

VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO POR ESPECTROFOTOMETRIA UV PARA SISTEMA EMULSIONADO LIPÍDICO CONTENDO BENZNIDAZOL

Letícia Streck, Kátia Solange Cardoso Rodrigues dos Santos, Matheus de Freitas Fernandes-Pedrosa e Arnóbio Antônio da Silva-Júnior*

Departamento de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Av. Gal. Gustavo Cordeiro de Farias, s/n, 59012-570 Natal - RN, Brasil

Anselmo Gomes de Oliveira

Departamento de Farmácia, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Rodovia Araraquara-Jau km 1, Universidade Estadual Paulista, 14800-900 Araraquara - SP, Brasil

Recebido em 22/10/10; aceito em 21/2/11; publicado na web em 5/5/11

VALIDATION OF AN ANALYTICAL METHOD BY UV SPECTROPHOTOMETRY FOR LIPID EMULSION SYSTEM CONTAINING BENZNIDAZOL. A validation study of an UV spectrophotometric method was conducted for quantitative analysis of benznidazol (BZN) in a lipid. The analytical determinations were performed at 315 nm at 25 °C. The emulsion components did not interfere on drug analyses, demonstrating the specificity of the methodology. A good linearity ($r = 0.99995$) and precision (RSD $< 5.0\%$) for intra and inter-day studies, including the reproducibility test were observed. The accuracy ranged of 102.1 ± 2.8 e $103.8 \pm 1.7\%$. The statistical analysis demonstrates a linear, precise, accurate and robust method for BZN quantification from the lipid emulsion system.

Keywords: benznidazol; lipid emulsions; UV-Vis spectrophotometry.

INTRODUÇÃO

As doenças parasitárias continuam sendo um obstáculo para o desenvolvimento social e econômico dos países mais pobres e são, frequentemente, chamadas de “doenças negligenciadas”, “doenças órfãs” ou “doenças tropicais”.¹ A doença de Chagas, infecção causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, constitui um dos principais problemas em saúde pública dos países em desenvolvimento.² Na América Latina a morbidade e a mortalidade associada com a doença de Chagas possuem maior magnitude quando comparada à malária, esquistossomose e leishmaniose.^{2,3}

O benznidazol (BZN) não é somente o fármaco de escolha para o tratamento da doença de Chagas, mas também o único comercializado na América Latina.⁴ O BZN (Figura 1) é um fármaco nitro-heterocíclico (N-benzil-2-nitroimidazole 1-acetamida) com atividade antiprotozoária e antibactericida. A maior limitação deste fármaco é a atividade antiparasitária insuficiente na fase crônica da doença, na qual menos de 80% dos pacientes tratados são curados parasitologicamente, de acordo com os critérios clássicos indicados sobre infecções agudas.⁵

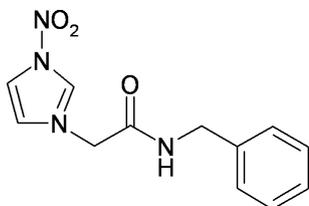


Figura 1. Representação esquemática da estrutura química do benznidazol

*e-mail: arnobiosilva@ufrnet.br

O BZN está disponível para administração oral na forma de comprimidos, apresentando assim limitações associadas com a absorção oral, devido a sua baixa solubilidade. O desenvolvimento de sistemas que contribuam para o aumento da biodisponibilidade do fármaco, ou aumento da concentração nas células/tecidos infectados reflete diretamente no aumento da eficiência terapêutica do benznidazol e, conseqüentemente, no sucesso da terapia da doença de Chagas.³⁻⁶ Neste segmento as emulsões/microemulsões lipídicas apresentam-se como uma alternativa interessante para o aumento da biodisponibilidade oral do fármaco.

As microemulsões (ME) podem ser definidas como sistemas termodinamicamente estáveis, isotrópicos, transparentes, de dois líquidos imiscíveis, usualmente água e óleo, um dividido (fase interna) no interior do outro (fase externa), estabilizados por um filme de compostos tensoativos, localizados na interface óleo/água.⁷ A formação destes sistemas geralmente envolve a combinação de três a cinco componentes, tais como tensoativo, água, óleo e, quando necessário, o cotensoativo.⁷⁻¹³ A principal característica das microemulsões (ME) é formar espontaneamente a fase interna por homogeneização dos componentes da fórmula, cujas dimensões das gotículas da fase interna são da ordem de nanômetros. Sua estabilidade termodinâmica oferece vantagens sobre as dispersões instáveis, tais como as suspensões e emulsões.¹⁰⁻¹⁴ Assim como com as MEs, as nanoemulsões também possuem gotículas da ordem de nanômetros, mas não são termodinamicamente estáveis.¹⁴ As ME são superiores às dispersões micelares em termos de potencial de solubilização de substâncias, por isso, são usadas para aumentar a solubilização e a absorção de fármacos lipofílicos.¹⁵

