



# Desenvolvimento e validação de metodologias analíticas para quantificação de um derivado tiofênico em sistemas microemulsionados

José Alexsandro Silva<sup>1</sup>, Geovani Pereira Guimarães<sup>1</sup>, Yuri Basílio Gomes Patriota<sup>1</sup>, Natan Emanuell de Sobral Silva<sup>1</sup>, Carlos Eduardo Miranda Sousa<sup>2</sup>, Francisco Jaime Bezerra Mendonça Junior<sup>3</sup>, Davi Pereira Santana<sup>2</sup>, Bolívar Ponciano Goulart de Lima Damasceno<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF), Campina Grande/PB, Brasil.

<sup>2</sup> Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Recife/PE, Brasil.

<sup>3</sup> Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCBS), Departamento de Farmácia, Laboratório de Desenvolvimento e Caracterização de Produtos Farmacêuticos (LDCPF), Campina Grande/PB, Brasil.

## RESUMO

O presente trabalho teve por objetivo validar métodos por espectrofotometria UV-Vis e por CLAE para a análise quantitativa de um derivado do tiofeno, o 2-[(3,4-dicloro-benzilideno)-amino]-5,6-diidro-4H-ciclopenta[b]tiofeno-3-carbonitrila (5CN05) e aplicá-los no doseamento da molécula contida em microemulsões. Os métodos propostos foram validados conforme a Resolução 899/2003 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). O comprimento de onda de máxima absorção do fármaco 5CN05 foi detectado em  $\lambda_{\text{max}} = 387\text{nm}$ . O método espectrofotométrico validado mostrou-se seletivo, apresentando linearidade na faixa de 3 a 16  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , coeficiente de correlação ( $r$ ) igual a 0,9998 e limites de detecção e quantificação de 0,12  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  e 0,41  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , respectivamente. Para o método CLAE, observou-se linearidade na faixa de 0,1 a 3,0  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ,  $r = 0,99915$ , limites de detecção e quantificação de 0,07  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  e 0,10  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  respectivamente. Para ambos os métodos, os parâmetros precisão, exatidão e robustez mostraram-se adequados para o uso pretendido. As metodologias propostas podem ser seguramente aplicadas para quantificação do 5CN05 em produtos farmacêuticos como microemulsões.

Palavras-chave: Microemulsão. Derivado do tiofeno. Validação espectrofotometria e por CLAE.

## INTRODUÇÃO

A emergente importância clínica das infecções fúngicas, juntamente à resistência a múltiplos fármacos antifúngicos e o pequeno número destes agentes terapêuticos disponíveis no mercado, torna necessária a descoberta de novas alternativas efetivas (Pinto *et al.*, 2008; Ccahuana-Vasquez *et al.*, 2007).

Os compostos heterocíclicos derivados do tiofeno apresentam várias atividades biológicas já comprovadas, entre as quais se podem destacar: antivirais (Bonini *et al.*, 2004), analgésica, antiinflamatória, antioxidante, antitumoral e anestésica local (Mohammad *et al.*, 2012), antibacterianas, herbicidas e, especialmente, antifúngicas principalmente contra espécies do gênero *Candida* (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, e *C. tropicalis*) e do gênero *Aspergillus* (*A. fumigatus*, *A. niger*, e *A. flavus*) (Pinto *et al.*, 2008).

Microemulsões (ME) podem ser definidas como sistemas termodinamicamente estáveis e opticamente transparentes, formados a partir da mistura de dois líquidos imiscíveis estabilizadas por um filme interfacial de tensoativos (Silva *et al.*, 2009; Fanun, 2010), sendo, geralmente, formados pela combinação de diferentes componentes tais como óleo, água, tensoativos e co-tensoativos (Damasceno *et al.*, 2011). As propriedades específicas dos sistemas microemulsionados relacionam-se, principalmente, à sua baixa tensão interfacial, grande área de interface, tamanho reduzido das gotículas e alta capacidade de solubilização de fármacos lipofílicos, hidrossolúveis e anfílicos (Fanun, 2010). Assim sendo, a utilização destes sistemas pode ser destinada ao desenvolvimento de agentes terapêuticos baseados em fármacos dificilmente incorporados em formulações comuns devido ao seu alto grau lipofílico. Neste contexto se inserem os derivados do tiofeno, em especial o 2-[(3,4-dicloro-benzilideno)-amino]-5,6-diidro-4H-ciclopenta[b]tiofeno-3-carbonitrila (Figura 1), que é o objeto de estudo desta pesquisa.

