

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ - *CAMPUS* DE CASCAVEL
CENTRO DE CIÊNCIAS MÉDICAS E FARMACÊUTICAS
MESTRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

ANDRÉ CORADINI CORRÊA

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA ESPECTROFOTOMÉTRICA
COMO ALTERNATIVA PARA DETERMINAÇÃO DO ÁCIDO
5-AMINOSALICÍLICO EM MEDICAMENTOS**

Orientador: Dr. Helder Lopes Vasconcelos

**CASCAVEL - PR
2018**

ANDRÉ CORADINI CORRÊA

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA ESPECTROFOTOMÉTRICA
COMO ALTERNATIVA PARA DETERMINAÇÃO DO ÁCIDO
5-AMINOSALICÍLICO EM MEDICAMENTOS**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual Oeste do Paraná, *campus* de Cascavel, em cumprimento aos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Ciências Farmacêuticas. Linha de pesquisa Fármacos e medicamentos.

Orientador: Dr. Helder Lopes Vasconcelos

**CASCADEL - PR
2018**

ANDRÉ CORADINI CORRÊA

BIOGRAFIA RESUMIDA

André Coradini Corrêa, natural de Umuarama, Paraná, Brasil, nascido no dia 19 de setembro de 1991, formou-se em Farmácia na Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE, *campus* de Cascavel em dezembro de 2014. em 2015, trabalhou na indústria farmacêutica Sandoz do Brasil, como analista no setor de Controle de Qualidade. Ingressou no Programa de Pós-graduação *stricto sensu* em nível de mestrado em Ciências Farmacêuticas no ano de 2016. Desenvolve projeto experimental de dissertação junto à linha Fármacos e medicamentos, orientado pelo professor Dr. Helder Lopes Vasconcelos.

*Enquanto estiver vivo, sinta-se vivo.
Se sentir saudades do que fazia, volte a fazê-lo.
Não viva de fotografias amareladas...
Continue, quando todos esperam que desistas.
Não deixe que enferruje o ferro que existe em você.
Faça com que ao invés de pena, tenham respeito por você.
Quando não conseguir correr através dos anos, trote.
Quando não conseguir trotar, caminhe.
Quando não conseguir caminhar, use uma bengala.
Mas nunca se detenha.
(Madre Teresa de Calcutá)*

Dedicatória

Dedico este trabalho em especial aos meus pais, José Ismael Gomes Corrêa e Marta Ivelina Coradini Corrêa e à minha irmã, Priscila, que sempre estiveram ao meu lado, incentivando e apoiando meus estudos e minha vida.

À minha namorada Amanda, pela compreensão, paciência, companheirismo, amizade e carinho.

Ao meu orientador Prof. Helder, pela paciência e dedicação.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus pela vida, pela sabedoria, por todas as minhas conquistas pessoais e profissionais, e por ter colocado em meu caminho pessoas tão especiais, que não mediram esforços em me ajudar. A estas pessoas externo aqui meus sinceros agradecimentos.

Aos meus pais, Ismael e Marta, por todos os esforços para garantir meus estudos e pelos ensinamentos de vida. À minha irmã, cunhado e sobrinho, Priscila, Joelson e Valentim, pelo incentivo, carinho, amizade e apoio. Sem vocês nada disso seria possível. Amo vocês!

À minha eterna namorada, Amanda, meu A²mor, obrigado pela paciência, pela amizade, pelo carinho, por sempre estar ao meu lado, ajudando nas minhas decisões e iluminando meu caminho. Sem você tudo seria mais difícil. Te A²mo!

Ao meu irmão de coração, Gabriel, obrigado pela parceria, pelo futebol, violão e fandangos. Conte comigo sempre que precisar. *Blood Brothers*.

Ao meu professor orientador, Helder Lopes Vasconcelos, pela amizade, paciência e sabedoria transmitida.

Aos meus colegas da turma de 2016 do Programa de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual do Oeste do Paraná.

Agradeço à CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão da bolsa durante um ano do período de realização deste mestrado.

DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA ESPECTROFOTOMÉTRICA COMO ALTERNATIVA PARA DETERMINAÇÃO DO ÁCIDO 5-AMINOSALICÍLICO EM MEDICAMENTOS

Resumo

O desenvolvimento de novas metodologias analíticas é essencial para criar alternativas aos métodos descritos nas farmacopeias, seja para identificação ou quantificação de fármacos. A literatura mostra poucos métodos de quantificação do ácido 5-aminosalicílico (5-ASA) em formas farmacêuticas. É considerada a metodologia mais utilizada, feita por CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência), o que torna caro o procedimento e até inviável em determinados setores. Dessa forma, justifica-se a pesquisa por métodos rápidos, eficientes e de baixo custo para análise desse fármaco. Assim, esta dissertação teve como objetivo utilizar a técnica de espectrofotometria para a determinação de ácido 5-aminosalicílico em diferentes formas farmacêuticas, baseando-se na reação de formação de um complexo colorido formado entre 5-ASA e íons Fe^{3+} , a qual é conhecida como técnica de Trinder. No Capítulo 1 dessa dissertação está descrita a metodologia desenvolvida, bem como os resultados dessa pesquisa, juntamente com as discussões pertinentes. O delineamento experimental (DOE) e a metodologia de superfície de resposta (RSM) foram realizados com o objetivo de reduzir o número de experimentos e obter as melhores condições para os procedimentos de medidas de absorvância do complexo. Foram estudados três fatores em dois níveis: concentração de 5-ASA (150 mg/L; 275 mg/L e 400 mg/L), concentração de $FeCl_3$ (100 mg/L; 200 mg/L e 300 mg/L) e proporção de volume (1:2; 1:1 e 2:1) entre as quantidades de 5-ASA e $FeCl_3$. O método desenvolvido apresentou valores satisfatórios de linearidade, precisão e exatidão. As diferentes formulações de drogas contendo 5-ASA apresentaram valores concordantes com os das especificações contidas na embalagem. A metodologia espectrofotométrica aplicada foi de baixo custo, simples e rápida para a determinação de 5-ASA em formulações farmacêuticas.

Palavras-chave: 5-ASA; Análise; Espectrofotometria; Validação.

DEVELOPMENT OF SPECTROPHOTOMETRIC METHODOLOGY AS AN ALTERNATIVE FOR THE DETERMINATION OF 5-AMINOSALICYLIC ACID IN MEDICINES

Abstract

The development of new analytical methodologies is essential to create alternatives to the methods described in the pharmacopoeias, either for identification or quantification of drugs. The literature shows few methods of quantification of 5-aminosalicylic acid (5-ASA) in pharmaceutical forms, being the methodology most used by CLAE (High Performance Liquid Chromatography), which makes the procedure expensive and even unviable in certain sectors. Thus, it is justified the research by fast, efficient and low-cost methods for the analysis of this drug. This dissertation aimed to use the spectrophotometry technique for the determination of 5-aminosalicylic acid in different pharmaceutical forms, based on the formation reaction of a colored complex formed between 5-ASA and Fe^{3+} ions, which is known as the Trinder. Chapter 1 of this dissertation describes the methodology developed, as well as the results of this research, together with the relevant discussions. Experimental design (ED) and response surface methodology (RSM) were carried out in order to reduce the number of experiments and achieve the best conditions for complex absorbance procedure. Three factors at two levels were studied: 5-ASA concentration (150 mg/L; 275 mg/L and 400 mg/L), FeCl_3 concentration (100 mg/L; 200 mg/L and 300 mg/L) and volume ratio (1:2; 1:1 and 2:1) between the amounts of 5-ASA and FeCl_3 . The developed method showed satisfactory values for linearity, precision and accuracy. The different drug formulations containing 5-ASA presented values that were in agreement with those specifications in the package. This spectrophotometric methodology proved to be low-cost, simple and fast to determine 5-ASA in pharmaceutical formulations.

Key words: 5-ASA; Analyze, Spectrophotometry; Validation.

Sumário

Lista de Tabelas	x
Lista de Figuras	xi
Lista de Abreviaturas.....	xii
1. Introdução.....	1
2. Objetivos	2
2.1. Objetivo geral	2
2.2. Objetivos específicos	2
3. Fundamentação teórica	3
3.1. Fármaco 5-ASA.....	3
3.2. Validação analítica	6
3.3. Planejamento experimental	7
4. Capítulo 1 - Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para a determinação do fármaco ácido 5-aminosalicílico utilizando planejamento experimental (artigo redigido de acordo com as normas da Revista Journal of Pharmaceutical and Biomedical analysis – QUALIS/CAPES A2)	9
Resumo	9
Abstract	10
Introdução	11
Metodologia.....	13
Resultados	16
Discussão.....	29
Conclusão	31
5. Conclusões gerais da dissertação	32
6. Considerações finais.....	33
7. Referências Bibliográficas	34
Referências Bibliográficas – Capítulo 1	34
Referências Bibliográficas – Fundamentação teórica	36
8. Anexos	39

Lista de Tabelas

Tabela 1. Valores e níveis das variáveis utilizadas no planejamento fatorial 2^3	13
Tabela 2. Matriz do planejamento fatorial 2^3 e dados experimentais das três variáveis estudadas.....	17
Tabela 3. Tabela de efeitos do planejamento fatorial 2^3	18
Tabela 4. Coeficiente de regressão do planejamento fatorial 2^3	20
Tabela 5. Tabela ANOVA para o planejamento fatorial 2^3	21
Tabela 6. Valores obtidos para o parâmetro de repetitividade pelo mesmo analista.....	25
Tabela 7. Valores obtidos do teste de precisão intermediária realizado por analista diferente.....	26
Tabela 8. Valores obtidos para o parâmetro de exatidão.....	28
Tabela 9. Valores das análises dos medicamentos contendo 5-ASA em diferentes formulações utilizando a metodologia desenvolvida.....	28
Tabela 10. Valores das análises dos medicamentos contendo 5-ASA em diferentes formulações utilizando a metodologia volumétrica.....	29

Lista de Figuras

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Figura 1. Estrutura química do ácido 5-aminosalicílico ($C_7H_7NO_3$).....3

CAPITULO 1

Figura 1. Determinação do comprimento de onda de máxima absorção do complexo formado 5-ASA – Fe^{3+} 16

Figura 2. Gráfico da interação entre concentração de 5-ASA e concentração de $FeCl_3$19

Figura 3. Gráfico da interação entre concentração de $FeCl_3$ e proporção 5-ASA: $FeCl_3$19

Figura 4. Gráfico de superfície de absorbância do complexo formado em função da interação entre concentração de 5-ASA e concentração de $FeCl_3$ 22

Figura 5. Gráfico de superfície de absorbância da concentração de $FeCl_3$ e a proporção de volume das soluções utilizadas22

Figura 6. Efeito do tempo na estabilidade do complexo 5-ASA – $FeCl_3$23

Figura 7. Curva analítica do 5-ASA.....24

Lista de Abreviaturas

- 5-ASA – Ácido 5-aminosalicílico
- AINES - Anti-inflamatórios não esteroidais
- ANOVA – Análise de variância
- ANVISA – Agencia Nacional de Vigilância Sanitária
- CLAE - Cromatografia liquida de alta eficiência
- CV – Coeficiente de variação
- DCC – Delineamento composto central
- DPR – Desvio padrão relativo
- ENE – Enema
- FeCl₃ – Cloreto de Ferro III
- GNR – Comprimido genérico
- HCL – Ácido clorídrico
- HPLC – High-performance liquid chromatography
- INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
- LD – Limite de detecção
- LQ – Limite de quantificação
- MPL – Cápsula manipulada
- NaOH – Hidróxido de sódio

1. Introdução

O ácido 5-aminosalicílico (5-ASA), também conhecido como mesalazina, é um fármaco muito utilizado no tratamento de inflamações do sistema digestório. Pode ser utilizado também no tratamento da colite ulcerativa e em casos de câncer. A colite ulcerativa tem sua predominância em adultos de 20 a 40 anos e pode ser chamada de proctite, colite esquerda, proctossigmoidite ou pancolite dependendo da localização das inflamações no intestino.

