo para a rotina de validação de metodologia analítica. Da mesma forma fez-se a escolha da fase metanol : água (75:25 v/v) por apresentar menor tempo de retenção, fato que vem do encontro das necessidades laboratoriais rotineiras.

A escolha da fase móvel metanol : água (75:25 v/v) com ajuste para pH 3,0 com auxílio de ácido fórmico foi determinante após análise da diminuição do pico adjacente que poderia deformar a cauda do pico principal, alterando sua área como se pode observar na Figura 5.19, logo, demonstrando interferências significativas durante análises de teor e validação da metodologia

analítica. A solução de azumoleno sódica SQR foi preparada de acordo com o item 4.1.1, com volume de injeção de 20 μL e vazão de 1,0 mL/minuto.

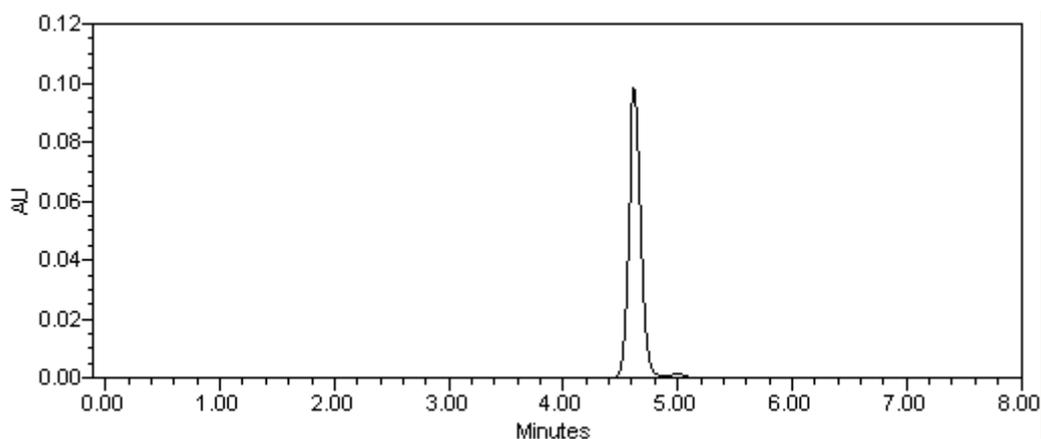


Figura 5.21. Cromatograma do azumoleno sódico SQR a 10,0 $\mu\text{g/mL}$ em 340 nm obtido por CLAE com fase móvel composta por metanol : água (75:25 v/v) com ajuste para pH 3,0 por ácido fórmico.

A fase móvel utilizada para metodologia de análise do dantroleno sódico por CLAE descrita segundo Saxena e colaboradores (1976), em 375 nm é o tetracloreto de carbono : dimetilformamida (90:10 v/v), com vazão de 2,0 mL/min, apresentando, em condições cromatográficas específicas com tempo de retenção de 30 minutos.

Em monografia do dantroleno sódico na Farmacopeia Japonesa utiliza-se como fase móvel para ensaios em CLAE hexano:ácido acético:etanol (90:10:9 v/v/v), resultando em tempo de retenção de 8 minutos em comprimento de onda de 300 nm (JAPANESE PHARMACOPOEIA, 2001).

5.2.3.2. Curva analítica

A Tabela 5.16. apresenta as leituras de absorvância obtidos para a curva analítica em comprimento de onda de 340 nm com solvente água purificada.

Tabela 5.16. Absorvâncias determinadas na obtenção da curva analítica de azumoleno SQR pelo método CLAE a 340 nm

Concentração de azumoleno sódico SQR ($\mu\text{g/mL}$)	Área	Área média \pm e.p.m.	DPR (%)
5,0	350609,0	354286,07 \pm 2013,06	0,98
	354704,5		
	357544,7		
7,0	463499,0	454869,00 \pm 5100,69	1,94
	455265,0		
	445843,0		
9,0	536140,0	534351,26667 \pm 1362,58	0,44
	535237,4		
	531676,4		
11,0	629456,5	633008,83 \pm 1790,62	0,49
	634391,7		
	635178,3		
13,0	706586,0	703212,93 \pm 6329,18	1,56
	690960,3		
	712092,5		
15,0	820178,0	805727,33 \pm 8190,48	1,76
	805183,0		
	791821,0		

e.p.m. = erro padrão da média

DPR % = desvio padrão relativo percentual

A representação gráfica da curva analítica e o coeficiente de regressão das soluções de azumoleno SQR em concentrações de 5,0 a 15,0 $\mu\text{g/mL}$ pelo método CLAE estão representados na Figura 5.22.

