



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA**  
**CAMPUS I - CAMPINA GRANDE**  
**PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**  
**MESTRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**GISELE JACINTO DE ARAUJO**

**VALIDAÇÃO DE MÉTODO ESPECTROMÉTRICO PARA QUANTIFICAÇÃO DE**  
**UM DERIVADO DE N-ACILHIDRAZONA**

**CAMPINA GRANDE**

**2023**

**GISELE JACINTO DE ARAUJO**

**VALIDAÇÃO DE MÉTODO ESPECTROMÉTRICO PARA QUANTIFICAÇÃO DE  
UM DERIVADO DE N-ACILHIDRAZONA**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual da Paraíba como requisito para obtenção do título de mestre em Ciências Farmacêuticas.

Área de concentração: Ciências Farmacêuticas

Orientador: Prof.<sup>a</sup> Dr. José Germano Vêras Neto

**CAMPINA GRANDE**

**2023**

É expressamente proibido a comercialização deste documento, tanto na forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano do trabalho.

A663v Araújo, Gisele Jacinto de.  
Validação de método espectrométrico para quantificação de um derivado de N-Acilhidrazona [manuscrito] / Gisele Jacinto de Araújo. - 2023.  
58 p. : il. colorido.

Digitado.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2023.

"Orientação : Prof. Dr. José Germano Vêras Neto, Departamento de Química - CCT."

1. Calibração univariada. 2. Controle de qualidade. 3. Espectrometria UV. 4. Quantificação da JR. I. Título

21. ed. CDD 615.11

GISELE JACINTO DE ARAUJO

VALIDAÇÃO DE MÉTODO ESPECTROMÉTRICO PARA QUANTIFICAÇÃO DE UM  
DERIVADO DE N-ACILHIDRAZONA

Dissertação de mestrado apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em Ciências  
Farmacêuticas da Universidade Estadual da  
Paraíba como requisito para obtenção do título  
de mestre em Ciências Farmacêuticas.

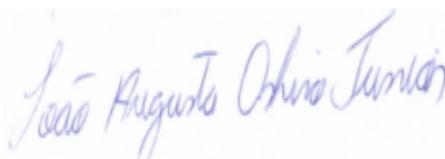
Área de concentração: Ciências Farmacêuticas

Aprovada em: 10/02/23

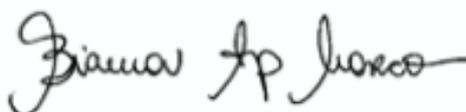
**BANCA EXAMINADORA**



Prof.<sup>a</sup> Dr. José Germano Vêras Neto (Universidade Estadual da Paraíba)  
Orientador



Prof.<sup>a</sup> Dr. João Augusto Oshiro Júnior (Universidade Estadual da Paraíba)  
Examinador interno



Prof.<sup>a</sup> Dra. Bianca Aparecida de Marco Segatto (Universidade Estadual Paulista)  
Examinadora externa

A minha Vó Maria, por ser meu maior exemplo de superação e alegria, DEDICO.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida e por todas as bênçãos concedidas. Rendo Graças, pois tudo foi providência e permissão Dele.

Aos meus Pais, pelo cuidado, dedicação e ensinamentos. Por serem a base da minha vida e por sempre me incentivarem a estudar. A minha família, por todo o amor e incentivo.

Ao meu Orientador Prof. Dr. José Germano Veras Neto, por todo o acompanhamento, orientação, ensinamentos e paciência ao longo dessa trajetória. Por sempre está à disposição e pelo amor que transmite ao ensinar. Agradeço de coração.

A Lêda, minha colega de mestrado e que foi essencial para o desenvolvimento da pesquisa. Obrigada por toda contribuição e ajuda.

Ao Prof. Dr. Ricardo Olímpio e seus alunos, por ter cedido a molécula, pela síntese de novos lotes quando solicitado e por toda a contribuição no estudo.

A UEPB, por ter sido minha segunda casa, desde a graduação.

Ao PPGCF da UEPB, por nos proporcionar está formação magnífica e essencial para ciência.

Ao corpo docente do programa, por todos os ensinamentos ao longo das disciplinas. Sem vocês não seria possível a concretização deste sonho.

Ao Secretário Thiago, por sempre atender as solicitações e pela dedicação a função que desempenha.

Aos professores Dr. João Augusto Oshiro Júnior e a Dra. Bianca Aparecida de Marco Segatto pelo aceite em participar da banca de defesa.

A minha turma de mestrado, por todo companheirismo e união. Em especial, a Angélica, Luana e Lêda.

Aos integrantes do laboratório de química analítica e Quimiometria, pela disponibilidade em ajudar e auxiliar.

A todos os meus amigos que contribuíram de alguma forma, seja através de uma oração, de uma palavra ou diretamente no processo da pesquisa. Em especial, ao meu irmão Guilherme, a Bárbara e Cleyton. O meu muito Obrigada!

A Farmácia Varejão do Trabalhador, em especial a Anderson, pela compreensão e liberação do trabalho para estudar e desenvolver a pesquisa.

E concludo agradecendo a minha mãezinha Nossa Senhora, por toda a intercessão e possibilitar a calma nos dias de agitação e incertezas.

Á todos, minha eterna Gratidão!

## RESUMO

A síntese de novos derivados acilhidrazônicos tem apresentado grande interesse científico, devido ao seu potencial de ação analgésica, anti-inflamatória e antimicrobiana. Nesse sentido, quando se trata de moléculas recém-sintetizadas, o desenvolvimento e validação de métodos de quantificação é de extrema importância, visto que não possuem métodos analíticos relatados em compêndios oficiais. Assim, o objetivo deste trabalho foi de desenvolver e validar um método analítico para quantificação de um derivado N-acilhidrazônico (JR-19) utilizando espectrometria de absorção molecular UV-VIS. Foi utilizado o espectrofotômetro Shimadzu UV-1280 para as medidas espectrométricas, o DMSO foi utilizado como solvente para preparação das soluções estoque e de trabalho. Inicialmente, foi feita varredura espectral na região do UV-Vis para determinar a máxima região de absorção da radiação, sendo escolhido o comprimento de onda 311 nm. Em seguida, foi avaliada a estabilidade das soluções de JR-19 em curto (8 horas) e médio (14 dias) prazos, variando as condições de armazenagem (temperatura e fotodegradação). Os resultados indicaram que as soluções se estabilizam a partir de 60 minutos de preparadas e que o melhor procedimento de estocagem é em temperatura ambiente (25°C) e que as mesmas não sofrem fotodegradação, não necessitando, portanto, de estarem ao abrigo da luz. Garantindo-se a estabilidade das soluções o método proposto foi validado seguindo os parâmetros preconizados pelo DOQ-CGCRE-008, estando harmonizado a RDC 166 de 2017 da ANVISA, a partir das figuras de mérito: Linearidade, seletividade, exatidão, precisão, limite de detecção, limite de quantificação e robustez. O método foi considerado linear na faixa de 2 a 17  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Os limites de detecção e quantificação foram 0,5831 e 1,7669  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente, assegurando a sensibilidade do método. O método foi considerado preciso apresentando coeficientes de variação inferiores a 5%. A exatidão foi avaliada a partir de teste de recuperação e os valores obtiveram média de 97,17%. Para a robustez foram realizados dois planejamentos fatoriais  $3^2$  para cada marca do DMSO, de modo que os coeficientes de variação apresentados foram menores que 5% para as respostas obtidas pelas diferentes marcas, sendo corroborado pelo diagrama de Pareto e gráfico de superfície e resposta, considerando o método robusto. Portanto, pode-se concluir que o método desenvolvido apresenta dentro dos padrões aceitáveis em termos dos parâmetros de qualidade preconizados.

**Palavras-chave:** calibração univariada; controle de qualidade; espectrometria UV; quantificação da JR19.

## ABSTRACT

The synthesis of new acylhydrazonic derivatives has presented a great scientific interest, due to their potential analgesic, anti-inflammatory and antimicrobial actions. In this sense, when it comes to newly synthesized molecules, the development and validation of quantification methods is of utmost importance, since they do not have analytical methods reported in official compendia. The objective of this work was to develop and validate an analytical method for the quantification of an N-acylhydrazonic derivative (JR-19) using UV-VIS molecular absorption spectrometry. A Shimadzu UV-1280 spectrophotometer was used for spectrometric measurements, DMSO was used as solvent for preparing stock and working solutions. Initially, spectral scanning was carried out in the UV-Vis region to determine the maximum radiation absorption region, choosing the wavelength of 311 nm. Then, the stability of the JR-19 solutions was evaluated in short (8 hours) and medium (14 days) terms, varying storage conditions (temperature and photodegradation). The results indicated that the solutions stabilize after 2 hours of preparation and that the best storage procedure is at room temperature (25 °C) and that they do not undergo photodegradation, therefore not needing to be protected from light. Ensuring the stability of the solutions, the proposed method was validated following the parameters recommended by DOQ-CGCRE-008, being harmonized with ANVISA's RDC 166 of 2017, based on the figures of merit: Linearity, selectivity, accuracy, precision, detection limit, quantification limit and robustness. The method was considered linear in the range of 2 to 17  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . The limits of detection and quantification were 0.5831 and 1.7669  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , respectively, ensuring the sensitivity of the method. The method was considered accurate with coefficients of variation lower than 5%. The accuracy was evaluated from the recovery test and the values averaged 97,17%. For robustness, two factorial designs were performed for each brand of DMSO, so that the coefficients of variation presented were less than 5% for the responses obtained by the different brands, being corroborated by the Pareto diagram and graph of surface and response, considering the method robust. Therefore, it can be concluded that the developed method is within acceptable standards in terms of the recommended quality parameters.

**Keywords:** quality control; quantification of JR-19; univariate calibration; UV Spectrometry.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Estrutura básica da função N-acilhidrazona .....	15
<b>Figura 2</b> - Estruturas de derivados acilhidrazônicos disponíveis comercialmente.....	16
<b>Figura 3</b> - Síntese de derivados N- acilidrazonas indolicos, utilizando ácido acético (AcOH) e etanol (EtOH) em temperatura ambiente .....	17
<b>Figura 4</b> - Representação gráfica da linearidade do método .....	21
<b>Figura 5</b> – Imagem referente aos três lotes obtidos da molécula JR-19.....	35
<b>Figura 6</b> - Varredura espectral de absorção no UV- Vis (a) e do UV (b) da solução de JR-19 .....	37
<b>Figura 7</b> - Molécula JR-19 com grupos cromóforos circulados .....	37
<b>Figura 8</b> - Estabilidade da molécula JR-19 com DMSO em 8 horas .....	38
<b>Figura 9</b> – Soluções preparadas nas embalagens para o estudo de estabilidade de 14 dias ....	39
<b>Figura 10</b> - Estabilidade da molécula JR-19 com DMSO em 14 dias.....	39
<b>Figura 11</b> - Curva analítica da JR-19 com DMSO no intervalo de 2 a 17 $\mu\text{g mL}^{-1}$ .....	41
<b>Figura 12</b> - Gráfico de resíduos de JR-19 com DMSO no intervalo de 2 a 17 $\mu\text{g mL}^{-1}$ .....	42
<b>Figura 13</b> -Espectros de absorção da JR-19 e do DMSO para verificação da seletividade.....	43
<b>Figura 14</b> - Diagrama de Pareto e gráfico de superfície de resposta referente ao planejamento $3^2$ das soluções preparadas com DMSO da marca 1 ( a e c) e maca 2 (b e d).....	47

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Condições para a avaliação da robustez do método .....	24
<b>Tabela 2</b> - Validação de método analítica por EAM UV-Vis.....	29
<b>Tabela 3</b> - Condições de estocagem da solução no período de 14 dias .....	31
<b>Tabela 4</b> - Matriz de planejamento $3^2$ .....	34
<b>Tabela 5</b> - Teste de análise de variância (ANOVA).....	41
<b>Tabela 6</b> - Resultado analítico referente a exatidão do método.....	44
<b>Tabela 7</b> - Resultado analítico da precisão intermediária para os três lotes da molécula JR-19 .....	45
<b>Tabela 8</b> - Respostas obtidas para o planejamento experimental $3^2$ para as marcas 1 e 2 de DMSO.....	46
<b>Tabela 9</b> - Resultados referente ao teste de t pareado para os solventes de marca 1 e 2.....	48

## LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

A	Absorbância
ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ANOVA	Análise de Variância (do inglês <i>Analysis Of Variance</i> )
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CMD	Concentração média determinada
CV	Coefficiente de variação
DMSO	Dimetilsulfóxido
DP	Desvio padrão
DPR	Desvio padrão relativo
EAM UV-Vis	Espectroscopia de Absorção Molecular na Região do Ultravioleta e Visível
FDA	Agência de Alimentos e Drogas (do inglês <i>Food and Drug Agency</i> )
GL	Grau de liberdade
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
ISO	Organização Internacional de Padronização (do inglês <i>International Organization for Standardization</i> )
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
LSVM	Laboratório de Síntese e Vetorização de Moléculas
NHA	N-Acilhidrazonas
NIRS	Espectroscopia no Infravermelho Próximo (do inglês <i>Near InfraRed Spectroscopy</i> )
p	Correlação de Pearson
r	Coefficiente de correlação
r <sup>2</sup>	Coefficiente de determinação
UEPB	Universidade Estadual da Paraíba
$\lambda$	Comprimento de onda

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>12</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>14</b>
<b>2.1</b>	<b>Objetivo Geral.....</b>	<b>14</b>
<b>2.2</b>	<b>Objetivos Específicos.....</b>	<b>14</b>
<b>3</b>	<b>FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA .....</b>	<b>15</b>
<b>3.1</b>	<b>N-acilhidrazona.....</b>	<b>15</b>
<b>3.2</b>	<b>Validação de métodos analíticos.....</b>	<b>18</b>
3.2.1	Seletividade.....	20
3.2.2	Linearidade.....	20
3.2.3	Exatidão.....	21
3.2.4	Precisão.....	22
3.2.5	Limite de detecção (LD) e Limite de quantificação (LQ) .....	23
3.2.6	Robustez.....	24
<b>3.3</b>	<b>Espectrofotometria de absorção molecular no UV-Visível (EAM UV-Vis).....</b>	<b>25</b>
<b>3.4</b>	<b>Validação de métodos analíticos por EAM UV-Vis.....</b>	<b>26</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>30</b>
<b>4.1</b>	<b>Reagentes e Solventes.....</b>	<b>30</b>
<b>4.2</b>	<b>Equipamentos e materiais.....</b>	<b>30</b>
<b>4.3</b>	<b>Escolha do solvente.....</b>	<b>30</b>
<b>4.4</b>	<b>Caracterização espectroscópica.....</b>	<b>30</b>
<b>4.5</b>	<b>Preparo da solução estoque.....</b>	<b>31</b>
<b>4.6</b>	<b>Estudo de Estabilidade de 8 horas e em 14 dias.....</b>	<b>31</b>
<b>4.7</b>	<b>Validação do método analítico por EAM UV-Vis.....</b>	<b>32</b>
4.7.1	Linearidade.....	32
4.7.2	Seletividade.....	32
4.7.3	Limites de quantificação (LQ) e detecção (LD) .....	33
4.7.4	Precisão.....	33
4.7.5	Exatidão.....	33
4.7.6	Robustez.....	34
<b>4.8</b>	<b>Análises estatísticas.....</b>	<b>34</b>
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>35</b>
<b>5.1</b>	<b>N' -(1H-indol-3yl) metileno) -2- cianoacetohidrazida (JR-19).....</b>	<b>35</b>
<b>5.2</b>	<b>Escolha do solvente, caracterização espectroscópica e estudo de estabilidade.....</b>	<b>35</b>

5.2.1 Escolha do solvente.....	35
5.1.2 Caracterização espectroscópica.....	36
5.1.3 Estabilidade da solução em 8 horas e 14 dias.....	38
<b>5.3 Validação do método analítico por EAM UV-Vis.....</b>	<b>40</b>
5.3.1 Linearidade .....	40
5.3.2 Limites de quantificação (LQ) e detecção (LD) .....	42
5.3.3 Seletividade .....	42
5.3.4 Exatidão .....	43
5.3.5 Precisão.....	44
5.3.6 Robustez.....	46
<b>6 CONCLUSÕES .....</b>	<b>50</b>
<b><u>REFERÊNCIAS .....</u></b>	<b>51</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A N-acilhidrazona (NHA) é uma classe de compostos orgânicos sintéticos de grande importância, devido às inúmeras e úteis aplicações em diferentes campos da Medicina, Biologia e Química. Essa classe de moléculas possui diversas atividades relatadas como ação analgésica, anti-inflamatória e antimicrobiana (SILVA *et al.*, 2015; MEIRA *et al.*, 2018; HOSNY; EL MORSY; SHERIF, 2015; NASTASĂ *et al.*, 2015; RODRIGUES *et al.*, 2016). Devido aos seus efeitos farmacológicos pronunciados, diversos estudos foram publicados com a síntese de novos derivados de NHA (PEDREIRA *et al.*, 2021; AARJANE *et al.*, 2020; RODRIGUES *et al.*, 2020; COIMBRA *et al.*, 2019), sendo, portanto, moléculas promissoras para o desenvolvimento de novos medicamentos.

