

MATERIAL SUPLEMENTAR

Validação de método espectrofotométrico de análise para a quantificação de ácido acetilsalicílico em formulações farmacêuticas: uma proposta de aula experimental para análise instrumental

Enock José A. Goes Junior^a, Jakson S. Roeder^a, Kaiky B. L. Oliveira^a, Mateus P. Ferreira^a e Jonatas G. da Silva^{b,*}

^aUniversidade Católica de Brasília, 71966-700 Taguatinga – DF, Brasil

^bUniversidade Federal do Oeste da Bahia, Campus Reitor Edgard Santos, 47810-059 Barreiras – BA, Brasil

*e-mail: jonatasg@yahoo.com.br

TESTES ESTATÍSTICOS

Média e desvio padrão

Repetições sucessivas de uma medida, geram valores diferentes entre si. O valor médio (\bar{x}), usualmente aceito como sendo o mais provável, no entanto, nem sempre é verdade, pode ser calculado pela Equação 1.

$$\bar{x} = \frac{\sum x_i}{n} \quad (1)$$

Onde: x_i são os valores encontrados para uma série finita de n medidas de uma mesma grandeza.

O desvio padrão (s) é uma medida do espalhamento (dispersão) dos valores em torno da média, calculado pela Equação 2:

$$s = \sqrt{\frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad (2)$$

Comparação de resultados

A comparação dos valores de um conjunto de resultados com o valor de referência ou com os valores de outros conjuntos de resultados permite verificar a exatidão e precisão do método analítico, ou se ele é melhor do que o outro.

Teste f

O teste f é usado na comparação das precisões de dois grupos de dados como, por exemplo, os resultados de dois métodos de análise diferentes ou resultados de dois laboratórios diferentes. O valor de f é:

$$f = \frac{S_A^2}{S_B^2} \quad (3)$$

O maior valor de s é sempre colocado no numerador, para que o valor de f seja maior que a unidade. O significado do valor obtido de f é então verificado por comparação com valores da tabela de f , levando em consideração os graus de liberdade ($n - 1$) dos dois conjuntos de dados em diferentes níveis de confiança ou probabilidade (P).

O valor de $f_{\text{calculado}}$ maior do que o valor de f_{tabelado} indica que existe diferença significativa entre as precisões que foram comparadas, a um determinado nível de confiança ou probabilidade.

Teste t de Student

O teste t é utilizado para amostras pequenas, tendo como objetivo comparar a média de uma série de resultados com o valor de referência e exprimir o nível de confiança associado ao significado da comparação. O valor de t é obtido pela Equação 4.

$$t = \frac{(\bar{x} - \mu) \sqrt{n}}{s} \quad (4)$$

Onde: μ é o valor de referência.

O valor de $t_{\text{calculado}}$ é comparado com um valor de t_{tabelado} (Tabela 1S), para $n - 1$ graus de liberdade em diferentes níveis de confiança ou probabilidade.

O valor de $t_{\text{calculado}}$ maior do que o valor de t_{tabelado} indica que existe diferença significativa entre o valor médio (\bar{x}) obtido e o valor de referência utilizado na comparação, a um determinado nível de confiança ou probabilidade.

Tabela 1S. Valores para o parâmetro t

Graus de liberdade (n - 1)	Nível de confiança (%)	
	95 (P = 5%)	99 (P = 1%)
1	12,71	63,66
2	4,30	9,93
3	3,18	5,84
4	2,78	4,60
5	2,57	4,03
6	2,45	3,71
7	2,37	3,50
8	2,31	3,36
9	2,26	3,25
10	2,23	3,17
11	2,20	3,11

n = número de medidas (determinações); P = probabilidade.

O teste t também usado para testar a diferença entre as médias de dois conjuntos de resultados, \bar{x}_1 e \bar{x}_2 . Quando um novo método analítico esta sendo desenvolvido recomenda-se comparar a média e a precisão do novo método (que está sendo testado) com a média e a precisão do método tradicional (de referência). O valor de t pode ser calculado pela Equação 5.

$$t = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{s_p \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}} \quad (5)$$

Onde s_p , o desvio padrão agrupado, é determinado pelos desvios padrão das duas amostras, s_1 e s_2 , como descrito na Equação 6.

$$s_p = \sqrt{\frac{(n_1-1)s_1^2 + (n_2-1)s_2^2}{n_1 + n_2 - 2}} \quad (6)$$

É necessário que não haja uma diferença significativa entre as precisões dos métodos. Por isso, aplica-se o teste f antes de usar o teste t.