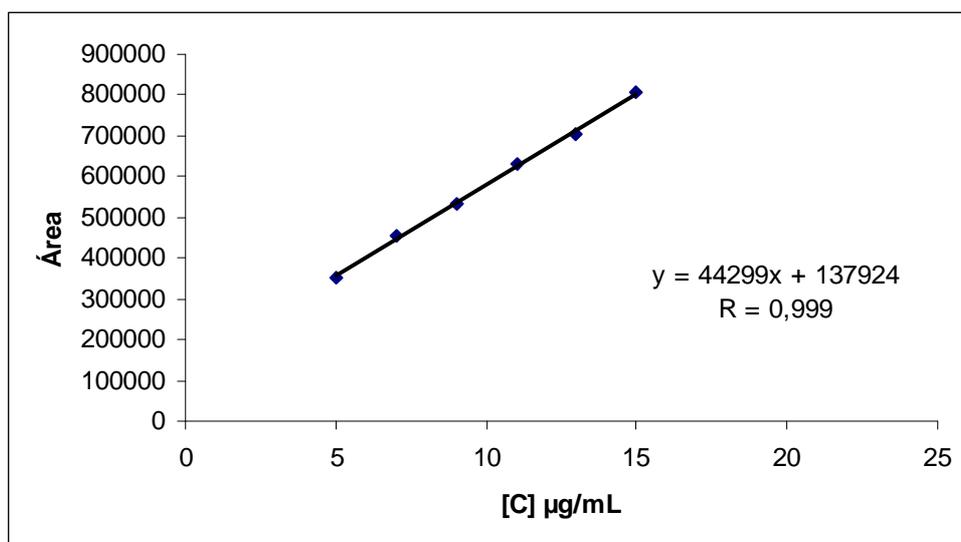


Figura 5.22. Representação gráfica da curva analítica da solução de azumoleno por CLAE a 340 nm.

A equação da reta, determinada pelo método dos mínimos quadrados, é $y = 44299x + 137924$, com um coeficiente de correlação (r) igual a 0,999.

Segundo BRASIL (2003) o critério mínimo aceitável do coeficiente de correlação (r) deve ser = 0,99.

A ANOVA calculada para os dados da curva analítica do azumoleno são mostrados na Tabela 5.17.

Tabela 5.17. Análise de variância dos valores de absorvância determinados para obtenção da curva analítica de azumoleno sódico SQR, utilizando CLAE a 340 nm

Fontes de variação	Grau de Liberdade	Soma dos quadrados das áreas	Variância (Quadrados médios)	F calc.	F tab. (0,05)
Entre Doses	5	425527047841,8	85105409568,36	284,13*	3,11
Regressão	1	423951888152,18	423951888152,18	1415,4*	4,75
Desvio da linearidade	4	1575159689,62	393789922,40	1,31	4,79
Resíduo (Dentro)	12	299528645,55	24960720,46	-	-
Total	17	425826576487,34	-	-	-

*Significativo para $p < 5\%$

A absorvidade molar (ϵ) foi calculada pela Equação 8.

Os parâmetros do tratamento estatístico sobre os valores experimentais obtidos para a curva analítica encontram-se na Tabela 5.18.

Tabela 5.18. Parâmetros analíticos do método CLAE proposto para azumoleno sódico a 340 nm

Parâmetros	Resultados
λ (nm)	340
ϵ (L/mol.cm)	2668477513,73
Faixa de concentração utilizada ($\mu\text{g/mL}$)	5,0 – 15,0
Equação: $y = ax + b$	
a	44299
b	137924
r (coeficiente de correlação)	0,999
n	6

5.2.3.3. Determinação da concentração de azumoleno na amostra

Os valores de teor de azumoleno sódico na amostra foram obtidos com sete leituras de solução a 9 µg/mL em triplicata estão representados na Tabela 5.19.

Tabela 5.19. Valores determinados para o doseamento de azumoleno sódico na amostra por CLAE a 340 nm

dia	teor de azumoleno ¹		teor médio ± e.p.m. ²	CV (%)
	µg/mL	[C %]		
1	8,88	98,67		
2	8,82	98,03	98,80 ± 0,03	0,85
3	8,97	99,69		

¹Cada valor corresponde a média de sete determinações.

²e.p.m. – erro padrão da média.

5.2.3.4. Validação de metodologia analítica por CLAE

5.2.3.4.1. Especificidade e seletividade

Os ensaios de especificidade e seletividade não foram realizados para o método analítico de cromatografia líquida e alta eficiência, uma vez que a substância analisada é um insumo ativo farmacêutico (API), não havendo matriz ou interferência de excipientes ou mesmo pela inexistência de substância padrão de produtos de degradação para esse fármaco até o presente momento.

5.2.3.4.2. Linearidade

Pelos parâmetros da curva analítica apresentados na Tabela 5.16. e na Figura 5.20., é possível observar que a linearidade do método, obtida na faixa

de concentração de 5,0 a 15,0 µg/mL, apresenta coeficiente de correlação de 0,99, com coeficiente de variação entre as determinações inferior a 5%, demonstrando haver excelente correlação linear entre os dados analisados.

5.2.3.4.3. Precisão

A precisão do método foi avaliada pelos ensaios de repetibilidade (intradia e interdia) realizada durante três dias diferentes, nos quais foram analisadas sete amostras preparadas individualmente. As médias das absorvâncias nas leituras estão próximas, com coeficiente de variação de 0,08% e 1,23% respectivamente no ensaio intradia e interdia, respectivamente, estando os desvios dentro do permitido comprovando a precisão do método (BRASIL, 2003a).

5.2.3.4.4. Exatidão

Na Tabela 5.20. são apresentados os valores de recuperação obtidos para cada nível de concentração testado de acordo com o item 4.3.3.5.3. pelo método CLAE a 340 nm para azumoleno sódico.

Tabela 5.20. Valores obtidos no teste de recuperação para azumoleno sódico por CLAE a 340 nm

	Azumoleno sódico SQR adicionado (µg/mL)	Azumoleno sódico SQR encontrado (µg/mL)	Recuperação (%)	Recuperação média (%)
R1	1,0	0,973	97,33	
R2	3,0	2,951	98,38	98,14
R3	5,0	4,936	98,72	

5.2.3.4.5. Robustez

A robustez do método foi determinada pela comparação dos resultados pelas diferenças das médias obtidas por dois analistas, com um coeficiente de variação de 1,11 % e pela variação da vazão do equipamento com variação de 0,9 mL/min e 1,1 mL/min, em comparação à 1,0 mL/min (vazão padrão utilizada no desenvolvimento do método proposto por CLAE), resultando em um coeficiente de variação de 0,64 %.

