

Validação de método espectrométrico para quantificação de um derivado de N-acilhidrazona

Gisele Jacinto de Araújo^[1], Renata Joyce Diniz Silva^[2], Ricardo Olímpio de Moura^[3], José Germano Vêras Neto^{[4]*}

^[1] giselearaujo2013@gmail.com, ^[2] renatarjds@gmail.com, ^[3] ricardo.olimpiodemoura@servidor.uepb.edu.br, ^[4] germano@servidor.uepb.edu.br. Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), Brasil

* autor correspondente

Resumo

O desenvolvimento de métodos de quantificação é de extrema importância para o controle de qualidade de insumos farmacêuticos ativos, principalmente quando são de moléculas recém-sintetizadas. Nesse sentido, o objetivo deste trabalho foi desenvolver e validar um método analítico para quantificação do composto N'-(1H-indol-3yl)metileno)-2-cianoacetohidrazida (JR-19). O método foi baseado na espectrometria UV como técnica analítica. Para obtenção dos espectros de absorção foi utilizado espectrofotômetro Shimadzu UV-1280, na faixa de 190 a 350 nm, utilizando DMSO como solvente e validação realizada seguindo os parâmetros preconizados pelas normas RDC 166, ISSO 17025 e DOQ-CGCRE-008. O comprimento de onda de máxima absorção foi em 311 nm. Em relação ao estudo de estabilidade de 8 horas foi possível identificar que a solução fica estável a partir de 60 minutos. Para estabilidade das soluções por 14 dias ficou demonstrado que a solução armazenada em temperatura ambiente, com ou sem proteção da luz, permanece estável. O método seguiu o processo de validação a partir da linearidade, faixa linear de trabalho, limites de detecção e de quantificação, precisão intermediária, exatidão e robustez. O método desenvolvido seguiu curva de calibração de 2,00 a 17,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$, com coeficiente de correlação de 0,991 e regressão significativa e sem falta de ajuste a partir da Análise de Variância. Também foi observado que os resíduos possuem distribuição normal com os dados homocedásticos demonstrando a significância estatística da curva ajustada. Os limites de detecção e quantificação foram 0,58 e 1,77 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. O método desenvolvido apresentou coeficientes de variação inferiores a 5% a partir do estudo de precisão intermediária. A exatidão foi avaliada a partir de teste de recuperação, obtendo um valor médio de 93,74%. A robustez do método foi avaliada a partir de duas distintas marcas de solventes e dois comprimentos de onda ao redor do obtido no modelo desenvolvido e não foram observadas diferenças significativas nos resultados. Em conclusão, o método desenvolvido para determinação quantitativa da molécula JR-19 atendeu aos requisitos de qualidade preconizados pelas normas nacionais nos parâmetros estudados para validação.

Palavras-chave: calibração univariada; controle de qualidade; espectrometria UV; quantificação; regressão linear.

Validation of a spectrometric method for quantification of an n-acylhydrazone derivative

Abstract

The development of quantification methods is extremely important for the quality control of active pharmaceutical ingredients, especially when they are newly synthesized molecules. In this sense, the objective of this work was to develop and validate an analytical method for quantification of the compound N'-(1H-indol-3yl)methylene)-2-cyanoacetohydrazide (JR-19). The method was based on UV spectrometry as analytical technique. A Shimadzu UV-1280 spectrophotometer was used to obtain the absorption spectra in the range 190-350 nm, using DMSO as solvent and validation performed following the parameters recommended by the RDC 166, ISO 17025 and DOQ-CGCRE-008. The wavelength of maximum absorption was at 311 nm. In relation to the 8-hour stability study, it was possible to identify that the solution is stable after 60 minutes. For the stability of the solutions for 14 days it was demonstrated that the solution stored at room temperature, with or without light protection, remains stable. The method followed the validation process based on linearity, linear working range, limits of detection and quantification, intermediate precision, accuracy and

robustness. The developed method followed a calibration curve from 2.00 to 17.00 $\mu\text{g mL}^{-1}$, with a correlation coefficient of 0.991 and significant regression with no lack of fit from the Analysis of Variance. It was also observed that the residuals have a normal distribution with homoscedastic data, demonstrating the statistical significance of the fitted curve. The limits of detection and quantification were 0.58 and 1.77 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectively. The developed method showed coefficients of variation less than 5% from the intermediate precision study. The accuracy was evaluated from recovery test, obtaining an average value of 93.74%. The robustness of the method was evaluated from two different brands of solvents and two wavelengths around the one obtained in the developed model and no significant differences in the results were observed. In conclusion, the method developed to quantify JR-19 molecule met the quality requirements recommended by national standards in the parameters studied for validation.

Keywords: linear regression; quality control; quantification; univariate calibration; UV spectrometry.

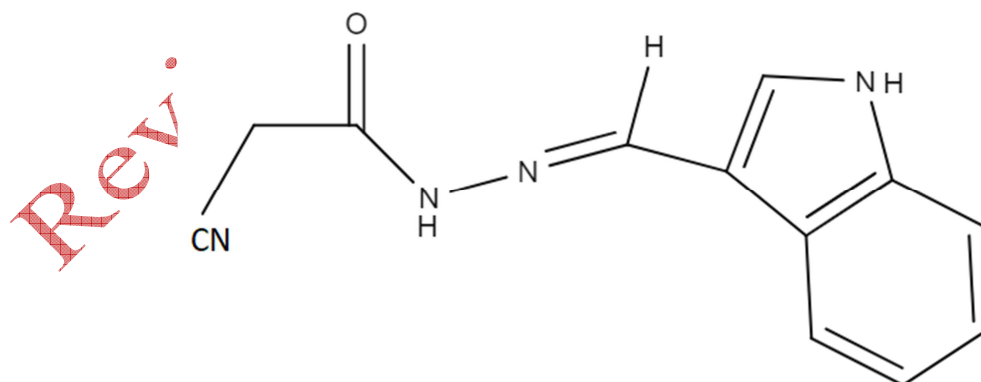
1 Introdução

A maioria dos insumos farmacêuticos ativos presentes em medicamentos é obtida a partir da síntese de moléculas. Esses compostos se baseiam em um esqueleto estrutural, com atividade biológica comprovada, em que são promovidas modificações a partir de estudos empíricos e/ou teóricos. Nesse sentido, uma estrutura molecular bastante utilizada na síntese de moléculas biologicamente ativas são os compostos acilhidrazônicos, derivados das N-acilhidrazonas (ARRUDA *et al.*, 2020).

Diversas N-acilhidrazonas possuem ação analgésica, anti-inflamatória, antimicrobiana, e antitumoral (HOSNY; EL MORSY; SHERIF, 2015; MEIRA *et al.*, 2018; NASTASA *et al.*, 2015; RODRIGUES *et al.*, 2016; SILVA *et al.*, 2015). Portanto, essas moléculas possuem uma estrutura biologicamente ativa privilegiada devido a presença de diversos tipos de ligantes que atuam em diferentes receptores celulares. Neste sentido, muitos estudos foram publicados com sínteses de derivados N-acilhidrazônicos (AARJANE *et al.*, 2020; COIMBRA *et al.*, 2019; MAIA; TESCH; FRAGA, 2014; PEDREIRA *et al.*, 2021).