Ao longo do tempo, alguns métodos analíticos para quantificação do BZN têm sido divulgados utilizando diversas técnicas como eletroquímica, polarografia, espectrofotometria UV e cromatografia líquida de alta eficiência,¹⁶ no entanto, a grande maioria destes estudos

descreve a determinação analítica do fármaco a partir de fluidos biológicos. Em 2006, Soares Sobrinho e colaboradores¹⁷ desenvolveram e validaram um método analítico para o doseamento do BZN a partir de comprimidos por espectrofotometria de UV-Vis. O método preconiza a dissolução do BZN em etanol e posterior dissolução em água para a análise no comprimento de onda de 324 nm. Recentemente, adaptações deste método foram aplicadas para a validação de um teste de dissolução para comprimidos contendo BZN¹⁸ e em um estudo de caracterização físico-química do BZN, especificamente nos ensaios de solubilidade do fármaco em diversos solventes.¹⁹

A Farmacopeia Portuguesa não apresenta um método analítico para o BZN,²⁰ enquanto a Farmacopeia Brasileira descreve o método analítico para o BZN a partir de comprimidos por espectrofotometria de UV em 316 nm utilizando HCl 0,1 mol L⁻¹ como meio de dissolução.²¹ Devido à falta de métodos nos compêndios oficiais para sistemas emulsionados lipídicos contendo BZN, o desenvolvimento e a validação de um método simples, rápido e acessível, que assegure a qualidade dos resultados apresentados é uma etapa fundamental no desenvolvimento do produto.

O objetivo do presente estudo foi investigar o efeito dos componentes da formulação na análise quantitativa do BZN a partir de sistemas emulsionados à base de óleo de soja e validar um método simples, específico, rápido e viável por espectrofotometria de UV. O estudo seguiu os critérios descritos para a validação de métodos analíticos para fármacos e medicamentos estabelecidos pelo *International Conference on Harmonisation* (ICH) e pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).^{22,23}

PARTE EXPERIMENTAL

Materiais e métodos

Reagentes e amostras

O BZN (Roche®, Brasil) foi cedido pelo Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco. A fosfatidilcolina de soja (lipóide s100®) foi adquirida da Gerbras® (Brasil). O óleo de soja, o oleato de sódio (82% ácidos graxos como ácido oleico) e o Tween® 80 foram adquiridos da Sigma-Aldrich (EUA). O álcool etílico P.A. e metanol P.A. foram adquiridos da Labsynth® (Brasil). Os sistemas emulsionados foram preparados pela técnica de inversão de fase, utilizando ultra-turrax IKA, modelo T18 no Laboratório de Tecnologia e Biotecnologia Farmacêutica da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN).

Equipamentos e condições de análises

Os equipamentos utilizados no presente estudo foram os espectrofotômetros Biochrom®, Libra S32 (Cambridge, UK) e o Thermo Scientific®, evolution 60S (Miami, USA). Todas as análises foram realizadas a 25 °C na faixa de 200 a 400 nm, com cubeta de quartzo de 1 cm e álcool etílico como branco. A balança utilizada possui quatro casas e a vidraria e micropipetas utilizadas permitem a observação de erro de 1%.

Solução padrão e amostras

Para a validação do método analítico, foi preparada a solução estoque do BZN em metanol na concentração de 500,0 µg mL⁻¹, e posteriormente uma alíquota foi transferida para balão volumétrico de 10,00 mL e diluída com álcool etílico para atingir a concentração de 20,0 µg mL⁻¹. A análise desta solução foi realizada em espectrofotômetro UV-Vis na faixa entre 200 a 400 nm para identificar o comprimento de onda de máxima absorção no sistema solvente escolhido. Para o preparo das amostras contendo a emulsão ou componentes da emulsão, após a dispersão da amostra em metanol, a

solução foi filtrada em membrana de 0,45 µm e o volume completado com metanol. Alíquotas adequadas deste filtrado foram transferidas e o volume completado com álcool etílico.

