

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**“DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS PARA O
CONTROLE ANALÍTICO DO ANTI-HELMÍNTICO
RICOBENDAZOLE[®]”**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE EM QUÍMICA, área de concentração: Química Tecnológica.

Orientador: Prof. Dr. Moacir Rossi Forim

São Carlos - SP

2013

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

L732dv Lima, Tiago do Couto de.
Desenvolvimento e validação de métodos para o controle analítico do anti-helmíntico ricobendazole® / Tiago do Couto de Lima. -- São Carlos : UFSCar, 2014.
56 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2013.

1. Química. 2. Controle de qualidade. 3. Cromatografia líquida de alta eficiência. 4. Sulfóxido de albendazol. I. Título.

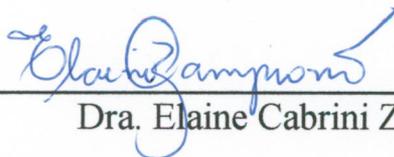
CDD: 540 (20ª)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Departamento de Química
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
Mestrado Profissional

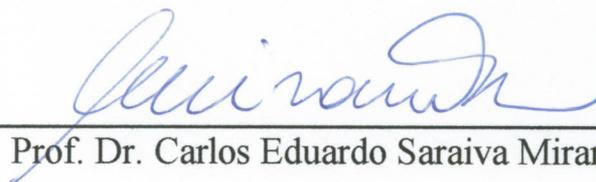
Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a defesa de dissertação de Mestrado Profissional do candidato Tiago do Couto de Lima, realizada em 16 de dezembro de 2013:



Prof. Dr. Moacir Rossi Forim



Dra. Elaine Cabrini Zamprônio



Prof. Dr. Carlos Eduardo Saraiva Miranda

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Moacir Rossi Forim, sinceros agradecimentos pela oportunidade e privilégio em ser seu aluno, ter recebido seu constante incentivo e atenção durante todo o projeto.

À empresa OuroFino Saúde Animal, pela oportunidade de realizar este projeto.

À minha gerente Silvia Barioni, e minha supervisora Eliane Ishikawa, por acreditarem em mim e me apoiar.

DEDICATÓRIA

À Deus e ao meu santo protetor São Judas Tadeu que me guiaram por este caminho tão difícil que escolhi percorrer.

À minha esposa Flávia Turci que esta a todo o momento do meu lado de forma incondicional.

À minha mãe Ana Lúcia do Couto de Lima que me ensinou tudo, e me tornou o homem que sou hoje.

“Somos do tamanho dos nossos sonhos”

Fernando Pessoa

LISTA DE ABREVIATURAS

ABZ -	Albendazol
ABZSO -	Sulfóxido de Albendazol
ANVISA -	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BPF -	Boas Práticas de Fabricação
BZD -	Benzimidazole
CCQ -	Círculos de controle da qualidade
CLAE -	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DAD -	Detector Diode Array
CLUE -	Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência
CQA -	Controle de qualidade alto
CQB -	Controle de qualidade baixo
CQM -	Controle de qualidade médio
CRF -	Conselho Regional de Farmácia
ICH -	<i>Internacional Conference on Harmonization</i>
IFA -	Insumo Farmacêutico Ativo
INPI -	Instituto Nacional de Propriedade Industrial
JIT -	Justamente no momento (<i>Just In Time</i>)
LD -	Limite de detecção
LQ -	Limite de quantificação
MAPA -	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
OPT -	Tecnologia de otimização de produção (<i>Optimized production technology</i>)
PNIFF -	Programa Nacional de Inspeção Indústria Farmacêutica e Farmoquímica
POP -	Procedimento Operacional Padrão
SE -	Solução estoque
SM -	Solução mãe
TQC -	Controle da Qualidade Total (<i>Total Quality Control</i>)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura química do Benzimidazole	20
Figura 2 – Estrutura química de Sulfóxido de Albendazol	21
Figura 3 - Gráfico em 3D do produto Ricobendazole e do placebo	34
Figura 4 – Cromatograma referente a seletividade da Fase móvel	34
Figura 5 – Cromatograma referente a seletividade do Placebo	34
Figura 6 – Cromatograma referente a seletividade do Padrão	34
Figura 7 – Cromatograma referente a seletividade do Produto	34
Figura 8 - Cromatograma da solução de Sulfóxido de Albendazol submetido à exposição em meio ácido	36
Figura 9 - Cromatograma da solução de Sulfóxido de Albendazol submetido à exposição em meio básico	36
Figura 10 - Cromatograma da solução de Sulfóxido de Albendazol submetido à exposição por oxidação.....	37
Figura 11 - Demonstração gráfica dos resultados obtidos para análise de linearidade no processo de validação.....	39
Figura 12 – Estrutura do Sulfóxido de Albendazol, seus potenciais metabólitos e produtos de degradação.....	43
Figura 13 – Cromatograma do Produto Ricobendazole®.....	44
Figura 14 – Cromatograma do produto Ricobendazole degradado com HCl.....	45
Figura 15 – Cromatograma do produto Ricobendazole degradado com NaOH.....	45
Figura 16 – Cromatograma do produto Ricobendazole degradado com H ₂ O ₂	46
Figura 17 - Espectro do produto Ricobendazole	46
Figura 18 - Espectro do produto Ricobendazole® degradado com H ₂ O ₂	47
Figura 19 - Cromatograma do produto Ricobendazole® obtido por CLUE.....	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Resultados da precisão do produto Ricobendazole®	39
Tabela 2 - Resultados da precisão intermediária do produto Ricobendazole®	40

RESUMO

O presente trabalho tem como objetivo desenvolver e validar um método analítico para quantificação do Sulfóxido de albendazol no produto comercial Ricobendazole[®] pelas técnicas de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE), assegurando a qualidade do produto técnico e a segurança do consumidor. O método desenvolvido e validado por CLAE tornou possível quantificar o Sulfóxido de albendazol, os parâmetros instrumentais foram fase estacionária Phenomenex C18, 250x4,6mm, 5 μ m, Gemini[®] e fase móvel constituída por tampão acetato de sódio 0,05 mol.L⁻¹ pH 5,0:Acetonitrina (75:25), vazão 1,0 mL.min⁻¹ e detecção UV à 290 nm. O tempo de retenção do ativo foi de 5,5 min e o tempo total de corrida analítica foi de 10 min. O coeficiente de correlação (r) de 0,9994, o resultado de recuperação do método considerando uma média geral das três concentrações foi de 99% para uma faixa linear de trabalho entre 80 e 120 μ g.mL⁻¹ com limites de detecção e quantificação de 0,3 μ g.mL⁻¹ e 1,0 μ g.mL⁻¹, respectivamente. Os resultados de precisão intermediária e de robustez apresentaram variações inferiores à 2%. O método de CLAE foi posteriormente testado por cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE) mantendo-se a mesma fase móvel Fase móvel: Tampão Acetato de Sódio 0,05M:Acetonitrila (75:25), fase estacionária Waters BEH[®] C18 (50mmx2,1mmx1,7 μ m), vazão 0,21 mL. min⁻¹, detector UV à 290 nm, tempo de retenção do ativo de 1,0 min e o tempo total de corrida analítica de 4,0 min. O método foi covalidado por CLUE para proporcionar uma maior flexibilidade analítica dentro do controle de qualidade, rapidez na liberação do produto e diminuição de gastos. Foram efetuados estudos no produto visando assegurar a estabilidade do mesmo durante toda sua validade, submetendo a condições forçadas de degradação por hidrólise ácida, básica, oxidação e temperatura. O produto mostrou-se estável não apresentando nenhum produto de degradação tóxico, obtendo assim resultados satisfatórios. Ambos os métodos podem ser considerados eficientes, rápidos e confiáveis para serem empregados em análises de rotina de controle de qualidade do produto comercial Ricobendazole[®].

Palavras-chave: Qualidade; Método analítico; Sulfóxido de Albendazol.

ABSTRACT

This study aims to develop and validate an analytical method for quantification of albendazole sulfoxide in Ricobendazole[®] product by high performance liquid chromatography (HPLC) ensuring product quality and consumer safety. The HPLC method with which it was possible to quantify the albendazole sulfoxide was carried out employing a phase C18, 250x4, 6 mm, 5 μ m, Gemini[®], and mobile phase of sodium acetate buffer 0.05M pH 5.0 : Acetonitrina (75:25), flow rate 1.0 ml / min and UV detection at 290 nm, the retention time was 5.5 min active and the total time of the analytical run was 10 min. The correlation coefficient (r) of 0.9994, the result recovery method considering an overall mean of three concentrations was 99% linear response range from 80 to 120 μ g.mL⁻¹ detection limit of 0.3 μ g.mL⁻¹ and the quantitation limit 1.0 μ g.mL⁻¹, the results of intermediate precision and robustness show variations lower than 2%. The method was later covalidado efficiency ultra chromatography (CLUE) while maintaining the same mobile phase Mobile phase: Buffer 0.05 M Sodium Acetate: Acetonitrile (75:25) BEH[®] C18 stationary phase (50mmx2, 1mmx1, 7 μ m) , flow rate 0.21 mL / min. UV detector 290 nm, retention time was 1.0 min active and the total time of 4.0 min analytical run. The method can be considered efficient, fast and reliable to be used in routine analysis of quality control Ricobendazole[®].

Keywords: Quality; Analytical method; Albendazole Sulfoxide.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS	VI
LISTA DE FIGURAS	VIII
LISTA DE TABELAS	IX
RESUMO	X
ABSTRACT	XI
1. INTRODUÇÃO	14
1.1 Retrospectiva da Historia da qualidade.....	15
1.2 Controle de qualidade.....	16
1.3 Estudos de estabilidade	17
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
2.1 O Benzimidazole (BZD).....	20
2.1.1 Farmacodinâmica	21
2.2 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	22
2.3 Cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE)	23
2.4 Validação analítica	24
2.4.1 Seletividade	24
2.4.2 Linearidade e faixa de aplicação	24
2.4.3 Precisão	26
2.4.4 Exatidão	26
2.4.5 Limite de Detecção	26
2.4.6 Limite de Quantificação	26
2.4.7 Robustez	28
3. OBJETIVOS	29
4. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	29
4.1 Materiais e reagentes	29
4.2 Produto técnico e especificações	29
4.3 Equipamentos, colunas cromatográficas e software	29
4.4 Soluções de Trabalho	30
4.4.1 Preparo dos padrões de Sulfóxido de Albendazol	30
4.4.1.1 Solução Estoque	30
4.4.1.2 Solução de Trabalho	30
4.4.1.3. Preparo da Amostra de Ricobendazole®	30

4.4.1.4 Preparo do tampão Acetato de Sódio 0,05M, pH 5	30
4.4.1.5 Preparo dos padrões de Linearidade	31
4.5 Condições Cromatográficas	31
4.6 Seletividade	32
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
5.1 Amostras do Produto Ricobendazole [®] sob Condições de Degradação Forçada (triplicata)	36
5.2 Linearidade	39
5.2.1 Limite de detecção (LD)	40
5.2.2 Limite de quantificação (LQ)	40
5.3 Precisão (Repetibilidade)	40
5.3.1 Precisão Intermediária	41
5.4 Exatidão	42
5.5 Estabilidade de Auto injetor	42
5.6 Robustez	43
5.7 Identificação dos produtos de degradação por espectrometria de massas.....	43
6. CONCLUSÃO	52
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53

1. INTRODUÇÃO

A importância da utilização de medicamentos de uso veterinário na cadeia de produção animal está intimamente relacionada aos progressos experimentados por esse segmento da agricultura nas duas últimas décadas. O controle de importantes zoonoses, tanto em caráter profilático como também terapêutico, foi apoiado em estratégias de manejo integrado da sanidade dos rebanhos, que envolveram, entre outras práticas, o emprego de fármacos. O conjunto de resultados preliminares do impacto desses medicamentos no desempenho zootécnico dos animais é, em geral, utilizado como forma de divulgação e inclusive para fins de registro no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Os benefícios aparentes desses produtos veterinários e a vinculação da utilização dos mesmos às expectativas de desempenho dos animais vêm sistematicamente massificando sua recomendação e utilização no Brasil. Entretanto, existem questionamentos permanentes a respeito da eficácia desses produtos uma vez que o desempenho predito dos animais manejados sob condições ideais raramente é alcançado em condições de campo. Diante dessas constatações, surgem algumas indagações relacionadas aos processos envolvidos com a administração dos medicamentos veterinários. O objetivo geral do projeto visa desenvolver e validar métodos analíticos para o controle do Ricobendazole[®].