Nesse sentido, as moléculas recém-sintetizadas não apresentam métodos para sua identificação inequívoca e quantificação, tornando necessário o desenvolvimento de métodos analíticos para garantir que os possíveis insumos farmacêuticos ativos (IFA) sejam controlados em termos de sua quantidade. Este controle da qualidade da espécie química recém-sintetizada permite que as indústrias farmacêuticas possam ajustar as condições de síntese, otimizar a formulação e permitir que o produto chegue ao consumidor final com sua efetiva qualidade e segurança.

Os métodos analíticos utilizados no controle da qualidade podem ser usados desde a identificação, como na indicação de ausência ou de presença da substância, até a determinação quantitativa de moléculas, insumos e excipientes em formulações farmacêuticas ou não. As técnicas analíticas mais comumente utilizadas no desenvolvimento de métodos de quantificação de moléculas sintéticas bioativas são: Técnicas cromatográficas, principalmente a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, do inglês *High Performance Liquid Chromatographic*) hifenada com detecção espectrofotométrica, as espectroscopias de absorção molecular na região do ultravioleta-visível (UV-VIS), no infravermelho próximo (NIR, do inglês *Near Infrared*) e a espectrofluorimétrica, sendo consideradas técnicas rápidas e precisas (VALINGER *et al.*, 2021; RAPALLI *et al.*, 2020; SIDDIQUI; ALOTHMAN; RAHMAN, 2017; OMAR *et al.*, 2015).

Os métodos citados acima, bem como todos os outros métodos analíticos, para que sejam utilizados para análise de ativos farmacêuticos é preciso que sejam desenvolvidos para avaliação do seu desempenho. Isto pode ser obtido por meio de parâmetros de qualidade denominados de figuras de mérito, que asseguram a qualidade e confiança do método, a partir da análise estatística de resultados obtidos de amostras de controle. O estudo desse

desempenho do método analítico dá-se o nome de validação, cujo objetivo é demonstrar que o método é apropriado para a finalidade pretendida. Vale ressaltar que o método deve ser considerado um processo contínuo, começando com um planejamento analítico e que continua ao longo de todo o desenvolvimento do produto com a molécula estudada (SAHOO *et al.*, 2018; TOME *et al.*, 2019; BRITO *et al.*, 2021).

No Brasil a validação de métodos analíticos em amostras com interesse farmacêutico é regulamentada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), estando todas as normas harmonizadas com as do Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Instrumental (INMETRO). Estas devem descrever as figuras de mérito que devem ser obtidas e quais os índices que tornam este método compatível com a qualidade desejada pelos órgãos de controle e fiscalização da comercialização e dos interesses dos consumidores finais. As figuras de mérito, como dito anteriormente, são os indicadores de desempenho de um método analítico e são nomeadas como: seletividade, linearidade, precisão, exatidão, sensibilidade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ) e robustez (BRASIL, 2017, INMETRO, 2020).

Pelas razões estabelecidas, justifica-se a finalidade desse trabalho a partir da necessidade de se desenvolver um método de quantificação de um novo derivado N-acilhidrazona, denominado de N'-(1H-indol-3yl) metileno)-2-cianoacetohidrazida (JR-19), com o intuito de que ocorra a avaliação e monitoramento efetivo dessa nova molécula inovadora.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

O presente trabalho tem como objetivo desenvolver e validar um método analítico para quantificação de N'-(1H-indol-3yl) metileno)-2-cianoacetohidrazida (JR-19) baseado em espectrometria de absorção molecular na região do ultravioleta.

### **2.2 Objetivos Específicos**

- a) realizar a caracterização espectroscópica da JR-19;
- b) avaliar a estabilidade da solução estoque;
- c) desenvolver e validar método espectrométrico UV para quantificação da molécula JR-19.

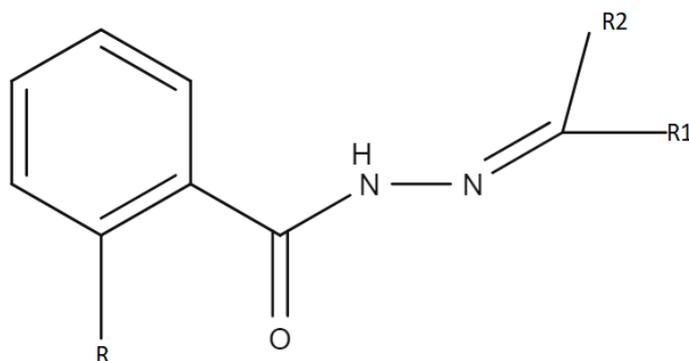
### 3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

#### 3.1 N-acilhidrazona

Atualmente, muitos medicamentos são desenvolvidos a partir de moléculas de origem sintética, consistindo de compostos que sofrem modificações estruturais com a finalidade de buscar uma maior atividade biológica, melhoramento de características farmacocinéticas e farmacodinâmicas. Nesse sentido, as hidrazonas são moléculas sintéticas que vêm sendo estudadas por seu potencial de desenvolver novos e eficientes medicamentos para as mais variadas enfermidades, apresentando diversos derivados. Esta classe de moléculas foi descoberta em 1883 por Emil Fischer, sendo considerada base de Schiff em que apresenta uma ligação dupla carbono-nitrogênio com o átomo de nitrogênio conectado a um grupo arila ou alquila (FISCHER; JOURDAN, 1883; SILVA; JUNIOR; BATALINI, 2021; PARRILHA, 2012; ARRUDA *et al.*, 2020).

Na Figura 1 é possível observar a função N-acilhidrazona, sendo formada a partir da condensação de um aldeído ou cetona com uma hidrazida. As N-acilhidrazonas são consideradas moléculas com estrutura privilegiada por possuir capacidade de fornecer pontos de ligantes para mais de um tipo de receptor, contendo diferentes grupos substituintes nas subunidades ligadas às suas funções do grupo acila e imina, estando representados por R, R1 e R2, respectivamente, resultando em diversos derivados que modulam uma grande diversidade de alvos moleculares (MAIA; TESCH; FRAGA, 2014).

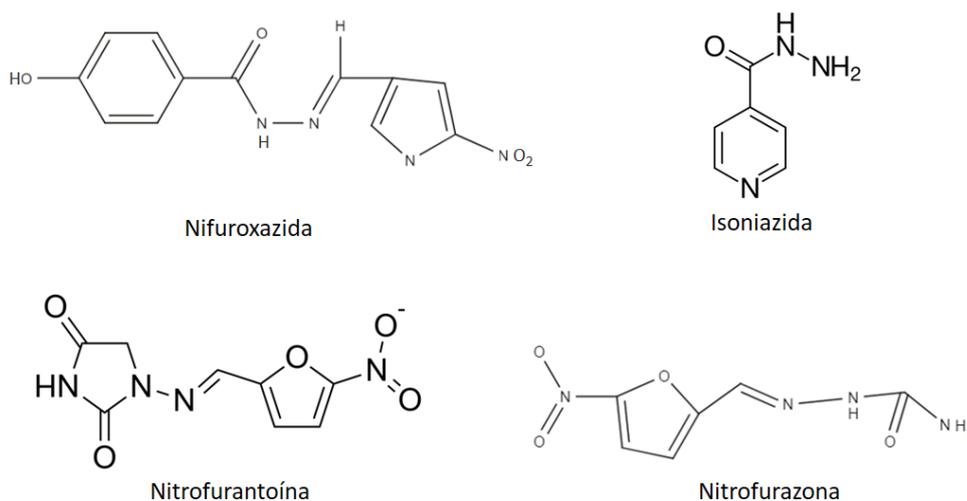
**Figura 1** - Estrutura básica da função N-acilhidrazona



Fonte: Elaborada pela autora, 2023.

Especificamente os derivados hidrazonas denominados de acilhidrazônicos, apresentam-se como moléculas particularmente promissoras para diversos fins terapêuticos. Existem algumas moléculas conhecidas comercialmente que utilizam a função hidrazona, como exemplo a nifuroxazida que apresenta nomenclatura hidrazida S-nitrofurfurilideno de ácido 4-hidroxi-benzóico, sendo utilizada como antibiótico gastrointestinal. Outros exemplos são: a isoniazida ou hidrazida do ácido isonicotínico que é um dos principais quimioterápicos para o tratamento da tuberculose; a nitrofurazona que é usada como agente antibacteriano tópico, e a nitrofurantoína que é usada como agente antibacteriano oral para tratar infecções no trato geniturinário, as estruturas podem ser observadas na Figura 2 (THOTA *et al.*, 2018; VILCHÈZE; JACOBS, 2019; BEGOVIC *et al.*, 2016).

**Figura 2-** Estruturas de derivados acilhidrazônicos disponíveis comercialmente



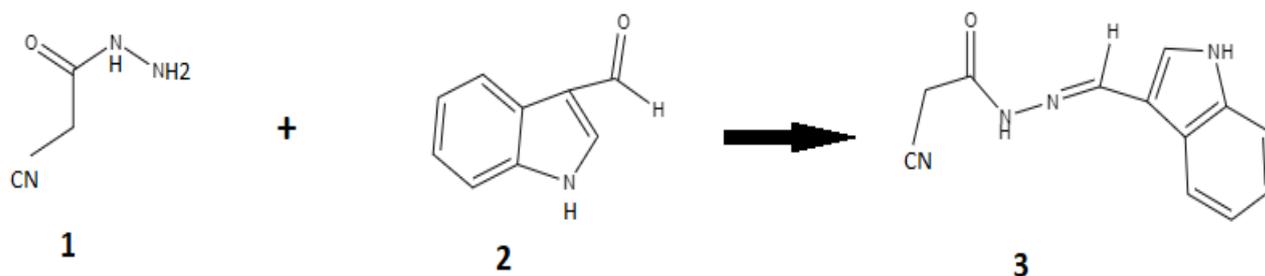
Fonte: Elaborada pela autora, 2023.

Conseqüentemente, ainda que tenha medicamentos disponíveis comercialmente que são sintetizados a partir da N-acilhidrazona, muitos pesquisadores buscam o desenvolvimento e síntese de novos derivados a fim de obter medicamentos que sejam mais eficientes e utilizados para o tratamento de patologias variadas.

Nesse sentido, Moraes e colaboradores (2018) propuseram uma nova rota de síntese baseando-se na reação de condensação entre o composto cianoacetohidrazida (1) e o carboxialdeído 3-indol (2), sob catálise de ácido acético e etanol (Figura 3). Esta reação ocorre em 12 horas sob agitação magnética e o precipitado formado na reação é removido por filtração, lavado com água destilada e seco em dessecador sob vácuo. Como produto foi

obtido um pó amarelo cristalino com 69,03% de rendimento e ponto de fusão de 199 a 202°C. A molécula foi nomeada como N'-(1H-indol-3-yl)metileno)-2-cianoacetohidrazida (JR-19) (3).

**Figura 3** - Síntese de derivados N- acilidrazonas indolicos, utilizando ácido acético (AcOH) e etanol (EtOH) em temperatura ambiente



Fonte: Elaborada pela autora, 2023.

A JR-19 foi caracterizada por espectroscopia de FTIR. Os resultados obtiveram consistência dos dados espectrais com a estrutura. Os picos de absorção obtidos nas regiões: 1620,2  $\text{cm}^{-1}$  é característico da função imina (C=N); 1670,5  $\text{cm}^{-1}$  para o grupo carbonila (HN-C=O); 2275,7  $\text{cm}^{-1}$  para a nitrila (CN) e 3300,8  $\text{cm}^{-1}$ , da amina (NH) (MORAIS *et al.*, 2018). Corroborando a esses dados, Wanderley e colaboradores (2019) observaram as bandas características dos principais grupos funcionais da molécula, em que os picos de absorção foram 3280,0  $\text{cm}^{-1}$  (NH), 2959,0  $\text{cm}^{-1}$  (CH), 2264,0  $\text{cm}^{-1}$  (CN), 1667,0  $\text{cm}^{-1}$  (CO) e 741,0  $\text{cm}^{-1}$  do aromático.

Em estudo proposto por Apolinário (2016), a JR-19 apresentou atividade anti-inflamatória em modelos de peritonite induzida por carragenina, em bolsão de ar subcutâneo e em edema de pata induzida por carragenina, levando a uma redução significativa da migração leucocitária e do edema. Além disso, JR-19 levou a uma atividade antinociceptiva no modelo de dor orofacial induzida por formalina, concluindo a ação na dor e inflamação.

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

Portanto, visto a relevância da molécula JR-19 apresentada nos estudos relatados e pelo fato de ser uma molécula com potencial inovador, tendo ausência de metodologias em compêndios oficiais que tragam testes quantitativos, torna-se necessário o desenvolvimento de

metodologia analítica para a quantificação dessa molécula. Aliado ao desenvolvimento é de fundamental importância que haja a validação do método desenvolvido, a fim da garantia da confiabilidade da determinação como também seguir as exigências propostas por órgãos regulatórios brasileiros e estrangeiros.

### 3.2 Validação de métodos analíticos

A utilização de métodos analíticos leva a resultados qualitativos ou quantitativos, sendo imprescindíveis no desenvolvimento de produtos na indústria como também na pesquisa. As aplicações na pesquisa estarão relacionadas à utilização dos resultados para comparar grupos controles e experimentais, expressar relações entre variáveis, testar hipóteses, enquanto que na indústria a utilização ocorre na determinação da qualidade de produtos, materiais e sistemas, na estimação de rendimento, entre outras aplicações (ELLISON; WILLIAMS, 2012).

A qualidade de um método analítico deve ser comprovada e demonstrada a partir de evidência documentada. Os órgãos externos responsáveis de fiscalização ou internos de controle exigem que o método desenvolvido apresente a comprovação da qualidade para o objetivo pretendido, sendo submetido a etapas de avaliação, seguido por normas e procedimentos que são descritos como validação (LEMUS *et al.*, 2022).

A Organização Internacional de Normalização (ISO, do inglês *International Organization for Standardization*), através do número 17025, define validação como sendo a “comprovação, através de evidências objetivas, de que o método cumpriu os requisitos para uma aplicação ou uso específico pretendido”. Deste modo, a adequação do método para fornecer informações úteis é demonstrada a partir da validação, na qual pode ser uma apresentação formal e sistemática para confirmar que o método fornece resultados satisfatórios e consistentes dentro do escopo do método. Os procedimentos analíticos comuns a serem validados são os testes de identificação, testes quantitativos para teor de impurezas e para controle de impurezas; testes quantitativos da fração ativa em amostras de substância, droga, produto ou outro(s) componente(s) selecionado(s) no medicamento (INMETRO, 2017; SHRIVASTAVA; DESHPANDE; DAHARWAL, 2018).

A exigência de validação de todos os processos utilizados em laboratórios e indústria se dá como requisito no credenciamento para garantia da qualidade e demonstração de competência técnica, sendo as normas regidas por órgãos regulatórios nacionais, como o Instituto Internacional de Metrologia (INMETRO) no caso do Brasil. Em termo de Estados

Unidos existe a Agência de Alimentos e Drogas (FDA, do inglês *Food and Drug Agency*), na Inglaterra o Ministério da Saúde, Trabalho e Bem-Estar (MHLW, do inglês *Ministry of Health, Labour and Welfare*) e a Agência Europeia de Medicina (EMA, do inglês *European Medicine Agency*) para a União Europeia. Todas estas agências participam e são responsáveis por organizar a Conferência Internacional sobre Harmonização (ICH, do inglês *International Conference on Harmonisation*), no intuito de estabelecer padrões para os procedimentos de pesquisa e desenvolvimento de fármacos (ICH, 2005, INMETRO, 2020).

A ISO 17025, publicada pelo INMETRO trata sobre os requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaio e calibração, acrescentando que os métodos a serem validados devem ser métodos não normalizados, que sejam desenvolvidos pelo laboratório e os métodos normalizados que sejam aplicados fora da finalidade pretendida ou com modificados (INMETRO, 2017). Um documento orientativo da ISO 17025, o DOQ-CGCRE-008, dispõe sobre a validação de métodos analíticos apresenta conceitos e metodologias preconizadas pela ANVISA, sugere o planejamento e execução da validação, a partir da seguinte ordem:

- Definir objetivo e escopo do método;
- Definir os parâmetros de desempenho;
- Definir os critérios de aceitação para cada parâmetro de desempenho;
- Verificar se as características de desempenho dos equipamentos estão compatíveis com o exigido pelo método em estudo;
- Qualificar os materiais, por exemplo, padrões e reagentes;
- Planejar os experimentos de validação, incluindo o tratamento estatístico a ser utilizado;
- Realizar os experimentos de validação;
- Realizar a análise crítica dos resultados obtidos, considerando os critérios de aceitação;
- Concluir se o método é adequado ao uso pretendido.

