



UNICAMP

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE QUÍMICA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA**



1150059499



IQ

T/UNICAMP So89a

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**“ ANÁLISE QUANTITATIVA DE DICLOFENACO
EM PREPARAÇÕES FARMACÊUTICAS ”**

200413413

Mestrando: RAFAEL LEANDRO DE SOUZA

Orientador: PROF. DR. MATTHIEU TUBINO

ABRIL / 2004

UNIDADE	10
Nº CHAMADA	11/10/2004
	So89a
V	EX
TOMBO BCI	59499
PROC.	16.11.04
C	☐
D	☒
PREÇO	1,00
DATA	13.9.04
Nº CPD	

13.9.04 321874

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE QUÍMICA
UNICAMP**

So89a

Souza, Rafael Leandro de.

Análise quantitativa de diclofenaco em
preparações farmacêuticas / Rafael Leandro de
Souza. – Campinas, SP: [s.n], 2004.

Orientador: Matthieu Tubino.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual
de Campinas, Instituto de Química.

1. Diclofenaco. 2. Espectrofotometria.
3. *Reflectância. 4. *Gravimetria. I. Tubino, Matthieu.
II. Universidade Estadual de Campinas. III. Título.

*Dedico esta tese a todos
que sempre me deram
força e incentivo.
Pai, mãe,
tudo que consegui
foi graças a sua ajuda.
Amo vocês!*

“...

*Feliz do homem que encontrou a sabedoria,
daquele que adquiriu a inteligência,
porque mais vale esse lucro que o da prata,
e o fruto que se obtém é melhor que o fino ouro.*

*Ela é mais preciosa que as pérolas,
jóia alguma a pode igualar.*

*Na mão direita ela sustenta uma longa vida;
na esquerda, riqueza e glória.*

Seus caminhos estão semeados de delícias.

Suas veredas são pacíficas.

É uma árvore de vida para aqueles que lançarem mãos dela.

Quem a ela se apega é um homem feliz...”

*(Provérbios. I - Exortação do sábio educador
3ª exortação do sábio: a prática da sabedoria)*

AGRADECIMENTOS

Palavras me faltam neste momento para expressar o quanto foi gratificante e motivador desenvolver este trabalho orientado pelo professor Matthieu Tubino (o qual só tenho a agradecer estes mais de 4 anos de trabalho conjunto) e, digamos, co-orientado pelo pessoal do laboratório que tanto me ajudou.

Agradeço, é claro, à toda minha família. Meu pai Abdias e minha mãe Sônia que tornaram possível meu sonho e sempre apoiaram minha escolha pela Química. Meus irmãos Flávio e Rodrigo pelo companheirismo na infância e adolescência e que, mesmo estando um pouco distantes de mim agora, estarão sempre nos meus pensamentos.

Aos queridos amigos do laboratório (em ordem alfabética pra não haver risco do último achar que gosto menos dele): Acácia, Adriana Veríssimo, Alvino, Ana Lúcia, Daniella Palombino, Daniela Terzi, Débora Forchetti, Débora Villa, Dri, Juliana, Marcos, Marta Vila, Martha Favaro, Mathias, Mauro, Patrícia, Tânia e principalmente à Wilma cuja ajuda e paciência foram fundamentais.

Aos amigos da república, especialmente à Ana Paula.

Aos amigos do coral Zíper na Boca a quem devo grande parte da minha alegria na UNICAMP. Agradeço em especial à Benigna, ao Filipe, à Alessandra, ao Paulo e à Janussa.

Ao pessoal do grupo de jovens e do grupo de canto da Igreja Santa Isabel de Barão Geraldo que sempre torceu por mim e, com certeza, rezou bastante para que tudo desse certo.

Agradeço também à empresa Nortec que gentilmente cedeu material para o desenvolvimento do trabalho, à professora Suzanne Rath pela ajuda na conclusão do trabalho, ao Instituto de Química da UNICAMP, ao CNPq, à CAPES e FAPESP pelo apoio financeiro e também ao funcionário Ricardo do HPLC.

Enfim, agradeço a todos que de alguma forma me ajudaram direta ou indiretamente neste trabalho.

Ah, claro, não podia esquecer do pessoal da Química 98 UNICAMP, afinal, foram, no mínimo, 4 anos de convivência. Alguns já são mestres, outros quase e outros, bem... este ano se formam! Um abraço para todos, fiquem com Deus!

CURRICULUM VITAE

RAFAEL LEANDRO DE SOUZA

DADOS PESSOAIS

Filiação: Abdias Almeida de Souza e Sônia Aparecida Ducatti de Souza
e-mail: rafasouza98@yahoo.com.br
Grupo de pesquisa: <http://gpquae.iqm.unicamp.br>
Nacionalidade: Brasileiro
Naturalidade: Olímpia - SP
Data de Nascimento: 16/07/1980

FORMAÇÃO ACADÊMICA:

- **Graduação: Licenciatura em Química**
Instituto de Química - Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP
Campinas – SP (1998-2002).
- **Graduação: Bacharelado em Química**
Instituto de Química - Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP
Campinas – SP (1998-2001).

ATIVIDADES CIENTÍFICAS:

- Estágio de Capacitação Docente. Disciplina: Química Clássica, Instituto de Química - UNICAMP, Campinas – SP (03/2003 a 07/2003).
- Iniciação Científica. Título: *Determinação Turbidimétrica Spot – Test Quantitativa de Potássio em Soro Sangüíneo Humano*. Orientação: Prof. Dr. Matthieu Tubino, IQ-UNICAMP. Co-orientação: Prof.^a Dr.^a Nelci F. Hoehr, HC – UNICAMP. Financiamento FAPESP (08/2000 a 12/2001).

TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS:

Souza, R. L. de e Tubino M. *Análise gravimétrica de diclofenaco em medicamentos*, 12º Encontro Nacional de Química Analítica, São Luis – MA. Livro de Resumos OT-03 (2003).

Souza, R. L. de e Tubino M. *Colorimetric quantitative analysis of diclofenac in pharmaceutical preparations*, “4th Congress of Pharmaceutical Sciences”, Ribeirão Preto – SP. Livro de Resumos QB-10 (2003).

Souza, R. L. de e Tubino M. *Determinação espectrofotométrica quantitativa de diclofenaco*, 26ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Poços de Caldas – MG. Livro de Resumos QA-233 (2003).

Souza, R. L. de; Tubino M. e Hoehr, N. F. *Método micro-analítico para determinação quantitativa de potássio em sangue humano*, 25ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Poços de Caldas – MG. Livro de Resumos QA-033 (2002).

Souza, R. L. de; Tubino M. e Hoehr, N. F. *Determinação Turbidimétrica Spot-Test Quantitativa de Potássio em Soro Sangüíneo*, 24ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Poços de Caldas – MG. Livro de Resumos QA-169 (2001).

CURSOS

- Procedimentos Analíticos Limpos: Uma Nova Filosofia, 12º Encontro Nacional de Química Analítica, São Luis – MA (2003). Duração: 6h.
- Contribuição da Química Analítica na Análise de Fármacos, “4th Congress of Pharmaceutical Sciences”, Ribeirão Preto – SP (2003). Duração: 6h.
- O uso da Química Nova na Escola e dos Cadernos Temáticos de QNEsc nas Salas de Aula do Ensino Superior: um Exemplo na Área de “Materiais”, 26ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Poços de Caldas – MG (2003). Duração: 6h.
- Preparo de Amostras, 11º Encontro Nacional de Química Analítica, Campinas – SP (2001). Duração: 6h.
- Química Medicinal, I Semana de Química, Instituto de Química - UNICAMP, Campinas – SP (2001). Duração: 6h.
- Química Forense, 24ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Poços de Caldas – MG (2001). Duração 6h.
- Curso de Gerenciamento Empresarial ministrado pelo Sebrae, Instituto de Química - UNICAMP, Campinas – SP (2000). Duração: 9h.

ARTIGOS EM PERIÓDICOS

- Souza, R. L. de; Tubino M. and Hoehr, N. F. *Rapid Quantitative Turbidimetric Spot Test Analysis of Potassium in Blood Serum*” (submetido para avaliação em janeiro de 2003).

RESUMO

“ANÁLISE QUANTITATIVA DE DICLOFENACO EM PREPARAÇÕES FARMACÊUTICAS”

Autor: Rafael Leandro de Souza

Orientador: Dr. Matthieu Tubino

O diclofenaco é um composto não-esteróide com propriedades anti-reumáticas, antiinflamatórias e antipiréticas. Ele é comercializado na forma de sal de sódio e de potássio. Há na literatura um número significativo de procedimentos analíticos para a quantificação deste princípio ativo, contudo, a maioria destas técnicas é cara e de procedimento relativamente demorado. Existem poucos procedimentos experimentais na região do visível para a sua análise quantitativa. Neste trabalho foram estudados um método espectrofotométrico de transmitância no visível e um método titulométrico para análise de diclofenaco, ambos já descritos na literatura. Foram também desenvolvidos um método gravimétrico e um método reflectométrico no visível. Este último foi realizado usando-se um reflectômetro portátil construído no laboratório. À exceção do método titulométrico, que se baseia em reação com ácido perclórico, os outros estão fundamentados na reação do diclofenaco com íons cobre(II) formando um composto de coloração verde. O estudo do método espectrofotométrico apresentou limite de detecção de $10^{-1} \text{ mg mL}^{-1}$ ($10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$), resposta linear de até $25,0 \text{ mg mL}^{-1}$ ($7,7 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) e estimativa de desvio padrão relativo na ordem de 4%. No estudo do método reflectométrico obtiveram-se respectivamente: $10^{-1} \text{ mg mL}^{-1}$ ($10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$), 18 mg mL^{-1} ($5,5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) e 2,5%. Para o estudo do método gravimétrico foi obtida estimativa de desvio padrão relativo de 8% quando foram usados 50,0 mg do princípio ativo e 1% quando foram usados 200,0 mg do princípio ativo. Para o estudo do método titulométrico a estimativa de desvio obtida foi de 4%. Os procedimentos propostos são de fácil execução e podem ser aplicados em laboratórios com pouca instrumentação. O desenvolvimento de procedimentos com estas características, visa ofertar métodos para o controle de medicamentos existentes no mercado, em face à existência das freqüentes falsificações.

ABSTRACT

“QUANTITATIVE DICLOFENAC ANALYSIS IN PHARMACEUTICAL PREPARATIONS”

Author: Rafael Leandro de Souza

Adviser: Dr. Matthieu Tubino

Diclofenac is a non-steroidal compound with antirheumatic, antiinflammatory and antipyretic properties. It is commercialised as sodium and potassium salts. The literature has a significative number of analytical procedures to quantify this active principle. However, the majority of these techniques are expensive and time consuming. There are few experimental procedures using the visible region of the spectrum for this quantitative analysis. In this work two previously described methods to diclofenac analysis were studied: one spectrophotometric in the visible and one titrimetric method. Two other methods were developed: a gravimetric method and a reflectometric method, also using the visible region of the spectrum. This last was performed using a portable reflectometer constructed in the laboratory. With the exception of the titrimetric method, based on a reaction with perchloric acid, the others are based on the reaction of diclofenac with copper(II) ions producing a green compound. The study of the spectrophotometric method showed detection limits of $10^{-1} \text{ mg mL}^{-1}$ ($10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$), linear response up to $25,0 \text{ mg mL}^{-1}$ ($7,7 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) and relative standard deviation estimation of 4%. In the study of the reflectometric method values of: $10^{-1} \text{ mg mL}^{-1}$ ($10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$), 18 mg mL^{-1} ($5,5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) and 2,5% have been obtained respectively. In the study of the gravimetric method a relative standard deviation estimation of 8% was obtained when 50,0 mg of the active principle was used and 1% when 200,0 mg of the active principle was used. In the titrimetric method the deviation estimation obtained was 4%. All proposed procedures can be easily performed. The development of this kind of methods intends to offer simple procedures for the control of medicines, due to the existence of frequent falsifications.

SUMÁRIO

Capítulo I – OBJETIVOS.....	1
Capítulo II – INTRODUÇÃO	5
1 – Fármacos	7
2 – Diclofenaco: Da descoberta à ação no organismo humano	8
2.1 Descoberta.....	8
2.2 Descrição	8
2.3 Propriedades Físicas.....	9
2.3.1 Espectro no ultravioleta.....	9
2.3.2 Solubilidade.....	9
2.3.3 Constante de dissociação (pKa) e coeficiente de partição.....	10
2.4 Síntese	10
2.5 A resposta inflamatória.....	11
2.6 Ação no organismo humano.....	12
3 – Técnicas analíticas para análise de diclofenaco	13
4 – A reação do diclofenaco com íons de metais da primeira série de transição	14
5 – Técnicas analíticas para análise de diclofenaco empregadas no trabalho.....	16
5.1 Espectrofotometria	16
5.2 Reflectometria	16
5.3 Gravimetria.....	18
5.4 Titulação potenciométrica	18
5.5 Cromatografia líquida de alta eficiência	19

6 – Método de medidas reflectométricas usado neste trabalho	19
7 – Validação em química analítica.....	21
7.1 Linearidade.....	22
7.2 Faixa linear.....	22
7.3 Sensibilidade.....	23
7.4 Limite de detecção	23
7.5 Limite de determinação.....	24
7.6 Seletividade.....	24
7.7 Precisão	25
7.8 Exatidão	25
 Capítulo III – ESTUDO DO MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO	27
1 – Material	30
1.1 Preparo de soluções	30
1.1.1 Solução de acetato de cobre(II) com ácido acético	
9:1 (v/v).....	30
1.1.2 Soluções tampão.....	30
1.1.3 Sais de metais alcalinos	31
1.1.4 Soluções padrão	32
1.2 Aparelhos e acessórios.....	32
2 – Procedimento experimental.....	32
3 – Resultados e discussão	34
3.1 Obtenção de espectros do complexo de diclofenaco de	
cobre(II)	34
3.2 Primeiros estudos.....	35
3.3 Otimização do pH para extração do complexo.....	36
3.4 Otimização da concentração de acetato de cobre(II).....	37

3.5 Estudo do número de extrações do complexo com clorofórmio.....	39
3.6 Estudo da força iônica da solução.....	41
3.7 Figuras de mérito	43

Capítulo IV – ESTUDO DO MÉTODO REFLECTOMÉTRICO 49

1 – Material	51
1.1 Preparo de soluções	51
1.2 Aparelhos e acessórios	51
2 – Procedimento experimental.....	52
2.1 Uso do acessório do espectrofotômetro HP 8254 A Diode Array	52
2.2 Uso do reflectômetro portátil	53
3 – Resultados e discussão	53
3.1 Estudos com acessório de reflectância do espectrofotômetro HP 8254 A	53
3.2 Estudos com reflectômetro portátil	55
3.3 Figuras de mérito	56

Capítulo V – ESTUDO DO MÉTODO GRAVIMÉTRICO 61

1 – Material	63
1.1 Preparo de soluções	63
1.2 Aparelhos e acessórios	63
2 – Procedimento experimental.....	63
3 – Resultados e discussão	64
3.1 Métodos térmicos de análise.....	64
3.2 Otimização no uso da velocidade da centrífuga.....	67

3.3 Estudo da massa constante	68
3.4 Figuras de mérito	68

Capítulo VI – ESTUDO DO MÉTODO DE REFERÊNCIA: TITULAÇÃO POTENCIOMÉTRICA 71

1 – Material	73
1.1 Preparo de soluções	73
1.1.1 Solução de ácido perclórico em ácido acético glacial	73
1.2 Aparelhos e acessórios	73
2 – Procedimento experimental.....	73
3 – Resultados e discussão	74
3.1 Estudos com padrão	74
3.2 Estudos com amostras.....	77
3.3 Figuras de mérito	78

Capítulo VII – MÉTODO DE REFERÊNCIA PARA ESTUDOS DE EXATIDÃO: HPLC 81

1 – Material	83
1.1 Preparo de soluções	83
1.2 Aparelhos e acessórios.....	83
2 – Procedimento experimental.....	83

Capítulo VIII – COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS DE DOIS MÉTODOS DIFERENTES..... 85

Capítulo IX – TRATAMENTO DE RESÍDUOS 89

Capítulo X – PERSPECTIVAS	93
Capítulo XI – CONCLUSÕES	97
1 – Considerações finais	99
2 – Estudo do método espectrofotométrico	99
3 – Estudo do método reflectométrico	100
4 – Estudo do método gravimétrico	100
4 – Estudo do método de referência: titulação potenciométrica	101
6 – Conclusão	101
Capítulo XII – REFERÊNCIAS	103
ANEXO	117

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Solubilidade do diclofenaco de sódio	9
Tabela 2. Dados físicos e analíticos de alguns complexos de diclofenaco	15
Tabela 3. Relação dos volumes de clorofórmio utilizados para extração em cada ensaio (1 a 4 extrações). Volume total final igual a 5,0 mL por ensaio.....	33
Tabela 4. Estudo para escolha da solução de diclofenaco para análise	35
Tabela 5. Dados obtidos da reação de complexação. A absorbância se refere a três extrações com clorofórmio (volume total final de 5,0 mL).....	36
Tabela 6. Dados obtidos da reação de complexação (extração com clorofórmio) entre solução padrão de diclofenaco de sódio 7,0 mg mL ⁻¹ e soluções com diferentes concentrações de acetato de cobre(II) feitas com e sem adição de solução de ácido acético 0,6 mg mL ⁻¹	39
Tabela 7. Dados obtidos da reação de complexação entre solução padrão de diclofenaco de sódio 7,0 mg mL ⁻¹ e solução de acetato de cobre(II) 50,0 mg mL ⁻¹ fazendo extração com diferentes volumes de clorofórmio.....	41
Tabela 8. Dados espectrofotométricos para construção da curva analítica do diclofenaco de sódio e do diclofenaco de potássio.....	43
Tabela 9. Equações obtidas das curvas analíticas.....	45
Tabela 10. Dados para determinação da precisão do método espectrofotométrico	45
Tabela 11. Parâmetros de validação para o método espectrofotométrico	46
Tabela 12. Comparação do método espectrofotométrico com o método oficial da Farmacopéia Norte Americana (HPLC)	47
Tabela 13. Comparação entre os valores de t-Student obtido e tabelado. N = 5	47
Tabela 14. Dados obtidos da reação de complexação utilizando o espectrofotômetro HP 8254 A com acessório para reflectância RSA HP 84. Média de triplicata	54

Tabela 15. Dados reflectométricos para construção da curva analítica do diclofenaco de sódio e do diclofenaco de potássio.....	56
Tabela 16. Equações obtidas das curvas analíticas.....	57
Tabela 17. Dados para determinação da precisão do método reflectométrico.....	58
Tabela 18. Parâmetros de validação para o método reflectométrico	59
Tabela 19. Comparação do método reflectométrico com o método oficial da Farmacopéia Norte Americana (HPLC).....	59
Tabela 20. Comparação entre os valores de t-Student obtido e tabelado. N = 5	60
Tabela 21. Estudo da massa constante para o complexo de diclofenaco de cobre(II)	68
Tabela 22. Dados para determinação da precisão do método gravimétrico	69
Tabela 23. Comparação do método gravimétrico com o método oficial da Farmacopéia Norte Americana (HPLC).....	69
Tabela 24. Comparação entre os valores de t-Student obtido e tabelado. N = 4	70
Tabela 25. Testes com padrão de diclofenaco de sódio e de potássio pelo método titulométrico	76
Tabela 26. Testes com amostra de diclofenaco de sódio e de potássio pelo método titulométrico	78
Tabela 27. Dados para determinação da precisão do método titulométrico..	78
Tabela 28. Comparação do método titulométrico com o método oficial da Farmacopéia Norte Americana (HPLC).....	79
Tabela 29. Comparação entre os valores de t-Student obtido e tabelado. N = 3	79
Tabela 30. Comparação dos resultados de dois métodos diferentes.....	87

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ácido 2 - anilino fenil acético e possíveis substituições	8
Figura 2. Fórmula estrutural (A) e molecular (B) do diclofenaco	9
Figura 3. Rotas sintéticas (A) e (B) para diclofenaco	11
Figura 4. Ácido araquidônico e um de seus derivados eicosanóides	12
Figura 5. Representação esquemática da reflexão regular (A) e da reflexão difusa (B)	17
Figura 6. Representação esquemática de um espectrofotômetro (A) com esfera integradora (B)	20
Figura 7. Esquema parcial do reflectômetro portátil mostrando cela reflectométrica (A) e cela de análise (B) para medidas de reflectância com as respectivas dimensões em mm	21
Figura 8. Espectros do complexo de diclofenaco de cobre(II) extraído em clorofórmio (400 a 800 nm) usando padrão de diclofenaco de sódio	34
Figura 9. Espectros de diclofenaco de cobre(II) extraído em clorofórmio acompanhados das respectivas ampliações, (a ₁) e (b ₁), para melhor visualização. Complexação com adição de solução de ácido acético 0,6 mg mL ⁻¹ (A) e sem sua adição (B). C _{CuAc(II)} = Concentração de acetato de cobre(II)	38
Figura 10. Absorbâncias a 680 nm do complexo de diclofenaco de cobre(II) extraído em clorofórmio. Uso de uma a quatro extrações do complexo com volume total final igual a 5,0 mL para cada caso.	40
Figura 11. Espectros relativos ao estudo da presença de sais na reação de complexação de solução padrão de diclofenaco de sódio com acetato de cobre(II) (A). Ampliação de parte dos espectros (B). Extração com clorofórmio ..	42

Figura 12. Curva analítica para diclofenaco de sódio – D_{Na} (A) e diclofenaco de potássio - D_K (B). Absorbância medida em 680 nm. Extração com clorofórmio ..	44
Figura 13. Espectrofotômetro HP 8452 A Diode Array, acoplado com acessório para reflectância RSA HP 84 com fibra óptica.....	51
Figura 14. Visualização do reflectômetro portátil usado mostrando cela reflectométrica (A), celas de análise (B) e multímetro (C)	52
Figura 15. Suporte para estudo reflectométrico utilizando acessório de reflectância	53
Figura 16. Espectro de reflectância do complexo de diclofenaco de cobre(II). Medidas feitas no espectrofotômetro HP 8254 A com acessório RSA HP 84. $A_R = -\log(\text{Reflectância})$	54
Figura 17. Gráfico obtido para diclofenaco de potássio - D_K nos estudos utilizando espectrofotômetro com acessório para reflectância	55
Figura 18. Curva analítica para diclofenaco de sódio - D_{Na} (A) e diclofenaco de potássio - D_K (B). Medidas feitas no reflectômetro portátil.....	57
Figura 19. Foto do tubo com filtro de placa porosa.....	64
Figura 20. Termogramas do diclofenaco de sódio(A), diclofenaco de potássio (B) e diclofenaco de cobre(II) (C)	65
Figura 21. Gráficos de DSC do diclofenaco de sódio (A), diclofenaco de potássio (B) e diclofenaco de cobre(II) (C). Velocidade de varredura de 10°C por minuto.	66
Figura 22. Exemplo de curva de titulação potenciométrica (A) e gráfico da 2ª derivada (B) para determinação do volume no ponto de equivalência	75
Figura 23. Espectros de infravermelho para diclofenaco de sódio (A) e diclofenaco de potássio (B). Espectros obtidos em pastilha de KBr	77

Capítulo I

OBJETIVOS

Este trabalho teve por objetivo o estudo e desenvolvimento de métodos analíticos quantitativos para análise de diclofenaco (sais de sódio e potássio) em preparações farmacêuticas. Foram estudados um método espectrofotométrico de transmitância no visível e um método titulométrico já existentes, além de se ter desenvolvido um método reflectométrico no visível e um método gravimétrico. Todos os métodos foram validados.

Os métodos espectrofotométrico, reflectométrico e gravimétrico foram fundamentados na reação de formação de um complexo colorido pouco solúvel em água. Os procedimentos são de fácil execução e de baixo custo.

Objetivos específicos:

Método espectrofotométrico:

- ❖ Otimizar a concentração de acetato de cobre(II) usado na reação de complexação com o diclofenaco, assim como o pH e o número de extrações com solvente.
- ❖ Verificar a influência da força iônica na formação do complexo.

Método reflectométrico:

- ❖ Adaptar o método espectrofotométrico estudado para uso em equipamento reflectométrico portátil, desenvolvido no laboratório, que implica em grande simplicidade e baixo custo.

Método gravimétrico

- ❖ Estudar as condições de precipitação, de separação e de secagem do produto de reação de cobre(II) com diclofenaco de modo a obter precisão e exatidão adequadas.

Método titulométrico

- ❖ Adaptar este método de referência usado apenas para diclofenaco “puro” de modo a poder aplicá-lo para análise deste princípio ativo em preparações farmacêuticas.

Capítulo II

INTRODUÇÃO

1 – FÁRMACOS

O avanço do conhecimento na área de Química Farmacêutica tem possibilitado a introdução de novos agentes terapêuticos. A produção industrial de tais agentes exige conhecimento dos mecanismos que regem as reações químicas e de métodos certificados de identificação dos fármacos. Esse complexo de operações define a Química Fina, um setor que gera produtos de composição química definida e alta pureza, do qual decorre um alto valor agregado.

Atualmente no Brasil são comercializados mais de 6000 produtos dessa área, entre eles os fármacos, setor no qual a maior concentração de atividades restringe-se à formulação e à embalagem. A produção nacional ainda é pequena em decorrência da complexidade e do desconhecimento da tecnologia adequada ao setor, profundamente dependente de matérias-primas e princípios ativos importados [C. C. Andrei *et al.*, 2003].

É comum as pessoas confundirem o termo droga com os termos fármaco e medicamento. Droga é a matéria-prima mineral, vegetal ou animal da qual se podem extrair um ou mais princípios ativos; de acordo com esta aceção, os agentes terapêuticos de origem sintética não são drogas. Fármaco é a substância química de constituição definida que pode ter aplicação em Farmácia, seja como preventivo, seja como curativo, seja como agente de diagnóstico; a ser aceita esta definição, a matéria-prima mineral, vegetal ou animal da qual se podem extrair uma ou mais bases medicamentosas não é fármaco, pois sua constituição química não é necessariamente conhecida. Medicamento é o mesmo que fármaco, mas especialmente quando se encontra na sua forma farmacêutica [A. Korolkovas *et al.*, 1982].