Nesse sentido, pode-se afirmar que o desenvolvimento de metodologias analíticas é fundamental na avaliação

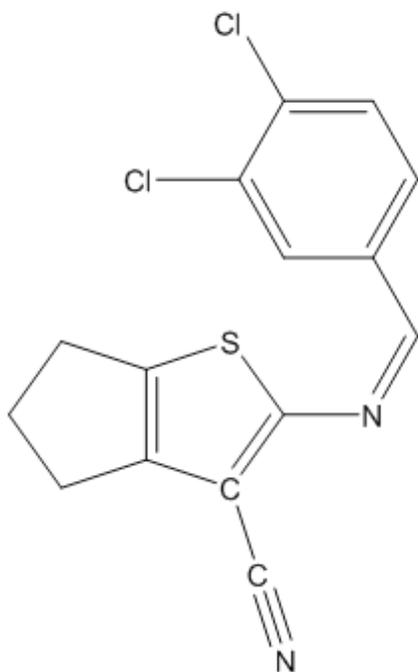


Figura 1. Estrutura química da molécula 5CN05.

quantitativa de um fármaco em uma formulação, bem como em estudos de solubilidade e estabilidade. Para que os resultados obtidos por um método possam ser considerados confiáveis e reprodutíveis faz-se necessária a determinação experimental de alguns parâmetros, sendo este processo conhecido como validação (Silva *et al.*, 2010).

As informações geradas durante a validação de um método analítico devem demonstrar que este preenche uma série de requisitos que permitam a sua aplicação analítica, ressaltando a confiabilidade dos seus resultados. Os testes devem comprovar, por exemplo, que o método demonstre especificidade, linearidade, precisão e exatidão adequadas para a análise proposta (ICH, 2005; Brasil, 2003).

Por conseguinte, e devido à inexistência de métodos normalizados ou farmacopéicos para avaliação do 5CN05 em produtos farmacêuticos, faz-se necessário desenvolver e validar metodologias analíticas por espectrofotometria de absorção no ultravioleta/visível (UV/VIS) e por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para quantificação desta molécula em formulação de microemulsão para aplicação tópica.

## MATERIAL E MÉTODOS

### *Materiais*

O derivado tiofênico 5CN05 foi obtido e sintetizado no Laboratório de Síntese e Vetorização de Moléculas (LSVM) da Universidade Estadual da Paraíba. Para formulação da microemulsão foram utilizados os componentes miristato de isopropila (Via Farma, Brasil – fase oleosa, 5,9% m/m), PEG-8 cáprico/caprílico

glicérido (LAS®, Brasquim, Brasil – tensoativo, 35,3% m/m), Poligliceril 6-dioleato (Plurol Oleique®, Gattefossé, França – tensoativo, 17,6% m/m) e água obtida em sistema purificador de água OS10 LX (Gehaka, Brasil – fase aquosa, 41,2% m/m). No desenvolvimento dos métodos analíticos foram utilizados: clorofórmio P.A. (F. Maia, Brasil), acetonitrila grau cromatográfico (J. T. Baker, EUA) e acetonitrila UV/HPLC (Vetec, Brasil).

### *Instrumentação e condições analíticas*

Utilizou-se neste estudo um espectrofotômetro com detector UV-VIS, modelo UV MINI - 1240 (Shimadzu, Japão). Inicialmente, realizou-se uma varredura espectrofotométrica de soluções do 5CN05 na faixa de comprimentos de onda ( $\lambda$ ) de 300 a 600 nm. Em seguida, determinou-se o valor de  $\lambda$  onde a solução apresentou maior absorvância, sendo então considerado como comprimento de onda adequado para quantificação do 5CN05.

Para o método cromatográfico, as análises foram realizadas utilizando-se sistema de cromatografia líquida de alta eficiência da marca Shimadzu com detector de UV/VIS (SPD 10Avvp), apresentando forno de coluna (CTO 10Avp), mostruário automático (SIL 10ADvp), controlador do sistema (LCC 10Avp) e duas bombas (LC 10ADvp). Como fase estacionária foi utilizada coluna analítica tipo C18 150 x 4,6  $\mu$ m Gemini (Phenomenex), acoplada a uma pré-coluna C18 4,0 x 3,0 mm (Phenomenex), com temperatura do forno ajustada em 40 °C. Como fase móvel, utilizou-se mistura de acetonitrila e água (95:5, v/v), sendo bombeada a um fluxo de 1 mL.min<sup>-1</sup>, com volume de amostras de 30  $\mu$ L.