Essas inflamações do sistema digestório podem ser tratadas com dieta alimentar associada ao uso de medicamentos, dentre eles os corticoides e anti-inflamatórios não esteroidais (AINES), os quais objetivam controlar a sintomatologia e amenizar as manifestações clínicas. Dentre os AINES, os aminossalicilatos são amplamente utilizados devido aos seus efeitos terapêuticos e também pelos efeitos adversos mais brandos comparados aos corticosteroides. O ácido 5-aminosalicílico (5-ASA) ou mesalazina tem sido usado no tratamento das doenças inflamatórias intestinais, mesmo com seus efeitos anti-inflamatórios não bem esclarecidos.

O desenvolvimento de novas metodologias analíticas é essencial para criar alternativas aos métodos descritos nas farmacopeias, seja para identificação ou quantificação de fármacos. Existem poucas metodologias para a quantificação do 5-ASA em formulações farmacêuticas e, frente aos métodos mais adotados pelas farmacopeias, destacam-se os cromatográficos, como a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

Por conseguinte, justifica-se a pesquisa para o desenvolvimento e validação de metodologia espectrofotométrica a fim de apresentar à comunidade científica uma alternativa de doseamento do 5-ASA, com características de baixo custo e utilização de aparelhos acessíveis na maioria dos laboratórios existentes.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Desenvolver e validar uma metodologia analítica para determinação de ácido 5-aminosalicílico em produtos farmacêuticos, utilizando-se técnica espectrofotométrica e planejamento experimental a fim de que se otimizem os resultados.

2.2. Objetivos específicos

- Desenvolver uma metodologia analítica para determinação de ácido 5-aminosalicílico em alguns produtos farmacêuticos utilizando-se da técnica espectrofotométrica, a partir da reação de formação do complexo colorido com o íon metálico Fe (III).
- Utilizar o planejamento fatorial 2^3 , com os fatores: concentração de 5-ASA, concentração de solução $FeCl_3$ e proporção de volume entre esses, bem como a resposta Absorbância do complexo formado.
- Validar a metodologia desenvolvida a partir dos parâmetros de linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, precisão e exatidão.
- Analisar diferentes formas farmacêuticas contendo o fármaco 5-ASA, sendo elas, comprimidos referência e genérico, cápsula manipulada, enema e sachê.

3. Fundamentação teórica

3.1. Fármaco 5-ASA

O ácido 5-aminosalicílico (5-ASA), também conhecido como Mesalamina ou Mesalazina, é uma droga usada para tratar inflamações do trato digestivo (doença de Crohn) e para amenizar a colite ulcerativa. Como um derivado do ácido salicílico, o 5-ASA é também um antioxidante que sequestra radicais livres, os quais são produtos do metabolismo e potencialmente prejudiciais ao corpo (CAI et al., 2003; GOTTI et al., 2001; JOSHI et al., 2005). A estrutura química do ácido 5-aminosalicílico é representada na Figura 1.

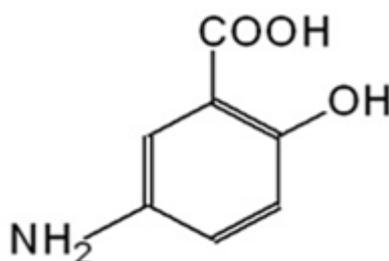


Figura 1 - Estrutura química do ácido 5-aminosalicílico (C₇H₇NO₃)

Este fármaco é instável em condições gástricas e propenso a ser absorvido no intestino superior, o que causa baixa biodisponibilidade do fármaco e baixa eficiência contra a doença inflamatória do cólon. Portanto, a entrega específica no cólon de 5-ASA é uma questão importante (CAI et al., 2003).

Os anti-inflamatórios não esteroidais, sobretudo o ácido 5-aminossalicílico (5-ASA) ou mesalazina, são usados para o tratamento da doença inflamatória intestinal por apresentarem, principalmente, efeitos adversos mais brandos quando comparados aos corticosteroides (GASCHE, 2011).

O uso da mesalazina (5-ASA) para o tratamento da doença inflamatória intestinal resulta das pesquisas sobre o mecanismo de ação da sulfassalazina. A sulfassalazina é clivada, por ação das bactérias da microbiota intestinal, e gera sulfapiridina e mesalazina. De acordo com os dados recentes, a atividade terapêutica é atribuída à mesalazina (único metabólito biologicamente ativo), todavia, a maior parte dos efeitos adversos, são causados pela sulfapiridina. Pacientes que não toleraram a terapia com sulfassalazina têm sido tratados com

êxito quando utilizam a mesalazina (KOELINK et al., 2010; LIM & HANAUER, 2010).

A Mesalazina, quando administrada por via oral, é rapidamente absorvida na porção inicial do intestino, onde há a maior parte de sua passagem para o ambiente sistêmico. Seu metabolismo é feito pelas N-acetil-transferases, presentes nas células epiteliais do intestino e nos hepatócitos e seu produto de metabolismo é chamado N-acetil-5-ASA. O tempo de meia vida pode variar de 1,4 até 6 horas, dependendo do sistema de liberação. A excreção pode ocorrer pela urina, tanto na forma metabolizada como na forma original, e, cerca de 50% são excretados pelas fezes de forma inalterada (QURESHI & COHEN, 2005).

A dosagem e a forma farmacêutica representam um papel central na eficácia de aminossalicilatos (ITO et al., 2010). O 5-ASA possui diversas concentrações comercializadas que variam de 400 mg a 2,5 g, dependendo da forma farmacêutica e do método de liberação, nos quais reflete-se também a segurança de uso e administração (SUTHERLAND et al., 2006).

Os níveis de 5-ASA foram tradicionalmente quantificados a partir de técnicas cromatográficas em formulações farmacêuticas e em matrizes biológicas, como sangue e secreções. Embora rotineiramente utilizadas, essas técnicas são relativamente caras e estão sujeitas a inconvenientes, uma vez que, muitas vezes, podem incluir extensa preparação de amostras intensivas em mão-de-obra e tempo de análise prolongado (NOBILIS et al., 2006, PALUMBO et al., 2005).

A determinação dos níveis de salicilatos pode ser feita por um método analítico de baixo custo, exatidão e precisão adequadas, chamado método de Trinder, no qual se utiliza da técnica de espectrofotometria na região do visível. A concentração do 5-aminosalicílico está diretamente relacionada à intensidade da coloração violeta do complexo formado entre o íon salicilato e o íon férrico oriundo do reagente cromogênico, o cloreto de ferro III (INMETRO, 2016).

A quantidade do complexo formado é diretamente proporcional à quantidade do analito presente na amostra. Esse complexo colorido é quantificado pela medida da absorbância da luz em 540 nanômetros, que atravessa a cubeta de vidro com a amostra adicionada de reagente, em comparação com uma solução-padrão do analito em concentração conhecida (MOREAURLM, 2012).

A literatura mostra poucos métodos de quantificação do 5-ASA em formas farmacêuticas. A Farmacopeia Americana (USP – *United States Pharmacopeia*, 24 ed.) adota o método de CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência), também denominado HPLC (*High-performance liquid chromatography*), que é baseado em uma fase móvel contendo hidrogenossulfato de tetrabutilamônio como um agente de emparelhamento de íons, e isso diminui a vida útil da coluna (USP, 2000).

Além disso, o método cromatográfico é considerado caro e a execução de análises por CLAE é pouco viável para alguns setores, como as farmácias magistrais. Na farmacopeia brasileira, não há procedimento para a determinação de 5-ASA em produtos farmacêuticos (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

Patel e colaboradores (2010) utilizaram três métodos (A, B e C) de espectrofotometria visível para medida quantitativa da mesalazina em formas farmacêuticas. Os métodos foram baseados na formação de cromogênios coloridos, medidos em 552 nm, 440 nm, e 494 nm, respectivamente.

O reagente de Bratton-Marshall (N-(1-naftil) etilenodiamina) foi empregado no método A; o reagente de Kovacs (paradimetilaminobenzaldeído) foi empregado no método B, e o reagente de Gibbs (2,6-dicloroquinonacloroimida) foi empregado no método C. Os métodos propostos foram validados e considerados como simples, sensíveis, seletivos, exatos, precisos, econômicos e podem ser usados para a determinação de mesalazina em formas farmacêuticas.

O método de voltametria de onda quadrada com eletrodo de grafite de lápis foi aplicado em outro estudo. Depois da otimização das condições experimentais, as curvas de calibração foram obtidas na concentração linear que variou de $9,78 \times 10^{-7}$ a $7,25 \times 10^{-5}$ mol/L, cujo resultado atingiu um limite de detecção de $2,12 \pm 0,05 \times 10^{-8}$ mol/L. Testes estatísticos mostraram que as concentrações de 5-ASA em comprimidos comerciais e enemas obtidos com o método voltamétrico proposto estavam em concordância com os valores obtidos via HPLC em nível de confiança de 95% (ULIANA et al., 2010).

Rafael e colaboradores (2007) compararam e validaram três métodos analíticos para controle de qualidade de comprimidos comerciais contendo 5-ASA: HPLC, DPPH (radicais 1,1-difenil-2-picrilhidrazil) e nitroação. Os parâmetros linearidade, precisão e exatidão foram estudados. O método HPLC com detecção ultravioleta em 254 nm foi realizado utilizando coluna C18 e a

elução em fase móvel, constituída de tampão fosfato monobásico 30 mmol/L (pH 7,0) e metanol (70:30; v/v), com 25% de sulfato hidrogênio de tetrabutylamônio.

Para o método de DPPH, foram utilizados tampão acetato 100 mmol/L, pH 5,5, álcool etílico e 250 µmol/L solução etanólica de DPPH a 517 nm. E, para o método de nitrosação, foram utilizados um eletrodo de platina e um padrão de nitrito de sódio 0,1 mol/L como solução titulante. A Repetibilidade e a precisão intermediária foram menores que 3%. Os métodos propostos pelos autores podem ser usados para análise quantitativa do 5-ASA em formas farmacêuticas.

3.2. Validação analítica

A validação de métodos analíticos é um processo no qual utilizam-se estudos estatísticos para garantir que o método atenda às exigências desejadas e documente as evidências quanto à eficiência para que aquele realize o que lhe foi indicado (RUELA et al., 2009). No Brasil, existem dois órgãos que credenciam e fiscalizam os procedimentos farmacêuticos: a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e o Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO).

Os parâmetros para a validação do ensaio analítico devem ser definidos para o desenvolvimento da validação do método. Dentre os parâmetros mais importantes, destacam-se a linearidade, a especificidade, a precisão, o limite de detecção, o limite de quantificação e a exatidão (ANVISA; Resolução nº 166, 2017).

A linearidade consiste na capacidade de fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância examinada dentro dos limites de variação desejados, os quais determinam a faixa de aplicação, também chamado de intervalo de atuação (ANVISA; Resolução nº 166, 2017).

A especificidade consiste na capacidade que um método tem de avaliar de forma inequívoca determinada substância em uma mistura complexa. A especificidade de um método é expressa pela concordância entre resultados obtidos para a solução padrão e amostra (ANVISA; Resolução nº 166, 2017).

A precisão corresponde ao grau de repetibilidade e reprodutividade entre valores obtidos em análises individuais. A precisão está associada à

repetitividade, ou seja, a máxima diferença aceitável em medições individuais com o mesmo conjunto (mesma amostra, mesmo analista, mesmo equipamento). Já a precisão intermediária expressa valores que envolvem diferentes dias, analistas, equipamentos, etc. (GIL, 2010).