O valor de $t_{\text{calculado}}$ maior do que o valor de t_{tabelado} indica que existe diferença significativa entre as médias (\bar{x}_1 e \bar{x}_2) de dois conjuntos de resultados, a um determinado nível de confiança ou probabilidade.

Análise de variância (ANOVA)

A comparação entre mais de duas médias, situação que acontece com frequência em química analítica, e as variações dos resultados devido ao erro aleatório associado às medidas das amostras repetidas e aos diferentes analistas, podem ser avaliadas e seus efeitos estimados pelo método estatístico conhecido como análise de variância. Uma discussão mais detalhada pode ser encontrada no Capítulo 7 do livro Fundamentos de Química Analítica dos autores Skoog, West, Holler e Crouch.

	A	B	C	D	E	F
1	ANOVA de Fator Único					
2						
3						
4			Reagen	Synth	Vetec	
5		Concentração de AAS ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	27,79	27,56	30,74	
6		Concentração de AAS ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	27,66	27,39	30,26	
7		Concentração de AAS ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	27,43	27,20	29,88	
8		Média	27,63	27,38	30,29	
9		DESVPAD	0,18	0,18	0,43	
10						
11		Média Global	28,43			
12					Graus de Liberdade (GL)	
13		Soma dos quadrados entre os grupos (SQF)	15,62	2		
14					I - 1 (I = Grupos que estão sendo comparados)	
15		Soma dos quadrados dos erros (SQE)	0,51	6		
16					N - I (N = número total de medidas)	
17		Média dos quadrados entre os grupos (MQF)	7,81			
18						
19		Média dos quadrados dos erros (MQE)	0,08			
20						
21		$F_{\text{calculado}}$	92,1			
22						
23		F_{tabelado}	5,14			
24						
25						
26		Célula C8 = MEDIA(C5:C7)	Célula D8 = MEDIA(D5:D7)	Célula E8 = MEDIA(E5:E7)		
27		Célula C9 = DESVPAD(C5:C7)	Célula D9 = DESVPAD(D5:D7)	Célula E9 = DESVPAD(E5:E7)		
28		Célula C11 = (3/9)*(C8+D8+E8)				
29		Célula C13 = (3*(C8-C11)^2)+(3*(D8-C11)^2)+(3*(E8-C11)^2)				
30		Célula C15 = 2*(C9^2)+ 2*(D9^2)+ 2*(E9^2)				
31		Célula C17 = C13/D13				
32		Célula C19 = C15/D15				
33		Célula C21 = C17/C19				
34						

Figura 1S. Planilha eletrônica para a análise de variância (ANOVA)

$$\text{Média global} = \bar{x} = \left(\frac{N_1}{N}\right)\bar{x}_1 + \left(\frac{N_2}{N}\right)\bar{x}_2 + \left(\frac{N_3}{N}\right)\bar{x}_3; \text{SQF} = N_1(\bar{x}_1 - \bar{x})^2 + N_2(\bar{x}_2 - \bar{x})^2 + N_3(\bar{x}_3 - \bar{x})^2;$$

$$\text{SQE} = (N_1 - 1)s_1^2 + (N_2 - 1)s_2^2 + (N_3 - 1)s_3^2; \text{MQF} = \frac{\text{SQF}}{I - 1}; \text{MQE} = \frac{\text{SQE}}{N - I}; F = \frac{\text{MQF}}{\text{MQE}}$$

Referências

1. Harris, D. C.; *Análise Química Quantitativa*, 9ª ed., LTC: Rio de Janeiro, 2017.
2. Mendham, J.; Denney, R. C.; Barnes, J. D.; Thomas, M. J. K.; *Análise Química Quantitativa*, 6ª ed., LTC: Rio de Janeiro, 2002.
3. Skoog, D. A.; West, D. M.; Holler, F. J.; Crouch, S. R.; *Fundamentos de Química Analítica*, 9ª ed., Cengage Learning: São Paulo, 2014.

VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

A validação de métodos analíticos é necessária para gerar resultados confiáveis no contexto do controle de qualidade na indústria farmacêutica, pois deve-se assegurar, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados. A seguir as definições de validação de métodos contidas na RDC nº 166 de 24/07/2017 da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária),¹ que estabelece critérios para a validação de métodos analíticos empregados em insumos farmacêuticos, medicamentos e produtos biológicos em todas as suas fases de produção no Brasil:

“A validação deve demonstrar que o método analítico produz resultados confiáveis e é adequado à finalidade a que se destina, de forma documentada e mediante critérios objetivos.”

“É a avaliação sistemática de um método por meio de ensaios experimentais de modo a confirmar e fornecer evidências objetivas de que os requisitos específicos para seu uso pretendido são atendidos.”

