

VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA DE DOSEAMENTO DE SULFAMETOXAZOL (MATÉRIA-PRIMA) POR ESPECTROFOTOMETRIA

Gisele Maccari dos Santos¹
Inara Staub Prochnau²

RESUMO

O processo de validação visa à qualidade e funcionalidade de um método de análise a ser desenvolvido, empregando parâmetros que comprovem que o mesmo seja apropriado. O trabalho teve como objetivo desenvolver e validar metodologia analítica para determinação quantitativa de sulfametoxazol matéria-prima, eficiente antimicrobiano, muito utilizado na prática clínica em associação à trimetoprima. O método foi desenvolvido empregando espectrofotometria de absorção na região do ultravioleta, no comprimento de onda de 257NM, empregando hidróxido de sódio 0,1M como solvente e concentração do fármaco de 10µg/ml. O método foi validado de acordo com as exigências da Resolução nº 899 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, verificando linearidade, precisão, robustez, especificidade e exatidão. Os resultados obtidos demonstraram que a metodologia de doseamento desenvolvida foi linear, precisa, exata e robusta, sendo a exatidão comprovada por comparação ao método oficial, descrito pela Farmacopeia Brasileira. O método apresentou especificidade limitada em função de deslocamento hipsocrômico da absorção do fármaco.

Palavras-chave: Controle de qualidade. Análise quantitativa. Espectrofotometria ultravioleta.

VALIDATION OF AN UV SPECTROPHOTOMETRIC METHOD FOR SULFAMETHOXAZOLE RAW MATERIAL

ABSTRACT

The validation process aims at the quality and functionality of an analysis method to be developed, using parameters that prove that it is appropriate. The aim of this work was to develop and validate an analytical methodology for the quantitative determination of sulfamethoxazole raw material, an antimicrobial widely used. The method was developed using ultraviolet absorption spectrophotometry at 257nm using 0.1M sodium hydroxide as solvent and 10µg/ml drug concentration. The method was validated according to the requirements of Resolution 899 of the National Health

¹Graduanda em Farmácia. Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUC/PR). Curitiba. Paraná. Brasil. E-mail: gi.maccari@outlook.com

²Doutora em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Professora Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUC/PR). Curitiba. Paraná. Brasil. E-mail: inara.prochnau@pucpr.br

Surveillance Agency, verifying linearity, precision, robustness, specificity and accuracy. The results demonstrated that the developed methodology was linear, precise, accurate and robust. The accuracy verified by comparison to the official method, described by the Brazilian Pharmacopoeia. The method showed limited specificity as a function of the hypsochromic shift of the drug absorption.

Key-words: Quality control. Quantitative analysis. Ultraviolet spectrophotometry.

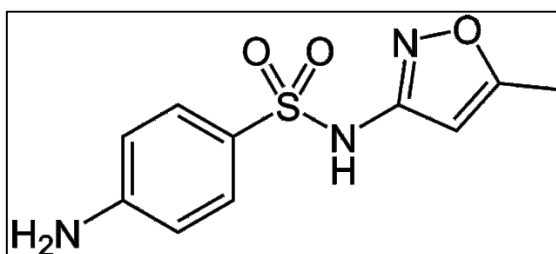
1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento e validação de métodos, para análise quantitativa de fármacos, requer o conhecimento das características físico-químicas das substâncias, seleção das melhores condições de análise e otimização dos processos de extração (SANTOS et al., 2011). A validação de uma metodologia garante a qualidade e a funcionalidade do método, uma vez que há inúmeros fatores que podem interferir nos resultados (VALENTIN; SOMMER; MATIOLI, 2004).

A Resolução nº 899 (ANVISA, 2003) determina que a validação deva comprovar que o método é apropriado para a finalidade pretendida, assegurando confiabilidade aos resultados; esses revelados por meio de especificidade, linearidade, exatidão, precisão e robustez, parâmetros fundamentais para garantir o controle de qualidade do fármaco.

As sulfonamidas são um grupo de antibacterianos, constituído por diferentes substâncias. Algumas sulfas são utilizadas em associação a outros fármacos, em prol de ação farmacológica melhorada, como no caso da sulfametoxazol (SMX) e trimetropima (BORGES et al., 2005). O SMX (Figura 1) pertence ao grupo das sulfonamidas e é absorvido e excretado rapidamente (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2012).

