



Métodos de Determinação do Ornidazol em Comprimidos Revestidos: Desenvolvimento, Validação e Comparação Estatística

Mônica F.L.R. SOARES ^{1,2}, José L. SOARES-SOBRINHO ¹, Severino GRANGEIRO-JÚNIOR ³,
Keyla E.R. SILVA ¹ & Pedro J. ROLIM-NETO ^{1*}

¹ Laboratório de Tecnologia dos Medicamentos - LTM. Departamento de Ciências Farmacêuticas,
Universidade Federal de Pernambuco. Av Prof. Arthur de Sá, S/N,
Cidade Universitária, Recife - PE. CEP 50740-521. Brasil

² Apsen Farmacêutica S.A. SP - Brasil

³ Núcleo de Controle de Qualidade de Medicamentos e Correlatos- NCQMC, UFPE. PE - Brasil

RESUMO. O antimicrobiano ornidazol, derivado dos 5-nitroimidazólicos, atua seletivamente em bactérias anaeróbicas e protozoários, não existindo métodos para sua quantificação em compêndios oficiais. Este trabalho objetivou o desenvolvimento de dois métodos analíticos por meio de duas diferentes técnicas, a espectrofotometria UV-Vis e CLAE para a forma farmacêutica comprimido. Os resultados obtidos por meio destes métodos foram comparados entre si utilizando teste T de Student. Os melhores resultados obtidos para o método por UV-Vis foram: metanol: água destilada (45:55) como solução diluente, concentração da amostra 10.00 µg/mL e λ 320 nm. Os melhores resultados para o método por CLAE foram: coluna C18, temperatura do forno 30°C, λ 318 nm, fase móvel: metanol:água purificada acidificada a 0.05% de ácido fosfórico (45:55), fluxo de 1.00 mL/min, concentração da amostra 40.00 µg/mL, volume de injeção de 20.00 µL, tempo de corrida 5 min. Os métodos foram considerados adequados ao uso pretendido e a comparação estatística entre estes comprova a sua equivalência.

SUMMARY. "Comparison of Methods for the Determination of Ornidazole in Film-Coated Tablets". The antimicrobial drug ornidazole, a 5-nitroimidazole derivate, exerts selective inhibition on protozoan and anaerobic bacteria. There isn't a described method for its quantification in official compendiums. This work aimed the development of two analytical methods by means of different techniques, UV-Vis spectrophotometry and HPLC for the pharmaceutical form tablet. The results obtained through these methods have been compared by Student's t-test. The best results obtained by UV-Vis method were: methanol:purified water (45:55) as diluent, sample concentration of 10 µg/mL and λ 320 nm. The best results obtained by HPLC method were: column C18 as stationary phase, oven temperature 30°C, λ 318 nm, mobile phase: methanol:purified water acidified to 5% with phosphoric acid (45:55), flow rate 1.00 mL/min, sample concentration 40 µg/mL, injection volume 20.00 µL. The methods have been considered suitable for the desired purpose and the statistics comparison between them proves their equivalence.

INTRODUÇÃO

O antimicrobiano ornidazol, derivado dos 5-nitroimidazólicos, atua seletivamente em bactérias anaeróbicas e protozoários. Apresenta-se na forma de pó cristalino, com coloração branca a levemente amarelada, odor suave e pouco perceptível. Praticamente insolúvel em solventes apolares e muito solúvel em solventes de alta a moderada polaridade ^{1,2} (Fig. 1).

Não existem métodos para quantificação do ornidazol nos compêndios oficiais, porém diversos métodos analíticos para a quantificação des-

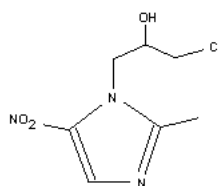


Figura 1.
Fórmula estrutural
do Ornidazol.

te fármaco encontram-se reportados na literatura científica internacional, sendo estes aplicáveis a matéria-prima, formas farmacêuticas e matrizes biológicas. Estes métodos utilizam diversas técnicas como eletroquímica ³⁻⁶, espectrofotometria

PALAVRAS CHAVE: CLAE, Espectroscopia UV-Vis, Método Analítico, Ornidazol.