O parâmetro sensibilidade é a capacidade de o método analítico distinguir, com determinado nível de confiança, duas concentrações próximas. Existem dois tipos de validação associados à sensibilidade: limite de detecção (LD) e de quantificação (LQ). O primeiro consiste na detecção da mais baixa concentração. Já o segundo, aplica-se a ensaios de doseamento e é a menor concentração que pode ser determinada quantitativamente pelo método (GIL, 2010). O parâmetro exatidão diz respeito ao grau de concordância entre os resultados encontrados pelo método e um valor aceito como referência (valor esperado).

3.3. Planejamento experimental

O uso de ferramentas estatísticas, tais como o planejamento fatorial e a superfície de resposta, explora as condições experimentais do sistema com o mínimo de experimentos possíveis, portanto, revelam-se as contribuições das variáveis da técnica na resposta analítica de forma mútua (BARROS et al., 2010).

O planejamento fatorial é uma estratégia analítica útil e sua principal aplicação consiste na triagem dos fatores mais relevantes de determinado sistema analítico. Após este processo de triagem das variáveis mais significativas, são executados experimentos que permitem refinamento e melhor conhecimento do sistema em estudo (MONTGOMERY, 1991).

As variáveis selecionadas são otimizadas por softwares estatísticos que gerarão modelos matemáticos. Por fim, é estabelecida uma equação matemática que relaciona as variáveis a serem otimizadas com a resposta analítica (superfície de resposta). Nessa equação, são aplicados artifícios matemáticos com os quais se estabelecem uma combinação numérica otimizada para as variáveis do sistema (BARROS et al., 2010).

Na proposição de um planejamento experimental, é fundamental que o mesmo seja capaz de fornecer exatamente o tipo de informação que o analista deseja. Assim, a atividade mais importante não está na análise de dados, e sim no planejamento dos experimentos em que estes dados devem ser obtidos (BARROS et al., 2010; SILVA et al., 2008).

O planejamento fatorial em dois níveis consiste na realização de um planejamento 2^k onde k corresponde ao número de fatores. Além disso, recomenda-se a realização de um delineamento composto central (DCC) com leitura em triplicata do ponto central, a fim de que se produzam dados informativos em toda a região de interesse. Ademais, recomenda-se que os experimentos sejam efetuados de forma aleatória para que se evitem erros sistemáticos (VIEIRA, S. E HOFFMANN, R., 1989).

4. Capítulo 1 - Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para a determinação do fármaco ácido 5-aminosalicílico utilizando planejamento experimental

A C CORRÊA¹ & H L VASCONCELOS¹

¹Centro de Ciências Médicas e Farmacêuticas - Universidade Estadual do Oeste do Paraná,
Brasil

Resumo

O ácido 5-aminossalicílico (5-ASA), utilizado no tratamento das inflamações do tubo digestivo, foi quantificado em cinco formas farmacêuticas pelo método espectrofotométrico baseado na reação de formação de um complexo colorido entre 5-ASA e íons Fe^{3+} . O delineamento experimental (DOE) e a metodologia de superfície de resposta (RSM) foram realizados com o objetivo de reduzir o número de experimentos e obter as melhores condições para os procedimentos de medidas de absorvância do complexo. Foram estudados três fatores em dois níveis: concentração de 5-ASA (150 mg/L; 275 mg/L e 400 mg/L), concentração de FeCl_3 (100 mg/L; 200 mg/L e 300 mg/L) e proporção de volume (1:2; 1:1 e 2:1) entre as quantidades de 5-ASA e FeCl_3 . As condições ótimas obtidas para a absorvância do complexo 5-ASA - Fe^{3+} foram com maiores concentrações de 5-ASA (400 mg/L) e de FeCl_3 (300 mg/L) e menor proporção de volume (1:2). Por fim, o método desenvolvido apresentou valores satisfatórios de linearidade, precisão e exatidão. As diferentes formulações de drogas contendo 5-ASA apresentaram valores concordantes com os das especificações contidas na embalagem. A metodologia espectrofotométrica aplicada foi de baixo custo, simples e rápida para a determinação de 5-ASA em formulações farmacêuticas.

Palavras-chave: 5-ASA; Espectrofotometria; Planejamento fatorial; Validação.

Correspondente: Professor H L Vasconcelos, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Centro de Ciências Médicas e Farmacêuticas, R. Universitária, 2069 - Universitário, Cascavel - PR, 85819-110. E-mail: helder.vasconcelos@unioeste.br

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF ANALYTICAL METHODOLOGY FOR ACID 5-AMINOSALICYLIC DETERMINATION BY EXPERIMENTAL DESIGN

Abstract

The 5-Aminosalicylic acid (5-ASA) used to treat inflammations of the digestive tract was quantified in five pharmaceutical forms by spectrophotometric method based on the reaction of formation of a colored complex between 5-ASA and Fe^{3+} ions. Experimental design (DOE) and response surface methodology (RSM) were carried out in order to reduce the number of experiments and achieve the best conditions for complex absorbance procedure. Three factors at two levels were studied: 5-ASA concentration (150 mg/L; 275 mg/L and 400 mg/L), FeCl_3 concentration (100 mg/L; 200 mg/L and 300 mg/L) and volume ratio (1:2; 1:1 and 2:1) between the amounts of 5-ASA and FeCl_3 . The best conditions for absorbance of 5-ASA - Fe^{3+} complex were higher concentrations of 5-ASA (400 mg/L) and FeCl_3 (300 mg/L) and lower volume ratio (1:2). The developed method presented satisfactory values for linearity, precision and accuracy. The different drug formulations containing 5-ASA presented values that were in agreement with those of the specifications contained in the package. This spectrophotometric methodology proved to be low-cost, simple and fast for the determination of 5-ASA in pharmaceutical formulations.

Keywords: 5-ASA; spectrophotometry; factorial design; validation.

Correspondence: Professor H L Vasconcelos, Western Paraná state University, Center of Medical and Pharmaceutical Sciences. 2069, Universitária street, Cascavel- PR, 85819-110.

E-mail: helder.vasconcelos@unioeste.br

Introdução

O ácido 5-aminosalicílico (5-ASA), também conhecido como Mesalazina, é um fármaco muito utilizado no tratamento de inflamações do sistema digestório. Pode também ser utilizado no tratamento da colite ulcerativa e em casos de câncer [1-3].

Esse fármaco pertence à classe dos anti-inflamatórios não esteroidais, os quais são amplamente usados no tratamento da doença inflamatória intestinal por apresentarem, principalmente, efeitos adversos mais brandos quando comparados aos corticosteroides [4].

Os níveis de 5-ASA são tradicionalmente quantificados baseados em técnicas cromatográficas e formulações farmacêuticas, como comprimidos e enemas, e em matrizes biológicas, tais como sangue e secreções [5,6].

O método de CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência), também denominado HPLC (High-Performance Liquid Chromatography), é adotado na Farmacopeia Americana, posto que é baseado na fase móvel que contém hidrogenossulfato de tetrabutilamônio como um agente de emparelhamento de íons, todavia, há uma redução no tempo de vida útil da coluna [7].

Além disso, o método cromatográfico é considerado caro e a execução de análises por CLAE é pouco viável para alguns setores. A literatura mostra poucos métodos de quantificação do 5-ASA em formas farmacêuticas. Por exemplo, a farmacopeia brasileira não descreve qualquer procedimento para determinar o 5-ASA em produtos farmacêuticos [8].

Porém, a determinação dos níveis de salicilatos pode ser feita por um método analítico de baixo custo, boa exatidão e precisão, conhecido como método de Trinder, de acordo com a técnica de espectrofotometria. A técnica consiste na formação do complexo colorido entre os íons salicilato e férrico. A concentração do salicilato estudado está diretamente relacionada à intensidade da coloração violeta do complexo formado [9].

Dessa forma, o desenvolvimento e a validação de um método analítico estão diretamente ligados à escolha do modelo estatístico que responda às exigências desejadas, a fim de que sejam documentadas as evidências de que o método realiza aquilo que lhe é demandado [10]. Conseqüentemente, alguns parâmetros analíticos devem ser definidos tanto para o desenvolvimento como para a validação de um método, em que se destacam a especificidade, a

exatidão, a precisão, a linearidade, o limite de detecção e o limite de quantificação [11].

Características como otimização do método, diminuição nos custos, menor geração de resíduos e menor tempo de execução são cada vez mais importantes no âmbito da pesquisa e do desenvolvimento de metodologias analíticas [12]. Com isso, o uso de ferramentas estatísticas tais como o planejamento experimental torna-se interessante, visto que tal planejamento explora as condições experimentais do sistema com o mínimo de experimentos possíveis, promove a otimização da metodologia e aumenta sua sensibilidade [13].

O planejamento experimental é uma estratégia analítica útil e sua principal aplicação consiste na triagem dos fatores mais relevantes de determinado sistema analítico. Após o processo de triagem das variáveis mais significativas, são executados experimentos que permitem refinamento e melhor conhecimento do sistema em estudo [14].

As variáveis selecionadas são otimizadas por softwares estatísticos que gerarão modelos matemáticos. E finalmente, é estabelecida uma equação matemática que relaciona as variáveis a serem otimizadas com a resposta analítica (superfície de resposta) [13].

Portanto, este trabalho objetivou desenvolver e validar uma metodologia analítica para determinação do 5-ASA em produtos farmacêuticos, a partir da técnica espectrofotométrica baseada na reação de formação do complexo colorido com o íon metálico Fe (III).

Foram utilizados o planejamento experimental e a metodologia de superfície de resposta para estudar os efeitos das concentrações de 5-ASA e de FeCl₃ e também da proporção em volume entre esses sobre a absorvância do complexo formado entre 5-ASA e íons Fe³⁺.

Metodologia

O 5-ASA foi preparado utilizando-se um padrão secundário procedente da empresa Purifarma – Gemini Indústria de Insumos Farmacêuticos Ltda, fornecido por uma farmácia de manipulação de Cascavel/PR, cujo laudo técnico atestava teor de pureza de 100,14%.

Todas as análises espectrofotométricas aqui descritas foram realizadas por espectrofotômetro Biospectro SP-220. Em todas as medidas utilizou-se uma cubeta de vidro de 1,0 cm de caminho óptico.

Planejamento experimental

O planejamento experimental explora as condições do sistema com o mínimo de experimentos possíveis, promove a otimização da metodologia e aumenta sua sensibilidade. É uma estratégia analítica útil para que se realize a triagem das variáveis mais relevantes do sistema analítico.

Dessa forma, foi realizado um planejamento experimental em dois níveis, sendo um planejamento 2^k , onde k é o número de fatores, com três repetições no ponto central. Os três fatores utilizados foram: concentração de 5-ASA, concentração de FeCl_3 e proporção de volume entre as quantidades de 5-ASA e Fe^{3+} , cuja variável-resposta foi a absorbância. Os experimentos foram efetuados de forma aleatória, definidos por sorteio, a fim de que se evitassem erros sistemáticos.

Na Tabela 1 estão apresentados os valores reais e os codificados para as variáveis concentração de 5-ASA, concentração de FeCl_3 e proporção de volume entre as quantidades de 5-ASA e Fe^{3+} utilizados no planejamento experimental fatorial 2^3 .

Tabela 1. Valores reais e os codificados das variáveis utilizadas no planejamento fatorial 2^3 .

Variáveis	Níveis		
	-1	0	1
Concentração de 5-ASA (mg/L)	150	275	400
Concentração de FeCl_3 (mg/L)	100	200	300
Proporção de volume 5-ASA: FeCl_3	1:2	1:1	2:1

O planejamento fatorial 2^3 foi composto por onze (11) experimentos que incluíram triplicatas no ponto central. Foram calculados os efeitos principais, as interações das variáveis, seus respectivos coeficientes para o modelo matemático, bem como a análise de variância (ANOVA) para determinar a validade do modelo. Os efeitos das variáveis foram descritos com a diferença entre a resposta média no nível superior e a resposta média no nível inferior

A análise dos dados foi avaliada utilizando-se os softwares MINITAB 17.0 e STATISTICA 8.0 e a qualidade do ajuste da equação polinomial foi avaliada pela determinação do coeficiente de determinação R^2 . Os valores ótimos obtidos das variáveis selecionadas foram analisados pela metodologia da superfície de resposta. Neste contexto, o teste F foi empregado como critério de validação da significância estatística dos modelos obtidos ao nível de confiança de 95%. Como resposta, foi avaliada a absorvância do complexo formado e proveniente da reação entre 5-ASA e íons Fe^{3+} .