Figura 1 – Estrutura química do sulfametoxazol. 4-amino-N-(5-metil-3-isoxazolil) benzenosulfonamida



Fonte: Brunton; Chabner; Knollmann (2012).

Na literatura, foram encontrados diferentes métodos para análise quantitativa do SMX matéria-prima, como titulação por diazotação (BRASIL, 2010, USP, 2009),

titulação potenciométrica (EUROPEAN PHARMACOPEIA, 2005), espectrofotometria derivada (FAN et al., 2003), espectrofluorimetria (BLANCO et al., 1999) e cromatografia líquida de alta eficiência (NEVADO; PEÑALVO; BERNARDO, 2001, CRUZ et al., 2010), entretanto um método simples e rápido, empregando espectrofotometria na região do ultravioleta, não foi encontrado.

Considerando o exposto, o objetivo do trabalho foi desenvolver um método espectrofotométrico de absorção na região do ultravioleta para análise quantitativa de sulfametoxazol matéria-prima e comprovar, através da análise experimental, que a metodologia é adequada. Para tanto, o método foi validado conforme os critérios dispostos na Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003 (ANVISA, 2003).

2 MATERIAL E MÉTODOS

A matéria-prima sulfametoxazol (teor 100,45%) foi gentilmente cedida pela Prati Donaduzzi Indústria Farmacêutica (Toledo, Brasil). Os equipamentos e instrumentos utilizados foram balança analítica (Gehaka, AG-200), determinador de ponto de fusão (Gehaka, PF-1500), espectrofotômetro de absorção na região do ultravioleta (FemtoCirrus 80) e espectrofotômetro na região do infravermelho (Bomem MB-100).

Para caracterizar a matéria-prima foram realizados ensaios avaliando características físico-químicas, como solubilidade e determinação do ponto de fusão e ensaios de identificação empregando espectrofotometria na região do infravermelho e do ultravioleta. Para o doseamento do fármaco foi empregada titulação por diazotação, para tanto, a matéria-prima foi previamente diluída em ácido acético glacial, ácido clorídrico e água, resfriada a 15 °C e titulada com nitrito de sódio 0,1M, previamente padronizado (BRASIL, 2010).

2.1 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA

Inicialmente, foram pesados 25mg de SMX matéria-prima em balão volumétrico de 25ml e o volume completado com NaOH 0,1M. Alíquotas de 1mL foram adicionadas em balões volumétricos de 100mL e o volume ajustado com o mesmo diluente. Fez-se espectro de varredura entre 200 e 400 NM, a fim de verificar o comprimento de onda de maior absorção do fármaco. Foi utilizado solução de NaOH 0,1M como branco.

Para demonstrar a adequação do método, o mesmo foi validado conforme a Resolução nº 899 (ANVISA, 2003), categoria I “Testes quantitativos para a determinação do princípio ativo em produtos farmacêuticos ou matérias-primas”, avaliando os seguintes parâmetros: especificidade, linearidade, intervalo, precisão intra-dia e inter-dias, exatidão e robustez.

2.1.1 Linearidade

Inicialmente, foram preparadas soluções com concentração de 1mg/mL, utilizando solução de NaOH 0,1M como diluente. Alíquotas de 4,0; 6,0; 8,0; 10,0 e 12,0mL dessas soluções foram transferidas para balões volumétricos de 100mL. Nova diluição foi realizada, afim de obter concentrações finais de 4,0; 6,0; 8,0; 10,0 e 12,0µg/mL.

Cada solução foi preparada em triplicata sendo realizadas três leituras de cada amostra. A curva padrão foi obtida a partir dos valores das absorvâncias em relação à concentração, analisando cinco pontos da curva. A linearidade foi determinada por análise de regressão linear, obtendo-se equação da reta e o coeficiente de correlação. Os resultados obtidos foram analisados através de análise de variância (ANOVA).

2.1.2 Precisão

A precisão intra-dias foi determinada pela análise de seis amostras individuais, na concentração de 8,0µg/mL. Aprecisão inter-dias foi avaliada em três diferentes dias, por dois analistas diferentes. As soluções foram preparadas em triplicata e a leitura das soluções foi realizada em espectrofotômetro de absorção no ultravioleta com comprimento de onda de 257nm. Foi empregado NaOH 0,1M como branco e o desvio-padrão relativo (DPR) foi calculado após as leituras.