KEY WORDS: Analytical Method, HPLC; Ornidazole, UV-Vis Spectroscopy.

* Autor a quem correspondência deve ser enviada. E-mail: pedro.rolim@pq.cnpq.br

de UV-Visível ⁷⁻⁹, cromatografia gasosa ¹⁰ e líquida ¹¹⁻¹⁵.

Apesar da existência de diversos métodos analíticos publicados, a técnica de espectrofotometria de UV-Vis tem sido utilizada apenas para a quantificação do ornidazol por meio de reações colorimétricas, com leitura em comprimento de onda no visível ⁷⁻⁹. O método desenvolvido e validado descrito permite a quantificação do ornidazol por meio de um comprimento de onda no ultravioleta, conferindo praticidade, confiabilidade e baixo custo para a utilização deste método na rotina laboratorial da indústria farmacêutica.

Os trabalhos publicados sobre a determinação do ornidazol pela técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) abrangem principalmente a determinação deste composto e/ou metabólitos deste em fluidos biológicos ou associados a outros fármacos, principalmente outros nitroimidazólicos. Tais métodos publicados não se aplicam a rotina do controle de qualidade da indústria farmacêutica, rotina esta que deve associar rapidez nas análises e confiabilidade dos resultados.

A validação de método analítico consiste na confirmação por exame e fornecimento de evidências objetivas de que os requisitos específicos para um determinado uso pretendido sejam atendidos. Esta necessidade de se demonstrar a qualidade de medições químicas, através de sua confiabilidade e rastreabilidade se faz obrigatório uma vez que o fármaco não apresenta monografia farmacopeica ¹⁶⁻²⁰.

Diante do exposto, este trabalho teve por objetivo o desenvolvimento e validação de dois métodos analíticos para doseamento de comprimidos revestidos a base de ornidazol 500 mg. Estes métodos foram comparados entre si, através da análise de três lotes de comprimidos manufaturados a partir de diferentes fornecedores do ornidazol, utilizando o tratamento estatístico Teste T-Student.

MATERIAL E MÉTODOS

Reagentes e amostras

Para a realização deste trabalho utilizou-se: metanol grau UV-HPLC (fornecedores: J.T Baker(r) e Vetec[®]; água destilada; água ultra-pura obtida através de sistema Milli-Q[®]; ácido fosfórico da marca Vetec[®]; ornidazol matéria-prima: fornecedor A (Gemine Exports - lote ONZ/503075, pureza 100%), fornecedor B (Zhejiang Supor Pharmaceuticals Co. LTDA - lote 20060405, pureza 99,0%) e fornecedor C (Far-ca

S.R.L - lote ONZ/503014, pureza 99,8%), ornidazol padrão de trabalho (fornecedor: Zhejiang Supor Pharmaceuticals Co. LTDA - lote 20060401, pureza: 100,0%) e três lotes de comprimidos desenvolvidos no Laboratório de Tecnologia dos Medicamentos (LTM) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) a partir dos diferentes fornecedores da matéria-prima ornidazol, denominados respectivamente de lote 1, 2 e 3.

Equipamentos, vidrarias e acessórios

Vidrarias volumétricas calibradas com certificado de calibração por lote do fabricante Brand[®]; espectrofotômetro da marca Vankel 50 UV-Visível Carry- Win-UV; ultra-som marca Branson modelo 2510; balança analítica Sartorius modelo CP 225D; cromatógrafo líquido da Shimadzu[®], com PDA-Detector de arranjo de iodo, usando software Class -VP; unidade filtrante Millex[®] com porosidade de 0.45 µm; Coluna Cromatográfica Shim-Pack[®] ODS com empacotamento C18, 150 x 4.60 mm Ø; partícula 5.00 µm - (Lote: M^o 4157111 e Lote: M^o 4157010) e Sistema Milli-Q[®] *academic* da Millipore[®].