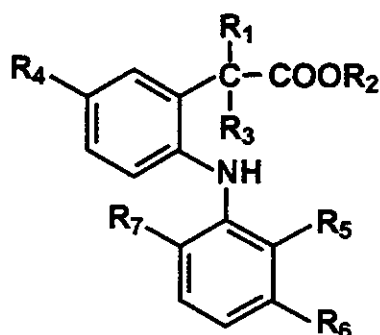
Diariamente são vistas reportagens sobre fármacos nos meios de comunicação. Notícias como a da contaminação de um medicamento usado como contraste em exames radiológicos e que foi associada à morte de 22 pessoas (o responsável disse poder ter “esquecido” de lavar o equipamento que foi usado em experiência com produtos tóxicos) [C. Bassan, 10 jun. 2003; C. Bassan, 12 jun. 2003] põem em questão a importância do controle de qualidade de fármacos na vida das pessoas e para o desenvolvimento nacional.

2 – DICLOFENACO: DA DESCOBERTA À AÇÃO NO ORGANISMO HUMANO

2.1 Descoberta

Na segunda metade da década de 60 teve início a divulgação de processos de preparação de derivados substituídos do ácido 2 - anilino fenil acético (Figura 1) [A. Sallmann *et al.*, 1971, 1972, 1973].

Estes derivados (seus ésteres e sais) têm graus de absorção desejáveis para proteção da pele contra o efeito irritante da luz ultravioleta (comprimento de onda entre 290 e 315 nm). Estes compostos também possuem atividade antiinflamatória, analgésica e antipirética combinadas com um favorável índice terapêutico. Um exemplo de um desses derivados é o diclofenaco.



R₁, R₂ e R₃ = H ou grupo alquil de cadeia pequena
R₄ = H, grupo alquil de cadeia pequena, grupo alcoxi de cadeia pequena, Cl, F ou Br
R₅ = grupo alquil de cadeia pequena, grupo alcoxi de cadeia pequena, Cl ou F
R₆ e R₇ = H, grupo alquil de cadeia pequena, Cl ou F

Figura 1: Ácido 2 - anilino fenil acético e possíveis substituições.

2.2 Descrição

O diclofenaco é um composto sintético não esteroide que pode ser encontrado nas formas de sal de sódio ou de potássio. A Figura 2 indica a fórmula estrutural do diclofenaco (Massa molar = 296,13 g mol⁻¹) e também sua fórmula molecular. Seu nome, segundo a IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemists – União Internacional de Química Pura e Aplicada) é 2-[(2,6-diclorofenil)amino]benzoato [C. M. Adeyeye *et al.*, 1990].

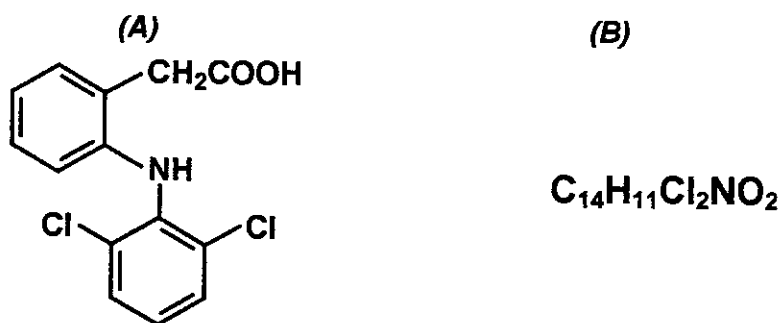


Figura 2: Fórmula estrutural (A) e molecular (B) do diclofenaco.

2.3 Propriedades físicas [C. M. Adeyeye et al., 1990]

2.3.1 Espectro no ultravioleta

O espectro no ultravioleta do diclofenaco de sódio em metanol mostra características de absorção aromática. Os comprimentos de máxima absorção são 276 e 283 nm e as absortividades molar $\epsilon_{276} = 1,01 \times 10^5$ e $\epsilon_{283} = 1,05 \times 10^5 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ respectivamente.

2.3.2 Solubilidade

As solubilidades de equilíbrio do diclofenaco de sódio em vários solventes à temperatura ambiente são mostradas na Tabela 1.

Tabela 1: Solubilidade do diclofenaco de sódio.

Solvente	Solubilidade (mg mL ⁻¹)
Água deionizada	> 9
Metanol	> 24
Acetona	6
Acetonitrila	< 1
Ciclohexano	< 1
pH 1,1 (HCl)	< 1
pH 7,2 tampão fosfato	6

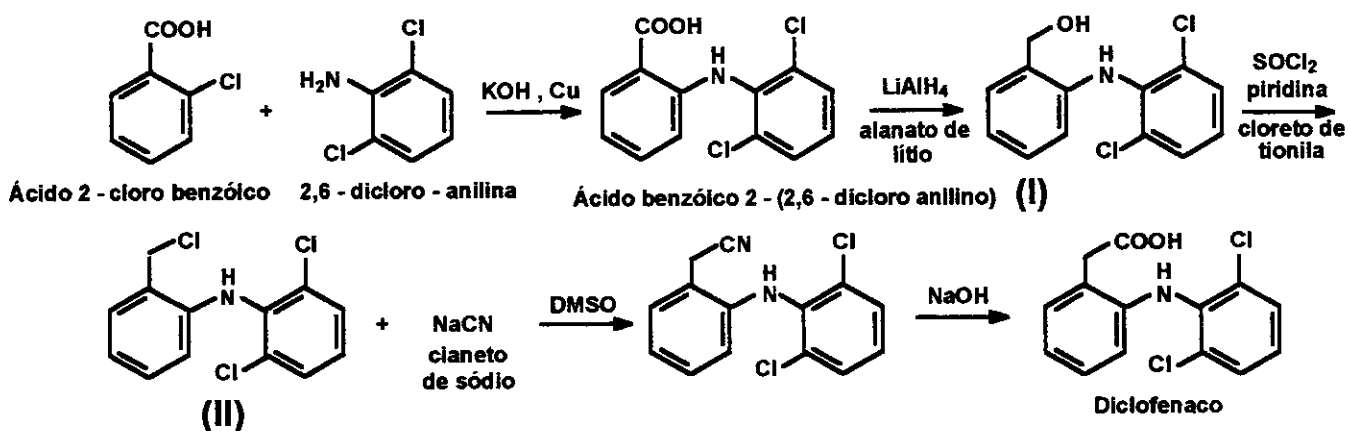
2.3.3 Constante de dissociação (pKa) e coeficiente de partição

O pKa do diclofenaco de sódio em água é 4 e o coeficiente de partição (razão de concentração em um solvente para sua concentração no outro solvente) em n-octanol / água em pH 7,4 é 13,4 e em pH 5,2 é 1,5 [Voltaren Online..., acesso em 15 jul. 2003].

2.4 Síntese

Vários procedimentos sintéticos para o diclofenaco são conhecidos [C. M. Adeyeye et al., 1990; P. Moser et al., 1990]. Na Figura 3 tem-se dois exemplos de esquema de sua rota sintética [A. Kleemann et al., 2001].

(A)



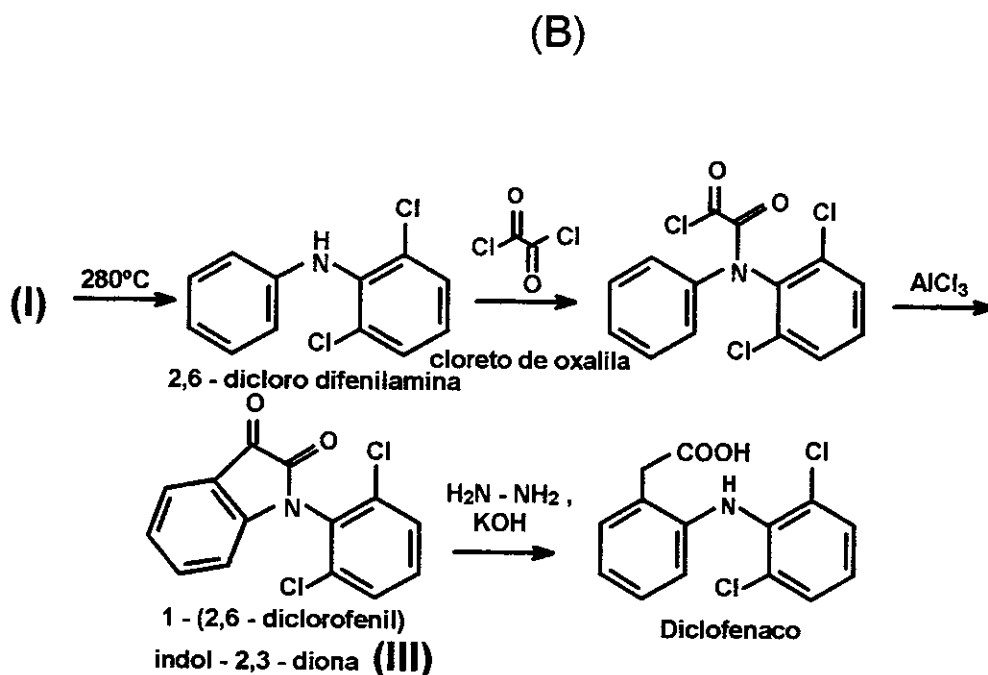


Figura 3: Rotas sintéticas (A) e (B) para diclofenaco.

2.5 A resposta inflamatória

Anti-reumáticos ou antiinflamatórios são fármacos que aliviam os sintomas das doenças reumáticas, dor e inflamação. Analgésicos são fármacos que, mediante ação sobre o sistema nervoso central, aliviam a dor sem causar entorpecimento ou perda de consciência. Os antipiréticos são fármacos que eliminam ou aliviam os estados febris, não baixam a temperatura normal, mas apenas quando ela está elevada [A. Korolkovas et al., 1982].

A lesão celular associada à inflamação atua sobre as membranas celulares, provocando a liberação de enzimas lisossômicas pelos leucócitos; a seguir, ocorre liberação de ácido araquidônico a partir de compostos precursores e vários eicosanóides

são sintetizados, entre eles as prostaglandinas (Figura 4). As prostaglandinas desempenham importantes funções no organismo tais como elevar ou baixar a pressão arterial, mediar a inflamação (resultando em dor), elevar a temperatura corporal (produzindo febre), proteger contra úlceras e regular a reprodução [D. Voet *et al.*, 1995].

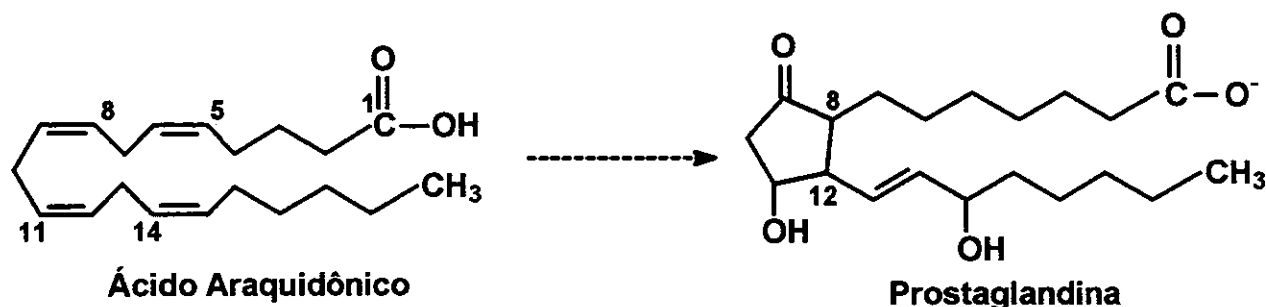


Figura 4: Ácido araquidônico e um de seus derivados eicosanóides.

2.6 Ação no organismo humano

Os efeitos que os fármacos causam resultam de um conjunto complexo de processos em que intervêm fatores diversos. Em suma, na ação dos fármacos são observadas três fases: fase farmacêutica, fase farmacocinética e fase farmacodinâmica.

Na fase farmacêutica, também chamada fase de exposição, ocorre a desintegração da forma em que o fármaco é administrado [A. Korolkovas *et al.*, 1982].

O diclofenaco é rapidamente absorvido após administração oral e possui meia-vida curta, o que o torna particularmente adequado para o tratamento de estados dolorosos e/ou inflamatórios agudos.

Durante a fase farmacocinética processa-se a absorção, distribuição, metabolismo e excreção do fármaco [A. Korolkovas *et al.*, 1982].

O diclofenaco é completamente absorvido no trato gastrointestinal após administração oral, seguindo a rápida absorção. A droga é distribuída em maiores concentrações nos órgãos de eliminação (fígado e rim) e no sangue. Como aproximadamente metade do diclofenaco é metabolizada durante sua primeira passagem pelo fígado (efeito de primeira passagem), a área sob a curva de concentração (AUC),

após administração oral, é cerca de metade daquela observada com uma dose parenteral equivalente. Sua meia vida no plasma sangüíneo é de aproximadamente duas horas.

A principal mudança metabólica da molécula de diclofenaco no ser humano é a hidroxilação, resultando em vários metabólitos fenólicos (3' – hidroxí-; 4' – hidroxí-; 5 – hidroxí e 3' – hidroxí – 4'metoxi – diclofenaco), a maioria dos quais são convertidos a conjugados glicurônicos. Dois desses metabólitos fenólicos são biologicamente ativos, mas em extensão muito menor que o diclofenaco.

Ocorrem efeitos adversos em cerca de 20% dos pacientes, incluindo distúrbio gastrointestinal, sangramento gastrointestinal oculto e ulceração gástrica devido a inibição da ciclooxygenase PGE_2 (um subtipo de prostaglandina), que apresenta um efeito de proteção celular da mucosa gástrica, inibindo a secreção de ácido gástrico mantendo a barreira nesta mucosa [B. G. Katzung, 1995].

A fase farmacodinâmica compreende o processo de interação do fármaco com o seu receptor. Desta interação resulta um estímulo que, após uma série de fenômenos químicos e bioquímicos, se traduz no efeito biológico esperado [A. Korolkovas *et al.*, 1982].

Evidências recentes sugerem que a isozima ciclooxygenase (COX II), responsável pela produção de prostaglandinas por células envolvidas na inflamação, não é idêntica à ciclooxygenase presente na maioria das outras células do organismo (COX I). Seria conveniente desenvolver um bloqueador seletivo da COX II para o tratamento da inflamação, uma vez que não afetaria as outras funções das prostaglandinas [B. G. Katzung *et al.*, 1995]. É exatamente isto que o diclofenaco faz, como já demonstrado experimentalmente [H. L. White *et al.*, 1974].

3 – TÉCNICAS ANALÍTICAS PARA ANÁLISE DE DICLOFENACO

A partir de 1975 com a introdução do uso de diclofenaco para o tratamento de inflamações houve um estímulo na aplicação clínica deste princípio ativo. Neste período, começaram a ser descritos na literatura trabalhos para determinação quantitativa de

diclofenaco em amostras biológicas [J. Haapasaari et al., 1983; K. Sorensen, 1978; O. Mutru et al., 1978; U. P. Geiger et al., 1975; E. C. Ku et al., 1975].

A partir de 1987 apareceu um número significativo de procedimentos analíticos para a determinação de diclofenaco sendo os mais comumente usados a colorimetria [Z. A. E. Sherif et al., 1997; J. C. Botello et al., 1995; B. V. Kamath et al., 1993; C. S. Sastry et al., 1987;], espectrofotometria no ultravioleta e no visível [S. Garcia, et al., 2001; P. O. Barrales et al., 1999; R. Bucci et al., 1998; M. L. F. de Córdova et al., 1998; Y. C. de Micalizzi et al., 1998; I. Karamancheva et al., 1998; T. P. Ruiz et al., 1997; I. Karamancheva et al., 1997; K. Shivram et al., 1993; Y. K. Arrawal et al., 1988] potenciometria [A. M. Pimenta, et al., 2002; J. A. Arancibia et al., 1999; S. S. M. Hassan et al., 1994] e HPLC (High Performance Liquid Chromatography – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência) [B. X. Mayer et al., 2003; M. S. A. Prado et al., 2002; C. Arcelloni et al., 2001; B. Dimitrova et al., 2000; G. Lunn et al., 1997; T. Hirai et al., 1997; P. F. Vanbel, 1993; L. Zecca et al., 1991]; contudo, a maioria destas técnicas é cara e/ou de procedimento relativamente demorado.

Desde 1990 com o uso intenso de HPLC para determinação de diclofenaco [D. Lansdorp et al., 1990; N. Beaulieu et al., 1990], essa técnica tem sido considerada procedimento oficial para análise de diclofenaco (dissolução seguida por análise cromatográfica com detecção na região do ultra-violeta) em formulações farmacêuticas conforme consta nas Farmacopéias Norte Americana [Diclofenac. In: *United States Pharmacopeia – USP*, 2002], Britânica [Diclofenac. In: *British Pharmacopoeia Version 3.0*, 1999] e Brasileira [Diclofenaco. In: *Farmacopéia Brasileira*, 2002].

4 – A REAÇÃO DO DICLOFENACO COM ÍONS DE METAIS DA PRIMEIRA SÉRIE DE TRANSIÇÃO

A síntese e estudo de complexos de metais de transição usando drogas antiinflamatórias como ligantes é uma área de pesquisa de grande interesse. Complexos que exibem atividade sinérgica (ação simultânea de vários fatores que produz um resultado maior que a soma das partes isoladas) entre a droga e o metal tem concentrado muita atenção [D. K. Demertzi, 1993] no desenvolvimento de novos medicamentos. Foi

descoberto, por exemplo, que os complexos de cobre também participam nos mecanismos de controle de doenças inflamatórias [J. R. J. Sorenson, 1982].

A Tabela 2 mostra dados físicos e analíticos de alguns desses complexos [R. Kesharwani et al., 1995].

Tabela 2: Dados físicos e analíticos de alguns complexos de diclofenaco.

Composto / cor	% em massa				T _{Dec} **
	M *	C	H	N	
Co(C ₁₄ H ₁₀ NCI ₂ O ₂).2H ₂ O / marrom - areia	8,59	49,05	3,70	4,04	245
Ni(C ₁₄ H ₁₀ NCI ₂ O ₂).2H ₂ O / verde claro	8,57	49,07	3,50	4,08	115
Cu(C ₁₄ H ₁₀ NCI ₂ O ₂).2H ₂ O / verde - azulado	9,21	48,72	3,09	3,73	242

* M = Metal

** T_{Dec} = Temperatura de decomposição do complexo

Com o objetivo de simplificar e baratear a análise quantitativa de diclofenaco, a partir da década de 90 começaram a surgir trabalhos de análise focando atenção nas reações que levam à formação de compostos coloridos como, por exemplo, na reação de diclofenaco com íons de metais da primeira série de transição [M. Konstandinidou et al., 1998; R. Bucci et al., 2000; R. Cini, 2000; S. Defazio et al., 2002].

Em 1991, S. A. Kustrin et al. apresentaram um estudo para determinação espectrofotométrica de diclofenaco através de sua reação com íons cobre(II) em meio tamponado. A reação (I) que ocorre pode ser representada como:



complexo verde - azulado ($\lambda_{\text{máximo}} = 680 \text{ nm}$)

O diclofenaco reage com solução aquosa de acetato de cobre(II) formando um complexo verde - azulado pouco solúvel em água e muito solúvel em clorofórmio. A reação ocorre em meio tamponado cujo pH pode variar de 4,4 a 6,4.

Apesar de *S. A. Kustrin et al.* terem analisado somente uma amostra de diclofenaco, a reação gerou um método espectrofotométrico simples e rápido para quantificar este princípio ativo em formulações farmacêuticas.

5 – TÉCNICAS ANALÍTICAS PARA ANÁLISE DE DICLOFENACO EMPREGADAS NO TRABALHO

5.1 *Espectrofotometria*

A técnica de espectrofotometria está baseada na medida de transmitância **T** ou absorbância **A** de soluções contidas em celas transparentes tendo um caminho óptico de **b** cm. De forma comum, a concentração **c** de um analito absorvente está relacionada linearmente à absorbância em uma faixa de concentração.

5.2 *Reflectometria*

A reflectância é uma técnica espectroscópica baseada na relação entre a radiação refletida por uma superfície refletora e a que incide sobre ela. O fenômeno envolvido nesta técnica, então, é a reflexão. Esta consiste no retorno da radiação após ter atingido uma dada superfície (amostra) e ser parcialmente absorvida (redução da intensidade) por esta superfície. Quando a radiação é direcionada para a superfície de uma amostra sólida ou em suspensão, dois tipos de reflexão da luz podem ocorrer: a reflexão regular e a reflexão difusa (Figura 5) [G. Kortüm, 1969]. Se os raios de luz refletidos mantêm o mesmo paralelismo dos raios de luz incididos, o fenômeno recebe o nome de *Reflexão Regular* (ou especular). Este fenômeno, ocorre em superfícies lisas e polidas. Quando os raios refletidos perdem o paralelismo e espalham-se desordenadamente em todas as direções, o fenômeno recebe o nome de *Reflexão Difusa*. Superfícies irregulares são responsáveis por este tipo de reflexão.



Figura 5: Representação esquemática da reflexão regular (A) e da reflexão difusa (B).

Em medidas de reflectância, a leitura realizada pelo espectrofotômetro é um sinal da radiação transmitida refletida, também chamada de força de reflexão ou reflectância, T_R , a qual é análoga à transmitância em espectroscopia. A densidade óptica para medidas de reflectância é dada por $A_R = -\log T_R$, análogo à absorbância [M. Tubino et al., 1997].

Os resultados das medidas de reflectância dependem das condições das medidas, especialmente da composição espectral da radiação, do ângulo de incidência, da textura da amostra e do tamanho das partículas. Como a maioria dos materiais apresenta estruturas irregulares, a espectroscopia de reflectância difusa acaba sendo mais empregada e explorada do que a de reflectância especular. A espectroscopia de reflectância difusa é empregada quando o fenômeno de espalhamento da luz é muito pronunciado, o que geralmente ocorre em espécies sólidas ou em suspensão com áreas superficiais elevadas, nas regiões do IV (infra-vermelho), UV (ultra-violeta), e visível [D. Kealey, 1972; D. Kealey, 1974; *Reflectance Phenomenology...*, acesso em 15 jun. 2002].

Diversos modelos foram desenvolvidos para descrever, em termos quantitativos, a intensidade da radiação refletida. O modelo de Kubelka e Munk é o mais usado.

A teoria de Kubelka - Munk considera sob um ponto de vista bastante simples os processos que ocorrem quando a luz incide sobre um material (absorção, reflexão e transmissão), estabelecendo que o material absorve parcialmente a luz que recebe e o restante é refletido. A proporção de luz absorvida depende do coeficiente de absorção do material K e a proporção de luz refletida depende do fator de dispersão do material S . O fundo sobre o qual se situa a amostra que está sendo observada (se é transparente ou translúcido) e a espessura da amostra (densidade de empacotamento) exercem influência sobre os parâmetros K e S [V. Marti et al., 1998; D. Reinecke et al., 1998].

Análises na região do UV - Vis utilizando espectrofotômetro equipado com acessório de reflectância difusa apresentando esfera integradora (ou de reflectância) e cabo de fibra óptica, pode fornecer bons resultados quantitativos de maneira simples e rápida, como mostrado por Tubino e colaboradores [M. Tubino et al., 1997]. Na maior parte destas análises quantitativas, as determinações são feitas a partir das curvas que relacionam a reflectância e a concentração sendo que a Lei de Kubelka - Munk não é aplicada.

5.3 Gravimetria

Em uma análise gravimétrica utiliza-se uma seqüência de operações com o objetivo de se determinar a quantidade de um constituinte em uma amostra, por pesagem direta deste analito ou de um dos seus derivados de composição estável, conhecida e bem definida. O procedimento utilizado numa análise gravimétrica pode ser bem entendido pelo estudo das várias etapas sucessivas ou operações unitárias que compõem este tipo de análise, ou seja: preparo da solução, precipitação, digestão, filtração, lavagem, secagem ou calcinação [N. Baccan et al., 1995].

5.4 Titulação potenciométrica

A titulação potenciométrica envolve a medida do potencial de um eletrodo indicador como função do volume de titulante usado. A informação obtida pela titulação potenciométrica não é a mesma daquela obtida por medidas de potenciometria direta. As titulações potenciométricas geram dados que são mais precisos do que os dados obtidos por titulações que usam indicadores químicos sendo particularmente úteis na análise de soluções coloridas ou turvas [D. A. Skoog et al., 1997].

5.5 Cromatografia líquida de alta eficiência

A cromatografia líquida de alta eficiência é uma das técnicas analíticas de separação mais usadas. As razões para a popularidade do método são a sua sensibilidade, a fácil adaptação para determinações quantitativas e sua ampla aplicabilidade a substâncias de grande interesse para a indústria, para muitos campos da ciência e para o público [D. A. Skoog *et al.*, 2002].

6 – MÉTODO DE MEDIDAS REFLECTOMÉTRICAS USADO NESTE TRABALHO

Em UV - Vis, as análises de reflectância podem ser feitas facilmente com acessório de reflectância do espectrofotômetro que possui esfera de reflectância (também chamada de esfera integradora) e/ou cabos de fibra óptica (Figura 6).

Os espectrofotômetros de reflectância medem a quantidade de luz refletida pela superfície sob análise em função do comprimento de onda para então fornecer o espectro de reflectância.

A operação do espectrofotômetro consiste, basicamente, em iluminar a amostra com luz branca e calcular a quantidade de luz que é refletida pela amostra em cada valor de comprimento de onda. Esta detecção é feita após a luz refletida ter passado por um dispositivo monocromador que separa a radiação nos diferentes comprimentos de onda. O instrumento é calibrado usando uma superfície padrão branca, feita geralmente, de BaSO₄.