Parâmetros da validação analítica

Para a validação do método analítico, conforme a RDC nº 166 de 24/07/2017 da ANVISA,¹ os seguintes parâmetros da validação analítica devem ser avaliados: seletividade, linearidade, efeito de matriz, faixa de trabalho, precisão, exatidão, limite de detecção, limite de quantificação, e robustez.

Seletividade

A seletividade do método analítico deve ser demonstrada por meio da sua capacidade de identificar ou quantificar o analito de interesse (substância ou conjunto de substâncias que se pretende identificar ou quantificar), inequivocamente, na presença de componentes que podem estar presentes na amostra (quantidade representativa de insumo farmacêutico, produto intermediário ou produto terminado, devidamente identificada, dentro do prazo de validade estabelecido), como impurezas (qualquer componente presente no insumo farmacêutico ou no produto terminado que não seja o insumo farmacêutico ativo nem os excipientes), diluentes e componentes da matriz (composição que mimetiza a amostra sem a presença do analito).¹

Linearidade

A linearidade de um método deve ser demonstrada por meio da sua capacidade de obter respostas analíticas diretamente proporcionais à concentração de um analito em uma amostra. Uma relação linear deve ser avaliada em toda a faixa estabelecida para o método. Para o estabelecimento da linearidade, deve-se utilizar, no mínimo, cinco concentrações diferentes da substância química de referência (SQR) para as soluções preparadas em, no mínimo, triplicata. Para avaliação da linearidade, devem ser apresentados os seguintes dados: ¹

- representação gráfica das respostas em função da concentração do analito;
- gráfico de dispersão dos resíduos, acompanhado de sua avaliação estatística;
- equação da reta de regressão de y em x, estimada pelo método dos mínimos quadrados;
- avaliação da associação linear entre as variáveis por meio do coeficientes de correlação (r) e de determinação (r²);
- avaliação da significância do coeficiente angular.

Para encontrar a melhor reta (ou curva) que passa pelos pontos experimentais, pode ser feita uma análise visual do gráfico de calibração, no entanto, em muitos casos, é mais razoável determinar a melhor reta por meio da regressão linear (método dos mínimos quadrados) (Figura 2S).

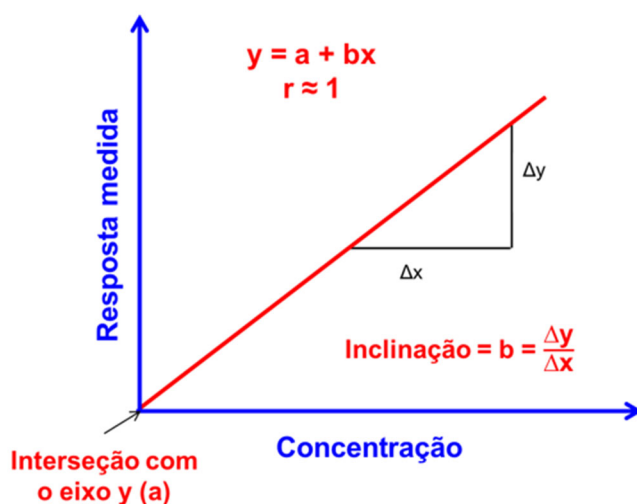


Figura 2S. Representação gráfica das respostas medidas em função da concentração do analito

A equação de uma linha reta é:

$$y = a + bx \tag{7}$$

onde y (variável dependente) é lançada em gráfico em função de x (variável independente).

Para obter a reta de regressão “y em x”, a inclinação da reta (b) e a interseção no eixo dos y (a) são determinados pelas equações:

$$b = \frac{n \sum x_i y_i - \sum x_i \sum y_i}{n \sum x_i^2 - (\sum x_i)^2} \quad (8)$$

$$a = \frac{(\sum x_i^2) (\sum y_i) - (\sum x_i y_i) (\sum x_i)}{n \sum x_i^2 - (\sum x_i)^2} \quad (9)$$

Para verificar se existe uma relação linear entre duas variáveis x_i e y_i , utiliza-se o coeficiente de correlação linear (r):

$$r = \frac{n \sum x_i y_i - \sum x_i \sum y_i}{\left\{ [n \sum x_i^2 - (\sum x_i)^2] [n \sum y_i^2 - (\sum y_i)^2] \right\}^{1/2}} \quad (10)$$

O valor de r deve estar entre -1 e $+1$. Quanto mais próximo de ± 1 , maior a probabilidade de que exista uma relação linear definida entre as variáveis x e y.

Deve-se também avaliar a linearidade por meio do teste f na análise da variância (ANOVA) da regressão (Tabela 2S).

