

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO DE DISSOLUÇÃO PARA COMPRIMIDOS DE BENZNIDAZOL BASEADO EM PLANEJAMENTO FATORIAL

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF A DISSOLUTION METHOD FOR BENZNIDAZOLE TABLETS BASED ON FACTORIAL DESIGN

Flávia Patrícia Morais de Medeiros¹

Talita Atanzio Rosa²

Maria Joanellys dos Santos Lima³

Larissa Araújo Rolim⁴

Rosali Maria Ferreira da Silva⁵

Pedro José Rolim Neto⁶

RESUMO: A dissolução é a etapa limitante da biodisponibilidade para fármacos pertencentes à Classe II do Sistema de Classificação Biofarmacêutica. Diante disso, o presente trabalho objetivou estabelecer as condições ótimas para a realização do teste de dissolução do benznidazol (BNZ), fármaco essencial no tratamento da doença de Chagas. Inicialmente, determinou-se a solubilidade do BNZ em água, suco gástrico simulado (SGS), HCl 0,1 M e em meios acrescidos de tensoativos (lauril sulfato de sódio - LSS e Tween 80) nas concentrações de 0,5%, 0,75% e 1%. Visando otimizar as condições do teste de dissolução no meio que promoveu maior solubilização (SGS com LSS), aplicou-se um planejamento fatorial variando a concentração de LSS (0,75% e 1%), o volume do meio (500 mL e 1000 mL) e a velocidade de rotação das pás (75 rpm e 100 rpm). As condições que apresentaram perfil mais favorável consistiram no uso de 1000 mL de SGS acrescido de LSS 1% sob rotação de 75 rpm. O método analítico por espectrofotometria UV-Vis e o método de dissolução foram adequadamente validados, demonstrando linearidade, precisão, exatidão, seletividade e robustez, confirmando sua aplicabilidade segura na rotina de controle de qualidade de comprimidos de BNZ.

Palavras-chaves: Benznidazol. Teste de dissolução. Planejamento fatorial. Validação de método. Controle de qualidade. Doença de Chagas.

¹Doutora em Ciências Farmacêuticas (UFPE), Empresa Brasileira de Hemoderivados e Biotecnologia (Hemobrás), Goiânia, Pernambuco.

²Doutora em Ciências Farmacêuticas (UFPE), Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, Pernambuco.

³Doutora em Ciências Farmacêuticas (UFPE), Pesquisadora na Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, Pernambuco.

⁴Doutora em Ciências Farmacêuticas (UFPE), Professora Adjunta da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, Pernambuco.

⁵Doutora em Ciências Farmacêuticas (UFPE), Professora Associada IV da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, Pernambuco.

⁶Doutor em Ciências Farmacêuticas (UFPE), Professor Titular da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, Pernambuco.

ABSTRACT: Dissolution is the rate-limiting step for the bioavailability of drugs belonging to Class II of the Biopharmaceutical Classification System. Given this, the present study aimed to establish the optimal conditions for performing the dissolution test of benznidazole (BNZ), an essential drug in the treatment of Chagas disease. Initially, the solubility of BNZ was determined in water, simulated gastric fluid (SGF), 0.1 M HCl, and in media supplemented with surfactants (sodium lauryl sulfate - SLS and Tween 80) at concentrations of 0.5%, 0.75%, and 1%. To optimize the dissolution test conditions in the medium that promoted the highest solubilization (SGF with SLS), a factorial design was applied, varying the SLS concentration (0.75% and 1%), media volume (500 mL and 1000 mL), and paddle rotation speed (75 rpm and 100 rpm). The conditions that presented the most favorable profile consisted of using 1000 mL of SGF supplemented with 1% SLS at a rotation speed of 75 rpm. The UV-Vis spectrophotometric analytical method and the dissolution method were properly validated, demonstrating linearity, precision, accuracy, selectivity, and robustness, confirming their safe applicability in the routine quality control of BNZ tablets.

Keywords: Benznidazole. Dissolution test. Factorial design. Method validation. Quality control. Chagas disease.

1. INTRODUÇÃO

A doença de Chagas é uma enfermidade negligenciada causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*. Apesar de ser historicamente endêmica em 21 países da América Latina, os intensos fluxos migratórios e a urbanização nas últimas décadas modificaram o perfil epidemiológico da doença, levando à notificação de diversos casos em países não endêmicos, como os Estados Unidos, o Canadá e nações europeias. Atualmente, a Organização Mundial da Saúde estima que existam entre seis e sete milhões de pessoas infectadas ao redor do mundo, com mais de 75 milhões de indivíduos sob o risco de infecção (WHO, 2024). Adicionalmente, observa-se um aumento expressivo na incidência da transmissão congênita, com mais de 15.000 crianças nascendo infectadas anualmente, o que posiciona essa via como a principal responsável pelo surgimento de novos casos agudos (Magi *et al.*, 2024).

O tratamento de escolha na terapêutica farmacológica baseia-se no uso do benznidazol (BNZ), um antiparasitário que apresenta taxas de cura de até 80% em fases agudas. Comercialmente, o BNZ é disponibilizado na América Latina na forma de comprimidos convencionais de 50 mg e 100 mg, produzidos majoritariamente pelo Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco (LAFEPE) no Brasil e pelo Laboratório Elea na Argentina (Magi *et al.*, 2024; Soares-Sobrinho *et al.*, 2010). Contudo, a concentração exclusiva dessas dosagens comerciais impõe severos desafios à pediatria, forçando a realização de preparações extemporâneas artesanais por meio do fracionamento ou da ressuspensão de comprimidos de

adultos, práticas que geram perfis de dissolução erráticos e uma perigosa variabilidade de teor que compromete a segurança e a eficácia do tratamento (Medeiros *et al.*, 2026).