5.2.3.4.6. Limite de Detecção

O limite de detecção foi calculado a partir do desvio padrão do coeficiente linear das três curvas analíticas obtidas (12784,74), sendo que o coeficiente angular da curva analítica final representada é de 44299. O limite de detecção encontrado nessas condições e parâmetro é de 0,95 µg/mL.

5.2.3.4.7. Limite de Quantificação

O limite de quantificação foi calculado a partir do desvio padrão do coeficiente linear das três curvas analíticas obtidas (12784,74), sendo que o coeficiente angular da curva analítica final representada é de 44299. O limite de detecção encontrado nessas condições e parâmetro é de 2,89 µg/mL.

6. DISCUSSÃO GERAL

Na iniciativa de qualquer empresa do segmento farmacêutico de alcançar a qualidade total muito trabalho deve ser realizado no sentido de validar métodos analíticos, seja para realização de análises rotineiras do controle de qualidade de matérias-primas, de produtos intermediários ou comprovação de qualidade de produtos finais.

Até mesmo outras atividades que devem ser obrigatoriamente realizadas por indústrias farmacêuticas como controle em processo e validação da limpeza de equipamentos possuem como pré-requisito a validação de métodos analíticos. De mesma forma ocorre com a realização de estudos de estabilidade.

A escolha por um dos métodos desenvolvidos e validados para quantificação de azumoleno sódico deve levar em consideração fatores relacionados à estrutura de cada estabelecimento farmacêutico, já que todos os métodos apresentaram confiabilidade analítica na totalidade dos parâmetros de validação.

A elaboração das especificações de matérias-primas deve ocorrer de acordo com dados farmacopeicos ou na ausência destes, com base em critérios do fabricante.

As análises qualitativas permitiram caracterizar o azumoleno sódico pelos seguintes métodos:

- Características físicas: O aspecto indicado como pó branco pode ser utilizado como parâmetro qualitativo quanto associado e comparado a algum compêndio oficial ou mesmo especificação interna do produto.

- Determinação da solubilidade: Foram utilizados diversos solventes na determinação das solubilidades cuja finalidade foi de realizar a caracterização da substância qualitativamente.

- Determinação do ponto de fusão: A determinação média resultante das análises foi de 242,5°C podendo ser amplamente utilizado como parâmetro de identificação desse composto.

- Análise térmica através de termogravimetria (TG) e análise térmica diferencial (DTA): As curvas termogravimétricas obtidas do azumoleno sódico SQR e amostra apresentaram similaridade, podendo-se observar 3 etapas de degradação com início e fim em temperaturas próximas e perda de massa equivalente.

- Espectroscopia na região do infravermelho: Foi utilizada para identificar os grupos funcionais do azumoleno sódico, além de realizar uma análise comparativa dos picos dos espectros para azumoleno sódico SQR e amostra.

Atuante em amplas aplicações no setor farmacêutico, usualmente têm prevalência em elucidação estrutural de substâncias, identificação rotineira de compostos e estudo de caracterização polimórfica (OHANNESIAN, STREETER, 2002).

- Espectrofotometria na região do ultravioleta: Dentre todos os solventes utilizados para determinação dos máximos de absorção, a água por ser de fácil aquisição, baixo custo e fácil descarte foi determinada como solvente de escolha para o desenvolvimento da validação do método por espectrofotometria UV. Os espectros obtidos para azumoleno sódico SQR e amostra apresentaram pico característico a 340 nm.

- Espectrofotometria na região do visível: A escolha do método com utilização de ácido clorânico 0,1% como reagente e acetonitrila como solvente baseou-se em estudos preliminares e na análise da literatura para fármacos com grupamentos semelhantes. Os espectros obtidos para azumoleno sódico SQR e matéria-prima apresentaram pico característico a 507 nm;

Métodos analíticos devem ser apresentados à comunidade científica apenas após a confirmação de que são eficientemente aplicáveis ao uso pretendido. Para isso, foram desenvolvidos e validados três métodos para determinação quantitativa de azumoleno sódico:

- Espectrofotometria na região do ultravioleta: Após a obtenção da curva de Ringbom definiu-se a curva analítica de acordo com a Lei de Lambert-Beer, obtendo-se linearidade satisfatória de 0,9995, com equação da reta $y=0,0868x-0,0425$. Obteve-se boa precisão, robustez e exatidão do método. Foram definidos os limites de detecção e de quantificação. O teor médio de azumoleno sódico foi determinado.

- Espectrofotometria na região do visível: Após a obtenção da curva de Ringbom definiu-se a curva analítica de acordo com a Lei de Lambert-Beer, obtendo-se linearidade satisfatória de 0,99, com equação da reta $y=0,0255x-0,0257$. Obteve-se boa precisão, robustez e exatidão do método. Foram definidos os limites de detecção e de quantificação. O teor médio de azumoleno sódico foi determinado.