Preparo de soluções

Foram preparadas soluções de cloreto de ferro III ($FeCl_3$), 5-ASA e ácido clorídrico (HCl). Enquanto o $FeCl_3$ foi preparado na concentração de 2000 mg/L, utilizando-se água destilada como solvente. O 5-ASA foi preparado na mesma concentração, utilizando-se ácido clorídrico 0,05 mol/L para auxiliar na sua solubilização. O HCl foi preparado na concentração de 0,05 mol/L utilizando-se água destilada como solvente.

As concentrações de 5-ASA e Cloreto de ferro III, além da proporção de volume descrito a seguir, apresentaram valores ótimos obtidos a partir do planejamento experimental realizado na etapa anterior.

Determinação do comprimento de onda de máxima absorção do complexo 5-ASA- Fe^{3+}

A reação de formação do complexo foi realizada utilizando-se as seguintes concentrações: Cloreto de ferro III (300 mg/L) e 5-ASA (400 mg/L). A amostra foi preparada na proporção de volume 1:2, da seguinte forma: foram pipetados 1,0 mL de 5-ASA 400 mg/L e 2,0 mL de Cloreto de Ferro III 300 mg/L, os quais foram transferidos para cubeta de vidro e, após homogeneização, realizou-se a leitura espectrofotométrica.

Procedeu-se a leitura fazendo-se uma varredura na faixa de 400 nm até 800 nm com intervalos de 10 nm. Foi também realizada a leitura da solução contendo apenas FeCl_3 (300 mg/L) e H_2O (denominada branco) para comprovar se o aumento da absorvância era devido à formação do complexo ou se apresentava interferência deste reagente.

Efeito do tempo de reação na estabilidade do complexo

O objetivo desde teste foi avaliar a estabilidade do complexo formado 5-ASA- Fe^{3+} durante certo período de tempo, através da medição de valores da absorvância do mesmo. Este teste foi realizado utilizando FeCl_3 (300 mg/L) e 5-ASA (400 mg/L). A amostra foi preparada na proporção 1:2, da seguinte forma: foram pipetados 1,0 mL de 5-ASA 400 mg/L e 2,0 mL de Cloreto de ferro III 300 mg/L, os quais foram transferidos para cubeta de vidro e, após homogeneização, realizou-se a leitura no espectrofotômetro no comprimento de onda de 520nm.

O teste foi feito nos tempos de 0 a 5 minutos com intervalos de 30 segundos entre cada leitura e após os primeiros cinco (5) minutos, nos tempos de 6, 8, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos, totalizando-se 18 leituras.

Construção da curva analítica

A curva analítica foi obtida a partir do preparo das soluções de 5-ASA em concentrações variáveis e misturadas com solução de FeCl_3 de concentração fixa. Em seguida, as soluções foram transferidas para a cubeta de vidro e após homogeneização, medidas as absorvâncias no comprimento ótimo de onda.

Análise espectrofotométrica dos medicamentos

Cinco diferentes formulações de medicamentos contendo 5-ASA foram analisadas de acordo com a metodologia espectrofotométrica desenvolvida, sendo elas: comprimido referência (Mesacol[®]), comprimido genérico (Gnr), cápsula manipulada (Mpl), sachê (Sch) e enema (Ene). Foram preparadas soluções de cada medicamento na concentração ótima obtida pelo planejamento experimental. Em seguida, as soluções foram transferidas para a cubeta de vidro com a proporção de volume otimizada de 5-ASA e FeCl_3 e, após homogeneização, foram medidas suas absorvâncias no comprimento ótimo de onda.

Análise volumétrica dos medicamentos

As análises nas mesmas cinco formulações de medicamentos contendo 5-ASA A foram realizadas a fim de se comparar a metodologia desenvolvida. Foram também preparadas as soluções de cada medicamento na concentração ótima obtida pelo planejamento experimental. Em seguida, realizada análise volumétrica descrita na farmacopeia britânica, cuja titulação foi feita com hidróxido de sódio 0,1 mol/L.

Resultados

Comprimento de onda de máxima absorção do complexo 5-ASA-Fe³⁺

Na Figura 1, pode-se observar que o comprimento de onda máximo foi de 520 nm, o qual foi escolhido para realização das leituras subsequentes. O FeCl₃ sozinho apresentou absorvância de 0,196 no comprimento de onda de máxima absorção do complexo, comprovando que é seletivo para a reação em questão.

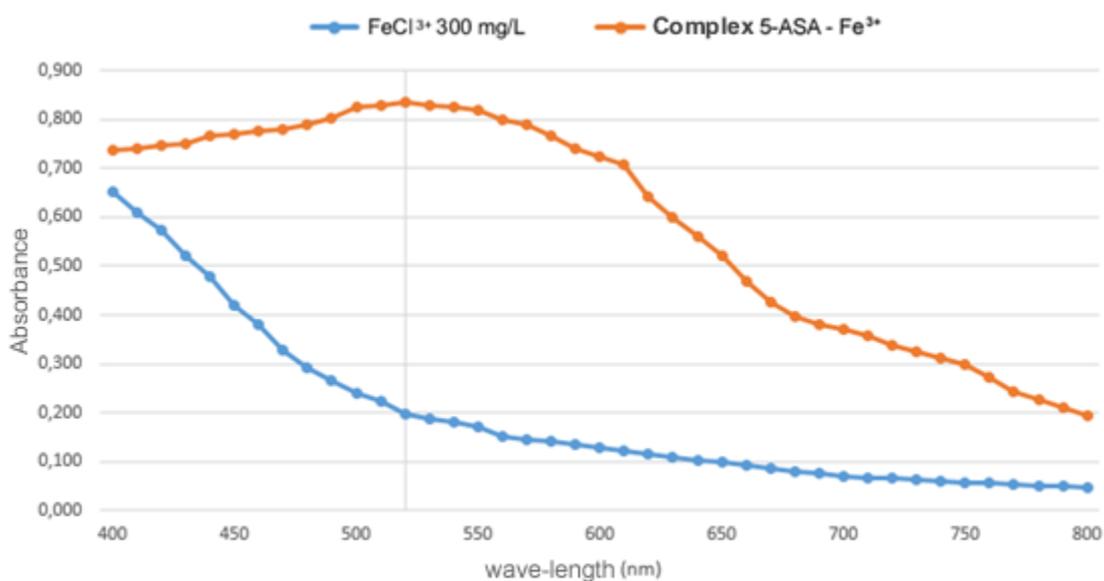


Figura 1. Determinação do comprimento de onda de máxima absorção do complexo formado 5-ASA – Fe³⁺.

Planejamento experimental

Na Tabela 2, observa-se a matriz do planejamento fatorial codificada e com os valores das concentrações das 3 (três) variáveis estudadas bem como os valores das absorvâncias obtidas na leitura espectrofotométrica do complexo

5-ASA e FeCl₃. As concentrações de 5-ASA utilizadas foram de: 150, 275 e 400 mg/L. Já para a solução de FeCl₃, as concentrações foram de: 100, 200 e 300 mg/L.

Tabela 2. Valores codificados e reais da matriz do planejamento fatorial 2³ e dados experimentais das três variáveis estudadas.

Ensaio	Ordem aleatória	Concentração de 5-ASA*	Concentração de FeCl ₃ *	Proporção de volume	Absorbância
		X ₁	X ₂	X ₃	Y
1	5	-1 (150)	-1 (100)	-1 (1:2)	0,143
2	1	1 (400)	-1 (100)	-1 (1:2)	0,158
3	8	-1 (150)	1 (300)	-1 (1:2)	0,732
4	4	1 (400)	1 (300)	-1 (1:2)	0,892
5	11	-1 (150)	-1 (100)	1 (2:1)	0,082
6	2	1 (400)	-1 (100)	1 (2:1)	0,117
7	3	-1 (150)	1 (300)	1 (2:1)	0,452
8	10	1 (400)	1 (300)	1 (2:1)	0,533
9	6	0 (275)	0 (200)	0 (1:1)	0,373
10	9	0 (275)	0 (200)	0 (1:1)	0,361
11	7	0 (275)	0 (200)	0 (1:1)	0,380

*Concentração em mg/L

A equação do modelo matemático para prever as variáveis respostas, ao nível de 95% de confiança, foi obtida a partir da equação geral do modelo linear:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{23} X_2 X_3 \quad (1)$$

Onde, Y representa a resposta prevista; β_0 é a intercepção; β_1 , β_2 e β_3 são os coeficientes lineares; β_{12} , β_{13} e β_{23} são os coeficientes da interação.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) usando o software estatístico Statistica 7.0. A precisão e a capacidade geral do modelo acima foram avaliadas utilizando-se a determinação do coeficiente de determinação (R²).

Tabela de efeitos

A Tabela de Efeitos mostra as variáveis que são significativas, sejam elas positivamente ou negativamente, na absorbância obtida. Dessa forma, pode-se

observar na Tabela 3 que a variável 1 (concentração 5-ASA) é significativa e influencia positivamente no aumento da absorvância. Da mesma forma, a variável 2 (concentração FeCl_3) também é significativa e exerce efeito positivo, além de acarretar em aumento da absorvância. Já a variável 3 (proporção de volume 5-ASA: FeCl_3) apresenta efeito significativo, porém de forma negativa, logo, acarreta em diminuição na absorvância.

Tabela 3. Tabela de efeitos do planejamento fatorial 2^3 .

	Efeito	Erro padrão	t(4)	p
Média	0,3837	0,0068	56,3078	0,0000*
(1) Concentração de 5-ASA	0,0728	0,0160	4,5520	0,0104*
(2) Concentração de FeCl_3	0,5273	0,0160	32,9899	0,0000*
(3) Proporção de volume	-0,1853	0,0160	-11,5911	0,0003*
5-ASA x FeCl_3	0,0478	0,0160	2,9877	0,0404*
5-ASA x Proporção de volume	-0,0148	0,0160	-0,9229	0,4082
FeCl_3 x Proporção de volume	-0,1348	0,0160	-8,4313	0,0010*

*Estatisticamente significativo a 95% de confiança.

A interação FeCl_3 x Proporção de volume (2x3) mostrou-se significativa, pois quando se altera a proporção da concentração de FeCl_3 acarreta em alteração negativa na resposta, ou seja, há diminuição na absorvância. Em contrapartida, a interação 5-ASA x Proporção de volume (1x3) não foi significativa, pois ao se alterar a proporção de 5-ASA, a resposta fica estatisticamente inalterada. Finalmente, a interação 5-ASA x FeCl_3 (1x2) é significativa, pois quando ocorre a alteração da concentração de 5-ASA há também alteração positiva na resposta, e conseqüentemente aumento no resultado da absorvância.

Os gráficos de interação foram gerados utilizando-se o software Minitab 17.0 para as interações significativas, a fim de se ilustrar a variação dos valores de absorvância frente à alteração dos níveis do planejamento. Na Figura 2 a seguir, observa-se a interação entre concentração de 5-ASA e concentração de FeCl_3 (interação 1x2).