A esfera integradora tem o objetivo de convergir os feixes de luz refletidos pela amostra. Então, a luz refletida “deixa” a esfera através de uma fenda e é encaminhada para o monocromador. Em alguns instrumentos, este percurso é feito através de um cabo de fibra óptica [The integrating..., acesso em 08 jul. 2003].

Tradicionalmente, a esfera é feita de um material metálico e internamente é revestida por um filme branco de BaSO₄. Algumas, no entanto, são revestidas por um

polímero branco chamado Spectralon que é extremamente durável, garantindo maior tempo de vida ao revestimento e, conseqüentemente, à esfera.

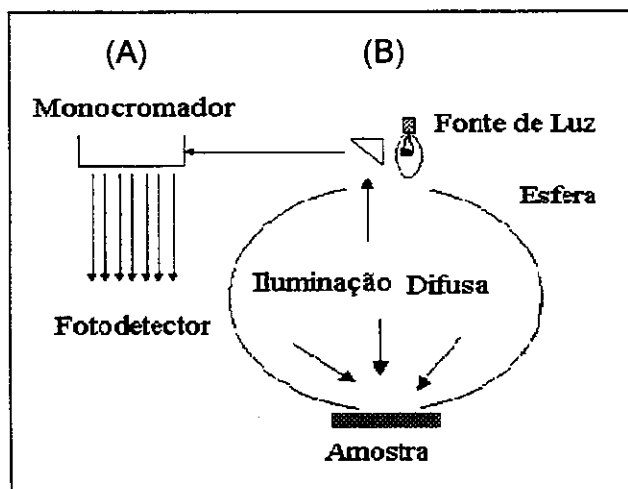


Figura 6: Representação esquemática de um espectrofotômetro (A) com esfera integradora (B).

Em 2003, *M. Tubino et al.* desenvolveram um reflectômetro portátil, visto parcialmente na Figura 7, como proposta alternativa a aplicação da espectrofotometria. Este equipamento muito simples, não atinge o grau de sofisticação nem o custo dos espectrofotômetros e reflectômetros comerciais. Isto vem, por exemplo, ao encontro das necessidades das farmácias de manipulação que não dispõem de grande capital para investimento e que devem, de acordo com a legislação vigente, passar a realizar um controle analítico em seus produtos [*Anvisa...*, acesso em 4 fev. 2004].

O reflectômetro é constituído de uma cela de PTFE (politetrafluoroetileno) preto, equipada com um LED (Light Emitter Diode - Diodo Emissor de Luz) e um LDR (Light Dependent Resistor - Resistência Dependente de Luz) posicionados no mesmo plano em um ângulo de 45° com respeito à superfície refletora e a um ângulo de 90° entre si. Entretanto o vértice deste ângulo não ultrapassa a superfície refletora mas fica sempre de 3,5 - 4,5 mm acima para evitar o componente especular. O valor de resistência do LDR varia com a intensidade de luz que incide sobre sua superfície. Uma bateria de 9 V em série com um potenciômetro variável de 10 k Ω alimenta o LED. A resistência do LDR é medida por um multímetro. Os valores de resistência obtidos com o multímetro estão

associados à intensidade de luz refletida pela solução em estudo e com a concentração do analito. A cela de análise é confeccionada em PTFE branco.

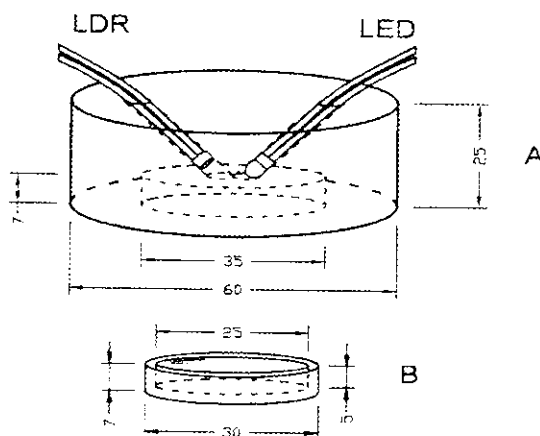


Figura 7: Esquema parcial do reflectômetro portátil mostrando cela reflectométrica (A) e cela de análise (B) para medidas de reflectância com as respectivas dimensões em mm.

Este sistema serviu para análise quantitativa de níquel em um catalisador [M. Tubino *et al.*, 2003]. As leituras de resistência foram relacionadas com a concentração do complexo colorido de níquel com dimetilglioxima, sendo diretamente proporcionais, de acordo com a equação (II) obtida empiricamente.

$$\Delta R = k \times C_i \quad (\text{II})$$

Sendo: ΔR = Variação de resistência do LDR indicada no multímetro, C_i = Concentração do analito na solução e k = constante de proporcionalidade.

O mesmo sistema também foi usado para determinação quantitativa de ácido acetilsalicílico baseado na formação de complexo de cor roxa [M. Tubino *et al.*, 2004].

7 – VALIDAÇÃO EM QUÍMICA ANALÍTICA

O teste de validação de um método analítico é feito para assegurar que uma metodologia analítica é exata, específica e reprodutível na extensão que o analito será analisado. A validação do método mostra a certeza e confiança deste método e é

algumas vezes referida como “um processo que comprova o que o método propõe” [F. Leite, 2002; H. Fabre et al., 1993; R. Kellner et al., 1998]. Laboratórios devem realizar métodos de validação para estar em concordância com as regulamentações da FDA (US Food and Drug Administration – Administração de Alimentos e Drogas dos Estados Unidos). Para medicamentos, os métodos de validação por HPLC, especificações da FDA, USP (United States Pharmacopeia – Farmacopéia dos Estados Unidos) e da ICH (International Conference on Harmonization – Conferência Internacional em Harmonização) ditam as normas para realizar esta validação [G. A. Shabir, 2003].

As figuras de mérito analisadas neste trabalho tiveram como referência as normas da ICH [Text on..., 2003; Validation of..., 2003], com exceção do ensaio de exatidão que se baseou em método descrito na USP. São as que seguem, de 7.1 a 7.8 [V. A. Fassel et al., 1975; Comission Decision..., 2002].

7.1 Linearidade

A linearidade pode ser avaliada pela inspeção visual de sinais que são função da concentração do analito. Quando se tem uma relação linear entre os dados, podem ser realizados testes estatísticos, por exemplo, por cálculo da linha de regressão pelo método dos mínimos quadrados, e o coeficiente de correlação pode ser encontrado através do desvio dos pontos dos dados da curva em relação à linha de regressão.

7.2 Faixa linear

A faixa linear é normalmente obtida dos estudos de linearidade e depende da aplicação que se quer fazer do procedimento. É estabelecida pela confirmação de que o procedimento analítico fornece um grau aceitável de linearidade, exatidão e precisão quando aplicado para amostras contendo quantidades do analito entre os extremos da faixa especificada do procedimento analítico.

7.3 Sensibilidade

A sensibilidade de um instrumento ou de um método é uma medida de sua habilidade em discriminar entre pequenas diferenças na concentração de um analito. Dois fatores limitam a sensibilidade: a inclinação da curva de calibração e a reprodutibilidade ou precisão do dispositivo de medida. Para dois métodos que tenham a mesma precisão, aquele que tem a curva de calibração mais inclinada será o mais sensível. A definição quantitativa de sensibilidade que é aceita pela IUPAC é a sensibilidade de calibração, que é a inclinação da curva de calibração a uma dada concentração de interesse.

7.4 Limite de detecção

O limite de detecção é definido como a menor concentração de um analito que pode ser detectada. Ele especifica se um analito está acima ou abaixo de um certo valor. O limite de detecção pode ser calculado com base no desvio padrão e na inclinação da curva analítica possuindo a seguinte fórmula (III):

$$LD = 3,3 \left(\frac{SD}{S} \right) \quad (III)$$

Sendo: **LD** = Limite de detecção, **SD** = Estimativa de desvio padrão e **S** = Coeficiente angular (sensibilidade).

A estimativa de desvio padrão pode ser determinada baseado na estimativa de desvio padrão do branco, no desvio padrão residual da linha de regressão ou no desvio padrão do intercepto y da linha de regressão.

7.5 Limite de determinação

O limite de determinação ou quantificação é definido como a menor concentração de um analito em uma amostra que pode ser determinado com precisão e exatidão aceitáveis em condições operacionais estabelecidas do método. Seu cálculo é baseado no desvio padrão e no coeficiente angular da curva analítica de acordo com a fórmula (IV):

$$LD = 10 \left(\frac{SD}{S} \right) \quad (IV)$$

A estimativa de desvio padrão pode ser determinada como no caso do limite de detecção.

7.6 Seletividade

A seletividade ou especificidade indica a habilidade do método em medir com exatidão a quantidade do analito na presença de todos componentes potenciais da amostra. A quantidade determinada do analito em misturas contendo o analito e todos seus componentes (formulação do placebo, intermediários de síntese, excipientes, produtos de degradação, impurezas de processo, etc.) é comparada com a quantidade determinada de uma solução contendo somente o analito. Outros potenciais componentes são gerados pela exposição do analito em condições extremas suficientes para degradá-lo até atingir um grau de pureza entre 80 - 90%. Para preparações farmacêuticas, condições extremas como meio ácido (HCl 0,1 mol L⁻¹), básico (NaOH 0,1 mol L⁻¹) e oxidante (H₂O₂ 3%) são típicos. Para se afirmar que o método é seletivo, deve-se ter certeza que os componentes da amostra não interferem na análise do analito.

7.7 Precisão

A precisão é a medida do grau de repetibilidade de um método analítico sobre uma operação normal e é geralmente expressa como o desvio padrão relativo em porcentagem (% RSD) para um número estatisticamente significativo de amostras. A precisão pode ser obtida em 3 diferentes níveis: repetibilidade (intra - ensaio), precisão intermediária (inter - ensaio) e reprodutibilidade. A **repetibilidade** indica os resultados de um método operado em um curto espaço de tempo sobre as mesmas condições. Pode ser determinado de um mínimo de 9 determinações cobrindo uma extensão específica do procedimento (por exemplo, 3 concentrações, 3 repetições cada). Para dizer que o método é preciso o valor de % RSD deve ser menor ou igual a 10%. A **precisão intermediária** indica os resultados das variações no laboratório como dias diferentes, analistas diferentes, etc. A **reprodutibilidade** é determinada testando-se as amostras em laboratórios diferentes.

7.8 Exatidão

A exatidão é a proximidade dos resultados dos testes obtidos pelo método analítico em relação ao valor verdadeiro. Existem diferentes modos pelos quais se pode determinar a exatidão. Ela pode ser obtida pela análise de uma amostra de concentração conhecida (material de referência) comparando-se o valor medido com o valor verdadeiro. Também pode ser obtida pela comparação dos resultados obtidos do novo método com os resultados de um procedimento alternativo e bem caracterizado que já se sabe ser exato. Uma outra maneira é através da fortificação de uma amostra adicionando quantidade conhecida do analito (padrão).

Capítulo III

ESTUDO DO MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO

Os reagentes utilizados em todos os estudos são de grau analítico. Os padrões de diclofenaco são de grau farmacêutico e os solventes usados no método de referência para estudos de exatidão são de grau HPLC. As soluções foram feitas usando-se água deionizada obtida em deionizador Milli Q-Plus. O uso de água destilada no lugar de água deionizada não ocasiona nenhuma diferença nas análises. Mesmo assim, optou-se pelo uso de água deionizada para se tentar evitar ao máximo os problemas com possíveis interferentes.

No caso das soluções preparadas, uma quantidade (massa ou volume) adequada do reagente foi medida e transferida quantitativamente para balão volumétrico. Utilizou-se agitação constante ou ultra-som no processo de dissolução quando necessário.

A unidade de concentração das soluções foi expressa em mg mL^{-1} , visto que é usual expressar concentração em preparações farmacêuticas comerciais usando-se esta unidade.

As amostras de medicamentos foram adquiridas no comércio farmacêutico local.

A amostragem foi feita através da pesagem de 40 comprimidos (equivalente a duas caixas de medicamento de mesmo lote), tanto para diclofenaco de sódio quanto para diclofenaco de potássio. As Farmacopéias recomendam o uso de 20 comprimidos mas como o medicamento foi estudado por cinco métodos diferentes, fez-se necessário o uso de maior quantidade de amostra.

Estes comprimidos foram triturados em almofariz e as massas transferidas para os respectivos frascos de vidro. A dissolução das amostras comerciais foi feita a fim de se obter solução de concentração $7,0 \text{ mg mL}^{-1}$ de diclofenaco. Para obtenção da solução foi dissolvida uma quantia equivalente do medicamento usando-se 6,00 mL de água a 85°C seguida de agitação por 1 minuto. A suspensão resultante foi mantida em banho-maria a 85°C por 5 minutos e depois centrifugada por 1 minuto a 58,3 rps (rotações por segundo). Filtrou-se em papel de filtro qualitativo e coletou-se em balão volumétrico de 25,0 mL. Foram feitas mais duas dissoluções seguindo o mesmo procedimento. Finalmente adicionou-se água a 85°C , através do papel de filtro, para completar o volume do balão até a marca.

1 – MATERIAL

1.1 Preparo de soluções

No estudo deste método foi usado clorofórmio para extração do complexo de diclofenaco de cobre(II).

1.1.1 Solução de acetato de cobre(II) com ácido acético 9:1 (v/v)

As soluções de acetato de cobre(II) de concentrações 40,0; 50,0; 60,0 e 70,0 mg mL⁻¹ (0,20; 0,25; 0,30 e 0,35 mol L⁻¹) foram preparadas pela dissolução de quantidades adequadas do sal Cu(CH₃CO₂)₂.H₂O (massa molar 199,65 g mol⁻¹) em água e posterior adição de ácido acético 0,6 mg mL⁻¹ (0,1 mol L⁻¹) na proporção 9:1 (v/v) água / ácido acético.

1.1.2 Soluções tampão [R. M. V. Assumpção et al., 1968]

O pH dos tampões foi medido com eletrodo de vidro combinado com o de calomelano, empregando-se pHmetro. As soluções tampão foram estocadas na geladeira.

a) Tampão acetato 1 (preparado com ácido acético 1,0 mol L⁻¹ e hidróxido de sódio 1,0 mol L⁻¹).

Foram adicionadas quantidades diferentes de hidróxido de sódio 1,0 mol L⁻¹ (24,3 a 48,3 mL) para um volume fixo (50,0 mL) de ácido acético 1,0 mol L⁻¹ de modo a obter soluções com pH 4,6; 5,0; 5,5; 6,0 e 6,4.

b) Tampão acetato 2 (preparado com ácido acético 2,0 mol L⁻¹ e acetato de sódio 2,0 mol L⁻¹).

Para obtenção deste tampão (pH 5,3) foram dissolvidos 13,6247 g de acetato de sódio com 5,70 mL de ácido acético P. A., em balão volumétrico de 1,0 L sendo o volume completado com água.

c) Tampão fosfato (preparado com fosfato de potássio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e hidróxido de sódio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$).

Para obtenção deste tampão (pHs 5,8 e 6,2) foi adicionado hidróxido de sódio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (3,7 e 8,6 mL respectivamente) a um volume fixo (50,0 mL) de H_2KPO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (massa molar $136,09 \text{ g mol}^{-1}$).

d) Tampão Mcllvaine (preparado com fosfato dissódico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e ácido cítrico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$):

Para obtenção deste tampão (pHs 4,6; 5,4 e 6,2) foi adicionado Na_2HPO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (9,4; 11,2 e 13,2 mL respectivamente) a 10,7; 8,9 e 6,8 mL de ácido cítrico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (massa molar $141,96 \text{ g mol}^{-1}$) respectivamente.

1.1.3 Sais de metais alcalinos

a) Cloreto de potássio

Para obtenção de solução de cloreto de potássio (massa molar $74,56 \text{ g mol}^{-1}$) $149,1 \text{ mg mL}^{-1}$ ($2,0 \text{ mol L}^{-1}$) foram dissolvidos 7,4602 g do sal em 50,0 mL de água.

b) Cloreto de sódio

Para obtenção de solução de cloreto de sódio (massa molar $58,44 \text{ g mol}^{-1}$) $116,9 \text{ mg mL}^{-1}$ ($2,0 \text{ mol L}^{-1}$) foram dissolvidos 3,7280 g do sal em 25,0 mL de água.

c) Tetrafluorborato de sódio

Para obtenção de solução de tetrafluorborato de sódio (massa molar $109,80 \text{ g mol}^{-1}$) $219,6 \text{ mg mL}^{-1}$ ($2,0 \text{ mol L}^{-1}$) foram dissolvidos 5,4895 g do sal em 25,0 mL de água.

d) Brometo de potássio

Para obtenção de solução de brometo de potássio (massa molar $119,01 \text{ g mol}^{-1}$) $238,0 \text{ mg mL}^{-1}$ ($2,0 \text{ mol L}^{-1}$) foram dissolvidos $5,9505 \text{ g}$ do sal em $25,0 \text{ mL}$ de água.

e) Perclorato de potássio

Para obtenção de solução de perclorato de potássio (massa molar $138,55 \text{ g mol}^{-1}$) $13,86 \text{ mg mL}^{-1}$ ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) foi dissolvida $0,3464 \text{ g}$ do sal em $25,0 \text{ mL}$ de água.

1.1.4 Soluções padrão

Foram feitas soluções padrão de diclofenaco de sódio e diclofenaco de potássio de concentrações $1,0$; $5,0$; $7,0$; $10,0$; $15,0$; $20,0$ e $25,0 \text{ mg mL}^{-1}$ através de dissolução de quantidades adequadas do princípio ativo em $25,0 \text{ mL}$ de água. Os padrões utilizados foram secos em estufa à 110°C por 3 h e deixados em dessecador com pentóxido de fósforo. Estes padrões foram cedidos gentilmente pela empresa NORTEC acompanhadas dos respectivos certificados de análise (**Anexo 1**).

1.2 Aparelhos e acessórios

Para o estudo do método espectrofotométrico foram utilizados os espectrofotômetros Ultrospec 2000 (Pharmacia Biotech) e FEMTO 600 S. As cubetas usadas são de vidro com caminho óptico de $1,0 \text{ cm}$. Uma centrífuga FANEM 206 BL também foi utilizada.

2 – PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Para obtenção dos espectros do complexo de diclofenaco de cobre(II) foram adicionados, em um funil de separação, (para cada $2,0 \text{ mL}$ de solução padrão de diclofenaco de sódio): $3,0 \text{ mL}$ de acetato de cobre(II) $50,0 \text{ mg mL}^{-1}$; $4,0 \text{ mL}$ de tampão

acetato (pH 5,3) e 2,0 mL de clorofórmio. O funil foi agitado por 3 minutos. Houve a formação de duas fases. A fase inferior, contendo o composto extraído em clorofórmio, foi coletada em um tubo de ensaio. Foram feitas mais duas extrações, da mesma amostra, com 2,0 e 1,0 mL de clorofórmio respectivamente totalizando 5,0 mL de solução de clorofórmio. Este procedimento também foi usado para obtenção da curva analítica e para análise de preparações farmacêuticas comerciais.

Após as extrações as medidas de absorbância nas soluções de clorofórmio foram feitas em cubeta de vidro de 1,0 cm de caminho óptico a 680 nm.

Na otimização do pH para extração do complexo e também na otimização da concentração de acetato de cobre(II), manteve-se a proporção (em volume) das soluções em 2:3:4 (padrão ou amostra, acetato de cobre(II) e tampão). Foram feitas três extrações tendo-se um volume total de clorofórmio de 5,0 mL.

O estudo da eficiência da extração do complexo com clorofórmio foi feito através da realização, após a adição dos reagentes, de uma a quatro extrações com clorofórmio. A Tabela 3 relaciona os ensaios com o volume de clorofórmio utilizado em cada extração tendo-se um volume total final igual a 5,0 mL.

Tabela 3: Relação dos volumes de clorofórmio utilizados para extração em cada ensaio (1 a 4 extrações). Volume total final igual a 5,0 mL por ensaio.

Ensaio	Volume em cada extração / mL			
Número de extrações				
1	5,0			
2	2,5	2,5		
3	2,0	2,0	1,0	
4	1,5	1,5	1,5	0,5

Depois deste estudo foi feito ensaio extraíndo o complexo com 7,0 mL de clorofórmio de uma vez, seguido de concentração para 5,0 mL por evaporação, em banho-maria, do solvente. O mesmo estudo foi feito usando 10,0 mL de clorofórmio de uma vez seguido também de concentração para 5,0 mL por evaporação do solvente em banho-maria.

O estudo da força iônica da solução foi feito através da adição de 1,0 mL de um sal logo após a reação de complexação com o acetato de cobre(II). Foram usados cinco sais diferentes e em um dos casos foi adicionado somente água. Foram feitas três extrações com clorofórmio ($V_{\text{total final}} = 5,0 \text{ mL}$).

3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Obtenção de espectros do complexo de diclofenaco de cobre(II)

Foram obtidos espectros de 400 a 800 nm do complexo de diclofenaco de cobre(II), extraído em clorofórmio, em três concentrações diferentes utilizando padrão de diclofenaco de sódio (Figura 8).

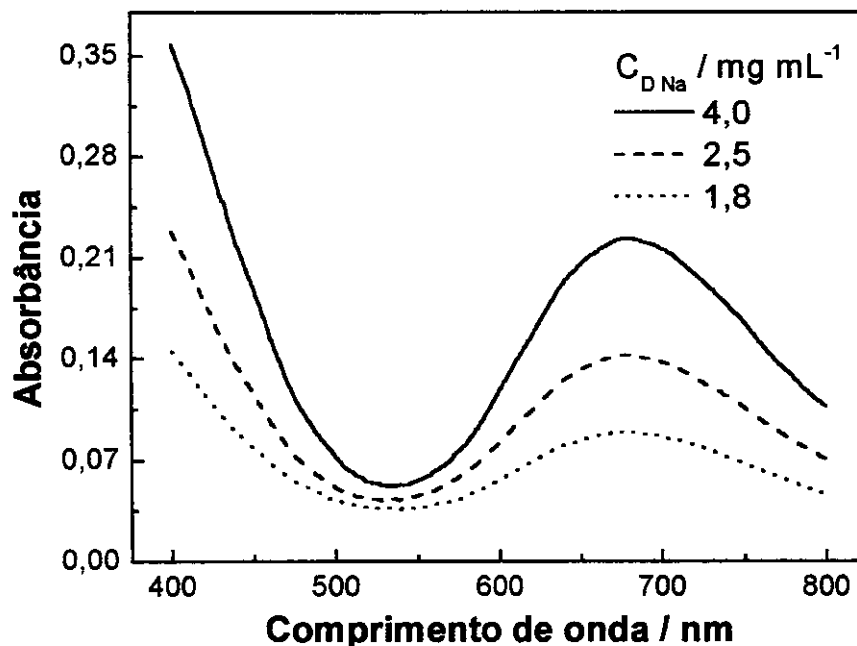


Figura 8 : Espectros do complexo de diclofenaco de cobre(II) extraído em clorofórmio (400 a 800 nm) usando padrão de diclofenaco de sódio.

O complexo de diclofenaco de cobre(II), de cor verde, apresenta absorção máxima próxima de 680 nm. Sendo assim, este foi o comprimento de onda usado para as análises.

3.2 Primeiros estudos

Nos primeiros estudos foram feitos testes utilizando cubetas de vidro de 1,0 e de 2,0 cm de caminho óptico. A cubeta de 2,0 cm de caminho óptico foi usada, no início, devido a ineficiência na extração do complexo. Com a otimização da extração, a cela de 1,0 cm de caminho óptico mostrou-se adequada. Foram feitos, também, testes com adição de tampão, feito com ácido acético e acetato de sódio, antes e depois da adição de solução de acetato de cobre(II). Concluiu-se que é melhor adicionar o tampão depois da solução de acetato de cobre(II). A concentração da solução de acetato de cobre(II) usada inicialmente foi de $50,0 \text{ mg mL}^{-1}$ e o pH do tampão, feito com ácido acético e acetato de sódio, usado foi 5,3. Um estudo da concentração de diclofenaco a ser usada na análise (Tabela 4) também foi feito com soluções padrão de diclofenaco de sódio em três concentrações diferentes. Para otimizar os resultados em análises espectrofotométricas, a solução a ser medida deve gerar um sinal entre 75,0 e 20,0 % de transmitância, ou seja, entre 0,125 e 0,699 de absorbância a fim de minimizar o erro ocasionado pelos efeitos do ruído instrumental.

Tabela 4: Estudo para escolha da solução de diclofenaco para análise.

	$C_{D Na} / \text{mg mL}^{-1} *$	$A **$
Padrão	5,0	0,304
	7,0	0,485
	10,0	0,790

* $C_{D Na}$ = Concentração de diclofenaco de sódio

** A = Absorbância em 680 nm

A solução de concentração $7,0 \text{ mg mL}^{-1}$ foi a que gerou resultado mais adequado e, portanto esta foi a concentração usada nas análises das amostras, ou seja, considerando o valor nominal da quantidade do princípio ativo farmacêutico, as soluções foram preparadas de modo a conter, no final, cerca de $7,0 \text{ mg mL}^{-1}$.

3.3 Otimização do pH para extração do complexo

Antes de iniciar esta análise, para controle, mediu-se o pH das diversas soluções usadas na análise:

- pH solução padrão $7,0 \text{ mg mL}^{-1} = 7,10$
- pH solução de acetato de cobre(II) $50,0 \text{ mg mL}^{-1} = 5,50$
- pH solução padrão $7,0 \text{ mg mL}^{-1} + \text{solução de cobre(II)} 50,0 \text{ mg mL}^{-1} = 5,38$

Seguindo o procedimento descrito por *Kustrin et al.*, 1991, a solução tampão foi feita com ácido acético $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ e hidróxido de sódio $1,0 \text{ mol L}^{-1}$. Foi feito um estudo baseado neste procedimento utilizando a solução tampão em diferentes pHs. Foram obtidos, assim, os valores de absorbância para solução padrão de diclofenaco de potássio $7,0 \text{ mg mL}^{-1}$ após sua reação de complexação com acetato de cobre(II) $50,0 \text{ mg mL}^{-1}$ como mostra a Tabela 5. Os valores de pH final foram obtidos após a adição de todos os reagentes (solução padrão, solução de acetato de cobre(II) e a respectiva solução tampão).