A qualidade de um produto veterinário é algo que deve ser obtido como resultado de vários fatores experimentais que, de uma maneira ou de outra, entra na concepção, desenvolvimento, distribuição e uso do fármaco.

A necessidade de desenvolvimento e validação de métodos para o Sulfóxido de Albendazol em preparações veterinárias, utilizando técnicas modernas, torna-se cada vez mais necessária acompanhando a evolução da indústria veterinária no Brasil.

Validar um método analítico através de um sistema metodológico é legitimar o resultado, documentar e legalizar o processo.

Na constante busca pela satisfação dos clientes, internos e externos, destacam-se as empresas voltadas para o programa de Qualidade Total, cuja qualidade do processo é uma das características de destaque. Para que o processo possa resultar em produto ou serviço que corresponda a uma necessidade,

utilização ou aplicação que satisfaça o cliente, este deve atender as especificações, estar disponível e proporcionar lucro. Desta forma, a análise dos principais atributos da validação de metodologia analítica de um fármaco, assegura tanto a implantação da metodologia como a confiabilidade dos resultados analíticos. A validação é um dos principais instrumentos da garantia de qualidade, tornando-se ultrapassado o conceito de apenas controlá-la. Os atributos normalmente recomendados nos programas de validação de metodologia analítica são: exatidão, precisão, especificidade, limite de detecção, limite de quantificação, linearidade, robustez e teste de conformidade do sistema, além da seletividade e a sensibilidade do método. Com este intuito, este trabalho proporcionou condições para se ter uma visão mais ampla da validação, em particular da validação de metodologia analítica, bem como sua importância para outros setores da empresa.

1.1 RETROSPECTIVA HISTÓRICA DA QUALIDADE

No início do século XX o controle de qualidade sistematizou-se e começou a receber a aplicação da estatística através das técnicas de Shewart¹ e seus colegas. Eles adotaram procedimentos científicos de inspeção por amostragem e para isso publicaram tabelas de amostragem no começo dos anos 40. Também evoluíram os modelos de administração da qualidade¹. Este programa deveria ser em 4 etapas:

- Estabelecer padrões;
- Avaliar o desempenho;
- Agir quando necessário;
- Planejar aprimoramento.

Isso sem contar com o incentivo ao treinamento para o controle de qualidade e a pesquisa e realizar atividades propriamente ditas de controle de qualidade, mas com o final da Guerra veio uma abundância e com ela a quantidade da produção ficou mais importante que a qualidade.

Em 1961 uma versão de *Deming* sobre Controle da Qualidade Total (*Total Quality Control* – TQC) foi apresentada, onde o interesse do cliente era o ponto de partida, a principal ideia para se administrar¹.

A qualidade teria que ser embutida no produto ou serviço desde o começo a

partir dos desejos e interesses do cliente. A Qualidade Total se encontra:

- Em todos os estágios do ciclo industrial;
- Do Marketing;
- Engenharia;
- Suprimentos;
- Engenharia de processo;
- Produção, inspeção e testes;
- Expedição e instalação e assistência técnica.

1.2 Controle de qualidade

No Brasil, considerando a necessidade de dispor de um instrumento atualizado de avaliação das condições de fabricação e garantia de qualidade dos produtos de uso veterinário, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), estabelece por meio da Instrução Normativa⁵ nº 13 de 03/10/2003 o Regulamento de Boas Práticas de Fabricação (BPF) de Produtos de Uso Veterinário, sendo que tal regulamento avaliado por meio da aplicação do Roteiro de Inspeção de Boas Práticas de Fabricação, que seria então elaborado e aplicado pela Coordenação de Fiscalização de Produtos Veterinários do Departamento de Defesa Animal (MAPA)⁶.

Desde 2004, o MAPA fica responsável pela execução da inspeção e da fiscalização⁶ de produtos de uso veterinário, bem como estabelecimentos que o fabrica, manipula, fraciona, envasa, etc.

A Resolução RDC nº210 de 04 de agosto de 2003, forma um conjunto de normas que regulamentam a fabricação de um produto. A validação deverá ser o registro documentado de testes e procedimentos, obviamente baseado na BPF, isto é, proporcionando um alto grau de segurança. Um determinado processo torna-se confiável ao ser validado e todo esse rigor nas exigências para garantir a qualidade do produto final e a satisfação do consumidor⁶.

Mas se as BPFs estão constantemente sendo aprimoradas, a validação também será, e por isso cada vez mais a Indústria veterinária busca procedimentos e conceitos de boa qualidade para produtos, processos e serviços, visando atender aos padrões mínimos estabelecidos por órgãos reguladores governamentais nacionais e

internacionais, cuja incumbência é zelar pelo bem-estar da comunidade².

1.3 Estudos de estabilidade

Estabilidade é a capacidade de um produto em manter suas características originais conforme as suas especificações de pureza, qualidade e potência. O propósito do teste de estabilidade é fornecer evidências de como a qualidade de um produto varia com o tempo sob influência de uma variedade de fatores ambientais, como temperatura, umidade e luz, e estabelecer um período de reteste, no caso de substâncias, ou *shelf life* (Tempo de prateleira), no caso de produtos finais, para os produtos estudados, além de recomendar condições de armazenamento adequadas¹⁰.

O tema “estabilidade” tem um impacto crucial no desenvolvimento e comercialização de medicamentos, englobando várias fases do seu ciclo de vida. Desde a escolha racional dos produtos veterinários na fase de triagem de potenciais candidatos, seguindo mais adiante com o candidato nas etapas de pré-formulação e compatibilidade, formulação de lotes pilotos, lotes registro e no acompanhamento dos lotes comerciais (pós-registro). Durante todo este ciclo, a interpretação dos resultados vai depender diretamente da qualidade dos procedimentos elaborados adotados pela empresa, da confiabilidade nos padrões utilizados, da robustez dos métodos, equipamentos e da medição, bem como também da capacitação da equipe.

A finalidade do teste de estabilidade é fornecer evidências sobre como a qualidade de um IFA (Insumo Farmacêutico Ativo) ou de um produto farmacêutico vai variar em função do tempo, fatores ambientais, tais como temperatura, umidade e luz, etc.

Guias internacionais, como o caso do ICH (*Internacional Conference on Harmonization*)⁸ vêm servindo como base de referência para a revisão das regulamentações nacionais vigentes, as quais apontam cada vez mais para o mesmo fim, numa tendência de harmonização, convergência e amadurecimento dos setores regulado e regulador. A discussão sobre o estabelecimento dos parâmetros para notificação, identificação e qualificação de produtos de degradação em medicamentos com princípios ativos sintéticos e semissintéticos se encontra em revisão no “Guia para Realização dos Estudos de Estabilidade”, da vigente resolução RE N° 01 (29/07/05)⁹.

No segmento farmacêutico, são consideradas substâncias medicamentosas, ou insumos ativos farmacêuticos, as matérias-primas utilizadas na formulação de medicamentos. Excipientes ou ingredientes não ativos podem ser adicionados a substâncias para desenvolvimento de uma formulação de medicamento. Os medicamentos, também chamados de produtos farmacêuticos, após acondicionados em suas embalagens finais, são finalmente postos no mercado. Os estudos de estabilidade estabelecem prazo de reteste para as substâncias medicamentosas e prazo de validade, ou *shelf life*, no caso de produtos farmacêuticos¹⁰. Define-se *shelf life* como, o tempo que um medicamento, em condições específicas de armazenamento, mantém as especificações estabelecidas em termos de substância ativa, qualidade e pureza¹¹. Também alerta para o fato da estabilidade dos medicamentos dependerem de vários fatores químicos e físicos, bem com da natureza dos excipientes presentes na formulação do medicamento, que podem influenciar a estabilidade do ingrediente ativo devido às interações químicas, particularmente para fatores de risco que afetam a estabilidade de uma substância ou produto: fatores internos - como reatividade dos ingredientes ativos, excipientes e material de embalagem, assim com a interação entre os componentes; fatores relacionados à produção - como tamanho do lote, equipamentos utilizados e qualidade dos componentes.

Para trabalhar de maneira segura, os testes devem ser conduzidos em condições mais estressantes do que as ambientais nas quais as substâncias ou medicamentos permanecem estáveis: diariamente (dia/noite) e sazonalmente (verão/inverno) as flutuações de temperatura e umidade do ambiente são substituídas por testes conduzidos em condições de longa duração ou acelerados, a temperaturas (de 25°C a $\pm 2\%$) e umidades relativas do ar (de 30 a $\pm 5\%$) constantes; os testes de estabilidade de longa duração são realizados nas condições climáticas máximas do mercado alvo; para cobrir os extremos, os testes de stress de curto prazo também podem ser conduzidos a altas temperaturas e umidades extremas para produtos a serem comercializados globalmente, é levada em consideração a pior condição climática de todos os mercados¹².

A falta de um guia específico para condução dos estudos de estabilidade possibilita um desenvolvimento dos estudos de degradação de acordo com as necessidades da empresa, na Oufofino Saúde animal foi definida uma degradação forçada utilizando HCl para hidrólise ácida, NaOH para hidrólise básica e H₂O₂ para

oxidação do Sulfóxido de Albendazol, buscando degrada-lo entre 10 e 30% de sua área referente ao T0 para uma possível verificação de formação de produtos de degradação. E para identificação destes possíveis produtos de degradação formados são utilizadas técnicas analíticas modernas como CLAE/DAD, CLUE, CLAE/EM que auxiliam na avaliação e propiciam uma avaliação quanto a sua estrutura química e toxicidade.