Somado a isso, o fármaco apresenta como grande limitação terapêutica a sua baixa hidrossolubilidade. Por ser classificado como Classe II no Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB), o BNZ possui alta permeabilidade, mas sua biodisponibilidade oral é estritamente limitada pela taxa de dissolução. Clinicamente, essa baixa solubilidade resulta em absorção inconstante, exigindo altas doses e esquemas terapêuticos prolongados (60 a 90 dias), fatores diretamente associados a eventos de toxicidade e à consequente baixa adesão dos pacientes ao tratamento (Magi *et al.*, 2024).

De acordo com o modelo matemático de dissolução de Noyes-Whitney, a determinação da taxa de dissolução *in vivo* pode ser influenciada por fatores intrínsecos ao fármaco, tais como difusão, área superficial, forma cristalina, molhabilidade do pó e solubilidade aquosa nos fluidos gastrointestinais. Adicionalmente, devem ser considerados os fatores fisiológicos, como a hidrodinâmica, o pH do meio e a composição dos fluidos do trato gastrointestinal, com especial destaque para os tensoativos nativos que auxiliam na solubilização de substâncias pouco hidrossolúveis (Horter; Dressman, 2001; Jambhekar; Breen, 2013).

Com o intuito de nortear o comportamento *in vivo* do ativo e, consequentemente, prever o desempenho e a conformidade regulatória da forma farmacêutica desenvolvida, realiza-se a determinação da solubilidade em diferentes meios. Essa etapa busca compreender a relação entre as propriedades físico-químicas do ativo e os parâmetros fisiológicos relevantes mimetizados nas condições do teste de dissolução (Sunesen *et al.*, 2005). Para tanto, o presente trabalho aplicou um planejamento fatorial para avaliar os fatores críticos que influenciam na determinação do percentual dissolvido de BNZ a partir de comprimidos de 100 mg, visando robustecer os parâmetros de controle de qualidade dessa forma farmacêutica essencial.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 REAGENTES E AMOSTRAS

Como matéria-prima, utilizou-se o benznidazol (BNZ, lote: 15772) e, como produto acabado, comprimidos de BNZ 100 mg (lote: 08041722), ambos fornecidos pelo Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco (LAFEPE®, Brasil). Os reagentes utilizados foram de grau analítico: ácido clorídrico (HCl) e cloreto de sódio (NaCl) (Vetec®); etanol P.A. (Carlo

Erba® e FMaia®); lauril sulfato de sódio (LSS) (Vetec® e Nuclear®); e polissorbato 80 (Tween 80®, Vetec®).

2.2 ESTUDO DE SOLUBILIDADE EM CONDIÇÃO SINK

O perfil de solubilidade do BNZ foi avaliado em diferentes meios de dissolução: água purificada (pH 5,94); suco gástrico simulado (SGS) Roche® (pH 1,35, preparado com 66 mL de HCl concentrado e 20 g de NaCl para 10 L de água purificada); HCl 0,1 M (pH 1,29); SGS acrescido de LSS nas concentrações de 0,5%, 0,75% e 1,0% p/v (pH 1,41; 1,32 e 1,33, respectivamente); soluções aquosas de LSS a 0,5%, 0,75% e 1,0% p/v (pH 8,13; 8,08 e 8,75, respectivamente); e solução aquosa de Tween 80® 0,5% v/v.

As amostras (n = 3) foram preparadas na concentração de 0,5 mg/mL em reservatórios de 5,5 mL e submetidas à agitação térmica a 37 °C por 24 horas (Sistema de Agitação Fisatom®). Posteriormente, as alíquotas foram filtradas em membrana de PVDF de 0,22 µm (Millex Millipore®), diluídas em balões volumétricos e quantificadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Utilizou-se um sistema Merck® Elite LaChrom, equipado com bomba L-2130, amostrador automático L-2200, forno de coluna L-2300 e detector por arranjo de diodos (DAD) L-2455, operando conforme método validado por Silva *et al.* (2007). Para os meios em que o BNZ obteve percentual dissolvido superior a 90% (SGS + 0,75% LSS; LSS 0,75%; SGS + 1% LSS; LSS 1%), além dos meios controle (água purificada e SGS), o ensaio foi replicado utilizando a concentração de 1,0 mg/mL.

4

2.3 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE DISSOLUÇÃO

2.3.1 Delineamento Experimental (Planejamento Fatorial)

Os comprimidos de BNZ (100 mg) foram pesados individualmente em balança analítica (Shimadzu® AW 220). Os ensaios de dissolução foram conduzidos em um dissolutor Varian®/Vankel® 7010 acoplado ao amostrador automático VK 8000, utilizando o aparato 2 (pá).

Para avaliar o impacto das variáveis operacionais sobre a eficiência de dissolução, aplicou-se um planejamento fatorial 2³ (n = 4, totalizando 8 ensaios executados de forma aleatória). Os fatores independentes e seus respectivos níveis estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Matriz do planejamento fatorial 2^3 para otimização do teste de dissolução de benznidazol.