Tabela 5 : Dados obtidos da reação de complexação. A absorbância se refere a três extrações com clorofórmio (volume total final de $5,0 \text{ mL}$).

Tampão	pH final	A *
4,6	4,8	0,081
5,0	5,1	0,124
5,3	5,3	0,476
6,0	5,9	0,416
6,4	6,1	0,409

* A = Absorbância em 680 nm

Pela Tabela 5 pode-se notar uma pequena diferença nos valores do pH da solução final em relação ao valor do pH do tampão preparado. Estas pequenas variações para mais e para menos não interferem nas análises. No caso em que se usou solução tampão pH 5,3 ocorre a maior extração do complexo visto o maior valor de absorbância. Sendo assim, a solução tampão pH 5,3 foi a escolhida para ser usada nas análises.

Seguindo procedimento descrito por *R. M. V. Assumpção et al., 1968* resolveu-se preparar a solução tampão pH 5,3 usando-se ácido acético e acetato de sódio por questões de praticidade.

Para tentar obter a maior extração possível do complexo, foram feitos testes usando tampão fosfato H_2KPO_4 / NaOH nos pHs 5,8 e 6,2 e tampão de McIlvaine nos pHs 4,5; 5,4 e 6,2. O fosfato interferiu nas análises e, portanto, não foi usado.

3.4 Otimização da concentração de acetato de cobre(II)

Segundo *Kustrin et al., 1991*; a solução de acetato de cobre(II) deve conter também solução $0,6 \text{ mg mL}^{-1}$ de ácido acético a fim de se evitar sua hidrólise. Foram feitas soluções de cobre(II) com concentrações variando de $40,0$ a $70,0 \text{ mg mL}^{-1}$. Não é possível obter soluções mais concentradas já que ocorre a saturação. Estas soluções foram feitas com e sem adição de solução de ácido acético $0,6 \text{ mg mL}^{-1}$ na proporção 9:1 (v/v) água / ácido acético, para ver se realmente era necessário seu uso.

Foi usada solução padrão de diclofenaco de sódio de concentração $7,0 \text{ mg mL}^{-1}$. O tampão usado foi feito com ácido acético e acetato de sódio (pH 5,3). Os espectros de diclofenaco de cobre(II) obtidos usando-se acetato de cobre(II) com e sem ácido acético podem ser vistos na Figura 9.

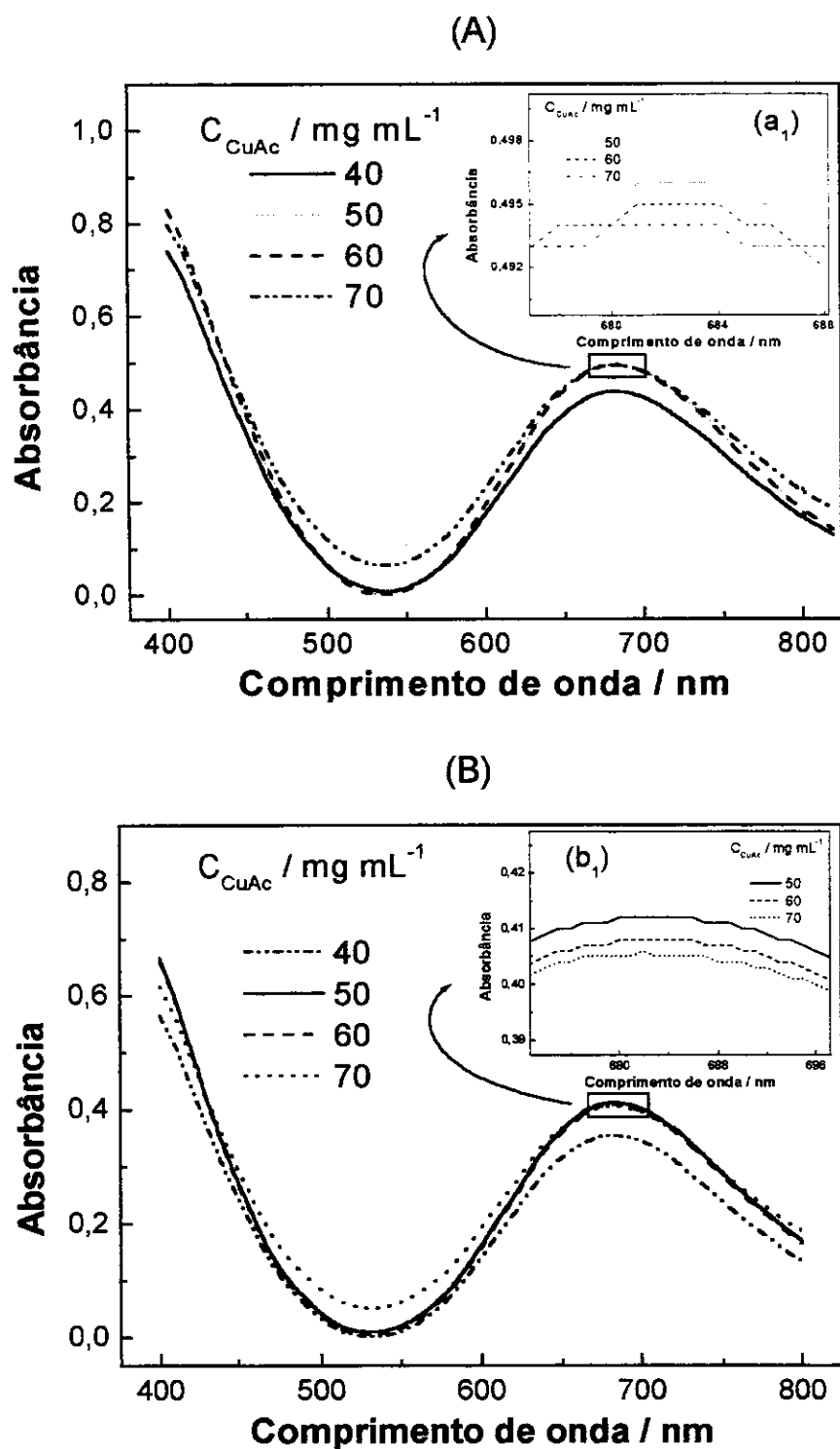


Figura 9: Espectros de diclofenaco de cobre(II) extraído em clorofórmio acompanhados das respectivas ampliações, (a₁) e (b₁), para melhor visualização. Complexação com adição de solução de ácido acético 0,6 mg mL⁻¹ (A) e sem sua adição (B). C_{CuAc} = Concentração de acetato de cobre(II).

Tabela 6: Dados obtidos da reação de complexação (extração com clorofórmio) entre solução padrão de diclofenaco de sódio $7,0 \text{ mg mL}^{-1}$ e soluções com diferentes concentrações de acetato de cobre(II) feitas com e sem adição de solução de ácido acético $0,6 \text{ mg mL}^{-1}$.

$C_{\text{CuAc}} / \text{mg mL}^{-1} *$	$A **$	
	Com ácido acético	Sem ácido acético
40,0	0,438	0,354
50,0	0,495	0,412
60,0	0,494	0,408
70,0	0,494	0,405

* C_{CuAc} = Concentração de acetato de cobre(II)

** A = Absorbância em 680 nm

Como visto na Tabela 6, quando se usou ácido acético na solução de cobre(II) obteve-se maior absorção.

Pelos resultados obtidos, foi escolhida para as análises seguintes a solução de acetato de cobre(II) $50,0 \text{ mg mL}^{-1}$ contendo ácido acético pois nas concentrações maiores de acetato de cobre(II) ($60,0$ e $70,0 \text{ mg mL}^{-1}$), o valor de absorbância permaneceu constante.

3.5 Estudo do número de extrações do complexo com clorofórmio

O processo de extração é governado pela Lei de Distribuição ou Lei de Partição, que estabelece que se uma substância for adicionada a uma mistura de dois líquidos não-miscíveis ou ligeiramente miscíveis, ela se distribui entre as camadas de modo que a razão de sua concentração em um solvente para a sua concentração no outro solvente permanece constante a uma determinada temperatura [C.C. Andrei *et al.*, 2003].

A razão entre as concentrações é denominada coeficiente de partição ou de distribuição. Portanto, quando uma substância sofre partição entre um solvente orgânico extrator e a água, o coeficiente de partição pode ser representado pela equação (V):

$$P = \frac{C_0}{C_A} \quad (V)$$

Sendo: P = Coeficiente de partição, C_0 = Concentração da substância no solvente extrator e C_A = Concentração da substância na água.

Qualquer substância cujo coeficiente de partição seja maior que 1 pode ser extraída eficientemente da fase aquosa [C. C. Andrei et al., 2003]. A extração é mais eficiente quando se divide o solvente extrator em diversas porções, realizando a extração em várias etapas em vez de realizá-la em uma única etapa com o volume total de solvente utilizado nas várias extrações individuais.

Foi testado o número de extrações (1 a 4) do complexo em clorofórmio, tendo 5,0 mL como volume total, através da medida da absorbância a 680 nm do complexo em clorofórmio obtido com solução padrão 7,0 mg mL⁻¹ de diclofenaco de sódio, como mostrado na Figura 10.

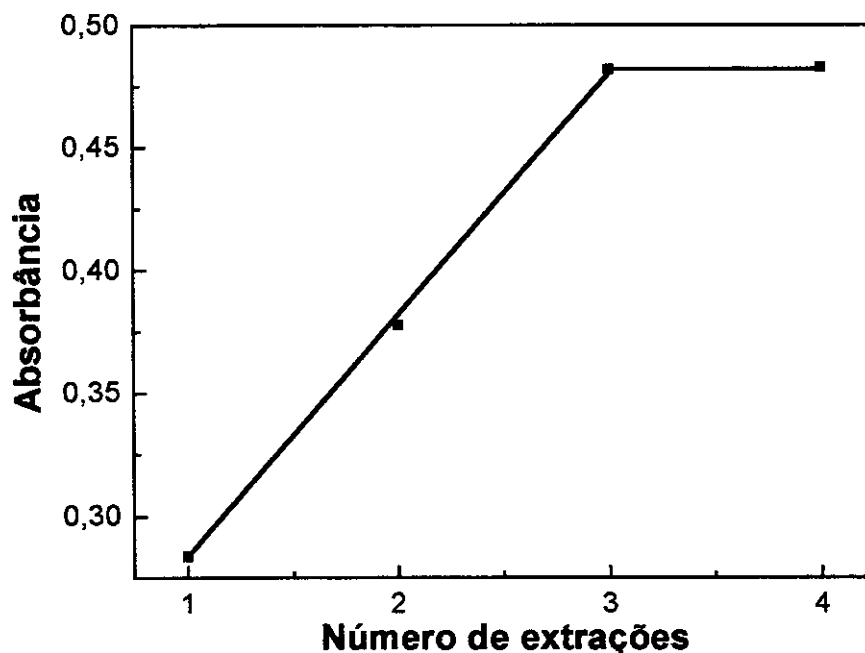


Figura 10: Absorbâncias a 680 nm do complexo de diclofenaco de cobre(II) extraído em clorofórmio. Uso de uma a quatro extrações do complexo com volume total final igual a 5,0 mL para cada caso.

Pela Figura 10, nota-se um aumento gradual nos valores de absorbância enquanto se aumenta o número total de extrações. Porém, ao mudar de três para quatro extrações percebeu-se que o valor de absorbância manteve-se constante.

Para tentar facilitar ainda mais o procedimento tentou-se fazer extração com maior quantidade de clorofórmio seguido de concentração para 5,0 mL de clorofórmio através de evaporação do solvente. Os resultados obtidos se encontram na Tabela 7.

Tabela 7: Dados obtidos da reação de complexação entre solução padrão de diclofenaco de sódio $7,0 \text{ mg mL}^{-1}$ e solução de acetato de cobre(II) $50,0 \text{ mg mL}^{-1}$ fazendo extração com diferentes volumes de clorofórmio.

VCHCl ₃ / mL *	A **
7,0	0,303
10,0	0,398

* VCHCl₃ = Volume de clorofórmio

** A = Absorbância em 680 nm

Os valores obtidos indicam menor extração do complexo comparado ao caso em que se fez três extrações ($A = 0,482$). Sendo assim, foram feitas três extrações do complexo de diclofenaco de cobre(II) com clorofórmio.

3.6 Estudo da força iônica da solução

A relação entre atividade a_x de uma espécie e sua concentração em mol L^{-1} $[X]$ é dada pela equação (VI):

$$a_x = \gamma_x [X] \quad (\text{VI})$$

Sendo γ_x uma quantidade adimensional chamada coeficiente de atividade. Este coeficiente, e portanto a atividade de X , varia com a força iônica de uma solução de modo tal que o uso de a_x em vez de $[X]$ em cálculos de equilíbrio, permite que se obtenha um valor numérico independente da força iônica. A força iônica I é definida pela equação (VII):

$$I = \frac{1}{2} \left\{ [x_1] z_1^2 + [x_2] z_2^2 + [x_3] z_3^2 + \dots \right\} \quad (\text{VII})$$

Sendo $[X_1]$, $[X_2]$, $[X_3]$... as representações da concentração em mol L⁻¹ dos vários íons em solução e Z_1 , Z_2 , Z_3 ... suas respectivas cargas. No cálculo da força iônica é necessário levar em conta todas as espécies iônicas na solução, não apenas as reativas.

Kustrin *et al.*, 1991, usaram cloreto de potássio para reação de complexação do diclofenaco para manutenção da força iônica. Neste trabalho foi feito um rápido estudo para verificar se era necessária (ou não) a presença de cloreto de potássio (ou algum outro sal) na análise. Foi usada solução padrão 7,0 mg mL⁻¹ de diclofenaco de sódio (Figura 11).

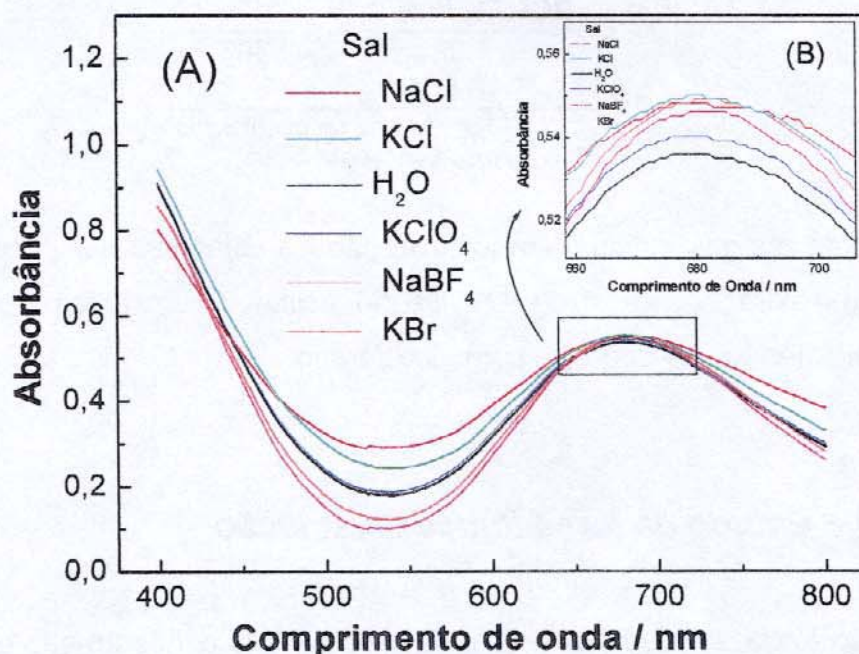


Figura 11: Espectros relativos ao estudo da presença de sais na reação de complexação de solução padrão de diclofenaco de sódio com acetato de cobre(II) (A). Ampliação de parte dos espectros (B). Extração com clorofórmio.

Para o cálculo da força iônica foram considerados todos os íons em solução: Na⁺ e C₁₄H₁₀Cl₂NO₂⁻ (diclofenaco de sódio), H⁺ e Ac⁻ (ácido acético), Na⁺ e Ac⁻ (acetato de sódio), Cu²⁺ e Ac⁻ (acetato de cobre(II)) e os íons dos respectivos sais. Para todos os sais, à exceção do KClO₄ ($I = 0,32$), obteve-se $I = 0,53$. Isto ocorre porque a força iônica de um eletrólito que possui íon de carga unitária é idêntico à concentração molar do sal. O eletrólito, neste caso, aumenta a solubilidade do diclofenaco de sódio por forças eletrostáticas de atração e repulsão que existem entre os íons desse eletrólito e os

envolvidos no equilíbrio (íons diclofenaco) e, sendo assim, quanto maior a força iônica, maior a solubilidade.

Com relação ao caso em que se usou água (espectro representado em cor preta) não foi notada diferença significativa na extração do diclofenaco em relação aos outros sais (diferença em torno de 0,01 unidades de absorbância) e, sendo assim, optou-se por não usar sais para aumentar a força iônica da solução, simplificando o procedimento.

3.7 Figuras de mérito

Neste estudo foram analisadas oito figuras de mérito sendo feitos dois estudos de exatidão.

As três primeiras figuras de mérito (linearidade, faixa linear e sensibilidade – Capítulo II, itens 7.1 a 7.3) foram obtidas através da análise da curva analítica. Para isso, foram feitas medidas em triplicata com soluções padrão de diclofenaco de sódio e de diclofenaco de potássio como mostrado na Tabela 8.

Tabela 8: Dados espectrofotométricos para construção da curva analítica do diclofenaco de sódio e do diclofenaco de potássio.

$C_D / \text{mg mL}^{-1} *$	$A_{Na} **$	$s ***$	$A_K **$	s
1,0	0,012	0,006	0,006	0
5,0	0,297	0,007	0,274	0,007
7,0	0,480	0,015	0,481	0,054
10,0	0,784	0,012	0,736	0,022
15,0	1,240	0,027	1,165	0,048
20,0	1,707	0,025	1,641	0,057
25,0	2,031	0,026	2,015	0,026

* C_D = Concentração de diclofenaco

** A_{Na} e A_K = Absorbância média ($N = 3$) para diclofenaco de sódio e diclofenaco de potássio

*** s = Estimativa de desvio padrão

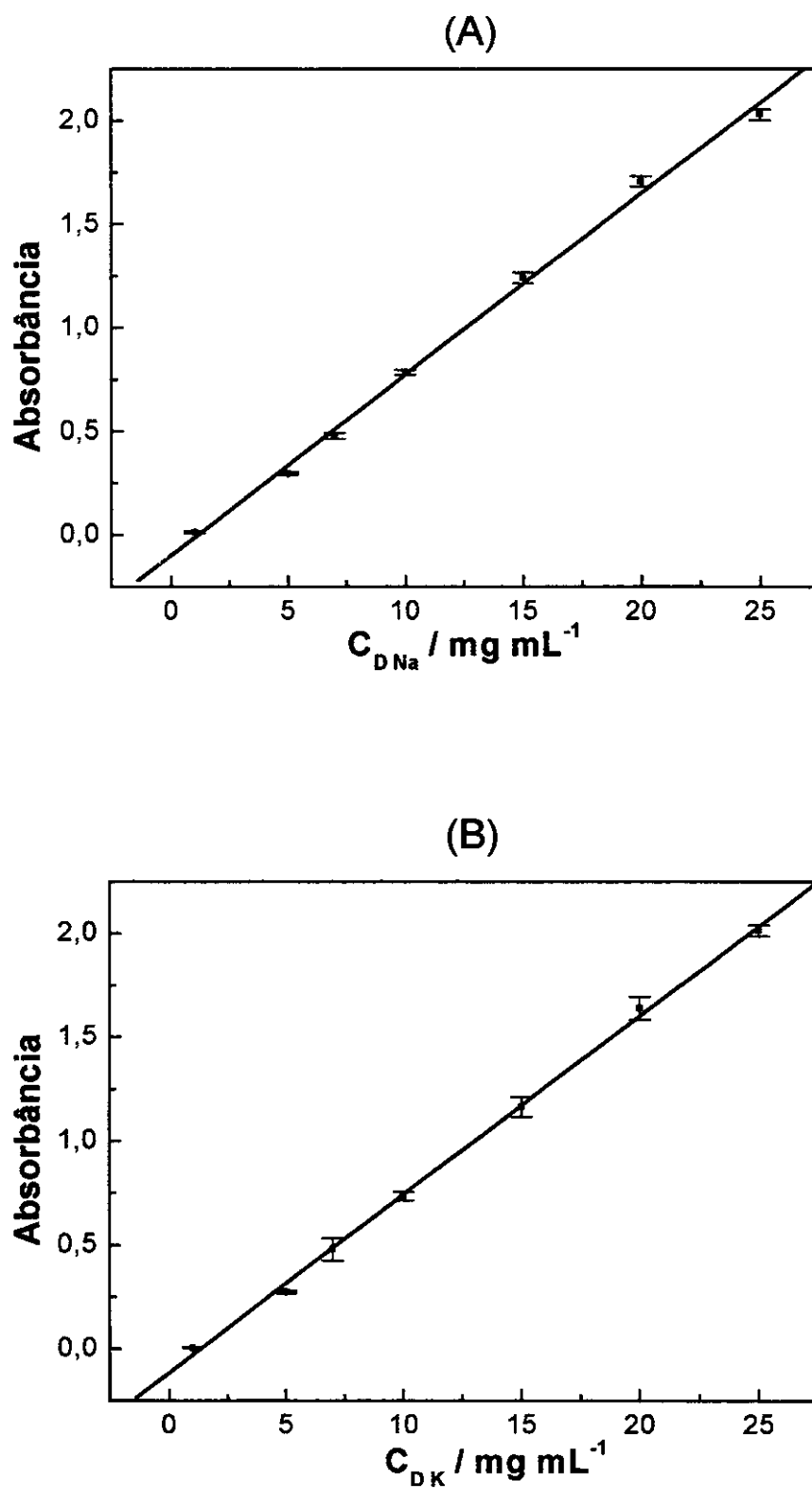


Figura 12: Curva analítica para diclofenaco de sódio - D_{Na} (A) e diclofenaco de potássio - D_K (B). Absorbância medida em 680 nm. Extração com clorofórmio.

Tabela 9: Equações obtidas das curvas analíticas.

Equação	Coefficiente de correlação
$A = -0,101 + 0,087 C_{DNa}$	$r = 0,9984$
$A = -0,115 + 0,086 C_{DK}$	$r = 0,9993$

Neste estudo, para o cálculo do limite de detecção e do limite de determinação usou-se a estimativa do desvio padrão do branco cujo valor foi 0,005 (10 medidas).

Para obtenção da seletividade (Capítulo II, item 7.6) as análises foram feitas usando solução de NaOH 0,1 mol L⁻¹ e de H₂O₂ 3% (o diclofenaco foi dissolvido diretamente nestas soluções obtendo-se solução 7,0 mg mL⁻¹). O diclofenaco não é solúvel em HCl.

A precisão (intra e inter - ensaio) foi obtida através da análise, durante 5 dias, de 3 soluções da curva analítica (5,0; 10,0 e 15,0 mg mL⁻¹) feitas com uma solução estoque de 20,0 mg mL⁻¹ (Capítulo II, item 7.7).

Tabela 10: Dados para determinação da precisão do método espectrofotométrico.

Espectrofotometria							
Dia	C _D / mg mL ⁻¹ *	Intra - ensaio					
		A _{Na} **	S _{Na} ***	%RSD **** (N = 5)	A _K **	S _K ***	%RSD (N = 5)
1	5,0	0,30	0,01	2,0	0,25	0,01	3,6
2		0,31	0,01	3,2	0,28	0,01	5,0
3		0,30	0,01	2,0	0,30	0,01	1,7
4		0,30	0,01	2,7	0,29	0,01	2,4
5		0,31	0,01	2,2	0,29	0,01	4,2
Inter - ensaio		0,30	0,01	2,4	0,28	0,01	3,4
1	10,0	0,83	0,03	3,0	0,74	0,04	5,0
2		0,81	0,02	3,4	0,74	0,02	2,0
3		0,75	0,01	1,2	0,73	0,01	1,7
4		0,77	0,02	2,0	0,73	0,02	3,2
5		0,78	0,02	2,1	0,72	0,01	1,3
Inter - ensaio		0,79	0,02	2,3	0,73	0,02	2,6
1	15,0	1,37	0,04	3,0	1,25	0,02	1,3
2		1,36	0,02	1,2	1,24	0,03	2,3
3		1,30	0,03	2,1	1,23	0,03	2,1
4		1,33	0,03	2,6	1,24	0,03	2,7
5		1,36	0,04	2,7	1,29	0,03	2,3
Inter - ensaio		1,34	0,03	2,3	1,25	0,03	2,1

* C_D = Concentração de diclofenaco

** A_{Na} e A_K = Absorbância média (N = 5) para diclofenaco de sódio e diclofenaco de potássio

*** S_{Na} e S_K = Estimativa de desvio padrão para diclofenaco de sódio e diclofenaco de potássio

**** %RSD = Estimativa de desvio padrão relativo (%RSD = s / A × 100), sendo A a absorbância média

No presente trabalho, a exatidão [B. de B. Neto et al., 1995; G. D. Christian, 1986; R. Caulcutt et al., 1989; J. C. Miller et al., 1993] foi avaliada mediante comparação de resultados obtidos na determinação de diclofenaco em amostras de medicamento pelo método proposto e pelo método HPLC recomendado pela Farmacopéia Norte Americana.

Abaixo encontram-se as Tabelas 11 e 12 com os parâmetros de validação (figuras de mérito) obtidos para o método espectrofotométrico.

Tabela 11: Parâmetros de validação para o método espectrofotométrico.