- Cromatografia líquida de alta eficiência: A fase móvel metanol : água (75:25 v/v), utilizada para o desenvolvimento do método analítico foi simples, de baixo custo e de menor geração de resíduos. O tempo de retenção obtido foi de cerca de 5,0 minutos, fato este que torna o método rápido. A curva analítica foi definida e adaptada de acordo com o método de espectrofotometria na região do ultravioleta obtendo-se linearidade satisfatória de 0,999, com equação da reta $y=44299x-137924$. Obteve-se boa precisão, robustez e exatidão do método. Foram definidos os limites de detecção e de quantificação. O teor médio de azumoleno sódico foi determinado.

Deve-se estimar sempre, para a opção da cromatografia líquida de alta eficiência, a necessidade de pessoal qualificado para realização de tais análises, custos inerentes ao equipamento e respectivas manutenções e ainda tempo de análise. No referido estudo pôde-se constatar um tempo de retenção de

surgimento dos picos cromatográficos relativamente curto (cerca de 4min e 45seg), permitindo a análise de um grande número de amostras em curto período de tempo.

Ainda que se priorize a utilização de métodos analíticos através de CLAE, uma das limitações da utilização desta técnica é o alto custo da análise, que emprega solventes orgânicos de alta pureza e padrões de referências, que ainda apresenta como ponto negativo o impacto ambiental ocasionado pela geração de resíduos. Entretanto, este método analítico é altamente específico e sensível, trazendo muita confiabilidade para ensaios analíticos.

Os ensaios que se utilizam da espectrofotometria na região do ultravioleta e do visível apresentam tempo de análises mais curto, são economicamente mais indicados e não geram resíduos químicos em demasia, além ainda da questão da portabilidade e simplicidade da técnica quando comparada ao CLAE.

Diversos fatores podem influenciar os resultados finais de ensaios que visam a validação de determinado método analítico. Pode-se citar, por exemplo, a qualificação do analista e a presença deste desde o início até o final do processo, buscando a minimização de desvios analíticos. Desta mesma forma procura-se utilizar vidrarias calibradas e equipamentos em perfeito estado de funcionamento e sempre sobre as mesmas condições de uso, temperatura e umidade controladas no ambiente da pesquisa, tempo de estabilidade das soluções e reagentes, tal como sou modo sistemático de preparo.

6.1. Análise comparativa das metodologias propostas para quantificação de azumoleno sódico

É de extrema necessidade a comparação dos métodos desenvolvidos nos diversos parâmetros da validação para determinar a variabilidade e a viabilidade desses métodos de forma significativa para que se possa optar por qualquer um deles baseando-se a decisão com equivalência e confiabilidade analítica.

Os métodos quantitativos para análise do azumoleno sódico comparados foram desenvolvidos por espectrofotometria de absorção na região do ultravioleta e visível e cromatografia líquida de alta eficiência.

A farmacopeia americana (USP 31, 2008) recomenda a comparação de métodos analíticos nos parâmetros de precisão e exatidão. Para isso foram analisados os parâmetros de validação dos métodos propostos para espectrofotometria de absorção na região do ultravioleta e visível e cromatografia líquida de alta eficiência, podendo ser observados na Tabela 6.1.

Tabela 6.1. Análise comparativa dos métodos de análise propostos para azumoleno sódico

Parâmetros	Métodos		
	UV	Visível	CLAE
λ (nm)	340	507	340
Faixa de concentração utilizada ($\mu\text{g/mL}$)	7 – 12	8 – 13	5 – 15
Equação: $y = ax + b$			
a	0,0868	0,0255	44752
b	- 0,0425	- 0,0257	137150
r	0,999	0,997	0,999
n	6	6	6
Exatidão (%)	98,10	98,63	98,14
Precisão intradia (CV%)	0,83	0,73	0,08
Precisão interdia (CV%)	0,76	0,88	1,23
Robustez (%)	1,450	0,575	0,875
Limite de Detecção ($\mu\text{g/mL}$)	0,24	1,26	0,95
Limite de Quantificação ($\mu\text{g/mL}$)	0,73	3,82	2,89

Todos os métodos propostos se apresentam satisfatórios quanto ao quesito exatidão (obtida através do ensaio de teste de recuperação), sendo próximos a 100%, além de robustez e precisão, podendo-se observar valores inferiores a 5%, como preconizado por Brasil (2003).

Tabela 6.2. Valores obtidos no doseamento do azumoleno sódico para os métodos propostos

<i>Parâmetro</i>	<i>Métodos</i>		
	<i>UV</i>	<i>Visível</i>	<i>CLAE</i>
	98,16	97,40	98,67
Teor (%)	98,89	98,57	98,03
	99,22	98,47	99,69
Teor médio (%)	98,86	98,15	98,80
CV (%)	0,62	0,66	0,85

A referente análise comparativa deve-se basear também em fatores como o doseamento do azumoleno sódico entre os três métodos propostos, como apresentados na Tabela 6.2.

Os ensaios de doseamento para os três métodos apresentou resultados semelhantes e com coeficiente de variação satisfatório.

7. CONCLUSÃO

A utilização das técnicas propostas possibilitou com eficiência e rapidez a identificação do azumoleno sódico. Foi possível também, concluir que os métodos validados podem ser utilizados de forma satisfatória para quantificar o azumoleno sódico matéria-prima, verificando a importância dos parâmetros de validação realizados para a aceitabilidade de cada novo método proposto.

As análises qualitativas permitiram a identificação do azumoleno sódico por meio das técnicas de espectrofotometria de absorção na região do ultravioleta e visível, infravermelho, termogravimetria e análise térmica diferencial, além é claro, da possibilidade de identificação de fármacos através da cromatografia líquida de alta eficiência.