Nos testes de stress, os ensaios fazem parte das estratégias de desenvolvimento de produtos e são normalmente realizadas sob condições mais severas que as dos testes acelerado. Os excipientes podem ser adicionados aos medicamentos com finalidade, por exemplo, de conferir determinada cor ou para controle de pH e umidade, etc.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O Benzimidazole (BZD)

A presença frequente de parasitas em animais acarretam importantes problemas de saúde e perdas econômicas significativas¹⁷. A necessidade de controlar estes parasitas tem levado ao desenvolvimento de inúmeras moléculas anti-helmínticas, como por exemplo, imidotiazoles, benzoimidazoles e probenzoimidazoles.

Entre os antiparasitários, o benzimidazole (BZD) é um dos grupos com maior espectro de atividade, com elevada eficácia e segurança, por ter o maior espectro de ação contra nematóides e cestóides e trematóides, graças a sua capacidade para inibir a polimerização da tubulina parasitária durante a mitose e possui baixa toxicidade¹⁷.

Os benzimidazóles são pós brancos cristalinos, com pontos de fusão ligeiramente altos, com baixa solubilidade em água e elevada solubilidade em meios orgânicos. O BZD tem um estrutura bicíclica composta por um anel de benzeno que funde-se nas posições 4 e 5 de anel imidazólico formando o anel benzoimidazólico¹⁷.

Os vários BZD diferem-se nos seus substituintes, os quais estão na posição 2 e 5 do anel benzimidazólico.

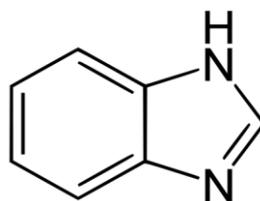


Figura 1 – Estrutura química do Benzimidazole

De acordo com estes substituintes, os BZD anti-helmínticos podem ser classificados em¹⁷:

- a) Metilcarbamatos: albendazol, sulfóxido de albendazol, parbendazol, mebendazol, Flubendazol, ciclobendazol, oxibendazol, luxabendazol, fembendazol e oxfendazol.

- b) Tiazole: tiabendazol, cambendazol.
- c) Tiol halogenados: triclabendazole

2.1.1 Farmacodinâmica

Uma vez absorvido, o BZD atinge a circulação, onde apresenta um grau de ligação as proteínas plasmáticas superior a 50%, com um volume de distribuição relativamente elevada¹⁶ atingindo os tecidos bem irrigados e periféricos.

A maioria destes fármacos são metabolizados no fígado, em duas fases, que leva a metabólitos ativos, como o Sulfóxido de Albendazol, e inativos, como Albendazol Sulfona¹⁸. Alguns são também metabolizados no trato gastrointestinal, como por exemplo o Tiabendazol¹⁹.

Metabólitos formados no fígado durante a primeira fase do metabolismo são produtos de processos oxidativos e de hidrólise, na segunda fase do metabolismo sua polaridade é aumentada. Estes BZD e seus metabólitos são excretados na bile e na urina.

Fazendo parte da família dos Benzimidazoles está o Sulfóxido de Albendazol, objeto deste estudo, ilustrado na figura 2.

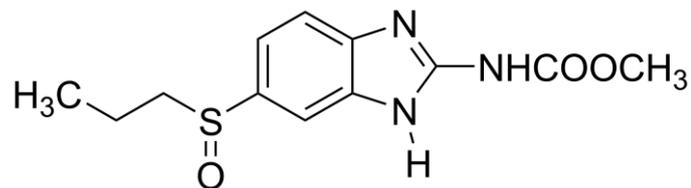


Figura 2 – Estrutura química de Sulfóxido de Albendazol¹⁸.

Dos BZD atualmente comercializados, o Sulfóxido de Albendazol (ABZSO) é o mais eficaz dos antiparasitários por possuir um maior espectro de ação. Provavelmente, as variações do efeito dos anti-helmínticos são devido as diferenças na disponibilidade de fármaco no corpo e, por consequência, a sua concentração na zona de ação²¹. Parte do seu efeito é atribuída à ação do seu metabólito, o Sulfóxido de Albendazol (ABZSO).

Na estrutura química da molécula do ABZSO tem um centro assimétrico quiral na posição do átomo de enxofre, que dá origem à existência de dois enantiômeros, ((+) - ABZSO),((-) ABZSO), de acordo com a sua atividade ótica. Estes enantiômeros

podem ter um comportamento farmacológico diferente. Atualmente não existem estudos sobre o perfil farmacológico dos enantiômeros de ABZSO.

O ABZSO, metil-[5-(propilsulfinil)-1H-benzimidazol-2-il] carbamato ($C_{12}H_{15}N_3O_3S$), também chamado de Ricobendazole®, é utilizada diretamente como um anti-helmíntico de amplo espectro, embora também apareça com um metabólito do Albendazol (ABZ).

Tem um peso molecular de 281,33g/mol, e é uma molécula polar, mas ainda tem uma elevada solubilidade lipídica. Seu pKa é de 7,8 e, assim como outros de seu grupo, tem uma natureza anfótera, aumentando a sua solubilidade quando em meio ácido¹⁸.

O ABZSO inibe o metabolismo energético do parasita devido à sua capacidade de agir em sistemas enzimáticos e no metabolismo energético. Esta interferência provoca uma diminuição na disponibilidade da energia necessária para o funcionamento normal dos órgãos vitais dos parasitas, o que leva a um esgotamento das fontes de energia, causando a sua morte.

O ABZSO tem uma elevada afinidade pela tubulina das células dos parasitas impedindo a polimerização das mesmas. A sua ligação com a tubulina nos microtúbulos durante o crescimento provoca a inibição da mitose¹⁸. Tal inibição pode causar uma perda de microtúbulos citoplásmicos dos parasitas, provocando uma interrupção da migração dos organelos intracelulares, bloqueando assim o transporte de organelas secretoras.

2.2 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

A cromatografia é um método físico-químico de separação²⁵. Está fundamentada na migração diferencial dos componentes de uma mistura, que ocorre devido a diferentes interações, entre duas fases imiscíveis, a fase móvel e a fase estacionária. A grande variedade de combinações entre fases móveis e estacionárias torna-a uma técnica extremamente versátil e de grande aplicação²⁵.

Entre as vantagens do emprego da CLAE, destacam-se os procedimentos simples e razoavelmente rápidos que exigem conhecimentos das variáveis cromatográficas sobre as interações intermoleculares, que conduzem a separação, e a análise instrumental que permite uma boa resolução, automação de operações, registro e processamento da informação obtida e necessitam de pequenas

quantidades de amostra, podendo-se fazer uso de quantidades maiores de material²⁵.

2.3 Cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE)

A CLUE é o avanço mais recente entre as técnicas cromatográficas líquidas. Esta técnica baseia-se nos mesmos princípios da cromatografia líquida de alta eficiência porém utiliza fases estacionárias com partículas de sílica menores que $2\mu\text{m}$ ^{23,24}. O uso destas partículas juntamente com as altas velocidades lineares da fase móvel, aumenta a resolução e a detecção, além de diminuir os tempos de análises^{23,24}.

Para tornar isto possível, uma vez que a atual tecnologia de instrumentação (bombas, injetores e detectores) disponível para a CLAE não é projetada para trabalhar em altas pressões, um novo equipamento que pode operar em pressões acima de 100 MPa foi introduzido e adaptado às necessidades atuais. Em 2004 pela Waters Corporation.

Este primeiro equipamento comercial se destacou por ser capaz de operar em pressões acima de 100 MPa (15000 psi), conhecido comercialmente como *Acquity™ ultra performance liquid chromatography system (UPLCTM)*²³. Logo em seguida, outros dois fabricantes, a Jasco e a Agilent, lançaram seus instrumentos de CLUE, o *Xtrem LC (X-LC)*, também com capacidade de trabalhar em pressões acima de 100 MPa e o *1200 Series Rapid Resolution LC system* capaz de trabalhar em pressões acima de 60 MPa (9000 psi)²⁴.

As modificações requeridas em um sistema de CLUE são a capacidade de trabalhar a pressões muito altas (100 MPa), volumes internos muito menores (conexões, alça de amostragem, cela do detector, bombas), celas do detector sem dispersão e com alta taxa de aquisição, melhoramento no sistema de controle e de dados, colunas resistentes para trabalharem a altas pressões e com baixo volume morto, injetores com precisão na faixa de volumes pequenos, etc²⁴.

2.4 Validação analítica

A validação deve garantir, através de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados¹².

Validação é o processo de definir uma exigência analítica e confirmar que o método sob investigação tem capacidade de desempenho consistente com o que a aplicação requer²⁶, confirmação através de testes e apresentação de evidências objetivas de que determinados requisitos são preenchidos para um dado uso intencional²⁷, assegurando a credibilidade destes durante o uso rotineiro, sendo algumas vezes mencionado como o “processo que fornece uma evidência documentada de que o método realiza aquilo para o qual é indicado para fazer²⁸”.

Os parâmetros analíticos normalmente encontrados para validação de métodos de separação são: seletividade; linearidade e faixa de aplicação; precisão; exatidão; limite de detecção; limite de quantificação e robustez. Estes termos são conhecidos como parâmetros de desempenho analítico.²⁴

2.4.1 Seletividade

A seletividade de um método instrumental de separação é a capacidade de avaliar, de forma inequívoca, as substâncias em exame na presença de componentes que podem interferir com a sua determinação em uma amostra complexa. A seletividade avalia o grau de interferência de espécies como outro ingrediente ativo, excipientes, impurezas e produtos de degradação, bem com outros compostos de propriedades similares que possam estar, por ventura, presentes. A seletividade garante que a banda de resposta seja exclusivamente do composto de interesse.^{28,30}

2.4.2 Linearidade e faixa de aplicação

A linearidade corresponde à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em exame, dentro de uma determinada faixa de aplicação.^{11,28} A correlação entre o sinal medido (área ou

altura da banda) e a massa ou concentração da espécie a ser quantificada muito raramente é conhecida *a priori*.

Na maior parte dos casos, a relação matemática entre o sinal e a concentração ou massa da espécie de interesse deve ser determinada empiricamente, a partir de sinais medidos para massas ou concentrações conhecidas dessa espécie. Essa relação matemática, muitas vezes, pode ser expressa como uma equação de reta chamada de *curva de calibração analítica*.³¹

Utiliza-se a regressão estatística para avaliar o sistema de calibração e suas incertezas associadas. No procedimento de medição química, a calibração é mais complexa, pois os valores de y são utilizados para prever os valores de x , sendo assim denominada regressão inversa. Os pressupostos na obtenção da curva de calibração são: linearidade do modelo; erro somente em y ; erros aleatórios e com variância homogênea; e erros com distribuição probabilística normal.

