

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA A DETERMINAÇÃO DE SULFASSALAZINA EM SUSPENSÃO ORAL: COMPARAÇÃO DO MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO E DE CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)

Mayre Aparecida Borges da Costa*, Eduardo Ricci-Júnior e Elisabete Pereira dos Santos

Departamento de Medicamentos, Faculdade de Farmácia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Av. Carlos Chagas Filho, 373, Bl. L, Cidade Universitária, Ilha do Fundão, 21941-590 Rio de Janeiro - RJ, Brasil

Claudia Regina Elias Mansur e Vânia Emerich Bucco de Campos

Instituto de Macromoléculas Eloisa Mano, Centro de Tecnologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Av. Horácio Macedo, 2030, Bl. J, 21941-598 Rio de Janeiro - RJ, Brasil

Recebido em 4/7/11; aceito em 10/10/11; publicado na web em 13/1/12

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF ANALYTICAL METHOD FOR DETERMINATION OF SULFASALAZINE IN ORAL SUSPENSION: COMPARISON BETWEEN SPECTROSCOPIC AND HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY. Sulfasalazine is a prodrug used in the treatment of the Chron's disease and rheumatoid arthritis. Two analytical methods for analysis of sulfasalazine in oral suspension were validated using Spectrophotometric and HPLC. There is not any pharmacopoeic method to assay sulfasalazine in oral suspension. The methods are insurance and fast execution for the quality control. Both, suspension and tablets 500 mg (Azulfín®) had been analyzed by methods using UV/VIS and HPLC and the results were satisfactory.

Keywords: sulfasalazine; oral suspension; analytical method.

INTRODUÇÃO

Sulfassalazina (SASP) foi desenvolvida por Svartz, na Suécia, em 1940, como um medicamento de ação antirreumática. Usada desde 1942, foi o primeiro fármaco desenvolvido para o tratamento da artrite reumatoide e para colite ulcerativa e ainda é usada como agente terapêutico para manutenção de remissão.¹ Recentes estudos mostraram que a sulfassalazina tem sido usada com segurança no tratamento prolongado de várias doenças inflamatórias e autoimunes.²

Atualmente, no mercado brasileiro a sulfassalazina está disponível somente na forma de comprimidos gastrorresistentes de 500 mg, Azulfín®, fabricada pela APSEN Farmacêutica, não sendo fabricada por nenhuma indústria brasileira a forma líquida, então foi manipulada uma suspensão oral de sulfassalazina 250 mg/5 mL. Uma vantagem da formulação líquida está relacionada à sua aplicabilidade para atender pacientes pediátricos e geriátricos, devido à facilidade de deglutição, além de administração de diferentes dosagens de acordo com o tratamento.³ Pacientes em coma que recebem alimentação enteral podem receber a suspensão sulfassalazina para o tratamento de distúrbios gastrointestinais por sondas, neste caso evitando-se a transformação de forma farmacêutica sólida (comprimido) em líquida (suspensão). Enemas e supositórios são formas farmacêuticas que não são indicadas no tratamento das úlceras localizadas no cólon ou em partes interiores do intestino, visto que não liberam o fármaco neste local.⁴

Sulfassalazina é um ácido 5-Aminosalicílico (5-ASA) ligado por uma ligação azo, a Sulfapiridina. Quando administrada oralmente, 30% da sulfassalazina são absorvidos na parte superior do trato gastrointestinal e o remanescente passa para o cólon, onde a ligação azo é desfeita pela ação das enzimas azoredutases bacterianas, liberando, então o ácido 5-Aminosalicílico (5-ASA) para agir no cólon. Sulfapiridina (SP) é totalmente absorvida e metabolizada para N-Acetilulfapiridina por enzimas hepáticas.⁵

A SASP tem caráter ácido devido a três grupos diferentes, carboxila, sulfonamido e hidroxila fenólica (Figura 1), sendo, portanto, solúvel em meio alcalino; insolúvel em meio ácido; levemente solúvel em álcool, praticamente insolúvel em água, benzeno, clorofórmio e éter.⁶ Segundo a classificação biofarmacêutica, a Sulfassalazina é classe IV,⁷ sendo insolúvel em água e de baixa permeabilidade.