Especificidade e seletividade

A especificidade e a seletividade do método foram avaliadas através da comparação dos espectros de absorção obtidos na região de 200-400 nm da (a) solução de BZN 20,0 µg mL⁻¹; (b) solução de BZN incorporado no sistema emulsionado 20,0 µg mL⁻¹ e (c) solução da matriz contendo quantidade equivalente dos componentes presentes na emulsão (fosfatidilcolina de soja, oleato de sódio, óleo de soja e tween® 80). As amostras foram preparadas e analisadas utilizando o mesmo procedimento experimental apresentado no item anterior.

Construção da curva padrão

A solução estoque de 500,0 µg mL⁻¹ de benznidazol foi preparada em metanol. Diferentes alíquotas desta solução foram transferidas para balão volumétrico de 10,00 mL e diluídas com álcool etílico a fim de se obter soluções com concentração na faixa de 2,50 a 40,0 µg mL⁻¹ (n = 5). A absorbância foi medida no comprimento de onda de 315 nm.

Linearidade e intervalo

A linearidade foi avaliada na faixa de concentração (2,50-40,0 µg mL⁻¹) utilizada para construção de cinco curvas padrão, obtidas em nove níveis de concentração. O coeficiente de correlação foi obtido através da regressão linear pelo método dos mínimos quadrados e os dados foram ainda submetidos à análise de variância (ANOVA).

Precisão

O teste de precisão pode avaliar os critérios de repetibilidade, precisão intermediária e de reprodutibilidade.^{22,23} Neste estudo, a precisão foi avaliada quanto à precisão intracorrída (repetibilidade), intercorrídas (precisão intermediária) e interlaboratorial (reprodutibilidade). Em todos os ensaios foram investigados cinco níveis de concentração em triplicata, sendo duas baixas (10,0 e 15,0 µg mL⁻¹), uma intermediária (20,0 µg mL⁻¹) e duas altas (25,0 e 30,0 µg mL⁻¹). O ensaio de repetibilidade foi realizado no mesmo dia e nas mesmas condições de análise, enquanto a precisão intercorrídas foi realizada em intervalos de 48 h e com analistas diferentes.

Exatidão

A exatidão do método foi avaliada pela adição e recuperação de padrão em cinco níveis de concentração e em triplicata. Em 1000 mg de emulsão foram adicionados e misturados 25,0 mg de BZN; após a dissolução, a amostra foi filtrada e o volume completado em balão volumétrico de 50,0 mL com álcool etílico. Diferentes alíquotas desta solução foram transferidas para balão volumétrico de 10,00 mL e o volume completado com álcool etílico a fim de obter diferentes concentrações (10, 15, 20, 25, 30 µg mL⁻¹). A exatidão foi expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente, conforme a Equação 1.

$$\text{Exatidão} = \left[\frac{\text{Concentração média experimental}}{\text{Concentração teórica}} \right] \times 100 \quad (1)$$

Robustez

Para verificar a robustez do método foram avaliadas diferentes proporções entre os solventes (metanol:álcool etílico) utilizados na preparação da solução estoque (100% metanol, 75% metanol, 50% metanol). O ensaio foi realizado investigando cinco níveis de concentração (10, 15, 20, 25, 30 µg mL⁻¹).

Análise estatística

Os resultados obtidos nos ensaios de precisão intra, intercorridas e de reprodutibilidade foram submetidos ao teste *t* de Student para avaliar possíveis diferenças estatísticas. Os resultados obtidos nos estudos de linearidade, exatidão e robustez foram submetidos à análise de variância (ANOVA). Para confronto dos valores médios estatisticamente diferentes, foi utilizado o teste de Dunnet no ensaio de robustez para comparações em relação a um grupo controle, sendo considerados significativamente diferentes os valores de $p < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Validação do método

Com o objetivo de observar o comprimento de onda de maior absorção do BZN no solvente escolhido, foi realizada análise da solução de fármaco na concentração de $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ para obtenção do espectro de varredura no intervalo de 200-400 nm (Figura 2a). O comprimento de onda de máxima absorção escolhido para as análises quantitativas foi de 315 nm.