O desenvolvimento e validação das metodologias analíticas de quantificação através dos ensaios de espectrofotometria de absorção na região do ultravioleta e visível e da cromatografia líquida de alta eficiência apresentaram-se satisfatórios.

A análise qualitativa foi realizada com sucesso por análise térmica, espectrofotometria de absorção na região do ultravioleta, espectroscopia na região do infravermelho e espectrofotometria de absorção na região do visível com utilização de ácido clorânico 0,1% como reagente e acetonitrila como solvente, permitindo a identificação do azumoleno sódico.

Os métodos de análise quantitativos desenvolvidos e validados envolveram espectrofotometria no UV, com comprimento de onda a 340 nm, que apresentou resposta linear entre a faixa de concentração de 7,0 e 12,0 µg/mL, na qual foram analisados satisfatoriamente os parâmetros de precisão, exatidão, robustez, limite de detecção e limite de quantificação, com teor médio de 98,86% e CV de 0,62 %

Para o método espectrofotométrico na região do visível, foram utilizados ácido clorânico 0,1% como reagente e acetonitrila como solvente, com comprimento de onda a 507 nm e faixa de concentração linear de 8,0 a 13,0 µg/mL, com avaliação dos parâmetros de precisão, exatidão, robustez, limite de detecção e limite de quantificação, com teor médio de 98,15% e CV de 0,66 %.

Para o método cromatográfico foi utilizada coluna de fase reversa C₁₈ e fase móvel composta por metanol : água (75:25, v/v) com ajuste para pH 3,0 com auxílio de ácido fórmico, vazão de 1,0 mL/min e 20 µL de volume de injeção, com leituras a 340 nm, apresentando linearidade em faixa de concentração de 5,0 a 15,0 µg/mL, com avaliação dos parâmetros de precisão, exatidão e robustez, com teor médio de 98,80 % e CV de 0,85 %.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABNT, NBR ISO/IEC 17025 - Requisitos gerais para competência de laboratórios de ensaio e calibração. ABNT, 2001.

ABRAHAM, R.B.; ADNET, P.; GLAUBER, V.; PEREL, A. Malignant hyperthermia. **Postgraduate Medical Journal**, v. 74, n. 867, p. 11-17, 1998.

ALLEN, G.C. Malignant hyperthermia and associated disorders. **Current opinion in rheumatology**, v. 5, n. 6, p. 719-724, 1993.

ALMEIDA NETO, M.A. Hipertermia maligna: Retrato brasileiro. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 42, p. 395-396, 1992.

AOAC. Association of Official Analytical Chemists. **Official Methods of Analysis**. 15^a ed. Arlington, 1990. v.1, p.xvii.

BLANK, J.W.; BOGGS, S.D. Successful treatment of an episode of malignant hyperthermia using a large dose of dantroleno. *Journal of Clinical Anesthesia*, v. 5, n. 1, p. 69-72, 1993.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 16, de 6 de março de 1995. Determina a todos os estabelecimentos produtores de medicamentos, o cumprimento das diretrizes estabelecidas pelo "GUIA DE BOAS PRÁTICAS DE FABRICAÇÃO PARA INDÚSTRIAS FARMACÊUTICAS". Diário Oficial da União, Brasília, 09 de março de 1995.

BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução RDC nº 134, de 13 de julho de 2001. Determina a todos os estabelecimentos fabricantes de medicamentos, o cumprimento das diretrizes estabelecidas no Regulamento Técnico das Boas Práticas para a Fabricação de Medicamentos, conforme ao Anexo I da presente Resolução. Diário Oficial da União, Brasília, de 16 de julho de 2001.

BRASIL. Governo do Estado de São Paulo. Decreto nº. 46.601 de 12 de março de 2002. Aprova a Política Estadual de Prevenção Diagnóstico e Tratamento da Hipertermia maligna. Diário Oficial do Estado de São Paulo, 12 de março de 2002.

BRASIL. Conselho Federal de Medicina. Resolução CFM nº 1.802 de 04 de outubro de 2006. Dispõe sobre a prática do ato anestésico. Diário Oficial da União. Brasília, 01 de novembro de 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução RE nº 899 de 29 de maio de 2003. Aprova o guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Diário Oficial da União. Brasília, 01 de novembro de 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução RDC nº 111 de 29 de abril de 2005. Aprova, na forma do Anexo I, as instruções para utilização da lista das DCBs e, na forma do Anexo II, a lista das DCBs 2004 para substâncias farmacêuticas. Diário Oficial da União. Brasília, 16 de maio de 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução RDC nº 37 de 06 de julho de 2009. Trata da admissibilidade das Farmacopeias estrangeiras. Diário Oficial da União. Brasília, 08 de julho de 2009.

BRITISH Pharmacopoeia 2009. London: The Stationary Office, 2009. v. 1, p. 1750-1751.

BRITT, B. Malignant Hyperthermia. In: ORKIN, F.K.; COOPERMAN, L.H. **Complications in Anesthesiology**. Philadelphia: JB Lippincott, 1983. p. 291-313

BRITT, B. Dantrolene. **Canadian Anaesthetists Society Journal**, v. 31, p. 61-75, 1984.

BRITT, B. Hereditary and epidemiological aspects of malignant hyperthermia. In NALDA, F.O.; GOTTMANN, S.; KHAMBATTA, H. **Malignant Hyperthermia Current Concepts**. Madrid : Normed Verlag Inc, 1988, p. 19-39.