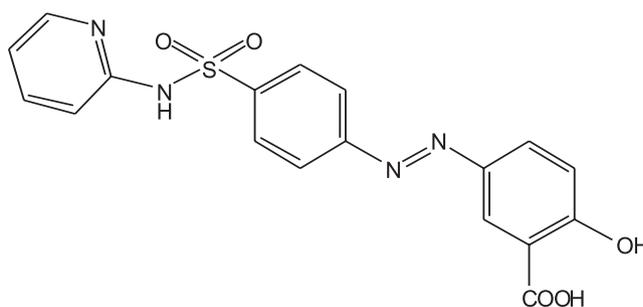


Figura 1. Estrutura química da Sulfassalazina

Na lista de monografia de análise da Farmacopeia Americana publicada em fevereiro de 2011,⁸ a suspensão oral de sulfassalazina aparece como prioridade, visto que já é comercializada na Europa e Estados Unidos. A proposta desse trabalho foi a validação de dois métodos analíticos para análise da suspensão oral de Sulfassalazina 250 mg/5 mL. O veículo da formulação é composto de agente suspensor (carboximetilcelulose sódica), adoçante (ciclamate de sódio), aromatizante de laranja, conservante (benzoato de sódio) e tensoativo (polissorbato 80). Dentro desse contexto, o desenvolvimento de um método analítico para determinar o teor do fármaco na formulação líquida de sulfassalazina é um dos requisitos fundamentais para a garantia da segurança e eficácia do medicamento. A validação do método analítico é um processo importante para demonstrar que o método de análise sob investigação é adequado ao uso pretendido, assegurando a qualidade e confiabilidade nos resultados durante a rotina.⁹

*e-mail: mayre@pharma.ufrj.br

Os métodos analíticos usados para a determinação do teor de sulfassalazina foram: espectrofotometria UV/VIS - um método rápido, prático e de baixo custo - e outro, por CLAE, onde são empregados reagentes mais caros, mas, que apresenta seletividade e pode ser empregada principalmente em estudos de estabilidade, permitindo avaliar a pureza cromatográfica do pico, detectando assim possíveis produtos de degradação.^{10,11}

Hoje, para as farmácias magistrais e para as indústrias, existe um grande interesse no desenvolvimento de métodos analíticos rápidos e que forneçam parâmetros apropriados para análise quantitativa de fármacos. É importante que esses métodos analíticos sejam de baixo custo, rápidos e precisos.^{9,12}

Neste trabalho, o objetivo está focado em validar dois métodos analíticos, rápidos, seguros e de baixo custo, que podem ser aplicados tanto em estabelecimentos como farmácias magistrais, como também em indústrias farmacêuticas.

PARTE EXPERIMENTAL

Material de referência e reagentes

Foi utilizado padrão de Sulfassalazina Fluka, lote 1450407 (10 g) teor de pureza 98,3%, hidróxido de sódio em micropérolas lote 0904898 e hidróxido de sódio em lentilhas lote 0702126, ambos do fornecedor Vetec, acetonitrila grau CLAE lote 1009123 do fornecedor Tedia Brazil e ácido fosfórico lote 1000153 do fornecedor Vetec. Azulfin® 500 mg, comprimidos revestidos gastroresistentes, lote 10100406 (fabricado em 08/2010 e validade 08/2012). Suspensão de Sulfassalazina 250 mg/5 mL manipulada na Farmácia Universitária da Universidade Federal do Rio de Janeiro. A suspensão de Sulfassalazina apresenta-se com cor amarela, adocicada e com odor de característico de laranja. A suspensão foi estocada em frasco de vidro âmbar contendo 200 mL do produto.

Equipamentos

Sistema de cromatografia líquida de alta eficiência, contendo cromatógrafo Shimadzu – bomba modelo LC-10AD VP, autoinjeter modelo SIL-10AD VP com detector de arranjo de fotodiodos modelo SPDM10A VP e sistema de dados (software) modelo Class-VP versão 6.1 (Japão). Coluna cromatográfica (Shimadzu) com 15 cm de comprimento, 4,6 mm d.i., 5 µm de tamanho de partícula. Espectrofotômetro duplo feixe Shimadzu UV, modelo 2401PC (Japão); potenciômetro Mettler Toledo, modelo MPC 227(USA). Aparelho de ultrassom (Thornton, modelo T14). Balança analítica (Mettler Toledo – modelo AG204). Cromatógrafo líquido Shimadzu modelo Prominence LC20AT, autoinjeter modelo SIL-20A, detector arranjo de diodos SPD-M20A (Japão).

Análise por CLAE

A fase móvel foi constituída de acetonitrila e água destilada na proporção de 1:1 e o pH ajustado para 2,5 utilizando ácido fosfórico. A coluna cromatográfica usada foi octadecil (C18) como fase estacionária, com dimensão de 150 mm x 4,6 mm e 5 µm de diâmetro de partícula. O detector de arranjo de diodos possibilitou a verificação da pureza cromatográfica do pico. O volume de injeção foi 20 µL das amostras e padrão a um fluxo de 1,0 mL min⁻¹ à temperatura ambiente (25 °C). As corridas tiveram duração de 7 min e a detecção da Sulfassalazina foi realizada no comprimento de onda de 359 nm. Este método é similar a métodos previamente publicados,¹¹ que também usam coluna de fase reversa e acetonitrila e água como fase móvel. Contudo, o método descrito aqui usa o pH da fase móvel de 2,5 sem

o uso de tampões e acetonitrila e água numa proporção para obter um tempo de retenção em torno de 3 min.