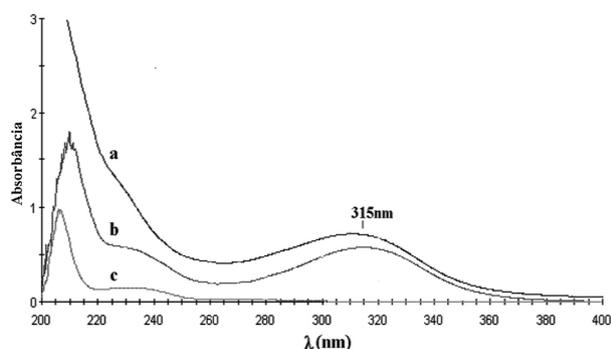


Figura 2. Espectros de absorção da (a) solução de BZN ($20 \mu\text{g mL}^{-1}$), (b) solução de BZN incorporada no sistema emulsionado ($20 \mu\text{g mL}^{-1}$) e (c) sistema emulsionado sem fármaco

A fim de verificar a especificidade e seletividade do método, foram obtidos os espectros de varredura da solução de BZN a $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Figura 2b), na presença de componentes do sistema emulsionado e da solução contendo apenas o sistema emulsionado, sem fármaco (Figura 2c), nas mesmas condições de análise da solução padrão de fármaco. O ensaio de especificidade e seletividade descreve a capacidade do método identificar e mensurar a quantidade fármaco na presença de impurezas, excipientes ou produtos de degradação.^{22,23} Os diferentes espectros de varredura (Figura 2) demonstram a eficiência do método quanto a este ensaio, pois os componentes não absorvem na região do comprimento de onda (315 nm) utilizado para a análise quantitativa do fármaco.

A curva padrão do BZN foi construída para a faixa de concentração de $2,5$ a $40 \mu\text{g mL}^{-1}$. A equação de regressão linear obtida foi $A = 0,02858 C - 0,00721$ (A = absorbância; C = concentração). O estudo de linearidade foi realizado através da análise dos resultados obtidos de cinco curvas analíticas na faixa de concentração de $2,5$ a $40 \mu\text{g mL}^{-1}$. O coeficiente de correlação obtido ($r = 0,99995$) a partir dos valores médios de absorbância acrescidos dos desvios padrão versus a concentração de fármaco demonstrou a boa linearidade do método. Os dados foram ainda submetidos à análise de variância, a qual demonstrou que a regressão linear foi estatisticamente significativa e sem falta de ajustes ($p < 0,05$) (dados não mostrados).

A precisão é um importante parâmetro analítico e representa a variação dos resultados em uma série de análises de uma amostra em condições semelhantes ou diferentes de análises.^{19,20} Neste estudo, a precisão foi investigada em triplicata para diferentes níveis de concentração ($10, 15, 20, 25$ e $30 \mu\text{g mL}^{-1}$). A Tabela 1 apresenta os resultados obtidos para os testes de precisão intracorrida (repetibilidade) e intercorridas (precisão intermediária).

Os resultados obtidos no estudo de precisão intra e intercorridas demonstraram a precisão do método. Em ambos os ensaios foram observados valores de coeficiente de variação (CV) inferiores a 5%.^{22,23} Os resultados obtidos para cada concentração investigada nos dois ensaios foram ainda submetidos ao teste *t* de Student para avaliar uma possível diferença estatística. Como demonstrado na Tabela 1, não houve diferença estatística ($p < 0,05$) entre os valores determinados no ensaio intracorrida daqueles determinados em diferentes dias e com diferentes analistas. O resultado da análise estatística confirma a análise da precisão do método para os diferentes ensaios.

O estudo de precisão interlaboratorial foi realizado com o objetivo de avaliar mudanças como as condições de trabalho, analistas, equipamentos e implementos utilizados. Para isto, foram avaliadas três determinações para cada concentração ($10, 15, 20, 25$ e $30 \mu\text{g mL}^{-1}$) em dois laboratórios diferentes utilizando equipamentos distintos (Tabela 2).

Os resultados experimentais (Tabela 2) confirmam os estudos de precisão intra e intercorridas. Os valores de CV observados foram menores que 5%, indicado que as mudanças inseridas no teste não foram capazes de alterar a precisão do método. O estudo foi amplo e para cinco níveis de concentração em triplicata. Os dados obtidos nos diferentes laboratórios para cada concentração investigada foram submetidos ao teste *t* de Student e não foi observada diferença estatística entre os diferentes conjuntos de medidas realizadas ($p < 0,05$).