Fatores	Nível (-)	Nível (+)
Meio (1)	LSS 0,75% + SGS	LSS 1,00% + SGS
Rotação (2)	75 rpm	100 rpm
Volume (3)	500 mL	1000 mL

Alíquotas de 7 mL foram coletadas nos intervalos de 7, 15, 30, 60, 90 e 120 minutos, sem reposição de meio. O conteúdo dissolvido foi quantificado por espectrofotometria de absorção no ultravioleta-visível (UV-Vis) em equipamento Cary 50 Probe UV-VIS Varian®. A análise estatística dos efeitos e as interações foram realizadas no *software* Statistica® versão 6.1.

2.3.2 Validação do Método de Dissolução

O teor dissolvido de BNZ foi quantificado através de método por espectrofotometria no UV-Vis em equipamento Cary 50 Probe da Varian®, no comprimento de onda de 324 nm. O método analítico foi validado em conformidade com as diretrizes da Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 166, de 24 de julho de 2017 (ANVISA). O teste de dissolução é classificado pela legislação vigente como um ensaio de desempenho (Categoria 4), o qual requer compulsoriamente a avaliação do parâmetro de precisão (repetibilidade). Adicionalmente, por se tratar de uma metodologia integrada que realiza a quantificação do ativo, todos os parâmetros analíticos aplicáveis a ensaios de teor (Categoria 1) foram avaliados como critérios complementares de confiabilidade.

A linearidade foi analisada a partir de três soluções-mãe autênticas e independentes. Estas foram preparadas transferindo 20 mg de BNZ para balão volumétrico de 100 mL, utilizando etanol PA, seguido de sonicação por 15 minutos. Cada solução-mãe originou uma curva de linearidade, com a segunda diluição aferida no meio de dissolução selecionado (Suco Gástrico Simulado - SGS + LSS 1%). Foram obtidas as concentrações de 2, 4, 8, 12, 16 e 20 µg/mL, e as três curvas foram tratadas estatisticamente por Análise de Variância (ANOVA) para verificação da linearidade e ajuste pelo método dos mínimos quadrados.

Para a precisão, avaliaram-se a repetibilidade (precisão intracorrida) e a precisão intermediária (precisão intercorridas). A precisão intermediária foi realizada por analistas diferentes em dias distintos, preparando soluções em sextuplicata ($n = 6$) para obter o ponto

médio da curva ($12 \mu\text{g/mL}$). O tratamento estatístico para comparação das médias e variâncias foi realizado pelos testes t de Student e teste F, respectivamente.

A exatidão foi avaliada em sextuplicata ($n = 6$) considerando três níveis de concentração cobrindo a faixa de trabalho: 8, 12 e $16 \mu\text{g/mL}$. Determinou-se a capacidade de recuperação do método, adotando-se o intervalo de aceitação de 90 a 110%. A seletividade foi documentada através do teste de dissolução de 8 comprimidos placebo de BNZ, monitorados sob as mesmas condições experimentais durante 120 minutos.

A robustez do ensaio foi realizada em duas vertentes: para o meio de dissolução, avaliou-se em quadruplicata a variação de lotes do fabricante de LSS (Vetec®). Para o método de quantificação, a robustez foi avaliada em sextuplicata ($n = 6$) na concentração final de $12 \mu\text{g/mL}$, modificando-se deliberadamente dois parâmetros: o fabricante do etanol PA (Carlo Erba e FMaia) e o tempo de sonicação no ultrassom (10, 15 e 20 minutos), utilizando teste t de Student e ANOVA, respectivamente.

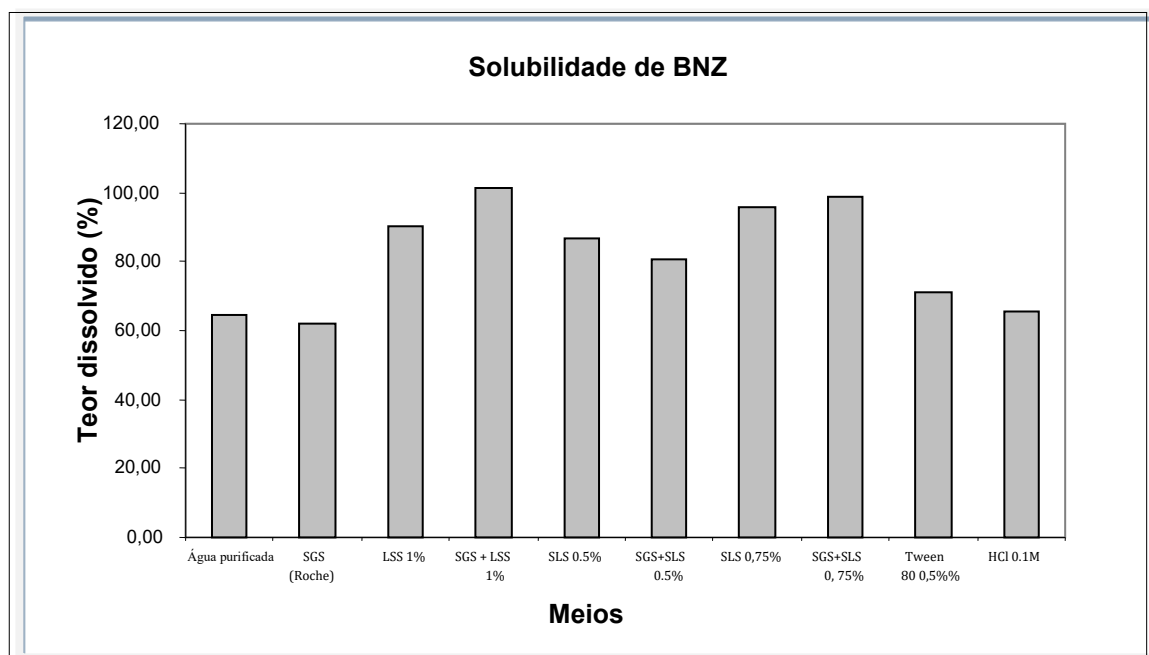
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 ESTUDO DE SOLUBILIDADE EM CONDIÇÃO SINK