Uma parte das sínteses de N-acilhidrazonas envolvem moléculas com possíveis aplicações em tratamento de neoplasias. Por exemplo, Moraes *et al.* (2018) propuseram uma nova rota de síntese baseando-se na reação de condensação entre o composto cianoacetohidrazida e o carboxialdeído 3-indol sob catálise de ácido acético e etanol. Essa reação ocorre em 12 horas sob agitação magnética e o precipitado formado na reação é removido por filtração, lavado com água destilada e seco em dessecador sob vácuo, obtendo um pó amarelo cristalino nomeado como N'-(1H-indol-3yl)metileno)-2-cianoacetohidrazida (JR-19), com a estrutura molecular apresentada na Figura 1.

Figura 1 – Estrutura química do derivado N'-(1H-indol-3yl) metileno)-2- cianoacetohidrazida (JR-19)



Fonte: elaborado pelos autores

A JR-19 em estudos iniciais apresentou-se como uma molécula com potencial para ser utilizada para tratar lesões cutâneas. Assim, é possível obter curativos biocompatíveis de baixo custo para cicatrização de feridas, apresentando ações antibacteriana, antifúngica, anti-inflamatória e analgésica (ASSIS *et al.*, 2021; WANDERLEY *et al.*, 2019).

Entretanto, moléculas recém-sintetizadas não apresentam métodos analíticos validados para sua quantificação. Neste sentido, pesquisas que proponham o desenvolvimento de métodos analíticos de baixo custo rápidos, precisos e exatos são importantes para permitir que as moléculas bioativas possam ser comercializadas em formulações farmacêuticas. Vale ressaltar que é necessária a quantificação da molécula por parte da indústria desde a etapa de formulação até a comercialização do produto acabado e dos órgãos de fiscalização para garantir a qualidade aos consumidores finais.

Os métodos analíticos são utilizados na determinação qualitativa, semi-quantitativa e/ou quantitativa de moléculas, insumos e excipientes em formulações farmacêuticas, sendo realizados a partir de técnicas analíticas apropriadas (SIDDIQUI; ALOTHMAN; RAHMAN, 2017). Dentre estas, uma das técnicas mais simples, econômicas, eficazes e eficientes é a espectrofotometria de absorção molecular na região do ultravioleta (EAM UV). Esta técnica se apresenta como uma das técnicas mais utilizadas em análises farmacêuticas, sendo útil e simples para a determinação da concentração de moléculas em uma solução (MOHAMMED, 2018), tendo como princípio básico a absorção da radiação por parte de um analito ou de um conjunto de espécies químicas, associada a transições eletrônicas na camada de valência (ATOLE; RAJPUT, 2018). A quantidade de radiação absorvida, na região de 200 a 400 nm para a região do ultravioleta, é proporcional à quantidade existente da molécula, se obedecida a lei de Bouguer-Lambert-Beer.

Contudo, a qualidade de um método analítico deve ser comprovada e demonstrada a partir de evidência documentada, denominada de validação. Assim, o método é submetido a etapas de avaliação de critérios quantitativos da qualidade a partir de normas e procedimentos descritos por órgãos nacionais de fiscalização. No Brasil, a validação de métodos analíticos em amostras com interesse farmacêutico é regulamentada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) com normas harmonizadas com as do Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Instrumental (INMETRO) (BRASIL, 2017; DELGADO-GOMEZ *et al.*, 2022; INMETRO, 2020).

As figuras de mérito são os indicadores de desempenho de um método analítico, dentre as quais podem ser citadas: linearidade, precisão, exatidão, sensibilidade, limite de detecção, limite de quantificação (FRANCO *et al.*, 2019; INMETRO, 2020; BRASIL, 2017).

Sendo assim, esta pesquisa objetivou desenvolver e validar um método espectrométrico na região espectral no ultravioleta para quantificar N'-(1H-indol-3yl)metileno)-2-cianoacetohidrazida (JR-19).

Nas seções posteriores, será relatada uma fundamentação teórica que apresenta trabalhos publicados que desenvolvem e validam métodos espectrométricos para quantificação de fármacos (seção 2). Segue-se na seção 3, a descrição da metodologia empregada utilizando figuras de mérito e métricas indicadas nas normas nacionais da ANVISA, harmonizada com INMETRO e organismos internacionais. A seção 4 apresenta os resultados para validar o método estudado, desde a escolha do comprimento de onda utilizado até as métricas de validação do método analítico, com as considerações finais deste trabalho na seção 5.

2 Fundamentação teórica

Na revisão de literatura, é possível encontrar inúmeras publicações de métodos que utilizam a Espectrometria de Absorção Molecular para determinação de insumos farmacêuticos ativos.

Adégholagun *et al.* (2018) desenvolveram um novo método espectrofotométrico para a determinação de gabapentina usando ácido cromotrópico em 470 nm. A faixa linear de trabalho obtido no estudo foi de 1,00 a 6,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$ usando 6 níveis de concentração. Os limites de detecção e quantificação foram 0,29 e 0,87 $\mu\text{g mL}^{-1}$ com coeficiente de determinação igual a 0,998. O método foi preciso com intervalo de recuperação de 97,60-103,10%; as precisões intra-dia e inter-dia foram inferiores a 0,65% de desvio padrão e não mostraram diferença estatística quando comparado com o método de referência na análise das formas farmacêuticas.

Goes Junior *et al.* (2019), em seu estudo para a quantificação de ácido acetilsalicílico em formulações farmacêuticas utilizando hidróxido de sódio como solvente em 297 nm. Foram determinadas as figuras de mérito proposta pela RDC (Resolução de Diretoria Colegiada) 166, de 24 de julho de 2017, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (BRASIL, 2017). O método desenvolvido usando três níveis de concentração foi considerado linear na faixa de 24,00 a 36,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$, apresentando bom coeficiente de correlação ($r = 0,999$) e limites adequados de detecção (1,99

$\mu\text{g mL}^{-1}$) e quantificação ($6,57 \mu\text{g mL}^{-1}$). A análise de precisão mostrou baixo coeficiente de variação ($< 2,00\%$) e um bom percentual médio de recuperação ($99,42\%$ - referência e $95,94\%$ - genérico).

Adu *et al.* (2019) desenvolveram um método analítico para determinação de 5-hidroximetil furfural em bebidas de malte enlatadas e sucos de frutas em Gana. No trabalho foi selecionado o comprimento de onda em 284 nm usando seis soluções padrão para preparar a curva analítica. As faixas lineares de trabalho obtidas foram de $1,00\text{-}20,00 \mu\text{g mL}^{-1}$ para o analito em sucos de fruta e $0,132\text{-}0,438 \text{ mg mL}^{-1}$ para bebidas maltadas enlatadas. O método foi validado usando as figuras de mérito especificidade, linearidade, faixa linear de trabalho, precisão, exatidão, robustez e estabilidade da solução.

Kumari e Khansili (2020) propuseram um método para a determinação de vildagliptina em sua forma pura e em formulações farmacêuticas. O meio utilizado para determinar o analito foi ácido clorídrico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ no comprimento de onda em 210 nm . A resposta linear para a faixa de concentração foi de $5 \text{ a } 60 \mu\text{g mL}^{-1}$ usando oito níveis de concentração obteve $0,999$ para o coeficiente de regressão. A exatidão do método usando teste de recuperação ficou entre $98\text{-}101\%$. As precisões intradia e interdia, limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) estavam permitiram definir a faixa linear dentro dos parâmetros de qualidade aceitáveis para o método analítico desenvolvido.

Shulyak *et al.* (2021) desenvolveram um método para determinação de lisinopril em comprimidos. A faixa linear de trabalho validada foi de $20 \text{ a } 100 \mu\text{g mL}^{-1}$ no comprimento de onda de 212 nm . As figuras de mérito linearidade, faixa linear de trabalho, especificidade, exatidão, precisão, LD, LQ e robustez foram usadas para validar o método.