Tabela 2S. Tabela de análise de variância para o ajuste de um modelo pelo método dos mínimos quadrados²

Fonte	SQ	GL	MQ	f _{calculado}
Modelo	$SQ_{reg} = \sum n_i [(y_e)_i - y_m]^2$	p-1	$MQ_{reg} = SQ_{reg}/(p-1)$	MQ_{reg}/MQ_r
Residual	$SQ_r = \sum \sum [y_{ij} - (y_e)_i]^2$	n-p	$MQ_r = SQ_r/(n-p)$	
Falta de ajuste	$SQ_{faj} = \sum n_i [(y_e)_i - y_{im}]^2$	m-p	$MQ_{faj} = SQ_{faj}/(m-p)$	MQ_{faj}/MQ_{ep}
Erro puro	$SQ_{ep} = \sum \sum [y_{ij} - y_{im}]^2$	n-m	$MQ_{ep} = SQ_{ep}/(n-m)$	
Total	$SQ_t = \sum \sum [y_{ij} - y_m]^2$	n-1	$MQ_t = SQ_t/(n-1)$	

SQ = Soma Quadrática; GL = Graus de Liberdade; MQ = Média Quadrática; n_i = número de repetições do nível i; m = número de níveis distintos da variável x; $n = \sum n_i$ = número total de medidas; p = número de parâmetros do modelo. O índice i indica o nível da variável x; o índice j refere-se às medidas repetidas da variável y em um dado nível de x. O segundo somatório das expressões para SQ_r , SQ_{ep} e SQ_t vai de $j = 1$ até $j = n_i$. Os outros somatórios vão de $i = 1$ até $i = m$. y_m é a média de todos os valores de y; y_{im} é a média das determinações repetidas no nível i.

Teste do ajuste da curva analítica:

O valor de $f_{\text{calculado}}$ (MQ_{reg}/MQ_r) maior do que o valor de f_{tabelado} indica a falta de ajuste da curva analítica, a um determinado nível de confiança ou probabilidade, e que o modelo pode ser melhorado.

Teste da validade da regressão (linearidade):

O valor de $f_{\text{calculado}}$ ($MQ_{\text{faj}}/MQ_{\text{ep}}$) muito maior do que o valor de f_{tabelado} indica que o método é linear, a um determinado nível de confiança ou probabilidade.

Efeito matriz

O efeito matriz deve ser determinado por meio da comparação entre os coeficientes angulares das curvas de calibração construídas com a SQR do analito em solvente e com a amostra fortificada com a SQR do analito. As curvas devem ser estabelecidas da mesma forma que na linearidade para os mesmos níveis de concentração, utilizando, no mínimo, cinco concentrações diferentes em, no mínimo, triplicata. O paralelismo das retas é indicativo de ausência de interferência dos constituintes da matriz e a sua demonstração deve ser realizada por meio de avaliação estatística adequada.¹

Faixa de trabalho

A faixa de trabalho deve ser estabelecida a partir dos estudos de linearidade, juntamente com os resultados de precisão e exatidão, sendo dependente da aplicação pretendida. Para teor deve ser considerada a seguinte faixa de trabalho: de 80% (oitenta por cento) a 120% (cento e vinte por cento).¹ Segundo a orientação sobre validação de métodos analíticos do INMETRO (DOQ-CGCRE-008, 5a revisão),³ a linearidade de um procedimento analítico é a sua habilidade (dentro de uma dada faixa) em obter resultados os quais são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, a faixa de trabalho de um procedimento analítico é o intervalo entre a menor concentração e a maior concentração de analito na amostra para o qual se demonstrou que o procedimento analítico tem um nível aceitável de precisão, exatidão e linearidade, e a faixa linear de trabalho é por inferência a faixa de concentração do analito em que os resultados do método são proporcionais à concentração do analito. A Figura 3S é um exemplo de uma curva analítica com a identificação dos parâmetros de validação.

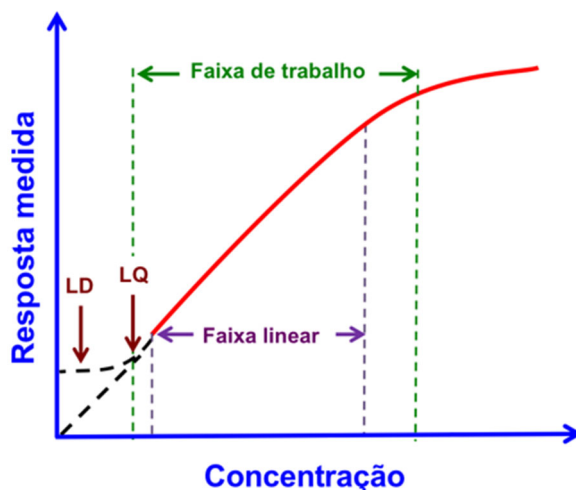


Figura 3S. Exemplo de uma curva analítica com a identificação dos parâmetros de validação: faixa de trabalho; faixa linear de trabalho; limite de detecção (LD); e limite de quantificação (LQ)