O termo condição *sink* descreve o cenário cinético no qual o volume do meio de dissolução é suficiente para impedir que a concentração do fármaco já dissolvido atinja a saturação, mimetizando o gradiente de concentração observado *in vivo* devido à absorção contínua através do trato gastrointestinal. Matematicamente, recomenda-se que o volume do meio seja de três a cinco vezes superior ao volume necessário para obter uma solução saturada do ativo. Todavia, para fármacos de baixa hidrossolubilidade, a manutenção estrita dessas condições em ensaios *in vitro* representa um desafio técnico complexo (Aiache *et al.*, 1997; USP, 2024).

No ensaio preliminar de solubilidade (concentração nominal de $0,5 \text{ mg/mL}$ de BNZ), a fração dissolvida em água purificada, SGS e HCl $0,1 \text{ M}$ estagnou em aproximadamente 65% (aproximadamente $0,325 \text{ mg/mL}$), confirmando o caráter hidrofóbico do fármaco. Em contrapartida, a adição dos tensoativos lauril sulfato de sódio (LSS, aniônico) e polissorbato 80 (Tween 80®, não iônico) a 0,5% promoveu incrementos na solubilidade para cerca de 85% ($0,425 \text{ mg/mL}$) e 75% ($0,375 \text{ mg/mL}$), respectivamente (Figura 1).

Figura 1. Solubilidade do BNZ a 0,5 mg/mL (SGS; LSS; HCl).



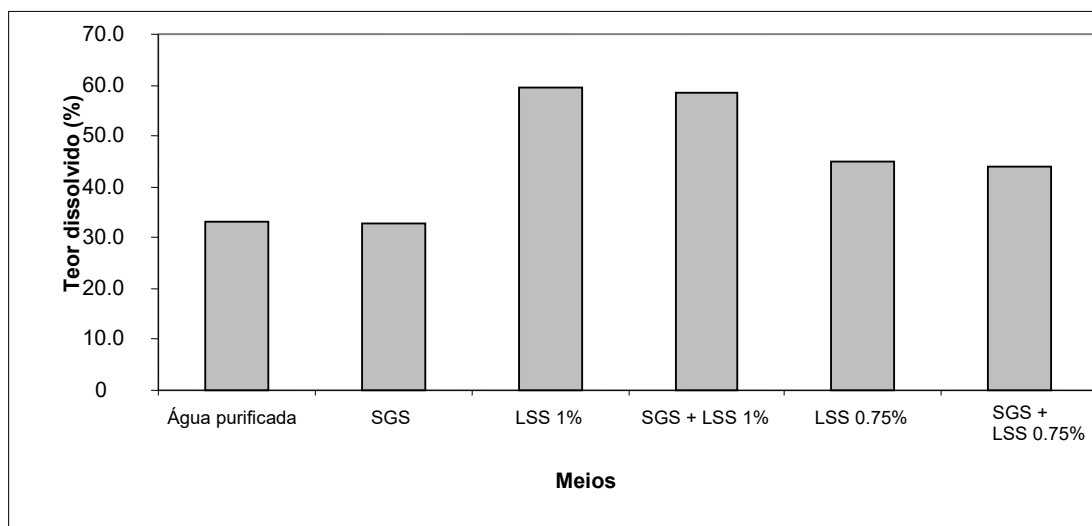
Esse aumento decorre da redução da tensão interfacial e do favorecimento da molhabilidade das partículas do pó pelo meio aquoso. O desempenho inferior do polissorbato 80 em relação ao LSS, mesmo em concentrações equivalentes, correlaciona-se com a dinâmica de difusão das micelas formadas. A taxa de dissolução global é controlada tanto pela solubilização quanto pela taxa de difusão das espécies livres e complexadas (complexo micela-fármaco). Como o polissorbato 80 possui peso molecular e número de agregação micelar significativamente superiores aos do LSS, o coeficiente de difusão do complexo micela-BNZ é reduzido, limitando o transporte de massa e retardando a cinética de dissolução (Soni *et al.*, 2008).

Visando maximizar a solubilização, o LSS foi associado ao SGS em concentrações crescentes (0,5%; 0,75% e 1,0%). Observou-se uma relação diretamente proporcional entre o teor de tensoativo e o incremento da solubilidade, comportamento condizente com a literatura para outros fármacos de baixa solubilidade (Baptista; Volpato, 2007; Martin, 2011). Enquanto a associação de LSS a 0,5% manteve o perfil próximo a 80% de dissolução, os meios contendo LSS a 0,75% e 1,0% (isolados ou combinados ao SGS) ultrapassaram o limiar de 90% (0,450 mg/mL).