BROWN, ME. **Introduction to thermal analysis: techniques and applications**. 4. ed. New York: Chapman & Hall, 2001. 264 p.

BROWN, M.E.; ANTUNES, E.M.; GLASS, B.D.; LEBETE, M.; WALKER, R.B. [DSC screening of potential prochlorperazine-exciipient interactions in preformulation studies](#). **Journal of Thermal Analalysis Calorimetry**, v. 56, n. 3, p. 1317-1322, 1999.

BUCKTON, G.; RUSSEL, S.J.; BEEZER, A.E. [Pharmaceutical calorimetry: a selective review](#). **Thermochimica Acta**, v. 193, p. 195-214, 1991.

CAMPOS, J. *et al.* Dantroleno sódico. **Revista Española de Anestesiología y Reanimación**, v. 32, n. 4, p. 179-183, 1985.

CANOTILHO, J.; SOUZA, A.T.B.; PINTO, J.A.M.C. Análise térmica: interesse em tecnologia farmacêutica. **Revista Portuguesa de Farmácia**, v. 42, n. 4, p. 5-12, 1992.

CORDELLA, C.; ANTINELLI, J.F.; AURIERES, C.; FAUCON, J.P.; CABROL-BASS, D.; SBIRRAZZUOLI, N. Use of differential scanning calorimetry (DSC) as a new technique for detection of adulteration in honeys. 1. Study of adulteration effect on honey thermal behavior. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 50, p. 203-208, 2002.

DENBOROUGH, M.A. Malignant Hyperthermia. **The Lancet**, v. 352, p. 1131-1136, 1998.

DENBOROUGH, M.A.; FOSTER, J.F.A.; LOWELL, R.R.H.; MAPLESTONE, P.A.; VILLIERS, J.D. Anaesthetic deaths in a family. **British journal of anaesthesia**, v. 34, n. 6, p. 395-396, 1962.

DHILLON, D.S.; PONG, S.F.; MOOREHEAD, T.J. A comparison of the potency and specificity of the direct muscle relaxant activity of azumolene and dantrolene. **Drug development research**, v. 25, n. 2, p. 161-169, 1992.

EL-REIS, M.A.; ABOU-ATTIA, F.M.; IBRAHIM, S.A. AAS and spectrophotometric determination of propranolol HCl and metoprolol tartrate. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 24, p. 179-187, 2000.

EURACHEM/CITAC Guide. Quantifying uncertainty in analytical measurement. ed. 2, 2000.

FAHELELBOM, K.M.S. Analysis of certain tetracyclines and oxytetracyclines through charge transfer complexation. **American Journal of Pharmacology and Toxicology**, v. 3, n. 3, p. 212-218, 2008.

FAJGELJ, A.; AMBRUS, A. **Principles and Practices of Method Validation**. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2000. 305 p.

FARMACOPEIA Brasileira. 3.ed. São Paulo: Organização Andrei, 1977.

FARMACOPEIA Brasileira. 4.ed. São Paulo: Atheneu, 1988.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). **Analytical Procedures and Methods Validation**. Washington: Center of Drug Evaluation and Research, 2000.

GANELLIN, C.R.; TRIGGLE D.J. **Dictionary of Pharmacological Agents**. 4. ed. London: Chapman & Hall, 1996. 993 p.

GANONG, W.F. **Fisiologia Médica**. 22. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Brasil, 2006. 796 p.

GIRON, D. Thermal analysis in pharmaceutical routine analysis. **Acta Pharmaceutica Jugoslavica**, v. 40, p. 95-157, 1990.

GOTO, S.; OGATA, K.; FUJIE, T.; FUGIGAKI, T.; NAKAMURA, H.; YUKINARI, T. Caesarean section in a patient with past history of fulminant malignant hyperthermia. **Masui**, v. 42, n. 2, 271-275, 1993.

GRAHAM, P.L. **Pharmaceutical Chemistry - An Introduction to Medicinal Chemistry**. London: British Library, 1995. p.201-202.

GUERRA, D.S.L. Síndrome Neuroléptico Maligna – Impregnação Maligna? **Jornal Mineiro de Psiquiatria**, v. 19, 2002.

GUPCHUP, G.; ALEXANDER, K.; DOLLIMORE, D. The use of thermal analysis and mass spectrometry to study the solid state behavior in pharmaceutical tablet mixtures. **Thermochimica Acta**, v. 196, n. 2, p. 267-278, 1992.

HEIMAN-PATTERSON, T.D. Neuroleptic malignant syndrome and malignant hyperthermia: Important issues for the medical consultant. **Medical Clinics of North America**, v. 77, p. 477-492, 1993.

[IAIZZO, P.A.](#); [KEHLER, C.H.](#); [CARR, R.J.](#); [SESSLER, D.](#); [BELANI, K.G.](#) Prior hypothermia attenuates malignant hyperthermia in susceptible swine. **Anesthesia & Analgesia**, v. 82, p. 803-809, 1996.

INSTANTÂNEAS. Síndrome de la hipertermia maligna. **Med. Interam.**, v. 16, n. 7, p. 412-413, 1997.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL (INMETRO). Orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos, DOQ-CGCRE-008, 2007.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL (INMETRO). Vocabulário Internacional de Termos Fundamentais e Gerais de Metrologia, VIM, 1995.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION (ICH). Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1), Geneva, 2005.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION (ICH). Good Manufacturing Practice Guidance for Active Pharmaceutical Ingredients Q7A, Rockville, 2001.