Precisão

A precisão deve avaliar a proximidade entre os resultados obtidos por meio de ensaios com amostras preparadas conforme descrito no método analítico a ser validado. A precisão deve ser expressa por meio da repetibilidade (precisão intradia), da precisão intermediária (precisão interdia) ou da reprodutibilidade. A precisão deve ser demonstrada pela dispersão dos resultados, calculando-se o coeficiente de variação (CV), também conhecido como desvio padrão relativo (DPR), da série de medições conforme a Equação 11.^{1,2}

$$CV = DPR = \frac{DP}{CMD} \times 100 \quad (11)$$

Onde: DP é o desvio padrão; CMD é a concentração média determinada.

De acordo com a RDC nº 166 de 24/07/2017 da ANVISA,¹ a determinação da repetibilidade deve obedecer aos seguintes critérios: avaliar as amostras sob as mesmas condições de operação, mesmo analista e mesma instrumentação, em uma única corrida analítica; e utilizar, no mínimo, nove determinações, contemplando o intervalo linear do método analítico, ou seja, três concentrações baixa, média e alta, com três réplicas em cada nível ou seis réplicas a 100% (cem por cento) da concentração do teste individualmente preparadas. A determinação da precisão intermediária deve obedecer aos seguintes critérios: expressar a proximidade entre os resultados obtidos da análise de

uma mesma amostra, no mesmo laboratório, em pelo menos dois dias diferentes, realizada por operadores distintos; e contemplar as mesmas concentrações e o mesmo número de determinações descritas na avaliação da repetibilidade. A reprodutibilidade deve ser obtida por meio da proximidade dos resultados obtidos em laboratórios diferentes. A reprodutibilidade é aplicável em estudos colaborativos ou na padronização de métodos analíticos para inclusão desses em compêndios oficiais, mediante testes estatísticos adequados.¹

Exatidão

A exatidão de um método analítico deve ser obtida por meio do grau de concordância entre os resultados individuais do método em estudo em relação a um valor aceito como verdadeiro. A exatidão deve ser verificada a partir de, no mínimo, nove determinações, contemplando o intervalo linear do método analítico, ou seja, três concentrações: baixa, média e alta, com três réplicas em cada nível. A exatidão deve ser expressa pela relação percentual de recuperação do analito de concentração conhecida adicionado à amostra ou pela relação entre a concentração média, determinada experimentalmente, e a concentração teórica correspondente, dada pelas Equações 12 ou 13.¹

$$\text{Recuperação} = \frac{\text{Concentração média experimental}}{\text{Concentração teórica}} \times 100 \quad (12)$$

ou

$$\text{Recuperação} = \frac{\text{CA(amostra adicionada)} - \text{CA(amostra)}}{\text{CTA}} \times 100 \quad (13)$$

Onde: CA é a concentração experimental do analito e CTA é a concentração teórica do analito adicionado.

Quando a exatidão é determinada a partir de um método anteriormente validado, deve-se considerar, em substituição ao termo “concentração teórica”, a concentração do analito determinada por meio desse.¹

Limite de detecção

Limite de detecção (LD) deve ser demonstrado pela obtenção da menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém, não necessariamente quantificado, sob as

condições experimentais estabelecidas. O limite de detecção pode ser calculado a partir do desvio padrão do intercepto com o eixo y (σ) e da inclinação da curva analítica (IC), Equação 14.¹

$$LD = \frac{3,3 \sigma}{IC} \quad (14)$$

Onde: IC é a inclinação da curva de calibração e σ é o desvio padrão e pode ser obtido de três formas:

- a partir do desvio padrão do intercepto com o eixo Y (Equações 15 e 16)⁴ de, no mínimo, três curvas de calibração construídas contendo concentrações do analito próximas ao suposto limite de detecção;

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum (y_i - \hat{y})^2}{n - 2}} \quad (15)$$

$$\sigma = S_{y/x} \sqrt{\frac{\sum x_i^2}{n \sum (x_i - \bar{x})^2}} \quad (16)$$

- a partir do desvio padrão residual da linha de regressão;
- a partir da estimativa de ruído proveniente da análise de um apropriado número de amostras do branco.