Para desafiar o sistema em condições de saturação, realizou-se um segundo ensaio duplicando-se a carga de fármaco (1,0 mg/mL), o que representa dez vezes a concentração final preconizada para o teste de dissolução do produto acabado (comprimidos de BNZ 100 mg). Os

ensaios focaram nos meios com solubilização prévia superior a 90%, além dos controles (água e SGS) (Figura 2).

Figura 2. Solubilidade do BNZ a 1,0 mg/mL (SGS; LSS).



Os resultados revelaram perfis de solubilidade equivalentes para o LSS isolado ou associado ao SGS, demonstrando, contudo, que a concentração do tensoativo é o fator determinante na saturação. Sob carga de 1,0 mg/mL, o sistema atingiu o platô de saturação, alcançando um máximo de 60% de dissolução (aproximadamente 0,6 mg/mL) para o meio com LSS 1,0% e de aproximadamente 45% (aproximadamente 0,45 mg/mL) para o LSS 0,75%, independentemente do pH.

8

3.2 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO DE DISSOLUÇÃO

A partir dos dados de solubilidade, procedeu-se ao desenvolvimento do método de dissolução para os comprimidos de BNZ 100 mg. Optou-se pela manutenção do SGS na composição do meio para mimetizar o ambiente gástrico, associado ao LSS para garantir capacidade solubilizante e reprodutibilidade cinética. Os resultados analíticos do planejamento experimental inicial estão consolidados na Tabela 2.

Tabela 2. Perfis cinéticos de dissolução (%) de comprimidos de benznidazol 100 mg obtidos no *screening* inicial sob diferentes condições operacionais (n = 4).

Rotação	Meio de dissolução	Volume (mL)	Tempos de coleta (min)					
			7	15	30	60	90	120
100 rpm	LSS 1% + SGS	500	40,28	56,04	71,04	83,72	88,48	90,76
		1000	45,33	64,68	80,57	92,37	96,95	98,98
	LSS 0,75% + SGS	500	40,33	57,35	73,80	85,29	91,42	89,63
		1000	38,16	57,31	73,71	87,29	91,40	93,83

75 rpm	LSS 1% + SGS	500	40,74	57,01	74,12	87,35	96,13	99,96
		1000	42,53	61,48	77,46	89,23	93,71	96,31
	LSS 0,75% + SGS	500	36,49	53,18	71,33	84,26	91,23	94,56
		1000	39,54	56,58	73,89	84,84	90,62	93,63
50 rpm	LSS 1% + SGS	500	15,23	24,69	33,56	46,19	53,60	56,51
		1000	19,86	34,59	51,75	70,42	78,18	81,88
	LSS 0,75% + SGS	500	13,51	23,44	32,72	45,11	50,30	56,39
		1000	21,31	35,56	49,16	63,42	72,33	78,15

Sob agitação de 50 rpm, independentemente do volume (500 ou 1000 mL) e do teor de tensoativo, os perfis de dissolução revelaram-se insatisfatórios, não atingindo o patamar mínimo de 85% de liberação nos tempos avaliados, o que inviabiliza o emprego dessa rotação devido ao efeito de segregação ou conificação (*coning*) no fundo do vaso. Em contrapartida, avaliações em meio tamponado com fosfato (pH 6,8; 1000 mL; 75 rpm) resultaram em liberações de 72,57% aos 60 min e 85,10% aos 120 min. Esse perfil foi cerca de 10% inferior aos obtidos em meios ácidos (SGS), evidenciando que o benznidazol, por se comportar como uma base extremamente fraca com pKa próximo a 0,2, apresenta sua estrutura predominantemente na forma molecular não ionizada em ampla faixa de pH (Diniz *et al.*, 2023), de modo que a maior eficiência dissolutiva observada em SGS pode estar relacionada à melhora da molhabilidade e interações cinéticas do fármaco com os componentes estruturais desse meio simulado em relação ao meio tamponado neutro.

Como o benznidazol classifica-se como um fármaco de Classe II no Sistema de Classificação Biofarmacêutica (alta permeabilidade e baixa solubilidade), a etapa de dissolução atua como o passo limitante para a sua absorção sistêmica, tornando o ensaio *in vitro* uma ferramenta preditiva crítica (Galia *et al.*, 1998; Guhman *et al.*, 2013). Para otimizar as condições operacionais de forma robusta, aplicou-se o planejamento fatorial 2³, cujas respostas estão discriminadas nas Tabelas 3 e 4.

Tabela 3. Matriz do planejamento fatorial experimental 2³ com os coeficientes de contraste e respostas de dissolução no tempo de 60 minutos.

Ens.	Média	Meio (1)	Rot. (2)	Vol. (3)	Int. (12)	Int. (13)	Int. (23)	Int. (123)	*Média (%)
1	+	-	-	-	+	+	+	-	84,26
2	+	-	+	-	-	+	-	+	85,29
3	+	+	-	-	-	-	+	+	87,34
4	+	+	+	-	+	-	-	-	83,72
5	+	-	-	+	+	-	-	+	84,84
6	+	-	+	+	-	-	+	-	87,29
7	+	+	-	+	-	+	-	-	89,23

8	+	+	+	+	+	+	+	+	92,37
---	---	---	---	---	---	---	---	---	-------

* A última coluna apresenta os valores médios do percentual dissolvido aos 60 minutos, obtidos experimentalmente e extraídos da Tabela 2 para as rotações de 75 e 100 rpm. Ens. = Ensaio; Rot. = Rotação; Vol. = Volume; Int. = Interação.