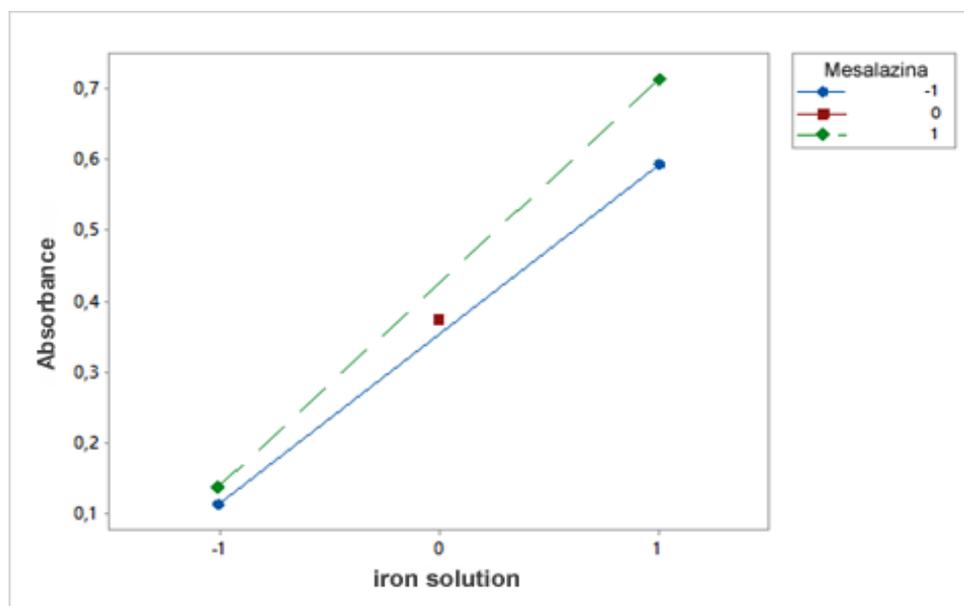


Figura 2. Gráfico da interação entre concentração de 5-ASA e concentração de FeCl_3 .

Observa-se a alteração dos valores de absorvância quando ocorre a alteração dos níveis (-1 a 1), portanto, pode-se afirmar que tal interação é significativa. No nível -1, o valor da absorvância está baixo e os pontos estão próximos entre si. Todavia, ocorre aumento na variável-resposta (absorvância) com a alteração dos níveis (-1 a 1) e aumenta a distância entre os pontos, com destaque para a significância desta interação.

A Figura 3 abaixo mostra a interação entre concentração de FeCl_3 e proporção de volume 5-ASA: FeCl_3 .

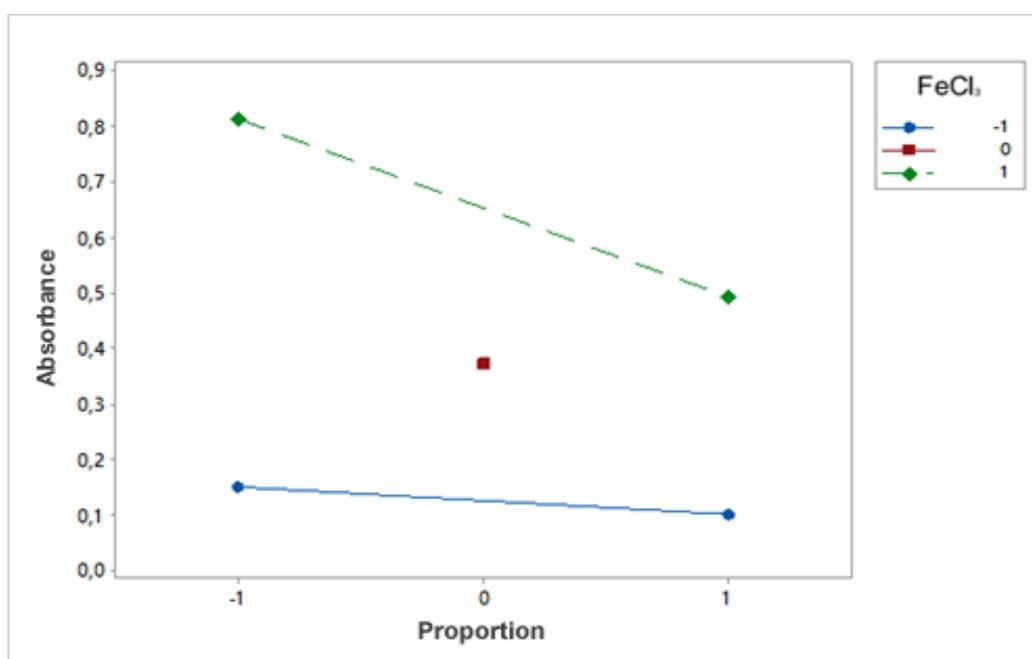


Figura 3. Gráfico da interação entre concentração de FeCl_3 e proporção de volume 5-ASA: FeCl_3 .

Quando ocorre a alteração dos níveis (-1 a 1), observa-se a alteração dos valores de absorvância, ou seja, observa-se que tal interação é significativa. No nível -1, o valor da absorvância está elevado e os pontos estão distantes. Porém, ocorre diminuição na variável-resposta (absorvância) com a alteração dos níveis (-1 a 1) e diminui-se a distância entre os pontos, com destaque para a significância desta interação.

A Tabela 4 mostra os coeficientes de regressão do planejamento experimental 2^3 .

Tabela 4. Coeficiente de regressão do planejamento fatorial 2^3 .

	Coeficiente Regressão	Erro padrão	t(4)	p
Média	0,3837	0,0068	56,3078	0,0000*
(1) Concentração de 5-ASA	0,0364	0,0080	4,5520	0,0104*
(2) Concentração de FeCl ₃	0,2636	0,0080	32,9899	0,0000*
(3) Proporção de volume	-0,0926	0,0080	-11,5911	0,0003*
5-ASA x FeCl ₃	0,0239	0,0080	2,9877	0,0404*
5-ASA x Proporção de volume	-0,0074	0,0080	-0,9229	0,4083
FeCl ₃ x Proporção de volume	-0,0674	0,0080	-8,4313	0,0011*

*Estatisticamente significativo a 95% de confiança.

A Equação 2 mostra o modelo linear obtido para predizer a absorvância em função da concentração de 5-ASA, concentração de FeCl₃ e proporção de volume entre 5-ASA:FeCl₃.

$$Y = 0,384 + 0,036X_1 + 0,264X_2 - 0,093X_3 + 0,024X_1X_2 - 0,067X_2X_3. \quad (2)$$

Onde Y é a absorvância;

X₁ concentração de 5-ASA (mg/L);

X₂ concentração de FeCl₃(mg/L) e

X₃ proporção de volume 5-ASA:FeCl₃ (mg/L).

Tabela ANOVA

A Tabela 5 mostra a análise de variância (ANOVA) do planejamento experimental.

Tabela 5. Tabela ANOVA para o planejamento fatorial 2³.

	Soma dos Quadrados	Grau de Liberdade	Quadrado Médio	F calculado	F tabelado	P
Regressão	0,6761	5	0,1352	272,77	5,05	<0,01
Resíduo	0,0025	5	0,0005			
Falta de ajuste	0,0023	3	0,0008	8,28	19,16	0,11
Erro puro	0,0002	2	9,2333			
Total	0,6810	10				

R²= 0,9970

Vale ressaltar que, baseado no teste F, o valor F calculado (272,77) é 54 vezes maior do que o F tabelado (5,05) com $p < 0,01$. Este resultado implica representação satisfatória pelo modelo linear. A falta de ajuste não foi significativa porque o F calculado (8,28) foi menor do que o F tabelado (19,16), ou seja, os dados experimentais estão compreendidos no modelo obtido. O coeficiente de determinação R² (0,9970) sugere que o modelo ajustado consegue explicar 99,70% da variabilidade dos dados experimentais, o qual confirma a qualidade do ajuste.

Gráficos de Superfícies de Respostas

Pode-se observar a superfície de resposta na Figura 4, frente às variáveis, concentração da solução de FeCl₃ em relação à concentração da solução de 5-ASA. Destaca-se o pico mais elevado em vermelho, onde indica o ponto máximo de absorvância obtida para o complexo em função da concentração de ambas soluções. Há, portanto, indícios de melhor otimização quando foram utilizadas a máxima concentração da solução de ferro (300 mg/L) e a máxima concentração da solução de 5-ASA (400 mg/L). A concentração de 5-ASA mostrou que interfere pouco na absorvância do complexo formado.

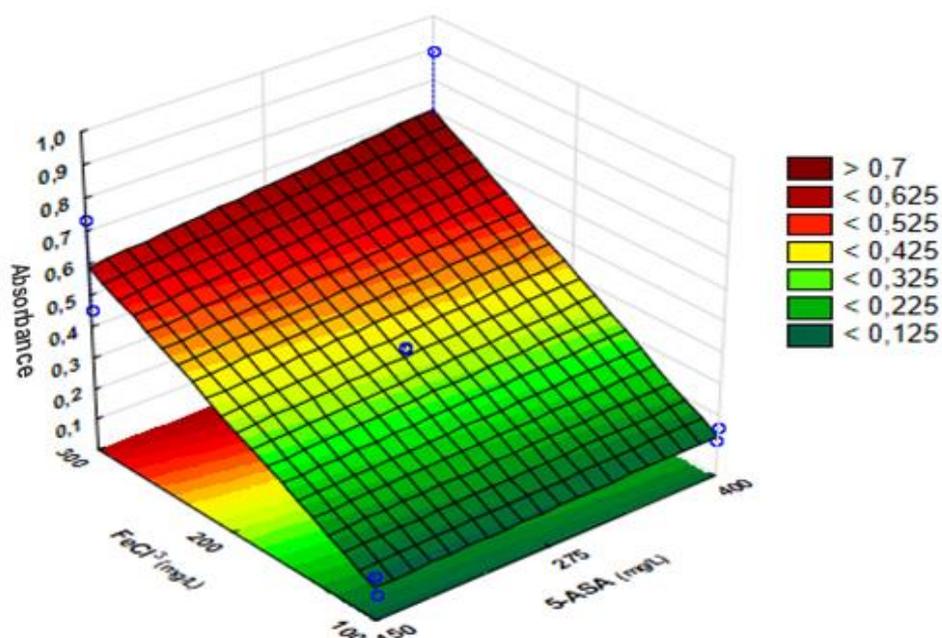


Figura 4. Gráfico de superfície de absorvância do complexo formado em função da interação entre concentração de 5-ASA e concentração de FeCl₃

Observa-se a superfície de resposta, frente às variáveis, concentração da solução de FeCl₃ em relação à sua proporção utilizada (Figura 5). Isso indica o ponto máximo de concentração, quando se utiliza maior concentração da solução de FeCl₃ (300 mg/L), e maior proporção de volume (1:2) de 5-ASA:FeCl₃ para leitura.

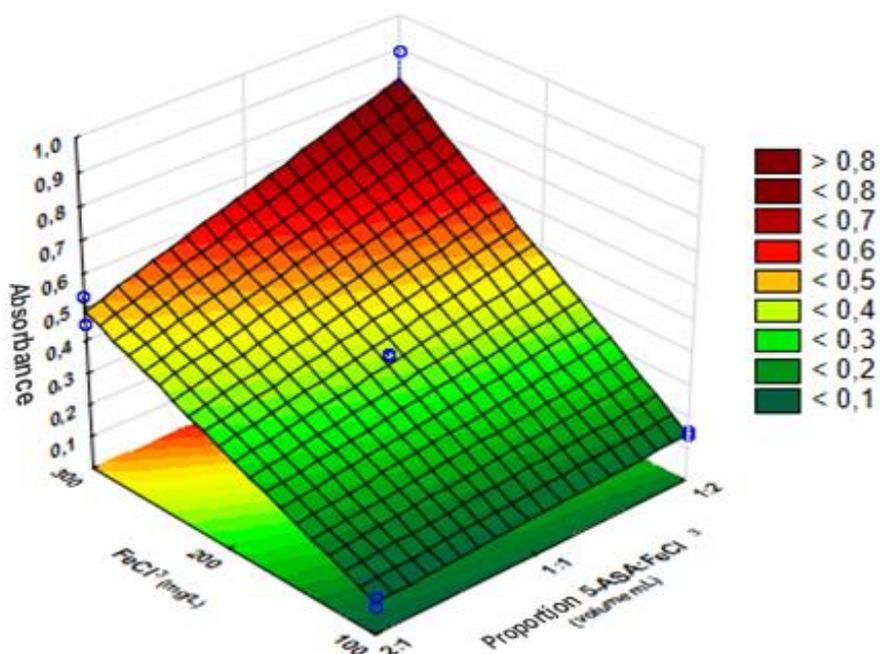


Figura 5. Gráfico de superfície de absorvância da concentração de FeCl₃ e a proporção de volume das soluções utilizadas.