Após investigar os diferentes níveis de precisão do método, foi realizado o ensaio de recuperação. A exatidão do método pode ser expressa como a porcentagem da recuperação de uma quantidade conhecida de fármaco adicionado à amostra. Esta amostra pode ser a forma farmacêutica ou somente o placebo (mistura

Tabela 1. Resultados obtidos para os ensaios de repetibilidade e precisão intermediária ($n = 3$)

| Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$) | Precisão intracorrida | | Precisão intercorridas | | Teste <i>t</i> de Student (<i>p</i>) |
|--|--|--------|--|--------|--|
| | Média \pm DP ($\mu\text{g mL}^{-1}$) | CV (%) | Média \pm DP ($\mu\text{g mL}^{-1}$) | CV (%) | |
| 10,0 | 10,0 \pm 0,2 | 1,85 | 9,8 \pm 0,3 | 3,44 | 0,352 |
| 15,0 | 14,7 \pm 0,1 | 0,77 | 14,5 \pm 0,6 | 4,05 | 0,618 |
| 20,0 | 19,6 \pm 0,3 | 1,72 | 19,5 \pm 0,6 | 2,96 | 0,777 |
| 25,0 | 24,8 \pm 0,3 | 1,43 | 23,8 \pm 0,7 | 2,84 | 0,085 |
| 30,0 | 29,8 \pm 0,6 | 1,97 | 28,5 \pm 0,9 | 3,18 | 0,102 |

CV = coeficiente de variação; DP = desvio padrão

Tabela 2. Resultados obtidos para o ensaio de reprodutibilidade (n = 3)

| Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$) | Laboratório A | | Laboratório B | | Teste <i>t</i> de Student (p) |
|--|--|--------|--|--------|-------------------------------|
| | Média \pm DP ($\mu\text{g mL}^{-1}$) | CV (%) | Média \pm DP ($\mu\text{g mL}^{-1}$) | CV (%) | |
| 10,0 | 10,4 \pm 0,4 | 3,79 | 9,9 \pm 0,3 | 3,34 | 0,258 |
| 15,0 | 15,8 \pm 0,6 | 3,67 | 15,6 \pm 0,8 | 4,99 | 0,811 |
| 20,0 | 20,6 \pm 0,8 | 3,73 | 20,5 \pm 0,9 | 4,48 | 0,847 |
| 25,0 | 25,6 \pm 0,9 | 3,46 | 25,5 \pm 0,8 | 3,19 | 0,928 |
| 30,0 | 30,6 \pm 1,4 | 4,56 | 29,9 \pm 0,8 | 2,82 | 0,436 |

CV= coeficiente de variação; DP= desvio padrão

dos excipientes). O ensaio de exatidão descreve ainda o grau de veracidade dos resultados obtidos da análise quantitativa.^{22,23} Para o presente estudo foram investigados cinco níveis de concentração (10, 15, 20, 25 e 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$) em triplicata, utilizando o ensaio do placebo contaminado. Os resultados do ensaio estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Resultados obtidos no ensaio de exatidão (n = 3)

| Concentração teórica ($\mu\text{g mL}^{-1}$) | Concentração experimental \pm DP ($\mu\text{g mL}^{-1}$) | Recuperação \pm DP (%) | CV (%) |
|--|--|--------------------------|--------|
| 10,0 | 10,4 \pm 0,2 | 103,8 \pm 1,7 | 1,7 |
| 15,0 | 15,4 \pm 0,4 | 103,0 \pm 2,6 | 2,5 |
| 20,0 | 20,4 \pm 0,6 | 102,1 \pm 2,8 | 2,8 |
| 25,0 | 25,7 \pm 0,5 | 102,8 \pm 1,8 | 1,8 |
| 30,0 | 30,7 \pm 1,3 | 102,5 \pm 4,4 | 4,3 |

CV= coeficiente de variação; DP= desvio padrão

O limite estabelecido do nível de recuperação aceitável para produtos farmacêuticos no Brasil está entre 80-120%.²³ O ensaio de exatidão realizado para as diferentes concentrações investigadas demonstrou a exatidão do método para a análise quantitativa do BZN a partir do sistema emulsionado estudado. O nível de recuperação variou entre 102,1 a 103,8%, sendo que os dados experimentais do ensaio de recuperação foram submetidos à análise de variância (ANOVA *one way*) e não foi observada diferença estatística significativa [$F(4,10) = 0,133$; $p = 0,967$] entre os valores de recuperação obtidos (n=5) para os cinco níveis de concentração investigados (10-30 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Estes resultados demonstram que o método pode ser aplicado com segurança.