Parâmetros		Na	K				
Linearidade		0,9984	0,9993				
Faixa linear (mg mL ⁻¹)		1,0–25,0	1,0–25,0				
Sensibilidade (unidades de absorvância/mg mL ⁻¹)		0,087	0,086				
Limite de detecção – DL (mg mL ⁻¹)		0,2	0,2				
Limite de determinação – QL (mg mL ⁻¹)		0,6	0,6				
Seletividade (especificidade)		• NaOH 0,1 mol L ⁻¹ • H ₂ O ₂ 3 %	possível possível				
Precisão(repetibilidade)		%RSD (N = 5) **					
C _D / mg mL ⁻¹ *		Intra - ensaio					Inter - ensaio
		Dia					
		1	2	3	4	5	
Na	5,0	1,99	3,19	1,97	2,70	2,24	2,42
	10	3,02	3,43	1,19	1,96	2,05	2,33
	15	3,00	1,18	2,08	2,55	2,73	2,31
K	5,0	3,59	5,02	1,67	2,41	4,15	3,37
	10	5,01	2,02	1,65	3,15	1,25	2,62
	15	1,28	2,33	2,12	2,67	2,32	2,14

* C_D = Concentração de diclofenaco

** %RSD = Estimativa de desvio padrão relativo para cinco determinações em cada dia

Deve-se lembrar que só se pode afirmar que o método é seletivo após a certeza de que a resposta obtida deve-se por causa do analito ou de um derivado deste. A resposta “possível” indica que os testes de seletividade preliminares para diclofenaco foram positivos.

Tabela 12: Comparação do método espectrofotométrico com o método oficial da Farmacopéia Norte Americana (HPLC).

Amostras	$m_{D Na} / mg * \pm ts / \sqrt{N}$		$m_{D K} / mg * \pm ts / \sqrt{N}$	
	Método proposto	Método USP	Método proposto	Método USP
Comprimido	46 ± 2	$46,1 \pm 0,4$	48 ± 2	$47,4 \pm 0,4$
Injetável	74 ± 2	76 ± 1	73 ± 2	74 ± 2

* $m_{D Na}$ e $m_{D K}$ = Massa média de diclofenaco de sódio e de diclofenaco de potássio

t = t-distribuição com 95% de confiança com (N-1) graus de liberdade

s = Estimativa de desvio padrão da concentração média de diclofenaco de sódio e de diclofenaco de potássio

N = Número de análises sendo 5 para método proposto e 3 para método USP

$ts / \sqrt{N}$ = Limite de confiança para a média $\bar{m}$ de N medidas repetidas

Tabela 13: Comparação entre os valores de t-Student obtido e tabelado. N = 5.

Amostras	Diclofenaco de sódio		Diclofenaco de potássio	
	t_{obtido}^*	$t_{tabelado}$	t_{obtido}	$t_{tabelado}$
Comprimido	0,05 a 1,56	2,78	0,01 a 1,70	2,78
Injetável	0,48 a 1,54		0,28 a 1,56	

* t_{obtido} = Valores de t-Student obtidos em 5 análises

A análise dos resultados obtidos pelo teste t de Student comparativo revelou que todos os valores estavam concordantes dentro do grau de confiança de 95%.

Capítulo IV

ESTUDO DO MÉTODO REFLECTOMÉTRICO

1 – MATERIAL

1.1 Preparo de soluções

Para este estudo foi utilizada a solução de acetato de cobre(II) $50,0 \text{ mg mL}^{-1}$ descrita no Capítulo III item 1.1.1, tampão acetato 2 (ácido acético $2,0 \text{ mol L}^{-1}$ e acetato de sódio $2,0 \text{ mol L}^{-1}$) pH 5,3 e também soluções padrão de diclofenaco de sódio e diclofenaco de potássio 1,0; 3,0; 5,0; 7,0; 10,0; 13,0; 15,0 e $18,0 \text{ mg mL}^{-1}$ obtidas como descrito no Capítulo III item 1.1.4.

1.2 Aparelhos e acessórios

No estudo do método reflectométrico usou-se o espectrofotômetro HP 8452 A Diode Array, acoplado com acessório para reflectância RSA HP 84. Uma representação esquemática [How does..., acesso em 08 jul. 2003] de um espectrofotômetro de reflectância com esfera integradora está exposto na Figura 13:

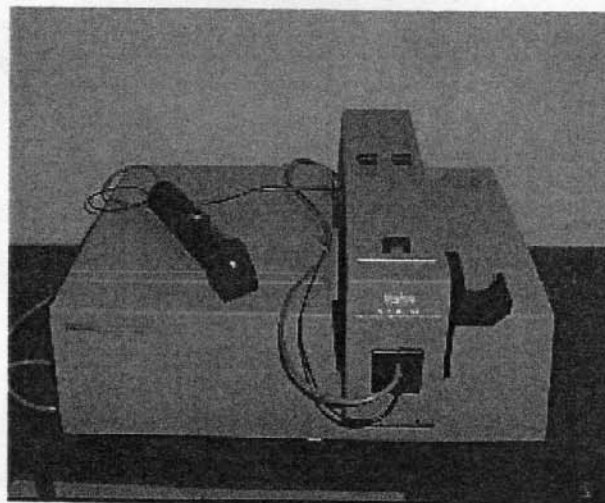


Figura 13: Espectrofotômetro HP 8452 A Diode Array, acoplado com acessório para reflectância RSA HP 84 com fibra óptica.

Para o estudo do método reflectométrico quantitativo desenvolvido neste trabalho, também foi utilizado um reflectômetro portátil desenvolvido no laboratório (Figura 14).

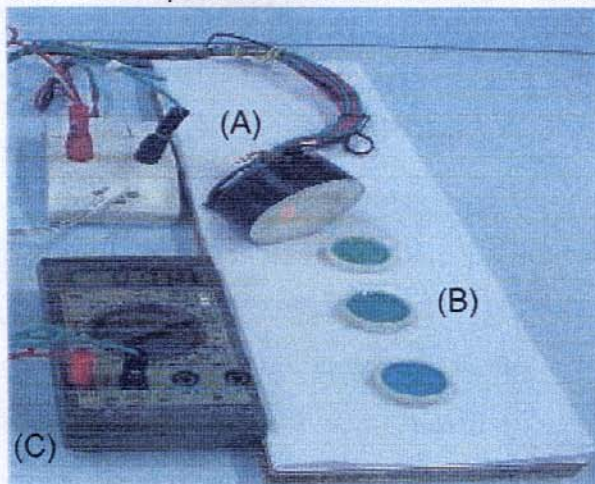


Figura 14: Visualização do reflectômetro portátil usado mostrando a cela reflectométrica (A), células de análise (B) e multímetro (C).

O reflectômetro desenvolvido é análogo ao descrito por *Tubino et al., 2003*. Entretanto, o dispositivo usado neste trabalho foi construído em PVC branco, pintado de preto externamente. O LED usado é vermelho ($\lambda = 635 \text{ nm}$). Juntamente com o LED foi colocada uma resistência de $100 \, \Omega$ para evitar que queimasse.

2 – PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

2.1 Uso do acessório do espectrofotômetro HP 8452 A Diode Array

Numa fase inicial, foi obtido o espectro de reflectância usando solução padrão de diclofenaco de potássio $7,0 \text{ mg mL}^{-1}$. Foi mantida a proporção 2:3:4 (v/v) das soluções.

Foram feitas soluções de diclofenaco usando solução padrão de diclofenaco de potássio com concentrações 0,63; 1,25; 2,50; 3,75; e $5,0 \text{ mg mL}^{-1}$. Com o auxílio de micropipeta Sci Tech ($50 - 200 \, \mu\text{L}$), foram misturados $67 \, \mu\text{L}$ de amostra comercial, $100 \, \mu\text{L}$ de acetato de cobre(II) e $133 \, \mu\text{L}$ de tampão acetato (pH 5,3). Foram coletados $80 \, \mu\text{L}$ da

mistura que foi colocada no suporte de análise construído em PTFE branco, como mostrado na Figura 15. O branco utilizado foi o próprio PTFE.

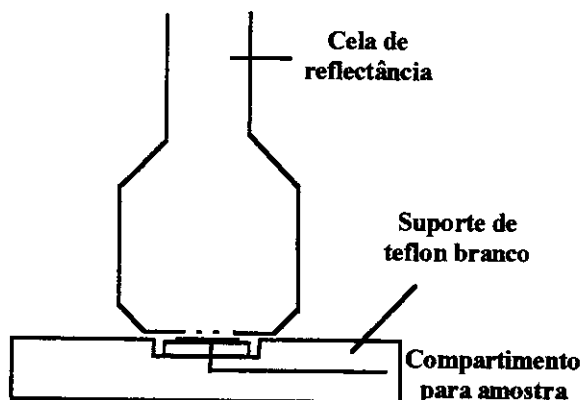


Figura 15: Suporte para estudo reflectométrico utilizando acessório de reflectância.

2.2 Uso do reflectômetro portátil

Foi misturado na cela de análise, com o auxílio de micropipeta (200 - 1000 μL), 310 μL de solução padrão (ou solução de amostra comercial), 470 μL de solução de acetato de cobre(II) 50,0 mg mL^{-1} e 620 μL de tampão acetato pH 5,3. Com isso tinha-se um volume total na cela de análise de 1,4 mL. A solução foi agitada com um bastão de vidro pequeno (10,0 cm de comprimento e 0,3 cm de diâmetro) para homogeneização. Após isso as medidas de resistência, em ohms, foram feitas utilizando voltagem aplicada no LED de 3,5 V.

3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Estudos com acessório de reflectância do espectrofotômetro HP 8452 A

Nos primeiros estudos foi obtido um espectro de reflectância do complexo de diclofenaco de cobre(II) de 450 a 780 nm utilizando solução padrão 7,0 mg mL^{-1} de diclofenaco de potássio, como mostrado na Figura 16. Foi utilizado o espectrofotômetro HP 8254 A com acessório para reflectância RSA HP 84.

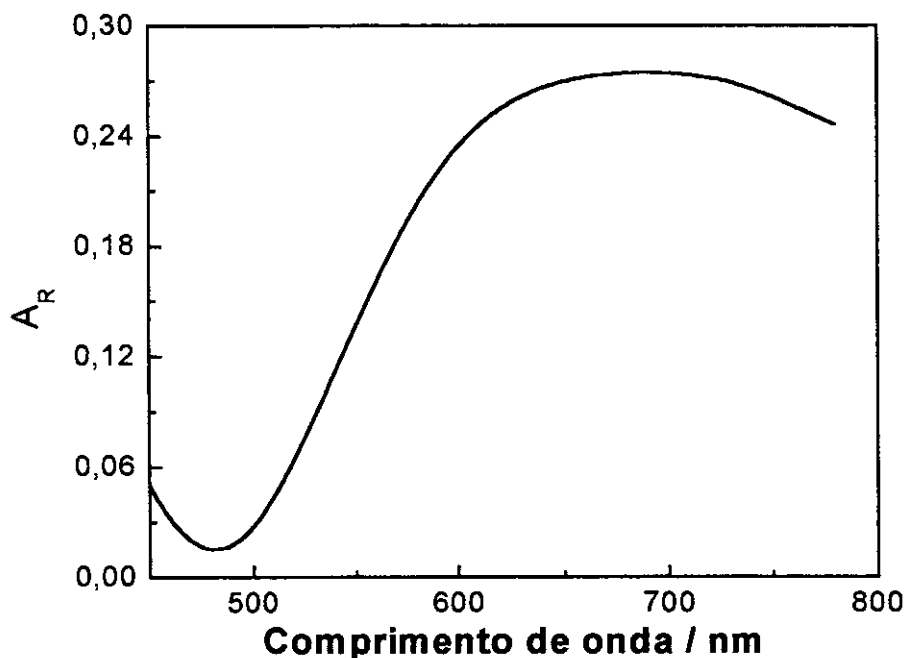


Figura 16: Espectro de reflectância do complexo de diclofenaco de cobre(II). Medidas feitas no espectrofotômetro HP 8254 A com acessório RSA HP 84. $A_R = -\log$ (Reflectância)

Em 680 nm foi obtido o A_R médio (análogo da absorbância) de cinco soluções feitas com padrão de diclofenaco de potássio. As medidas obtidas da reação de complexação de diclofenaco de potássio com acetato de cobre(II) foram feitas em triplicata para cada uma das soluções. Os resultados são mostrados na Tabela 14 acompanhados do respectivo gráfico (Figura 17).

Tabela 14: Dados obtidos da reação de complexação utilizando o espectrofotômetro HP 8254 A com acessório para reflectância RSA HP 84. Média de triplicata.

$C_{DK} / \text{mg mL}^{-1} *$	$A_R **$	$s ***$
0,63	0,246	0,003
1,25	0,256	0,003
2,50	0,270	0,002
3,75	0,281	0,003
5,00	0,293	0,003

* C_{DK} = Concentração de diclofenaco de potássio

** A_R = Densidade óptica.

*** s = Estimativa de desvio padrão

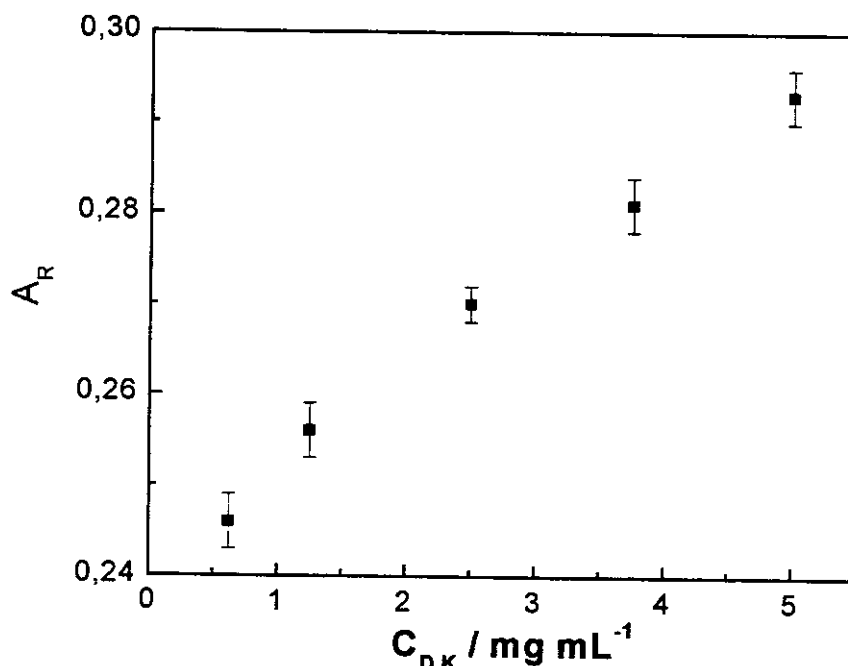


Figura 17: Gráfico obtido para diclofenaco de potássio - D_K nos estudos utilizando espectrofotômetro com acessório para reflectância.

Através da observação destes dados preliminares (relação linear entre densidade óptica – A_R e concentração de diclofenaco de potássio – D_K) foi possível admitir que o procedimento analítico proposto com reflectômetro portátil, para quantificação de diclofenaco em preparações farmacêuticas, pode levar a bons resultados.

3.2 Estudos com reflectômetro portátil

Inicialmente foram feitos estudos usando-se apenas água em três celas de análise reflectométrica, variando-se o volume total. Foi notado um ligeiro aumento no valor de resistência a medida em que se aumentava o volume total de água na cela. Também foi feito estudo variando o volume total das soluções de reagentes (adicionados na proporção 2:3:4 mL como no estudo do método espectrofotométrico) na cela de análise de 1,2 a 1,8 mL optando-se pelo uso de 1,4 mL como volume total.

A voltagem a ser aplicada no LED foi otimizada para o valor de 3,5 V.

3.3 Figuras de mérito

Neste estudo, como no estudo do método espectrofotométrico, também foram analisadas oito figuras de mérito.

As três primeiras figuras de mérito (linearidade, faixa linear e sensibilidade), foram obtidas através da análise da curva analítica assim como no caso do estudo espectrofotométrico.

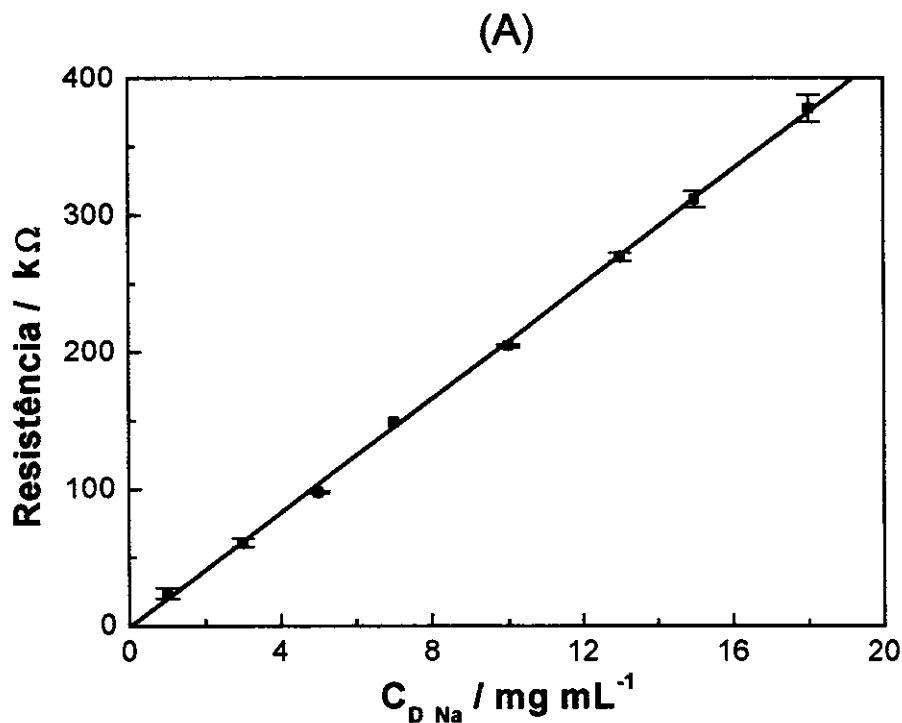
Tabela 15: Dados reflectométricos para construção da curva analítica do diclofenaco de sódio e do diclofenaco de potássio.

$C_D / \text{mg mL}^{-1} *$	$R_{Na} / \text{k}\Omega **$	$s ***$	$R_K / \text{k}\Omega **$	s
1,0	24	4	não obtido	não obtido
3,0	61	3	32	4
5,0	98	1	47	2
7,0	149	0	61	2
10,0	205	1	87	3
13,0	270	3	106	4
15,0	312	6	123	8
18,0	378	10	145	11

* C_D = Concentração de diclofenaco

** R_{Na} e R_K = Resistência média corrigida pelo branco ($R_{Branco} = 313 \text{ k}\Omega$) para diclofenaco de sódio e diclofenaco de potássio

*** s = Estimativa de desvio padrão



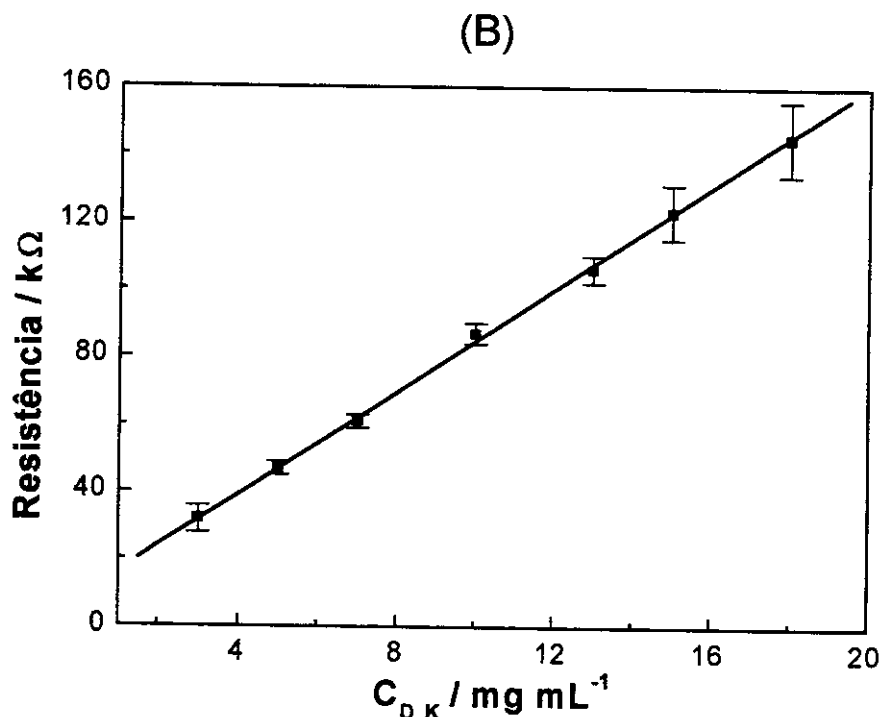


Figura 18: Curva analítica para diclofenaco de sódio - D_{Na} (A) e diclofenaco de potássio - D_K (B). Medidas feitas no reflectômetro portátil.

Tabela 16: Equações obtidas das curvas analíticas.

Equação	Coefficiente de correlação
$R = -1,1 + 20,9 C_{D Na}$	$r = 0,9997$
$R = -8,8 + 7,6 C_{D K}$	$r = 0,9988$

Para o cálculo do limite de detecção e do limite de determinação usou-se a estimativa de desvio padrão do branco cujo valor foi de 2 (média de 10 medidas).

O teste de seletividade foi feito como no estudo do método espectrofotométrico.

A precisão (intra e inter - ensaio) foi obtida através da análise, durante 4 dias, de 3 soluções da curva analítica (5,0; 10,0 e 15,0 mg mL^{-1}) feitas com uma solução estoque de 20,0 mg mL^{-1} .

Tabela 17: Dados para determinação da precisão do método reflectométrico.

Reflectometria							
Dia	C _D / mg mL ⁻¹ *	Intra - ensaio					
		R _{Na} **	S _{Na} ***	%RSD **** (N = 5)	R _K **	S _K ***	%RSD (N = 5)
1	5,0	92	2	2,2	47	1	2,1
2		96	2	2,1	49	2	4,1
3		99	2	2,0	46	2	4,3
4		93	2	2,2	46	2	4,3
Inter - ensaio		95	2	2,1	47	2	3,7
1	10	202	1	0,5	91	2	2,2
2		202	2	1,0	87	2	2,3
3		202	1	0,5	91	2	2,2
4		202	2	1,0	90	3	3,3
Inter - ensaio		202	2	0,8	90	2	2,5
1	15	310	3	1,0	120	2	1,7
2		311	2	0,6	117	1	0,9
3		313	2	0,6	114	2	1,8
4		312	2	0,6	116	4	3,4
Inter - ensaio		312	2	0,7	117	2	2,0

* C_D = Concentração de diclofenaco** R_{Na} e R_K = Resistência média em $k\Omega$ (N = 5) para diclofenaco de sódio e diclofenaco de potássio*** S_{Na} e S_K = Estimativa de desvio padrão para diclofenaco de sódio e diclofenaco de potássio

**** %RSD = Estimativa de desvio padrão relativo

A exatidão foi avaliada mediante comparação de resultados obtidos na determinação de diclofenaco em amostras de medicamento pelo método proposto e pelo método recomendado pela Farmacopéia Norte Americana (HPLC).

As Tabelas 18 e 19 mostram os parâmetros de validação (figuras de mérito) obtidos para o método reflectométrico.

Tabela 18: Parâmetros de validação para o método reflectométrico.

Parâmetros		Na	K			
Linearidade		0,9997	0,9992			
Faixa linear (mg mL ⁻¹)		1,0-18,0	3,0-18,0			
Sensibilidade (unidades de resistência / mg mL ⁻¹)		21	8			
Limite de detecção – DL (mg mL ⁻¹)		0,3	0,9			
Limite de determinação – QL (mg mL ⁻¹)		1,0	2,7			
Seletividade (especificidade)		• NaOH 0,1 mol L ⁻¹ • H ₂ O ₂ 3 %	possível possível			
Precisão(repetibilidade)		%RSD (N = 5) **				
C _D / mg mL ⁻¹ *		Intra - ensaio				Inter - ensaio
		Dia				
		1	2	3	4	
Na	5,0	2,2	2,1	2,0	2,0	2,1
	10	0,5	1,0	0,5	1,0	0,8
	15	1,0	0,6	0,6	0,6	0,7
K	5,0	2,1	4,1	4,3	4,3	3,7
	10	2,2	2,3	2,2	3,3	2,5
	15	1,7	0,9	1,8	3,4	2,0

* C_D = Concentração de diclofenaco

** %RSD = Estimativa de desvio padrão relativo para cinco determinações em cada dia

Tabela 19: Comparação do método reflectométrico com o método oficial da Farmacopéia Norte Americana (HPLC).

Amostras	m _{D Na} / mg * ± ts/√N		m _{D K} / mg * ± ts/√N	
	Método proposto	Método USP	Método proposto	Método USP
Comprimido	48 ± 1	46,1 ± 0,4	50 ± 2	47,4 ± 0,4
Injetável	74 ± 2	76 ± 1	71 ± 2	74 ± 2

* m_{D Na} e m_{D K} = Massa média de diclofenaco de sódio e de diclofenaco de potássio

t = t-distribuição com 95% de confiança com (N-1) graus de liberdade

s = Estimativa de desvio padrão da concentração média de diclofenaco de sódio e de diclofenaco de potássio

N = Número de análises sendo 5 para método proposto e 3 para método USP

ts/√N = Limite de confiança para a média $\bar{m}$ de N medidas repetidas

Tabela 20: Comparação entre os valores de *t*-Student obtido e tabelado. *N* = 5.

Amostras	Diclofenaco de sódio		Diclofenaco de potássio	
	t_{obtido}^*	$t_{tabelado}$	t_{obtido}	$t_{tabelado}$
Comprimido	0,15 a 1,32	2,78	0,25 a 1,42	2,78
Injetável	0,71 a 1,39		0,35 a 1,33	

* t_{obtido} = Valores de *t*-Student obtidos em 5 análises

A análise dos resultados obtidos pelo teste *t* de Student comparativo revelaram que todos os valores estavam concordantes dentro do grau de confiança de 95%.