Os parâmetros preconizados para a realização de um estudo de validação de métodos, seguindo as recomendações do DOQ-CGCRE-008 são: seletividade, exatidão, precisão, limite de detecção, limite de quantificação, linearidade e robustez, estando harmonizada à norma supracitada, a Resolução de Diretoria Colegiada RDC nº 166, de 24 de julho de 2017. Portanto, os métodos que não estão descritos em compêndios oficiais devem seguir os critérios que estão estabelecidos nestas resoluções (BRASIL, 2017; INMETRO, 2020).

### 3.2.1 Seletividade

A seletividade é a capacidade que um método deve possuir para ser possível identificar ou quantificar o analito (insumo farmacêutico ativo) mesmo na presença de excipientes ou impurezas, realizando a comparação entre as medidas obtidas com o analito contaminado e sem contaminação, verificando ou não a interferência destes (HARAHAP; VIANNEY; SURYADI, 2021; COELHO *et al.*, 2018).

### 3.2.2 Linearidade

A linearidade pode ser entendida como a capacidade de um método obter respostas analíticas diretamente proporcionais à concentração do analito em uma amostra. Esta figura de mérito é estabelecida pela utilização de, no mínimo, cinco concentrações diferentes do analito para as soluções preparadas em, no mínimo, triplicata, devendo obter uma relação linear (FRANCO *et al.*, 2019; BRASIL, 2017).

A linearidade é determinada por meio de gráficos, no qual expressa a correlação linear entre o sinal medido e a concentração do material estudado, Figura 3. Esses gráficos são denominados de curvas analíticas, em que o eixo vertical refere-se a resposta obtida através da medição e o eixo horizontal a concentração do analito.

A partir da curva analítica obtém uma equação da reta (Equação 1), sendo esta utilizada para o cálculo da concentração do analito em uma amostra. Esta curva apresenta coeficientes linear e angular da equação da reta, sendo possível obter o coeficiente de regressão linear  $r$  que quanto mais próximo de 1,0, menor será a dispersão entre os pontos experimentais. Segundo as normas da INMETRO esse coeficiente deve ser maior que 0,99 (INMETRO, 2020).

A equação da reta que relaciona as duas variáveis é:

$$y = ax + b \text{ (Eq)} \quad \text{(Equação 1)}$$

Em que:

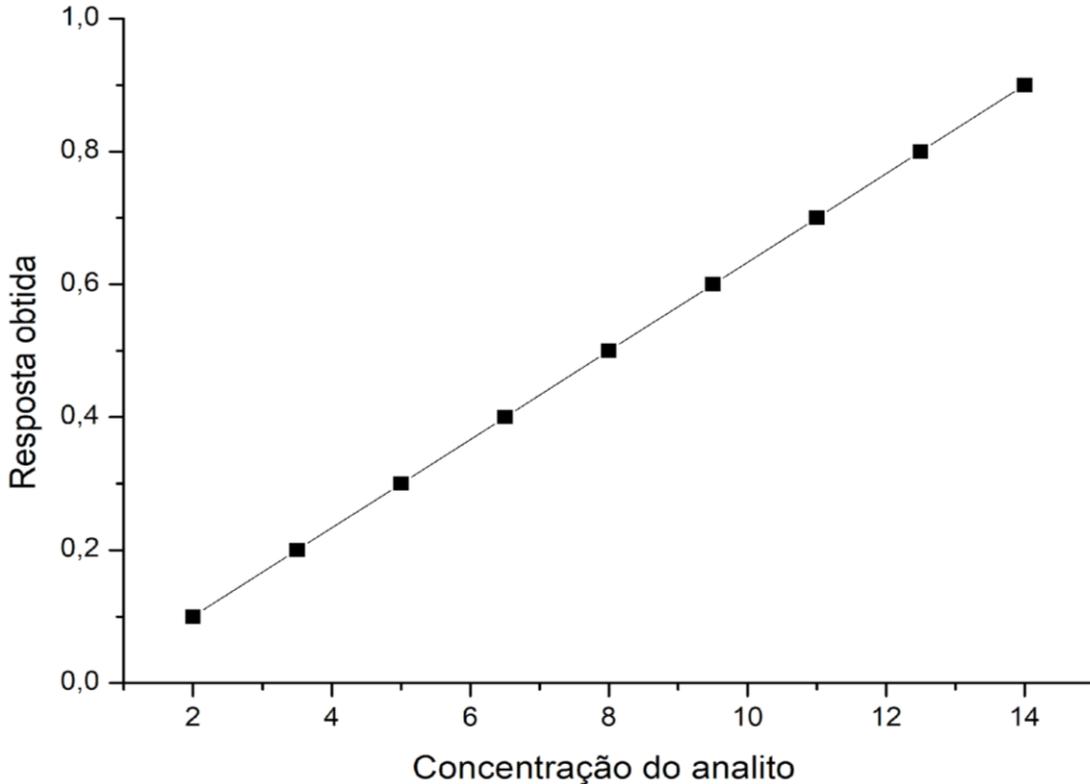
$y$  = resposta medida

$x$  = concentração;

$a$  = inclinação da curva de calibração = sensibilidade;

b = interseção com o eixo y, quando  $x=0$

**Figura 4** - Representação gráfica da linearidade do método



Fonte: Elaborada pela autora, 2023.

### 3.2.3 Exatidão

Para um método analítico, a exatidão é tida como a proximidade do resultado obtido utilizando o método a ser validado com o valor aceito como verdadeiro, representando assim o grau de concordância entre estes. A avaliação necessita de amostras preparadas de maneiras independentes utilizando um procedimento experimental para a mesma amostra em várias repetições. A avaliação da exatidão pode ser realizada através de materiais de referência, comparação de métodos, ensaios de recuperação, adição padrão e ensaios Inter laboratoriais (BALBINOT, 2022).

Nesse contexto, a recuperação é constantemente utilizada para determinação da exatidão em artigos científicos estando relacionada à quantidade de analito que é recuperado no processo em relação à quantidade real presente. Ela pode ser expressa pela relação percentual de recuperação do analito de concentração conhecida adicionado (fortificada), de modo que pode ser obtida através da fortificação de uma solução a partir de cinco níveis de

concentração de modo que os resultados obtidos devem estar bem próximos de 100% com recomendações da legislação de que se situe entre 98 e 102%, sendo expressa através da Equação 2 (KIRAN; PARVATHI; KUMAR, 2020; COELHO *et al.*, 2018).

$$\text{recuperação}(\%) = 100 \times \left( \frac{C1-C2}{C3} \right) \quad (\text{Equação 2})$$

Em que:

C1= concentração determinada na amostra adicionada

C2= concentração determinada na amostra não adicionada

C3= concentração adicionada

### 3.2.4 Precisão

A precisão é considerada uma estimativa da dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, podendo ser considerada em três níveis: repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade. Esta figura de mérito é geralmente expressa como a variância, desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV) de uma série de medições (RÉ FILHO, 2016).

$$\text{CV} = \text{DPR} = \left( \frac{DP}{CMD} \right) \times 100 \quad (\text{Equação 3})$$

Em que:

CV = coeficiente de variação;

DPR = desvio padrão relativo;

DP = desvio padrão;

CMD = concentração média determinada

Na repetitividade (precisão intra-corrída) utiliza-se a mesma instrumentação e o mesmo analista para verificar a concordância dos resultados em um curto período de tempo. Esse procedimento pode ser realizado durante um dia de análise, sendo determinado pela utilização de três níveis de concentração (alto, médio e baixo) com medidas em triplicata (MADEJ *et al.*, 2021).

Na precisão intermediária (precisão inter-corrida) ocorre a obtenção dos resultados no mesmo laboratório, porém em dias e analistas diferentes, sendo normalmente determinada a partir de três níveis de concentração com medidas em triplicatas e em dois dias diferentes de análises da amostra, com dois analistas diferentes (SILVA; COSTA; BASTOS, 2017).

Outro nível importante na precisão é a reprodutibilidade (precisão inter-laboratorial) que neste caso utiliza resultados obtidos em laboratórios diferentes para verificar a concordância entre os resultados obtidos (BRASIL, 2017).

### 3.2.5 Limite de detecção (LD) e Limite de quantificação (LQ)

O Limite de Detecção (LD) é definido como a menor quantidade de analito que pode ser detectado em uma amostra com 95 ou 99% de confiança utilizando o método proposto e pode ser obtido a partir da Equação 4, no qual representa a relação entre o desvio padrão (DP) e a inclinação da curva de calibração ( $b$ ) multiplicado por 3,3 (INMETRO, 2020).

$$LD = \left(\frac{DP}{b}\right) \times 3,3 \quad (\text{Equação 4})$$

O Limite de Quantificação (LQ) é a menor concentração do analito que pode ser determinada quantitativamente com precisão e exatidão adequadas, correspondendo ao padrão de calibração de menor concentração, excluindo o branco. O LQ pode ser estabelecido por uma série de ensaios com um branco; a partir da estatística da regressão por mínimos quadrados, quando o método utiliza uma calibração linear e a partir da razão sinal/ruído (SILVA, 2021).

O LQ pode ser representado pela Equação 5, no qual representa a relação entre o desvio padrão (DP) e a inclinação da curva de calibração ( $b$ ) e multiplicado por 10,0.

$$LQ = \left(\frac{DP}{b}\right) \times 10,0 \quad (\text{Equação 5})$$

Em que:

LQ = Limite de quantificação

LD = Limite de detecção

DP = Desvio Padrão

$b$  = Inclinação da curva de calibração

### 3.2.6 Robustez

A robustez é responsável por medir a sensibilidade que um método apresenta em relação a pequenas variações que possam alterar os resultados analíticos. Quando um método não é afetado por pequenas modificações em seus parâmetros será considerado robusto. Estudos de robustez aplicam-se a todas as condições experimentais que possam, na prática, estar sujeitas a variações como, por exemplo, a estabilidade dos reagentes, composição da amostra, pH, temperatura, entre outras (Tabela 1), Essa figura de mérito é considerada um procedimento opcional e que normalmente é realizado na etapa de otimização de alguns parâmetros (PEREIRA, 2016).

**Tabela 1** - Condições para a avaliação da robustez do método

Em relação ao preparo das Amostras	Estabilidade das soluções analíticas Tempo de extração Compatibilidade de filtros
Na utilização da Espectrofotometria	Variação do pH da solução em diferentes lotes Variação de fabricantes dos solventes utilizados no preparo das soluções
Utilização de outras técnicas analíticas	As variações a serem testadas deverão ser avaliadas criticamente e seus resultados deverão ser apresentados

Fonte: Adaptado BRASIL, 2017.

Para a determinação da robustez do método é utilizado, muitas vezes, um planejamento experimental, devido à capacidade de estudar o efeito individual e de interação entre um grande número de fatores em um número mínimo de experimentos. O planejamento fatorial é um exemplo de planejamento experimental, sendo geralmente empregado no estudo de interação entre duas ou mais variáveis que podemos chamar de fatores em função de uma variável resposta que é objeto do estudo (ROUSSEL; RIGHEZZA, 2021; AMOSA *et al.*, 2021).

É importante destacar que a validação analítica é necessária no processo de obtenção de patentes para novos produtos e que ainda não apresenta método analítico validado e por ter

um grande potencial de ser incorporado em formulações farmacêuticas (SILVA-BUZANELLO *et al.*, 2015).

Dessa forma, para que ocorra o desenvolvimento e conseqüentemente a validação é necessário que haja um método que possa ser empregado para a quantificação da molécula. A espectrofotometria de absorção molecular na região do ultravioleta-visível se apresenta como uma das técnicas mais utilizadas em análises farmacêuticas, sendo útil e simples para a determinação da concentração de moléculas em uma solução e uma boa opção para utilizar neste estudo (MOHAMMED, 2018).

### **3.3 Espectrofotometria de absorção molecular no UV-Visível (EAM UV-Vis)**

Pode-se encontrar na literatura a utilização de diversas técnicas para a validação de metodologias analíticas, destacando-se CLAE quando associada a um tipo de detector, sendo largamente empregada por possuir vantagens como permitir várias formas de detecção, podendo aumentar a especificidade e o conteúdo de informações por ensaio. Entretanto, a CLAE possui alguns inconvenientes, tais como, custo da análise, especialização do técnico, equipamentos caros e com manutenção de alto custo. Para contornar estes inconvenientes podem ser utilizados métodos espectrométricos como os de EAM UV-Vis que é considerada uma técnica com análises rápidas e de custo baixo (AL-HAKKANI *et al.*, 2021; DHALAPE; KHADANGALE; PINJARI, 2020; DOPPA; KONIDALA; KHANABHI, 2019).

A EAM UV-Vis é uma das técnicas analíticas que tem como princípio básico a absorção da radiação por parte de um analito ou de um conjunto de espécies químicas e é obtido a partir da emissão de fótons por parte de uma lâmpada que atinge a amostra e é detectada, em seguida, por um componente fotossensível. A região de absorção na região do ultravioleta vai de 200 a 400 nm e no visível de 400 a 800 nm e está associada a transições eletrônicas em átomos, íons ou moléculas. Esta técnica depende tanto da concentração do analito quanto de sua estrutura química e do volume da porta-amostra e é utilizada desde a identificação até a quantificação (ATOLE; RAJPUT, 2018).

Quando a radiação eletromagnética passa através de um material transparente, uma parte dessa radiação pode ser absorvida e a outra parte transmitida. Nas Equações 6 e 7 pode-se observar as relações de transmitância, que representa a fração da radiação incidente pela radiação transmitida, e a absorbância está relacionada com o logaritmo da transmitância. (HOLLER; SKOOG, 2009).

$$T = \frac{I}{I_0} \quad (\text{Equação 6})$$

$$A = -\log T \quad (\text{Equação 7})$$

Em que:

$T$  = transmitância

$I$  = intensidade da radiação transmitida

$I_0$  = intensidade da radiação incidente

$A$  = absorbância

A espectrofotometria é fundamentada na lei de Lambert-Beer apresentada na Equação 8, na qual consiste na relação direta entre a concentração do analito e a quantidade de luz absorvida. Esta lei estabelece que quando a luz atravessa um meio contendo um analito que absorve, observa-se que a intensidade do feixe de luz ocorre de acordo com a excitação do analito. Assim, quanto maior a concentração do analito, maior será sua absorção de radiação, dentro de dados limites estabelecidos pela validação do método em termos de um modelo de regressão (HOLLER; SKOOG, 2009).

$$A = \epsilon b c \quad (\text{Equação 8})$$

Em que:

$A$  = absorbância

$\epsilon$  = absorvidade molar

$b$  = caminho ótico

$c$  = concentração ( $\text{mol L}^{-1}$ ).

### 3.4 Validação de métodos analíticos por EAM UV-Vis

Trabalhos podem ser obtidos na literatura com a utilização da espectrofotometria no UV-vis para o desenvolvimento e validação de métodos analíticos. Com isso, podemos observar a importância e a utilização da EAM UV-Vis para diferentes tipos de moléculas, nos quais em seu desenvolvimento do método, determinam o comprimento de onda a ser

utilizado, o solvente e a faixa de leitura espectroscópica, proporcionando a validação do método.

Um novo método para determinação da ranolazina em forma farmacêutica foi desenvolvido por Doppa e colaboradores (2019), em que utilizaram como solvente o ácido ortofosfórico a 0,2% v/v, sendo absorvância medida em 217 nm e faixa de trabalho de 20 a 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , obtendo coeficiente de correlação 0,999%. O limite de detecção e quantificação foi de 0,807 e 2,4460  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente. O desvio padrão relativo do método foi de 0,5090% para a precisão e a recuperação do medicamento foi de 97,25 a 97,75%, determinando assim que o método é preciso e exato.

Dois métodos para a determinação simultânea de Quinfamida e Mebendazol a granel e em mistura laboratorial usando HCl metanólico 0,01 mol L<sup>-1</sup> como solvente foram apresentados. As medidas de absorvância da Quinfamida e Mebendazol ocorreram nos comprimentos de onda de 260,00 e de 232,40 nm, respectivamente. As faixas de concentração foram de 1 a 6  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para Quinfamida e 2 a 12  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para Mebendazol. Os testes de recuperação de Quinfamida e Mebendazol variaram de 98,48 a 99,08 % e de 98,83 a 99,62 % (Método I); de 98,14 a 98,93% e de 99,16 a 99,35% (Método II) para Quinfamida e Mebendazol, respectivamente. A precisão foi determinada como repetibilidade e desvio inter-dia e intra-dia em que os desvios padrões foram menores que 2% para ambas as drogas (DHANDAR *et al.*, 2018).

Um método para determinação de curcumina em sua forma pura e formulações farmacêuticas foi validado com leituras realizadas em 429 nm e tendo um sistema solvente contendo tampão fosfato pH 7,4 e etanol em mistura (1:1). O método apresentou resposta linear para a faixa de concentração de 2 a 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e coeficiente de correlação de 0,998. O método foi tido como exato, visto que a recuperação foi encontrada dentro da faixa de 98-101 %. O limite de detecção e limite de quantificação foram de 0,861 e 2.872  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente (MAJUMDER *et al.*, 2020).