Análise por espectrofotometria

Os parâmetros analíticos do método espectrofotométrico estão descritos na Farmacopeia America, 34ª edição, para análise de comprimido. A validação do método espectrofotométrico foi realizada utilizando solução de NaOH 0,1 M como diluente para solubilizar o fármaco. Alíquotas de 1 mL da suspensão de sulfassalazina, que corresponde a cerca de 50 mg do fármaco, foram pesadas e transferidas para balão volumétrico de 100 mL, 80 mL do diluente foram adicionados e as amostras foram deixadas sob agitação constante por 20 min e, em seguida, o volume foi completado com NaOH 0,1 M. Em seguida, alíquotas de 1 mL foram transferidas para balão volumétrico de 100 mL diluídas em água purificada e acidificadas com 2 mL de ácido acético 0,1 M, a fim de se obter uma concentração final de 5 µg mL⁻¹.

As leituras foram realizadas em espectrofotômetro no comprimento de onda de 359 nm, utilizando água purificada como branco. Em meio alcalino, pH acima de 7,0, a SASP fica mais ionizada e a solução com coloração amarela intensa, nesse pH pode ser observado um deslocamento batocrômico para o comprimento de onda de 456 nm, pois ocorre mudança na estrutura eletrônica, devido ao grupamento ácido, que possui pKa igual a 0,6.

Validação do método analítico

Os parâmetros de validação para os métodos espectrofotométrico e cromatográfico foram realizados de acordo com recomendações da legislação vigente na Resolução RE 899, de 29/05/2003,¹³ seguindo os critérios da categoria I “Testes quantitativos para a determinação do princípio ativo em produtos farmacêuticos ou matérias-primas”, portanto, foram avaliados: especificidade, linearidade, intervalo, precisão (repetitividade), precisão intermediária (precisão interdia), exatidão e robustez. Em caráter de complementação, foram calculados os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ).

Espectrofotometria UV/VIS

Seletividade

Foi realizada a varredura de uma amostra de placebo e do analito nas mesmas condições de determinação do analito. A varredura foi realizada no intervalo de comprimento de onda de 200 a 600 nm.

Linearidade e intervalo

A linearidade é a verificada em função da concentração do analito e avalia a capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância analisada, dentro de uma faixa de aplicação.¹⁴ A linearidade foi avaliada a partir de três curvas de calibração preparadas em dias diferentes no intervalo de 2,0 a 12 µg mL⁻¹. Foi preparada uma solução estoque de sulfassalazina utilizando NaOH 0,1 M como diluente, na concentração de 200 µg mL⁻¹. Posteriormente foram transferidas alíquotas da solução estoque para balão volumétrico de 100 mL, adicionados 2 mL de ácido acético 0,1 M e completado para este volume com água purificada a fim de se obter amostras nas concentrações de 2,0; 4,0; 6,0; 8,0; 10,0 e 12,0 µg mL⁻¹. Os critérios para aceitação de linearidade foram o coeficiente de correlação linear (r), a equação da reta (y = ax + b) e o coeficiente de determinação (R²). Os dados da curva analítica foram avaliados estatisticamente através da análise de variância (ANOVA). A faixa de aplicação da linearidade corresponde aos valores superior e inferior da substância em exame e corresponde na curva analítica ao intervalo entre 20 a 160%, ou seja, 2,0-12,0 µg mL⁻¹.

Precisão (repetibilidade) e precisão intermediária

A precisão intracorrída (repetibilidade) foi obtida com a quantificação consecutiva de seis réplicas de amostras na concentração de $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ com o mesmo analista. A precisão intermediária foi obtida utilizando diferentes equipamentos, lote diferente de NaOH e outro analista. A precisão intermediária ou intercorrída é um parâmetro que melhor representa a variabilidade de resultados dentro de um laboratório. Para ambas, precisão e precisão intermediária, foi considerado como critério de aceitação o desvio padrão relativo (DPR).

Exatidão

A exatidão do método representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e um valor verdadeiro.¹⁵ Para determinação da exatidão do método foi realizado o teste de recuperação, que é a proporção da quantidade de analito que é passível de ser quantificada, sendo a quantidade recuperada obtida em porcentagem. Para essa determinação foram feitas 3 soluções nas concentrações de 3,0; 4,0 e $5,0 \mu\text{g mL}^{-1}$. Cada solução foi feita em triplicata ($n=3$). Para cada solução 1 mL de placebo foi adicionado em todas as soluções preparadas e calculado o percentual de recuperação. O critério de aceitação para exatidão foi o desvio padrão relativo (DPR).