Capítulo V

ESTUDO DO MÉTODO GRAVIMÉTRICO

1 - MATERIAL

1.1 Preparo de soluções

Para este estudo foram utilizadas as mesmas soluções do estudo do método reflectométrico (Capítulo IV), com exceção das soluções padrão que, neste caso, não são necessárias.

1.2 Aparelhos e acessórios

No estudo do método gravimétrico utilizou-se Balança Analítica Mettler AE 200 e Estufa FANEM 315 SE. Uma centrífuga FANEM 206 BL também foi usada.

2 – PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Inicialmente foi preparada a solução contendo o diclofenaco. No caso do padrão, 50,0 mg foram dissolvidos em 7 mL de água. Para amostra comercial foram usados cerca de 7 mL de solução 7,0 mg mL⁻¹ de diclofenaco.

A solução contendo diclofenaco foi colocada em um béquer e a ela foram adicionados 4,0 mL de solução de acetato de cobre(II) 50,0 mg mL⁻¹ e 4,0 mL de tampão acetato (pH 5,3) nesta ordem.

Após a reação de complexação a solução foi agitada com o auxílio de uma mini bagueta de vidro. A solução contendo o complexo foi transferida para um tubo de vidro de 10,0 cm de comprimento e 1,6 cm de diâmetro com filtro de placa porosa G3 feito no laboratório (Figura 19), previamente seco em estufa por 1 hora a 110°C e tarado. Este tubo foi centrifugado durante 30 segundos inicialmente a 16,7 rps e depois a 58,3 rps (rotações por segundo). O procedimento foi repetido até que toda solução com o complexo contida

foi centrifugado durante 30 segundos inicialmente a 16,7 rps e depois a 58,3 rps (rotações por segundo). O procedimento foi repetido até que toda solução com o complexo contida no béquer fosse centrifugada. O mesmo procedimento foi feito utilizando 200,0 mg de padrão alterando-se proporcionalmente a quantidade dos reagentes utilizados.

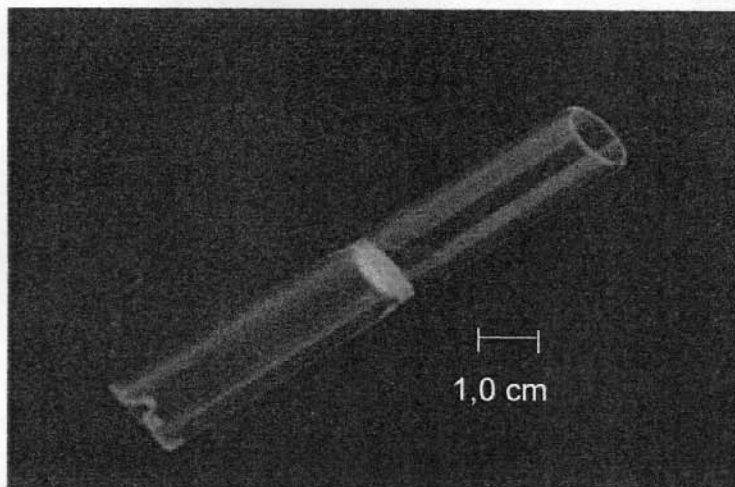


Figura 19: Foto do tubo com filtro de placa porosa.

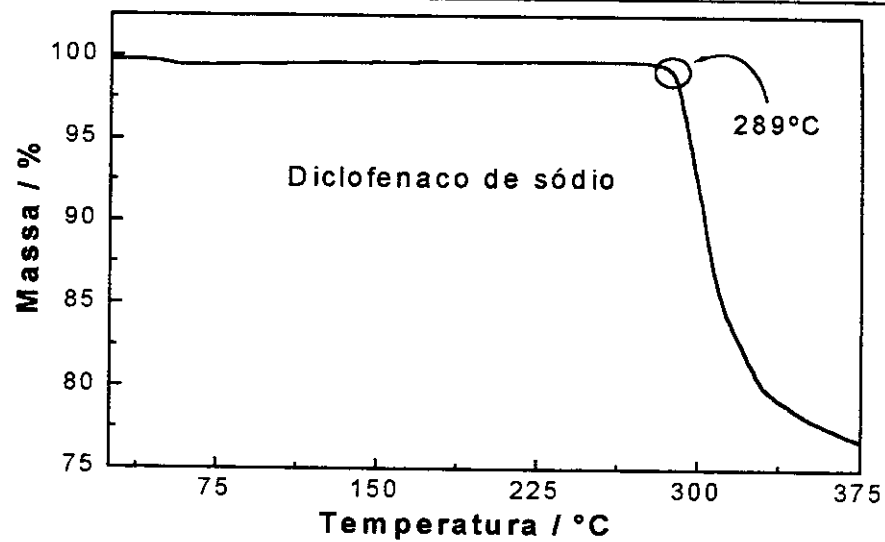
Foi feito estudo para encontrar a melhor temperatura para eliminação de água do complexo precipitado através dos métodos térmicos de análise TGA (Termogravimetric Analysis – Análise Termogravimétrica) e DSC (Differential Scanning Calorimetry - Calorimetria Exploratória Diferencial). Após as centrifugações e a otimização da temperatura da estufa (130°C), foi otimizado o tempo de permanência do complexo na estufa (1h) através do estudo da massa constante. Finalmente o tubo foi pesado e a massa de diclofenaco (sódio ou potássio) obtida.

3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

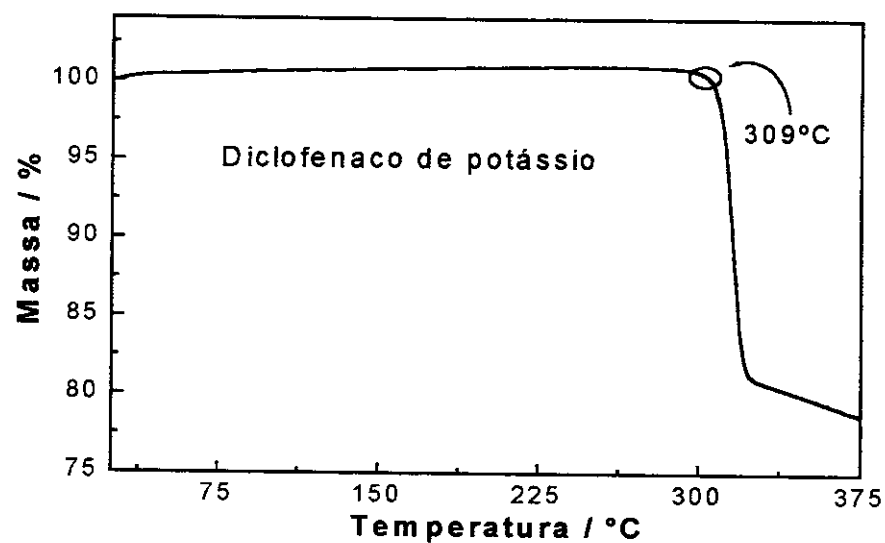
3.1 Métodos térmicos de análise

Os padrões de diclofenaco de sódio e de diclofenaco de potássio foram analisados por TGA, Figura 20, e por DSC (velocidade de varredura de 10°C por minuto), Figura 21. O

(A)



(B)



(C)

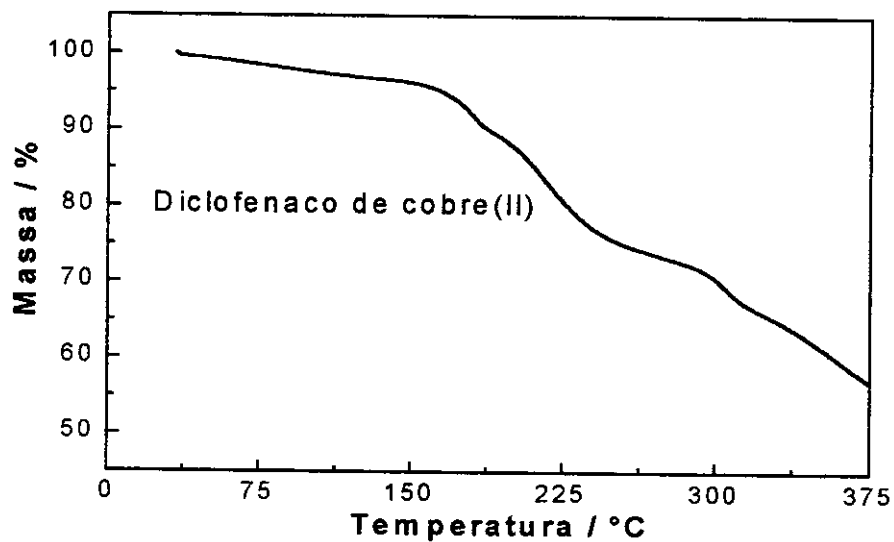


Figura 20: Termogramas do diclofenaco de sódio(A), diclofenaco de potássio (B) e diclofenaco de cobre(II) (C).

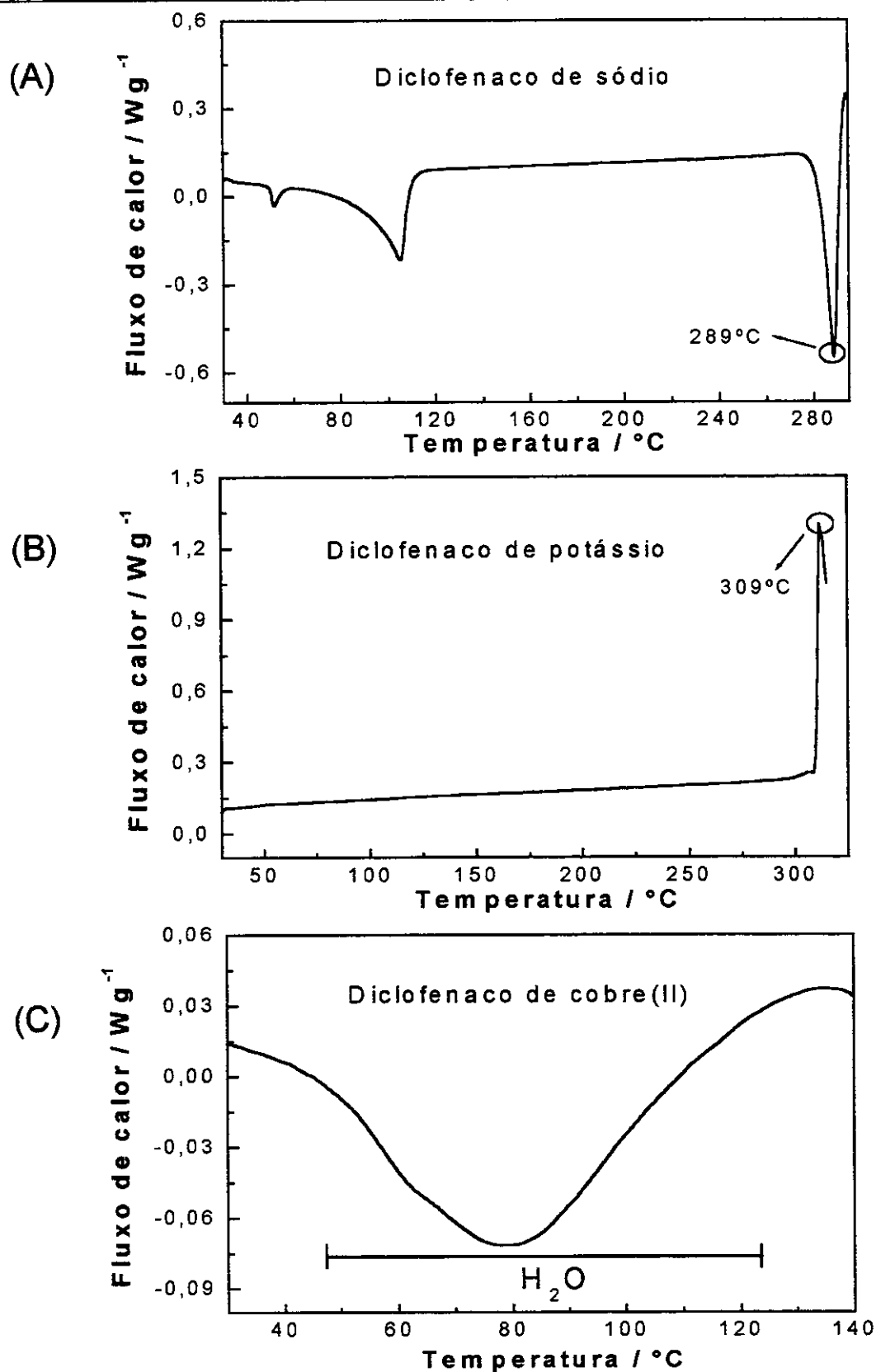


Figura 21: Gráficos de DSC do diclofenaco de sódio (A), diclofenaco de potássio (B) e diclofenaco de cobre(II) (C). Velocidade de varredura de 10 $^{\circ}\text{C}$ por minuto.

Pelos termogramas e gráficos de DSC dos padrões, foi visto que a temperatura de fusão do diclofenaco de sódio é de 289°C (280°C segundo a literatura) enquanto que a do diclofenaco de potássio é de 309°C (314°C segundo a literatura). Apesar da diferença em relação ao valor da literatura oficial [*Diclofenac. In: British Pharmacopoeia Version 3.0, 1999*], os valores obtidos concordam com os citados na maioria dos trabalhos científicos pesquisados [*A. Fini et al., 2001; P. Tudja et al., 2001; A. D. Magri et al., 2000*].

Nos gráficos de DSC dos padrões foi visto para o sal de sódio a presença de dois sinais em $50^{\circ}\text{C} < T < 110^{\circ}\text{C}$ atribuídos a perdas de moléculas de água do complexo. Para o sal de potássio não há sinais de perda dos componentes voláteis do sólido.

O complexo de diclofenaco de cobre(II) possui moléculas de água de cristalização como pode ser visto em seu espectro de infravermelho (**Anexo 2**).

O termograma do complexo de diclofenaco de cobre(II) mostra que sua decomposição térmica ocorre através de um processo de várias etapas em que as reações ocorrem consecutivamente se sobrepondo parcialmente umas às outras [*R. Bucci et al., 2000*]. A temperatura de decomposição do complexo de cobre(II) é de 242°C [*R. Kesharwani et al., 1995*].

No gráfico de DSC obtido para o complexo de diclofenaco de cobre(II), foi visto que a água de solvatação é totalmente eliminada em torno de 130°C como pode ser visto pelo sinal no gráfico (C) da Figura 21. Sendo assim, concluiu-se que a temperatura da estufa para secagem do complexo de diclofenaco de cobre(II) deve ser de 130°C.

3.2. Otimização no uso da velocidade da centrífuga

A velocidade de rotação da centrífuga foi ajustada para que não houvesse perdas do precipitado, ou seja, a velocidade inicial da centrífuga deveria ser tal que o complexo ficasse aderido nos poros do filtro de forma a evitar a passagem das partículas menores. Para isso, foi utilizada inicialmente uma rotação baixa de 16,7 rps (rotações por segundo) e depois a velocidade foi aumentada gradualmente até 58,3 rps para agilizar o processo. Cada centrifugação foi feita durante 30 segundos.

3.3 Estudo da massa constante

Foi feito estudo da massa constante (Tabela 21), ou seja, um acompanhamento da perda de água do complexo no decorrer do tempo ao ser colocado na estufa. Isto foi feito para saber o tempo de estufa necessário para secagem do complexo. A temperatura da estufa foi ajustada em 130°C. Foram usados 5 tubos com filtro de placa porosa. Em todas as análises após a retirada da estufa, os tubos ficaram 20 minutos no dessecador sendo depois pesados.

Tabela 21: Estudo da massa constante para o complexo de diclofenaco de cobre(II).

Tempo / h	m ₁ / mg *	m ₂ / mg	m ₃ / mg	m ₄ / mg
0,5	262,0	— **	—	—
1,0	52,1	52,8	—	—
1,5	52,1	52,8	49,9	—
2,0	52,1	52,7	49,9	49,1
3,0	52,0	52,7	49,8	49,0

* m = massa

** — = O tubo não foi retirado da estufa

Como pode ser visto, a mudança nas massas de complexo após 1 h de estufa é insignificante. Sendo assim, conclui-se que para a análise, pode-se deixar o filtro com o precipitado de diclofenaco de cobre(II) por 1 hora direto na estufa e depois fazer a pesagem.

3.4 Figuras de mérito

Neste estudo foram analisadas duas figuras de mérito: precisão e exatidão.

No estudo da precisão usou-se massas de diclofenaco de sódio ou de potássio $50,0 \pm 0,4$ mg que foram dissolvidas em 7,0 mL de água.

Tabela 22: Dados para determinação da precisão do método gravimétrico.

Gravimetria						
Intra - ensaio						
Dia	m_{Na} / mg^*	s_{Na}^{**}	%RSD (N = 4) ***	m_K / mg^*	s_K^{**}	%RSD (N = 4)
1	49,1	0,3	0,6	51,0	1,0	2,0
2	50,1	0,3	0,6	51,0	0,8	1,6
3	49,9	0,4	0,8	50,4	0,3	0,6
4	49,9	0,3	0,6	50,4	0,5	1,0
Inter - ensaio	49,8	0,3	0,7	50,7	0,7	1,3

* m_{Na} e m_K = massa média (N = 4 determinações) de diclofenaco de sódio e de diclofenaco de potássio

** s_{Na} e s_K = Estimativa de desvio padrão para diclofenaco de sódio e diclofenaco de potássio

*** %RSD = Estimativa de desvio padrão relativo para quatro determinações a cada dia

As massas de diclofenaco de cobre(II) obtidas foram, em cada caso, convertidas para massa de diclofenaco de sódio (ou de potássio). Para isto foi usada a equação (VIII) mostrada abaixo:

$$m_{\text{calculada}} = Y \times m_{\text{diclofenaco de cobre(II)}} \quad (\text{VIII})$$

Sendo Y igual a 0,9732 para diclofenaco de sódio e igual a 1,0225 para diclofenaco de potássio. Esta equação foi obtida considerando-se a massa molar de diclofenaco de cobre(II) igual a $653,7 \text{ g mol}^{-1}$.

As massas molares de diclofenaco de sódio e de potássio são respectivamente $318,1$ e $334,2 \text{ g mol}^{-1}$, a massa molar do ânion diclofenaco é de $295,1 \text{ g mol}^{-1}$.

Tabela 23: Comparação do método gravimétrico com o método oficial da Farmacopéia Norte Americana (HPLC).

Amostras	$m_{DNa} / \text{mg}^* \pm ts/\sqrt{N}$		$m_{DK} / \text{mg}^* \pm ts/\sqrt{N}$	
	Método proposto	Método USP	Método proposto	Método USP
Comprimido	51 ± 4	$46,1 \pm 0,4$	50 ± 4	$47,4 \pm 0,4$
Injetável	74 ± 4	76 ± 1	77 ± 4	74 ± 2

* m_{DNa} e m_{DK} = Massa média de diclofenaco de sódio e de diclofenaco de potássio

t = t-distribuição com 95% de confiança com (N-1) graus de liberdade

s = Estimativa de desvio padrão da concentração média de diclofenaco de sódio e de diclofenaco de potássio

N = Número de análises sendo 4 para método proposto e 3 para método USP

$ts/\sqrt{N}$ = Limite de confiança para a média $\bar{m}$ de N medidas repetidas

Tabela 24: Comparação entre os valores de *t*-Student obtido e tabelado. *N* = 4.

Amostras	Diclofenaco de sódio		Diclofenaco de potássio	
	<i>t</i> _{obtido} *	<i>t</i> _{tabelado}	<i>t</i> _{obtido}	<i>t</i> _{tabelado}
Comprimido	0,18 a 1,29	3,18	0,17 a 1,48	3,18
Injetável	0,05 a 1,02		0,29 a 1,12	

* *t*_{obtido} = Valores de *t*-Student obtidos em 4 análises

A análise dos resultados obtidos pelo teste *t* de Student comparativo revelaram que todos os valores estavam concordantes dentro do grau de confiança de 95%.

Apesar de os valores obtidos estarem dentro do permitido para amostras comerciais (mínimo de 90,0% e máximo de 110,0% da quantidade declarada) [*Diclofenac. In: British Pharmacopoeia Version 3.0, 1999*], foi feita análise gravimétrica em quadruplicata com amostras comerciais (comprimido) contendo 200,0 mg do princípio ativo, ou seja, o equivalente a quatro comprimidos. Foi obtida massa de 198 ± 2 para diclofenaco de sódio e $200,8 \pm 0,6$ para diclofenaco de potássio. Fazendo-se uma comparação com o estudo feito com 50,0 mg de diclofenaco nota-se uma diminuição do desvio padrão relativo de 8 para menos de 1%.

O tempo de análise para diclofenaco por gravimetria é de cerca de uma hora e meia para análise simultânea de 8 amostras contando-se as etapas de preparo de amostra, reação de complexação, filtração, lavagem e secagem. Levando-se em conta o tempo requerido pelo analista diretamente, tem-se somente 30 minutos de tempo de análise pois a etapa de secagem na estufa dura 1 hora.

Capítulo VI

ESTUDO DO MÉTODO DE REFERÊNCIA: TITULAÇÃO POTENCIOMÉTRICA

1 – MATERIAL

1.1 Preparo de soluções

Neste estudo, foi utilizado ácido acético glacial para dissolver a amostra.

1.1.1 Solução de ácido perclórico em ácido acético glacial

Uma solução de ácido perclórico 10,05 mg mL⁻¹ (0,1 mol L⁻¹) foi preparada através da mistura de 8,50 mL de ácido perclórico com 500,00 mL de ácido acético glacial e 21,00 mL de anidrido acético. A solução foi resfriada em banho de gelo e foi adicionado ácido acético glacial para obter 1000,00 mL. A solução foi padronizada com biftalato de potássio obtendo-se concentração igual a 8,914 mg mL⁻¹ (8,87×10⁻² mol L⁻¹).

1.2 Aparelhos e acessórios

Para o estudo do método titulométrico utilizou-se um potenciômetro Analyser pH 300 contendo um eletrodo de vidro combinado com o de calomelano.

2 – PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

A titulação potenciométrica está descrita na Farmacopéia Brasileira [*Diclofenaco. In: Farmacopéia Brasileira, 2002*] e na Britânica [*Diclofenac. In: British Pharmacopoeia Version 3.0, 1999*] e é indicada, dentre outros métodos, como referência para análise de padrão de diclofenaco de sódio e de diclofenaco de potássio.

Aminas aromáticas (bases fracas, como o diclofenaco), não são tituláveis em água e, por isso, deve-se usar solvente orgânico, no caso, o ácido acético glacial (IX) [Wilson, et al., 1975].



Segundo a Farmacopéia Brasileira, na titulação potenciométrica, 1,0 mL de ácido perclórico $10,05 \text{ mg mL}^{-1}$ ($0,1000 \text{ mol L}^{-1}$) equivale a 33,42 mg de diclofenaco de potássio ou 31,81 mg de diclofenaco de sódio. Sendo assim, 4 comprimidos de 50,0 mg cada, terão cerca de 200,0 mg de diclofenaco, o que dará um gasto de aproximadamente 6,0 mL para as amostras de diclofenaco de potássio e 6,3 mL para as amostras de diclofenaco de sódio.

Neste estudo foi usado um potenciômetro, sendo as medidas feitas em milivolts. O eletrodo usado foi o de vidro combinado com o de calomelano [Wilson, et al., 1975]. O eletrodo foi lavado com água e depois com ácido acético glacial; foi, então, colocado no erlenmeyer que continha aproximadamente 200,0 mg do princípio ativo (padrão ou amostra) dissolvido em 25,0 mL de ácido acético glacial. Quando as análises foram feitas usando-se amostra, a solução contendo o princípio ativo dissolvido foi filtrada em papel qualitativo. A solução com diclofenaco foi titulada com ácido perclórico $8,914 \text{ mg mL}^{-1}$ ($8,87 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$). Para análise de novas amostras o eletrodo foi sempre lavado com ácido acético glacial. A titulação foi feita na capela.

Neste estudo também foram obtidos os espectros de infravermelho para os padrões de diclofenaco de sódio e de potássio a fim de se tentar saber a sua pureza. Para isto os padrões ficaram em estufa durante 4h a 130°C e depois colocados em dessecador com pentóxido de fósforo. Os espectros foram obtidos em pastilha de KBr.

3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Estudos com padrão

Foram feitos dois testes com padrão de diclofenaco de sódio e dois com padrão de diclofenaco de potássio a fim de se tentar saber a sua pureza.

Vários métodos podem ser usados para determinar o ponto final de uma titulação potenciométrica (volume no ponto de equivalência). O mais usado envolve a construção direta de um gráfico do potencial como função do volume de reagente adicionado. O ponto médio da parte da curva em que há uma brusca elevação no valor do potencial é estimado visualmente e tido como o ponto final. Uma segunda aproximação para detecção do ponto

final é o cálculo da mudança de potencial por unidade de volume do titulante ($\Delta E / \Delta V$). Um gráfico destes dados como função do volume de titulante adicionado produz uma curva com máximo que corresponde ao ponto de inflexão. Uma segunda derivada para os dados muda o sinal no ponto de inflexão facilitando ainda mais sua visualização. Abaixo (Figura 22) é mostrado um exemplo destes gráficos utilizados para determinação do ponto final de uma titulação potenciométrica utilizando amostra de diclofenaco de sódio.