Um novo método espectrofotométrico para a determinação de gabapentina usando ácido cromotrópico foi proposto por Adegbolagun e colaboradores (2018) obtendo resultados satisfatórios, cuja linearidade na concentração na faixa de 1-6  $\mu\text{g mL}^{-1}$  com medidas em 470 nm. O método foi preciso com intervalo de recuperação de 97,6-103,1%; as precisões intra-dia e inter-dia foram inferiores a 0,65% de desvio padrão e não mostraram diferença estatística quando comparado com o método de referência na análise das formas farmacêuticas.

Um método simples para a determinação de vildagliptina em sua forma pura e formulações farmacêuticas utilizando HCl 0,1 mol L<sup>-1</sup> como solvente foi desenvolvido e validado, as medidas de absorvância foram realizadas em 210 nm. A resposta linear para o intervalo de concentração de 5–60 µg mL<sup>-1</sup> de vildagliptina foi registrada com coeficiente de regressão de 0,999. A precisão foi encontrada entre 98-101% de recuperação e o desvio padrão da precisão intra-dia e inter-dia foi de 1,26 e 1,16% respectivamente, que estão dentro dos limites. O limite de detecção e o limite de quantificação, foram de 0,951 e 2,513 µg mL<sup>-1</sup>, respectivamente (KUMARI; KHANSILI, 2020).

A validação de um método espectrofotométrico simples, preciso, exato, rápido e de baixo custo para a quantificação de ácido acetilsalicílico em formulações farmacêuticas foi proposto por Goes e colaboradores (2019). Os autores determinaram as figuras de mérito proposta pela RDC 166, de 24 de julho de 2017 e obtiveram resultados satisfatórios. O método foi considerado linear na faixa de 24 a 36 µg mL<sup>-1</sup>, apresentando bom coeficiente de correlação ( $r = 0,9994$ ) e limites adequados de quantificação (6,57 µg mL<sup>-1</sup>) e detecção (1,99 µg mL<sup>-1</sup>). A análise de precisão mostrou baixo coeficiente de variação (< 2,0%) e um bom percentual médio de recuperação (99,42% - referência e 95,94% - genérico), determinando a exatidão do método.

Vidhi e Patel (2021) desenvolveram e validaram um método para a estimativa do etabonato de Remogliflozina, no qual mostra absorvância máxima a 229 nm, utilizando metanol como solvente. A faixa linear foi de 2 a 10 µg mL<sup>-1</sup> e coeficiente de correlação de 0,9990. O resultado da precisão inter-dia e intra-dia mostra desvio padrão variando de 0,050 - 0,254% e 0,058 - 0,258% para três concentrações em três repetições. A recuperação percentual foi encontrada na faixa de 98,94% - 99,86%. O LD e o LQ foram de 0,037 e 0,113 µg mL<sup>-1</sup>, respectivamente.

Na Tabela 2 estão descritos os trabalhos citados anteriormente, com os respectivos analitos, solventes, comprimento de onda, faixa de trabalho empregados utilizando a EAM UV-Vis para a validação do método.

**Tabela 2-** Validação de método analítica por EAM UV-Vis

<b>Analito</b>	<b>Solvente</b>	<b>Comprimento de onda</b>	<b>Faixa de trabalho</b>	<b>Referências</b>
Gabapentina	ácido cromotrópico	470 nm	1-6 $\mu\text{g mL}^{-1}$	Adegbolagun <i>et al.</i> , 2018
Quinfamida e Mebendazol a granel	HCl metanólico 0,01 mol L <sup>-1</sup>	260,00 e de 232,40 nm	1 a 6 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para Quinfamida e 2 a 12 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para Mebendazol	DHANDAR <i>et al.</i> , 2018
Ranolazina em forma farmacêutica	ácido ortofosfórico a 0,2%	217 nm	20 a 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$	Doppa <i>et al.</i> , 2019
ácido acetilsalicílico em formulações farmacêuticas	NaOH 0,100 mol L <sup>-1</sup>	297 nm.	24 a 36 $\mu\text{g mL}^{-1}$	Goes <i>et al.</i> , 2019
Curcumina em sua forma pura e formulações farmacêuticas	tampão fosfato pH 7,4 e etanol em mistura (1:1)	429 nm	2 a 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$	MAJUMDER <i>et al.</i> , 2020
Vildagliptina em sua forma pura e formulações farmacêuticas	HCl 0,1 mol L <sup>-1</sup>	210 nm	5–60 $\mu\text{g mL}^{-1}$	KUMARI; KHANSILI, 2020
Etabonato de Remogliflozina	Mentanol	229 nm	2 a 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$	VIDHI; PATEL, 2021

Fonte: Elaborada pela autora, 2023.

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Reagentes e Solventes**

O composto JR-19 foi sintetizado e cedido pelo Laboratório de Síntese e Vetorização de Moléculas (LSVM), da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB) coordenado pelo Prof. Dr. Ricardo Olímpio de Moura. O solvente utilizado para os procedimentos e análises foi o dimetilsulfóxido (DMSO) PA (Neon® e Vetec®); metanol PA (Neon®); álcool etílico PA (Neon®) e acetato de etila (Vetec®)

### **4.2 Equipamentos e materiais**

Espectrofotômetro Shimadzu UV-1280, com detector UV-VIS; espectrofotômetro UV-VIS-NIR da PerkinElmer, lambda 750 e cubeta de quartzo com caminho óptico de 10 mm.

### **4.3 Escolha do solvente**

Para a escolha do solvente, realizou testes de solubilidade com a molécula JR-19 a partir de misturas rápidas e simples entre o solvente e a molécula em um béquer. Também foi observada a influência sobre o sinal do espectro, adicionando a mistura á cubeta e realizada varredura de 190 a 800 nm no Espectrofotômetro Shimadzu UV-1280. Para ambos foram testando os seguintes solventes: metanol, álcool etílico, dimetilsulfóxido (DMSO) e acetato de etila.

### **4.4 Caracterização espectroscópica**

Com o objetivo de se obter o espectro de ultravioleta da molécula JR-19 e o comprimento de onda de máxima absorção, foi realizada uma varredura entre a faixa de 190 a 800 nm no Espectrofotômetro Shimadzu UV-1280. Realizando a varredura para diferentes concentrações da molécula com o solvente determinado.

#### 4.5 Preparo da solução estoque

A solução estoque de  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$  foi preparada solubilizando-se 5 mg da molécula JR-19 em uma pequena quantidade de DMSO (10 mL) e a mistura foi transferida para balão volumétrico de 100 mL, completando volume com DMSO.

#### 4.6 Estudo de Estabilidade de 8 horas e em 14 dias

A Estabilidade em 8 horas da solução de DMSO com a JR-19 foi realizado no espectrofotômetro UV-VIS-NIR da PerkinElmer,  $\lambda$  750, no comprimento de onda de mais alto sinal do espectro determinado no item 4.4, com medidas realizadas a cada 30 segundos ao longo de 8 horas.

A estabilidade de 14 dias foi avaliada sob quatro diferentes condições de estocagem (Tabela 2), a temperatura ambiente refere-se a temperatura entre 23-25°C. A solução preparada foi adicionada em 4 frascos de vidro transparente com batoque de vidro, sendo dois frascos protegidos da luz com a utilização de papel alumínio. Para todas as condições, as leituras das soluções eram realizadas todos os dias, no mesmo horário e no mesmo equipamento (espectrofotômetro Shimadzu UV-1280), durante um período de 14 dias, utilizando a faixa de máxima absorção determinada no item 4.4.

As soluções que permaneceram na geladeira eram retiradas da geladeira e resfriadas, deixando 30 minutos em temperatura ambiente, sendo, prosseguida com a leitura, posteriormente.

**Tabela 3** - Condições de estocagem da solução no período de 14 dias

	<b>Temperatura</b>	<b>Proteção da luz</b>
<b>Condição 1</b>	23-25°C	Sim
<b>Condição 2</b>	23-25°C	Não
<b>Condição 3</b>	2-8°C	Sim
<b>Condição 4</b>	2-8°C	Não

Fonte: Elaborada pela autora, 2023.

## 4.7 Validação do método analítico por EAM UV-Vis

O método foi validado conforme preconizado pela Resolução de Diretoria Colegiada RDC nº 166, de 24 de julho de 2017 e sobe orientações da ISO 17025, o DOQ-CGCRE-008, sendo os parâmetros de qualidade do método desenvolvido: linearidade e faixa de trabalho, limites de quantificação (LQ) e detecção (LD), exatidão, precisão e robustez. As análises foram realizadas para três lotes da molécula.

### 4.7.1 Linearidade

A linearidade foi determinada através da construção da curva de calibração na faixa de trabalho determinada a partir da caracterização espectroscópica. Sendo, preparadas para cada lote as soluções de trabalho a partir da solução estoque em 11 níveis de concentração, para tal, transferiram-se diferentes alíquotas da solução estoque para 11 balões volumétricos de 10 mL, completando o volume do balão com DMSO. Os cálculos para as determinação das alíquotas a ser adicionada em cada balão foi realizado através da fórmula de diluição ( $C1 \times V1 = C2 \times V2$ ), em que: C1 e C2 = Concentração inicial e final, respectivamente; V1 e V2 = Volume inicial e final, respectivamente.

Após o preparo, as soluções foram analisadas em triplicata, com medidas randômicas, no comprimento de onda de máxima absorção. Os resultados foram digitados em planilha e, na sequência, foi elaborada uma curva analítica com os valores médios e estimada por regressão linear. Dez medidas de branco foram utilizadas para avaliar o limite de detecção e de quantificação. Logo, utilizou-se o método dos mínimos quadrados para obtenção da equação da reta e coeficiente de correlação. A análise de variância (ANOVA) foi aplicada para observar se a equação da reta explica satisfatoriamente a relação entre concentração e sinal.

### 4.7.2 Seletividade

Para avaliação da seletividade do método, foram obtidos por varredura espectral, nos comprimentos de ondas determinados na caracterização espectroscópica, utilizando espectros no UV do derivado JR-19 e do DMSO, a fim da realização da comparação dos espectros. Para tal, preparou-se uma solução da JR-19 com DMSO e uma solução de DMSO com água destilada na proporção 1:1, para ambos foi realizado varredura espectral na faixa de 190 a 400

nm :do UV-visível (UV-VIS). Sendo considerado seletivo quando, numa mesma condição analítica, não ocorrer a sobreposição dos picos referentes a JR-19 e DMSO na faixa de absorção máxima.

#### 4.7.3 *Limites de quantificação (LQ) e detecção (LD)*

Os limites de quantificação (LQ) e de detecção (LD) foram calculados a partir da curva de calibração obtida no item anterior e do desvio padrão (DP) de medidas repetidas de sinais do branco, conforme Equação 9.

$$DP = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - M)^2}{n-1} \quad (\text{Equação 9})$$

Em que:

$\Sigma$ = Indica o somatório de todos os termos, desde a primeira posição (i=1) até a posição n

$x_i$ = valor na posição **i** no conjunto de dados

M= média aritmética dos dados

n= quantidade de dados.

#### 4.7.4 *Precisão*

A precisão foi avaliada a partir da precisão intermediária. Realizou-se um estudo de comparação entre as leituras de uma mesma concentração, realizados por analistas, turnos e dias diferentes, no mesmo laboratório e equipamento. As concentrações foram preparadas em três níveis (baixos, médio e alto) dentro da faixa de concentração de trabalho obtida, procederam-se às leituras das soluções em espectrofotômetro no comprimento de onda de máxima absorção definido na varredura espectral, registrando-se os valores das absorbâncias e efetuando-se o cálculo da estimativa do desvio padrão relativo das determinações.

#### 4.7.5 *Exatidão*

A exatidão do método foi determinada por estudos de recuperação, através da adição de quantidades conhecidas de solução de diferentes concentrações adicionadas na solução de menor concentração da faixa linear de trabalho, que foi determinada na linearidade. Então, as soluções fortificadas foram preparadas, em quatro concentrações intermediárias da faixa de

trabalho, realizando as leituras para obter as concentrações experimentais a partir da equação da reta que foi obtida na construção da curva de calibração.

#### 4.7.6 Robustez

A robustez do método proposto foi determinada pelas mudanças de marca do solvente e de comprimento de onda. As medidas de absorvância foram determinadas, para as duas variáveis em estudo, a partir de três concentrações (níveis baixo, médio e alto). Em termos da escolha dos comprimentos de onda foram avaliadas variações de  $\pm 3$  nm do comprimento de onda escolhido a partir do método desenvolvido. Assim sendo, foi aplicado planejamento experimental fatorial  $3^2$  para o estudo de robustez de cada uma das marcas de solvente utilizando, conforme indicado na Tabela 3.

O tratamento estatístico foi elaborado utilizando o software STATISTICA® versão 12, obtendo os efeitos padronizados (diagramas de Pareto) e as análises estatísticas (superfície de resposta) para avaliação dos resultados, além do teste t pareado para avaliar a diferença entre as duas marcas de solvente nos três comprimentos de onda em três níveis de concentração distintas.

Tabela 4- Matriz de planejamento  $3^2$

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

Fonte: Elaborada pela autora, 2023.

#### 4.8 Análises estatísticas

A análise estatística dos dados foi realizada através de análise de variância ANOVA, onde os resultados são considerados significativos quando a probabilidade é inferior a 5% ( $p < 0,05$ , intervalo de confiança de 95%), teste t pareado  $\alpha = 0,05$ .

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 N'-(1H-indol-3yl) metileno)-2-cianoacetohidrazida (JR-19)

Na Figura 5 podemos observar a imagem dos três lotes referente ao derivado N'-(1H-indol-3yl)metileno)-2-cianoacetohidrazida (JR-19) que foi cedido e sintetizado pelo Laboratório de Síntese e Vetorização de Moléculas (LSVM), da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB). Sendo observado como um pó cristalino amarelo, tendo uma diferença de cor no terceiro lote (tonalidade mais branca) e isso se deve a alguma mudança de concentração e tempo reacional no processo de síntese, não interferindo nos resultados do desenvolvimento e validação do método.

**Figura 5** – Imagem referente aos três lotes obtidos da molécula JR-19



Fonte: Dados da Pesquisa

### 5.2 Escolha do solvente, caracterização espectroscópica e estudo de estabilidade

#### 5.2.1 Escolha do solvente

O primeiro passo para o desenvolvimento do método foi a escolha do solvente a ser utilizado, para tal levou-se em consideração o poder de solubilização do fármaco, custo e toxicidade do solvente e a sensibilidade do fármaco frente ao comprimento de onda, testando os seguintes solventes: metanol, álcool etílico, dimetilsulfóxido (DMSO) e acetato de etila.

Todos solventes testados apresentaram solubilidade com a molécula, sendo escolhido o DMSO como melhor opção, pois apresenta baixa toxicidade e não evapora, quando comparado com o metanol e álcool etílico, além de apresentar melhor resposta de sinal no UV-VIS com a JR-19.

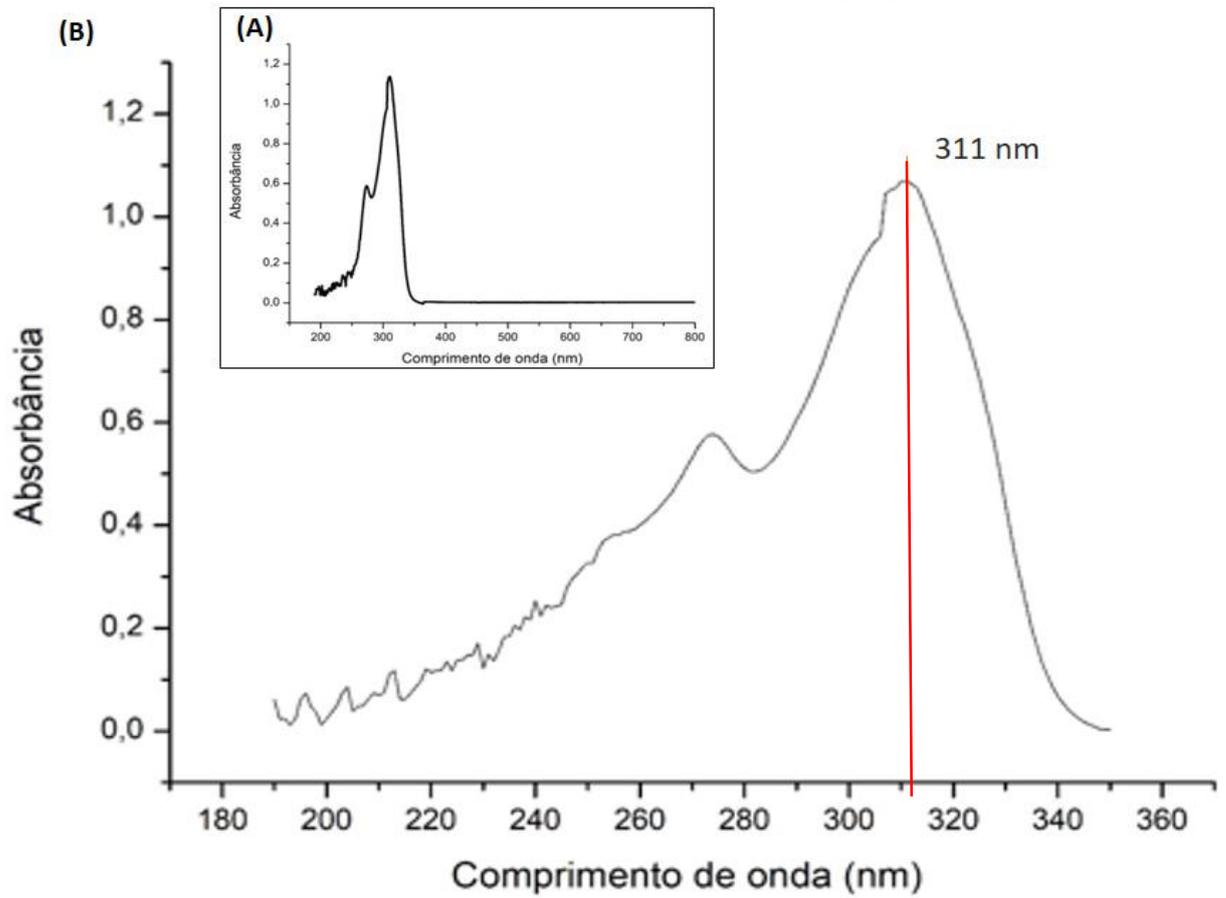
O DMSO é um solvente altamente polar e considerado aprótico, sendo incapaz de atuar como doador de prótons em interações de pontes de hidrogênio. Possui em sua estrutura uma porção altamente polar (o dipolo sulfóxido, S=O) e dois grupos metílicos que são apolares, sendo bom solvente para moléculas polares e não polares, conferida a capacidade de interagir com uma variedade de compostos (AVILA, 2018).