Limite de quantificação

O limite de quantificação (LQ) é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas, sendo coerente com o limite de especificação da impureza. O LQ pode ser calculado como descrito na Equação 17.¹

$$LQ = \frac{10 \sigma}{IC} \quad (17)$$

Robustez

A robustez é um parâmetro tipicamente realizado no desenvolvimento do método analítico que indica a sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações das condições analíticas. Para o método espectrofotométrico as condições analíticas que podem ser variadas são o pH e a utilização

de diferentes lotes ou fabricantes de solventes. Caso haja suscetibilidade do método a variações nas condições analíticas, essas deverão ser controladas por meio de precauções descritas no método.¹

Referências

1. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA); *RDC N° 166*, de 24/07/2017.
2. Pimentel, M. F.; Neto, B. B. Calibração: Uma Revisão para Químicos Analíticos. *Química Nova* **1996**, 3, 268.
3. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO). Orientação sobre Validação de Métodos Analíticos, DOQ-CGCRE-008, 5ª revisão, 2016.
4. Mendham, J.; Denney, R. C.; Barnes, J. D.; Thomas, M. J. K.; *Análise Química Quantitativa*, 6a ed., LTC: Rio de Janeiro, 2002.

PADRONIZAÇÃO DA SOLUÇÃO DE HIDRÓXIDO DE SÓDIO

- Pesar cerca de 0,3 g de ftalato ácido de potássio ($\text{HK}(\text{C}_8\text{H}_4\text{O}_4)$) seco por 1 - 2 h a $110\text{ }^\circ\text{C}$, em estufa, resfriado e mantido em dessecador;
- Transferir para um erlenmeyer de 125 mL, dissolver em 50-75 mL de água ultrapura;
- Adicionar 3 gotas do indicador fenolftaleína;
- Lavar uma bureta de 25 mL com aproximadamente 5 mL da solução de NaOH a ser padronizada;
- Montar um sistema de titulação com a bureta, as garras e a haste universal;
- Adicionar à bureta a solução de NaOH a ser padronizada, retirar as bolhas de ar e ajustar o zero;
- Iniciar a titulação abrindo a torneira com a mão esquerda, “agarrando” a bureta na região da torneira;
- Deixar a solução de NaOH escoar lentamente, mantendo o erlenmeyer sob agitação constante com a mão direita, até a viragem de incolor para rosa;
- Anotar o volume gasto da solução de NaOH e repetir o procedimento pelo menos mais duas vezes;
- Calcular a concentração da solução de NaOH.

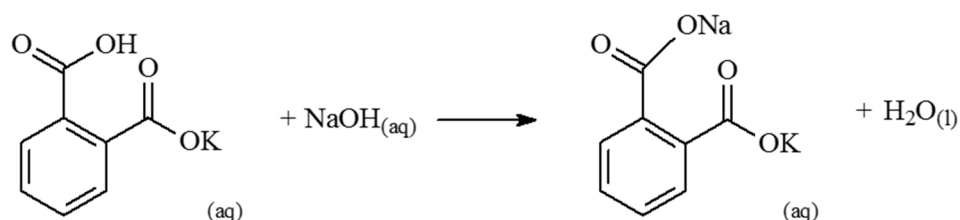


Figura 4S. Reação química da titulação de padronização da solução de NaOH com biftalato de potássio (HA)

Cálculos:

No ponto final:

$$n_{\text{HA}} = n_{\text{NaOH}} \quad (18)$$

onde: n é a quantidade de substância (mol)

Sabendo-se que:

$$n = [\quad] \cdot V \quad (19)$$

ou

$$n = \frac{m}{MM} \quad (20)$$

onde: [] é a concentração molar (mol L^{-1}); V é o volume (L); m é a massa (g); MM é a massa molar (g mol^{-1})

Substituindo-se as Equações 19 e 20 na Equação 18, tem-se:

$$\frac{m_{\text{HA}}}{MM_{\text{HA}}} = [\text{NaOH}] \cdot V_{\text{NaOH}} \quad (21)$$

onde: m_{HA} é a massa do biftalato de potássio (g); MM_{HA} é a massa molar do biftalato de potássio (g mol^{-1}); $[\text{NaOH}]$ é a concentração molar da solução de NaOH após a padronização (mol L^{-1}); V_{NaOH} é o volume da solução de NaOH que foi padronizada (L).