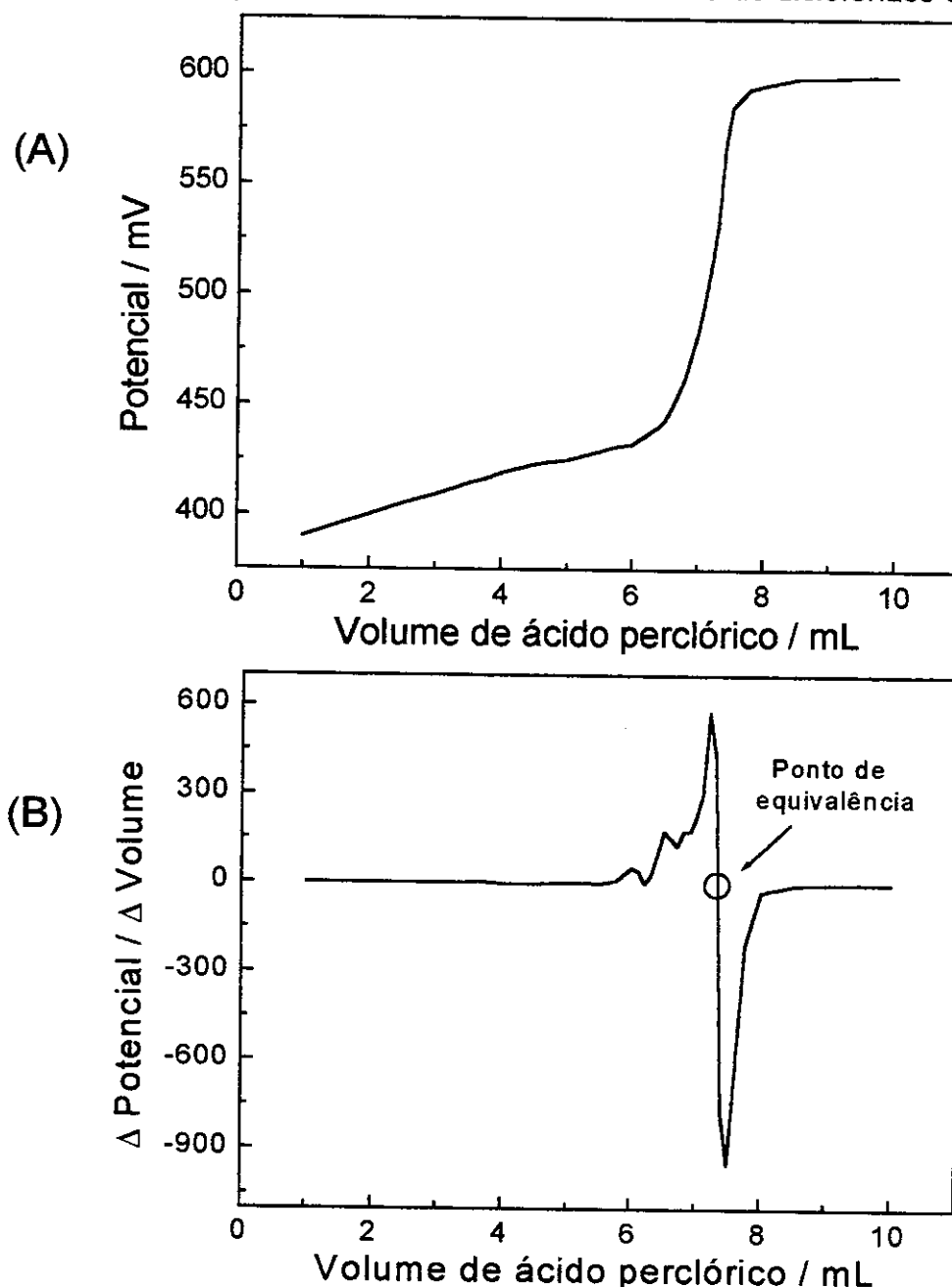


Figura 22: Exemplo de curva de titulação potenciométrica (A) e gráfico da 2ª derivada (B) para determinação do volume no ponto de equivalência.

A Tabela 25 mostra as massas obtidas para padrão de diclofenaco de sódio e diclofenaco de potássio utilizando titulação potenciométrica.

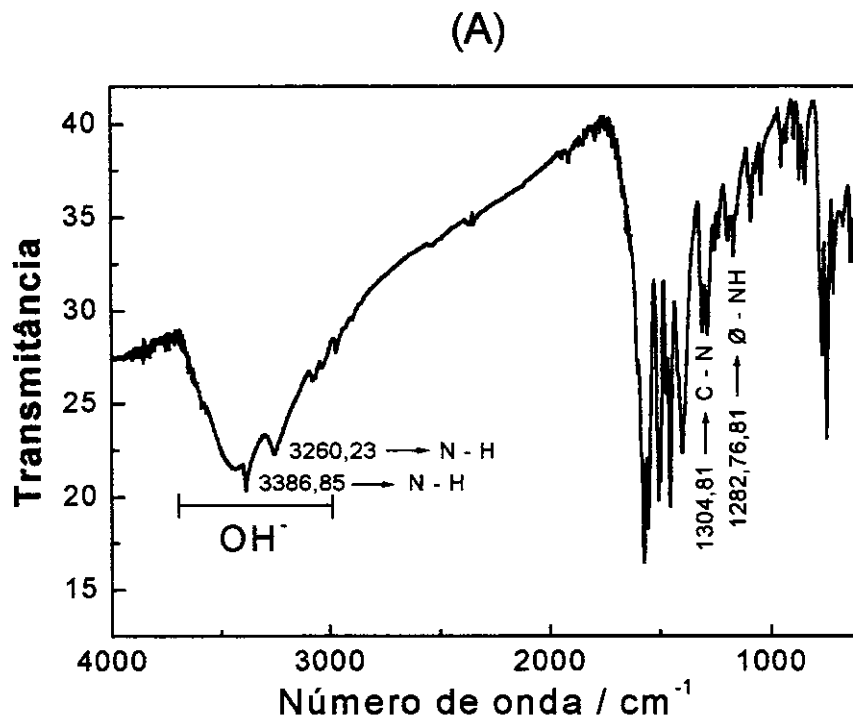
Tabela 25: Testes com padrão de diclofenaco de sódio e de potássio pelo método titulométrico.

Padrão	Testes	V_{Pe} / mL*	m_{pesada} / g **	m_{obtida} / g	Diferença / %
Sódio	1	6,945	0,2005	0,1960	- 2,24
	2	6,925	0,2011	0,1954	- 2,83
Potássio	1	6,615	0,2013	0,1961	- 2,58
	2	6,585	0,2011	0,1952	- 2,93

* V_{Pe} = Volume no ponto de equivalência

** m = massa

Foram obtidos os espectros no infravermelho (Figura 23) dos padrões de diclofenaco de sódio e de potássio [D. L. Pavia et al., 1996; R. M. Silverstein et al., 1994]. Ao se analisar estes espectros, pôde-se notar que os padrões, mesmo após secagem em estufa e em dessecador contendo pentóxido de fósforo, continham água.



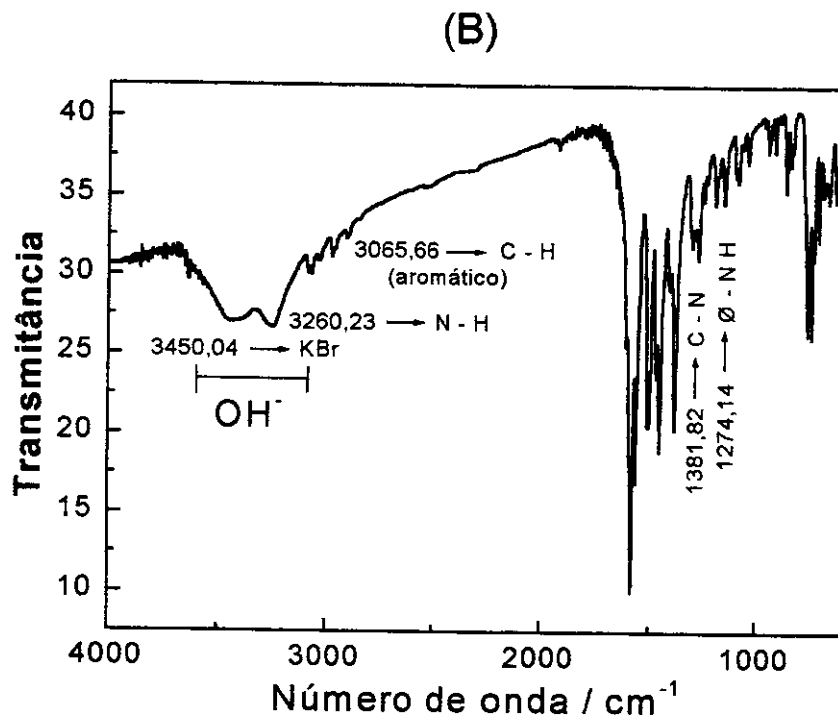


Figura 23: Espectros de infravermelho para diclofenaco de sódio (A) e diclofenaco de potássio (B). Espectros obtidos em pastilha de KBr.

3.2 Estudos com amostras

O método titulométrico descrito nas Farmacopéias Brasileira e Britânica só é indicado para padrões de diclofenaco mas, mesmo assim, ele foi aplicado para preparações farmacêuticas com o objetivo de verificar a validade do método nestes casos.

Foram usadas duas amostras de diclofenaco de sódio e duas de diclofenaco de potássio.

Assim como nos estudos com padrão, foi feita a relação entre a variação do potencial de eletrodo pela adição do volume de titulante obtendo-se assim a curva titulométrica. Através do gráfico da 2ª derivada desta curva foi encontrado o volume no ponto de equivalência.

O resultado dos testes feitos com amostra se encontram na Tabela 26.

Tabela 26: Testes com amostra de diclofenaco de sódio e de potássio pelo método titulométrico.

Amostra	Testes	V _{Pe} / mL *	m _{pesada} / g	m _{obtida} / g	Diferença / %
Sódio	1	7,209	0,2001	0,2034	+ 1,65
	2	7,350	0,2001	0,2074	+ 3,65
Potássio	1	6,857	0,2002	0,2033	+ 1,55
	2	7,174	0,2001	0,2099	+ 4,90

* V_{Pe} = Volume no ponto de equivalência

Através destes resultados pode-se dizer que é possível utilizar este método titulométrico para quantificar diclofenaco em preparações farmacêuticas.

3.3 Figuras de mérito

Neste estudo foram analisadas duas figuras de mérito: precisão e exatidão.

No estudo da precisão usou-se massas de diclofenaco de $200,0 \pm 0,3$ mg que foram dissolvidas em 25,0 mL de ácido acético glacial.

Tabela 27: Dados para determinação da precisão do método titulométrico.

Titulação potenciométrica						
Intra - ensaio						
Dia	V _{Na} / mL *	S _{Na} **	%RSD *** (N = 3)	V _K / mL *	S _K **	%RSD (N = 3)
1	6,808	0,219	3,22	6,581	0,043	0,653
2	6,996	0,124	1,77	6,636	0,030	0,452
3	6,916	0,053	0,766	6,608	0,003	0,454
4	6,679	0,126	1,89	6,432	0,096	1,49
Inter - ensaio	6,850	0,131	1,91	6,564	0,043	0,655

* V_{Na} e V_K = Volume médio (N = 3 determinações) gasto de titulante na análise de diclofenaco de sódio e de diclofenaco de potássio respectivamente

** S_{Na} e S_K = Estimativa de desvio padrão para diclofenaco de sódio e diclofenaco de potássio

*** %RSD = Estimativa de desvio padrão relativo para três determinações a cada dia

Assim como para o estudo dos métodos espectrofotométrico, reflectométrico e gravimétrico, a exatidão foi avaliada por comparação com o método recomendado pela USP.

Tabela 28: Comparação do método titulométrico com o método oficial da Farmacopéia Norte Americana (HPLC).

Amostras	$m_{DNa} / \text{mg}^* \pm \frac{ts}{\sqrt{N}}$		$m_{DK} / \text{mg}^* \pm \frac{ts}{\sqrt{N}}$	
	Método proposto	Método USP	Método proposto	Método USP
Comprimido	52 ± 2	$46,1 \pm 0,4$	52 ± 2	$47,4 \pm 0,4$

* m_{DNa} e m_{DK} = Massa média de diclofenaco de sódio e de diclofenaco de potássio

t = t-distribuição com 95% de confiança com (N-1) graus de liberdade

s = Estimativa de desvio padrão da concentração média de diclofenaco de sódio e de diclofenaco de potássio

N = Número de análises sendo 3 para método proposto e 3 para método USP

$\frac{ts}{\sqrt{N}}$ = Limite de confiança para a média $\bar{m}$ de N medidas repetidas

Tabela 29: Comparação entre os valores de t-Student obtido e tabelado. N = 3.

Amostras	Diclofenaco de sódio		Diclofenaco de potássio	
	t_{obtido}^*	$t_{tabelado}$	t_{obtido}	$t_{tabelado}$
Comprimido	0,04 a 1,02	4,30	0,07 a 1,03	4,30

* t_{obtido} = Valores de t-Student obtidos em 3 análises

A análise dos resultados obtidos pelo teste t de Student comparativo revelaram que todos os valores estavam concordantes dentro do grau de confiança de 95%.

Capítulo VII

MÉTODO DE REFERÊNCIA PARA ESTUDOS DE EXATIDÃO: HPLC

1 – MATERIAL

1.1 Preparo de soluções

O HPLC foi utilizado como método de referência nos estudos de exatidão para diclofenaco de sódio e diclofenaco de potássio.

Para fase móvel foi utilizada solução tampão fosfato pH 2,5 – metanol (30:70).

A solução tampão fosfato pH 2,5 foi preparada misturando-se volumes iguais de solução de ácido fosfórico 0,01 mol L⁻¹ e solução de fosfato de sódio monobásico 0,01 mol L⁻¹.

O diclofenaco foi diluído em mistura de metanol – água (70:30).

1.2 Aparelhos e acessórios

Nos estudos com o método de referência foi utilizado o equipamento HPLC Waters 600 E com detector UV-Vis 484 (foi usado para medida $\lambda = 254$ nm) e registrador Waters 746. Para análise de diclofenaco de sódio foi usada coluna (fase reversa) de 150 mm de comprimento e 4,6 mm de diâmetro interno, empacotada com sílica quimicamente ligada a octilsilano (5 μ m). Para análise de diclofenaco de potássio foi usada coluna (fase reversa) de 250 mm e 4,6 mm de diâmetro interno, empacotada com sílica quimicamente ligada a octadecilsilano (5 μ m).

2 – PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

O procedimento foi feito segundo relatado pela Farmacopéia Norte Americana (USP) [Diclofenac. In: The United States Pharmacopeia - USP, 2002].

Acrescentando-se a este procedimento, foram feitas soluções padrão de diclofenaco de concentrações variando de 3,0 a 15,0 μ g mL⁻¹ a fim de se obter a curva analítica. Todas as análises foram feitas em triplicata.

O tempo de eluição para diclofenaco de sódio foi de 8,4 minutos e para diclofenaco de potássio foi de 17 minutos.

Capítulo VIII

COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS DE DOIS MÉTODOS DIFERENTES

O teste t de Student pode ser também empregado para comparar os valores médios obtidos com dois métodos diferentes. A concordância mútua das duas médias pode ser testada por um critério, expresso pela relação (X):

$$t = \frac{\bar{x}_A - \bar{x}_B}{\sqrt{\frac{(N_A + N_B)(N_A s_A^2 + N_B s_B^2)}{N_A N_B (N_A + N_B - 2)}}} \quad (X)$$

Sendo: $\bar{x}_A$ e $\bar{x}_B$ = médias aritméticas dos resultados dos dois métodos, s_A e s_B = estimativas de desvio padrão, N_A e N_B = números de determinações de cada método A e B respectivamente.

O valor é comparado com o valor tabelado para o número de graus de liberdade $v = (N_A + N_B - 2)$ [K. Eckschlager, 1972].

Tabela 30: Comparação dos resultados de dois métodos diferentes.

Métodos / Graus de liberdade	t _{obtido} *				t _{tabelado}
	Na		K		
	Comprimido	Injetável	Comprimido	Injetável	
Espectrofotométrico e Reflectométrico / 8	1,79	0 **	1,41	1,41	2,31
Espectrofotométrico e Gravimétrico / 7	2,15	0	0,86	1,72	2,37
Espectrofotométrico e Titulométrico / 6	3,56 (a)	---- ***	2,37	----	2,45
Reflectométrico e Gravimétrico / 7	1,42	0	0	2,58 (b)	2,37
Reflectométrico e Titulométrico / 6	3,25 (c)	----	1,19	----	2,45
Gravimétrico e Titulométrico / 5	0,34	----	0,67	----	2,57

* t-distribuição com 95% de confiança

** O valor de $t_{\text{obtido}} = 0$ é devido ao fato de $\bar{x}_A = \bar{x}_B$

*** --- = não foi feita análise para o referido medicamento

Como pode ser visto na Tabela 30, a maioria dos resultados está concordante, entre si, dentro do grau de confiança de 95%. Deve-se atentar para o fato de que os excipientes, em todos os casos, podem interferir na análise, podendo justificar as imprecisões e inexatidões. Se for considerado grau de confiança de 99%, todos os dados estarão concordantes entre si. Neste caso, os valores de t-Student tabelado para (a), (b) e (c) se tornam respectivamente 3,71; 3,50 e 3,71 considerando os respectivos graus de liberdade iguais a 6, 7 e 6.

Capítulo IX

TRATAMIENTO DE RESÍDUOS

Assim como a produção industrial, o laboratório gera resíduos provenientes dos restos de amostras analisadas e produtos líquidos (aquosos e orgânicos) ou sólidos provenientes dos processos de análise, além de gases e vapores das reações, digestões etc. Em princípio deve-se procurar reduzir ao máximo a geração de lixo requisitando apenas o necessário e suficiente de amostras para análise, e sempre que possível adotar métodos analíticos que utilizem o mínimo de amostras.

Tudo isto visa a diminuição da poluição ambiental, assunto que deve ser levado em conta para todas as situações em que resíduos nocivos à natureza são produzidos (como no caso deste trabalho). Neste aspecto, os métodos de análises mais modernos avançam nesta direção, utilizando instrumentos cada vez mais sensíveis requerendo quantidades mínimas de amostras.

O monitoramento de fármacos residuais no meio ambiente vem ganhando grande interesse devido ao fato de muitas dessas substâncias serem freqüentemente encontradas em efluentes de Estações de Tratamento de Esgoto (ETEs) e águas naturais, em concentrações na faixa de $\mu\text{g L}^{-1}$ e ng L^{-1} . Por exemplo, a concentração média de diclofenaco detectada nas águas superficiais no Brasil é de 0,02 a 0,06 no $\mu\text{g L}^{-1}$. É necessária uma avaliação criteriosa dos efeitos desses fármacos no meio aquático e estabelecer os limites de concentração para o descarte seguro de efluentes domésticos tratados em corpos receptores [D. M. Bila et al., 2003].

Todos os resíduos gerados neste trabalho foram tratados e incinerados por uma empresa especializada contratada pelo Instituto de Química da UNICAMP.

Nos estudos espectrofotométrico, reflectométrico e gravimétrico foi gerado resíduo de cobre(II) com clorofórmio e tampão acetato. À solução contendo cobre(II) é adicionada solução de hidróxido de sódio $1,0 \text{ mol L}^{-1}$. O precipitado obtido foi recolhido e pode ser utilizado na confecção de tijolos. O clorofórmio foi incinerado juntamente com a fase aquosa contendo o tampão [O. A. Ohlweiler, 1968].

No estudo titulométrico foi gerado resíduo de ácido perclórico com ácido acético glacial. Este resíduo foi neutralizado e incinerado [Prudent Practices..., 1983].

No estudo do método de referência HPLC o resíduo gerado foi metanol com tampão fosfato. Este resíduo também foi incinerado.

Capítulo X

PERSPECTIVAS

Levando em conta os bons resultados obtidos na análise dos diclofenacos de sódio e de potássio nos quatro estudos feitos e, considerando-se também a grande necessidade de se ter métodos simples de análise para controle de qualidade de medicamentos, pode-se propor a realização de estudos semelhantes com outras substâncias de uso farmacêutico.

Estudos mais aprofundados com respeito à seletividade (especificidade) dos métodos espectrofotométrico e reflectométrico também podem ser feitos, por exemplo, através de estudos de ponto de fusão. Pode ser feito também um estudo do limite de determinação para o método gravimétrico.

Pode-se desenvolver “kits” para análise de preparações farmacêuticas em farmácias de manipulação a baixo custo e com simplicidade operacional. Através de parcerias, estes kits poderão ser distribuídos para estas farmácias de manipulação e utilizados pelos próprios farmacêuticos para se ter um controle de qualidade no próprio local de compra e venda de medicamentos.

Capítulo XI

CONCLUSÕES

1 – CONSIDERAÇÕES FINAIS

A proposta deste trabalho foi estudar e desenvolver métodos de análise para quantificar diclofenaco em preparações farmacêuticas. Através da utilização de procedimentos simples, rápidos e de baixo custo busca-se facilitar as análises para o controle de qualidade deste princípio farmacêutico.

Foram estudados quatro métodos, todos (à exceção do estudo titulométrico) foram fundamentados na reação de diclofenaco com íons cobre(II), que é rápida e de fácil execução, além do fato de não requerer reagentes caros.

2 – ESTUDO DO MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO

No estudo do método espectrofotométrico foram feitas algumas modificações no procedimento do experimento utilizado como referência [Kustrin *et al.*, 1991] a fim de se obterem melhores resultados analíticos. Deve-se lembrar que as condições de análise de diclofenaco em medicamentos determinadas por Kustrin foram otimizadas através de cálculos quimiométricos, enquanto que no estudo feito neste trabalho estas mesmas condições foram otimizadas experimentalmente.

O pH usado para extração do complexo de diclofenaco de cobre(II) foi 5,3 enquanto que no artigo foi relatado o uso de pH 6,0.

Ao invés de uma (como relatado no artigo), foram feitas três extrações do complexo com clorofórmio obtendo-se assim maior extração do complexo (a extração é mais eficiente quando se divide o solvente extrator em diversas porções, realizando a extração em várias etapas em vez de realizá-la em uma única etapa).

Não foi usado, no presente trabalho, cloreto de potássio ou qualquer outro sal para manutenção da força iônica da solução que contém o complexo (como relatado no artigo) pois sua presença não traz mudanças significativas nos resultados analíticos.

Para este estudo foram obtidos oito parâmetros de validação dando destaque para: limite de detecção de 10^{-1} mg mL⁻¹ (10^{-4} mol L⁻¹), resposta linear de até 25,0 mg mL⁻¹ ($7,7 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹) e estimativa de desvio padrão relativo de 4%.

3 – ESTUDO DO MÉTODO REFLECTOMÉTRICO

Neste estudo foram feitos, inicialmente, testes utilizando acessório do espectrofotômetro HP 8452 A Diode Array com acessório para reflectância RSA HP 84. Os resultados preliminares mostraram que o procedimento analítico proposto com reflectômetro portátil podia levar a bons resultados para a análise de diclofenaco em preparações farmacêuticas.

Em um segundo momento foi usado um reflectômetro portátil desenvolvido no laboratório. Foram feitas otimizações tais como os volumes das soluções de reagentes a serem adicionados na cela de análise e a voltagem a ser aplicada no LED (fonte de luz).

Assim como para o estudo espectrofotométrico, foram obtidos oito parâmetros de validação. Foi obtido limite de detecção de 10^{-1} mg mL⁻¹ (10^{-4} mol L⁻¹), resposta linear de até 18,0 mg mL⁻¹ ($5,5 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹) e estimativa de desvio padrão relativo de 2,5%.

4 – ESTUDO DO MÉTODO GRAVIMÉTRICO

Otimizações também foram feitas para este método através do controle da velocidade da centrífuga, do uso de métodos térmicos de análise para encontrar melhor temperatura de secagem do complexo e do estudo de perda de massa do complexo quando na estufa para determinar seu tempo de secagem.

Neste estudo foram obtidos dois parâmetros de validação: precisão e exatidão com estimativa de desvio padrão relativo de 8% para o caso em que se fez análise com amostra comercial contendo 50,0 mg do princípio ativo. Aumentando-se a massa para 200,0 mg a estimativa de desvio padrão relativo é menor que 1%.

5 – ESTUDO DO MÉTODO DE REFERÊNCIA: TITULAÇÃO POTENCIOMÉTRICA

Este estudo se mostrou útil, servindo como indicador da pureza dos padrões, tendo sido, também, aplicado na análise de amostras comerciais de diclofenaco.

Neste caso, 2 parâmetros de validação foram obtidos: precisão e exatidão tendo-se estimativa de desvio padrão relativo de 4%.

6 – CONCLUSÃO

Todos os métodos estudados se mostraram úteis na quantificação de diclofenaco em preparações farmacêuticas, devendo-se atentar para a facilidade operacional e para a rapidez no procedimento. Especial atenção deve ser dada aos métodos reflectométrico e gravimétrico. O primeiro por não requerer aparelhagem cara e ser um método rápido. O segundo por não ter necessidade de curvas analíticas.

Em todos os métodos estudados foram utilizadas amostras de diclofenaco de sódio e de diclofenaco de potássio obtendo-se em ambos os casos a mesma qualidade dos resultados analíticos.

Os valores de massa de amostra comercial de diclofenaco de sódio e potássio obtidas em todos os estudos estavam de acordo com a faixa especificada em Farmacopéia [*Diclofenac. In: British Pharmacopoeia Version 3.0, 1999*] que é de no mínimo 90,0% e no máximo 110,0% da quantidade declarada. Para se tentar viabilizar um método novo, esta faixa deve ser de $\pm 2\%$, o que foi obtido em todos os casos estudados neste trabalho, incluindo o gravimétrico quando usa-se alíquotas maiores.

Nos estudos de exatidão (parâmetro de validação) a análise dos resultados obtidos pelo teste t de Student comparativo revelaram resultados satisfatórios dentro do grau de confiança de 95%. Os métodos desenvolvidos também apresentam boa concordância entre si para análise de diclofenaco em amostras comerciais.

Pode-se concluir que todos os métodos estudados neste trabalho podem ser aplicados para a quantificação de diclofenaco em preparações farmacêuticas.