### *Desenvolvimento e validação dos métodos analíticos*

As validações das metodologias analíticas foram conduzidas segundo as exigências da Resolução da ANVISA RE no 899 (Brasil, 2003), a qual determina que os parâmetros seletividade, linearidade e faixa de aplicação (intervalo), precisão, exatidão e robustez, limite de detecção e de quantificação devem ser analisados.

O desenvolvimento dos métodos teve início com a realização de uma varredura espectrofotométrica na região o UV/VIS, em uma faixa de 300 a 600 nm do 5CN05 puro, com o objetivo de identificar em qual comprimento de onda o fármaco apresentava valores de absorvância máximos.

A seletividade do método espectrofotométrico foi determinada comparando-se as curvas espectrais obtidas através das leituras de diluições individuais de cada sistema em acetonitrila, comparando o comportamento da matriz isenta da substância de interesse (ME-Branca), e a matriz contendo o 5CN05 (ME-5CN05, C = 10  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup>). A seletividade do método cromatográfico foi determinada pela avaliação da interferência dos componentes dos sistemas utilizados para carreamento do fármaco (excipientes da formulação de ME). Para tanto, foram analisadas e comparadas amostras das formulações ME-Branca, ME-5CN05 (C = 6  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup>) e amostras de solução do fármaco em acetonitrila (C = 1  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup>).

A linearidade e a faixa de aplicação do método espectrofotométrico foi verificada a partir de solução padrão ( $n=3$ ) de  $1,0 \text{ mg.mL}^{-1}$  obtida pela dissolução de 10 mg do 5CN05 em 10 mL de clorofórmio. Em seguida, diluiu-se 800  $\mu\text{L}$  desta solução em 10 mL de acetonitrila, obtendo-se uma solução (S1) com concentração de  $80 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ . A partir desta solução (S1), foram feitas diluições de forma a obter soluções de 3; 5; 7; 9; 10; 11; 12; 14; 15 e 16  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do fármaco em acetonitrila.

O parâmetro linearidade, para o método cromatográfico, foi determinado partindo da análise de três curvas analíticas em 7 níveis de concentração em uma faixa de 0,1000 a 3  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Para a obtenção de cada curva, uma solução padrão (SP) de  $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$  foi preparada pela dissolução de 10 mg do 5CN05 em 10 mL de clorofórmio. Em seguida, diluiu-se 200  $\mu\text{L}$  da SP em 10 mL de acetonitrila, obtendo-se uma solução (S1) com concentração de 20  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . A partir desta solução (S1), foram feitas diluições de forma a obter soluções de 0,1000; 0,1500; 0,3000; 0,5000; 1,0; 2,0 e 3,0  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . A linearidade, tanto do método espectrofotométrico quanto cromatográfico, foi estimada pela análise de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados e os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram estimados de acordo com as equações  $\text{LD} = \text{DP} \times 3/\text{IC}$  e  $\text{LQ} = \text{DP} \times 10/\text{IC}$ , em que DP é o desvio padrão dos coeficientes lineares obtidos com três curvas analíticas e IC é a média dos coeficientes angulares das respectivas curvas (Brasil, 2003).

A precisão do método espectrofotométrico foi determinada através da leitura em sextuplicata de diluições da solução padrão de  $1,0 \text{ mg.mL}^{-1}$  na concentração do ponto médio da curva de calibração ( $10 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ ). Já a precisão do método cromatográfico foi determinada, também, por análises em sextuplicatas na concentração do ponto médio da curva ( $1,0 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ ). Em ambos os casos, a precisão foi avaliada em dois níveis: repetibilidade (precisão intra-corrída) e precisão intermediária (precisão inter-corrídas), por analistas distintos, sendo expressas como coeficiente de variação (CV%) segundo a equação  $\text{CV} = \text{DP}/\text{CMD}$ , em que DP é o desvio padrão e CMD é a concentração média determinada.