Logo, pode-se concluir que as concentrações ideais para otimização do método são aquelas em que se utilizam as concentrações máximas das soluções de ferro e 5-ASA e a menor proporção de volume 5-ASA:FeCl₃, em que se utilizará 1 mL da solução de 5-ASA com 2 mL da solução de ferro. Dessa forma, serão utilizadas as concentrações de 300 mg/L da solução de ferro em conjunto com 400 mg/L da solução de 5-ASA na proporção 1:2 de 5-ASA e FeCl₃.

Efeito do tempo de reação na estabilidade do complexo

Na Figura 6, a seguir, pode-se perceber que a maior variação nos valores de absorbância do complexo formado ocorre até 10 minutos. Entretanto, tal variação não é importante, visto que a diferença de absorbância registrada foi de apenas 0,051. Depois dos 10 minutos iniciais, a absorbância permaneceu praticamente inalterada até o final dos 30 minutos. Desta forma, nota-se que o complexo é estável e assim se manterá durante todo o tempo necessário para realização de um teste em uma amostra comercial. E vale ressaltar que esta resposta é relevante para este trabalho.

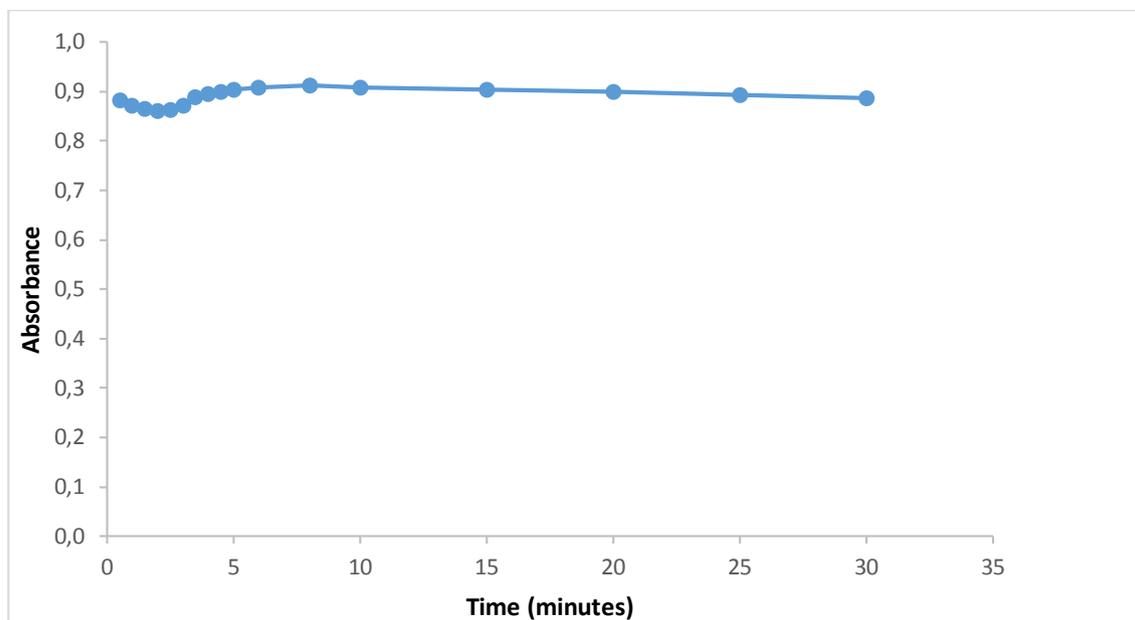


Figura 6. Efeito do tempo na estabilidade do complexo 5-ASA – FeCl₃.

Curva analítica para o Ácido 5-aminosalicílico

A faixa linear está entre os parâmetros normalmente encontrados para a validação de um método analítico. A linearidade corresponde à capacidade do

método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância analisada, dentro de uma faixa de aplicação, posto que a construção de uma curva analítica é a forma de se verificar tal linearidade.

Neste trabalho, foram utilizados cinco pontos com diferentes concentrações de 5-ASA, as quais foram: 150 mg/L, 225 mg/L, 300 mg/L, 375 mg/L e 450 mg/L. A concentração da solução de ferro foi de 300 mg/L. E, para a preparação do complexo, foram transferidas alíquotas de 1 mL de cada concentração de 5-ASA e 2 mL de solução de ferro para a cubeta de vidro e realizada leitura em 520 nm no espectrofotômetro

A faixa linear observada entre as concentrações de 150 a 450 mg/L, apresentou a seguinte equação de regressão linear $y = 0,0008x + 0,5766$, cujo valor para o coeficiente de correlação linear (r) foi igual a 0,9954, valor ideal para a linearidade.

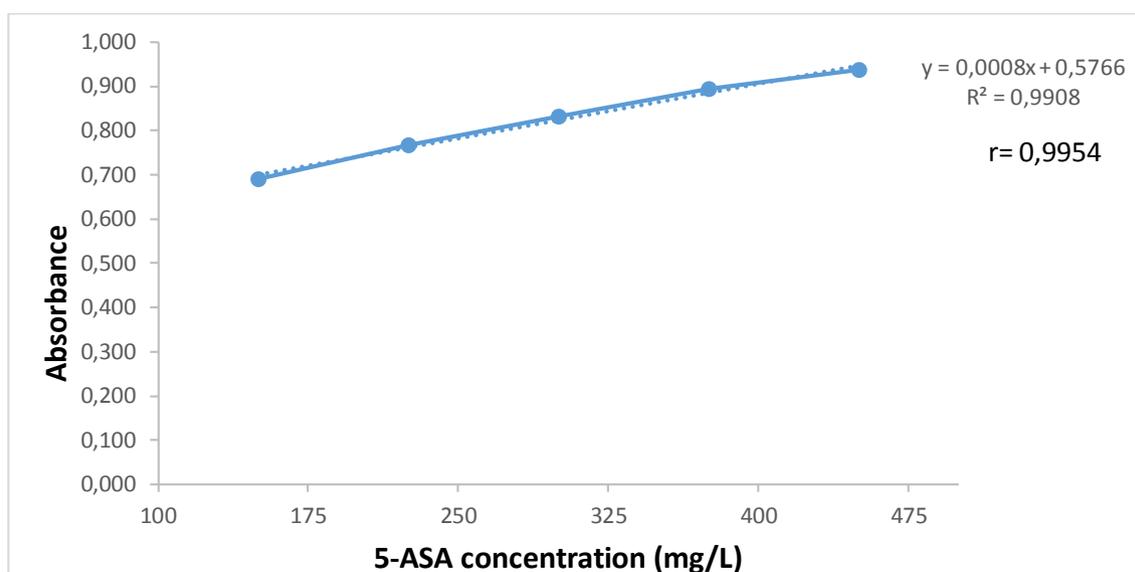


Figura 7. Curva analítica do 5-ASA.

Análise dos parâmetros de validação do método

Especificidade

A especificidade consiste na capacidade que um método tem para avaliar de forma inequívoca determinada substância em uma mistura complexa [11]. Esse parâmetro foi observado quando se realizou a varredura da solução contendo apenas FeCl_3 , apresentada anteriormente na Figura 1.

Linearidade

A linearidade é a capacidade de uma metodologia analítica demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo determinado. Recomenda-se que a linearidade seja determinada pela análise de, no mínimo, cinco concentrações diferentes [11]. O critério mínimo aceitável do coeficiente de correlação linear (r) deve ser igual a 0,99.

A linearidade foi obtida na preparação da curva padrão apresentada, anteriormente, na Figura 3, a qual apresentou coeficiente de correlação linear (r) igual a 0,9954 e equação $y = 0,0008x + 0,5766$. Com esses valores, observou-se que o método apresentou boa linearidade na faixa compreendida de 150 a 450 mg/L para concentração de 5-ASA.

Precisão

A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra. A análise de repetitividade foi realizada para avaliação da precisão, com seis 6 leituras do complexo 5-ASA-Fe³⁺, cuja concentração de 5-ASA utilizada foi a do valor intermediário (300 mg/L), a qual foi repetida por três vezes no decorrer do mesmo dia. Este parâmetro de validação busca a concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo com o mesmo analista e mesma instrumentação [11].

Os valores das absorbâncias e respectivas médias encontram-se na Tabela 6. Observa-se também que o método não apresenta variações consideráveis quando utilizado para análises em um período de tempo variável utilizando-se das mesmas condições e analista, pois os valores obtidos para o desvio padrão relativo foram todos menores que 5% [11,16].

Tabela 6. Valores obtidos para o parâmetro de repetitividade pelo mesmo analista.

Amostra	1	2	3	4	5	6	MEDIA	DPR* (%)
Tempo 01	0,846	0,835	0,841	0,828	0,822	0,825	0,833	1,14
Tempo 02	0,851	0,859	0,836	0,846	0,831	0,850	0,846	1,22
Tempo 03	0,849	0,841	0,827	0,851	0,848	0,833	0,842	1,15

*DPR = desvio padrão relativo

O teste de precisão intermediária foi realizado para detectar possíveis alterações nas análises, o qual também avalia quando as modificações de condições para realização são maiores. Assim, as análises foram realizadas em dias diferentes e com analistas diferentes. Os dados dessa análise são mostrados na Tabela 7 a seguir.

Tabela 7. Valores obtidos do teste de precisão intermediária realizado por analista diferente.

Amostra	1	2	3	4	5	6	MEDIA	DPR* (%)
Analista 02	0,850	0,859	0,841	0,847	0,827	0,832	0,843	1,41

*DPR = desvio padrão relativo

O Coeficiente de variação foi menor que 5%, ou seja, pode-se evidenciar a precisão do método. Os dados também mostram que não há diferença significativa entre os dois analistas ao nível de confiança de 95% [11,16].

Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)

Limite de detecção é a menor quantidade do analito a ser detectada e presente em uma amostra, porém não necessariamente quantificada, sob as condições experimentais estabelecidas. O limite de detecção é estabelecido por análise de soluções de concentrações conhecidas e decrescentes do analito, até o menor nível detectável [11].

A determinação do limite de detecção pode ser realizada pelo método visual, da razão sinal-ruído, baseado na determinação do branco ou em parâmetros da curva de calibração, considerando-se as particularidades do método analítico utilizado [16].

Para métodos visuais, o limite de detecção é determinado pela menor concentração para a qual é possível constatar o efeito visual esperado. Para métodos instrumentais, o limite de detecção pode ser determinado pela razão sinal-ruído. A razão sinal-ruído deve ser maior ou igual a 2:1. E, para a determinação baseada em parâmetros da curva analítica, o limite de detecção pode ser calculado pela equação abaixo:

$$LD = \frac{3 \times \text{desvio padrão do intercepto com o eixo do } Y}{\text{inclinação da curva de calibração}} \quad (3)$$

O limite de quantificação é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis. Assim, para os métodos visuais, o limite de quantificação é determinado pela menor concentração para a qual é possível constatar o efeito visual esperado [11]. E, para a determinação baseada em parâmetros da curva analítica, o limite de detecção pode ser calculado pela seguinte equação:

$$LQ = \frac{10 \times \text{desvio padrão do intercepto com o eixo do Y}}{\text{inclinação da curva de calibração}} \quad (4)$$

Os valores obtidos para os limites de detecção e quantificação foram 0,202 e 0,673, respectivamente. Tais parâmetros não são previstos para determinação de acordo com a categoria I classificada pela Anvisa, porém foram calculados adicionalmente para o método desenvolvido [11].