Além dos coeficientes de regressão y e x , também é possível calcular, a partir dos pontos experimentais, o coeficiente de correlação r ³². O que r realmente representa, em qualquer circunstância, é o coeficiente de correlação entre os valores observados e os valores estimados pelo modelo:

$$R = r (y_e, y)$$

Um erro comum é usar o valor numérico de r^2 , ou de sua raiz quadrada r , para avaliar um modelo e concluir, caso esse valor seja suficientemente alto, que é satisfatório. Um valor de 0,99 para r (isto é, $r^2 = 0,98$), é obviamente muito alto, mas significa apenas que 98% da variação total em torno da média foi explicada pelo modelo. É possível que os 2% restantes estejam concentrados numa única porção da curva, e isso indicaria falta de ajuste. O modo correto de fazer avaliação é usar o teste F para falta de ajuste, se o modelo está bem ajustado, a média quadrática devida falta de ajuste, reflete apenas os erros aleatórios. Tão importante quanto fazer o teste F é examinar cuidadosamente os resíduos deixados pelo modelo. Num modelo bem ajustado esses resíduos devem apresentar uma distribuição normal, ou melhor, não devem apresentar nenhum indício de anormalidade. Só faz sentido calcular as estimativas e seus intervalos de confiança se o modelo empregado estiver correto, isto é, se ele se mostrar capaz de descrever satisfatoriamente o comportamento dos valores experimentais. A validade do modelo e a significância estatística da curva ajustada podem ser testadas por meio da análise de variância,

que tem como ponto de partida a decomposição da soma quadrática dos desvios de todas as observações em relação a média.

2.4.3 Precisão

Representa a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, sob condições definidas³³. A precisão também pode ser expressa através do intervalo de confiança da média, que é uma faixa de valores no qual existe uma determinada probabilidade de se encontrar um certo valor de uma variável.

2.4.4 Exatidão

Representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e um valor de referência aceito como verdadeiro³³. É importante observar que um valor exato ou verdadeiro é o valor obtido por uma medição perfeita e este valor é indeterminado por natureza³³.

2.4.5 Limite de Detecção

O limite de detecção representa a menor concentração da substância em exame que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, utilizando um determinado procedimento experimental³³. O limite de detecção pode ser calculado de três maneiras diferentes: método visual, método relação sinal-ruído, método baseado em parâmetros da curva analítica.

2.4.6 Limite de Quantificação

O limite de quantificação representa a menor concentração da substância em exame que pode ser medida, utilizando um determinado procedimento experimental.³³

2.4.7 Robustez

A robustez de um método mede a sensibilidade que este apresenta face a pequenas variações. Diz-se que um método é robusto quando ele não é afetado por uma modificação pequena e deliberada em seus parâmetros. A robustez de um método cromatográfico é avaliada, por exemplo, pela variação de parâmetros como a concentração do solvente orgânico, pH e força iônica da fase móvel em CLAE, programação da temperatura, natureza do gás de arraste em Cromatografia gasosa, bem como o tempo de extração, agitação, etc. As mudanças introduzidas refletem as alterações que podem ocorrer quando um método é transferido para outros laboratórios, analistas ou equipamentos.³⁵

3. OBJETIVOS

A qualidade de um produto farmacêutico é algo que se obtém como resultado de vários fatores que, de uma maneira ou de outra, entra na concepção, desenvolvimento, distribuição e uso do fármaco.

Este estudo tem como objetivo auxiliar o mercado veterinário na evolução e aprimoramento de suas técnicas analíticas, desenvolver e validar métodos analíticos eficientes para quantificação e acompanhamento da estabilidade do Sulfóxido de Albendazol, gerar um Procedimento Operacional Padrão (POP), o qual deverá ser implantado na linha de produção do Ricobendazole[®] e atender as exigências legais sobre o registro de medicamentos veterinários.

4. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

4.1 Materiais e reagentes

Foram utilizados Água deionizada MilliQ®, sistema Millipore; Acetonitrila e metanol grau HPLC (J.T.Baker®,Phillipisburg,USA); Ácido fosfórico p.a, Hidróxido de Sódio p.a, Peróxido de hidrogênio p.a, Ácido Fórmico p.a e Acetato de Sódio Triidratado p.a (Synth®,São Paulo,Brasil); Ácido Acético Glacial (J.T.Baker®,Phillipisburg,USA); Sulfóxido de Albendazol (Sigma-Aldrich®,Germany) 98,49% de pureza cromatográfica; Membrana filtrante PVDF 0,45 µm, 47mm de diâmetro Millipore® (São Paulo, Brasil); Filtro Millex de PVDF 0,45 µm, 25mm de diâmetro Millipore® (São Paulo, Brasil).

4.2 Produto técnico e especificações

As amostras Solução injetável Ricobendazole®, que contém 11g de Sulfóxido de Albendazol por 100 mL de excipiente, e sua solução placebo (segredo industrial), foram gentilmente fornecidas pela empresa OuroFino Saúde Animal.

4.3 Equipamentos, colunas cromatográficas e software

Balança analítica XS205DU Mettler Toledo® (São Paulo, Brasil); Banho ultrassom Quimis® Q335D (São Paulo, Brasil); Sistema de filtração a vácuo Millipore® (São Paulo, Brasil); Câmara climática Ohaus 2000. Foram utilizados um Cromatógrafo líquido Waters Acquity H/Class (Waters Milford, M.A, USA) configurado com bomba quaternária J10QSM, auto injetor J10SDI, forno de coluna J10HLP e detector de ultravioleta J10TUV. O controle do equipamento UPLC®, aquisição e processamento dos dados foram realizados pelo software Waters Empower® 2; Cromatógrafo líquido Shimadzu® composto por um injetor automático SIL-20A ,sistema de degaseificador DGU-20A5 on-line, sistemas de bombas quaternário LC-20AT, forno CTO-10Asvp, detector SPD 20-A UV/VIS e software LC Solution® (Kyoto, Japan); Coluna cromatográfica C18 BEH (50x2, 1 mm d.i., 1,7µm diâmetro de partícula, P.N.186002350 Waters, USA); Coluna cromatográfica C18 (250 x 4,6mm, 5µm, Gemini® (Torrance, USA); pHmetro Ohaus® .

4.4 Soluções de Trabalho

4.4.1 Preparo dos padrões de Sulfóxido de Albendazol

4.4.1.1 Solução Estoque

Em um balão volumétrico de 50mL, foi pesado 62,5mg de Sulfóxido de Albendazol e adicionado 30mL de Metanol, foi colocado quinze minutos no ultrassom e o volume foi completado com metanol.

4.4.1.2 Solução de Trabalho

Soluções de trabalho foram preparadas transferindo os volumes exatos de (0,640mL), (0,800mL), (0,960mL) para três balões de 10mL, respectivamente. O volume foi completado com metanol grau HPLC.

4.4.1.3 Preparo da Amostra de Ricobendazole[®]

Em um balão volumétrico de 50mL, foi pesado 672,0mg de Ricobendazole[®] e adicionado 30mL de metanol, foi colocado quinze minutos no ultrassom completando o volume com metanol, em seguida foi pipetado 0,800mL para um balão de 10mL e completado o volume com metanol.

4.4.1.4 Preparo do tampão Acetato de Sódio 0,05M, pH 5

Foi pesado 5,103g de acetato de sódio triidratado e dissolvido por agitação em 750mL de água purificada, ajustando o pH para 5 com ácido acético glacial. Foi filtrado em membrana filtrante PVDF de 0,45 µm com o auxílio do sistema de filtração a vácuo.

4.4.1.5 Preparo dos padrões de Linearidade

As amostras foram preparadas em cinco concentrações, em triplicata.

Para o preparo da solução mãe foi pesado 62,5 mg de Sulfóxido de Albendazol em um balão volumétrico de 50 ml e adicionado 30ml de Metanol, colocado quinze minutos no ultrassom e completado o volume com metanol.

Para o padrão 1 foi pipetado 640 μL da solução mãe em um balão volumétrico de 10 mL e em seguida completado com metanol, resultando em uma concentração de $80 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de Sulfóxido de Albendazol.

Para o padrão 2 foi pipetado 720 μL da solução mãe em um balão volumétrico de 10 mL e em seguida completado com metanol, resultando em uma concentração de $90 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de Sulfóxido de Albendazol.

Para o padrão 3 foi pipetado 800 μL da solução mãe em um balão volumétrico de 10 mL e em seguida completado com metanol, resultando em uma concentração de $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de Sulfóxido de Albendazol.

Para o padrão 4 foi pipetado 880 μL da solução mãe em um balão volumétrico de 10 mL e em seguida completado com metanol, resultando em uma concentração de $110 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de Sulfóxido de Albendazol.

Para o padrão 5 foi pipetado 960 μL da solução mãe em um balão volumétrico de 10 mL e em seguida completado com metanol, resultando em uma concentração de $120 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de Sulfóxido de Albendazol.

4.5 Condições Cromatográficas

Como o Sulfóxido de Albendazol é um princípio ativo exclusivo do segmento veterinário, não há monografia oficial em nenhum compêndio, ou seja, nenhuma metodologia analítica oficial, por isso todos os parâmetros analíticos foram desenvolvidos baseados na estrutura química do mesmo, levando em consideração parâmetros como fase móvel, fase estacionária, comprimento de onda e fluxo.

Após o desenvolvimento dos parâmetros acima, chegou-se às seguintes condições:

Foi utilizado para o método de CLAE como fase móvel: Acetonitrila: Tampão Acetato de Sódio (25:75%v/v) e uma fase estacionária: Gemini[®] C18 (250 mm x 4,6mm x 5,0mm) a uma temperatura de 30°C, mantendo um fluxo constante de 1,0

mL.min⁻¹ com um volume de Injeção das amostras de 10 µL e o detector em um comprimento de onda de UV 290 nm.

Foi utilizado para o método de CLAE/DAD como fase móvel: Acetonitrila: Tampão Acetato de Sódio (25:75%v/v) e uma fase estacionária: Gemini[®] C18 (250 mm x 4,6mm x 5,0mm) a uma temperatura de 30°C, mantendo um fluxo constante de 1,0 mL.min⁻¹ com um volume de Injeção das amostras de 10 µL e o detector em um comprimento de onda de UV 200 nm a 800nm.

Foi utilizado para o método de CLUE como fase móvel: Acetonitrila: Tampão Acetato de Sódio (25:75%v/v) e uma fase estacionária: C18 BEH (50x2, 1 mm d.i., 1,7µm diâmetro de partícula, a uma temperatura de 30°C, mantendo um fluxo constante de 0,21 mL/min⁻¹ com um volume de Injeção das amostras de 0,4µL e o detector em um comprimento de onda de UV 290nm.

4.6 Seletividade

A demonstração da seletividade foi feita por avaliação da interferência da fase móvel e dos excipientes do placebo do Produto Ricobendazole[®] no tempo de retenção do Sulfóxido de Albendazol. Para tal, foi injetada a Fase Móvel, o Placebo do Produto Ricobendazole[®], o Padrão de Sulfóxido de Albendazol e o Produto Ricobendazole[®] nas condições cromatográficas descritas no item 4.5.