A exatidão dos métodos espectrofotométrico e do método cromatográfico foi determinada por análises em triplicata de três soluções do fármaco em diferentes faixas de concentração, sendo uma em baixa, uma em média e outra em alta concentração, respectivamente 5; 10 e 15  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  para o método espectrofotométrico e 0,5; 1,0 e 1,5  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  para o método cromatográfico. A exatidão foi expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente.

A robustez dos métodos espectrofotométrico e cromatográfico foram observadas mediante variações ocasionadas pela marca do solvente acetonitrila, adquiridos por diferentes fornecedores e diferentes equipamentos (método espectrofotométrico) e a temperatura do forno da coluna (25 e 40 °C) para o método cromatográfico.

## RESULTADOS

A varredura espectrofotométrica, 300-600 nm (Figura 2), realizada para a verificação do comprimento de onda adequado, demonstrou que a 5CN05 apresentou pico máximo de absorvância em 387 nm, cujo valor foi definido para utilização no desenvolvimento e validação dos métodos analíticos tanto por espectrofotometria quanto por CLAE.

A seletividade do método espectrofotométrico foi o primeiro passo no desenvolvimento e validação da metodologia analítica, na qual foi observado que a ME-5CN05 apresentou pico de absorção no comprimento de onda de 387 nm, o mesmo não acontecendo com a formulação ME-Branca (Figura 3).

O método cromatográfico também demonstrou seletividade, uma vez que no tempo de retenção encontrado para o fármaco (2,9 minutos), não foram evidenciados picos interferentes relacionados aos componentes da formulação com um tempo de corrida de 4 minutos conforme observado na Figura 4.

O método proposto por espectrofotometria apresentou linearidade em uma faixa de 3 a 16  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . A curva analítica (Figura 5), obtida em triplicata, pôde ser descrita através da equação  $y = 0,0654x - 0,0186$  obtida pelo método dos mínimos quadrados, apresentando um coeficiente de correlação ( $r$ ) igual a 0,9998. A inclinação da curva (coeficiente angular) apresentou valor de desvio-padrão igual a 0,000173 e coeficiente de variação de 0,265%. Quanto ao intercepto (coeficiente linear) foram observados os valores de 0,002683 e 14,456%, respectivamente. O limite de detecção e o limite de quantificação foram de 0,12  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  e 0,41  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , respectivamente.

O método cromatográfico, por sua vez, apresentou linearidade em uma faixa de 0,1 a 3,0  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  e sua curva analítica (Figura 6) apresentou como equação  $y = 82875x - 7378$  e coeficiente de correlação ( $r$ ) igual a 0,99915. Para a inclinação da curva e o intercepto, foram observados os valores de desvio-padrão de 304,833 e 192,221 e coeficientes de variação de 0,368% e 2,605, respectivamente. Os limites de detecção e quantificação foram de 0,07  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  e 0,10  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , respectivamente.

As Tabelas 1 e 2 apresentam os dados obtidos durante a determinação dos parâmetros precisão e exatidão dos métodos espectrofotométrico e cromatográfico, respectivamente.

Para ambos os métodos, os valores de CV(%) obtidos durante a avaliação da precisão foram inferiores a 5,0%. Na determinação da exatidão, demonstrou-se proximidade entre os valores de concentração obtidos pelos métodos e os seus valores teóricos.

A Tabela 3 mostra os valores obtidos durante a avaliação da robustez do método espectrofotométrico. As modificações avaliadas foram: preparo das soluções de leitura utilizando acetonitrila proveniente de diferentes fornecedores (F1: Vetec, lote 110738; F2 : J.T. Baker, lote K04C55); leitura das soluções em diferentes

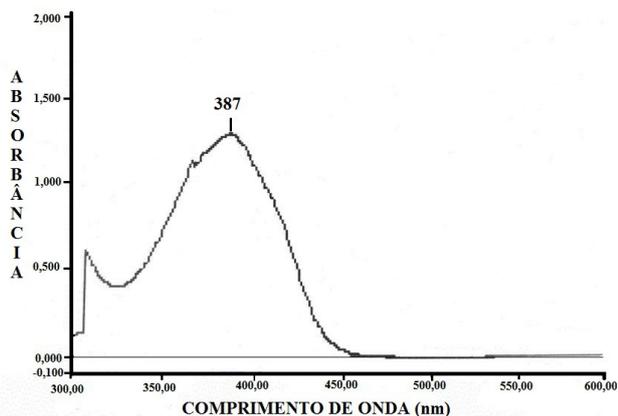


Figura 2. Varredura espectrofotométrica da solução do 5CN05 (300 a 600 nm, C = 15 µg.mL<sup>-1</sup>).