Exatidão

A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro e é calculada como porcentagem de recuperação da quantidade conhecida do analito adicionado à amostra, ou como a diferença percentual entre as médias e o valor verdadeiro aceito.

A exatidão do método deve ser determinada a partir de, no mínimo, nove (9) determinações contemplando o intervalo linear do procedimento, ou seja, três (3) concentrações (baixa, média e alta), com três (3) réplicas cada [11,17]. A exatidão é expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente, expressa pela equação a seguir:

$$\text{Exatidão} = \frac{\text{concentração média experimental}}{\text{concentração teórica}} \times 100 \quad (5)$$

Os valores encontrados para o parâmetro exatidão são observados na Tabela 8.

Tabela 8. Valores obtidos para o parâmetro de exatidão.

Concentração 5-ASA (mg/L)	Absorbância 01	Absorbância 02	Absorbância 03	Média/DP	Concentração/DP (mg/L)	Exatidão (%)
150	0,695	0,688	0,699	0,694 ± 0,006	147 ± 7,09	97,83
300	0,841	0,819	0,828	0,829 ± 0,011	316 ± 14,10	105,17
450	0,936	0,953	0,935	0,941 ± 0,010	456 ± 13,00	101,22

*DP = Desvio padrão

Os resultados estão dentro dos critérios de aceitação, ou seja, entre 80 a 120% [11]. A exatidão é confirmada desde que a precisão, a linearidade e a especificidade sejam estabelecidas. Dessa forma, o método espectrofotométrico proposto é exato, visto que a precisão, a linearidade e a especificidade foram adequadas.

Análises dos medicamentos

Cinco amostras de medicamentos foram analisadas, contendo o princípio ativo 5-ASA, são elas: comprimido referência (Mesacol[®]), comprimido genérico (Gnr), cápsula manipulada (Mpl), sachê (Sch) e enema (Ene

Tabela 9. Valores das análises dos medicamentos contendo 5-ASA em diferentes formulações utilizando a metodologia desenvolvida.

Formulações (400 mg/L)	Concentração Média/DP (mg/L)	% Recuperação
Mesacol [®]	378 ± 4,36	94,60
Gnr	368 ± 2,12	92,00
Mpl	343 ± 3,10	85,65
Sch	336 ± 4,86	83,98
Ene	348 ± 4,23	87,00

*DPR = desvio padrão relativo

Todas as amostras apresentaram desvio padrão relativo menor que 5%, cujo menor desvio foi 2,12 e o maior foi 4,86%. A porcentagem de recuperação também apresentou resposta dentro do preconizado, cujo mínimo é 80% [11,16]. Os mesmos medicamentos foram analisados a fim de que fossem comparados os resultados obtidos pela metodologia espectrofotométrica desenvolvida, de acordo com a metodologia volumétrica com NaOH, descrita na farmacopeia britânica [15]. Os valores obtidos pela metodologia citada estão descritos na Tabela 10.

Tabela 10. Valores das análises dos medicamentos contendo 5-ASA em diferentes formulações utilizando a metodologia volumétrica descrita na farmacopeia britânica.

Formulações (400 mg/L)	Concentração Média/DP (mg/L)	% Recuperação
Mesacol®	381 ± 3,28	95,25
Gnr	374 ± 2,08	93,50
Mpl	326 ± 2,81	81,50
Sch	337 ± 3,47	84,25
Ene	332 ± 2,87	83,00

*DPR = desvio padrão relativo

As amostras apresentaram desvio padrão relativo menor que 5%, cujo menor desvio foi 2,08 e o maior foi 3,47%. A porcentagem de recuperação também apresentou resposta dentro do preconizado, cujo mínimo é 80% [15].

O teste F foi aplicado para efeito de comparação dos resultados obtidos entre o método espectrofotométrico e o método volumétrico, para verificar se há diferença significativa entre os dois métodos. Porém, não há diferença significativa entre os dois métodos, pois o valor obtido de F (0,48) foi menor que o valor de F tabelado ao nível de 95% de confiança (6,39).

Discussão

A utilização do planejamento experimental foi essencial para a determinação dos pontos de máxima absorção do complexo formando, utilizando-se as máximas concentrações da solução de ferro e da nossa amostra do farmaco. Dessa forma, foi possível a obtenção de uma resposta otimizada da análise. Pois, o planejamento experimental explora as condições experimentais

do sistema com o mínimo de experimentos possíveis, revelando-se, portanto, as contribuições das variáveis da técnica na resposta analítica de forma mútua [13].

Após o processo de triagem das variáveis mais significativas, que permitem refinamento e melhor conhecimento do sistema em estudo [14], seguiu-se para a validação da metodologia desenvolvida, de acordo com os parâmetros exigidos pelas normas da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), órgão que regula tais exigências no Brasil. Foram realizados os parâmetros de linearidade, especificidade, precisão, precisão intermediária, limite de detecção, limite de quantificação e exatidão [11].

A linearidade obtida a partir da curva analítica apresentou valor do coeficiente de correlação linear (r) de 0,9954, o qual está dentro do critério de aceitação preconizado, que deve ser de $r = 0,99$, e que evidencia a boa linearidade do método na faixa compreendida de trabalho. Para o parâmetro de precisão e precisão intermediária, este último sendo realizado por outro analista e em dias diferentes, apresentaram desvio padrão relativo menores que 1,5%, sendo estes valores inferiores ao preconizado pela literatura, que é de 5%, por conseguinte, evidencia-se a precisão do método [11,16].

Os limites de detecção e quantificação, que é a menor quantidade do analito presente em uma amostra, capaz de ser detectado e quantificado, respectivamente, também apresentaram valores aceitáveis. Embora estes parâmetros não sejam exigidos de acordo com a categoria I da Anvisa, eles foram calculados adicionalmente para o método desenvolvido [11].

A exatidão, que é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em relação ao valor verdadeiro, apresentou valores dentro dos critérios de aceitação preconizados. Ela também é confirmada desde que a precisão, a linearidade e a especificidade sejam estabelecidas. Dessa forma, o método espectrofotométrico proposto é exato, visto que a precisão, a linearidade e a especificidade foram adequadas [17]. Assim, foi possível evidenciar que todos os testes exigidos para a validação do método fossem realizados e obtidos valores dentro do preconizado.

Cinco formulações diferentes contendo o princípio ativo 5-ASA foram analisadas pela metodologia desenvolvida, porém com a mesma concentração de 400 mg/L. Todas as amostras analisadas apresentaram valores dentro do preconizados, com valores de desvio padrão relativo menores que 5%, bem como a porcentagem de recuperação acima de 80% [16].

Vale ressaltar que não há procedimento descrito pela Farmacopeia Brasileira para a determinação de 5-ASA em produtos farmacêuticos [8]. Em contrapartida, a Farmacopeia Americana adota um método que utiliza Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com uma fase móvel contendo hidrogenossulfato de tetrabutílamônio como agente de emparelhamento de íons, mas, isso diminui a vida útil da coluna [7]. Além disso, a Farmacopeia Britânica estabelece um método volumétrico quando titula o 5-ASA com hidróxido de sódio 0,1 (Mol/L) [15].

Dessa forma, a metodologia volumétrica apresentou valores próximos ao encontrado pela metodologia espectrofotométrica proposta quando analisou os mesmos medicamentos, cujo objetivo foi de comparar os resultados obtidos pelo método desenvolvido. Além disso, o teste estatístico (teste F) foi aplicado para evidenciar que não há diferença significativa a 95% de confiança entre os dois métodos.

Conclusão

O método foi validado para quantificação de 5-ASA em formulações farmacêuticas e apresentou valores aceitáveis para todos os parâmetros exigidos. Dessa forma, essa metodologia atendeu às diretrizes da legislação vigente. A metodologia foi otimizada quando se aplicou o planejamento experimental, o qual reduziu o número de experimentos, o tempo e os custos com reagentes. O método espectrofotométrico é de baixo custo, rápido e de fácil execução. Esse método pode ser utilizado de modo seguro e confiável, portanto é interessante tanto para análise em uma indústria farmacêutica como em uma farmácia de manipulação. As cinco formulações diferentes de 5-ASA apresentaram concentrações dentro do que é preconizado pela legislação e de acordo com o informado pelo fabricante.

5. Conclusões gerais da dissertação

A metodologia espectrofotométrica desenvolvida para a determinação de 5-ASA em formulações farmacêuticas é de baixo custo, simples e rápida. Os resultados obtidos a partir das experiências de recuperação com os pequenos coeficientes de variação foram satisfatórios e a simplicidade da metodologia permite recomendá-la para a determinação de 5-ASA em formulações farmacêuticas.

6. Considerações finais

Vale destacar a importância dessa metodologia alternativa para quantificar o 5-ASA em formulações farmacêuticas, haja vista aquela ter sido validada e comparada com o método volumétrico descrito na farmacopeia britânica. Dessa forma, o método desenvolvido durante esta pesquisa pode ser sugerido à farmacopeia brasileira como alternativa de doseamento do fármaco, visto que ela não apresenta metodologia destinada para este objetivo.

Por fim, serão relevantes outras pesquisas associadas a este trabalho, bem como a comparação do método desenvolvido com a metodologia cromatográfica descrita na farmacopeia americana, a mais utilizada até então.

7. Referências Bibliográficas

Referências Bibliográficas – Capítulo 1

- [1] CAI, Q. X.; ZHU, K. J.; CHEN, D.; GAO, L. P. *Synthesis, characterization and in vitro release of aminosalicilyc acid and 5-acetyl aminosalicilyc acid of polyanhydride – P (CBFAS)*. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, Amsterdam, v. 55, p. 203-208, 2003.
- [2] GOTTI, R.; POMPONIO R.; BERTUCCI, C.; CAVRINI, V. *Determination of 5-aminosalicylic acid related impurities by micellar electrokinetic chromatography with an ionpair reagent*. *J. Cromatogr. A*, Amsterdam, v. 916, p. 175-183, 2001.
- [3] JOSHI, R.; KUMAR, S.; UNNIKRISHNAN, M.; MUKHERJEE, T.; *Free Radical Res.* 39, 1163, 2005.
- [4] GASCHÉ C, CAMPREGHER C. Aminosalicylates. *Best Prac Resid Clini Gastroenterol* 2011, 25: 535 – 546.
- [5] NOBILIS, M.; VYBIRALOVA, Z.; SLADKOVA, K.; LISA, M.; HOLCAPEK, M.; KVETINA, J.; *High-performance liquid-chromatographic determination of 5-aminosalicylic acid and its metabolites in blood plasma*. *J. Chromatogr., A* 2006, 1119, 299.
- [6] PALUMBO, G.; CARLUCCI, G.; MAZZEO, P. et al., *Simultaneous determination of 5 aminosalicilyc acid, acetyl-5-aminosalicylic acid and 2, 5-dihydroxybenzoic acid in endoscopic intestinal biopsy samples in humans by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection*. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, Oxford, v.14, p.175-180, 1995.
- [7] UNITED STATES PHARMACOPEIA - USP. 24. ed. Rockville, United States Pharmacopeia Convention, 2000.
- [8] BRASIL. FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 5ª ed. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2010.
- [9] MOREAU RLM. *Ácido acetilsalicílico: determinação da salicemia por espectrofotometria*. In: MOREAU RLM, SIQUEIRA MEPB (Org.). *Toxicol anal.* 2013: 189-193.
- [10] RUELA, A.; ARAÚJO, M.; PEREIRA, G.; *Desenvolvimento e validação de um método analítico rápido por cromatografia líquida de alta eficiência para determinação de nimesulida em estudos de liberação in vitro*. *Revista Química Nova*. Alfenas, v. 32. n. 1. p. 165 - 168, 2009.