Avaliação da interferência dos produtos de degradação foi avaliada na etapa de desenvolvimento analítico, procedendo na seguinte forma:

Foi preparada a amostra do produto Ricobendazole[®] e submetida a condições de estresse induzido por Hidrólise Ácida, Hidrólise Básica, Oxidação em diversas concentrações até obter a ideal e Umidade/Calor (80°C/90%UR) para obter uma degradação do Sulfóxido de Albendazol entre 10 e 30%, para visualizar possíveis produtos de degradação.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A técnica de CLAE é largamente utilizada na Indústria veterinária. O uso de CLAE inclui acompanhamento de produção, controle de qualidade de matérias primas, testes de estabilidade e estudos de impurezas.

Um procedimento analítico deve descrever em detalhes as etapas necessárias para efetuar cada teste analítico, deve incluir, mas não está limitado a: a amostra, o padrão de referência e ao preparo dos reagentes, uso do equipamento, geração da curva de calibração, uso de fórmulas para os cálculos necessários, etc. O procedimento analítico pode ser referido como Procedimento Operacional Padrão (POP) ou método analítico de CLAE, como não foi encontrado monografia do Sulfóxido de Albendazol sua solubilidade foi definida em função de suas propriedades físico-químicas com isso foi possível definir solventes que puderam ser usados na composição da fase móvel.

Os ensaios de extração do analito foram realizados com diferentes solventes e diferentes tempos de extração. As diluições da amostra foram definidas de forma que o analito estivesse na concentração ideal para análise. A coluna foi escolhida levando em consideração a estrutura química do analito e de seus grupos funcionais. Com isso foi possível consultar na literatura o uso de colunas para estruturas químicas semelhantes. O teste de coluna foi feito em conjunto com teste de fase móvel. Os solventes utilizados foram metanol, acetonitrila e tampão.

A distribuição relativa do soluto entre duas fases foi determinada pela interação que este tem com cada fase e foi encontrada uma fase móvel que promoveu um equilíbrio conveniente do soluto em relação à fase estacionária e a fase móvel, de modo que o analito eluiu de modo satisfatório, apresentando uma boa seletividade.

Após todos os parâmetros definidos, os mesmos foram otimizados e o método foi validado por CLAE, devido a eficiência e rapidez da técnica e posteriormente transferido por CLUE, para proporcionar uma maior facilidade operacional e rapidez da análise do produto no controle de qualidade.

O método foi considerado Seletivo por não ocorrer interferência da Fase Móvel e dos excipientes do placebo do Produto Ricobendazole® no tempo de retenção do Sulfóxido de Albendazol, pela resolução entre as bandas do Sulfóxido

de Albendazol das impurezas/produtos de degradação vizinhos a este ser igual ou superior a 1,5 ($RS \geq 1,5$) e por ser comprovada a pureza da banda do Sulfóxido de Albendazol por CLAE/DAD e por CLUE/DAD. O cromatograma em três dimensões (3D), segundo figura 3, assegurou que não existe nenhum outro componente, conhecido ou desconhecido, sendo eluído junto com o Sulfóxido de Albendazol. Isto garantiu que a banda de resposta é exclusivamente do Sulfóxido de Albendazol, comprovando a seletividade do método proposto.

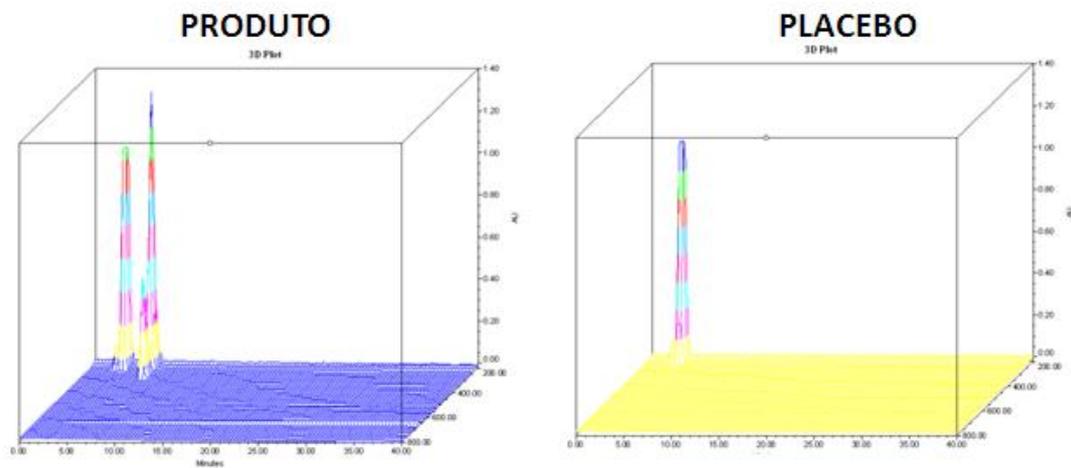


Figura 3 - Gráfico em 3D do produto Ricobendazole e do placebo.

Para determinação da seletividade foram feitas injeções da fase móvel, do placebo, do padrão e do produto, cujos cromatogramas estão abaixo:

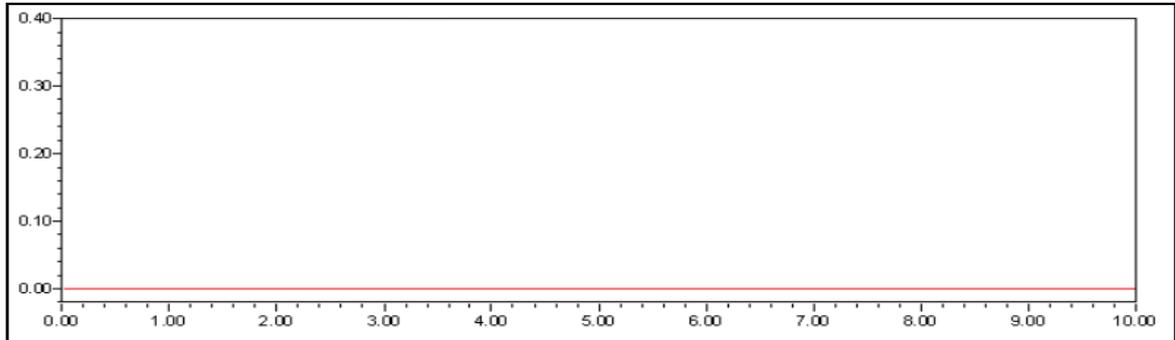


Figura 4 – Cromatograma referente a seletividade da Fase móvel

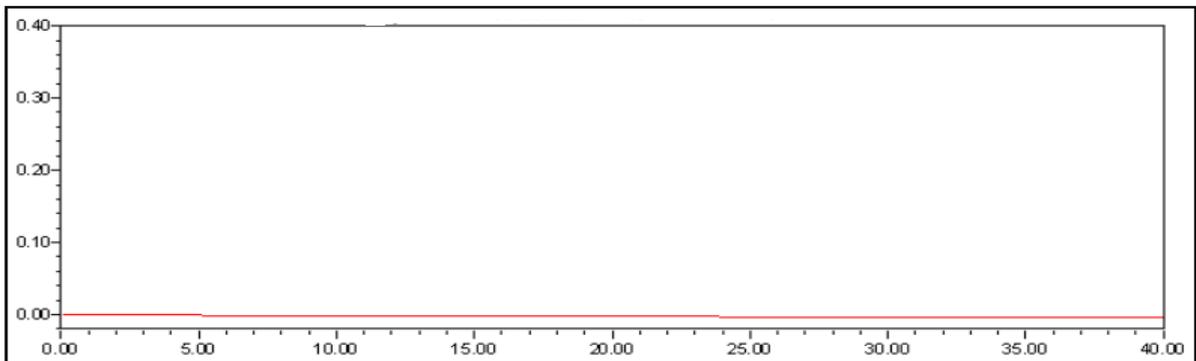


Figura 5 – Cromatograma referente a seletividade do Placebo

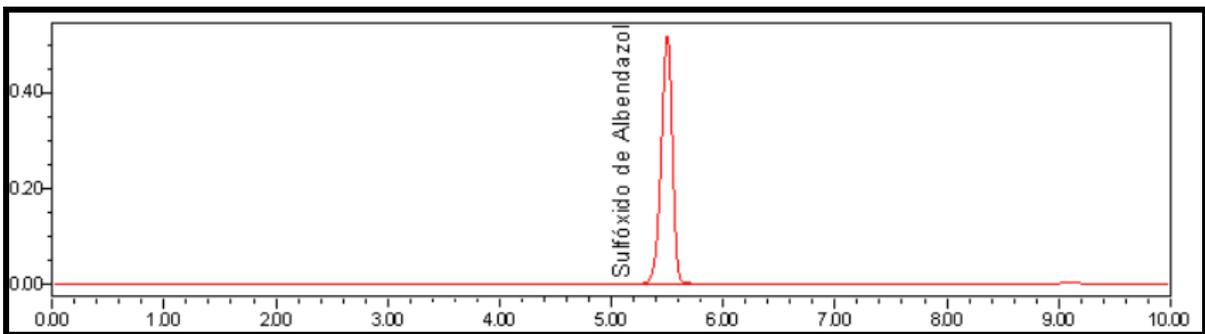


Figura 6 – Cromatograma referente a seletividade do Padrão

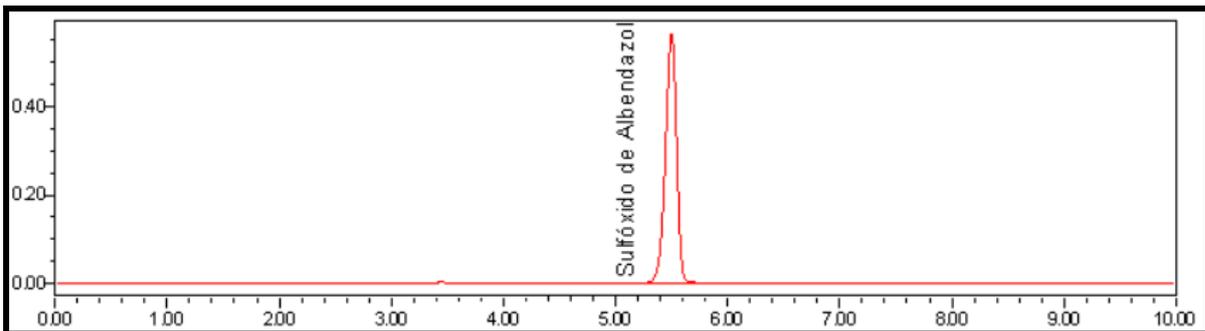


Figura 7 – Cromatograma referente a seletividade do Produto

De acordo com os resultados obtidos nos cromatogramas, o método mostrou-se seletivo, pois não apresentou nenhuma banda cromatográfica nas injeções de fase móvel e de placebo no tempo de retenção do ativo, comprovando assim que o método possui a capacidade de avaliar, de forma inequívoca, as substâncias em exame na presença de excipientes do Ricobendazole® que podem interferir em sua determinação, avaliando também o grau de interferência de impurezas e produtos de degradação, garantindo que a banda de resposta seja exclusivamente do composto de interesse.^{28,30}

5.1 Amostras do Produto Ricobendazole® sob Condições de Degradação Forçada (triplicata)

Foram testadas várias concentrações nos meios básico, ácido e oxidativo, a fim de obter uma degradação do Sulfóxido de Albendazol entre 10 e 30%, possibilitando assim a visualização de possíveis produtos de degradação.