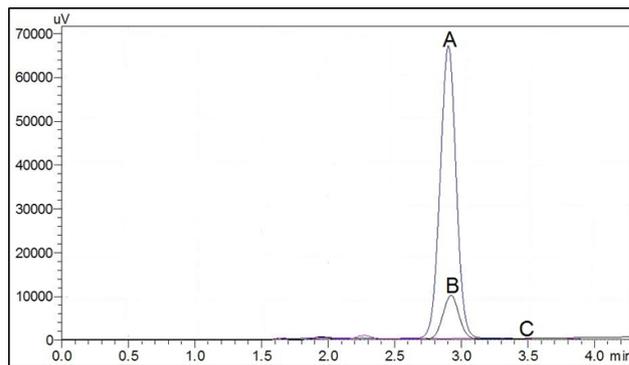


Figura 4. Representação do cromatograma da ME-5CN05 (C = 6 µg.mL<sup>-1</sup>) (A), solução 5CN05 (C = 1 µg.mL<sup>-1</sup>) (B) e ME-Branca (C) (Fase móvel: acetonitrila e água 95:5, v/v).

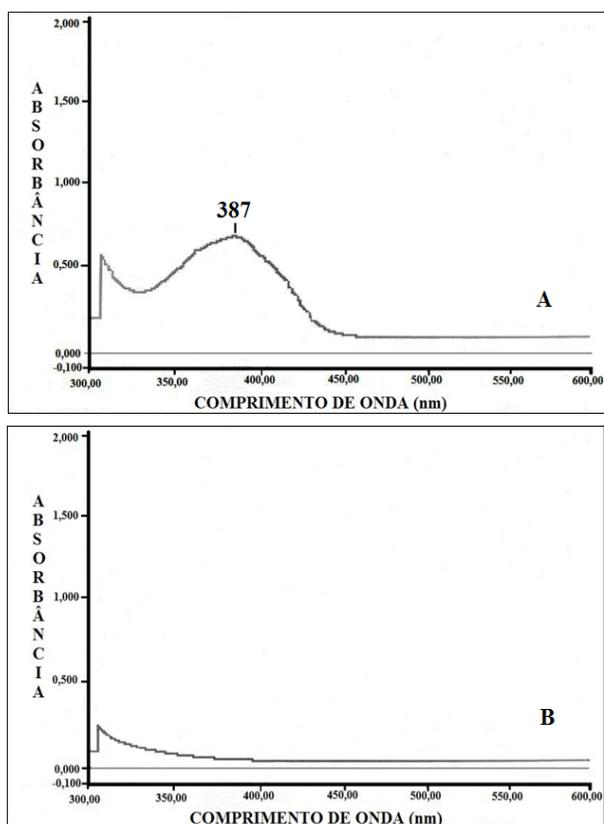


Figura 3. Varredura espectrofotométrica das amostras ME-5CN05 (A) e ME-Branca (B) (300 a 600 nm, C = 10 µg.mL<sup>-1</sup>).

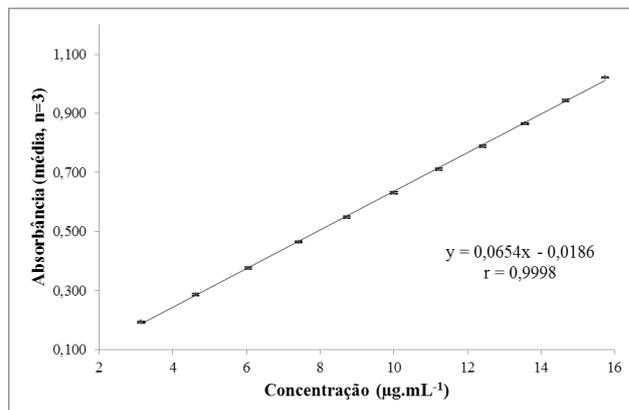


Figura 5. Curva analítica para solução de 5CN05 utilizando o método espectrofotométrico.