Método Analítico por Espectrofotometria no UV-Vis

Desenvolvimento do método

Foram realizados testes com diversos solventes (água, ácido clorídrico 0.10 M e metanol) e misturas dos mesmos em diferentes proporções a fim de escolher uma melhor solução diluente para utilização no método analítico levando em consideração o poder de solubilização do princípio ativo, além de proceder varreduras no espectrofotômetro na faixa de 200 a 400 nm para escolha do melhor comprimento de onda.

Preparo das amostras e solução padrão

As amostras foram preparadas a partir do peso médio de 20 comprimidos, os quais foram posteriormente pulverizados. Uma quantidade de pó equivalente 100.00 mg de ornidazol foi transferidos para um balão volumétrico de 100.00 mL, com auxílio do diluente metanol: água destilada (45:55), sonicou-se por 10 min, aferiu o volume com a solução diluente. Realizou-se diluições com água destilada de forma a obter concentração final de 10.00 µg/mL semelhante a do padrão.

Validação do método

Após o desenvolvimento do método avaliou-se alguns aspectos na validação como linearidade, precisão, exatidão, especificidade, limite de

detecção e de quantificação e robustez²¹⁻²³. A validação foi realizada com apenas um fornecedor do ornidazol matéria-prima, sendo este o fornecedor B, mesmo fornecedor do padrão de trabalho.

Linearidade: Este ensaio foi realizado com a análise de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados dos pontos médios de três curvas autênticas com cinco pontos nas concentrações de 2,50 µg/mL, 5,00 µg/mL, 7,50 µg/mL, 10,00 µg/mL, 12,50 µg/mL e 15,00 µg/mL do padrão de trabalho de ornidazol. O coeficiente de correlação obtido foi a partir da média das três curvas. **Precisão:** A precisão foi determinada através dos métodos de repetitividade e precisão intermediária. A repetitividade foi determinada pela análise de amostras individuais em sextuplicata e a precisão intermediária em dois dias por dois analistas diferentes. **Exatidão:** Foram obtidos três lotes de comprimidos com o percentual dos excipientes fixos, variando-se apenas a concentração do princípio-ativo em 50, 100 e 150% do ornidazol. A extração do ativo na preparação foi realizada conforme descrito no item preparo das amostras. Em seguida, cada amostra foi analisada em triplicata. **Especificidade:** Um placebo do comprimido de ornidazol foi analisado pela técnica descrita. **Limite de Detecção (LD) e de Quantificação (LQ):** Para se realizar o LD e LQ foi considerado o desvio padrão da reta com relação à absorbância do primeiro nível de concentração (2,50 µg/mL) de ornidazol nas três curvas de calibração e seus coeficientes angulares. **Robustez:** O ensaio foi determinado a partir da variação dos seguintes parâmetros: marca do solvente (J.T Baker® e Vetec®), tempo de sonicação das soluções (8, 10 e 12 min) e influência da luz (presença e ausência de luminosidade). Foram realizadas análises de amostras em quadruplicata para todos os parâmetros da robustez.

Método Analítico por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Desenvolvimento do método

Foram realizados testes com diversos solventes (acetonitrila, tampões, metanol, água ultra-pura e água ultra-pura acidificada) e misturas dos mesmos em diferentes proporções a fim de escolher uma melhor solução diluente. A fim de garantir boa reprodutibilidade do método, a eficiência da coluna não deve ser menor que 2000 pratos teóricos, o fator de cauda deve apresentar-se entre 0,90 a 2,00 e o desvio padrão relativo das áreas das replicatas dos picos registrados

não deve ser maior do que 2%. A performance do sistema cromatográfico foi avaliada a partir dos seguintes parâmetros: fator de capacidade, número de pratos teóricos e fator de cauda, observando-se os cromatogramas obtidos. Após o desenvolvimento do método analítico, injetou-se o uracil, nas mesmas condições cromatográficas estabelecidas, para se verificar o tempo morto da coluna e com base nesta informação estabelecer outros parâmetros importantes para a eficiência do método. O uracil, não possui afinidade pela fase móvel e pela coluna, fator determinante para a justificar a sua utilização.