Adegbolagun *et al.* (2020) propuseram um método espectrofotométrico em 470 nm para determinação de gabapentina usando ácido cromotrópico. A faixa linear obtida foi de $1,00 \text{ a } 6,00 \mu\text{g mL}^{-1}$ e no teste de recuperação foram obtidos resultados de $97,60 \text{ a } 103,10\%$ da concentração da solução. A precisão inter e intradia foram abaixo de $0,65\%$, sem diferença estatística entre os valores.

Bhojar, Belgamwar e Trivedi (2022) determinaram e validaram um método para quantificação simultânea de isoniazida e rifampicina em medicamentos. Foram selecionados os comprimentos de onda de $263 \text{ e } 335 \text{ nm}$ nas faixas lineares de trabalho de $4,00\text{-}24,00 \text{ e } 6,00\text{-}36,00 \mu\text{g mL}^{-1}$ para isoniazida e rifampicina, respectivamente. Foram avaliadas as figuras de mérito linearidade, sensibilidade, LD, LQ, precisão e exatidão.

Kumar e Haque (2022) propuseram um método para determinar o cloreto de amitriptilina com água como solvente em 239 nm . A linearidade do método validado foi de $0,50 \text{ a } 2,50 \mu\text{g mL}^{-1}$ com coeficiente de regressão de $0,995$. O teste de recuperação obteve uma faixa de exatidão de $98,00 \text{ a } 102,00\%$ e $0,027 \text{ e } 0,081 \mu\text{g mL}^{-1}$ para LD e LQ, respectivamente. As precisões intradia e interdia ficaram abaixo de $1,80\%$. Assim, os autores concluíram que o método é adequado para análises de rotina atendendo aos requisitos de qualidade definidos nas normas internacionais.

Vidhi e Patel (2021) desenvolveram e validaram um método para a estimativa do etabonato de Remogliflozina, no qual mostra absorvância máxima a 229 nm , utilizando metanol como solvente. A faixa linear foi de $2,00\text{-}10,00 \mu\text{g mL}^{-1}$ e coeficiente de correlação de $0,999$. O resultado da precisão interdia e intradia mostra desvio padrão variando entre $0,05\%$ e $0,25\%$ e entre $0,06\%$ e $0,26\%$ para três concentrações e três repetições. A recuperação percentual foi encontrada na faixa entre $98,94\%$ e $99,86\%$. O LD e o LQ foram de $0,04 \text{ e } 0,11 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente.

Na esteira dos trabalhos publicados e discutidos nesta seção, o presente estudo apresenta o desenvolvimento e validação de um método analítico para quantificação da N'-(1H-indol-3yl)metileno)-2-cianoacetohidrazida (JR-19) baseado na espectrometria de absorção molecular na região do ultravioleta, atendendo as recomendações da RDC nº 166, de 24 de julho de 2017 da ANVISA (BRASIL, 2017).

3 Parte experimental

Nesta pesquisa, a validação de um método para quantificar JR-19 foi desenvolvida seguindo os protocolos indicados pelas normas nacionais e internacionais de metrologia. Foram executados os procedimentos: escolha de solvente que possua estabilidade em 8 horas e 14 dias, seleção do comprimento de onda de trabalho e a validação do método analítico, propriamente dito. As figuras de mérito estudadas foram: linearidade, limite de detecção e limite de quantificação, precisão, exatidão e robustez.

3.1 Reagentes e solventes

O composto JR-19 foi sintetizado e cedido pelo Laboratório de Síntese e Vetorização de Moléculas, da Universidade Estadual da Paraíba e o solvente utilizado foi o dimetilsulfóxido (DMSO) PA (Neon[®] e Vetec[®]).

3.2 Estudo de estabilidade de 8 horas e 14 dias

O estudo de estabilidade em 8 horas foi realizado no espectrofotômetro UV-VIS-NIR da PerkinElmer, modelo Lambda 750, no comprimento de onda de máxima absorção, com medidas a cada 30 segundos ao longo das 8 horas. A estabilidade da solução em 14 dias foi avaliada em termos de duas variáveis. Uma variável estudada foi a manutenção ou não da solução ao abrigo da luz. A segunda variável diz respeito ao armazenamento das amostras em geladeira (2 a 8 °C) ou em temperatura ambiente. As leituras das medidas de absorbância das soluções foram realizadas diariamente em mesmo horário para estabilidade em 14 dias.

3.3 Caracterização espectroscópica

Para obtenção dos espectros de absorção para caracterização espectroscópica e no desenvolvimento do método foi utilizado o espectrofotômetro Shimadzu UV-1280, com detector UV-VIS, na faixa de comprimento de onda de 190 a 350 nm, com intervalo de 1,0 nm, e cubeta de quartzo com caminho óptico de 10 mm.

3.4 Preparo da solução estoque

A solução estoque de 50 µg mL⁻¹, foi preparada solubilizando-se 5,0 mg da molécula JR-19 em uma pequena quantidade de DMSO (10 mL) e a mistura foi transferida para balão volumétrico de 100 mL e completado volume com o mesmo solvente. A partir da solução estoque foram preparadas as soluções de trabalho nas concentrações da faixa de trabalho observadas na caracterização espectroscópica. Para tal, transferiram-se diferentes alíquotas da solução estoque para balões volumétricos de 10 mL, completando o volume da vidraria com DMSO.

3.5 Validação do método analítico por EAM UV

O método foi validado conforme o preconizado pela RDC n° 166, de 24 de julho de 2017 (BRASIL, 2017) e sob orientações da ISO 17025, DOQ-CGCRE-008 (INMETRO, 2020). Todas as análises foram realizadas em triplicata em cada um dos três lotes da molécula sintetizada.

3.5.1 Linearidade

A linearidade foi determinada através da construção da curva de calibração na faixa de trabalho determinada a partir da caracterização espectroscópica. As soluções foram analisadas em triplicata, com medidas obtidas de cada amostra de forma aleatória e com repetições das medidas de branco. Assim, foi estimada a equação da reta por regressão linear a partir do método dos mínimos quadrados e avaliada pela Análise de Variância (ANOVA) para validação do modelo matemático obtido.

3.5.2 Limite de quantificação (LQ) e detecção (LD)

Os limites de detecção e de quantificação foram calculados sob as condições experimentais estabelecidas, efetuando-se 15 leituras correspondentes ao branco (DMSO). As estimativas do LD e do LQ foram determinadas através das Equações 1 e 2, respectivamente:

$$LD = \frac{DP}{b} \times 3,3 \quad (1)$$

$$LQ = \frac{DP}{b} \times 10,0 \quad (2)$$

os quais: b é a inclinação da curva de calibração obtida na equação da reta da curva de calibração e o DP é desvio padrão relativo entre as leituras do branco.

3.5.3 Precisão

A precisão foi avaliada a partir da precisão intermediária. Realizou-se um estudo de comparação entre as leituras de uma mesma concentração realizadas por analistas em turnos e em dias distintos. As soluções de JR-19 foram preparadas em três níveis de concentração (baixo, médio e alto) dentro da faixa de concentração de trabalho obtida. Em seguida, medidas espectrométricas das soluções foram conduzidas no comprimento de onda de máxima absorção definido na varredura espectral, registrando-se os valores das absorbâncias e efetuando-se o cálculo da estimativa do desvio padrão relativo das determinações.