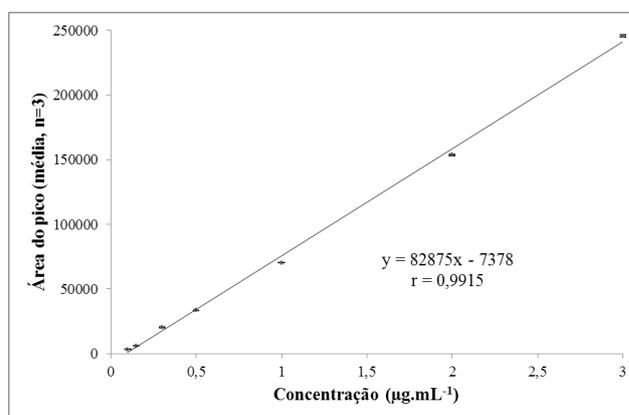


Figura 6. Curva analítica para solução de 5CN05 utilizando o método cromatográfico.

Tabela 1. Valores correspondentes aos parâmetros de Precisão (n=6) e Exatidão (n=3) do método espectrofotométrico validado.

Parâmetro	[5CN05] teórica ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	[5CN05] obtida ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	Precisão (%)	Exatidão (%)
Precisão Repetibilidade	10,00	9,86 $\pm$ 0,005	0,87	98,59
Precisão intermediária				
Analista 1	10,00	10,27 $\pm$ 0,006	0,90	102,74
Analista 2	10,00	10,08 $\pm$ 0,008	1,23	100,83
Exatidão				
Nível Baixo	5,00	4,66 $\pm$ 0,003	0,93	93,15
Nível Médio	10,00	9,86 $\pm$ 0,005	0,79	98,61
Nível Alto	15,00	14,71 $\pm$ 0,004	0,44	98,09

Tabela 2. Valores correspondentes aos parâmetros de Precisão (n=6) e Exatidão (n=3) do método cromatográfico validado.

Parâmetro	[5CN05] teórica ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	[5CN05] obtida ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	Precisão (%)	Exatidão (%)
Precisão Repetibilidade	1,00	1,05 $\pm$ 0,005	0,49	105,00
Precisão intermediária				
Analista 1	1,00	1,04 $\pm$ 0,005	0,56	103,40
Analista 2	1,00	1,07 $\pm$ 0,011	1,06	107,08
Exatidão				
Nível Baixo	0,50	0,50 $\pm$ 0,002	0,44	100,74
Nível Médio	1,00	1,02 $\pm$ 0,006	0,58	102,09
Nível Alto	1,50	1,51 $\pm$ 0,003	0,21	100,67

Tabela 3. Valores correspondentes a determinação da robustez do método espectrofotométrico validado (n=3).

Modificação	[5CN05] teórica ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	[5CN05] obtida ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	Precisão (%)	Exatidão (%)
A	10,00	9,86 $\pm$ 0,107	1,08	98,56
B	10,00	10,21 $\pm$ 0,092	0,90	102,13
C	10,00	10,50 $\pm$ 0,192	1,82	104,98

Legenda: A = Solução 5CN05 em acetonitrila (fornecedor 1); B = Solução 5CN05 em acetonitrila (fornecedor 2); C = Solução 5CN05 em acetonitrila (fornecedor 1, equipamento 2).

Tabela 4. Valores correspondentes a determinação da robustez do método cromatográfico validado (n=3).

Modificação	[5CN05] teórica ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	[5CN05] obtida ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	Precisão (%)	Exatidão (%)
A	1,00	1,009	0,19	100,88
B	1,00	1,012	0,65	101,22
C	1,00	1,011	0,40	101,10
D	1,00	1,028	0,94	102,80

Legenda: A = Solução 5CN05 em acetonitrila (fornecedor 1), temperatura do forno 40 °C; B = Solução 5CN05 em acetonitrila (fornecedor 1), temperatura do forno 25 °C; C = Solução 5CN05 em acetonitrila (fornecedor 2), temperatura do forno 40 °C; D = Solução 5CN05 em metanol.

espectrofotômetros (E1: modelo UV Mini 1240, Shimadzu; E2: modelo SP-2000UV, Hangzhou Chincan). Foi constatado que o método possui robustez intrínseca, uma vez que manteve suas respostas, em triplicata, em meio às variações realizadas.