### **5.1.2 Caracterização espectroscópica**

Determinado o solvente, foram realizadas medidas no EAM UV-vis a partir da solução estoque e sucessivas diluições, obtendo diferentes concentrações, até a obtenção do espectro. Por fim, a solução na concentração de  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$  foi selecionada para a realização da varredura no intervalo 190-800 nm (Figura 6a), verificando a presença de bandas no espectro de absorção entre 190 e 350 nm. Consequentemente, ao diminuir a região do espectro para 190 a 350 nm foi possível observar os picos de absorção (Figura 6b), em que a máxima absorbância foi em comprimento de onda ( $\lambda$ ) de 311 nm, sendo, portanto a região escolhida para as análises quantitativas.

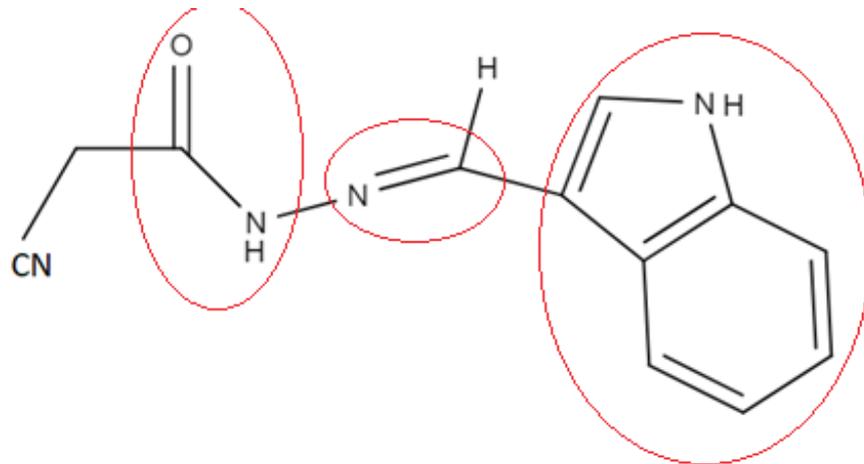
É importante entender que a JR-19 é uma molécula orgânica, sendo a determinação do comprimento de onda dependente do quanto os elétrons da molécula estão ligados entre si. Esta molécula apresenta ligações insaturadas, como exemplo a imina (C=N); o grupo carbonila (HN-C=O) e o aromático, em que não estão fortemente ligados entre si, fazendo com que sejam mais fáceis de serem excitados pela radiação e com isso serem absorvidos (OLIVEIRA, 2021). Portanto, estes grupos orgânicos insaturados que absorvem na região do UV-Vis são chamados de cromóforos e estão circulos na Figura 7, sendo a presença desses cromóforos responsáveis por promover um deslocamento das absorções máximas para comprimentos de onda maiores.

**Figura 6** - Varredura espectral de absorção no UV- Vis (a) e do UV (b) da solução de JR-19



Fonte: Dados da Pesquisa

**Figura 7**- Molécula JR-19 com grupos cromóforos circulos



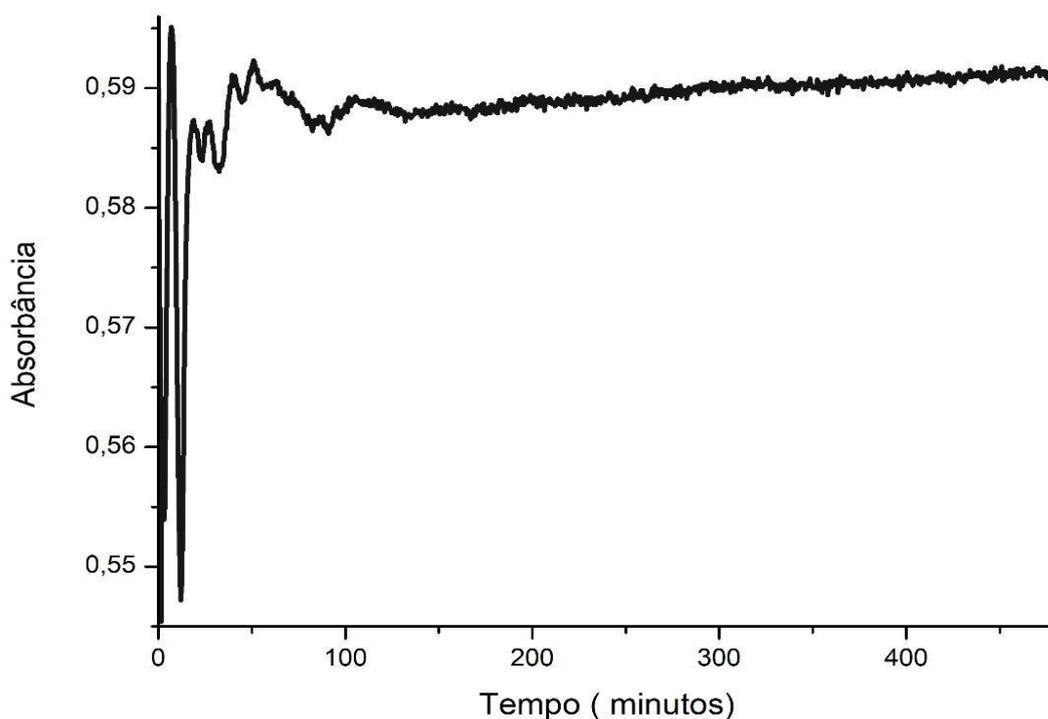
Fonte: Elaborada pela autora, 2023.

### 5.1.3 Estabilidade da solução em 8 horas e 14 dias

O estudo de estabilidade para a solução de DMSO com a JR-19 foi realizado com o intuito de observar o tempo de estabilidade bem como as condições de armazenamento para estocagem da solução.

Ao verificar o comportamento dos espectros ao longo de 8 horas (Figura 8), observou-se que nos primeiros 60 minutos a solução apresentou instabilidade nos valores referente as absorvâncias e após os 60 minutos esses valores permaneceram com medidas estáveis com relação as determinações, observando assim uma estabilidade da solução após uma hora de preparada, podendo ser utilizada após esse período com garantia da estabilidade da determinação.

**Figura 8** - Estabilidade da molécula JR-19 com DMSO em 8 horas



Fonte: Dados da pesquisa.

Na Figura 9 observamos as soluções nas embalagens para o estudo de estabilidade de 14 dias. Enquanto que os resultados referentes à estabilidade da solução em 14 dias estão na Figura 10, em que se observou que as soluções armazenadas na geladeira não mantiveram a estabilidade, independentemente de proteção ou não da luz. Já as soluções que ficaram em temperatura ambiente mantiveram a estabilidade, podendo ficar com ou sem

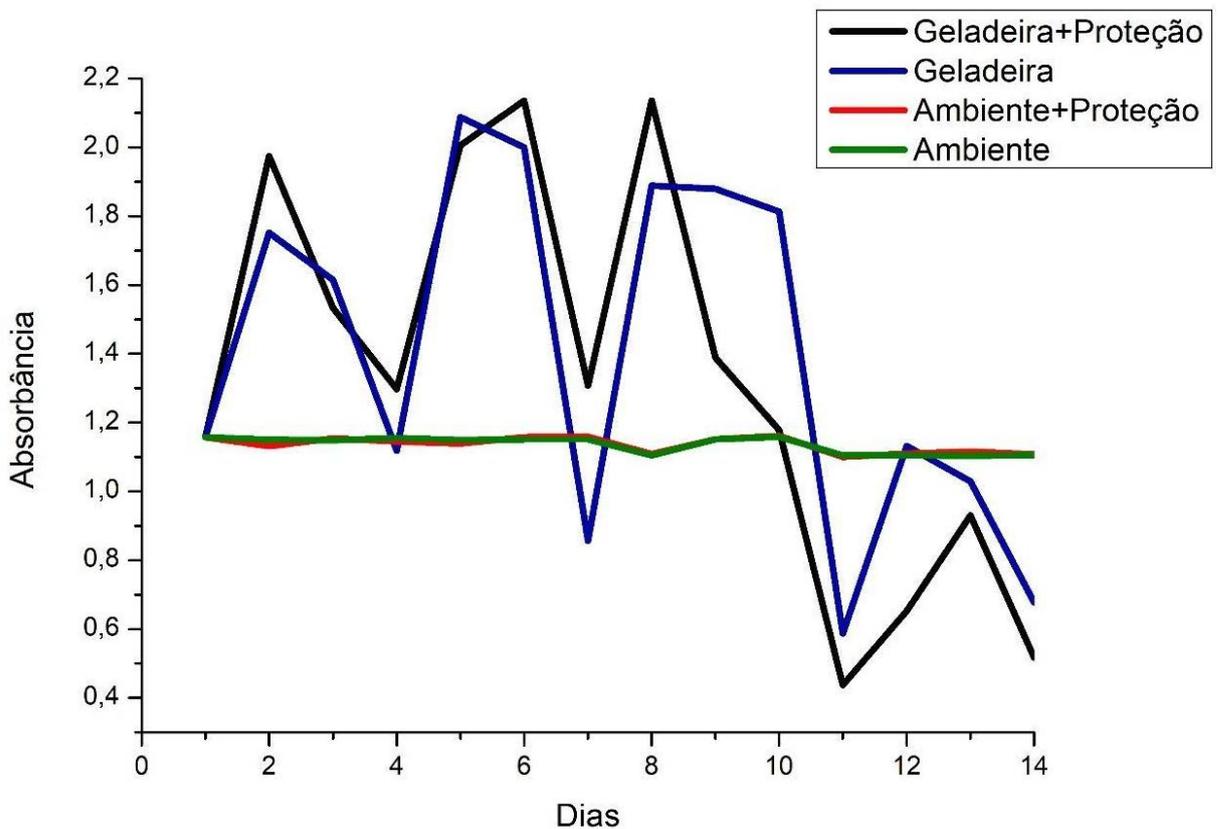
proteção da luz para ser utilizadas por um período de 14 dias após o preparo, permanecendo com valores de absorbâncias estabilizados.

**Figura 9** – Soluções preparadas nas embalagens para o estudo de estabilidade de 14 dias



Fonte: Dados da pesquisa.

**Figura 10** - Estabilidade da molécula JR-19 com DMSO em 14 dias



Fonte: Dados da pesquisa.

A determinação da solução para permanecer 60 minutos de repouso após o preparo se deve, provavelmente ao rearranjo das moléculas do DMSO e da JR-19. Nesse sentido, pode-se entender que ocorre uma espécie de acomodação das moléculas no período de uma hora, permitindo a máxima estabilidade da solução, proporcionando a quantificação adequada da molécula após esse período.

Como relatado, o estudo constatou que a solução na geladeira perdeu a estabilidade, diferentemente das armazenadas em temperatura ambiente. Não foram encontrados dados que elucidasse o motivo dessa instabilidade, porém pode estar relacionado a características do DMSO. O DMSO congela ao ser armazenado em 18°C, provavelmente levando a um desequilíbrio das partículas e conseqüentemente da solução. Vale lembrar que as medidas das soluções da geladeira foram realizadas após descongelamento e ficarem em temperatura ambiente.

### **5.3 Validação do método analítico por EAM UV-Vis**

#### **5.3.1 Linearidade**

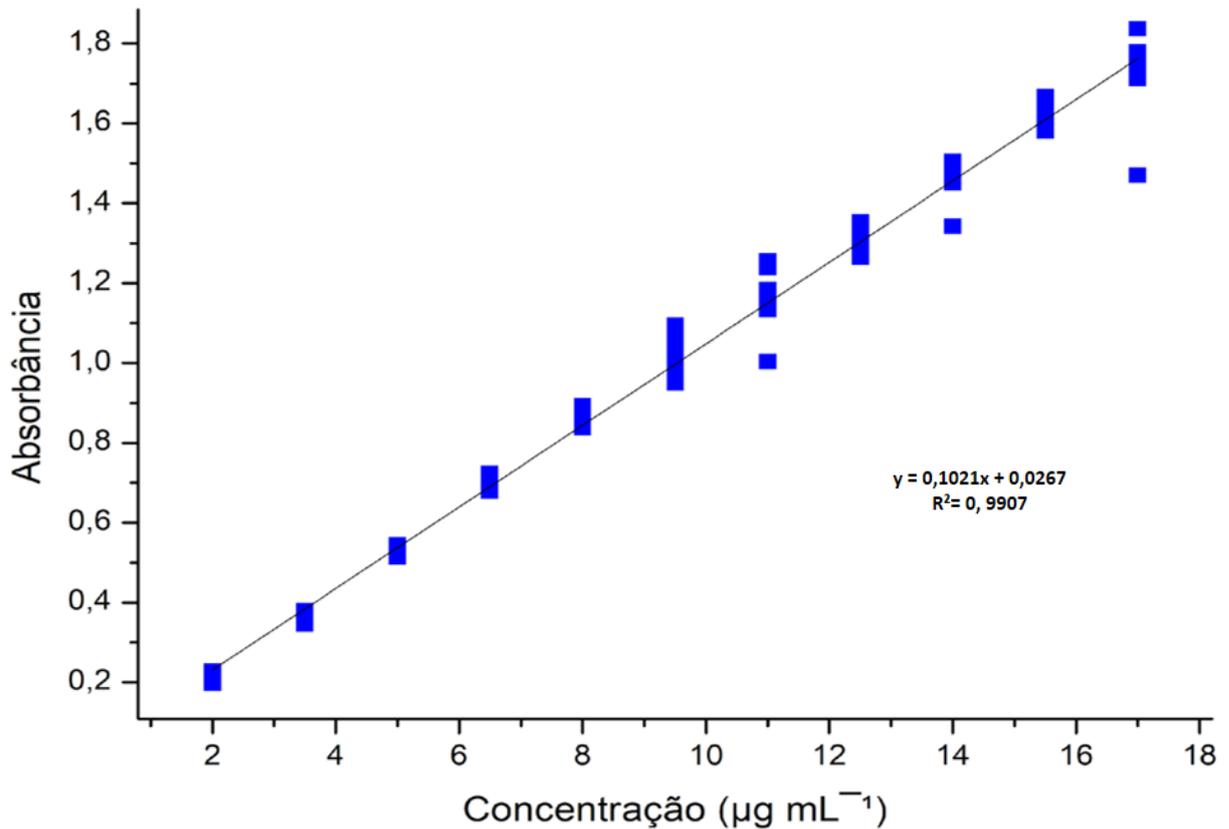
O método exposto apresentou linearidade na faixa de 2,0 – 17  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , com determinação realizada a partir da curva de calibração dos três lotes da molécula, com medidas em triplicata para cada lote. A equação obtida foi  $y = 0,1021x + 0,0267$ , com coeficiente de correlação linear 0,9907, obtendo-se resultados significativos para a regressão linear. A curva de calibração obtida pode ser observada na Figura 11.

Como observado, a curva de calibração foi obtida a partir de 11 níveis de concentração, bem superior ao preconizados pelo DOQ-CGCRE-008 que é de no mínimo 5 níveis de concentração com 3 replicatas por nível. Alguns estudos como de Dhandar e colaboradores (2018), utilizaram 6 níveis, Majumder e colaboradores (2020), utilizaram apenas 5 níveis, Adegbolagun e colaboradores (2018), 6 níveis e 7 níveis no estudo de Goes e colaboradores (2019), considerando, portanto, que este método apresenta uma larga faixa linear de trabalho, com isso obtém um melhor desempenho do método, possibilitando a diminuição de erros.