- [11] Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA; Resolução nº 166, de 24/07/2017; *Validação de métodos analíticos*, ministério da saúde, 2017.
- [12] SILVA, J. A.; DAMASCENO, B. P. G. L.; SILVA, F. L. H.; MADRUGA, M. S.; SANTANA, D. P. *Aplicação da metodologia de planejamento fatorial e análise de superfícies de resposta para otimização da fermentação alcoólica*. Química Nova, v. 31, n. 5, p.1073-1077, 2008.
- [13] BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E.; *Como fazer experimentos*, 4ª ed., Editora Bookman: São Paulo, 2010.
- [14] MONTGOMERY, D. C.; *Design and Analysis of Experiments*, 3ª ed., John Wiley: New York, 1991.
- [15] BRITISH PHARMACOPEIA. London: Her Majesty's Stationery Office, Vol II, 2009.
- [16] Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia - INMETRO. DOQ-CGCRE-008 – *Orientação sobre validação de métodos analíticos*. Revisão 04 – agosto/2016
- [17] ICH; *International conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use*. Q2B(R1); Guideline on Validation of Analytical Procedure-Methodology, 2005.

Referências Bibliográficas – Fundamentação teórica

- Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA; Resolução nº 166, de 24/07/2017; *Validação de métodos analíticos*, ministério da saúde, 2017.
- BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E.; *Como fazer experimentos*, 4ª ed., Editora Bookman: São Paulo, 2010.
- BRASIL. FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 5ª ed. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2010.
- BRITISH PHARMACOPEIA. London: Her Majesty's Stationery Office, Vol II, 2009.
- BYSTROWSKA, B.; NOWAK, J.; BRANDYS, J.; *Validation of a LC method for the determination of 5-aminosalicylic acid and its metabolite in plasma and urine. J. Pharm. Biomed. Anal.* 2000, 22, 341.
- CAI, Q. X.; ZHU, K. J.; CHEN, D.; GAO, L. P. *Synthesis, characterization and in vitro release of aminosalicylic acid and 5-acetyl aminosalicylic acid of polyanhydride – P (CBFAS). Eur. J. Pharm. Biopharm.*, Amsterdam, v. 55, p. 203-208, 2003.
- E C, CAMPREGHER C. *Aminosalicylates. Best Prac Resid Clini Gastroenterol* 2011, 25: 535 – 546.
- GANDINI, C.; CACCIALANZA, G.; KITSOS, M.; MASSOLINI, G.; DE LORENZI, E.; *Determination of 5-aminosalicylic acid and related compounds in raw materials and pharmaceutical dosage forms by high-performance liquid chromatography. J. Chromatogr.* 1991, 540, 416.
- GASCHE C, CAMPREGHER C. *Aminosalicylates. Best Prac Resid Clini Gastroenterol* 2011, 25: 535 – 546.
- GIL, E.S.; *Controle Físico-Químico de Qualidade de Medicamentos*, 3 ed., Editora Pharmabooks, São Paulo, 2010
- GOTTI, R.; POMPONIO R.; BERTUCCI, C.; CAVRINI, V. *Determination of 5-aminosalicylic acid related impurities by micellar electrokinetic chromatography with an ionpair reagent. J. Cromatogr. A*, Amsterdam, v. 916, p. 175-183, 2001.
- ICH; *International conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. Q2B(R1); Guideline on Validation of Analytical Procedure-Methodology*, 2005.

Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia - INMETRO. DOQ-CGCRE-008 – *Orientação sobre validação de métodos analíticos*. Revisão 04 – agosto/2016

ITO, H., MATSUMOTO, T., SUZUKI, Y., AIDA, Y., YOSHIDA, T. *Direct comparison of two different mesalamine formulations for the maintenance of remission in patients with ulcerative colitis: a double-blind, randomized study*. *Inflamm Bowel Dis*, v. 16, p. 1575-1582, Set 2010.

JOSHI, R.; KUMAR, S.; UNNIKRIHANNAN, M.; MUKHERJEE, T.; *Free Radical Res.* 39, 1163, 2005.

KOELINK, P.J., HAWINKELS, L.J.A.C., WIERCINSKA, E., SIER, C.F.M., DIJKE, P.T., LAMERS, C.B.H.W.M HOMMESA, D.W., VERSPAGET, H.W. *5-Aminosalicylic acid inhibits TGF- β 1 signalling in colorectal cancer cell*. *Cancer Letters*, v. 287, p.82-90, Jan 2010.

LIM, W.C., HANAUER, S. *Aminosalicylates for induction of remission or response in Crohn's disease*. *Cochrane Database Syst Rev*; 2010.

MONTGOMERY, D. C.; *Design and Analysis of Experiments*, 3rd ed., John Wiley: New York, 1991.

MOREAU RLM. *Ácido acetilsalicílico: determinação da salicemia por espectrofotometria*. In: MOREAU RLM, SIQUEIRA MEPB (Org.). *Toxicol anal.* 2013: 189-193.

NOBILIS, M.; VYBIRALOVA, Z.; SLADKOVA, K.; LISA, M.; HOLCAPEK, M.; KVETINA, J.; *High-performance liquid-chromatographic determination of 5-aminosalicylic acid and its metabolites in blood plasma*. *J. Chromatogr., A* 2006, 1119, 299.

PALUMBO, G.; CARLUCCI, G.; MAZZEO, P. et al., *Simultaneous determination of 5 aminosalicylic acid, acetyl-5-aminosalicylic acid and 2, 5-dihydroxybenzoic acid in endoscopic intestinal biopsy samples in humans by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection*. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, Oxford, v.14, p.175-180, 1995.

PATEL, K.M.; PATEL, C.N.; PANIGRAHI, B.; PARIKH, A.S.; PATEL, H.N. *Development and Validation of Spectrophotometric Methods for the Estimation of Mesalamine in Tablet Dosage Forms*, 2010.

QURESHI, A.I., COHEN, R.D. *Mesalamine delivery systems: do they really make much difference?*. *Adv Drug Deliv Rev*, v. 57, p. 281-302, Jan 2005.

- RAFAEL, J.A.; JABOR, J.R.; CASAGRANDE, R.; GEORGETTI, S.R.; BORIN, M.F.; FONSECA, M.J.V. *Validation of HPLC, DPPH and nitrosation methods for mesalamine determination in pharmaceutical dosage forms*, 2007.
- RUELA, A.; ARAÚJO, M.; PEREIRA, G.; *Desenvolvimento e validação de um método analítico rápido por cromatografia líquida de alta eficiência para determinação de nimesulida em estudos de liberação in vitro*. Revista Química Nova. Alfenas, v. 32. n. 1. p. 165 - 168, 2009.
- SILVA, J. A.; DAMASCENO, B. P. G. L.; SILVA, F. L. H.; MADRUGA, M. S.; SANTANA, D. P. *Aplicação da metodologia de planejamento fatorial e análise de superfícies de resposta para otimização da fermentação alcoólica*. Química Nova, v. 31, n. 5, p.1073-1077, 2008.
- SUTHERLAND, L.R., MARTIN, F., GREER, S., ROBINSON, M., GREENBERGER, N., SAIBIL, F., MARTIN, T., SPARR, J., PROKIPCHUK, E., BORGAN, L. *5-aminosalicylic acid enema in the treatment of distal ulcerative colitis, proctosigmoiditis and proctitis*. *Gastroenterology*, v. 92, n.6, p. 1894-1898, Jun 1987.
- ULIANA, C.V.; YAMANAKA, H.; GARBELLINI, G.S.; SALAZAR-BANDA, G.R. *Determination of 5-Aminosalicylic Acid in Pharmaceutical Formulations by Square Wave Voltammetry at Pencil Graphite Electrodes*, 2010.
- UNITED STATES PHARMACOPEIA - USP. 24. ed. Rockville, United States Pharmacopeia Convention, 2000.
- VICENTINI, F. C.; FIGUEIREDO FILHO, L. C. S. DE; JANEGITZ, B. C.; Santiago, A.; PEREIRA-FILHO, E. R. ; FATIBELLO, O. . *Planejamento Fatorial e Superfície de Resposta: Otimização de um Método Voltamétrico para a Determinação de Ag(I) Empregando um Eletrodo de Pasta de Nanotubos de Carbono*. Química Nova, v. 34, p. 825-830, 2011.
- VIEIRA, S. E HOFFMANN, R. *Estatística Experimental*. Editora Atlas, São Paulo, 1989.

8. Anexos

Normas para publicação na Revista Científica Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis

Informações essenciais sobre a página de título

Título: Conciso e informativo. Os títulos são freqüentemente usados em sistemas de recuperação de informações. Evitar abreviaturas e fórmulas sempre que possível.

Nomes e afiliações de autores: Indique claramente o (s) nome (s) e o (s) nome (s) de família de cada autor e verifique se todos os nomes estão corretamente escritos. Forneça o endereço postal completo de cada afiliação, incluindo o nome do país e, se disponível, o endereço de e-mail de cada autor.

Autor correspondente: Indique claramente quem irá lidar com a correspondência em todas as etapas do arbitramento e publicação, também pós-publicação. Esta responsabilidade inclui responder a futuras consultas sobre metodologia e Materiais.

Estrutura do artigo

Resumo

O resumo deve indicar brevemente o objetivo da pesquisa, os principais resultados e as principais conclusões. Um resumo é frequentemente apresentado separadamente do artigo, por isso deve ser capaz de ficar sozinho. Por este motivo, as referências devem ser evitadas, mas, se necessário, cite o (s) autor (es) e ano (s).

Palavras-chave

Imediatamente após o resumo, forneça um máximo de 6 palavras-chave, usando a ortografia americana e evitando termos gerais e plurais e conceitos múltiplos (evite, por exemplo, 'e', 'de').

Introdução

Indique os objetivos do trabalho e forneça um quadro adequado, evitando uma literatura detalhada pesquisa ou um resumo dos resultados.

Material e métodos

Forneça detalhes suficientes para permitir que o trabalho seja reproduzido por um pesquisador independente. Métodos que já estão publicados devem ser resumidos e indicados por uma referência.

Resultados

Os resultados devem ser claros e concisos.

Discussão

Isso deve explorar o significado dos resultados do trabalho, não repeti-los. Um resultado combinado e a seção de discussão geralmente é apropriada. Evite extensas citações e discussões sobre as publicações publicadas.

Conclusões

As principais conclusões do estudo podem ser apresentadas em uma breve seção de Conclusões.

Referências

Texto: Indique as referências por número (s) entre colchetes de acordo com o texto. Os autores reais podem ser encaminhados, mas o número (s) de referência deve ser sempre dado.

Exemplo: '....como demonstrado [3,6]. Barnaby e Jones [8] obtiveram um resultado diferente ... "

Lista: Numerar as referências (números entre colchetes) na lista na ordem em que aparecem no texto.

Exemplos:

Referência a uma publicação de diário:

[1] J. van der Geer, J.A.J. Hanraads, R.A. Lupton, A arte de escrever um artigo científico, J. Sci. Comum. 163 (2010) 51-59.

Tabelas

Envie as tabelas como texto editável e não como imagens. As tabelas podem ser colocadas ao lado do texto relevante no artigo, ou em páginas separadas no final. Classifique as tabelas consecutivamente de acordo com a aparência no texto e coloque as notas de tabela abaixo do corpo da tabela.

Pontos gerais

- Utilize as seguintes fontes em suas ilustrações: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol ou use fontes que pareçam semelhantes.
- Numerar as ilustrações de acordo com sua sequência no texto.
- Fornecer legendas para ilustrações separadamente.
- Dimensione as ilustrações próximas às dimensões desejadas da versão publicada.
- Envie cada ilustração como um arquivo separado.