2.1.3 Exatidão

Através da comparação dos resultados, obtidos na determinação da precisão do método, com a técnica de titulação por diazotação descrita nas Farmacopeias Brasileira e Americana (BRASIL, 2010, USP, 2009), a exatidão do método foi determinada.

2.1.4. Especificidade

A especificidade foi avaliada por meio de teste de degradação forçada em soluções de SMX, que foram expostas à degradação por hidrólise ácida (exposição ao HCl 1M na proporção 1:5 (v/v)) e alcalina (exposição ao NaOH 1M na proporção 1:5 (v/v)), por 10 horas (LUPI, 2006). Para tanto, foram preparadas três soluções do fármaco com concentração de 400,0µg/mL. Alíquotas de 2mL dessas soluções foram

acrescidas de 8mL das soluções de degradação e após 10 horas de exposição, as concentrações foram diluídas a 8,0µg/mL com NaOH 0,1M e o espectro de varredura foi traçado.

2.1.5. Robustez

O teste de robustez, para análises espectrofotométricas, pode ser avaliado segundo variações de pH da solução, temperatura ou diferentes fabricantes de solventes. O ensaio foi realizado, a partir de pequenas variações de temperatura, submetendo a solução de 8,0µg/mL de SMX matéria-prima ao resfriamento a 10°C, em geladeira e aquecimento a 36°C, em placa de aquecimento.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os ensaios realizados caracterizaram e comprovaram a identidade e pureza da amostra de sulfametoxazol matéria-prima, pois suas características estavam de acordo com as descritas na Farmacopeia Brasileira (Tabela 1) (BRASIL, 2010).

Tabela 1 – Resultados dos ensaios de caracterização de sulfametoxazol matéria-prima.

Ensaio	Resultados	Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2010)
Descrição	Pó Branco	Pó cristalino branco ou quase branco
Solubilidade	Insolúvel em H ₂ O e solúvel em NaOH	Insolúvel em H ₂ O e ligeiramente solúvel em NaOH
Ponto de fusão	171,1 °C	Entre 168,0e 172,0°C
Titulação por diazotação	100,45%	Entre 99,00 e 101,00%

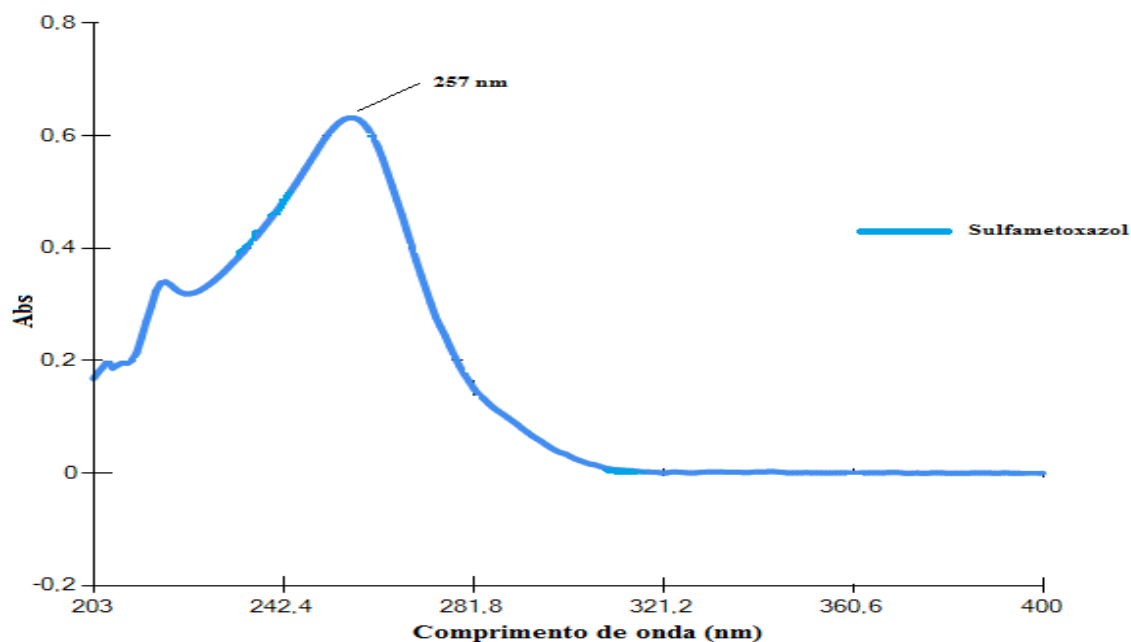
A técnica espectrofotométrica na região do infravermelho mostra-se bastante útil na identificação de fármacos. A Tabela 2 apresenta as bandas de absorção encontradas para o sulfametoxazol e suas atribuições (SILVERSTEIN, WEBSTER, KIEMLE, 2007), confirmando a identidade da matéria-prima.