IONASHIRO, M. Giolito – **Fundamentos da termogravimetria, análise térmica diferencial, calorimetria exploratória diferencial**. São Paulo: Giz Editorial e Livraria, 2005. v. 1. 80 p.

JAPANESE Pharmacopoeia. 14th. ed. Tokio. Society of Japanese Pharmacopoeia, 2001.

KAPLAN, R.F. Malignant hyperthermia. **Refresher Course Lectures. ASA. Annual Meeting.** San Francisco, 1991. p. 231-237.

KHASHABA, P.Y.; EL-SHABOURI, S.R.; EMARA, K.E.; MOHAMED, A.M. Analysis of some antifungal drugs by spectrophotometric and spectrofluorimetric methods in different pharmaceutical dosage forms. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 22, p. 363-376, 2000.

KRAUSE, T.; GERBERSHAGEN, M.U.; FIEGE, M.; WEISSHORN, R.; WAPPLER, F. Dantroleno - A review of its pharmacology, therapeutic use and new developments. **Anaesthesia**, v. 59, n. 4, p. 364-373, 2004.

KRIVOSIC-HORBER, R.M.; ADNET, P.J. L'hyperthermie maligne anaesthesique: un syndrome dont Le taux de mortalite est inacceptable. **La Revue Du Praticien Medecine Generate**, v. 8, p. 150-188, 1992.

LA ROCA, M.F.; SOBRINHO, J.L.S.; NUNES, L.C.C; NETO, P.J.R. Desenvolvimento e validação de método analítico: passo importante na produção de medicamentos. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 88, n. 4, p.177-180, 2007.

LAMBI, J.N.; NSEHYUKS, A.T.; EGBEWATT, N.; CAFFERATA, L.F.R.; ARVIA, A.J. Synthesis, spectral properties and thermal behaviour of zinc(II) acetylsalicylate. **Thermochimica Acta**, v. 389, n. 1-2, p. 145-151, 2003.

LANÇAS, F.M. **Validação de Métodos Cromatográficos de Análise.** 6^oed. São Carlos: RIMA Editora, 2004. 62 p.

LEMING, D.; QINGQIN, X.; JIANMEI, Y. Fluorescence spectroscopy determination of fluoroquinolones by charge-transfer reaction. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 33, p. 693-698, 2003.

LERMAN, J.; SIMS, C. Anesthesia and muscle diseases. **Advanced anesthesia**, v. 13, p. 247-269, 1996.

MACCANI, R.M.; WEDEL, D.J.; HOFER, R. Norepinephrine does not potentiate porcine malignant hyperthermia. **Anesthesia & Analgesia**, v. 82, p. 790-795, 1996.

MACEDO, J.A.B. As indústrias farmacêuticas e o sistema de gestão ambiental. **Fármacos & Medicamentos**, v. 1, n. 4, p. 46-50, 2000.

MANICA, J. **Anestesiologia: princípios e técnicas**. 3. ed. Porto Alegre: ARTMED, 2004. 1384 p.

MARTINDALE - The Extra Pharmacopoeia. 36.ed. London: Pharmaceutical Press, 2009. 2417 p.

MELBY, L.R.; HARDER, R.J.; HERTLER, W.R.; MAHLER, W.; MENSON, R.E.; MOCHEL, W.E. **Journal of the American Chemical Society**, v. 84, p. 3374, 1962.

MERLI, G.J.; BELL, R.D. Tratamiento preoperatorio del paciente quirúrgico con enfermedad neurológica. Consulta Preoperatoria. **The Medical Clinics of North America**, v. 71, n. 3, p. 516-517, 1987.

MOFFAT, A.C. **Clarke's isolation and identification of drugs in pharmaceuticals, body fluids and post mortem materials**, 2º ed. London: The Pharmaceutical Press, 1986. 508 p.

MORETTO, S.A.G.; ALBUQUERQUE, C.N. Controle da Qualidade: Importância do Ensaio Aspecto na Avaliação da Qualidade do Ativo Farmacêutico. **Fármacos & Medicamentos**, v. 56, p. 44-52, 2009.

MORETTO, L.D.; SHIB, M. A era da validação. **Pharmaceutical Technology**, v.4, p. 4-48, 2000.

MORETTO, L.D. Auto-Inspeção nas Indústrias Farmacêuticas. **Revista Pharmaceutical Technology**, v. 5, n. 1, p.44-48, 2001.

NALLY, J.D. (Ed.). **Good Manufacturing Practices for Pharmaceuticals**. 6^a ed. New Jersey: Informa Healthcare, 2007. 398 p.

O'FLYNN, R.P.; SHUTACK, J.G.; ROSENBERG, H.; FLETCHER, J.E. Masseter muscle rigidity and malignant hyperthermia susceptibility in pediatric patients. And update on management and diagnosis. **Anesthesiology**, v. 80, n. 6, p. 1228-1233, 1994.

ONAH, J.O.; ODEIANI, J.E. Simultaneous spectrophotometric determination of sulfadoxine and pyrimethamine in pharmaceutical formulations. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 30, p. 851-857, 2002.

OHANNESIAN, L.; STREETER, A.J. (Ed.). **Handbook of Pharmaceutical Analysis**. New York: Marcel Dekker, 2002. 585 p.

PRICHARD, E. **Analytical Measurement Terminology**. Cambridge: LGC, 2001. 74 p.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F.; MELO, L.F.C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p.771-780, 2003.