Tabela 4. Efeitos calculados para o planejamento fatorial 2^3 nos tempos de amostragem de 60 e 120 minutos.

Variáveis e Interações	Tempo: 60 minutos^a	Tempo: 120 minutos^b
Efeitos Principais		
Média	86,79	94,43
(1) Meio	2,74	4,13
(2) Rotação	0,75	-2,27
(3) Volume	3,27	1,42
Interações de Dois Fatores		
12	-0,99	-0,99
13	1,99	0,86
23	2,05	4,79
Interação de Três Fatores		
123	1,33	1,15

^aO erro padrão é 0,64 para cada efeito com 24 graus de liberdade ($p < 0,05$).

^bO erro padrão é 1,43 para cada efeito com 24 graus de liberdade ($p < 0,05$).

Conforme a análise estatística dos efeitos obtida para o tempo de 60 minutos (Tabela 4), os fatores principais meio (efeito de 2,74) e volume (efeito de 3,27) exerceram impactos positivos e significativos na resposta de dissolução, indicando que a transição para o nível superior (LSS 1,0% e volume de 1000 mL) otimiza o processo de transferência de massa. A variável isolada rotação não se mostrou estatisticamente significativa no tempo de 60 minutos (0,75). No entanto, observou-se uma forte interação positiva entre a rotação e o volume (efeito 23 de 2,05) e uma interação sinérgica de terceira ordem entre todos os fatores avaliados (efeito 123 de 1,33). No intervalo de 120 minutos, o fator principal meio permaneceu como o único termo isolado significativo (4,13). No tocante às interações, a associação entre rotação e volume (efeito 23 de 4,79) manteve-se significativa.

Considerando que a discriminação dos perfis cinéticos e a influência das variáveis hidrodinâmicas e químicas foram mais evidentes no intervalo de 60 minutos, este tempo foi eleito como referencial para a triagem. Assim, visando garantir a condição *sink* sem induzir

artefatos por agitação excessiva (visto que a rotação isolada não foi significativa), fixaram-se as seguintes condições operacionais para a validação do método: meio SGS + LSS 1,0%, volume de 1000 mL e agitação por pás a 75 rpm.

3.3 VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE DISSOLUÇÃO

Os resultados do ensaio de seletividade demonstraram uma leitura constante e basal de aproximadamente $1 \mu\text{g/mL}$ em todos os tempos analíticos amostrados para o placebo. Este valor é analiticamente insignificante frente ao teor total do fármaco, confirmando que os excipientes da formulação não interferem na quantificação do ativo no comprimento de onda de escolha.

Na robustez do meio de dissolução, avaliaram-se diferentes lotes de LSS do fabricante Vetec (L 0806072 e L 0902322). O t calculado para os tempos de 60 e 120 minutos ($t_{\text{calc}} = 0,6788$ e $1,3798$, respectivamente) foi menor que o t tabelado ($t_{\text{tab}} = 2,7764$ e $3,1824$). Portanto, com 95% de confiança, não há diferença estatisticamente significativa entre os lotes.

Diferença estatística significativa foi observada na comparação entre os fornecedores de LSS (Vetec e Nuclear) ($t_{\text{calc}} > t_{\text{tab}}$, $p < 0,05$). No entanto, sob a ótica do controle de qualidade e conformidade regulatória, os produtos foram considerados adequados por cumprirem as especificações do perfil de dissolução previamente determinadas. Recomenda-se, contudo, que a troca de fornecedor do tensoativo seja sempre formalmente qualificada.

11

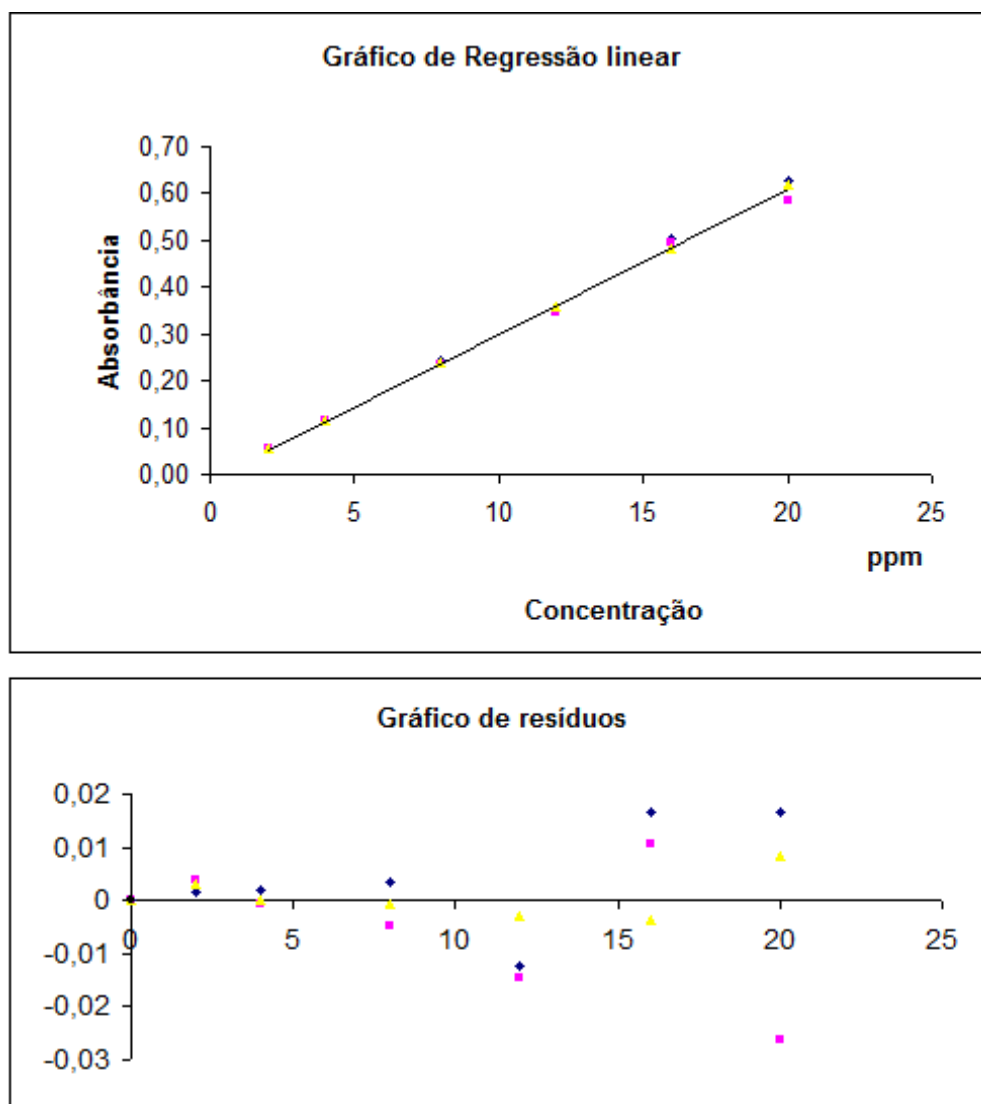
3.4 VALIDAÇÃO DO MÉTODO PARA QUANTIFICAÇÃO