Robustez e estabilidade das soluções

A robustez do método espectrofotométrico foi avaliada com a mudança de fornecedores de reagentes e equipamentos. A estabilidade das soluções foi realizada em temperatura ambiente ($25 \text{ }^\circ\text{C}$) por 5 dias e em condições diferentes de armazenamento. Foram preparadas soluções padrões utilizando balões volumétricos âmbar e transparente, avaliando, assim, a fotoestabilidade da Sulfassalazina.

Validação do método por CLAE

O método por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foi validado como alternativa para determinação do teor da SASP. Foi utilizado como sistema de detecção o arranjo de fotodiodos e a pureza cromatográfica do pico avaliado.

Seletividade

A seletividade comprova a capacidade de um método em determinar um analito de maneira inequívoca na presença de outras substâncias, como excipientes, produtos de degradação, que possam interferir na sua determinação.^{10,14}

A seletividade foi avaliada através de injeções do diluente (acetonitrila:água), placebo e amostra contendo o analito (Figura 2). A solução de sulfassalazina foi preparada transferindo-se 1 mL da suspensão para um balão volumétrico de 250 mL e adicionando-se 125 mL de diluente. A amostra foi deixada sob agitação por 20 min e o volume completado para 250 mL com diluente. Alíquotas de 3 mL foram transferidas para balão volumétrico de 100 mL e o volume completado para este volume com o mesmo diluente. A concentração final da amostra foi $6 \mu\text{g mL}^{-1}$. Antes da injeção, as amostras foram filtradas em filtro $0,45 \mu\text{m}$. A amostra do placebo foi preparada da mesma maneira que a amostra. Foi verificado se no tempo de retenção da amostra havia a presença de outras substâncias no diluente e no placebo e, também, a pureza do pico cromatográfico através da comparação do espectro cromatográfico do padrão e das amostras e da análise do gráfico tipo *ratio*gram (Figura 3).

Linearidade

Três curvas padrão foram construídas com 5 níveis de concentração. A solução estoque foi preparada na concentração de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$, em diluente composto de acetonitrila e água na proporção de

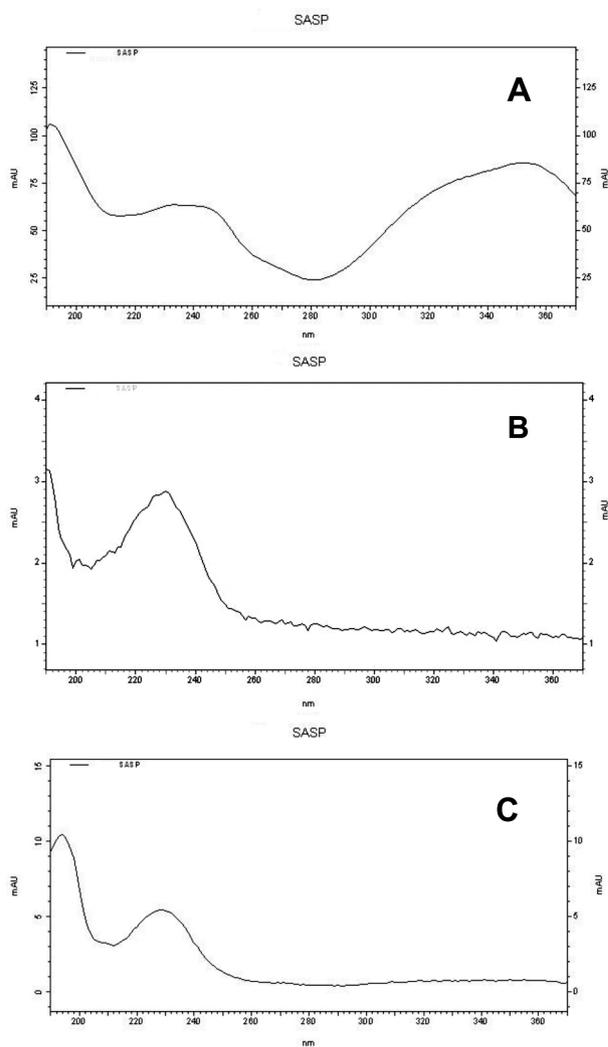


Figura 2. Espectro de absorção do analito (A), placebo (B) e diluente (C)

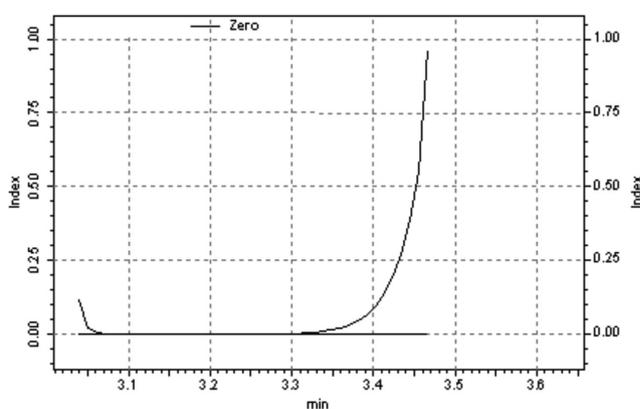


Figura 3. Gráfico tipo *ratio*gram mostrando a pureza cromatográfica da SASP obtida pela razão cromatográfica