Preparo das amostras e solução padrão

As amostras foram preparadas a partir do peso médio de 20 comprimidos, os quais foram posteriormente pulverizados. Uma quantidade de pó equivalente 100,00 mg de ornidazol foi transferidos para um balão volumétrico de 100.00 mL, com auxílio do diluente metanol:água ultra-pura (45:55), sonicou-se por 10 min, aferiu o volume com a solução diluente. Realizou-se diluições com a solução diluente metanol:água ultra-pura (45:55) de forma a obter concentração final de 40.00 µg/mL semelhante a do padrão, filtrou-se a solução em membrana com porosidade 0.45 µm e transferiu-se a amostra para o vial.

Condições Cromatográficas

Coluna cromatográfica Shim-Pack® ODS com empacotamento C₁₈, 150 x 4,6 mm Ø e partícula 5 µm, temperatura do forno de 30 °C, fluxo da fase móvel: 1,00 mL/min, comprimento de onda de 318 nm; fase móvel: metanol:água purificada acidificada a 0,05% de ácido fosfórico (45:55); primeira e segunda diluição em metanol:água ultra-pura (45:55), concentração de leitura das amostras de ornidazol de 40,00 µg/mL, volume de injeção de 20,00 µL, tempo de corrida de 5 min, tempo de retenção do ornidazol de aproximadamente 3,23 min.

Validação do método

Após o desenvolvimento do método avaliou-se alguns aspectos na validação como linearidade, precisão, exatidão, especificidade, limite de detecção e de quantificação e robustez²¹⁻²³. A validação foi realizada com apenas um fornecedor do ornidazol matéria-prima, sendo este o fornecedor B, mesmo fornecedor do padrão de trabalho.

Linearidade: Este ensaio foi realizado com a análise de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados dos pontos médios de três curvas autênticas com seis pontos nas concen-

trações de 20 µg/mL, 30 µg/mL, 40 µg/mL, 50 µg/mL, 60 µg/mL e 80 µg/mL do padrão de trabalho de ornidazol. O coeficiente de correlação obtido foi a partir da média das três curvas. **Precisão:** A precisão foi determinada através dos métodos de repetitividade e precisão intermediária. A repetitividade foi determinada pela análise de amostras individuais em sextuplicata. A precisão intermediária foi determinada em dois dias por dois analistas diferentes. **Exatidão:** Foram obtidos três lotes de comprimidos com o percentual dos excipientes fixos, variando-se apenas a concentração do princípio-ativo em 50, 100 e 150% do ornidazol. A extração do ativo na preparação foi realizada conforme descrito no item preparo das amostras. Em seguida, cada amostra foi analisada em triplicata. **Especificidade:** Um placebo do comprimido de ornidazol foi analisado pela técnica descrita. **Limite de Detecção (LD) e de Quantificação (LQ):** Para se realizar o LD e LQ foi considerado o desvio padrão da reta com relação à absorbância do primeiro nível de concentração (20 µg/mL) de ornidazol nas três curvas de calibração e seus coeficientes angulares. **Robustez:** O ensaio foi determinado a partir da variação dos seguintes parâmetros: tempo de sonicação das soluções (8, 10 e 12 min), temperatura do forno (29, 30 e 31 °C), fluxo da fase móvel (0,98, 1,00 e 1,02 mL/min) e coluna cromatográfica Shim-Pack® ODS C18; 150 x 4,6 mm; 5 µm: Lote: M° 4157111 e Lote: M° 4157010. Foram realizadas análises de amostras em quadruplicata para todos os parâmetros da robustez.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Método Analítico por Espectrofotometria No UV-Vis