3.5.4 Exatidão

A exatidão do método foi determinada por estudos de recuperação, através da adição de 4 mL de quantidades conhecidas de soluções de diferentes concentrações em 2 mL de solução de menor concentração. Então, as soluções fortificadas foram preparadas em quatro concentrações intermediárias da faixa de trabalho, realizando as leituras para obter as concentrações experimentais a partir da equação da reta que foi obtida na construção da curva de calibração. O cálculo da recuperação se deu a partir da Equação 3.

$$\text{recuperação}(\%) = 100 \times \left(\frac{C1 - C2}{C3} \right) \quad (3)$$

os quais: $C1$ é a concentração do analito na amostra fortificada; $C2$ é a concentração do analito na amostra não fortificada; $C3$ é a concentração do analito adicionado à amostra fortificada.

3.5.5 Robustez

A robustez do método proposto foi determinada pelas mudanças de marca do solvente e de comprimento de onda. As medidas de absorbância foram determinadas, para as duas variáveis em estudo, a partir de três concentrações (níveis baixo, médio e alto). Em termos da escolha dos comprimentos de onda foram avaliados variações de ± 3 nm do comprimento de onda escolhido a partir do método desenvolvido. Assim sendo, foi aplicado planejamento experimental fatorial 3^2 para o estudo de robustez de cada uma das marcas de solvente utilizando, conforme indicado na Tabela 1. O tratamento estatístico foi elaborado utilizando o software STATISTICA[®] versão 12, obtendo os efeitos padronizados (diagramas de Pareto) e as análises estatísticas (superfície de resposta) para avaliação dos resultados, além do teste t pareado para avaliar a diferença entre as duas marcas de solvente nos três comprimentos de onda em três níveis de concentração distintas.

Tabela 1 – Matriz de planejamento 3

Fatores	Níveis		
	-1	0	+1
Comprimento de onda (nm)	$\lambda - 3$	λ	$\lambda + 3$
Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Baixa	média	alta

Fonte: dados da pesquisa

4 Resultados e discussão

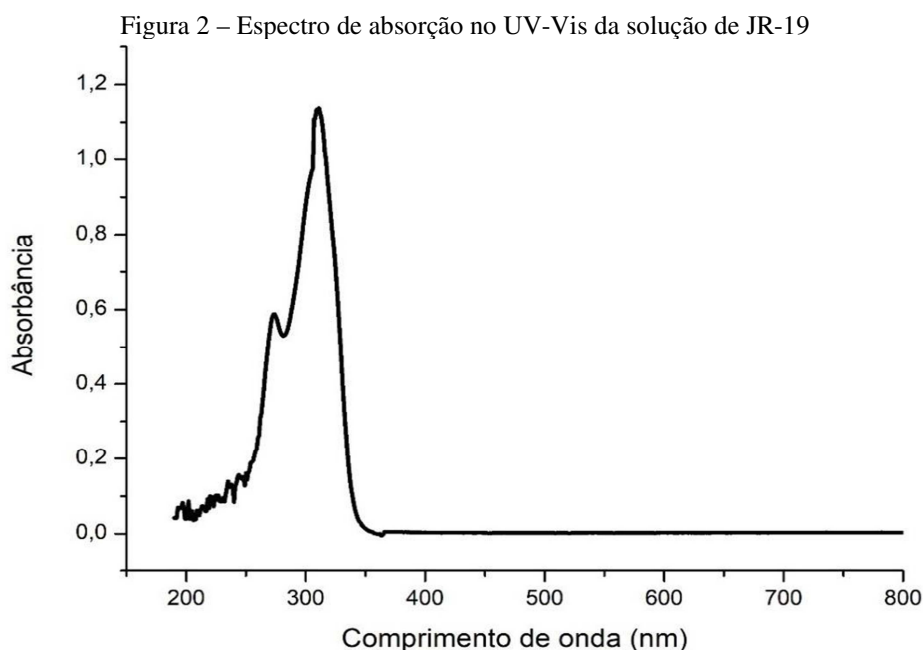
Os dados relativos à escolha das condições de trabalho para desenvolvimento do método analítico são apresentados nesta seção.

4.1 Caracterização espectroscópica

A primeira etapa do desenvolvimento do método analítico foi a escolha do solvente, para tal levou-se em consideração o grau de solubilização do fármaco e custo e toxicidade do solvente. Foram testados os seguintes solventes: metanol, álcool etílico, DMSO e acetato de etila. Todos os solventes

testados solubilizaram adequadamente o JR-19, mas foi escolhido o DMSO, pois apresenta baixa toxicidade e obteve melhor resposta de sinal na faixa do espectro eletromagnético ultravioleta.

Posteriormente, realizou uma varredura espectroscópica no UV-Vis, a fim de definir as bandas de máxima absorção da molécula JR-19 e com isso escolher o comprimento de onda adequado para o trabalho. O espectro da solução de JR-19 em DMSO na faixa de 190 e 350 nm é apresentada na Figura 2. Foi possível observar que 311 nm é o comprimento de onda (λ) máximo obtido e, portanto, foi o escolhido para construção do método analítico.



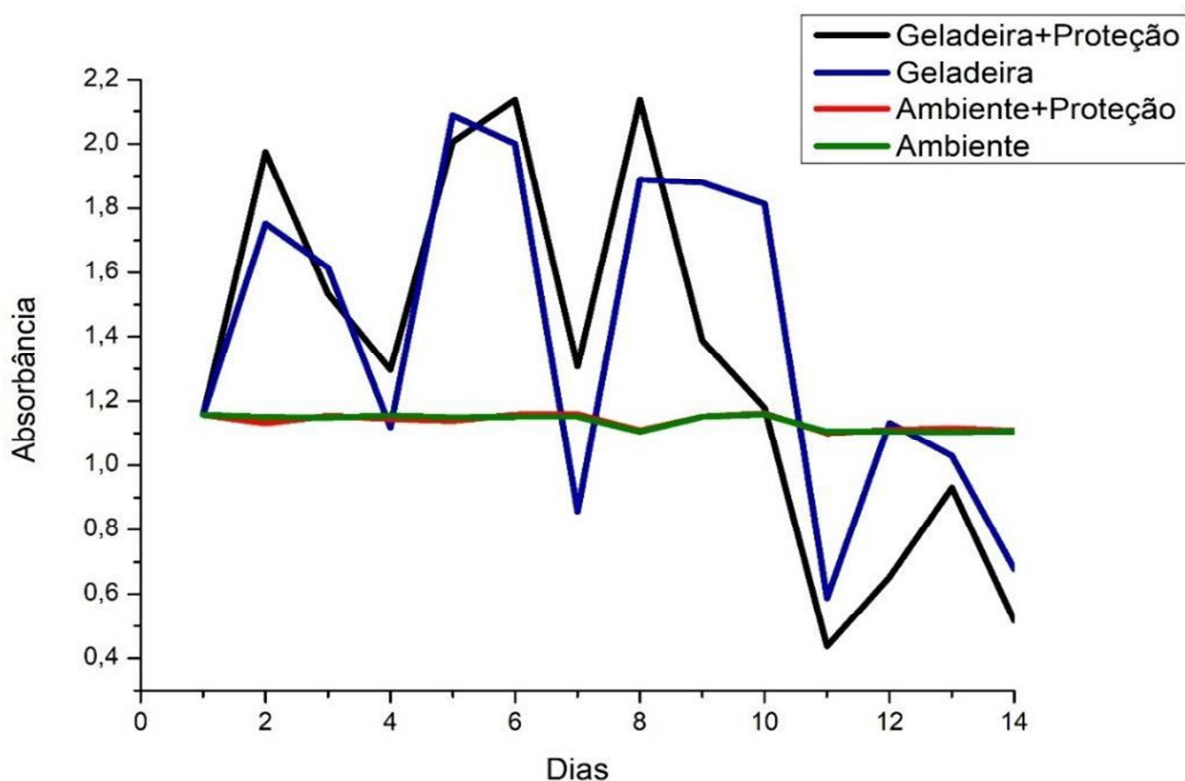
Fonte: dados da pesquisa

4.2 Estabilidade da solução estoque em 8 horas e 14 dias

Para o estudo de estabilidade em 8 horas foi observado o comportamento da absorbância em 311 nm com intervalos de medida de 10 s. As soluções tiveram uma estabilidade do sinal analítico a partir de 60 minutos, sugerindo que na primeira hora ocorre um rearranjo das moléculas do DMSO e da JR-19.