A linearidade do método foi confirmada por meio da análise de variância como observado na Tabela 5, Visto que o valor de F calculado (10468,7341) foi maior do que o tabelado (3,936), demonstrando que a curva ajustada possui significância estatística, atestando que o método é linear em nível de confiança de 95%. Corroborando a esses dados, o teste de

falta de ajuste observou que o F calculado (2,0649) foi menor do que o tabelado (5,117), evidenciando que o modelo linear é adequado, não havendo falta de ajuste.

**Figura 11** - Curva analítica da JR-19 com DMSO no intervalo de 2 a 17  $\mu\text{g mL}^{-1}$



Fonte: Dados da pesquisa.

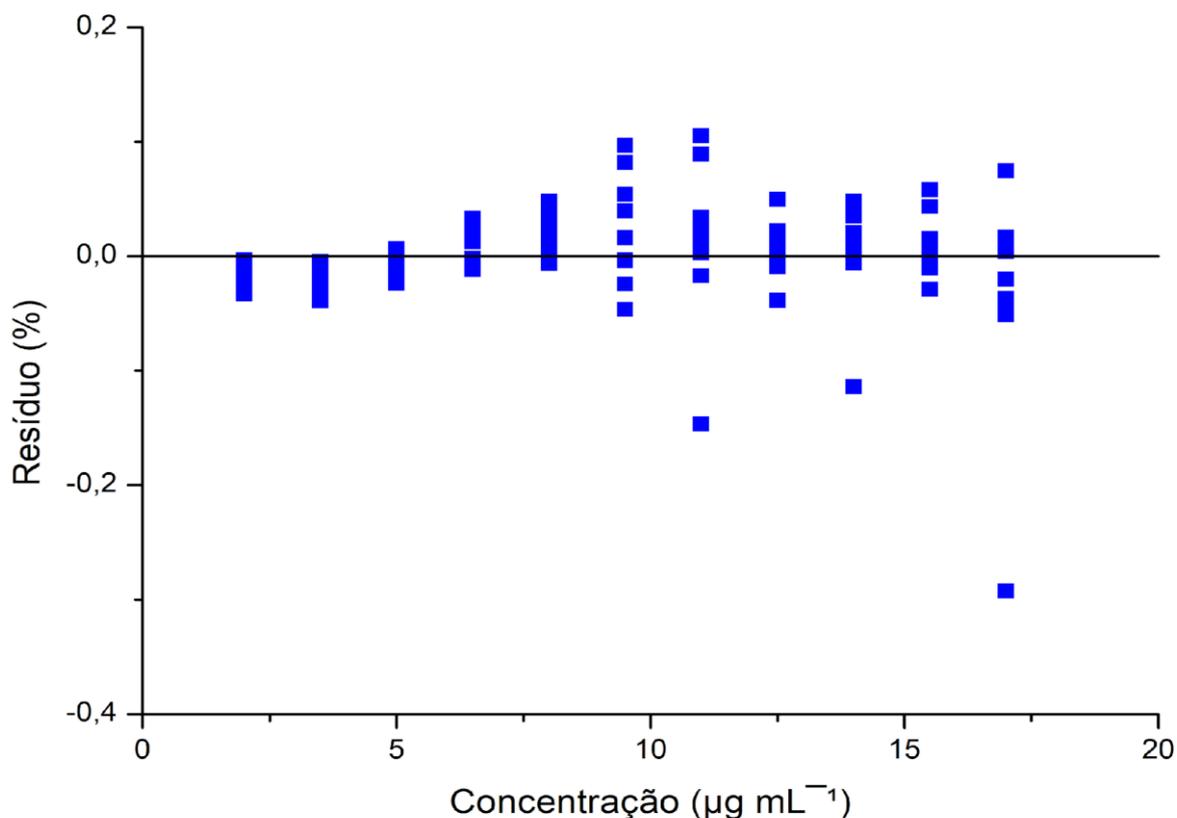
**Tabela 5** - Teste de análise de variância (ANOVA)

	Graus de liberdade	Soma quadrática	Média quadrática	F	F tabelado
Regressão	1	23,4691	23,4691	10468,7341	3,936
Resíduo	97	0,2175	0,0022		
Falta de ajuste	9	0,0379	0,0042	2,0649	5,117
Erro puro	88	0,1795	0,0020		
Total	98	23,6865			

Fonte: Dados da pesquisa.

O gráfico de resíduos no qual expõe a adequabilidade do modelo, sendo uma estimativa de erro, está apresentado na Figura 12, no qual os resultados estão normalmente distribuídos, em torno do zero, com variância constante.

**Figura 12-** Gráfico de resíduos de JR-19 com DMSO no intervalo de 2 a 17  $\mu\text{g mL}^{-1}$



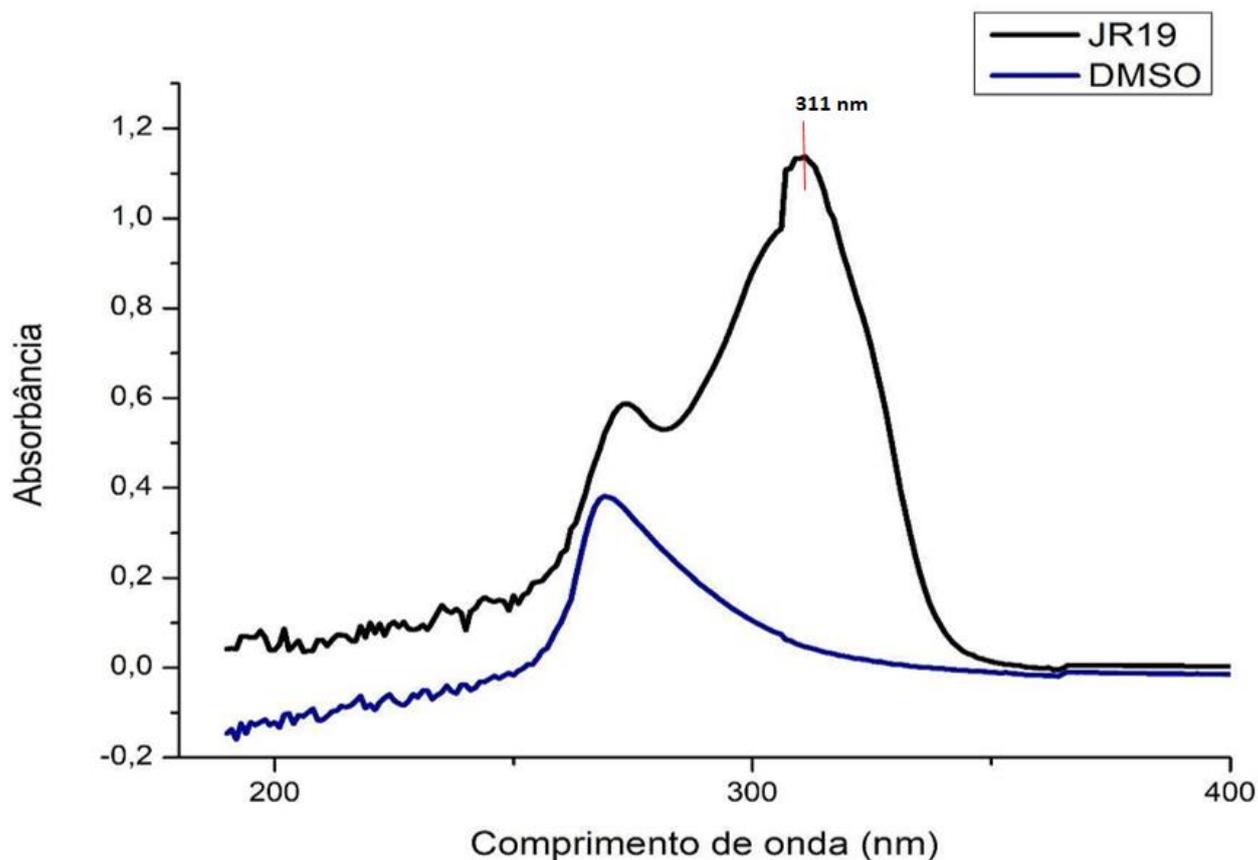
Fonte: Dados da pesquisa.

### 5.3.2 Limites de quantificação (LQ) e detecção (LD)

A sensibilidade do método foi avaliada a partir do limite de detecção (LD) e de quantificação (LQ), de modo que para estes parâmetros os valores calculados foram de 0,58 e 1,77  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente. Desse modo, obteve um método de alta sensibilidade, visto aos níveis de determinação relacionados a detecção e quantificação, demonstrando uma grande capacidade para percepção do analito.

### 5.3.3 Seletividade

De acordo com os espectros da Figura 13, observamos que não ocorreu a sobreposição dos picos referentes a JR19 e o DMSO na faixa de 311 nm, visto que o DMSO não absorve no mesmo comprimento de onda da JR-19. Desta forma, assegura-se que o método é seletivo para a utilização deste solvente no comprimento de onda utilizado, não havendo, portanto, interferência do DMSO na quantificação da molécula.

**Figura 13**-Espectros de absorção da JR-19 e do DMSO para verificação da seletividade

Fonte: Dados da pesquisa.

#### 5.3.4 Exatidão

A exatidão do método foi determinada por estudos de recuperação através da fortificação de uma solução de  $2 \mu\text{g mL}^{-1}$ , na qual foram adicionadas 1 mL de soluções nas concentrações de 3,5; 5,0; 6,5; 8,0 e  $9,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ , obtendo 5 soluções fortificadas. As concentrações da amostra fortificada, não adicionada e adicionada e os resultados de recuperação destas soluções estão apresentados na Tabela 6. A média de recuperação obtida foi de 97,17%, estando dentro da faixa de 80 a 110% de recuperação, conforme os critérios de aceitação atrelados ao nível de concentração do analito apresentados no DOQ-CGCRE-008.

Corroborando aos dados obtidos de exatidão, podemos observar os apresentados pela validação de método analítico por EAM UV-vis para a quantificação de nifuroxazida e isoniazida. Na validação método para comprimidos de nifuroxazida, utilizou dimetilformamida como solvente. O comprimento de onda de máxima absorção foi em 370 nm, a exatidão a partir da recuperação média foi de 100,13%. Da mesma forma para a isoniazida em comprimidos, utilizaram a faixa de 263 nm para as leituras, e três meios de

dissolução: ácido clorídrico (pH 1,2), acetato de sódio (pH 4,5) e fosfato de potássio (pH 6,8). A recuperação obtida foi de 98,82, 99,23 e 98,75%, respectivamente para os meios com pH 1,2, 4,5 e 6,8 (BENITES, 2016; GARCIA, 2022).

**Tabela 6-** Resultado analítico referente a exatidão do método

	Concentração da amostra fortificada ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Concentração da amostra não adicionada ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Concentração adicionada ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Recuperação (%)
<b>Lote 1</b>	2,61	1,65	0,73	131,51
	2,70	1,65	1,00	105,03
	3,24	1,65	1,37	116,11
	3,47	1,65	1,66	109,31
	3,81	1,65	1,91	112,99
<b>Lote 2</b>	2,07	1,59	0,67	71,72
	2,47	1,59	0,97	91,24
	2,69	1,59	1,28	85,96
	2,74	1,59	1,44	80,69
	3,23	1,59	1,85	88,71
<b>Lote 3</b>	2,55	1,93	0,65	96,00
	2,83	1,93	0,97	93,96
	3,06	1,93	1,19	95,10
	3,29	1,93	1,45	93,53
	3,46	1,93	1,79	85,64
<b>Média</b>	2,83	1,65	1,28	97,17

Fonte: Dados da pesquisa.

### 5.3.5 Precisão

A precisão intermediária do método observou a proximidade dos valores obtidos. Foi realizado o estudo para os três lotes da molécula JR-19 e os resultados foram expressos em valores de coeficiente de variação (CV, %), obtendo-se médias de 2,85, 1,23 e 1,52% para as concentrações de 2,0, 9,5 e 17  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente, como observado na Tabela 7. Os coeficientes de variação obtidos para todas as medidas realizadas e lotes foram inferiores a 5%, o que determina que o método analítico exposto é preciso e está de acordo com as recomendações da ANVISA.

Avaliando os valores obtidos de CV para a análise da precisão intermediária, o método pode ser considerado reprodutível quando realizado nas condições apresentadas neste estudo, especificadas mesmo por analistas diferentes, tendo valores semelhantes com analistas e dias diferentes.

**Tabela 7-** Resultado analítico da precisão intermediária para os três lotes da molécula JR-19

<b>Concentração média (CV, %)</b>						
	<b>Turno</b>	<b>Analista</b>	<b>2 µg mL<sup>-1</sup></b>	<b>9,5 µg mL<sup>-1</sup></b>	<b>17 µg mL<sup>-1</sup></b>	
<b>Lote 1</b>	Dia 1	manhã	1	1,231 (3,49%)	8,763 (0,84%)	16,563 (2,67%)
			2	1,019 (4,35%)	8,594 (1,12%)	16,692(4,16%)
	Tarde	1	1,949 (0,84%)	9,732 (1,85%)	17,587(2,70%)	
		2	1,92 (1,28%)	9,645 (2,15%)	18,025(2,15%)	
	Dia 2	manhã	1	3,183(2,75%)	9,557 (2,45%)	17,429(2,19%)
			2	3,223 (0,54 %)	9,470 (1,37%)	17,551(0,58%)
		tarde	1	1,969 (4,46 %)	9,444 (0,75%)	16,640(0,68%)
			2	1,909 (4,77%)	9,316(0,58%)	16,316(1,32%)
<b>Lote 2</b>	Dia 1	manhã	1	2,389 (2,67%)	10,161(2,00%)	17,929 ( 2,51%)
			2	1,901 (1,48%)	9,961 (0,40%)	17,934 (3,05%)
	tarde	1	2,111 (3,28%)	10,104(2,54%)	17,694(1,56%)	
		2	1,968 (2,94%)	9,731(0,68%)	17,294 (2,09%)	
	Dia 2	manhã	1	1,863 (3,73%)	7,848 (1,81%)	16,394(0,66%)
			2	1,769 (3,09%)	8,005(2,87%)	16,204 (2,64%)
		tarde	1	2,198 (3,01%)	7,899(1,26%)	16,012 (1,02%)
			2	1,911 (3,89%)	7,748(1,26%)	16,481(2,76%)
<b>Lote 3</b>	Dia 1	manhã	1	2,739 (0,14%)	11,588(0,65%)	18,794 (1,44%)
			2	2,374 (0,46%)	11,448(1,09%)	18,405 (1,89%)
	tarde	1	2,429 (0,39%)	11,314(2,46%)	19,067(0,91%)	
		2	2,473 (2,70%)	11,353(1,69%)	19,077 (0,05%)	
	Dia 2	manhã	1	1,798 (0,63%)	9,246 (1,16%)	17,958(0,70%)
			2	1,838 (3,11%)	8,821(1,10%)	18,746(1,44%)
		tarde	1	1,989 (3,23%)	8,838(1,05%)	17,851 (1,49%)
			2	1,938 (2,41%)	9,085(1,21%)	18,795 (1,47)
<b>Média geral</b>			1,959 (2,85%)	9,470 (1,23%)	17,641 (1,52%)	

Fonte: Dados da pesquisa.

### 5.3.6 Robustez

Para a avaliação da robustez, foi realizado um planejamento  $3^2$  para cada marca de DMSO utilizada, com 9 experimentos cada. Para Tal, foi variado o comprimento de onda em 311, 308 e 314 nm, e a concentração da solução em 3,5; 9,5 e 14  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . As respostas obtidas estão apresentadas na Tabela 8, na qual podemos observar os coeficientes de variação em relação as determinações da marca 1 e 2, sendo menores que 5%, com isso pode-se dizer que a mudança de marca do solvente não interferiu nas respostas obtidas, o que demonstra que o método é robusto nas condições apresentadas.