PADRONIZAÇÃO DA SOLUÇÃO DE ÁCIDO CLORÍDRICO

- Pesar cerca de 0,3 g de carbonato de sódio (Na_2CO_3) seco por 1 - 2 h a $200\text{ }^\circ\text{C}$, em estufa, resfriado e mantido em dessecador;
- Transferir para um erlenmeyer de 125 mL, dissolver em 50-75 mL de água ultrapura;
- Adicionar 3 gotas do indicador alaranjado de metila;
- Lavar uma bureta de 25 mL com aproximadamente 5 mL da solução de HCl a ser padronizada;
- Montar um sistema de titulação com a bureta, as garras e a haste universal;
- Adicionar à bureta a solução de HCl a ser padronizada, retirar as bolhas de ar e ajustar o zero;
- Iniciar a titulação abrindo a torneira com a mão esquerda, “agarrando” a bureta na região da torneira;
- Deixar a solução de HCl escoar lentamente, mantendo o erlenmeyer sob agitação constante com a mão direita, até a viragem de amarelo para vermelho;

- Anotar o volume gasto da solução de HCl e repetir o procedimento pelo menos mais duas vezes;
- Calcular a concentração da solução de HCl.

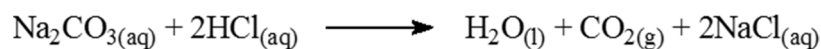


Figura 5S. Reação química da titulação de padronização da solução de HCl com carbonato de sódio (B)

Cálculos:

No ponto final:

$$n_{\text{HA}} = (n_{\text{B}}) \times 2 \quad (22)$$

onde: n é a quantidade de substância (mol)

Sabendo-se que:

$$n = [\] \cdot V \quad (23)$$

ou

$$n = \frac{m}{\text{MM}} \quad (24)$$

onde: [] é a concentração molar (mol L^{-1}); V é o volume (L); m é a massa (g); MM é a massa molar (g mol^{-1})

Substituindo-se as Equações 23 e 24 na Equação 22, tem-se:

$$[\text{HCl}] \cdot V_{\text{HCl}} = \left(\frac{m_{\text{B}}}{\text{MM}_{\text{B}}} \right) \times 2 \quad (25)$$

onde: $[HCl]$ é a concentração molar da solução de HCl após a padronização (mol L^{-1}); V_{HCl} é o volume da solução de HCl que foi padronizada (L); m_B é a massa do carbonato de sódio (g); MM_B é a massa molar do carbonato de sódio (g mol^{-1}).

QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDO ACETILSALICÍLICO EM COMPRIMIDOS UTILIZANDO-SE A TITULAÇÃO DE RETORNO ÁCIDO-BASE

- Pesar e pulverizar 20 comprimidos;
- Transferir quantidade do pó equivalente a 0,250 g de ácido acetilsalicílico para três erlenmeyers de 125 mL;
- Adicionar 15 mL da solução de hidróxido de sódio $0,500 \text{ mol L}^{-1}$ padronizada;
- Ferver cuidadosamente por 10 minutos;
- Esperar esfriar;
- Adicionar 3 gotas do indicador vermelho de fenol;
- Lavar uma bureta de 25 mL com aproximadamente 5 mL da solução de HCl $0,500 \text{ mol L}^{-1}$ padronizada;
- Montar um sistema de titulação com a bureta, as garras e a haste universal;
- Iniciar a titulação abrindo a torneira com a mão esquerda, “agarrando” a bureta na região da torneira;
- Deixar a solução de HCl $0,500 \text{ mol L}^{-1}$ escoar lentamente, mantendo o erlenmeyer sob agitação constante com a mão direita, até a viragem de vermelho para amarelo;
- Determinar o teor de ácido acetilsalicílico no medicamento (Cada mL de NaOH $0,500 \text{ mol L}^{-1}$ equivale a 45,040 mg de ácido acetilsalicílico);
- Realizar a determinação do teor de ácido acetilsalicílico no medicamento em triplicata.

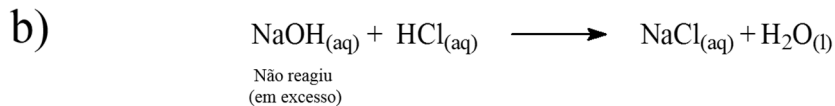
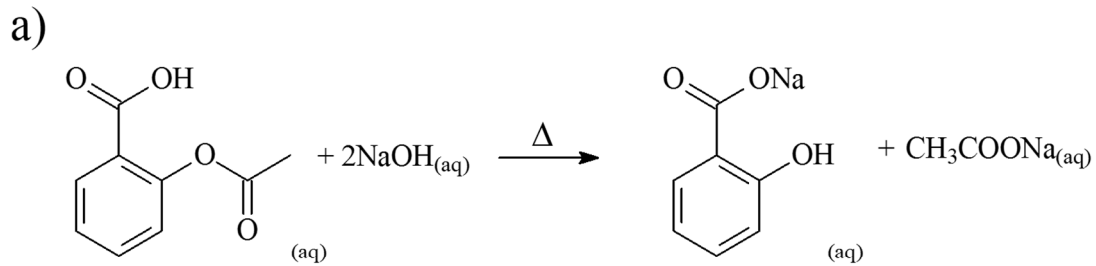