Os resultados referentes à estabilidade da solução de JR-19 em DMSO em 14 dias são apresentados na Figura 3. Em termos da temperatura de manutenção das soluções, as armazenadas na geladeira, ao e sem abrigo da luz, não mantiveram a estabilidade espectral. Já as soluções que ficaram em temperatura ambiente mantiveram a estabilidade, podendo ficar armazenadas com ou sem proteção da luz para ser utilizadas por um período de 14 dias, após o preparo.

Figura 3 – Estabilidade da molécula JR-19 com DMSO em 14 dias



Fonte: dados da pesquisa

4.3 Validação do método analítico por EAM UV

Os dados relativos à validação do método analítico desenvolvido são apresentados nesta seção.

4.3.1 Linearidade

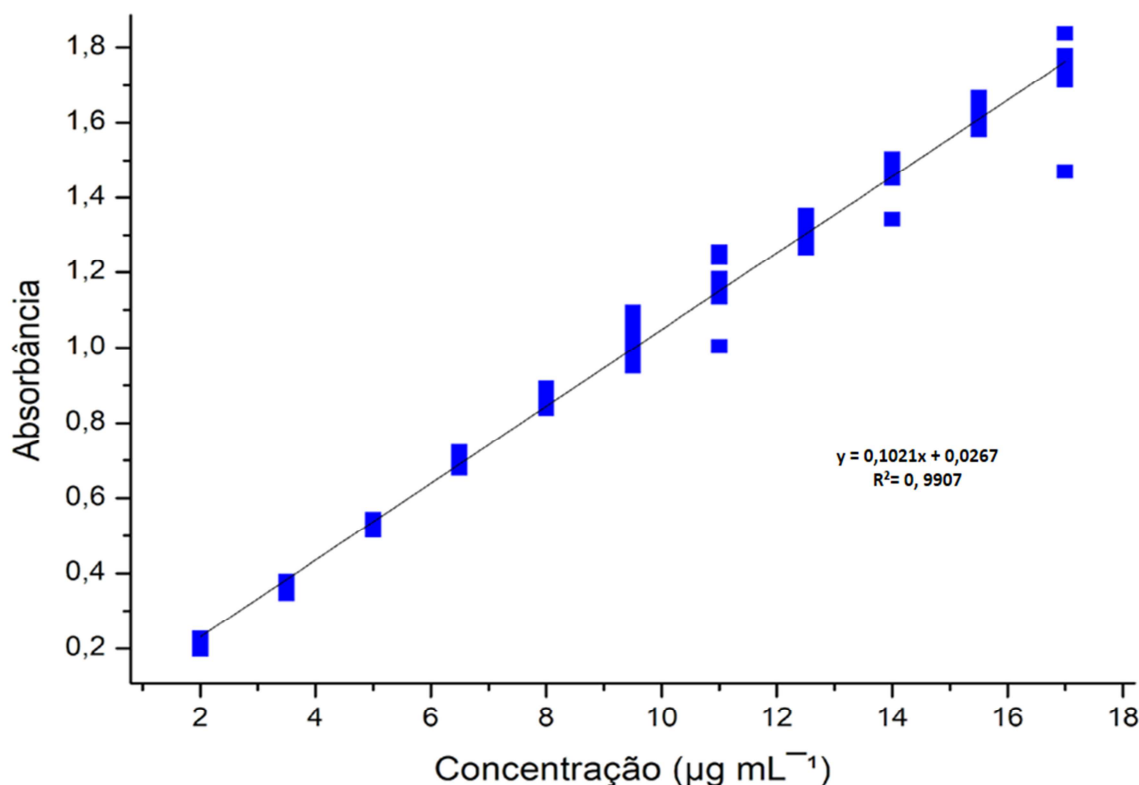
O método exposto apresentou linearidade na faixa de 2,00 a 17,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$, com determinação realizada a partir da curva analítica das absorbâncias médias obtidas dos três lotes da molécula (Figura 5). Observa-se que as medidas de absorbância em 311 nm nas soluções são diretamente proporcionais à concentração do analito. A equação $y = 0,1021x + 0,0267$ foi determinada através do método de mínimos quadrados e com coeficiente de correlação linear de 0,991, estando de acordo com o critério mínimo aceitável do coeficiente de correlação ($r = 0,990$) descrito na resolução para validação de métodos analíticos da ANVISA (BRASIL, 2017).

Consequentemente, a linearidade do método foi confirmada por meio da ANOVA, apresentada na Tabela 2. Visto que o valor de F calculado (10,468,734) foi maior do que o tabelado (3,936), demonstrando que a curva ajustada possui significância estatística, atestando que o método é linear em nível de confiança de 95%. Corroborando a esses dados, o teste de falta de ajuste observou que o F calculado (2,065) foi menor do que o tabelado (5,117), evidenciando que o modelo linear é adequado, não havendo falta de ajuste.

Tabela 2 – Teste de análise de variância (ANOVA)

	Graus de liberdade	Soma quadrática	Média quadrática	F	F tabelado
Regressão	1	23,469	23,469	10,468,734	3,936
Resíduo	97	0,217	0,002		
Falta de ajuste	9	0,038	0,004	2,065	5,117
Erro puro	88	0,180	0,002		
Total	98	23,687			

Fonte: dados da pesquisa

Figura 5 – Curva analítica da solução de JR-19 no intervalo de 2 a 17 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 

Fonte: dados da pesquisa

Como observado, a curva de calibração foi obtida a partir de 11 níveis de concentração, bem superior ao preconizados pelo DOQ-CGCRE-008 que é de no mínimo 5 níveis de concentração. Goes *et al.* (2019) desenvolveram um método para determinação de ácido acetilsalicílico utilizaram sete níveis de concentração, Adegbolagun *et al.* (2018) utilizaram seis níveis de concentração e Majumder *et al.* (2020) utilizaram 5 níveis.

4.3.2 Limite de quantificação e detecção

Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram obtidos a partir da equação da reta da curva analítica e do desvio padrão das medidas de branco. Para estes parâmetros os valores calculados foram de 0,58 e 1,77 $\mu\text{g mL}^{-1}$, LD e LQ, respectivamente. A menor concentração da faixa de trabalho foi superior ao LQ obtido sugerindo que a solução com menor concentração pode ser utilizada no desenvolvimento do método analítico.

Quando comparamos com outros estudos como o de Goes *et al.* (2019) que obtiveram 6,57 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para LQ e 1,99 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para LD e Majumder *et al.* (2020) que foram de 0,861 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 2.872 $\mu\text{g mL}^{-1}$, para LD e LQ, respectivamente, considerando uma alta sensibilidade no método proposto.