O sucesso do método quanto à eficiência na recuperação ocorreu devido à escolha do sistema solvente para dispersão da amostra. Ao adicionar metanol ocorre a quebra do sistema emulsionado e a consequente dispersão dos componentes da formulação, incluindo os componentes insolúveis em água e o fármaco. O uso do álcool etílico como solvente na diluição da solução amostra garante a manutenção dos componentes da formulação solubilizados e estes não interferem na análise do fármaco, conforme demonstrado no ensaio de seletividade (Figura 2).

A robustez consiste em um ensaio que permite avaliar a capacidade do método analítico de resistir a possíveis alterações de parâmetros analíticos importantes como pH, força iônica, temperatura, solventes, entre outras condições.^{22,23} Neste estudo, a preparação das amostras envolveu a dissolução em metanol e posterior diluição com álcool etílico para análise em espectrofotômetro. Como parâmetro de robustez foi apresentada uma ampla variação na razão de metanol/álcool etílico utilizada para a dissolução inicial da amostra, pois quando foi utilizada uma marca diferente de cada solvente, os resultados obtidos para cada concentração investigada nos dois ensaios foram

submetidos ao teste *t* de Student e não foram observadas diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$). Assim, foram investigadas duas variações grandes em relação ao solvente usado (100%) no método analítico: 50 e 75%. Os resultados obtidos no ensaio estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Resultados obtidos no ensaio de robustez utilizando diferentes proporções de metanol na dissolução da amostra (n = 3)

| Concentração teórica ($\mu\text{g mL}^{-1}$) | Concentração experimental \pm DP ($\mu\text{g mL}^{-1}$) | | | CV (%) |
|--|--|----------------|----------------|--------|
| | (50%) | (75%) | (100%) | |
| 10,0 | 10,3 \pm 0,7 | 10,5 \pm 0,5 | 10,1 \pm 0,0 | 4,57 |
| 15,0 | 15,4 \pm 0,7 | 15,0 \pm 0,4 | 14,9 \pm 0,3 | 3,49 |
| 20,0 | 20,5 \pm 1,1 | 20,0 \pm 1,0 | 20,0 \pm 0,7 | 4,59 |
| 25,0 | 25,4 \pm 1,2 | 24,8 \pm 1,0 | 25,1 \pm 0,7 | 3,68 |
| 30,0 | 32,7 \pm 0,1* | 30,7 \pm 0,9 | 29,8 \pm 0,5 | 1,44 |

Estatisticamente diferente 100% ($p < 0,05$)

Mesmo com a ampla faixa de variação na composição do solvente utilizado para a dissolução da amostra, não foi verificada alteração relevante nos parâmetros de recuperação e precisão do método. Para todos os níveis de concentração investigados, o coeficiente de variação (CV) obtido foi inferior a 5%. Todas as análises foram realizadas em triplicata, preservando as mesmas condições. Além disso, após submeter os dados experimentais obtidos para cada concentração, a análise de variância (ANOVA *one way*) não apresentou diferença estatística significativa para as concentrações de 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ [$F(2,6) = 0,423$; $p = 0,673$]; 15 $\mu\text{g mL}^{-1}$ [$F(2,6) = 0,872$; $p = 0,465$]; 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ [$F(2,6) = 0,253$; $p = 0,784$] e 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ [$F(2,6) = 0,279$; $p = 0,766$]. Quando a variação da razão de metanol foi de 50%, foi observada diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle (100%) [$F(2,6) = 16,526$; $p = 0,04$]. Esta mesma diferença não ocorreu para a concentração de 75%, a qual está bem mais próxima da condição real de análise planejada para o método de análise quantitativa para o BZN no sistema emulsionado investigado. É interessante ressaltar que a concentração escolhida para a análise quantitativa do fármaco no sistema emulsionado foi aquela localizada no meio da curva padrão (25 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Estes resultados demonstram a robustez do método perante a variação tão ampla na proporção dos solventes utilizados.

CONCLUSÃO

A validação do método analítico para o BZN, a partir do sistema emulsionado lipídico por espectrofotometria de UV, demonstrou especificidade e linearidade dentro da faixa de concentração empregada. Os parâmetros analíticos investigados indicam um método simples, rápido, preciso, exato e que pode ser aplicado com segurança e confiabilidade na determinação do teor de fármaco incorporado na emulsão lipídica.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq/MCT) pelo apoio financeiro concedido (Processo nº 479195/20080).