1:1. Alíquotas foram transferidas para balões volumétricos de 100 e 50 mL, avolumadas com o mesmo diluente, para obter concentrações no intervalo de 3,0; 5,0; 7,0; 9,0 e $12 \mu\text{g mL}^{-1}$. A curva de calibração foi construída com a ajuda do software Excel (Microsoft, 2007). Os critérios de linearidade para aceitação da curva foram os coeficientes de correlação e a equação da reta ($y = ax + b$). Um estudo estatístico ANOVA ($p < 0,05$) foi utilizado para avaliar se os dados obtidos

eram equivalentes. A homocedasticidade foi calculada usando o teste de Cochran (Teste G) para avaliar se as variâncias se alteram proporcionalmente ao valor de concentração (x).¹⁵

Precisão (repetibilidade) e precisão intermediária

A precisão foi avaliada com soluções ($n=6$) na concentração de $6 \mu\text{g mL}^{-1}$. A precisão intermediária foi avaliada em outro dia e as amostras injetadas em outro equipamento. A análise de precisão foi realizada através do valor do desvio padrão relativo (DPR).

Exatidão

Foram preparadas três soluções ($n=3$) com níveis de concentração diferentes: 5, 6 e $8 \mu\text{g mL}^{-1}$. Todas as soluções preparadas para o teste de exatidão continham solução placebo (solução com excipiente). A recuperação foi calculada para cada solução e o desvio padrão relativo (DPR) usado como critério de aceitação.

Robustez e estabilidade das soluções

A robustez do método mede a sua estabilidade frente a pequenas variações e, se este não for afetado por estas variações, indica que o método é robusto.¹⁴ Os parâmetros utilizados na robustez foram a variação do pH da fase móvel em 0,5 unidades ($\text{pH} = 3,0$), fluxo em 0,2 unidades ($1,2 \text{ mL min}^{-1}$) e composição da fase móvel em 5% de acréscimo de acetonitrila, numa proporção final de acetonitrila:água de 525:475.

A estabilidade de soluções na concentração de $6 \mu\text{g mL}^{-1}$ foi avaliada em três dias consecutivos e a pureza cromatográfica dos picos obtidos foi avaliada.

Utilizando os métodos analíticos validados, analisou-se a suspensão oral de Sulfassalazina 250 mg/5 mL (manipulada na Farmácia Universitária da UFRJ) e o comprimido de Azulfin® 500 mg (Apsen Farmacêutica). Todas as análises foram feitas em triplicata e determinou-se o desvio padrão relativo (DPR).

Limites de detecção e de quantificação

Os limites de detecção e quantificação foram determinados a partir das Equações 1 e 2, usando os dados de três curvas analíticas:

$$\text{LD} = s \cdot 3/\alpha \quad (1)$$

$$\text{LQ} = s \cdot 10/\alpha \quad (2)$$

onde s é o desvio padrão do intercepto com o eixo y nas três curvas de calibração e α é o coeficiente angular da curva analítica.

Doseamento da suspensão oral 250 mg/5 mL e Azulfin® 500 mg

Método espectrofotométrico

Uma quantidade de amostra correspondente a 50 mg de Sulfassalazina foi transferida para um balão volumétrico de 100 mL, solubilizada com NaOH 0,1 M e diluída até volume final com o mesmo solvente. A solução foi agitada mecanicamente por 20 min e uma alíquota de 1 mL transferida para um balão volumétrico de 100 mL, adicionando-se 2 mL de ácido acético 0,1 M e completado para esse volume com água destilada. A concentração final desta solução foi $5 \mu\text{g mL}^{-1}$. A absorvância desta solução foi lida no comprimento de onda de 359 nm, utilizando água destilada como branco.