4.3.3 Precisão

A precisão intermediária do método teve como objetivo avaliar a proximidade dos valores obtidos nas leituras de absorbâncias realizadas em dois dias, nos turnos manhã e tarde com dois analistas e três faixas de concentrações para os três lotes da molécula. A Tabela 3 apresenta os resultados das médias das absorbâncias e dos valores de coeficiente de variação (%) obtidos. Os coeficientes de variação para todas as medidas realizadas e lotes foram inferiores a 5%, com valor médio de 1,92%, o que determina que o método analítico exposto é preciso e está de acordo com as recomendações da ANVISA.

Tabela 3 – Precisão intermediária para os três lotes da molécula JR-19

Concentração $\mu\text{g mL}^{-1}$ (CV, %)
--

	Turno	Analista	2 $\mu\text{g mL}^{-1}$	9,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$	17 $\mu\text{g mL}^{-1}$
Dia 1	manhã	1	2,48 (2,67)	10,41 (0,85)	18,35 (2,51)
		2	1,89 (1,48)	10,22 (1,09)	18,35 (3,05)
	tarde	1	2,19 (0,84)	10,31 (2,46)	18,15 (1,56)
		2	1,99 (2,70)	9,92 (1,69)	17,66 (2,09)
Dia 2	manhã	1	1,89 (2,75)	9,24 (1,81)	16,98 (0,70)
		2	1,80 (3,10)	8,75 (1,37)	17,07 (1,44)
	tarde	1	1,99 (3,23)	8,85 (1,05)	16,39 (1,02)
		2	1,89 (3,90)	9,04 (1,21)	16,89 (1,47)

Fonte: dados da pesquisa

4.3.4 Exatidão

A exatidão do método foi determinada por estudos de recuperação, estando relacionado à quantidade de analito que é recuperado no processo em relação a quantidade real presente. Nesse sentido foram obtidas as concentrações teóricas e as experimentais destas soluções fortificadas, estando apresentadas na Tabela 4. Os resultados se apresentam adequados em termos de exatidão visto que o valor médio de recuperação (93,74%) para os três lotes, estando dentro da faixa de 80 a 110%, recomendada pela legislação.

Tabela 4 – Resultados referente a exatidão do método

	Concentração da amostra fortificada ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Concentração da amostra não adicionada ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Concentração adicionada ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Recuperação (%)
Lote 1	2,61	1,65	0,73	130,77
	2,70	1,65	1,00	105,03
	3,24	1,65	1,37	116,11
	3,47	1,65	1,66	109,31
	3,81	1,65	1,91	112,99
Lote 2	2,07	1,59	0,67	71,72
	2,47	1,59	0,97	91,24
	2,69	1,59	1,28	85,96
	2,74	1,59	1,44	80,69
	3,23	1,59	1,85	88,71
Lote 3	2,55	1,93	0,65	96,00
	2,83	1,93	0,97	93,96
	3,06	1,93	1,19	95,1
	3,29	1,93	1,45	93,53
	3,46	1,93	1,79	85,64

Fonte: dados da pesquisa

4.3.5 Robustez

Para a avaliação da robustez foi realizado um planejamento 3^2 para cada marca de DMSO utilizada, com 9 experimentos cada. As respostas obtidas estão apresentadas na Tabela 5. Os coeficientes de variação apresentados foram menores que 5%, com isso pode-se afirmar que não ocorreu alteração estatisticamente significativa entre as soluções preparadas com DMSO em duas marcas distintas. O teste t -pareado observou uma associação dos solventes ($p = 0,975$), corroborando com os resultados apresentados.

Tabela 5 – Absorbâncias das soluções obtidas a partir do planejamento experimental 3^2 para as duas marcas de solvente

Experimento	Comprimento de onda (nm)	Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Resposta Marca 1	Resposta Marca 2	DP (CV, %)
1	314	9,50	0,933	1,000	0,047 (4,72)
2	311	14,00	1,441	1,471	0,021 (2,11)
3	308	9,50	0,948	0,959	0,007 (0,74)

4	314	14,00	1,383	1,422	0,027 (2,74)
5	311	3,50	0,352	0,366	0,010 (0,99)
6	314	3,50	0,360	0,352	0,005 (0,52)
7	311	9,50	0,978	0,950	0,019 (1,93)
8	308	3,50	0,350	0,363	0,009 (0,89)
9	308	14,00	1,386	1,403	0,012 (1,20)

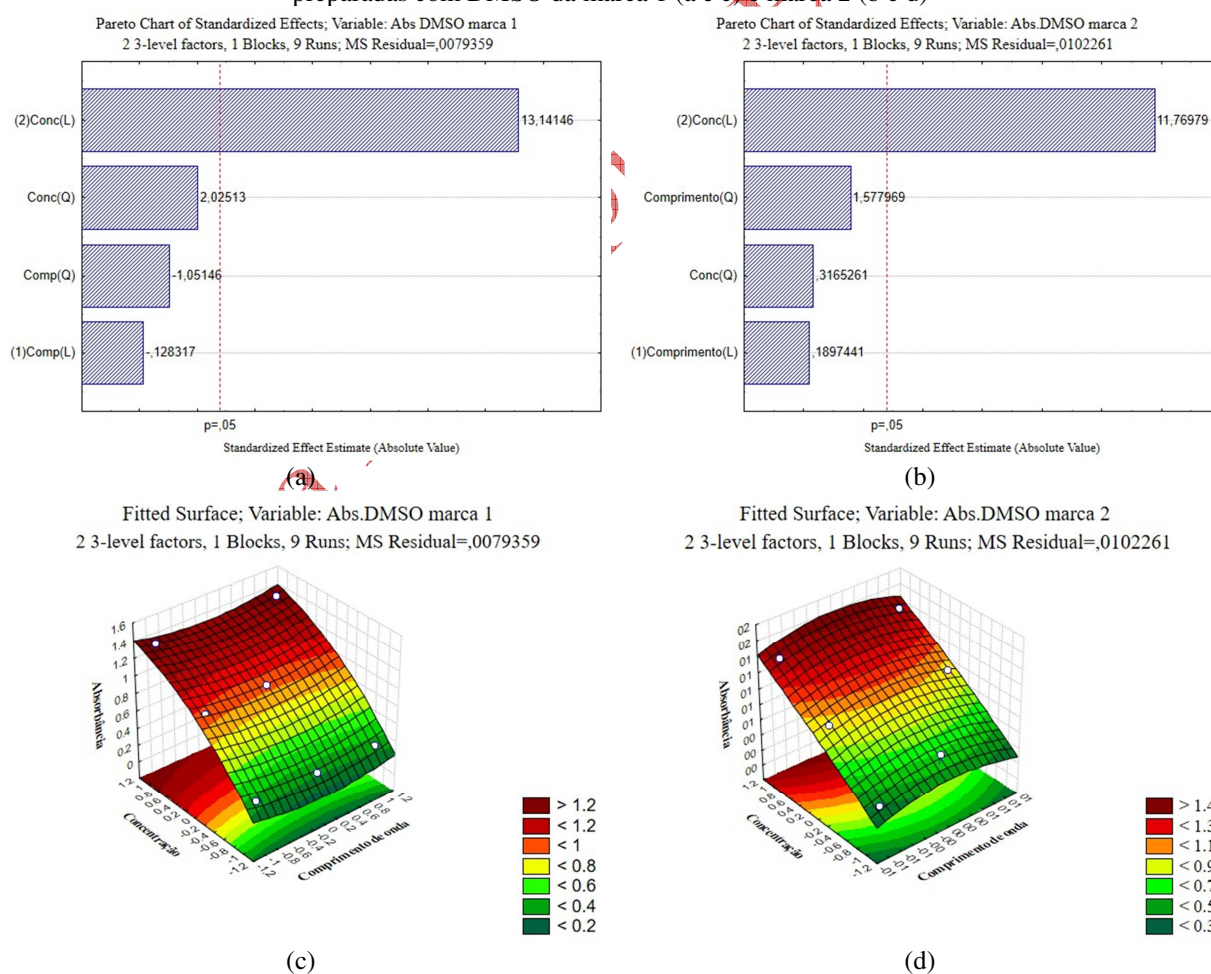
Resposta = Absorbância; DP= Desvio Padrão; CV=Coeficiente de Variação.