Hidrólise Ácida (HCl 0,5N em estufa a 80°C por 2horas)

Em um balão volumétrico de 50 mL, foram pesados 672,0 mg do produto Ricobendazole® e adicionado aproximadamente 10 mL de Metanol. Deixado no ultrassom por 15 minutos. A seguir, foi adicionado 15mL de Ácido Clorídrico 0,5N e metanol deixando o volume final em 30mL. Foi agitado por 1 minuto e colocado em estufa a 80°C por 2 horas. Em seguida, a fim de interromper a reação, foi adicionado Hidróxido de Sódio 0,5N até pH neutro e agitado. Após a solução atingir a temperatura ambiente, foi completado o volume do balão com Metanol e agitado até total homogeneização. A seguir, foi transferido 800µL desta solução para um balão volumétrico de 10mL, completado o volume com metanol e filtrado em membrana PVDF 0,45 µm . Podemos visualizar abaixo o cromatograma da solução de Sulfóxido de Albendazol submetido à exposição em meio ácido na Figura 6.

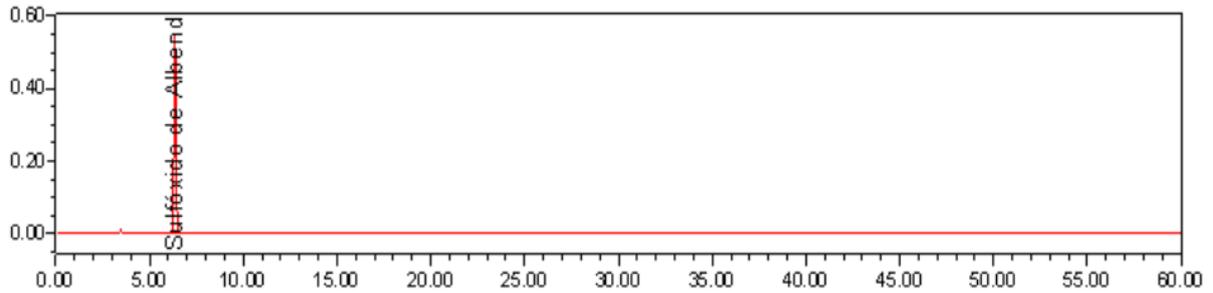


Figura 8 - Cromatograma da solução de Sulfóxido de Albendazol submetido à exposição em meio ácido

Mesmo em condições extremas, de HCl 0,5N em estufa a 80°C por 2 horas, o meio ácido não apresentou produtos de degradação.

Hidrólise Básica (NaOH 0,5N em estufa a 80°C por 2 horas)

Em um balão volumétrico de 50 mL, foram pesados 672,0 mg do produto Ricobendazole® e adicionado aproximadamente 10 mL de Metanol. Deixado em ultrassom por 15 minutos e agitado por 1 minuto. A seguir, foi adicionado 15mL de Hidróxido de Sódio 0,5N e metanol a fim de fechar o volume final para 30mL. Foi colocar em estufa a 80°C por 2 horas. Em seguida, a fim de interromper a reação, foi adicionado Ácido Clorídrico Concentrado até pH neutro e agitado. Após a solução atingir a temperatura ambiente, foi completado o volume do balão com Metanol. A seguir, foi transferido 800 µL desta solução para um balão volumétrico de 10 mL, completado o volume com metanol, agitado por 1 minuto e filtrado em membrana PVDF de 0,45 µm. Podemos visualizar abaixo o cromatograma da solução de Sulfóxido de Albendazol submetido à exposição em meio básico na Figura 7.

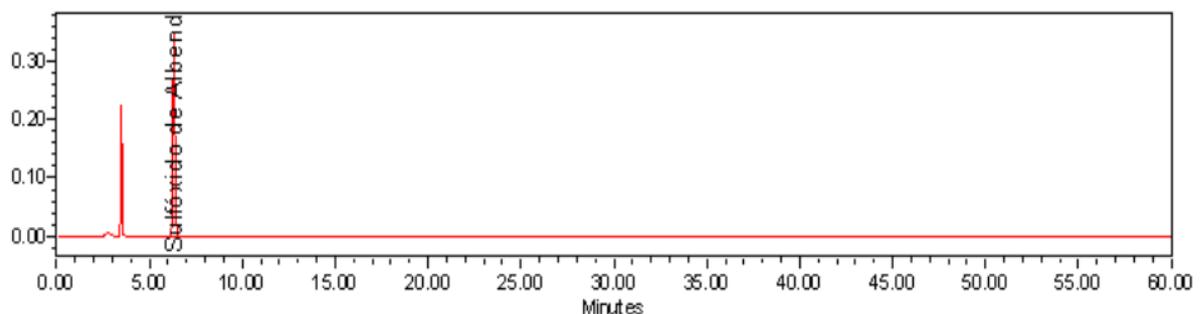


Figura 9 - Cromatograma da solução de Sulfóxido de Albendazol submetido à exposição em meio básico

O produto foi submetido a condições extremas de NaOH 1,0N em estufa a 80°C por 2 horas e apresentou a formação de um produto de degradação.

Oxidação (H₂O₂ 25% em estufa a 80°C por 2 horas)

Em um balão volumétrico de 50mL, foram pesados 672,0 mg do produto Ricobendazole[®] e adicionado aproximadamente 5,8 mL de Metanol. Foi deixado em ultrassom por 15 minutos. A seguir, foram adicionados 25,9mL de Peróxido de Hidrogênio 23,4% a fim de fechar o volume final para 30mL. Foi agitado por 1 minuto e colocado em estufa a 80°C por 2 horas. Em seguida, foi completado o volume do balão com Metanol. A seguir, foram transferidos 800 µL desta solução para um balão volumétrico de 10mL, completando o volume com metanol, foi agitado por 1 minuto e filtrado em membrana PVDF de 0,45µm. Podemos visualizar abaixo o cromatograma da solução de Sulfóxido de Albendazol submetido à exposição por oxidação.

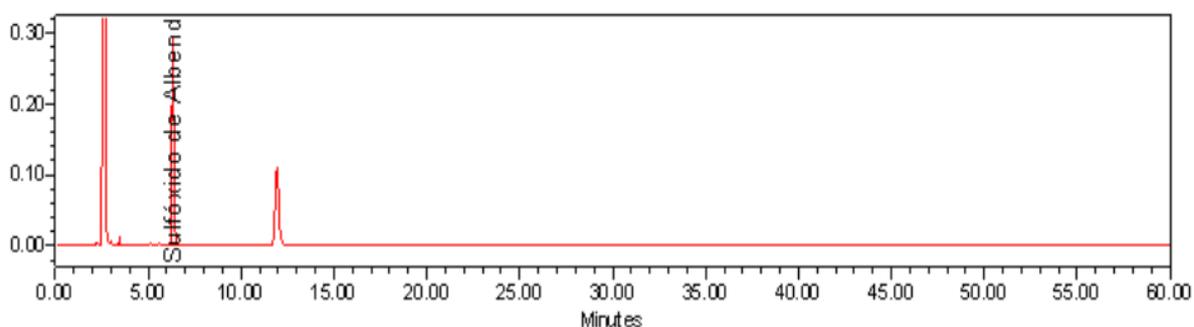


Figura 10 - Cromatograma da solução de Sulfóxido de Albendazol submetido à exposição por oxidação.

O produto foi submetido a condições extremas de H₂O₂ 25% em estufa a 80°C por 2 horas e apresentou a formação de produtos de degradação.

5.2 Linearidade

A figura abaixo ilustra a demonstração gráfica dos resultados obtidos para análise de linearidade no processo de validação.

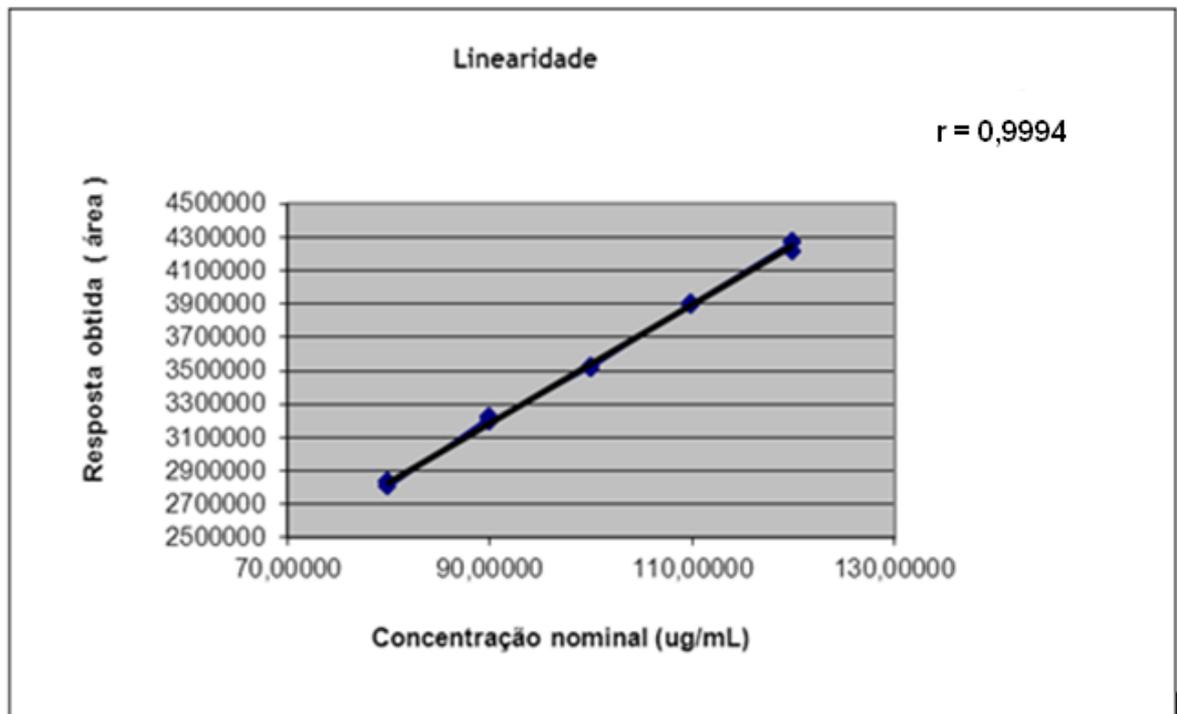


Figura 11 - Demonstração gráfica dos resultados obtidos para análise de linearidade no processo de validação por CLAE.

A linearidade obtida correspondeu à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em exame, dentro da faixa de aplicação proposta.