Método cromatográfico

Uma quantidade de amostra correspondente a 50 mg de Sulfassalazina foi transferida para um balão volumétrico de 250 mL, solubilizada com mistura acetonitrila:água (1:1) e diluída até volume final com o mesmo solvente. A solução foi agitada mecanicamente por 30 min e filtrada em membrana de celulose de porosidade 0,45

μm . Alíquota de 3 mL foi transferida para um balão volumétrico de 100 mL, completado para este volume com a mesma mistura. A concentração final desta solução foi $6 \mu\text{g mL}^{-1}$. As amostras foram injetadas em triplicata e a concentração e o teor de sulfassalazina calculados por comparação com a área obtida de uma solução padrão na mesma concentração da amostra.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Método espectrofotométrico

A validação do método espectrofotométrico para quantificação de Sulfassalazina em suspensão na concentração de 250 mg/5 mL apresentou resultados dentro das especificações exigidas pela ANVISA. Os resultados são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Resultados da validação do método espectrofotométrico para quantificação da suspensão oral Sulfassalazina 250 mg/5 mL

Parâmetros da validação	Método espectrofotométrico	Método cromatográfico
Linearidade	$R^2 = 0,9996$	$R^2 = 0,9982$
	$R^2 = 1$	$R^2 = 0,9996$
	$R^2 = 0,9941$	$R^2 = 1$
Repetitividade ($n=6$)	DPR = 0,8%	DPR = 2,7%
Precisão intermediária ($n=6$)	DPR = 1,1%	DPR = 1,4%
Exatidão ($n=3$)	$98,3 \pm 0,3\%$	$98,9 \pm 1,6\%$
	$101,6 \pm 1,6\%$	$99,7 \pm 1,3\%$
	$100,9 \pm 1,2\%$	$99,2 \pm 1,4\%$
LD ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	1,05	1,12
LQ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	3,50	3,75

DPR= Desvio Padrão Relativo. R^2 = Coeficiente de determinação. n = Número de graus de liberdade. LD=Limite de detecção. LQ= Limite de quantificação

O método espectrofotométrico apresentou especificidade no comprimento de onda de leitura das amostras ($\lambda=359 \text{ nm}$), os espectros de absorção não mostraram presença de interferentes nesse comprimento de onda.

As três curvas de calibração apresentaram coeficiente de correlação próximo a 1, mostrando-se lineares. A análise da variância (ANOVA) nos permite avaliar a linearidade do método e a validade da regressão.¹² Através do teste F é possível confirmar o modelo linear da curva, considerando a hipótese de que o coeficiente angular da curva seja diferente de zero, o valor de F calculado deve ser maior que o F crítico ou de significação, nesse caso, o valor encontrado para F calculado foi de 5597,4 e o F de significação ou crítico igual a $1,61 \times 10^{-18}$, confirmando, assim, a regressão nas três curvas de calibração. Neste caso, pode confirmar, com 95% de confiança, que o modelo é linear e que a inclinação da reta não é nula.

Outros parâmetros analíticos avaliados foram a precisão (repetibilidade) e a precisão intermediária, o limite de aceitação segundo a RE 899 de 29/05/2003,¹³ o desvio padrão relativo (DPR) é de no máximo 5,0% e os resultados para o método espectrofotométrico foram satisfatórios (Tabela 1), portanto, o método espectrofotométrico é preciso para ambos os tipos de precisão avaliados. Pode-se afirmar que o método é preciso intracorrída e intercorrída.

Os resultados de exatidão obtidos para os três níveis foram: nível I (98,3%), nível II (101,6%) e nível III (100,9%). Esses resultados estão dentro dos critérios de aceitação, ou seja, entre 98 a 102%¹² e desvio padrão relativo menor que 5,0%.¹³ Os resultados de exatidão são demonstrados na Tabela 1. De acordo com as normas do ICH (*International Conference on Harmonization*),¹⁶ a exatidão é

confirmada desde que a precisão, linearidade e a especificidade sejam estabelecidas. Sendo assim, o método espectrofotométrico proposto é exato, visto que a precisão, a linearidade e a especificidade foram adequadas.¹⁶

Os valores encontrados de limite inferior de detecção (LD) e limite inferior de quantificação (LQ) foram determinados: 1,05 e 3,50 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. Para a categoria I¹³ esses parâmetros não são previstos, porém foram calculados adicionalmente para o método espectrofotométrico. Os valores da menor quantidade do analito quantificável pelo método (LQ) e menor quantidade do analito detectável pelo método (LD) foram menores que o valor de quantificação do método, provando assim que o mesmo é adequado aos objetivos propostos.

A robustez do método espectrofotométrico foi demonstrada através das condições empregadas no teste de precisão intermediária, usando diferentes lotes de reagente, analistas e laboratórios. As modificações não alteraram os resultados, mantendo-se dentro dos critérios de aceitação, indicando que o método é preciso para ambos os tipos de precisão avaliados (Tabela 1).

As soluções em balões volumétricos âmbar ou transparente foram armazenadas em temperatura ambiente ($25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$) e os valores de absorbância monitorados durante 5 dias. A solução armazenada em balão âmbar por até 5 dias, em temperatura ambiente, apresentou valores de absorbância estável. A solução armazenada em balão volumétrico transparente por 5 dias também apresentou valores de absorbância estável durante 5 dias. Esse parâmetro é importante, pois muitas análises necessitam ser executadas por um período de 24 h e a estabilidade da solução do ativo representa menor custo e praticidade na execução do método.