Capítulo XII

REFERÊNCIAS

As referências foram descritas e organizadas segundo Programa de Capacitação de Usuários em Informação Científica 2003 "Usuário da Informação de Ciência e Tecnologia". Módulo 4: Elaboração de Trabalhos Científicos - Trabalho de Conclusão de Curso, Monografia, Dissertação, Tese. Seção de Referência: *Diretoria de Serviços ao Público Biblioteca Central - UNICAMP*, 2003 e Programa de Capacitação de Usuários em Informação Científica 2003 "Usuário da Informação de Ciência e Tecnologia". Módulo 4: Elaboração de Trabalhos Científicos – Anexos . Seção de Referência: *Diretoria de Serviços ao Público Biblioteca Central - UNICAMP*, 2003.

A. D. Magri, R. Bucci and A. L. Magri **DSC in the Chemical Analysis of Drugs**, *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, v. 61, p. 369-376, 2000.

A. Fini, M. Garuti, G. Fazio, J. A. Fuentes and M. A. Holgado **Diclofenac Salts I. Fractal and Thermal Analysis of Sodium and Potassium Diclofenac Salts**, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 90, n. 12, p. 2049-2057, 2001.

A. Kleemann, J. Engel, B. Kutscher and D. Reichert; *Pharmaceutical Substances Syntheses Patents Applications*, Georg Thieme Verlag, 4th edition, Thieme, 2001, 1380 p.

A. Korolkovas e J. H. Burckhalter; *Química Farmacêutica*, Título do original em inglês *Essentials of Medicinal Chemistry*, Editora Guanabara Dois S. A., 1982, 783 p.

A. M. Pimenta, A. N. Araújo and M. C. B. S. M. Montenegro **Simultaneous Potenciometric and Fluorimetric Determination of Diclofenac in a Sequential Injection Analysis System**, *Analytica Chimica Acta*, v. 470, p. 185-194, 2002.

A. Sallmann and R. Pfister **Chemical Intermediates for the Production of Substituted 2-anilinophenylacetic Acids and Esters**, *United States Patent Office*, US 3.778.470, Dec. 11, 1973.

A. Sallmann and R. Pfister **Pharmaceutical Compositions and Methods Employing Substituted Derivatives of 2-anilinophenylacetic Acids and Esters**, *United States Patent Office*, US 3.652.762, Mar. 28, 1972.

A. Sallmann and R. Pfister **Substituted Derivatives of 2-anilinophenylacetic Acids and a Process of Preparation**, *United States Patent Office*, US 3.558.690, Jan. 26, 1971.

Anvisa. Agência Nacional de Vigilância Sanitária: Legislação Consolidada – Leis. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/consolidada/lei_9787_99.htm>. Acesso em 4 fev. 2004.

B. de B. Neto, I. S. Scarminio e R. E. Bruns; *Planejamento e Otimização de Experimentos*, Editora da UNICAMP, 1995, 299 p.

B. Dimitrova, I. Doytchinova and R. Zlatkova **Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography for Evaluating the Distribution of Pharmaceutical Substances in Suppository Base-Phosphate Buffer System**, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 23, n. 6, p. 955-964, 2000.

B. G. Katzung; *Farmacologia Básica e Clínica*, 6ª edição, Tradução: Fernando Diniz Mundim e Patrícia Josephine Voeux, Editora Guanabara Koogan, 1995, 1068 p.

B. V. Kamath, K. Shivram, G. P. Oza and S. Vangani **Use of Charge Transfer Complexation in the Spectrophotometric Determination of Diclofenac Sodium**, *Analytical Letters*, v. 26, n. 4, p. 665-674, 1993.

B. X. Mayer, K. Namiranian, P. Dehghanyar, R. Stroh, H. Mascher and M. Muller **Comparison of UV and Tandem Mass Spectrometric Detection for the High-Performance Liquid Chromatographic Determination of Diclofenac in Microdialysis Samples**, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 33, n. 4, p. 745-754, 2003.

C. Arcelloni, R. Lanzi, S. Pedercini, G. Molteni, I. Fermo, A. Pontiroli and R. Paroni **High-Performance Liquid Chromatographic Determination of Diclofenac in Human Plasma After Solid-Phase Extraction**, *Journal of Chromatography B*, v. 763, p. 195-200, 2001.

C. Bassan **Dossiê Pode Indicar Falhas na Fabricação**, *Correio Popular*, 12 jun. 2003. Caderno Brasil, p. B-10.

C. Bassan **Fabricante do Celobar Admite Culpa**, *Correio Popular*, 10 jun. 2003. Caderno Brasil, p. B-7.

C. C. Andrei, D. T. Ferreira, M. Faccione e T. J. Faria; *Da Química Medicinal à Química Combinatória e Modelagem Molecular*, Editora Manole Ltda., 2003, 154 p.

C. M. Adeyeye and Pui-Kai Li **Diclofenac Sodium**, *Analytical Profiles of Drug Substances*, v.19, p. 123-144, 1990.

C. S. Sastry, A. R. M. Rao and T. N. V. Prasad **Spectrophotometric Analysis of Diclofenac Sodium and Piroxicam and Their Pharmaceutical Preparations**, *Analytical Letters*, v. 20, n. 2, p. 349-359, 1987.

Comission Decision of 12 August 2002 Implementing Council Directive 96/23/EC Concerning the Performance of Analytical Methods and the Interpretation of Results, *Official Journal of the European Communities*, p. 8-36, 2002.

D. A. Skoog, D. M. West and F. J. Holler; *Fundamentals of Analytical Chemistry*, 7th edition, Harcourt College Publishers, 1997, 870 p.

D. A. Skoog, F. J. Holler e T. A. Nieman **Princípios de Análise Instrumental**, 5^a edição, tradução: Ignez Caracelli, Paulo Celso Isolani, Regina Helena de Almeida Santos, Regina Helena Porto Francisco, Editora Bookman, 2002, 836 p.

D. K. Demertzi **Metal Complexes of the Anti-Inflammatory Drug Sodium [2-[(2,6-Dichlorophenyl)Amino]Phenyl]Acetate (Diclofenac Sodium). Molecular and Crystal Structure of Cadmium Diclofenac**, *Polyhedron*, v.12, n. 11, p. 1361-1370, 1993.

D. Kealey **Quantitative Reflectometry – II Precision and Interferences**, *Talanta*, v. 21, p. 475-480, 1974.

D. Kealey **Quantitative Reflectometry – I Principles and Scope**, *Talanta*, v. 19, p. 1563-1571, 1972.

D. Lansdorp, T. J. Janssen, P. J. M. Guelen and T. B. Vree **High-Performance Liquid Chromatographic Method for the Determination of Diclofenac and its Hydroxy Metabolites in Human Plasma and Urine**, *Journal of Chromatography*, v. 528, p. 487-494, 1990.

D. L. Pavia, G. M. Lampman and G. S. Kriz; *Introduction to Spectroscopy*, 2nd edition, Saunders College Publishing, 1996, 511 p.

D. M. Bila e M. Dezotti **Fármacos no Meio Ambiente**, *Química Nova*, v. 26, n. 4, p. 523-530, 2003.

D. Reinecke, A. Jensen, F. Fister and U. Scherman **Quantitative Determination of Organic Compounds by Diffuse Reflectance Fourier Transform Infrared Spectrometry**, *Analytical Chemistry*, v. 60, p. 1221-1224, 1998.

D. Voet and J. G. Voet; *Biochemistry*, 2nd edition, John Wiley & Sons, 1995, 1392 p.

Diclofenac. In: *British Pharmacopoeia Version 3.0*, Incorporating the Requirements of the 3rd edition of the European Pharmacopoeia - 1997, HM Stationery Office, 1999.

Diclofenac. In: *The United States Pharmacopeia - USP 25*, 25th edition, Webcom Limited, 2002, 1683 p.

Diclofenaco. In: *Farmacopéia Brasileira*, 4^a edição, Parte II, Terceiro Fascículo, 2002, 1218 p.

E. C. Ku, J. M. Wasvary and W.D. Cash **A Potent Inhibitor of Prostaglandin Synthetase**, *Biochemical Pharmacology*, v. 24, n. 5, p. 641-643, 1975.

F. Leite; *Validação em Análise Química: conceitos, repe, repro, estatística, calibrações*, Editora Átomo, 2002, 278 p.

G. A. Shabir **Validation of High-Performance Liquid Chromatography Methods for Pharmaceutical Analysis Understanding the Differences and Similarities Between Validation Requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization**, *Journal of Chromatography A*, v. 987, p. 57-66, 2003.

G. D. Christian; *Analytical Chemistry*, 4th edition, John Wiley & Sons, 1986, 676 p.

G. Kortüm; *Reflectance Spectroscopy, Principle, Methods, Applications*, translated from the German by J. E. Lohr, Springer - Verlag, 1969, 366 p.

G. Lunn and N. Schmuff; *HPLC Methods for Pharmaceutical Analysis*, John Wiley & Sons, Inc., 1997, 1609 p.

H. Fabre, S. W. Sun and B. Mandrou **Assay Validation for an Active Ingredient in a Pharmaceutical Formulation: Practical Approach Using Ultraviolet Spectrophotometry**, *Analyst*, v. 118, p. 1061-1094, 1993.

H. L. White and A. T. Glassman **Simple Radiochemical Assay for Prostaglandin Synthetase**, *Prostaglandins*, v. 7, n. 2, p.123-129, 1974.

How does a Reflectance Spectrophotometer Work. Disponível em <<http://www.colourware.co.uk/cpfaq/q3-10.htm>>. Acesso em 08 jul. 2003.

I. Karamancheva, I. Dobrev, L. Brakalov and A. Andreeva **Second Derivative Spectrophotometric Determination of the Degradation Products of Diclofenac Sodium in Gel-Ointment**, *Analytical Letters*, v. 31, n. 1, p. 117-129, 1998.

I. Karamancheva, I. Dobrev, L. Brakalov and A. Andreeva **Spectrophotometric Determination of Diclofenac Sodium in Gel-Ointment**, *Analytical Letters*, Bulgaria, v. 30, n. 12, p. 2235-2249, 1997.

J. A. Arancibia and G. M. Escandar **Complexation Study of Diclofenac with β -Cyclodextrin and Spectrofluorimetric Determination**, *Analyst*, v. 124, p. 1833-1838, 1999.

J. C. Botello and G. P. Caballero **Spectrophotometric Determination of Diclofenac Sodium with Methylene Blue**, *Talanta*, v. 42, n. 1, p. 105-108, 1995.

J. C. Miller and J. N. Miller; *Statistics for Analytical Chemistry*, 3rd edition, Ellis Horwood PTR Prentice Hall, 1993, 233 p.

J. Haapasaari, E. Wuolijoki and H. Ylijoki **Treatment of Rheumatoid-Arthritis with Diclofenac Sodium**, *Scandinavian Journal of Rheumatology*, v. 12, n. 4, p. 325-330, 1983.

J. R. J. Sorenson; *Metal Ions in Biological Systems* v. 14, Dekker, 1982, 450 p.

K. Eckslager; *Errors, Measurement and Results in Chemical Analysis*, Van Nostrand Reinhold Company, 1972, 230 p.

K. Shivram and B. V. Kamath **Spectrophotometric Determination of Diclofenac Sodium Via Oxidation Reactions**, *Analytical Letters*, v. 26, n. 5, p. 903-911, 1993.

K. Sorensen **Long-Term Investigation of a New Anti-Rheumatic Drug, Diclofenac Sodium (Voltaren)**, *Scandinavian Journal of Rheumatology*, Suppl. 22, p. 81-85, 1978.

L. Zecca, P. Ferrario and P. Costi **Determination of Diclofenac and its Metabolites in Plasma and Cerebrospinal Fluid by High-Performance Liquid Chromatography with Electrochemical Detection**, *Journal of Chromatography*, v. 567, p. 425-432, 1991.

M. Konstandinidou, A. Kourounakis, M. Yiangou, L. Hadjipetrou, D. K. Demertzi, S. Hadjikakou and M. Demertzis **Anti-Inflammatory Properties of Diclofenac Transition Metalloelement Complexes**, *Journal of Inorganic Biochemistry*, v. 70, p. 63-69, 1998.

M. L. F. de Córdova, P. O. Barrales and A. M. Díaz **Sensitive and Selective Determination of Diclofenac Sodium in Pharmaceutical Preparations by Solid Phase Ultraviolet Absorptiometry**, *Analytica Chimica Acta*, v. 369, p. 263-268, 1998.

M. S. A. Prado, M. Steppe, M. F. M. Tavares, E. R. M. K. Hackmann and M. I. R. M. Santoro **Comparison Between Capillary Electrophoresis and Liquid Chromatography for the Determination of Diclofenac Sodium in a Pharmaceutical Tablet**, *Journal of AOAC International*, v. 85, n. 2, p. 333-340, 2002.

M. Tubino, F. A. A. Matias and M. M. D. C. Vila **Quantitative Reflectance Spot Test for the Determination of Acetylsalicylic Acid in Pharmaceutical Preparations**, *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 15, n. 1, p. 1-4, 2004.

M. Tubino, F. A. A. Matias and M. M. D. C. Vila **A Simple Device for Quantitative Colorimetric Diffuse Reflectance Measurements**, *Sensors and Actuators B*, v. 88, p. 60-66, 2003.

M. Tubino, A. V. Rossi and M. E. A. de Magalhães **Quantitative Spot Tests of Fe(III), Cr(VI) and Ni(II) by Reflectance Measurements**, *Analytical Letters*, v. 30, n. 2, p. 271-282, 1997.

N. Baccan, J. C. de Andrade, O. E. S. Godinho e J. S. Barone; *Química Analítica Quantitativa Elementar*, 2ª edição, Editora Edgard Blücher Ltda, 1995, 259 p.

N. Beaulieu, E. G. Lovering, J. Lefrançois and H. Ong **Determination of Diclofenac Sodium and Related-Compounds in Raw-Materials and Formulations**, *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, v. 73, n. 5, p. 698-701, 1990.

O. A. Ohlweiler; *Teoria e Prática da Análise Quantitativa Inorgânica*, Editora Universidade de Brasília, 1968, v. 1, 291 p.

O. Mutru, M. Penttila, J. Pesonen, P. Salmela, O. Suhonen and T. Sonck **Diclofenac Sodium (Voltaren) and Indomethacin in Ambulatory Treatment of Rheumatoid-Arthritis – Double-Blind Multicenter Study**, *Scandinavian Journal of Rheumatology*, Suppl. 22, p. 51-56, 1978.

P. F. Vanbel, J. A. Gilliard and B. Tilquin **Chemometric Optimization in Drug Analysis by HPLC - a Critical Evaluation of the Quality Criteria Used in the Analysis of Drug Purity**, *Chromatographia*, v. 36, p. 120-124, 1993.

P. Moser, A. Sallmann and I. Wiesenberger **Synthesis and Quantitative Structure-Activity Relationships of Diclofenac Analogues**, *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 33, p. 2358-2368, 1990.

P. O. Barrales, A. R. Medina, M. L. F. de Córdova and A. M. Diaz **Sensitive and Simple Determination of Diclofenac Sodium by Use of a Continuous Flow-Injection Procedure with Solid-Phase Spectroscopic Detection**, *Analytical Sciences*, v. 15, p. 985-989, 1999.

P. Tudja, M. Z. I. Khan, E. Mestrovic, M. Horvat and P. Golja **Thermal Behaviour of Diclofenac Sodium: Decomposition and Melting Characteristics**, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, v. 49, n. 10, p. 1245-1250, 2001.

Programa de Capacitação de Usuários em Informação Científica 2003 "Usuário da Informação de Ciência e Tecnologia". Módulo 4: Elaboração de Trabalhos Científicos - Trabalho de Conclusão de Curso, Monografia, Dissertação, Tese. Seção de Referência: *Diretoria de Serviços ao Público Biblioteca Central - UNICAMP*, 2003.

Programa de Capacitação de Usuários em Informação Científica 2003 "Usuário da Informação de Ciência e Tecnologia". Módulo 4: Elaboração de Trabalhos Científicos - Anexos. Seção de Referência: *Diretoria de Serviços ao Público Biblioteca Central - UNICAMP*, 2003.

Prudent Practices for Disposal of Chemicals from Laboratories, National Academy Press, 1983, Appendix J, 282 p.

R. Bucci, A. D. Magri, A. L. Magri and A. Napoli **Spectroscopic Characteristics and Thermal Properties of Divalent Metal Complexes of Diclofenac**, *Polyhedron*, v. 19, p. 2515-2520, 2000.

R. Bucci, A. D. Magri and A. L. Magri **Determination of Diclofenac in Pharmaceutical Formulations**, *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, v. 362, p. 577-582, 1998.

R. Caucutt and R. Boddy; *Statistics for Analytical Chemists*, Chapman and Hall, 1989, 253 p.

R. Cini **Anti-Inflammatory Compounds as Ligands in Metal Complexes as Revealed in X-Ray Structural Studies**, *Comments on Inorganic Chemistry*, v. 22, n. 3-4, p. 151-186, 2000.

R. Kellner, J. M. Mermet, M. Otto and H. M. Widmer; *Analytical Chemistry*, Wiley-VCH, 1998, 916 p.

R. Kesharwani and P. Singh **Synthesis and Characterisation of Divalent Metal Complexes of Diclofenac Sodium**, *Journal of Indian Chemical Society*, v. 72, p. 803-804, 1995.

R. M. Silverstein, G. C. Bassler e T. C. Morrill; *Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos*, tradução R. B. de Alencastro, 5ª edição, Editora Guanabara Koogan, 1994, 387 p.

R. M. V. Assumpção e T. Morita; *Manual de Soluções, Reagentes & Solventes*, 1ª edição, Editora Edgard Blücher Ltda, 1968, 627 p.

Reflectance Phenomenology and Modeling Tutorial. Disponível em. <http://www.erim.org/on-line-docs/GUIDE/guide.frm.html>. Acesso em 15 jun. 2002.

S. A. Kustrin, L. Zivanovic, D. Radulovic and M. Vasiljevic **Experimental Design Applied to a Spectrophotometric Study of a Diclofenac Sodium-Copper(II) Complex**, *Analyst*, v. 116, p. 753-756, 1991.

S. Defazio and R. Cini **Synthesis, X-ray Structure and Molecular Modelling Analysis of Cobalt(II), Nickel(II), Zinc(II) and Cadmium(II) Complexes of the Widely used Anti-Inflammatory Drug Meloxicam**, *Journal of the Chemical Society. Dalton Transactions*, p. 1888-1897, 2002.

S. García, C. S. Pedreño, I. Alberó, and C. García **Flow-Injection Spectrophotometric Determination of Diclofenac or Mefenamic Acid in Pharmaceuticals**, *Mikrochimica Acta*, v. 136, p. 67-71, 2001.

S. S. M. Hassan, R. M. A. Aziz and M. S. A. Samad **Plastic Membrane Electrode for Selective Determination of Diclofenac (Voltaren) in Pharmaceutical Preparations**, *Analyst*, v. 119, p. 1993-1996, 1994.

T. Hirai, S. Matsumoto and I. Kishi **Simultaneous Analysis of Several Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs in Human Urine by High-Performance Liquid Chromatography with Normal Solid-Phase Extraction**, *Journal of Chromatography B*, v. 692, n. 2, p. 375-388, 1997.

T. P. Ruiz, C. M. Lozano, A. S. and M. T. S. Miguel **Flow Extraction Spectrophotometric Method for the Determination of Diclofenac Sodium in Pharmaceutical Preparations**, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 16, p. 249-254, 1997.

Text on Validation of Analytical Procedures Q2A, ICH Harmonised Tripartite Guideline. Disponível em: <<http://www.ich.org>>. Acesso em 20 nov. 2003.

The Integrating Sphere Reflectance Accessory. Disponível em <http://www.labsphere.com/tech_info/docs/IS_Reflectance_Accy.pdf>. Acesso em 08 jul. 2003.

U. P. Geiger, P. H. Degen and A. Sioufi **Quantitative Assay of Diclofenac in Biological-Material by Gas-Liquid-Chromatography**, *Journal of Chromatography*, v. 111, n. 2, p. 293-298, 1975.

V. A. Fassel **Nomenclature, Symbols, Units and Their Usage in Spectrochemical Analysis – II. Data Interpretation**, *Analytical Chemistry Division*, 1975.

V. Marti, P. Notavi e J. Portolés **Método Racional de Preparação e Ajuste de Tintas Serigráficas**, *Cerâmica Industrial*, v. 3, n. 4-6, p. 6-12, 1998.

Validation of Analytical Procedures: Methodology Q2B, ICH Harmonised Tripartite Guideline. Disponível em: <<http://www.ich.org>>. Acesso em 20 nov. 2003.

Voltaren Online, Description, Chemistry, Ingredients – Diclofenac – RxList Monographs. Disponível em <<http://www.rxlist.com/cgi/generic/diclofen.htm>>. Acesso em 15 jul. 2003.

Wilson and Wilson's; *Comprehensive Analytical Chemistry*, Elsevier, 1975, 374 p.

Y. C. de Micalizzi, N. B. Pappano and N. B. Debattista **First and Second Order Derivative Spectrophotometric Determination of Benzyl Alcohol and Diclofenac in Pharmaceutical Forms**, *Talanta*, v. 47, p. 525-530, 1998.

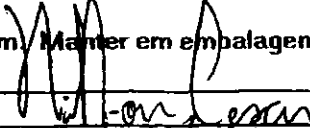
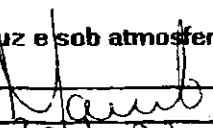
Y. K. Arrawal, V. P. Upadyay and S. K. Menon **Spectrophotometric Determination of Diclofenac Sodium**, *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 50, n. 1, p. 58 - 60, 1988.

Z. A. E. Sherif, M. I. Walash, M. F. E. Tarras and A. O. Osman **Colorimetric Determination of Two Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs Using p-dimethylaminocinnamaldehyde**, *Analytical Letters*, v. 30, n. 10, p. 1881-1896, 1997.

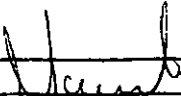
ANEXO

Anexo 1: Certificados de análise dos padrões de diclofenaco de sódio (A) e de diclofenaco de potássio (B).

(A)

 NORTEC	CERTIFICADO DE ANÁLISE DICLOFENACO DE SÓDIO GRAU INJETÁVEL	REFERÊNCIA: EUROPEAN PHARMACOPEIA, 3rd Edition, 1997, page 1487 USP 24, page 546
LOTE Nº: CDS - 0052	Validade: ABRIL/2004	Data de Fabricação: 15/04/02
TESTES	RESULTADOS	ESPECIFICAÇÕES
. Descrição . Solubilidade . Dosagem . Perda por Secagem (1 g, 105°C/3 h) . Metais pesados (Pb) . pH da Solução a 1,0% . Identificação . Substâncias Relacionadas (HPLC) . Limpidez da Solução (Sol. 5,0% em metanol) . Absorção da Luz A (5,0% metanol, 1 cm) 440 nm . Bromo (ICP-MS) . Cor da Solução a 400 nm: A (20% metanol, 1 cm)	. De acordo . Água: de acordo . Metanol: de acordo . Etanol 96%: de acordo . Acetona: de acordo . Éter: de acordo . 99,6% . 0,1% . De acordo . 7,2 . I. V.: de acordo . Sódio: positivo . De acordo . De acordo . 0,029 . De acordo . 0,088	. Pó cristalino branco a levemente amarelado, levemente higroscópico. . Livremente solúvel em metanol; pouco solúvel em água; solúvel em etanol 96%; levemente solúvel em acetona; praticamente insolúvel em éter. . 99,0% à 101,0%, base seca . Máximo 0,5% . Máximo 10 ppm . 7,0 à 8,5 . I.V.: de acordo com o padrão . Sódio: positivo . Nenhum pico secundário maior do que 0,2% Somatório: máx. 0,5% . Solução Límpida . Máximo 0,050 . Máximo 10 ppm . Máximo 0,200
. Embalagem: Manter em embalagem hermeticamente fechada, ao abrigo da luz e sob atmosfera de nitrogênio.		
ANALISTA: 	GARANTIA DA QUALIDADE: 	
DATA: 30/04/02	DATA: 30-4-02	

(B)

 NORTEC	CERTIFICADO DE ANÁLISE DICLOFENACO DE POTÁSSIO	REFERÊNCIA : NORTEC : MC-PF.009.02
LOTE Nº: CDP - 0092	Validade : JULHO/2007	Data de Fabricação: 29/07/02
TESTES	RESULTADOS	ESPECIFICAÇÕES
. Descrição . Solubilidade . Dosagem . Perda por Secagem (1 g, 105°C/3 h) . Metais Pesados (Pb) . Cor a 400 nm: A (20%, 1 cm) metanol . pH da Solução (a 1,0% em água) . Identificação . Substâncias Relacionadas (HPLC) . Absorção da Luz A (5,0% , 1 cm) 440 nm . Limpidez da Solução (Sol. 5,0% em metanol) . Bromo (ICP-MS)	. De acordo . Água: de acordo . Metanol : de acordo . 99,9% . 0,2% . De acordo . 0,054 . 7,1 . I.V.: de acordo . Potássio : de acordo . De acordo . 0,004 . De acordo . De acordo	. Pó cristalino branco ou quase branco, higroscópico. . Levemente solúvel em água; solúvel em metanol. . 99,0% à 101,0%, base seca . Máximo 0,5% . Máximo 10 ppm . Máximo 0,200 . 7,0 à 8,5 . I.V.: de acordo com o padrão . Potássio : positivo . Nenhum pico secundário maior do que 0,2% somatório: máximo 0,5% . Máximo 0,050 . Solução límpida . Máximo 10 ppm
. Embalagem: Manter em embalagem hermeticamente fechada, ao abrigo da luz e sob atmosfera de nitrogênio		
ANALISTA :  DATA : 13/08/02	GARANTIA DA QUALIDADE :  DATA : 13-8-02	

Anexo 2: Espectro de infra-vermelho do diclofenaco de cobre(II) obtido em pastilha de KBr.