Desenvolvimento do Método Analítico

Para a escolha do solvente e do comprimento de onda, levou-se em consideração a capacidade de solubilização do ativo por meio da solução diluente e a especificidade do comprimento de onda frente aos componentes utilizados na formulação do comprimido e melhor sensibilidade ao princípio-ativo. O comprimento de onda selecionado foi de 320 nm e o sistema solvente foi metanol: água destilada (45:55) para a primeira diluição e água destilada para a segunda diluição (curva B, Fig. 2). Os solventes envolvidos como diluentes vão modificar a absorvidade molar das substâncias e consequentemente o deslocamento das varreduras, não sendo o pH necessariamente o fator crítico.

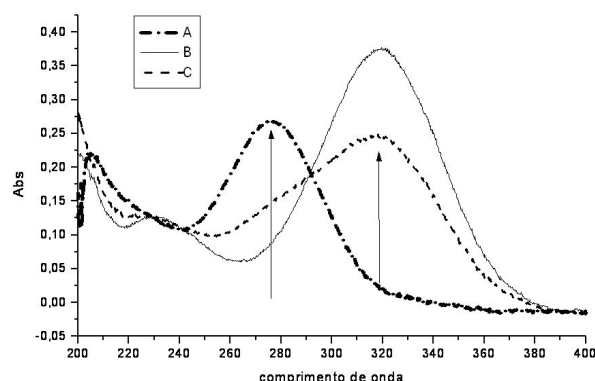


Figura 2. Varredura espectrofotométrica do ornidazol em diferentes misturas de solventes. A curva A apresenta primeira e segunda diluição em HCl 0.1M, a curva B apresenta primeira diluição em metanol: água destilada (45:55) e a segunda em água destilada e a curva C apresenta primeira diluição em HCl 0.1M e a segunda em água destilada.

Validação do Método Analítico

Os resultados obtidos com a validação deste método estão descritos na Tabela 1.

Método	Parâmetros	Resultados
Espectro	λ	320 nm
	Especificidade (abs)	0.0015
	Faixa linearidade (µg/mL)	2.50- 15.00
	R ²	0.9999
	Inclinação	0.0042
	Interceptação	0.0033
	LD(µg.mL ⁻¹)	0.21 µg /mL
	LQ(µg.mL ⁻¹)	0.69 µg /mL
	Repetitividade(%)	100.32 ± 0.23
	DPR%	1.11
	Exatidão 50%	50.46 ± 1.27
	Exatidão 100%	100.27 ± 1.46
	Exatidão 150%	148.42 ± 1.07
	Equação da reta	y = 0.042x - 0.0033

Tabela 1. Resultados da validação do método por espectrofotometria no UV.

Precisão (Precisão Intermediária): A precisão entre dias e entre analistas foi verificada através do teste ANOVA One-Way que não houve diferença estatisticamente significativa com um nível de 95% de confiança, apresentando para a variação entre dias um F calculado de 0,65 e F tabelado 3,86 e para a variação entre analistas um F calculado 0,35 de e F tabelado 3,86. **Robustez:** Para o parâmetro tempo de sonicação, verificou-se através da ANOVA One-Way que não houve diferença estatisticamente significativa com um

nível de 95% de confiança entre a média das concentrações, apresentando um F calculado de 2,83 e F tabelado de 4,26. Adotou-se, porém a sonicação por 10 min, uma vez que as outras formas testadas não mostraram variação significativa. Para o segundo e terceiro parâmetros avaliados, influência da luz e marca de solvente, verificou-se estatisticamente através do Teste t-Student, para duas amostras, presumindo variâncias equivalentes, que não há diferença significativa entre os resultados, admitindo-se um nível de 95% de intervalo de confiança entre a média das absorvâncias, apresentando para influência de luminosidade um T calculado de 0,58 e um T crítico de 2,45, para marcas de solventes, apresentou um T calculado 1,35 e T crítico de 2,45. O método de doseamento para o comprimido de ornidazol é robusto, pois de acordo com os resultados obtidos, não apresentou diferença relevante nos parâmetros avaliados, demonstrando que os resultados obtidos por meio deste método são confiáveis sob pequenas e deliberadas variações.