Método cromatográfico

A seletividade e a especificidade do método cromatográfico foram avaliadas injetando-se nas mesmas condições o diluente, o placebo e a amostra. Não foi detectado nos cromatogramas do placebo e do diluente nenhum pico no tempo de retenção (3,2 min) encontrado para a SASP. Os espectros de absorção do diluente (A), placebo (B) e amostra (C) (Figura 2), mostram que, no comprimento de onda de 359 nm há ausência de interferentes. Outra maneira que se provou a seletividade e especificidade foi através da pureza cromatográfica do pico das amostras injetadas. A pureza foi comprovada pelo gráfico tipo *ratigram*, que expressa a razão entre o sinal do analito e de uma provável impureza em função do tempo. No tempo de retenção da SASP essa razão foi igual a zero (Figura 3), mostrando que não existe outra substância coeluinte com a SASP nas condições estabelecidas de teste.

O método cromatográfico apresentou linearidade, com o coeficiente de determinação maior que 0,999. O tempo de retenção da SASP nessas condições de análise foi de 3,1 min (Figura 4). A homocedasticidade para a curva de calibração foi testada e o valor G calculado (0,4940) foi menor que o valor G tabelado (0,6838), indicando que as variâncias não foram significativamente diferentes. A validade da regressão analisada mostrou que para uma curva com o coeficiente angular diferente de zero, o F calculado deve ser menor

que o F de significação, nesse caso, o valor de F calculado foi de 6,04 e o valor do F de significação encontrado foi de 0,03, mostrando que a inclinação da curva não é nula.

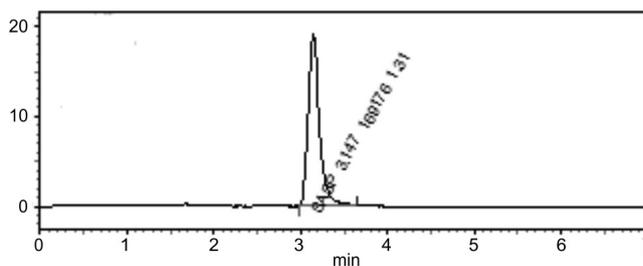


Figura 4. Cromatograma obtido com a fase móvel acetoneitrila:água (1:1) pH 2,5 e fluxo 1,2 mL min⁻¹

Adicionalmente, foram calculados, a partir das curvas analíticas, o limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ). Os valores obtidos foram 1,12 e 3,75 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente, demonstrando que a sensibilidade do método é adequada para o objetivo proposto e que a quantificação ficou acima do limite inferior de quantificação determinado.

Os resultados de precisão (repetibilidade) e precisão intermediária foram satisfatórios e os resultados de desvio padrão relativo (DPR) foram menores que 5,0%, conforme recomendação da RE 899 de 29/05/2003.¹³

Os resultados de exatidão também foram satisfatórios, com os valores de desvio padrão relativo (DPR) menores que 5,0% e a recuperação entre 98 a 102%¹². Os resultados constam da Tabela 1.

O método cromatográfico se apresentou robusto para modificações de equipamento, fluxo, variação de pH e fase móvel. O teste de robustez foi realizado em outro equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência e avaliou-se o coeficiente de variação de 3 injeções consecutivas de padrão e amostra. As alterações realizadas não produziram mudanças significativas nos resultados de assimetria (menor que 2,0) do pico de Sulfassalazina e na estabilidade do sistema (DPR menor que 2,0%).

As amostras foram injetadas por um período de 24 h e mostraram-se estáveis à temperatura ambiente.

Determinação do teor de Sulfassalazina na suspensão oral 250 mg/5 mL e no comprimido Azulfin® 500 mg

Foram analisadas, por ambos os métodos, a suspensão oral e o comprimido referência¹⁷ de Sulfassalazina 500 mg (Azulfin®), os resultados foram satisfatórios (Tabela 2). A metodologia analítica por espectrofotometria UV/VIS para a forma farmacêutica comprimido está descrita na Farmacopeia Americana 34ª edição,¹⁸ enquanto que o método utilizando CLAE¹² ainda não foi contemplado. Para suspensão oral, ambos os métodos (UV/VIS e CLAE) ainda não estão contemplados nas Farmacopeias Americana e Brasileira 5ª edição.¹⁹ Os resultados para ambas as formulações foram satisfatórios com desvio padrão relativo (DPR) menor que 2,0%.