3.4.1 Linearidade

O resultado médio dos pontos das três curvas de linearidade foi tratado pelo método dos mínimos quadrados, obtendo-se a equação da reta $y = 0,030961 (\pm 0,000851)x - 0,00973 (\pm 0,010329)$.

A análise de regressão linear demonstrou um coeficiente de determinação (R^2) de 0,99732, que corresponde a um coeficiente de correlação (r) de 0,9986, atendendo ao critério regulatório mínimo da RDC 166/2017 ($r \geq 0,990$). Os gráficos da curva de calibração e da distribuição dos resíduos estão apresentados na Figura 3.

Figura 3. Gráficos referentes à regressão linear e distribuição dos resíduos da curva de linearidade do benzonidazol.



Isso significa que 99,73% da variação total em torno da média é explicada pela regressão, restando apenas 0,27% de variação residual. Os limites de quantificação (LQ) e detecção (LD), calculados com base nos parâmetros estatísticos da reta conforme as equações normativas, resultaram em 0,1426 $\mu\text{g/mL}$ e 0,0941 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente.

3.4.2 Precisão

Os resultados de precisão intermediária apresentaram Desvio Padrão Relativo (DPR ou CV) estritamente inferior a 5% para ambos os analistas em dias diferentes (Tabela 5), cumprindo as exigências para métodos espectrofotométricos.

Tabela 5. Resultados da precisão intermediária realizada por analistas diferentes em diferentes dias.

Amostra	Analista 1 / 1º dia Conc. ($\mu\text{g/mL}$)	Analista 2 / 2º dia Conc. ($\mu\text{g/mL}$)
1	12,08	11,93
2	11,87	11,94
3	11,87	12,04
4	11,83	12,32
5	11,91	12,06
6	11,90	12,64
Média	11,91	12,16
DPR (%)	0,75	2,26

Como o t calculado (2,07) foi menor que o t tabelado (2,23) com 95% de confiança, e as variâncias mostraram-se equivalentes pelo teste F, confirma-se a precisão e a robustez intercorridas do método.

3.4.3 Exatidão

Os resultados experimentais de recuperação laboratorial estão dispostos na Tabela 6.

Tabela 6. Resultados da exatidão e recuperação do método.

Amostra	8 $\mu\text{g/mL}$	12 $\mu\text{g/mL}$	16 $\mu\text{g/mL}$
1	7,83	11,57	14,43
2	7,67	11,23	14,67
3	7,75	10,82	14,75
4	7,84	10,93	14,33
5	7,82	11,04	14,64
6	7,81	10,83	14,52
Média	7,79	11,07	14,56
DPR (%)	0,86	2,60	1,10

Os valores médios obtidos situaram-se estritamente dentro do intervalo de aceitação de 90 a 110% (faixa recomendada pela legislação para o doseamento do fármaco), comprovando a exatidão do método analítico.

3.4.4 Robustez

Os resultados da robustez para a variação do fornecedor de etanol PA estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7. Resultados da robustez para variação de fornecedor de etanol PA.

Amostra	Carlo Erba Conc. ($\mu\text{g/mL}$)	FMaia Conc. ($\mu\text{g/mL}$)
1	13,01	12,34
2	12,34	12,71
3	12,05	12,96
4	12,28	12,75
5	12,23	12,59
6	12,25	13,10
Média	12,36	12,74
DPR (%)	2,66	2,09

O tratamento estatístico por teste t de Student revelou um t calculado (2,20) menor que o t tabelado (2,22) com 95% de confiança, indicando que o método é robusto frente a pequenas variações operacionais de insumos.

A segunda variação deliberada testada foi o tempo de sonicação no banho de ultrassom (Tabela 8), parâmetro crítico por interferir diretamente na eficiência de extração do ativo da matriz farmacêutica.