Método Analítico por CLAE

Desenvolvimento do Método Analítico

A melhor solução diluente foi a metanol: água ultra-pura 45:55 (Fig. 3), comprova-se a alta seletividade e eficiência da coluna cromatográfica empregada por meio do resultado de pratos teóricos obtido, sendo este de aproximadamente 3472,9; a adequada definição e assimetria do pico se comprova pelo resultado de fator de cauda obtido, sendo este de aproximadamente 1,14 e o fator de capacidade, calculado a partir de dados obtidos por meio da análise do uracil, resultou em um valor aproximado de 5,67. O melhor comprimento de onda definido pelo equipamento foi de 318 nm, contudo por se tratar de um platô, há uma tolerância de ± 2 nm, sem prejudicar a absorvância significativamente ²⁴.

Validação do Método Analítico

Os resultados obtidos com a validação deste método estão descritos na Tabela 2.

Método	Parâmetros	Resultados
CLAE	Faixa linearidade ($\mu\text{g/mL}$)	20.00 - 80.00
	λ	318 nm
	Inclinação	45857.94
	Interceptação	12292.30
	R ²	0.9999
	Repetitividade(%)	100.07 \pm 1.22
	DPR%	1.19
	Especificidade (mAU)	0.00
	LD ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	0.21
	LQ ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	0.69
	Exatidão 50%	49.20 \pm 0.32
	Exatidão 100%	100.38 \pm 0.61
	Exatidão 150%	149.32 \pm 1.45
	Equação da reta	$y = 45857.94x - 12292.3$

Tabela 2. Resultados da validação do método por cromatografia líquida (CLAE).

Precisão (Precisão Intermediária): demonstrou-se por meio do teste ANOVA One-Way que não houve diferença estatisticamente significativa com um nível de 95% de confiança, apresentando para a variação entre dias um F calculado de 1,37 e F tabelado 4,76 e para a variação entre analistas um F calculado 0,68 de e F tabelado 5,14. **Robustez:** Para o parâmetro lote da coluna cromatográfica, verificou-se estatisticamente através do Teste t-Student, presumindo variâncias equivalentes, que não há diferença significativa entre os resultados, admitindo-se um nível de 95% de intervalo de confiança entre a média das absorvâncias, apresentando T calculado de 0,47 e um T crítico de 2,78. Para o parâmetro temperatura de forno verificou-se através da ANOVA One-Way que não houve diferença estatisticamente significativa com um nível de 95% de confiança entre a média das concentrações, apresentando um F calculado de 2,80 e

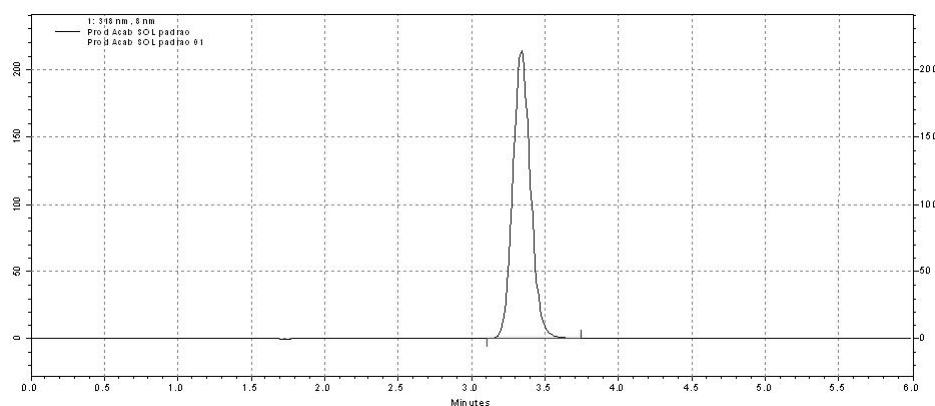


Figura 3. Cromatograma do ornidazol obtido por meio da técnica descrita.