Fonte: dados da pesquisa

Complementando o estudo de robustez, os diagramas de Pareto apresentados na Figura 6 (a-b) mostraram que nas condições estudadas a concentração, e sua interação linear, exerceu uma influência positiva sobre o sinal de absorbância, sendo a concentração mais significativa estatisticamente para os solventes utilizados. Assim, os resultados foram equivalentes para ambos solventes, não existindo diferença estatisticamente significativa. Corroborando a esses resultados, os gráficos de superfície de resposta, Figura 6 (c-d), demonstraram que a concentração exerce uma influência na resposta, de modo que à medida que aumenta concentração a resposta também aumenta.

Em termos da variação do comprimento de onda é possível observar que esta variação não exerceu influência estatisticamente significativa sobre as absorbâncias das soluções.

Figura 6 – Diagrama de Pareto e gráfico de superfície de resposta referente ao planejamento 3^2 das soluções preparadas com DMSO da marca 1 (a e c) e marca 2 (b e d)



Conc= Concentração; Comprimento=comprimento de onda; L = Interação linear; Q = Interação quadrática

Fonte: dados da pesquisa

5 Conclusão

O método de análise proposto para quantificação do derivado JR-19 em DMSO foi desenvolvido e validado a partir da utilização da espectrometria de absorção molecular na região do ultravioleta.

O solvente utilizado no trabalho foi DMSO, pois manteve as soluções do JR-19 estáveis em curto (8 horas) e médio (14 dias) prazos. O comprimento de onda de trabalho foi o de máxima absorção das soluções, em 311 nm. Todas as métricas das figuras de mérito obtidas alcançaram os parâmetros preconizados pela ANVISA.

O método foi linear na faixa de concentração de JR-19 em DMSO de 2,00 a 17,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$ sendo o menor valor superior a LD (0,58 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e LQ (1,77 $\mu\text{g mL}^{-1}$). O Coeficiente de Variação do método desenvolvido ficou com valor médio de 1,92% em termos de precisão e no teste de recuperação obteve-se 93,74% em termos de exatidão, todos dois parâmetros dentro dos limites aceitáveis pela ANVISA.

Por fim, quando alterações de comprimento de onda e de marca de solvente foram executadas os resultados apresentados não sofreram variação estatisticamente significativa, indicando que o método é robusto em termos desses dois parâmetros.

O método proposto, portanto, pode ser aplicado na quantificação do JR-19 em formulações farmacêuticas, sendo o próximo passo da pesquisa que o grupo de trabalho está desenvolvendo. Também é possível, a partir dos resultados, a possibilidade de desenvolvimento de métodos analíticos utilizando espectroscopia de absorção molecular na região do ultravioleta para moléculas similares a esta apresentada neste manuscrito e que já foram sintetizadas.

Financiamento

Esta pesquisa recebeu apoio da Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado da Paraíba (FAPESQ) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Conflito de interesses

Os autores declaram não haver conflito de interesses.

Referências

AARJANE, M.; AOUIDATE, A.; SLASSI, S.; AMINE, A. Synthesis, antibacterial evaluation, in silico admet and molecular docking studies of new n-acylhydrazone derivatives from acridone. *Arabian Journal of Chemistry*, v. 13, n. 7, p. 6236-6245, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.arabjoc.2020.05.034>.

ADEGBOLAGUN, O. M.; THOMAS, O. E.; AIYENALE, E. O.; ADEGOKE, O. A. A new spectrophotometric method for the determination of gabapentin using chromotropic acid. *Acta Pharmaceutica Scientia*, v. 56, n. 3, p. 93-110, 2018. DOI: <https://doi.org/10.23893/1307-2080.APS.05624>.

ADU, J. K.; AMENGOR, C. D. K.; ORMAN, E.; IBRAHIM, N. M.; IFUNANYA, M. O.; ARTHUR, D. F. Development and validation of UV-visible spectrophotometric method for the determination of 5-hydroxymethyl furfural content in canned malt drinks and fruit juices in Ghana. *Journal of Food Quality*, v. 2019, 1467053, 8 p., 2019. DOI: <https://doi.org/10.1155/2019/1467053>.

ARRUDA, I. E.; MACEDO, B. V. S.; MACEDO, J. C.; CAMPOS, W. R. A.; ARAÚJO, C. R. M.; ASSIS, A. G. Preparação de hidrazona e n-acilhidrazona usando fármacos comerciais como reagentes: aulas práticas de síntese de compostos bioativos. *Química Nova*, v. 43, n. 5, p. 642-648, 2020. DOI: <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170497>.

ASSIS, A. C. L.; MOREIRA, L. M. C. C.; ROCHA, B. P.; PEREIRA, M. R. B.; MELO, D. F.; MOURA, R. O.; AZEVEDO, E. P.; OSHIRO-JUNIOR, J. A.; DAMASCENO, B. P. G. L. N-acylhydrazone derivative-loaded cellulose acetate films: thermoanalytical, spectroscopic, mechanical

and morphological characterization. **Polymers**, v. 13, n. 14, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/polym13142345>.

ATOLE, D. M.; RAJPUT, H. H. Ultraviolet spectroscopy and its pharmaceutical applications - a brief review. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, v. 11, n. 2, p. 59-66, 2018. DOI: <https://doi.org/10.22159/ajpcr.2018.v11i2.21361>.

BHOYAR, V.; BELGAMWAR, V. S.; TRIVEDI, S. Simultaneous determination and validation of anti-tubercular drugs in simulated lungs alveolar macrophages fluid by ultraviolet-visible spectrophotometric method. **Journal of Applied Spectroscopy**, v. 89, n. 5, p. 892-897, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10812-022-01444-z>.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada Nº. 166, de 24 de julho de 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 25 de julho de 2017. Disponível em: https://www.in.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/19194581/doi-2017-07-25-resolucao-rdc-n-166-de-24-de-julho-de-2017-19194412. Acesso em: 20 jan. 2022.

COIMBRA, E. S.; SOUZA, M. V. N.; TERROR, M. S.; PINHEIRO, A. C.; GRANADO, J. T. Synthesis, biological activity, and mechanism of action of new 2-pyrimidinyl hydrazone and N-acylhydrazone derivatives, a potent and new classes of antileishmanial agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 184, p. 111742, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.111742>.

DELGADO-GOMEZ, B. S.; LOPEZ-ESPINOSA, N. L.; CASTRO-BEAR, V.; LEMUS, O. Z.; Validation of three analytical methods for quantification of acetaminophen by UV spectrophotometry. **Ars Pharmaceutica**, v. 63, n. 2, p. 152-165, 2022. DOI: <https://doi.org/10.30827/ars.v63i2.21983>.