Tabela 2 – Frequência de absorção das principais bandas no infravermelho e suas respectivas atribuições para sulfametoxazol matéria-prima.

Comprimento de onda (cm ⁻¹)	Grupos funcionais	Atribuições (SILVERSTEIN, WEBSTER, KIEMLE, 2007)
3070 a 3500	Anina	Aminas primárias aromáticas: ~ 3.400
800 a 860	Anel benzeno	Anéis <i>para</i> -substituídos
1140 a 1200	Sulfonamida	Deformação axial assimétrica
1350 a 1560	Isoxazol	Deformação axial assimétrica
1370 a 1390	Metil	Deformação angular

A Figura 2 apresenta o espectro de varredura obtido para SMX matéria-prima na concentração de 10 µg/mL em NaOH. Observa-se o comprimento de onda de absorção máxima em 257 nm. A técnica de espectrofotometria na região do ultravioleta é útil no controle de qualidade de produtos farmacêuticos, pois a maioria dos medicamentos absorve energia na região do ultravioleta, os resultados podem ser obtidos rapidamente, a análise é simples e podem ser utilizados menos solventes, tornando isso valioso na análise de rotina (ICH, 1997).

Figura 2 – Espectro de varredura em espectrofotômetro de absorção no ultravioleta (Femto – Cirrus 80) de sulfametoxazol matéria-prima solução a 10 µg/mL, empregando NaOH 0,1M como diluente.



A linearidade do método foi determinada para garantir que os resultados obtidos estão diretamente proporcionais à concentração do analito, dentro de uma dada faixa (BERGANO, 2013). O gráfico construído, plotando os dados de concentração versus absorvância (Figura 3), demonstrou proporcionalidade entre os dois fatores. Os resultados foram obtidos por meio da média de três curvas padrão e demonstram boa correlação no intervalo das concentrações estudadas.

A equação da reta obtida, a partir do estudo de regressão linear, foi $y = 0,0654x - 0,0015$ e o coeficiente de correlação calculado foi 0,9979, considerado aceito pelo critério da resolução RE nº 899 (ANVISA, 2003), que especifica mínimo de 0,99. A ANOVA dos resultados indicou que a curva padrão apresentou regressão linear significativa e desvio da linearidade não significativo.

O método também demonstrou-se preciso. A precisão foi determinada pela análise do DPR entre as amostras. Segundo os dados da Tabela 3, verificou-se DPRs intra-dias de 2,87%, 2,55% e 3,09% e inter-dias de 1,15%, todos inferiores a 5%, valor descrito na RE nº 899 (ANVISA, 2003). A precisão do método expressa o grau de dispersão e avalia a proximidade dos resultados, obtidos em uma série de medidas, de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra (ANVISA, 2003, BRAGA, 2010).

Figura 3 – Representação gráfica da curva padrão de sulfametoxazol, obtida por meio de espectrofotometria na região no ultravioleta com comprimento de onda de 257 nm.