**Tabela 8** - Respostas obtidas para o planejamento experimental  $3^2$  para as marcas 1 e 2 de DMSO

Experimento	Comprimento de onda (nm)	Concentração ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Resposta Marca 1 ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Resposta Marca 2 ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	DP $\pm$ CV (%)
1	314	9,5	9,057	9,633	0,407(4,36)
2	311	14	14,194	14,495	0,213(1,48)
3	308	9,5	9,210	9,317	0,075(0,81)
4	314	14,0	13,610	14,002	0,277(2,01)
5	311	3,5	3,187	3,330	0,101(3,09)
6	314	3,5	3,262	3,187	0,053(1,64)
7	311	9,5	9,511	9,234	0,195(2,09)
8	308	3,5	3,164	3,292	0,091(2,81)
9	308	14,0	13,635	13,808	0,122(0,89)

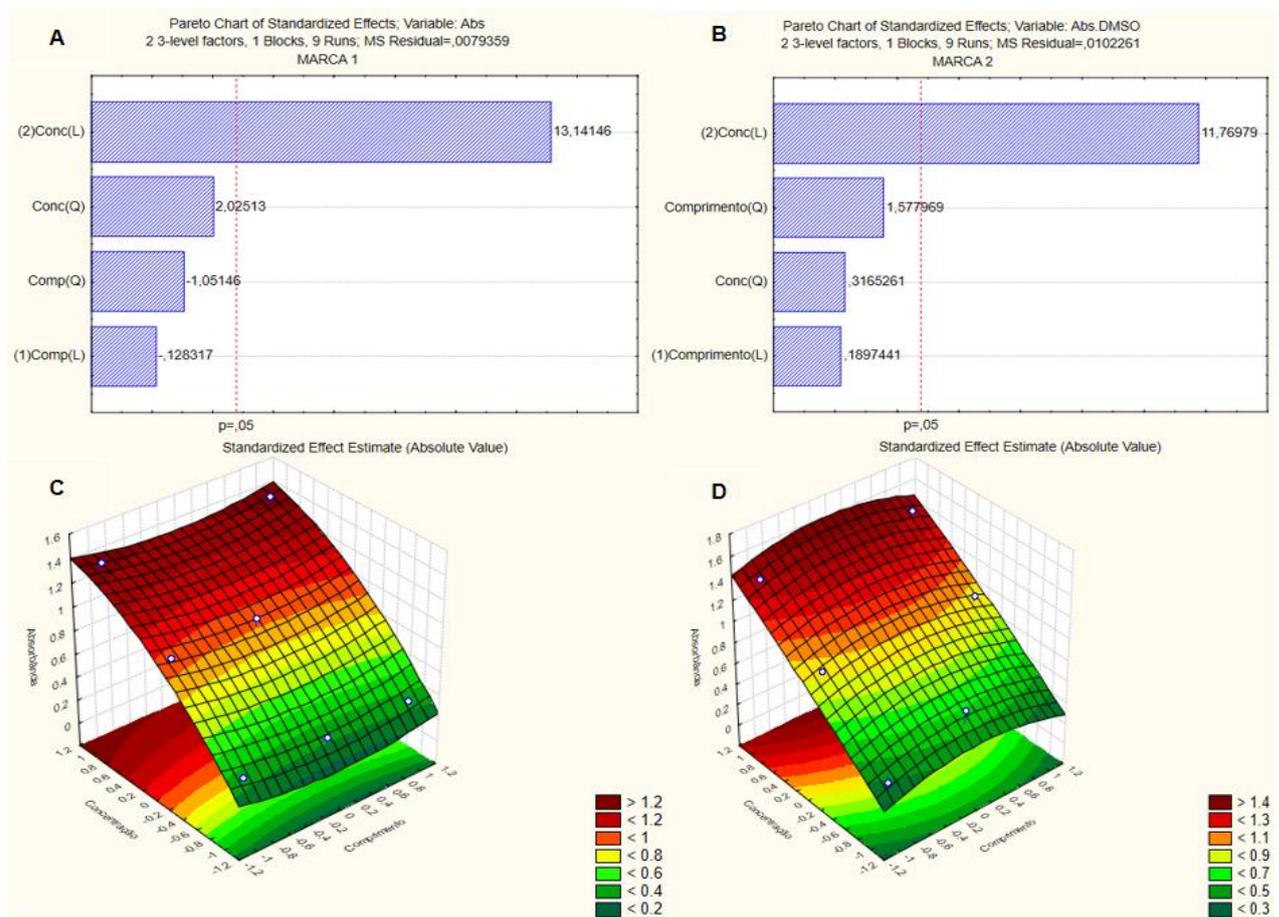
Fonte: Dados da pesquisa.

Resposta = Concentração obtida; DP= Desvio Padrão; CV=Coefficiente de variação.

Os resultados obtidos também foram analisados através do diagrama de Pareto e do gráfico de superfície de resposta, apresentados na Figura 14. Nos diagramas de Pareto (Figura 10a e b) observou-se que nas condições estudadas, a concentração e sua interação linear, exerceu uma influência positiva, sendo a concentração mais significativa estatisticamente para os solventes utilizados, de modo que os resultados foram equivalentes para ambos solventes, não existindo diferença.

Corroborando aos resultados obtidos pelo diagrama de Pareto, os gráficos de superfície de resposta (Figura 10 c e d), demonstra que a concentração exerce uma influência na resposta, de modo que a medida que aumenta concentração a resposta também aumenta, enquanto que o comprimento de onda não exerce nenhuma influência sobre a resposta obtida. Conseqüentemente, pode-se observar que as duas marcas de solvente não apresentaram diferenças nesse sentido, ambas apresentaram uma mesma interpretação para os gráficos.

**Figura 14-** Diagrama de Pareto e gráfico de superfície de resposta referente ao planejamento 3<sup>2</sup> das soluções preparadas com DMSO da marca 1 ( a e c) e maca 2 (b e d)



Fonte: Dados da pesquisa.

Conc= Concentração; Comprimento=comprimento de onda; L = Interação linear; Q = Interação quadrática. A linha vermelha vertical indica o ponto que os efeitos estimados foram estatisticamente significativos (p = 0,05).

Por fim, para analisar os efeitos da mudança de marca do solvente sob o mesmo conjunto de variáveis, utilizou-se o teste de t pareado (Tabela 9), de modo que observou uma associação dos solventes marca 1 e marca 2 (p= 0,97542), não apresentando diferenças entre a mudança de marca do DMSO no estudo.

**Tabela 9** - Resultados referente ao teste de t pareado para os solventes de marca 1 e 2

	DMSO (marca 1)	DMSO (marca 2)
Média	0,868	0,920
Variância	0,180	0,217
Observações	9	9
Correlação de Pearson	0,975	
Hipótese da diferença de média	0	
Gl	8	
Stat t	1,473	
P(T<=t) uni-caudal	0,089	
t crítico uni-caudal	1,860	
P(T<=t) bi-caudal	0,179	
t crítico bi-caudal	2,306	

Fonte: Dados da pesquisa.

A obtenção de um método de análise que seja prático e preciso pode ser o primeiro passo para o uso racional de medicamentos, visto que a qualidade de um produto Farmacêutico estará diretamente relacionada com a saúde dos pacientes. Essa consideração é importante, pois muitas vezes há carência de métodos analíticos na literatura e na maioria dos compêndios oficiais para o controle de qualidade de muitas substâncias ativas (*hit*) e protótipos (*lead compound*) (KOGAWA; SALGADO, 2016).

As metodologias fazem parte das atribuições do controle de qualidade, sendo imprescindíveis no processo de desenvolvimento de um medicamento, que em média leva dez anos para chegar ao mercado, após pesquisas, testes e investimentos. Consequentemente, qualquer falha no processo de desenvolvimento de um medicamento pode resultar em graves danos para a saúde da população, como para a indústria fabricante, causando um impacto negativo ao mercado consumidor (ROCHA; BETONI, 2014).

É importante destacar que a utilização de um mesmo método analítico para moléculas que apresentam o mesmo esqueleto molecular da JR-19, pode ser invalidada, devido as particularidades que cada molécula possuem e aos substituintes que são incorporados. Dessa maneira, ao comparar os estudos da nifuroxazida e isoniazida com os dados apresentados,

observa as diferenças na faixa máxima de absorção que podem estar relacionados tanto a estrutura molecular, quanto aos solventes utilizados.

Nesse sentido, a obtenção e validação deste método de quantificação para a JR-19 é de grande importância e útil, pois poderá ser utilizado para a quantificação deste derivado que apresenta um grande potencial inovador. Podemos destacar a utilização de um solvente não tóxico e a técnica EAM UV-Vis que é largamente empregada em todo o mundo, sendo considerada como uma ferramenta para ser utilizada na validação de compostos orgânicos de forma rápida e fácil (MOHAMMED, 2018)

## 6 CONCLUSÕES

A metodologia descrita neste trabalho permitiu a quantificação de N'-(1H-indol-3yl)metileno)-2-cianoacetohidrazida (JR19), sendo desenvolvido e validado a partir da utilização da espectrometria de absorção molecular na região do ultravioleta-visível, utilizando a faixa de 311 nm para as leituras de absorbâncias e DMSO como solvente.

O estudo de estabilidade da solução da JR-19 com o DMSO apresentou resultados satisfatórios para o armazenamento no período de 14 dias em temperatura ambiente, independentemente da proteção da luz, sendo as leituras de absorbância realizadas após uma hora da preparação da solução.

O método analítico cumpriu todos os parâmetros preconizados para alcançar a validação, atendendo as exigências de: linearidade, cuja curva analítica se deu no intervalo de 2 a 17  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , precisão, exatidão, sensibilidade e robustez.

Os resultados obtidos comprovaram que o método poderá ser utilizado para procedimento de quantificação da JR-19 em laboratórios, como aliado as pesquisas relacionadas a esta molécula. Consequentemente, poderá ser utilizado para quantificação da molécula em possíveis formulações que sejam desenvolvidas a partir da JR-19.

## REFERÊNCIAS

- AARJANE, Mohammed; AOUIDATE, Adnane; SLASSI, Siham; AMINE, Amina. Synthesis, antibacterial evaluation, in silico ADMET and molecular docking studies of new N-acylhydrazone derivatives from acridone. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 13, n. 7, p. 6236–6245, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2020.05.034>.
- ADEGBOLAGUN, Olayemi; THOMAS, Olusegun; AIYENALE, Elizabeth ; ADEGOKE, Olajire . A new spectrophotometric method for the determination of gabapentin using chromotropic acid. **Acta Pharmaceutica Scientia**, v. 56, n. 3, p. 93–110, 2018. DOI: <https://doi.org/10.23893/1307-2080.APS.05621>.
- AL-HAKKANI, Mostafa; GOUDA, Gamal ; HASSAN, Sedky; FARGHALY, Osman; MOHAMED, Mahmoud. Fully investigation of rp-hplc analytical method validation parameters for determination of cefixime traces in the different pharmaceutical dosage forms and urine analysis. **Acta Pharmaceutica Scientia**, v. 59, n. 1, p. 631–645, 2021. DOI: <https://doi.org/10.23893/1307-2080.APS.05906>.
- AMOS, Mutiu; ADERIBIGBE, Fatai; ADENIYI, Adewale; IGHALO, Joshua; BELLO, Bisola; JAMI, Mohammed; ALKHATIB, Ma'an Fahmi; MAJOZI, Thokozani; ABDULKAREEM, Sulyman. Auto-correlation robustness of factorial designs and GAMS in studying the effects of process variables in a dual-objective adsorption system. **Applied Water Science**, v. 11, n. 2, p. 1–14, 2021. DOI: [10.1007/s13201-020-01349-2](https://doi.org/10.1007/s13201-020-01349-2).
- APOLINÁRIO, Nadjaele de Melo. **Elucidação estrutural e avaliação do potencial biológico de novos derivados n-acilhidrazônicos**. Orientadora: Vanda Lucia dos Santos. 2016.114p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2016.
- ARRUDA, Isabella Elias; SANTOS MACEDO, Brendo Vinícius; CONCEIÇÃO MACEDO, Joseane da; ALCANTARA CAMPOS, Wesley Randson; MELO ARAÚJO, Cleônia Roberta; ASSIS GONSALVES, Arlan de. Preparação De Hidrazona E N-Acilidrazona Usando Fármacos Comerciais Como Reagentes: Aulas Práticas De Síntese De Compostos Bioativos. **Química Nova**, v. 43, n. 5, p. 642–648, 2020. DOI: <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170497>.
- ASSIS, Amaro César Lima; MOREIRA, Lívia Maria Coelho de Carvalho; ROCHA, Beatriz Patrício; PEREIRA, Milena Raissa Bezerra; DE MELO, Demis Ferreira; DE MOURA, Ricardo Olímpio; DE AZEVEDO, Eduardo Pereira; OSHIRO-JUNIOR, João Augusto; DAMASCENO, Bolívar Ponciano Goulart de Lima. N-acylhydrazone derivative-loaded cellulose acetate films: Thermoanalytical, spectroscopic, mechanical and morphological characterization. **Polymers**, v. 13, n. 14, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/polym13142345>.
- ATOLE, Dipali M.; RAJPUT, Hrishikesh H. Ultraviolet spectroscopy and its pharmaceutical applications- A brief review. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, v. 11, n. 2, p. 59–66, 2018. DOI: <https://doi.org/10.22159/ajpcr.2018.v11i2.21361>.

AVILA, Jocasta Neves Libório . **Estrutura e ambiente local de dimetil sulfóxido (DMSO) em diferentes meios iônicos**. 2018. 196p. Tese de Doutorado ( Pós graduação em química). Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

BALBINOT, Priscila Dotto Rosa. **Determinação de resíduos de ditiocarbamatos, empregando cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas, em erva-mate (ilex paraguariensis) produzida na américa do sul**. 2022. 87 p. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química, RS, 2022.

BEGOVIC, Begler; AHMETAGIC, Sead; CALKIC, Lejla; VEHABOVIC, Midhat; KOVACEVIC, Sanela; CATIC, Tarik; MEHIC, Meliha. Open Clinical Trial on Using Nifuroxazide Compared to Probiotics in Treating Acute Diarrhoeas in Adults. **Materia Socio Medica**, vol. 28, no. 6, p. 454, 2016. DOI: <https://doi.org/10.5455/msm.2016.28.454-458>.

BENITES, Javier Isai melquiades. **Validación del método analítico por espectrofotometría uv-vis para la cuantificación de tabletas recubiertas de nifuroxazida 200 mg**.2016.54p.Monografia( Faculdade de Farmácia e Bioquímica). Universidad nacional de Trujillo, Trujillo, 2016.

BRASIL. Ministério da saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução N°. 166, de 24 de julho de 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, v. 2017, p. 1–21, 24 jul. 2017. Disponível em: [http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2721567/RDC\\_166\\_2017\\_COMP.pdf/d5fb92b3-6c6b-4130-8670-4e3263763401](http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2721567/RDC_166_2017_COMP.pdf/d5fb92b3-6c6b-4130-8670-4e3263763401). Acesso em 18.set.21.

BRITO, Francisca Airlane Esteves; BEZERRA, Lorena Cristina Rodrigues; MELO, Aírís Maria Araújo; FURTADO, Roselayne Ferro; BORGES, Maria de Fátima; FIGUEIREDO, Evânia Altina Teixeira. Validation of alternative microbiological methods: An overview. **Brazilian Journal of Food Technology**, vol. 24, p. 1–9, 2021.DOI: <https://doi.org/10.1590/1981-6723.02320>.

COELHO, Emanuela Monteiro; PADILHA, Carla Valéria da Silva; MISKINISA, Gabriela Aquino;SÁA, Antônio Gomes Barroso; PEREIRA, Giuliano Elias; AZEVDO, Luciana Cavalcanti; LIMA, Marcos dos Santos. Simultaneous analysis of sugars and organic acids in wine and grape juices by HPLC: Method validation and characterization of products from northeast Brazil. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 66, p. 160-167, 2018.DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2017.12.017>

COIMBRA, Elaine Soares; NORA DE SOUZA, Marcus Vinícius; TERROR, Mariana Sequetto; PINHEIRO, Alessandra Campbell; DA TRINDADE GRANATO, Juliana. Synthesis, biological activity, and mechanism of action of new 2-pyrimidinyl hydrazone and N-acylhydrazone derivatives, a potent and new classes of antileishmanial agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 184, p. 111742, 2019. DOI: [10.1016/j.ejmech.2019.111742](https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.111742).

DHALAPE, Vitthal; KHADANGALE, Santosh ;PINJARI, Rahul. RP-hplc method validation for quantitative analysis of pemetrexed disodium hemipentahydrate. **Research Journal of Pharmacy and Technology**, v. 13, n. 8, p. 3685-3689, 2020. DOI: [10.5958/0974-360X.2020.00652.6](https://doi.org/10.5958/0974-360X.2020.00652.6)

DHANDAR, Ajinkya; GANORKAR, saurabh; PATIL, Amod, SHIRKHEDKAR, atula. Development and validation of UV spectrophotometric method for simultaneous estimation of Quinfamide and Mebendazole in in-house pharmaceutical formulation. **Journal of Pharmaceutical Technology, Research and Management**, v. 6, n. 1, p. 9-20, 2018. DOI: <https://doi.org/10.15415/jptrm.2018.61002>

DOPPA, roopa sirisha; KONIDALA, Sathish Kumar; KHANABHI, Sheik. Development and validation of UV spectroscopic method for the determination of ranolazine in bulk and formulation. **Research Journal of pharmacy and Technology**, v. 12, n. 10, p. 5007-5010, 2019. DOI: 10.5958/0974-360X.2019.00868.0.

ELLISON, SLR e WILLIAMS, A. (eds) **Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement**. 3ª edição. Teddington, Reino Unido, Eurachem/CITAC, 141 p. (Guia CITAC Número 4), 2012. DOI: <http://dx.doi.org/10.25607/OBP-952>

FISCHER, Emil; JOURDAN, Friedrich. Ueber die hydrazine der brenztraubensäure. **Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft**, v. 16, n. 2, p. 2241-2245, 1883.

FRANCO, Elton Santos; FERREIRA, Ana Flávia de Assis; SILVA, Diego Francis; CAMARGO, Júlia Araújo; PÁDUA, Valter Lúcio; RODRIGUES, Jairo Lisboa; RODRIGUEZ, Mariandry del Valle; GIANI, Alessandra. Validação de método analítico por ELL-CG-EM para detecção de trialometas decorrentes da cloração de águas contendo Microcystis. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, v. 24, p. 1003-1012, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1413-41522019175794>.