FRANCO, E. S.; FERREIRA, A. F. A.; SILVA, D. F.; CAMARGO, J. A.; PÁDUA, V. L.; RODRIGUES, J. L.; RODRIGUEZ, M. V.; GIANI, A. Validação de método analítico por ell-cg-em para detecção de trihalometanos decorrentes da cloração de águas contendo Microcystis. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, v. 24, n. 6, p. 1003-1012, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1413-41522019175794>.

GOES JUNIOR, E. J. A.; ROEDER, J. S.; OLIVEIRA, K. B. L.; FERREIRA, M. P.; SILVA, J. G. Validação de método espectrofotométrico de análise para a quantificação de ácido acetilsalicílico em formulações farmacêuticas: uma proposta de aula experimental para análise instrumental. **Quimica Nova**, v. 42, n. 1, p. 99-104, 2019. DOI: <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170300>.

HOSNY, N. M.; EL MORSY, E. S. A.; SHERIF, Y. E. Synthesis, spectral, optical and anti-inflammatory activity of complexes derived from 2-aminoenzohydrazide with some rare earths. **Journal of Rare Earth**, v. 33, n. 7, p. 758-764, 2015. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1002-0721\(14\)60482-8](https://doi.org/10.1016/S1002-0721(14)60482-8).

INMETRO – INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA QUALIDADE E TECNOLOGIA. Coordenação Geral de Acreditação. DOQ-CGCRE-008: Orientação sobre validação de métodos analíticos. **Inmetro**, 30 p., 2020. Disponível em: http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/Cgcre/DOQ/DOQ-Cgcre-8_08.pdf. Acesso em: 02 de janeiro de 2023.

KUMAR, T. D. A.; HAQUE, M. S. Ultraviolet spectrophotometric method for the determination of amitriptyline hydrochloride. **Journal of Applied Spectroscopy**, v. 89, n. 3, p. 476-481, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10812-022-01382-w>.

KUMARI, B.; KHANSILI, A. Analytical method development and validation of uv-visible

spectrophotometric method for the estimation of vildagliptin in gastric medium. **Drug Research**, v. 70, n. 9, p. 417-423, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1055/a-1217-0296>.

MAIA, R. C.; TESCH, R.; FRAGA, C. A. M. Acylhydrazone derivatives: a patent review. **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 24, n. 11, p. 1161-1170, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1517/13543776.2014.959491>.

MAJUMDER, K. K.; SHARMA, J. B.; KUMAR, M.; BHATT, S.; SAINI, V. Development and validation of UV-visible spectrophotometric method for the estimation of curcumin in bulk and pharmaceutical formulation. **Pharmacophore**, v. 11, n. 1, p. 115-121, 2020. Disponível em: <https://pharmacophorejournal.com/LfMmjyr>. Acesso em: 25 jan. 2023.

MEIRA, C. S.; SANTOS-FILHO, J. M.; SOUSA, C. C.; ANJOS, P. S.; CERQUEIRA, J. V.; DIAS NETO, H. A.; SILVEIRA, R. G.; RUSSO, H. M.; WOLFENDER, J. L.; QUEIROZ, E. F.; MOREIRA, D. R. M.; SOARES, M. B. P. Structural design, synthesis and substituent effect of hydrazone-N-acylhydrazones reveal potent immunomodulatory agents. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 26, n. 8, p. 1971-1985, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2018.02.047>.

MOHAMMED, A. M. UV-visible spectrophotometric method and validation of organic compounds. **European Journal of Engineering Research and Science**, v. 3, n. 3, p. 8-11, 2018. DOI: <https://doi.org/10.24018/ejers.2018.3.3.622>.

MORAES, A. D. T. O.; MIRANDA, M. D. S.; JACOB, Í. T. T.; AMORIM, C. A. C.; MOURA, R. O.; SILVA, S. A. S.; SOARES, M. B. P.; ALMEIDA, S. M. V.; SOUZA, T. R. C. L.; OLIVEIRA, J. F.; SILVA, T. G.; MELO, C. M. L.; MOREIRA, D. R. M.; LIMA, M. C. A. Synthesis, in vitro and in vivo biological evaluation, cox-1/2 inhibition and molecular docking study of indole-N-acylhydrazone derivatives. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 26, n. 20, p. 5388-5396, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2018.07.024>.

NASTASA, C.; TIPERCIUC, B.; DUMA, M.; BENEDEC, D.; ONIGA, O. New hydrazones bearing thiazole scaffold: Synthesis, characterization, antimicrobial, and antioxidant investigation. **Molecules**, v. 20, n. 9, p. 17325-17338, 2015. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules200917325>.

PEDREIRA, J. G. B.; SILVA, R. R.; NOËL, F. G.; BARREIRO, E. J. Effect of s-se bioisosteric exchange on affinity and intrinsic efficacy of novel N-acylhydrazone derivatives at the adenosine a2a receptor. **Molecules**, v. 26, n. 23, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules26237364>.

RODRIGUES, D. A.; FERREIRA, G. A. S.; FERREIRA, A. C. S.; FERNANDES, R. A.; KWEE, J. K.; SANTANNA, C. M. R.; IONTA, M.; FRAGA, C. A. M. Design, synthesis, and pharmacological evaluation of novel N-acylhydrazone derivatives as potent histone deacetylase 6/8 dual inhibitors. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 59, n. 2, p. 655-670, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b01525>.

SHULYAK, N.; BUDZIVULA, K.; KRYSKIW, L.; KUCHER, T. Development of spectrophotometric method for determination of lisinopril in tablet dosage form. **Acta Medica Leopoliensia**, v. 28, p. 104-117, 2022. DOI: <https://doi.org/10.25040/aml2022.1-2.104>.

SIDDIQUI, M. R.; ALOTHMAN, Z. A.; RAHMAN, N. Analytical techniques in pharmaceutical analysis: a review. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 10, p. S1409-S1421, 2017. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.arabjc.2013.04.016>.

SILVA, T. F.; JÚNIOR, W. B.; MOREIRA, M. S. A.; COSTA, F. N.; SILVA, C. E. M.; FERREIRA, F. F.; BARROSO, R. C. R.; NOËL, F.; SUDO, R. T.; ZAPATA-SUDO, G.; LIMA, L. M.; BARREIRO, E. J. Novel orally active analgesic and anti-inflammatory cyclohexyl-N-acylhydrazone

derivatives. **Molecules**, v. 20, n. 2, p. 3067-3088, 2015. DOI: DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules20023067>.

VIDHI, D.; PATEL, P. Method development and validation of UV spectrophotometric estimation of remogliflozin etabonate in bulk and its tablet dosage form. **Research Journal of Pharmacy and Technology**, v. 14, n. 4, p. 2042-2044, 2021. DOI: <https://doi.org/10.52711/0974-360X.2021.00362>.

WANDERLEY, D. M. S.; MELO, D. F.; SILVA, L. M.; SILVA, W. C.; CORREIA, L. P.; OSHIRO-JUNIOR, J. A.; FOOK, M. V. L.; MOURA, R. O.; LIMA, R. S. C.; DAMASCENO, B. P. G. L. Physical-chemical characterization of N-acylhydrazone derivative chitosan films using spectroscopic and thermoanalytical techniques. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 138, n. 5, p. 3789-3796, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10973-019-08906-1>.

Revista Principia - Early View