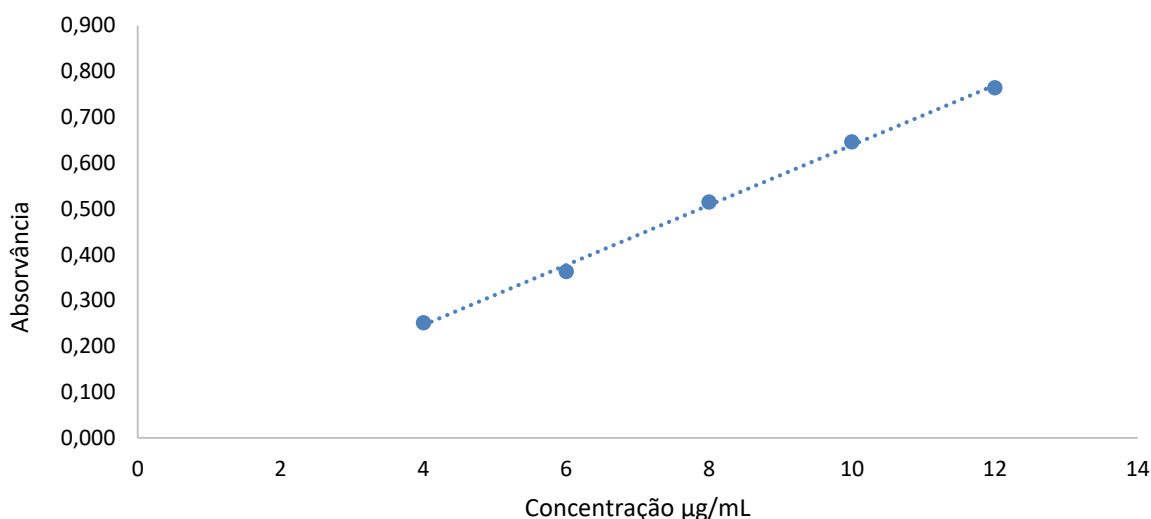


Tabela 3 – Resultados obtidos em diferentes amostras de sulfametoxazol matéria-prima, através de espectrofotometria na região ultravioleta, para avaliação da precisão intra-dias e inter-dias. Média dos teores obtidos e DPRs. Concentração teórica de 8µg/mL.

	Teor (%) das soluções de SMX						Intra-dia(%)	DPR* (%)
Dia I ^{A1}	101,88	94,46	97,37	101,25	99,55	96,89	98,57	2,87
Dia II ^{A1}	101,71	97,78	103,40	98,03	103,56	99,73	100,70	2,55
Dia II ^{A2}	97,68	99,49	102,20	96,34	104,63	101,94	100,38	3,09
Teor médio inter-dias (%)							99,88	
DPR							1,15	

A¹ Analista 1, A² Analista 2, *DPR: Desvio Padrão Relativo.

As médias dos teores obtidos pelos dois métodos realizados estão descritos na Tabela 4. Para comprovar a exatidão do método em desenvolvimento, foi realizada análise estatística, empregando o teste de t de *Student*, entre os métodos de

espectrofotometria de absorção no ultravioleta e o método descrito na Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2010). Após análise estatística, o valor de t_{calc} foi de 0,3404 sendo o $t_{\text{tab0,05}}$ 2,093. Pode-se observar que não existe diferença significativa entre os dois métodos, inferindo exatidão ao método proposto.

Tabela 4 – Resultados obtidos na determinação de sulfametoxazol matéria-prima por titulação de diazotação e espectrofotometria no UV.

	Titulação por Diazotação (n = 3)	UV (n = 18)
Teor médio (%)	100,45	99,88
DPR*	0,27	1,15

*DPR: Desvio Padrão Relativo.

O teste de degradação forçada foi realizado a fim de detectar o fármaco na presença de seus produtos de degradação, pois a especificidade é a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto, em presença de outros componentes (ICH, 1997). Todas as soluções apresentaram absorção no comprimento de onda estabelecido pela farmacopeia, porém um pouco abaixo (deslocamento hipsocrômico), indicativo de que produtos de degradação podem interferir na absorção do SMX ou que a alteração do pH da solução, pode ter alterado a estrutura do grupo saturado, ligado ao cromóforo, alterando o valor do comprimento de onda da absorção. Métodos espectrofotométricos na região do ultravioleta não apresentam especificidade na determinação de misturas de substâncias ou fármacos e seus produtos de degradação, pois a restrição desse método é a dificuldade de determinação simultânea, sem separação prévia, devido a sobreposição de bandas de transições eletrônicas (DONATO et al., 2010).

A robustez do método desenvolvido foi comprovada, pois após alteração de temperatura das soluções contendo o fármaco, os teores obtidos não apresentaram diferença significativa.

4 CONCLUSÃO

A matéria-prima de SMX foi caracterizada frente à análise das suas características físico-químicas como descrição, solubilidade e ponto de fusão; foi identificada, através de espectrofotometria na região do infravermelho e do ultravioleta e quantificada pelo método descrito em códigos oficiais.