ORNIDAZOL Comprimido	CLAE (%)	ESPECTRO UV-VIS (%)
Padrão de Trabalho	100.18 ± 0.9	100.39 ± 1.1
Lote 1 (Fornecedor A)	99.86 ± 0.6	100.21 ± 0.9
Lote 2 (Fornecedor B)	99.36 ± 0.7	100.32 ± 0.8
Lote 3 (Fornecedor C)	99.47 ± 0.8	99.94 ± 1.2
Coefficiente de Variação (CV)	0.37	0.09

Tabela 3. Comparação estatística entre técnicas e entre lotes.

F tabelado de 5,14, assim como para os parâmetros de fluxo de fase móvel e tempo de sonicação, que apresentaram F calculado de 3,72 e 0,16, respectivamente. Todos os parâmetros foram analisados com 3 graus de liberdade (n = 4).

Comparação Estatística entre Métodos e entre Lotes

A técnica de espectrofotometria no UV-VIS já teve imensa utilização na indústria farmacêutica, contudo com o avanço de outras técnicas mais sensíveis, confiáveis e seguras, como a cromatografia líquida de alta eficiência, esta técnica teve sua utilização reduzida, sendo continuada, devido suas conhecidas vantagens, como baixo custo, fácil manuseio e rapidez nas análises. Atualmente esta é utilizada nas rotinas laboratoriais, não sendo vastamente empregada nos estudos de estabilidade de medicamentos, por não ser considerado sensível o suficiente para detectar produtos de degradação e impurezas.

Esta técnica pode ser aplicada na rotina das indústrias farmacêuticas para a realização dos controles em processo, que exigem rapidez e confiabilidade nos resultados, sendo de grande utilidade e importância para as farmácias de manipulação.

A comparação do método por espectro UV-VIS com o método por cromatografia líquida vem agregar valor e confiabilidade aos resultados do método de UV-VIS. As amostras foram analisadas em sextuplicata e os valores obtidos por meio dos dois métodos foram confrontados estatisticamente pelo teste t Student e estão descritos na Tabela 3. Todos os comprimidos apresentaram teor dentro do limite de especificação estabelecido de 90 a 110% na base seca, estando aprovadas, e pode-se afirmar que não há diferenças estatisticamente significativas entre os comprimidos obtidos a partir de diferentes fornecedores e entre as técnicas analíticas utilizadas com 95% de confiança, de acordo com o tratamento estatístico teste t Student.

Com base nos resultados apresentados o mé-

todo por espectrofotometria UV-VIS demonstrou ser estatisticamente igual ao método de cromatografia líquida, podendo ambos serem implementados na rotina laboratorial, pois são considerados métodos alternativos e confiáveis para o doseamento do fármaco ornidazol em comprimidos revestidos.

CONCLUSÃO

Os métodos desenvolvidos são considerados métodos alternativos, por não constarem descritos em farmacopéias ou formulários oficiais e em comparação com os métodos estudados na literatura científica internacional estes métodos possuem grandes vantagens devido a simplicidade e a rapidez de suas técnicas de preparo. Os resultados obtidos mostram que os métodos atendem aos requisitos de Boas Práticas Laboratoriais, pois apresentam sensibilidade, reprodutibilidade, precisão, robustez, linearidade e finalmente a confiabilidade requerida para um método analítico, constituindo-se de alternativas analíticas rápidas, seguras eficazes e de baixo custo. A comparação estatística entre estes dois métodos confirma a equivalência destes na análise de doseamento do ornidazol em comprimidos revestidos, podendo a indústria farmacêutica ou a farmácia de manipulação escolher dentre a sua realidade laboratorial qual destes métodos será implementado.