Figura 6S. Reações químicas envolvidas na titulação de retorno ácido-base para a quantificação de AAS em Apirina®. (a) Reação química do AAS com o NaOH sob aquecimento; (b) Reação química da titulação da solução padrão de NaOH 0,500 mol L⁻¹ em excesso com a solução padrão de HCl 0,500 mol L⁻¹

Cálculos:

No ponto final:

$$n_{\text{NaOH}} = n_{\text{HCl}} \quad (26)$$

onde: n é a quantidade de substância (mol)

Para calcular a quantidade de substância inicial de NaOH ($n_{\text{NaOH}i}$) utiliza-se a Equação 27.

$$n_{\text{NaOH}i} = [\text{NaOH}] \cdot V_{\text{NaOH}} \quad (27)$$

onde: [] é a concentração molar (mol L⁻¹); V é o volume (L);

Para calcular a quantidade de substância de NaOH que reagiu ($n_{\text{NaOH}r}$) utiliza-se a Equação 28.

$$n_{\text{NaOH}r} = n_{\text{NaOH}i} - n_{\text{HCl}} \quad (28)$$

onde: n_{NaOHr} é a quantidade de substância de NaOH que reagiu com o AAS (mol); n_{NaOHi} é a quantidade de substância de NaOH adicionada inicialmente (mol); e n_{HCl} é a quantidade de substância de HCl necessária para neutralizar o NaOH que não reagiu (em excesso) (mol).

Para calcular a quantidade de substância de ASS utiliza-se a Equação 29.

$$n_{\text{AAS}} = \frac{n_{\text{NaOHr}}}{2} \quad (29)$$

onde: n_{AAS} é a quantidade de substância de AAS (mol); e n_{NaOHr} é a quantidade de substância de NaOH que reagiu com o AAS (mol).

Em seguida, para calcular a massa de AAS utiliza-se a Equação 30.

$$n_{\text{AAS}} = \frac{m_{\text{AAS}}}{\text{MM}_{\text{AAS}}} \quad (30)$$

onde: n_{AAS} é a quantidade de substância de AAS (mol); m_{AAS} é a massa de AAS (g); MM_{AAS} é a massa molar do AAS (g mol^{-1})

Uma outra alternativa para calcular a massa (g) de ASS na amostra analisada, por meio do volume da solução de NaOH que reagiu com AAS sob aquecimento, com proporção de 1 AAS para 2NaOH, é apresentada a seguir:

$$n_{\text{ASS}} = \frac{n_{\text{NaOH}}}{2} = \frac{[\text{NaOH}] \cdot V_{\text{NaOH}}}{2} \quad (31)$$

Supondo-se que a concentração da solução de NaOH seja igual a $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ é possível calcular a massa de AAS por mililitro ($1,0 \times 10^{-3} \text{ L}$) de NaOH que reagiu, substituindo-se o valor de n_{AAS} na Equação 30:

$$n_{\text{ASS}} = \frac{n_{\text{NaOH}}}{2} = \frac{0,5 \cdot 1,0 \times 10^{-3}}{2} = 2,5 \times 10^{-4} \text{ mol}$$

$$m_{\text{AAS}} = n_{\text{AAS}} \cdot \text{MM}_{\text{AAS}} = 2,5 \times 10^{-4} \cdot 180,16 = 45,040 \text{ mg}$$

onde: MM_{AAS} é igual a $180,16 \text{ g mol}^{-1}$.

Referências

1. Alam, M. M.; Akhtar, M.; Husain, A.; Shaquiquzzaman, M.; *Practical Pharmaceutical Analytical Chemistry*, 1a ed., Elsevier: New Delhi, 2011.
2. Harris, D. C.; *Análise Química Quantitativa*, 9ª ed., LTC: Rio de Janeiro, 2017.
3. Mendham, J.; Denney, R. C.; Barnes, J. D.; Thomas, M. J. K.; *Análise Química Quantitativa*, 6ª ed., LTC: Rio de Janeiro, 2002.
4. Skoog, D. A.; West, D. M.; Holler, F. J.; Crouch, S. R.; *Fundamentos de Química Analítica*, 9ª ed., Cengage Learning: São Paulo, 2014.
5. Farmacopeia Brasileira, Agência Nacional de Vigilância Sanitária: Brasília, 2010, p. 863.