O método desenvolvido para análise quantitativa do sulfametoxazol matéria-prima, por espectrofotometria na região do ultravioleta foi validado, demonstrando ser linear, preciso, exato e robusto, apresentando especificidade limitada em função do pequeno deslocamento hipsocrômico da absorção, apresentada pelas soluções que sofreram alteração de pH.

REFERÊNCIAS

- ANVISA. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003 – Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Brasília, DF: Anvisa, 2003. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/RE_899_2003.pdf>
- BERGANO, A.C. **Desenvolvimento e validação interlaboratorial de metodologia por eletroforese capilar para análise da associação de sulfametoxazol e trimetropina**. Dissertação de Mestrado. Fundação Oswaldo Cruz, 2013. Disponível em: <<https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/11141>>
- BLANCO, C.C. Determination of the antibacterial drug sulfamethoxazole in pharmaceutical preparations containing trimethoprim by spectrofluorimetry after derivatization with fluorescamine. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v.36, n.5, p.444-447, 1999.
- BORGES, A.D.L. Síntese de sulfadiazina e sulfadiazina de prata em escala semi-micro: prática experimental em síntese de fármacos. **Química Nova**, v.28, n. 4, p. 727-731, 2005.
- BRAGA, R.R. **Desenvolvimento e validação de método analítico para determinação de alantoína em formulações tópicas e lipossomas**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio de Janeiro/RJ, 2010. Disponível em: <<http://objdig.ufrj.br/59/teses/751644.pdf>>
- BRASIL. **Farmacopéia Brasileira**. 5.ed. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2010. v.2.
- BRUNTON, L.L; CHABNER, B.A; KNOLLMANN, B.C. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman e Gilman**. 12. ed. Porto Alegre: AMGH, 2012.
- CRUZ, H. Degradação fotocatalítica de sulfametoxazol, trimetoprima e diclofenaco em solução aquosa. **Química Nova**, v.33, n.6, p.1270-1274, 2010.
- DONATO, E.M.et al. Espectrofotometria derivada: uma contribuição prática para o desenvolvimento de métodos. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.31, n.2, p. 1808-4532, 2010.
- EUROPEAN PHARMACOPEIA. 5.ed. Strasbourg: Convention an elaboration of na Eurpean Pharmacopeia, 2005.
- FAN, J. Flow-injection spectrophotometric determination of sulfadiazine and sulfamethoxazole in pharmaceuticals and urine. **Analytica Science**, v.19, n.1, p. 419-422, 2003.

ICH. International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use: Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. Q2B, 1995. Disponível em: <https://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1__Guideline.pdf>

LUPI, C.D. Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para determinação do inibidor de protease ritonavir matéria-prima e cápsulas. Dissertação de Mestrado. 2006. 165f. Dissertação. Universidade Federal do Rio Grande do Sul/RS, 2006. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/10183/14274>>

NEVADO, J.J.B; PEÑALVO, G.C; BERNARDO, F.J. Simultaneous determination of sulfamethoxypyridazine, sulfamethoxazole, sulfadimethoxine and their associated compounds by liquid chromatography. **Analytica Chimica Acta**, v.44, n.2, p. 241-248, 2001.

SANTOS, P.N.et al. Otimização e validação de métodos multiresíduos para determinação de sulfonamida em camarão cultivado por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por ultravioleta. **Química Nova**, v.34, n.7, p.1265-1270, 2011.

SILVERSTEIN, R.M.; WEBSTER, F.X.; KIEMLE, D. J. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**.7.ed. Rio de Janeiro: LTC, 2007.

USP. **The United States Pharmacopeia**. 29.ed. Rockville, USA: The United States Pharmacopeial Convention, 2009.

VALENTIN, S.R; SOMMER, W.A.; MATIOLI, G. Validação de métodos analíticos na quantificação de comprimidos de captopril - comparação de metodologias para um programa de garantia de qualidade. **Acta Scientiarum. Health Sciences**, v.26, n.2, p. 357-364, 2004.

AGRADECIMENTOS

À PUCPR pela disponibilização do Laboratório de Química Farmacêutica e à Prati Donaduzzi Indústria Farmacêutica.

Artigo recebido em: 31/10/2017

Artigo aprovado em: 15/06/2018

Artigo publicado em: 11/07/2018