Tabela 2. Resultados (n=3) da análise da suspensão oral 250 mg/5 mL e do comprimido revestido Azulfin® 500 mg por CLAE e por UV/VIS

Azulfin® 500 mg				Sulfassalazina 250 mg/5 mL			
CLAE		UV/VIS		CLAE		UV/VIS	
mg/cpr	DPR	mg/cpr	DPR	Mg mL ⁻¹	DPR	Mg mL ⁻¹	DPR
508,7	0,81%	502,4		51,6		53,4	
510,0		504,6	0,23%	50,4	1,45%	53,0	0,46%
502,3		504,1		50,3		52,9	

Devido à indisponibilidade do placebo do comprimido de Azulfin® 500 mg, a seletividade do método cromatográfico foi demonstrada através do gráfico tipo *ratioqram*, demonstrando a pureza cromatográfica, obtido em cromatógrafo com detector de fotodiodos. Foi possível, então, avaliar a pureza cromatográfica tanto do pico do padrão quanto da amostra que manteve a razão igual a zero no tempo de retenção da SASP, indicando que os excipientes não interferem na seletividade do método no tempo de retenção da Sulfassalazina.

CONCLUSÃO

Dois métodos foram validados para quantificação de Sulfassalazina em suspensão 250 mg/5 mL para uso oral. Ambas as metodologias analíticas atenderam às diretrizes da legislação vigente. O método espectrofotométrico é de baixo custo, rápido e de fácil execução. O método cromatográfico apresenta um custo mais alto, devido à pureza dos reagentes e equipamento, mas também é de rápida execução, preciso e robusto. Ambos os métodos podem ser utilizados de modo seguro e confiável pelo controle de qualidade, o que torna sua aplicabilidade interessante tanto para análise de rotina de uma indústria quanto de uma farmácia de manipulação. Os métodos são, portanto, simples, rápidos e seguros para a análise do comprimido Azulfin® 500 mg e para análise da suspensão oral 250 mg/5 mL.

AGRADECIMENTOS

Ao LabCQ (Laboratório de Controle de Fármacos e Medicamentos) e ao LADEG (Laboratório de Desenvolvimento Galênico) pelo suporte técnico e financeiro deste trabalho.

REFERÊNCIAS

1. Genc, H.; Cakit, B. D.; Nacir, B.; Saracoglu, M.; Kakar, M.; Erdem, H. R.; *Clin. Rheumatol.* **2007**, *26*, 1104.
2. Bakar, O.; Gurbuz, O.; *J. Am. Academy Dermatol.* **2007**, *57*, 703.
3. Trinches, R. C.; Saeger, S. C.; Pereira, S. C.; Barros, R. C.; Chiavegato, L. F.; Lima, L. M. T.; *Int. J. Pharm. Compd.* **2004**, *6*, 198.
4. Wong, D.; Larrabee, S.; Cliffdord, K.; Tremblay, J.; Friend, D. R.; *J. Controlled Release* **1996**, *47*, 173.
5. Kumagai, S.; Komada, F.; Kita, T.; Morinobu, A.; Ozaki, S.; Ishida, H.; Sano, H.; Matsubara, T.; Okumura, K.; *Pharm. Res.* **2004**, *21*, 324.
6. *The Merck Index*; 13th, ed., Merck & Co.: New Jersey, 2001.
7. Clarysse, S.; Brouwers, J.; Tack, J.; Annaert, P.; Augustijns, P.; *Eur. J. Pharm. Sci.* **2011**, *43*, 260.
8. <http://www.usp.org/USPNF/submitMonograph/newMon.html>, acessada em Junho 2011.
9. Ruela, A. L. M.; Araújo, M. B.; Pereira, G. R.; *Quim. Nova* **2009**, *32*, 165.
10. Lanças, F. M.; *Cromatografia Líquida Moderna: HPLC/CLAE*, Átomo: São Paulo, 2009.
11. Dahan, A.; Amidon, G. L.; *Int. J. Pharm.* **2010**, *386*, 216.
12. Polonini, H. C.; Santos, F. C.; Vaz, U. P.; Brandão, M. A.; Raposo, N. R. B.; Ferreira, A. O.; *Quim. Nova* **2011**, *34*, 516.
13. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA; RE nº 899, de 29/05/2003: *Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos*, Ministério da Saúde: Brasil, 2003.
14. Ribani, M.; Bottoli, C. B. G.; Collins, H. C.; Jardim, I. C. S. F.; Melo, L. F. C.; *Quim. Nova* **2004**, *27*, 771.
15. Oliveira, M. A. C.; Loewn, M. T. R.; Cabral, L. M.; Santos, E. M.; Rodrigues, C. R.; Castro, H. C.; Santos, T. C.; *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2005**, *38*, 751.
16. 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.
17. <http://portal.anvisa.gov.br/home/medicamentos>, acessada em Junho 2011.
18. *The United States Pharmacopeia*, 34th ed., United States Pharmacopoeial Convention: Rockville, 2011.
19. http://www.anvisa.gov.br/hotsite/cd_farmacopeia/index.htm, acessada em Junho 2011.