Constatou-se para o método cromatográfico que o mesmo também apresentara robustez intrínseca, uma vez que ao analisar amostras na concentração de 1  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  em triplicata e em diferentes condições (tipo de solvente, temperatura do forno, fabricante do solvente), as respostas mantiveram-se dentro das especificações exigidas pela legislação. Os resultados encontram-se expressos na Tabela 4.

## DISCUSSÃO

A seletividade deve ser o primeiro parâmetro a ser avaliado no desenvolvimento de um método analítico. Este parâmetro deve ser avaliado continuamente durante a validação e subsequente utilização do método (Silva *et al.*, 2010). A legislação preconiza que o método pode ser considerado seletivo se nenhum interferente da matriz, sem o fármaco, apresentar absorvância no comprimento de onda específico para a molécula a ser analisada (ICH, 2005; Brasil, 2003). A determinação deste parâmetro teve por objetivo avaliar o grau de interferência dos componentes da formulação estudada e impurezas, bem como outros compostos de propriedades similares que poderiam estar presentes, uma vez que alguns excipientes podem sofrer degradação e gerar compostos que não são observados inicialmente, podendo confundir com o analito de interesse (Ribani *et al.*, 2004). As metodologias propostas para quantificação do 5CN05 demonstraram ser seletivas, uma vez que não houve interferência dos componentes nos pontos específicos de detecção do fármaco (comprimento de onda de 387 nm para o método espectrofotométrico e tempo de retenção de 2,9 minutos para o método cromatográfico).

O coeficiente de correlação permite estimar a qualidade e linearidade da curva obtida, pois quanto mais próximo de 1, menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados. Um coeficiente de correlação maior que 0,999 é considerado evidência de um ajuste ideal dos dados para a linha de regressão (Nunes *et al.*, 2005). A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Brasil, 2003) recomenda um coeficiente de correlação igual a 0,99 e o Instituto Nacional de Metrologia (INMETRO, 2003) um valor acima de 0,90. Sendo assim, o valor de r obtido para a análise do 5CN05 em ambos os métodos, encontra-se dentro das conformidades recomendadas. Nas condições estudadas demonstrou-se que os resultados de exatidão e precisão para ambos os métodos desenvolvidos e validados também estão de acordo com o preconizado.

A robustez de um método mede a sensibilidade que este apresenta em detrimento a pequenas variações. Considera-se um método como sendo robusto quando ele não é afetado por uma modificação pequena e deliberado

em seus parâmetros. As modificações propostas na determinação da robustez refletem as alterações que podem ocorrer quando um método é transferido para outros laboratórios, analistas ou equipamentos (Ribani *et al.*, 2004). No presente estudo, tanto o método espectrofotométrico quanto o cromatográfico demonstraram possuir robustez intrínseca, uma vez que a resposta analítica para ambos os métodos mostrou-se dentro das especificações exigidas, mesmo com as modificações propostas.

Os métodos analíticos propostos neste trabalho, foram desenvolvidos a fim de disponibilizar procedimentos analíticos para quantificação do 5CN05 em formas farmacêuticas/sistemas de liberação, como as microemulsões, devido à inexistência de métodos oficiais para a referida molécula. Os métodos propostos podem ser considerados intercambiáveis, uma vez que as amostras aplicadas na validação de ambos foi a mesma. Entretanto, as metodologias apresentam faixas de linearidade distintas e complementares. O método cromatográfico, devido a sua maior sensibilidade e seletividade, pode servir de base para quantificação do 5CN05 em testes de permeação cutânea e cinéticas de liberação, desde que estudado nas condições adequadas e específicas dos referidos testes. Para testes mais simples, como o doseamento, a metodologia por espectrofotometria pode ser aplicada devido a sua rapidez e baixo custo.

Em conclusão, os mesmos demonstraram estar em conformidade com as especificações recomendadas pela legislação. Os parâmetros estudados garantiram rapidez, seletividade, linearidade, exatidão e precisão, apresentando-se, portanto, validados conforme a RE 899/2003 da ANVISA.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Coordenação de Aperfeiçoamento de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de mestrado ao discente Geovani Pereira Guimarães, bem como pelo suporte financeiro proveniente do edital PROPESQ-UEPB nº 02/2010.