Agradecimentos. A Apsen Farmacêutica S.A. pela parceria no desenvolvimento da pesquisa.

REFERÊNCIAS

1. Singh, P., R. Mittal, G.C. Sharma, S. Singh & A. Singh (2003) *Profiles of Drug Substances, Excipients, and Related Methodology* 30, pp. 123-84.
2. Wang, M.H., Z.C. Tan, X.H. Sun, F. Xu, Y.F. Liu, L.X. Sun & T. Zhang (2004) *Thermochim. Acta* 414: 25-30.
3. Knox, R.J., D.I. Edwards & R.C. Knight (1984) *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 10: 1315-8.
4. Özkan, A.S., Z. Senturk & I. Biryol (1997) *Int. J. Pharm.* 157: 137-44.

5. Tocher, J.H. & D.I. Edwards (1988) *Free Rad. Res. Commun.* **4**: 269-76.
6. Yarlett, N., T. Gorrell, R. Marczak & M. Müller (1985) *Mol. Biochem. Parasitol.* **14**: 29-40.
7. Manjunath, S., K.U.M. Ravi & S.A. Raju (2000) *Asian J. Chem.* **12**: 797-800.
8. Mruthyunjayaswamy, B.H.M., S.M. Patil & S.A. Raju (2004) *J. Indian Chem. Soc.* **81**: 346-8.
9. Sarsambi, P.S. & S.A. Raju (2002) *Asian J. Chem.* **14**: 543-4.
10. Bhatia, S.C. & V.D. Shanbhag (1984) *J. Chromatogr.* **305**: 325-34.
11. Bakshi, M., B. Singh, A. Singh & S. Singh (2001) *J. Pharm. Biomed. Anal.* **26**: 891-7.
12. Krishnaiah, Y.S.R., Y.I. Muzib, P. Bhaskar & S.S. Shyale (2003) *Asian J. Chem.* **15**: 925-9.
13. Krishnaiah, Y.S.R., Y.I. Muzib, P. Bhaskar & G.S. Rao (2003) *Asian J. Chem.* **15**: 941-4.
14. Li, Q., Y. Zhao, Y.G. Liang & B.J. Wang (2003) *The Chinese Pharm. J.* **38**: 690-2.
15. Xu, J.P., J. Li, H. Zhang & M. Zhang (2006) *Pharm. Care Research.* **6**: 136-8.
16. Bedor, D.C.G., J.L. Soares Sobrinho, S. Grangeiro Júnior & P.J. Rolim Neto (2004) *Contr. Contaminação* **68**: 32-6.
17. International Conference on Harmonisation (2005) *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology*. ICH Harmonised Tripartite Guideline. Q2 (R1).
18. Ribani, M., B.J. Bottoli, C.H. Collins, J.C.S.F. Jardim & L.F.C. Melo (2004) *Quím. Nova.* **27**: 771-80.
19. Soares Sobrinho, J.L., L.C.C. Nunes, S. Grangeiro Júnior, M.F. La Roca & P.J. Rolim Neto (2005) *Contr. Contaminação* **73**: 35-41.
20. United States Pharmacopeia 29 ed. (2006) *"Validation of Compendial Methods"*, U.S. Pharmacopeial Convention, Rockville, cap. 1225.
21. Gomes, G.C. & H.R.N. Salvado (2005) *Acta Farm. Bonaerense* **24**: 406-8.
22. Mainardes, R.M., P.O. Cinto & M.P.D. Gremião (2006) *Acta Farm. Bonaerense* **25**: 567-70.
23. Silva, R.M.F., F.H.C. Oliveira, R.R. Stratmann, M.F. Pimentel, F.P.M. Medeiros, M.M. Albuquerque & P.J. Rolim Neto (2006) *Acta Farm. Bonaerense* **25**: 578-82.
24. Skoog, D.A. D.M. West, F.M. Holler & S.R. Crouch (2005) *Fundamentos de Química Analítica*. Thomson Learning, Madrid.