Tabela 8. Resultados da robustez para variação do tempo de sonicação no ultrassom.

Amostra	10 min Conc. ($\mu\text{g/mL}$)	15 min Conc. ($\mu\text{g/mL}$)	20 min Conc. ($\mu\text{g/mL}$)
1	13,01	12,34	12,17
2	12,34	12,71	11,89
3	12,05	12,96	12,44
4	12,28	12,75	13,06
5	12,23	12,59	12,86
6	12,25	13,10	12,62
Média	12,36	12,74	12,51
DPR (%)	2,66	2,09	3,45

O tratamento por ANOVA (95% de confiança) gerou um F calculado (1,82) menor que o F tabelado (3,68), demonstrando estabilidade analítica e provando que o método quantitativo é robusto para os três tempos avaliados.

4. CONCLUSÃO

Considerando a relevância do ensaio de dissolução para fármacos pertencentes à Classe II do Sistema de Classificação Biofarmacêutica, o método de dissolução para comprimidos de benznidazol (BNZ) foi desenvolvido e adequadamente validado para aplicação em rotinas de controle de qualidade. O método estabelecido, que utiliza como meio o Suco Gástrico Simulado (SGS) acrescido de LSS 1% em volume de 1000 mL e rotação das pás a 75 rpm, demonstrou ser preciso, seletivo e robusto. Adicionalmente, o método espectrofotométrico empregado para a quantificação do teor dissolvido de BNZ também foi validado em conformidade com as exigências regulatórias vigentes, provando ser linear, preciso, seletivo, exato e robusto.

REFERÊNCIAS

AIACHE, J. M. et al. FIP Guidelines for dissolution testing of solid oral products. *Dissolution Technologies, Liberty*, v. 4, n. 4, p. 5-14, 1997.

BAPTISTA, E. B.; VOLPATO, N. M. Efeito do pH e da presença de tensoativos no meio de dissolução na correlação in vivo/in vitro de comprimidos de glibenclamida não bioequivalentes. *Revista Brasileira de Farmácia*, v. 88, n. 3, p. 107-112, 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 166, de 24 de julho de 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. *Diário Oficial da União: seção 1*, Brasília, DF, ano 154, n. 141, p. 57-59, 25 jul. 2017.

DINIZ, Melina Luiza Vieira et al. Microextraction by packed sorbent and high-performance liquid chromatography for determination of benznidazole in human plasma. *Journal of Chromatography B*, v. 1219, art. 123640, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2023.123640>.

GALIA, E. et al. Evaluation of various dissolution media for predicting in vivo performance of class I and class II drugs. *Pharmaceutical Research*, v. 15, n. 5, p. 698-705, 1998.

GUHMANN, M. et al. Design of biorelevant test setups for the prediction of diclofenac in vivo features after oral administration. *Pharmaceutical Research*, v. 30, n. 6, p. 1483-1501, jun. 2013.

HORTER, D.; DRESSMAN, J. B. Influence of physicochemical properties on dissolution of drugs in gastrointestinal tract. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 46, n. 1-3, p. 75-87, 2001.

JAMBHEKAR, S. S.; Breen, P. J. Drug dissolution: significance of physicochemical properties and physiological conditions. *Drug Discovery Today*, v. 18, n. 23-24, p. 1173-1184, dez. 2013.

MAGI, María Sol et al. Organic solvent-free benznidazole nanosuspension as an approach to a novel pediatric formulation for Chagas disease. *Pharmaceutical Development and Technology*, v. 29, n. 7, p. 745-756, 2024. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC11415019/>.

MARTIN, Alfred N. Martin's physical pharmacy and pharmaceutical sciences: physical chemical and biopharmaceutical principles in the pharmaceutical sciences. Editado por Patrick J. Sinko; coeditado por Yashveer Singh. 6. ed. Filadélfia: Lippincott Williams & Wilkins, 2011.

MEDEIROS, F. P. M. de et al. Avaliação de preparações extemporâneas de benznidazol: uniformidade e teor no tratamento da doença de chagas em pediatria. *Brazilian Journal of Animal and Environmental Research*, v. 9, n. 2, e87061, 2026. <https://doi.org/10.34188/bjaerv9n2-133>.

SILVA, A. L. M. et al. Desenvolvimento de método analítico por CLAE em comprimidos de BNZ para doença de Chagas. *Química Nova*, v. 30, n. 5, p. 1163-1166, 2007.

SOARES-SOBRINHO, J. L. et al. Caracterização físico-química do tripanocida benznidazol para o desenvolvimento de medicamentos. *Acta Farmacéutica Bonaerense*, v. 29, n. 5, p. 803-807, 2010.

SONI, T. et al. Development of discrimination method for dissolution of aceclofenac marketed formulations. *Dissolution Technologies*, v. 15, n. 2, p. 31-35, 2008.

16

SUNESSEN, V. H. et al. In vivo in vitro correlations for a poorly soluble drug, danazol, using the flow-through dissolution method with biorelevant dissolution media. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 24, n. 4, p. 305-313, 2005.

UNITED STATES PHARMACOPEIAL CONVENTION. USP-NF Online: United States Pharmacopeia, USP 48; National Formulary, NF 43. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2024.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Chagas disease (also known as American trypanosomiasis): Fact sheets. Genebra: WHO, 2024. Disponível em: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis)). Acesso em: 11 jun. 2026.