REFERÊNCIAS

1. Nwaka, S.; Ridley, R. G.; *Nature Rev. Drug Discov.* **2003**, *2*, 919.
2. Lamas, M. C.; Villaggi, L.; Nocito, I.; Bassani, G.; Leonardi, D.; Pascutti, F.; Serra, E.; Salomón, C. J.; *Int. J. Pharm.* **2006**, *307*, 239.
3. Soares Sobrinho, J. L.; Lima, L. N. A.; Perrelli, D. C.; Silva, J. L.; Medeiros, F. P. M.; Soares, M. F. L. R.; Rolim Neto, P. J.; *Braz. J. Pharm. Sci.* **2008**, *44*, 383.
4. Schofield, C. J.; Jannini, J.; Salvatella, R.; *Trends Parasitol.* **2006**, *22*, 583.
5. Cançado, J. R. *Rev. Inst. Med. Trop.* **2002**, *4*, 29.
6. Soares Sobrinho, J. L.; Medeiros, F. P. M.; La Roca, M. F.; Silva, K. E. R.; Lima, L. N. A.; Rolim Neto, P. J.; *Rev. Patol. Trop.* **2007**, *36*, 103.
7. Dalmora, M. E. A.; Oliveira, A. G.; *Int. J. Pharm.* **1999**, *184*, 157.
8. Oliveira, A. G.; Scarpa, M. V.; Chaimovich, H.; *J. Pharm. Sci.* **1997**, *86*, 616.
9. Formariz, T. P.; Urban, M. C. C.; Silva-Júnior, A. A.; Gremião, M. P. D.; Oliveira, A. G.; *Braz. J. Pharm. Sci.* **2005**, *41*, 301.
10. Formariz, T. P.; Sarmiento, V. H. V.; Silva-Júnior, A. A.; Scarpa, M. V.; Santilli, C.; Oliveira, A. G.; *Colloids Surf., B* **2006**, *51*, 54.
11. Formariz, T. P.; Chiavacci, L.; Sarmiento, V. H. V.; Franzini, C. M.; Silva-Júnior, A. A.; Scarpa, M. V.; Santilli, C.; Egito, E. S. T.; Oliveira, A. G.; *Colloids Surf., B* **2008**, *63*, 287.
12. Formariz, T. P.; Chiavacci, L. A.; Scarpa, M. V.; Silva-Júnior, A. A.; Egito, E. S. T.; Terrugi, C. H. B.; Franzini, C. M.; Sarmiento, V. H. V.; Oliveira, A. G.; *Colloids Surf., B* **2010**, *77*, 47.
13. Oliveira, A. G.; Scarpa, M. V.; Correa, M. A.; Cera, L. F. R.; Formariz, T. P.; *Quim. Nova* **2004**, *27*, 131.
14. Constantinides, P. P.; Chaubal, M. V.; Shorr, R.; *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2008**, *60*, 757.
15. Constantinides, P. P.; Tustian, A.; Kessler, D. R.; *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2004**, *56*, 1243.
16. Da Silva, A. L. M.; Soares Sobrinho, J. L.; Rolim Neto, P. J.; Da Silva, M. F. R.; De Medeiros, F. P. M.; De Lima, L. G.; *Quim. Nova* **2007**, *30*, 1163.
17. Soares Sobrinho, J. L.; Silva, A. L. M.; Moraes, F. P.; Grangeiro Junior, S.; Rolim Neto, P. J.; *Rev. Bras. Farm.* **2006**, *87*, 78.
18. de Lima, A. A. N.; Soares Sobrinho, J. L.; da Silva, J. L.; Corrêa Júnior, R. A. C.; Lyra, M. A. M.; Rolim Neto, P. J.; *Quim. Nova* **2009**, *32*, 2196.
19. Maximiano, F. P.; Costa, G. H. Y.; de Souza, J.; Cunha-Filho, M. S. S.; *Quim. Nova* **2010**, *33*, 1714.
20. *Farmacopeia Portuguesa*, 7ª ed., Imprensa Nacional de Lisboa: Lisboa, 2002.
21. *Farmacopeia Brasileira*, 4ª ed. Atheneu: Rio de Janeiro, 2002.
22. International Conference on Harmonisation – ICH; *International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Validation of Analytical Procedures: Methodology*, 1996.
23. Brasil, Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA); Resolução RE Nº899, de 29/05/2003, *Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos*.