GARCIA ARTEAGA, Lesly Fabiola. **Validación de un método espectrofotométrico UV/Vis para estudios de bioequivalencia in vitro de tabletas de isoniazida 100 mg**. 2022.63p. Monografía (Faculdade de Farmácia e Bioquímica). Universidade nacional de Trujillo, Trujillo, 2022.

GOES, Enock José; ROEDER, Jakson; OLIVEIRA, Kaiky; FERREIRA, Mateus ; SILVA, Jonatas. Validation of a spectrophotometric method for quantification of acetylsalicylic acid in pharmaceutical formulations: A proposal of experimental activity for instrumental analysis. **Quimica Nova**, vol. 42, no. 1, p. 99–104, 2019. DOI: <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170300>.

HARAHAP, Yahdiana; VIANNEY, Aurelia Maria; SURYADI, Herman. Method development and validation for measuring O6-Methylguanine in dried blood spot using ultra high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 15, p. 963-971, 2021. DOI: 10.2147/DDDT.S283775

HOLLER, F. James; SKOOG, Douglas A.; CROUCH, Stanley R. **Princípios de análise instrumental**. 6. ed. Porto Alegre, RS: Bookman, 2009. vii, 1055 p. ISBN 9788577804603.

HOSNY, Nasser Mohammed; EL MORSY, El Sayed; SHERIF, Yousery. Synthesis, spectral, optical and anti-inflammatory activity of complexes derived from 2-aminobenzohydrazide with some rare earths. **Journal of Rare Earths**, v. 33, n. 7, p. 758–764, 2015. DOI: 10.1016/S1002-0721(14)60482-8.

ICH. HARMONISED TRIPARTITE GUIDELINE. Validation of analytical procedures: text and methodology Q2 (R1). **International conference on harmonization of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use**. Switzerland: Geneva, v. 1, n. 20, 2005. Disponível em: <https://database.ich.org/sites/default/files/Q2%28R1%29%20Guideline.pdf>. Acesso em: 17.out.2022.

INMETRO. Associação Brasileira de Normas Técnicas. **ISO/IEC 17025: Requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaio e calibração**. Rio de Janeiro, 3ª Ed. 22p., 19. Dez, 2017. Disponível em: [https://www.exactusmetrologia.com.br/sites/default/files/3-nbr\\_iso\\_iec\\_17025-2017\\_versao\\_exclusiva\\_treinamento.pdf](https://www.exactusmetrologia.com.br/sites/default/files/3-nbr_iso_iec_17025-2017_versao_exclusiva_treinamento.pdf). Acesso em: 22.Out.21.

INMETRO. Coordenação geral de acreditação. **DOQ-CGCRE-008: Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos**. Rio de Janeiro, Jun. 2020. 30 p. Revisão nº 9. Disponível em: [http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/pesquisa\\_link.asp?seq\\_tipo\\_documento=5&cod\\_uo\\_numerocao=00774&num\\_documento=008%0Ahttp://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8\\_08.pdf](http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/pesquisa_link.asp?seq_tipo_documento=5&cod_uo_numerocao=00774&num_documento=008%0Ahttp://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8_08.pdf). Acesso em: 22.out.21.

KIRAN, Naga Ravi.; PARVATHI, P.; KUMAR, Suresh. Development and validation of rp-hplc method for the simultaneous estimation of linagliptin, empagliflozin and metformin in solid dosage forms. **Asian Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 10, n. 3, p. 117-124, 2020. DOI: 10.5958/2231-5675.2020.00021.6.

KOGAWA, Ana Carolina; SALGADO, Hérica Regina Nunes. Review Article Analytical Methods Need Optimization to Get Innovative and Continuous Processes for Future Pharmaceuticals. **Scholars Academic Journal of Pharmacy**. vol. 5, n. 6, p. 240–244, 2016. DOI: <https://doi.org/10.21276/sajp.2016.5.6.3>.

KUMARI, Beena; KHANSILI, Aparna. Analytical method development and validation of UV-visible spectrophotometric method for the estimation of vildagliptin in gastric medium. **Drug Research**, v. 70, n. 9, p. 417–423, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1055/a-1217-0296>.

LEMUS, Oscar; DELGADO-GÓMEZ, Balbina; LÓPEZ-ESPINOSA, Nadia; CASTRO-BEAR, Veronica. Validation of three analytical methods for quantification of acetaminophen by UV spectrophotometry. **Ars Pharmaceutica (Internet)**, v. 63, n. 2, p. 152–165, 2022. DOI: <https://doi.org/10.30827/ars.v63i2.21983>.

MADEJ, Katarzyna; PAPROTNY, Łukasz; WIANOWSKA, Dorota; KASPRZYK, Joanna; HERMAN, Małgorzata; PIEKOSZEWSKI, Wojciech. A fully validated HPLC–UV method for determination of sulthiame in human serum/plasma samples. **Biomedical Chromatography**, v. 35, n.3, p. 1–11, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1002/bmc.5002>.

MAIA, Rodolfo; TESCH, Roberta; FRAGA, Carlos Alberto Manssour. Acylhydrazone derivatives: A patent review. **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 24, n. 11, p. 1161–1170, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1517/13543776.2014.959491>.

MAJUMDER, Kollol Kumar; SHARMA, Jai Bharti; KUMAR, Manish, BHATT, Shailendra; SAINI, Vipin. Development and Validation of UV-Visible Spectrophotometric Method for The Estimation of Curcumin in Bulk and Pharmaceutical Formulation. **Pharmacophores**, v.

10, n. 1, p. 115-121, 2020. Disponível em:

<https://pharmacophorejournal.com/storage/models/article/SMJC7D4k0SyyfuMfvOJc1hgD6XY75fIMOUK04nkqQueLML64ebZhQLGOHDDW/development-and-validation-of-uv-visible-spectrophotometric-method-for-the-estimation-of-curcumin-.pdf>. Acesso em: 10.out.2022.

MEIRA, Cássio; SANTOS, José Maurício; SOUSA, Caroline; ANJOS, Pâmela; CERQUEIRA, Jéssica; DIAS NETO, Humberto; DA SILVEIRA, Rafael; RUSSO, Helena; WOLFENDER, Jean Luc; QUEIROZ, Emerson; MOREIRA, Diogo; SOARES, Milena. Structural design, synthesis and substituent effect of hydrazone-N-acylhydrazones reveal potent immunomodulatory agents. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 26, n. 8, p. 1971–1985, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2018.02.047>.

MOHAMMED, Abdul Moiz. UV-Visible Spectrophotometric Method and Validation of Organic Compounds. **European Journal of Engineering Research and Science**, v. 3, n. 3, p. 8-11, 2018. DOI: <https://doi.org/10.24018/ejers.2018.3.3.622>.

MORAES, Ana Daura Travassos de Oliveira; MIRANDA, Mirelly Dianne Santos; JACOB, Íris Trindade Tenório; AMORIM, Cézar Augusto da Cruz; MOURA, Ricardo Olímpio; SILVA, Simone Ângela Soares; SOARES, Milena Botelho Pereira; ALMEIDA, Sinara Mônica Vitalino de; SOUZA, Túlio Ricardo Couto de Lima; OLIVEIRA, Jamerson Ferreira de; SILVA, Teresinha Gonçalves da; MELO, Cristiane Moutinho Lagos de; MOREIRA, Diogo Rodrigo Magalhães; LIMA, Maria do Carmo Alves de. Synthesis, in vitro and in vivo biological evaluation, COX-1/2 inhibition and molecular docking study of indole-N-acylhydrazone derivatives. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 26, n. 20, p. 5388–5396, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2018.07.024>.

NASTASA, Cristina; TIPERCIUC, Brîndusa; DUMA, Mihaela; BENEDEC, Daniela; ONIGA, Ovidiu. New hydrazones bearing thiazole scaffold: Synthesis, characterization, antimicrobial, and antioxidant investigation. **Molecules**, v. 20, n. 9, p. 17325–17338, 2015. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules200917325>.

OLIVEIRA, Vitória maria almeida teodoro. **Autenticação de alecrim e hortelã orgânicos utilizando espectroscopia uv-vis associada a quimiometria**. 2021.55p. Dissertação ( Pós graduação em tecnologia de alimentos). Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campo Mourão, 2021.

OMAR, Mahmoud; AHMED, Hytham; HAMMAD, Mohamed; DERAYEA, Sayed. Validated spectrofluorimetric method for determination of selected aminoglycosides. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 135, p. 472–478, 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.saa.2014.07.020>.

ORIQUI, Luciana R.; MORI, Milton; WONGTSCHOWSKI, Pedro. Guia para a determinação de estabilidade de produtos químicos. **Química Nova**, v. 36, n. 2, p. 340–347, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422013000200023>.

PARRILHA, Gabrieli Lessa. **Complexos metálicos de hidrazonas, tiossemicarbazonas e lapachol: atividades farmacológicas e relações de estrutura-atividade**. 2012. 154 f. Tese (Doutorado em Química). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2012

PEDREIRA, Júlia Galvez Bulhões; SILVA, Rafaela Ribeiro; NOËL, François; BARREIRO, Eliezer. Effect of s–se bioisosteric exchange on affinity and intrinsic efficacy of novel n-acylhydrazone derivatives at the adenosine a2a receptor. **Molecules**, v. 26, n. 23, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules26237364>.

PEREIRA, Elaine. **Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para quantificação de urânio em compostos do ciclo do combustível nuclear por espectroscopia no infravermelho com transformada de fourier (FTIR)**. Orientadora: Profa. Dra. Maria Aparecida Faustino Pires. 2016. 177 f. Tese (Doutorado em Ciências de Tecnologia Nuclear - Materiais) - Instituto de pesquisas energéticas e nucleares, Universidade Estadual de São Paulo, São Paulo, 2016.

RAPALLI, Vamshi Krishna; KAUL, Vedhant; GORANTLA, Srividya; WAGHULE, Tejashree; DUBEY, Sunil Kumar; PANDEY, Murali Monohar; SINGHVI, Gautam. UV Spectrophotometric method for characterization of curcumin loaded nanostructured lipid nanocarriers in simulated conditions: Method development, in-vitro and ex-vivo applications in topical delivery. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 224, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.saa.2019.117392>.

RÉ FILHO, Antonio Oscar. **Desenvolvimento e validação de um novo método analítico para quantificação de resíduo de eprinomectina no leite bovino**. 2016. 58 f. Dissertação (Mestrado em química). Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2016.

ROCHA, Tiago galdino; GALENDE, Sharize betoni. A importância do controle de qualidade na indústria farmacêutica. **Uningá Review**, v. 20, n. 2, p. 97–103, 2014. Disponível em: <https://revista.uninga.br/uningareviews/article/view/1593>. Acesso em: 16.Jan.2023.

RODRIGUES, Daniel; FERREIRA-SILVA, Guilherme; FERREIRA, Ana; FERNANDES, Renan; KWEE, Jolie; SANTANNA, Carlos; IONTA, Marisa; FRAGA, Carlos. Design, Synthesis, and Pharmacological Evaluation of Novel N-Acylhydrazone Derivatives as Potent Histone Deacetylase 6/8 Dual Inhibitors. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 59, n. 2, p. 655–670, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b01525>.

RODRIGUES, Daniel; GUERRA, Fabiana; SAGRILLO, Fernanda; SENA, Pedro; ALVES, Marina; THOTA, Sreekanth; CHAVES, Lorrane ; SANT'ANNA, Carlos; FERNANDES, Patrícia; FRAGA, Carlos. Design, Synthesis, and Pharmacological Evaluation of First-in-Class Multitarget N-Acylhydrazone Derivatives as Selective HDAC6/8 and PI3K $\alpha$  Inhibitors. **ChemMedChem**, v. 15, n. 6, p. 539–551, 2020. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201900716>.

ROUSSEL, Jean-Marc; RIGHEZZA, Michel. Application of prediction intervals to the interpretation of analytical methods robustness studies. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 193, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2020.113706>.

SAHOO, Chinmaya Keshari; SUDHAKAR, keshari; SAHOO, Nalini canta; RAO, Surepalli Ram Mohan. Validation of Analytical Methods: A Review. **Journal of Innovation in Pharmaceutical Sciences**, v. 2, n. 1, p. 8-15, 2018. Disponível em: <https://www.indianjournals.com/ijor.aspx?target=ijor:jips1&volume=2&issue=1&article=002>. Acesso em: 16.out.2022.

SHRIVASTAVA, Suman; DESHPANDE, Pooja; DAHARWAL, S J. Key Aspects of Analytical Method Development and Validation. **Journal of Ravishankar University**. v. 31, n. 1, p. 32–39, 2018. Disponível em: <https://jru.b.com/HTMLPaper.aspx?Journal=Journal%20of%20Ravishankar%20University;PID=2018-31-1-6>. Acesso em: 17.out.2022

SIDDIQUI, Masoom Raza; ALOTHMAN, Zeid ; RAHMAN, Nafisur. Analytical techniques in pharmaceutical analysis: A review. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 10, p. 1409–1421, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.arabjc.2013.04.016>.

SILVA, Adriany da; JUNIOR, Jair Marques; BATALINI, Claudemir. Síntese E Caracterização De Derivados Da L-Fenilalanina E L-Tirosina Alinhada À “Química Verde” E Avaliação Da Toxicidade / Synthesis and Characterization of L-Phenylalanine and L-Tyrosine Derivatives in Line With “Green Chemistry” and Evaluation of Toxicity. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 1, p. 1614–1631, 2021. DOI: <https://doi.org/10.34117/bjdv7n1-110>.

SILVA, Beatriz. Validação de métodos analíticos por cromatografia gasosa com detector FID.2021.Dissertação(Mestrado em Tecnologia e Ciência Alimentar), Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, Porto, 2021.

SILVA, Erick Vicente; COSTA, Juliana de Carvalho; BASTOS, Jairo Kenupp. A validated HPLC-UV method for the analysis of galloylquinic acid derivatives and flavonoids in *Copaifera langsdorffii* leaves. **Journal of Chromatography B**, v. 1061, p. 240-247, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2017.07.027>.

SILVA, Tiago Fernandes; JÚNIOR, Walfrido Bispo; ALEXANDRE-MOREIRA, Magna Suzana; COSTA, Fanny Nascimento; DA SILVA MONTEIRO, Carlos Eduardo; FERREIRA, Fabio Furlan; BARROSO, Regina Cely Rodrigues; NOËL, François; SUDO, Roberto Takashi; ZAPATA-SUDO, Gisele; LIMA, Lídia Moreira; BARREIRO, Eliezer J. Novel orally active analgesic and anti-inflammatory cyclohexyl-N-acylhydrazones derivatives. **Molecules**, v. 20, n. 2, p. 3067–3088, 2015. DOI:<https://doi.org/10.3390/molecules20023067>.

SILVA-BUZANELLO, Rosana Aparecida; FERRO, Ana Caroline; BONA, Evandro; CARDOZO-FILHO, Lúcio; ARAUJO, Pedro Henrique Hermes; LEIMANN, Fernanda Vitória; GONÇALVES, Odinei Hess. Validation of an Ultraviolet–visible (UV–Vis) technique for the quantitative determination of curcumin in poly (l-lactic acid) nanoparticles. **Food Chemistry**, v. 172, p. 99-104, 2015.DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.09.016>.

THOTA, Sreekanth; RODRIGUES, Daniel A.; PINHEIRO, Pedro de Sena Murteira; LIMA, Lídia M.; FRAGA, Carlos A.M.; BARREIRO, Eliezer J. N-Acylhydrazones as drugs. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 28, n. 17, p. 2797–2806, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2018.07.015>.

TOME, Tim; ŽIGART, Nina; ČASAR, Zdenko; OBREZA, Aleš. Development and Optimization of Liquid Chromatography Analytical Methods by Using AQbD Principles: Overview and Recent Advances. **Organic Process Research and Development**, v. 23, n. 9, p. 1784–1802, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.oprd.9b00238>.

VALINGER, Davor; LONGIN, Lucija; GRBEŠ, Franjo; BENKOVIĆ, Maja; JURINA, Tamara; GAJDOŠ KLJUSURIĆ, Jasenka; JURINJAK TUŠEK, Ana. Detection of honey adulteration – The potential of UV-VIS and NIR spectroscopy coupled with multivariate analysis. **Lwt**, v. 145, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111316>.

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

VILCHÈZE, Catherine; JACOBS JR, William R. The isoniazid paradigm of killing, resistance, and persistence in *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of molecular biology**, v. 431, n. 18, p. 3450-3461, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.02.016>.

WANDERLEY, Davidson; MELO, Demis; SILVA, Laryssa; SILVA, Wesley; CORREIA, Lidiane ; OSHIRO-JUNIOR, João agosto; FOOK, Marcus.; MOURA, Ricardo; LIMA, Rosemary ; DAMASCENO, Bolívar. Physical–chemical characterization of N-acylhydrazone derivative chitosan films using spectroscopic and thermoanalytical techniques. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 138, n. 5, p. 3789–3796, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10973-019-08906-1>.