RODANTE, F.; VECCHIO, S.; CATALANI, G.; TOMASSETTI, M. Compatibility between active components of a commercial drug. **Fármaco**, v. 57, p. 833-843, 2002.

[ROEWER, N.](#); [DZIADZKA, A.](#); [GREIM, C.A.](#); [KRAAS, E.](#); [SCHULTE, A.E.J.](#) Cardiovascular and metabolic responses to anesthetic-induced malignant hyperthermia in swine. **Anesthesiology**, v. 83, p. 141-159, 1995.

ROSENBERG, H.; SEILMAN, D.; FLETCHER, J. Certain inherited disorders enhanced or instigated by drug administered by anesthesiologist. **Clinical Anesthesia**, p. 589-613, 1992.

SALEH, G.A.; ASKEL, H.F.; RAMADAN, M.F.; OMAR, M.A. Use of charge-transfer complexation in the spectrophotometric analysis of certain cephalosporins. **Talanta**, v. 54, p. 1205-1215, 2001.

SALGADO, H.R.N.; RIBEIRO, Y.A.; RIBEIRO, C.A.; SCHAPOVAL, E.E.S. Análise térmica de esparfloxacino. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 26, n. 2, p. 119-123, 2005.

SARAIVA, C.P. Validação de métodos analíticos & determinação da incerteza de medição: o que há em comum? **Fármacos & Medicamentos**, v. 57, p. 48-54, 2009.

SAXENA, S.J.; HONIGBERG, I.L.; STEWART, J.T.; KEENE, G.R.; VALLNER, J.J. Liquid chromatography in pharmaceutical analysis VI: Determination of dantroleno sodium in a dosage form. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.66, n. 2, p. 286-288, 1976.

SCHWE, P.F. (Norwich, NY). Azumoleno dosage form. **United States Norwich Eaton Pharmaceuticals**. Pat.nº 4822629. 12 dec. 1986, 18 apr. 1989.

SILVERSTEIN, R.M.; WEBSTER, F.X. **Identificação espectrofotométrica de compostos orgânicos**. 6. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2000.

SIMÕES, C.M.; KOISHI, G.N.; ROZATTI, M.; AMARA, J.L.G. Estamos preparados para diagnosticar e conduzir um episódio de hipertermia maligna? **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 53, n. 2, p. 248 – 257, 2003.

SUDO, R.T.; CARMO, P.L.; TRACHEZ, M.M.; ZAPATA-SUDO, G. Effects of azumolene on normal and malignant hyperthermia-susceptible skeletal muscle. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 102, n. 3, p. 308–316, 2008.

STRAZIS, K.P.; FOX, A.W. Malignant hyperthermia: a review of published cases. **Anesthesia & Analgesia**, v. 77, p. 297-304, 1993.

STRENG, W.H. Physical chemical characterization of drug substances. **Drug Discovery Today**, v. 2, p. 415-426, 1997.

THOMPSON, K.C. [Pharmaceutical applications of calorimetric measurements in the new millennium](#). **Thermochimica Acta**, v. 355, p. 83-87, 2000.

TOMASSETTI, M.; CATALANI, A.; ROSSI, V.; VECCHIO, S. Thermal analysis study of the interactions between acetaminophen and excipients in solid dosage forms and in some binary mixtures. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 37, n. 5, p. 949-955, 2005.

TONELLI, D.; TOLDO, A. Regulação da temperatura e anestesia. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 44, n. 3, p. 195-204, 1994.

TORPY, J.M. Hipertermia maligna. **The Journal of the American Medical Association**, v. 293, n. 23, p. 2958, 2005.

TORRES, L.A. A RDC 134 e os itens que devem ser cumpridos até 16 de janeiro de 2003. **Revista Controle de Contaminação**, v. 42, p. 20-25, 2002.

USP 31. The United States Pharmacopeia. Rockville : USP Convention, 2008. v. 1, v. 2, v. 3.

VESSMAN, J.; STEFAN, R.I.; STADEN, J.F.V.; DANZER, K.; LINDNER, W.; BURNS, D.T.; FAJGELJ, A.; MÜLLER, H. Selectivity in analytical chemistry. **Pure and Applied Chemistry**, v. 73, n. 8, p. 1381-1386, 2001.

WARD, A.; CHAFFMAN, M.O.; SORKIN, E.M. Dantroleno. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and therapeutic use in malignant syndrome and an update of its use in malignant hyperthermia, the neuroleptic malignant syndrome and muscle spasticity. **Drugs**, v. 32, p. 130-168, 1986.

WEBER, A.P. Qualidade na origem do processo. **Fármacos & Medicamentos**, v. 53, p. 14-18, 2008.

WENDLANDT, W.W. **Thermal analysis**. 3 ed. New York: Wiley-Interscience, 1986. 814 p.

WHITE, JR.R.L. (Norwich, NY); ELLIS, K.O. (Norwich, NY). Use of azumoleno for the treatment of malignant hyperthermia. **United States Norwich Eaton Pharmaceuticals**. Pat. n° 4861790. 28 out. 1987, 29 aug. 1989.

ZHAO, X.; WEISLEDER, N.; HAN, X.; PAN, Z.; PARNES, Z.; BROTTTO, M.; MA, J. Azumolene Inhibits a Component of Store-operated Calcium Entry Coupled to the Skeletal Muscle Ryanodine Receptor. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 44, p. 33477-33486, 2006.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)