## ABSTRACT

*Development and validation of analytical methodologies for measurement of a thiophene derivative in microemulsion systems*

**This study aims to validate methods of UV-Vis and HPLC for quantitative determination of a thiophene derivative, 2 - [(3,4-dichloro -benzylidene)-amino] -5,6-dihydro-4H-cyclopentyl-ta [b] thiophene-3-carbonitrile referred in this study as 5CN05, and apply them to quantify the 5CN05 in microemulsions. The proposed methods were validated according to the Resolution RE 899/2003 of the National Health Surveillance Agency (ANVISA). The 5CN05 was detected by UV-Vis at  $\lambda_{\text{max}} = 387\text{nm}$ . The validated UV-**

**Vis method proved to be selective, showing linearity in the range of  $3\text{-}16 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , correlation coefficient (r) of 0.9998 and limits of detection and quantification of  $0.12 \mu\text{g.mL}^{-1}$  and  $0.41 \mu\text{g.mL}^{-1}$  respectively. For the CLAE method the linearity was observed in the range  $0.1$  to  $3.0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ,  $r = 0.99915$ , limits of detection and quantification of  $0.07 \mu\text{g.mL}^{-1}$  and  $0.10 \mu\text{g.mL}^{-1}$  respectively. For both UV-Vis and CLAE methods, the precision parameters, accuracy and robustness were adequate for the intended use. The proposed methodologies can be safely applied to quantify the 5CN05 in pharmaceutical microemulsions products.**

Keywords: Microemulsion. Thiophene derivative. Validation spectrophotometry and HPLC.

## REFERÊNCIAS

Bonini C, Chiummiento L, De Bonis M, Funicello M, Lupattelli P. Synthesis of a first thiophene containing analog of the HIV protease inhibitor nelfinavir. *Tetrahedron Lett.* 2004;45(13):2787-99.

Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Diário Oficial da União, nº 104, 2 de junho de 2003. Seção 1. p. 56-9.

Ccahuana-Vasquez RA, Santos SSF, Koga-Ito CY, Jorge AC. Atividade antimicrobiana da *Uncaria tomentosa* sobre patógenos da cavidade bucal humana. *Braz Oral Res.* 2007; 21(1):46-50.

Damasceno BPGL, Silva JA, Oliveira EE, Silveira WLL, Araújo IB, Oliveira AG, Egito EST. Microemulsão: um promissor carreador para moléculas insolúveis. *Rev Ciênc Farm Básica Apl.* 2011;32(1):9-18.

Fanun M. Formulation and characterization of microemulsions based on mixed nonionic surfactants and peppermint oil. *J Colloid Interface Sci.* 2010;343:496-503.

Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO). Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos DOQ-CGCRE-008. Brasil: INMETRO; 2003.

International Conference on Harmonisation (ICH). Commission of the European Communities – Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1). Geneva: ICH; 2005.

Mohammad AIC, Satyendra D, Apurba T, Patel M, Monika K, Girish K, Mohan S, Saravanan J. Synthesis and Antimicrobial screening of some Novel Substituted Thiophenes. *Hygeia J D Med.* 2012;4(1):112-8.

Nunes RS, Senna BAA, Silva JA, Santana DP. Validação de metodologia analítica para doseamento do timol em extratos vegetais de *Lippia sidoides* Cham por CLAE. *Rev Bras Farm.* 2005;86(3):87-91.

Pinto E, Queiroz MJ, Vale-Silva LA, Oliveira JF, Begouin A, Begouin JM, Girsch G. Antifungal activity of synthetic di(hetero)arylamines based on the benzo[b]thiophene moiety. *Bioorg Med Chem*. 2008;16(17):8172-7.

Ribani M, Bottoli CBG, Collins CH, Jardim ICSF. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Quim Nova*. 2004;27(5):771-80.

Silva JA, Santana DP, Bedor DGC, Borba VFC, Lira AAM, Egito, EST. Estudo de liberação e permeação *in vitro* do diclofenaco de dietilamônio em microemulsão gel-like. *Quim Nova* 2009;32(6):1389-93.

Silva JA, Bedor DCG, Sousa CEM, Santana DP, Egito EST Oliveira. Desenvolvimento e validação de método analítico para quantificação de diclofenaco de dietilamônio em pele humana por cromatografia líquida de alta eficiência. *Rev Ciênc Farm Básica Apl*. 2010;31(1):41-6.

Recebido em 19 de março de 2013

Aceito em 3 de julho de 2013