O valor obtido de 0,9994 para r (isto é, $r^2 = 0,9989$), significou que 99% da variação total em torno da média foi explicada. É possível que o 1% restantes estejam concentrados numa única porção da curva, por isso foi aplicado o teste estatístico F, para indicar caso tenha ocorrido a falta de ajuste, pois a média quadrática obtida refletiu apenas erros aleatórios. No teste de resíduos não apresentou nenhum indício de anormalidade.

Todos os resultados obtidos na análise de variância foram satisfatórios.

5.2.1 Limite de detecção (LD)

Foi detectada a concentração mínima de $0,3 \mu\text{g.mL}^{-1}$, com precisão e exatidão especificada pelo método, porém não necessariamente quantificada.⁸

O critério adotado para determinação de LD foi a relação entre a área do sinal e do ruído da linha de base, sendo adotada a relação de 3:1, conforme estabelecido pelo ICH¹¹.

O resultado obtido foi satisfatório, pois demonstrou a sensibilidade do método.

5.2.2 Limite de quantificação (LQ)

Foi mensurada a concentração mínima de $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$, com precisão e exatidão especificada pelo método, dentro dos valores aceitáveis.⁸

O critério adotado para determinação de LQ foi a relação entre a área do sinal e do ruído da linha de base, sendo adotada a relação de 10:1, conforme estabelecido pelo ICH¹¹.

O resultado obtido foi satisfatório, pois demonstrou a sensibilidade do método.

5.3 Precisão (Repetibilidade)

A repetibilidade foi avaliada pela proximidade dos resultados obtidos das amostras e expressa como desvio padrão relativo (coeficiente de variação) entre os resultados.

Tabela 1 – Resultados da precisão do produto Ricobendazole®

Ricobendazole®	Conc (%p/v)
Produto 1	11,0
Produto 2	11,1
Produto 3	11,1
Produto 4	11,1
Produto 5	11,1
Produto 6	11,1
Média	11,1
Desvio Padrão	0,0

CV (%)	0,4
--------	-----

A repetibilidade foi verificada através de 6 determinações da mesma amostra do produto Ricobendazole®. Estas amostras representaram a concentração de 100% do ativo.

A repetibilidade foi avaliada pela análise do coeficiente de variação (CV%) entre as 6 amostras, e o resultado foi de 0,4%, sendo que o exigido é de $\leq 2\%$ para o ativo, comprovando a precisão do método.¹²

4.3.1 Precisão Intermediária

A Precisão Intermediária foi avaliada pela concordância dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra e foi expressa como coeficiente de variação entre os resultados para o Sulfóxido de Albendazol.

As amostras foram preparadas em quadruplicata e analisadas por três dias consecutivos, onde o resultado de desvio padrão obtido foi de 0,5%, sendo que o exigido é de $\leq 2\%$ para o ativo, comprovando a precisão intermediária do método.¹²

Tabela 2 - Resultados da precisão intermediária do produto Ricobendazole®

Ricobendazole®	Conc (%p/v)
1º Dia	11,0
	11,1
	11,1
	11,1
2º Dia	11,1
	11,1
	11,0
	11,2
3º Dia	11,1
	11,0
	11,1
	11,1
Média	11,1
CV (%)	0,5

5.4 Exatidão

A exatidão do método foi determinada após o estabelecimento da linearidade, do intervalo linear e da especificidade, e verificada a partir de 9 determinações, em 3 concentrações, baixa, média e a alta, com 3 réplicas de cada.⁸

Foi calculada como porcentagem de recuperação da quantidade conhecida do analito adicionado ao placebo. A exatidão foi expressada pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente:

$$\text{Exatidão} = \frac{\text{Concentração média experimental}}{\text{Concentração teórica}} \times 100$$

Para a avaliação da exatidão, foram analisadas 3 amostras controle de qualidade (CQB, CQM e CQA), preparadas pela adição do ativo ao placebo, as concentrações foram definidas considerando a proximidade da concentração baixa, média e alta da curva.

Para CQ baixo foi preparada a amostra com 83 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de Sulfóxido de Albendazol e obtido o resultado de 99% de recuperação.

Para CQ médio foi preparada a amostra com 109 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de Sulfóxido de Albendazol e obtido o resultado de 99%

Para CQ alto foi preparada a amostra com 117 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de Sulfóxido de Albendazol e obtido o resultado de 99%.

Todos os resultados de recuperação obtidos ficaram dentro do especificado pela Legislação.

5.5 Estabilidade de Auto injetor

Para avaliar a estabilidade do Sulfóxido de Albendazol no tempo e condições de análise, as 6 amostras do produto Ricobendazole quantificadas no primeiro dia de validação foram mantidas no auto injetor por 24 horas, tempo máximo permitido pela empresa, e reanalisadas.

Para determinar a porcentagem de variação entre os resultados foi utilizado o seguinte cálculo:

$$\text{Recuperação} = \frac{(\text{Concentração final} - \text{Concentração inicial})}{\text{Concentração final}} \cdot 100\%$$

A estabilidade das soluções foi de 0,9% e considerada satisfatória, pois a variação permitida é de até 2% em relação à média da concentração inicial do ativo, determinando assim que as soluções não sofreram nenhum tipo de degradação por um determinado período de tempo em condições de armazenagem pré-definidas.

5.6 Robustez

O método cromatográfico foi variado em 2% no fluxo de fase móvel, 2% na composição da fase móvel, foi trocado o lote da coluna cromatográfica utilizada e variado em 2% no pH do tampão da fase móvel. A variação da temperatura do forno da coluna cromatográfica também variou em 2%. Todos os parâmetros acima variaram 2% para mais e para menos.

A avaliação foi feita pela variação dos resultados finais em relação aos resultados iniciais do método analítico.

A robustez obtida na média entre todos os parâmetros alterados foi de 1% e considerada satisfatória, considerando a variação máxima aceita de 2%.

5.7 Identificação dos produtos de degradação por espectrometria de massas.

Com base nos resultados obtidos através do estudo de degradação por cromatografia líquida, foi utilizada a técnica de espectrometria de massas para identificação dos produtos de degradação gerados, baseado na literatura, conforme figura 12.

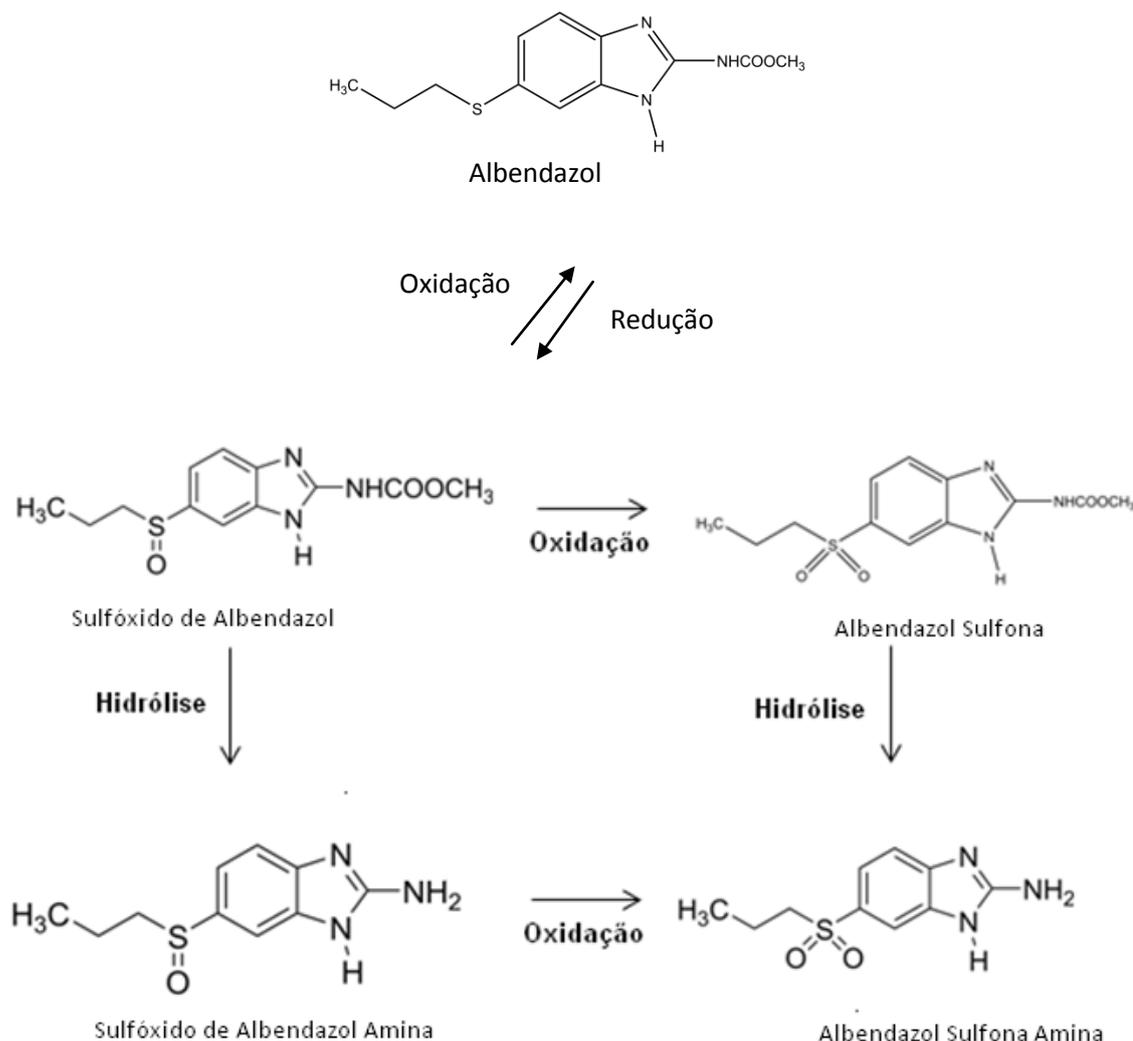


Figura 12 – Estrutura do Sulfóxido de Albendazol, seus potenciais metabólitos e produtos de degradação.¹⁸

A saída do cromatógrafo líquido foi ligada em linha com um espectrômetro de massas com analisador por triplo quadrupolo API™ 2000 (AB/MDS Sciex, Framingham, MA, USA). Foram utilizadas duas interfaces de ionização em pressão atmosférica (API), ionização por *electrospray* através de uma fonte Turbolon Spray® (ESI-MS) Para otimização do espectrômetro de massas, foram avaliados parâmetros dependentes do analito para MS e MS/MS as transições de maior intensidade necessárias para a identificação por modo SRM, o potencial de desagregação (DP), potencial de focalização (FP), potencial de entrada (EP), voltagem do TurbolonSpray® (IS), energia do gás de colisão (CAD), energia de colisão (CE) e potenciais de entrada e saída da célula (CEP e CXP respectivamente). Estes

parâmetros foram avaliados usando infusão direta de uma solução de Sulfóxido de Albendazol $10\mu\text{g.mL}^{-1}$ na vazão de $10\mu\text{l.min}^{-1}$. Para os parâmetros dependentes da fonte como a altura e distância da sonda do TurbolonSpray®, gás de cortina (CUR), gás nebulizador (GS1), gás de aquecimento (GS2) e temperatura da fonte (TEM) foi utilizado uma solução aquosa de $1\mu\text{g.mL}^{-1}$ por injeção em fluxo utilizando como fase móvel solução 0,5% ácido fórmico:Acetonitrila:Metanol (60:20:20) (v/v/v) previamente selecionada nos parâmetros cromatográficos. É importante ressaltar que para uma melhor adequação entre as vazões usadas para promover a melhor separação cromatográfica e para a inserção do analito no espectrômetro de massas, um divisor de fluxo foi adaptado na interface do cromatógrafo com o espectrômetro, direcionando apenas um terço da vazão total para a entrada da fonte de ionização. Os resultados obtidos nos testes de estresse, empregando-se o método por CLAE/MS, podem ser observados nas figuras a seguir:

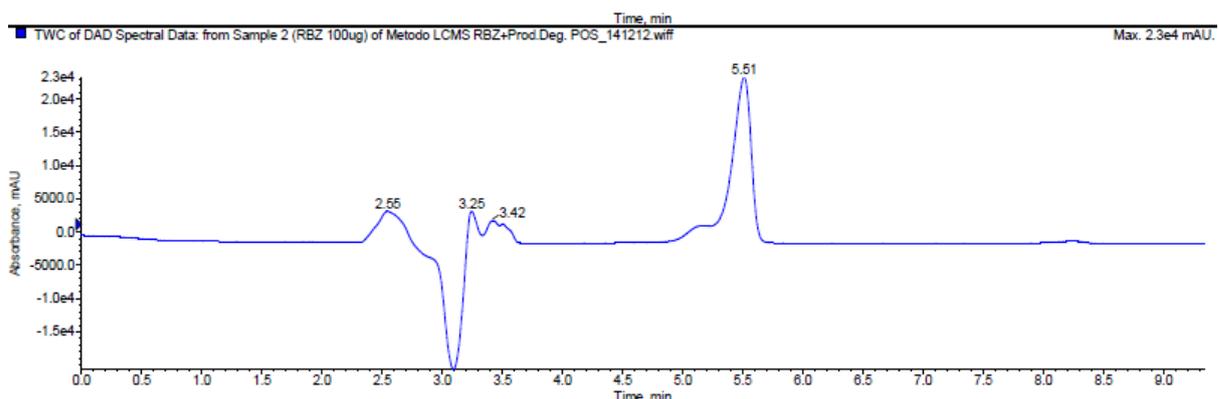


Figura 13 – Cromatograma do Produto Ricobendazole® controle.

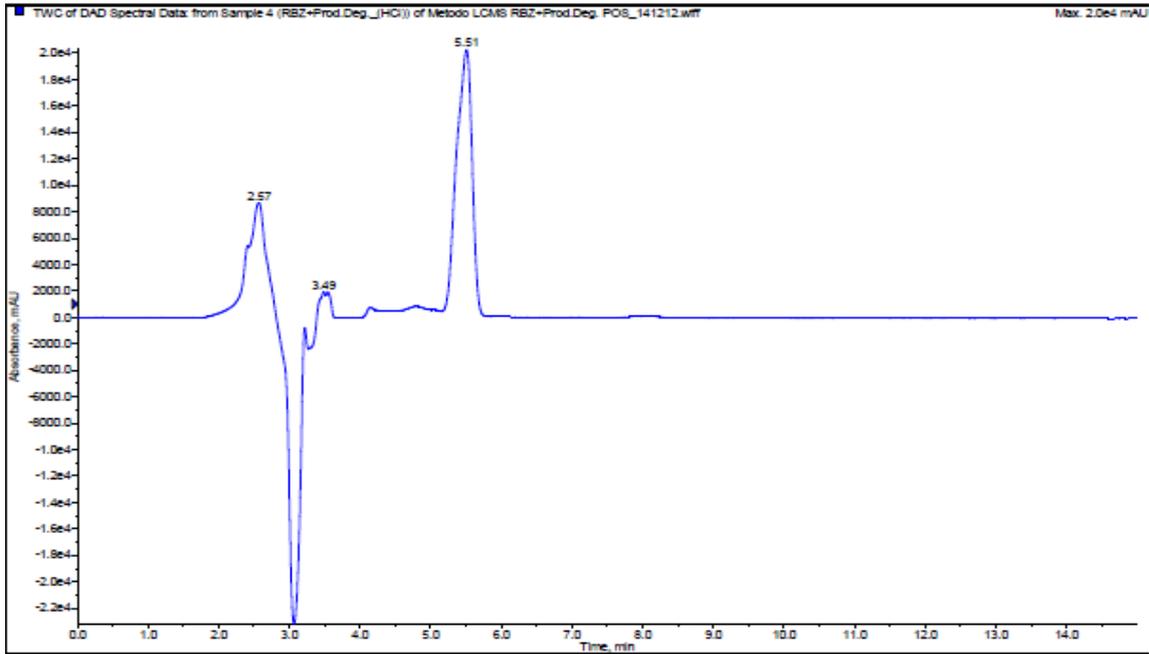


Figura 14 – Cromatograma do produto Ricobendazole degradado com HCl

Ricobendazole degradado com HCl, apresentou uma boa estabilidade perante a hidrólise ácida pois não apresentou produto de degradação.

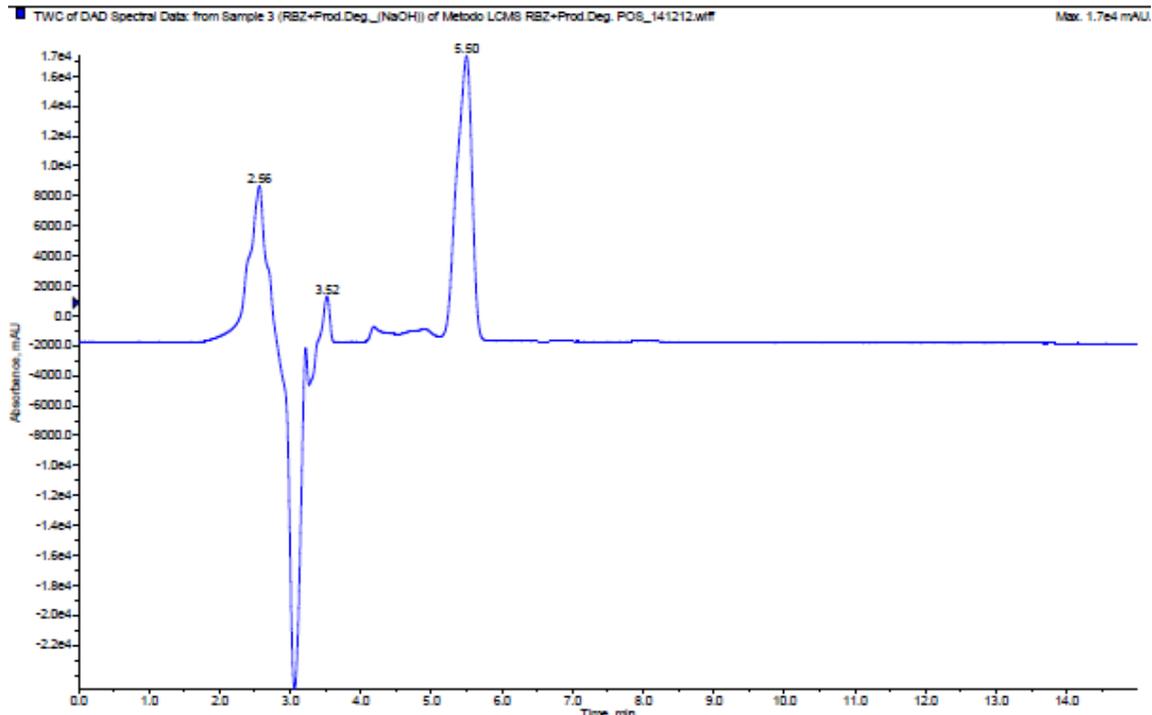


Figura 15 – Cromatograma do produto Ricobendazole degradado com NaOH

Ricobendazole degradado com NaOH, apresentou uma boa estabilidade perante a hidrólise básica pois não apresentou produto de degradação.

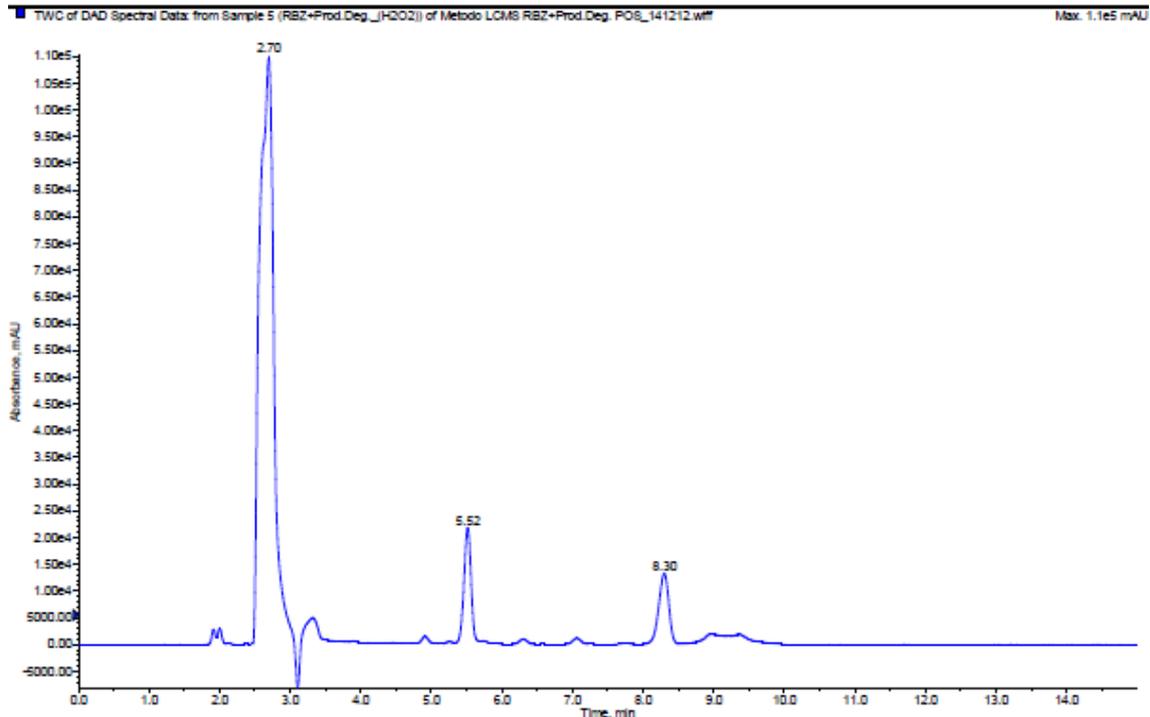


Figura 16 – Cromatograma do produto Ricobendazole degradado com H₂O₂

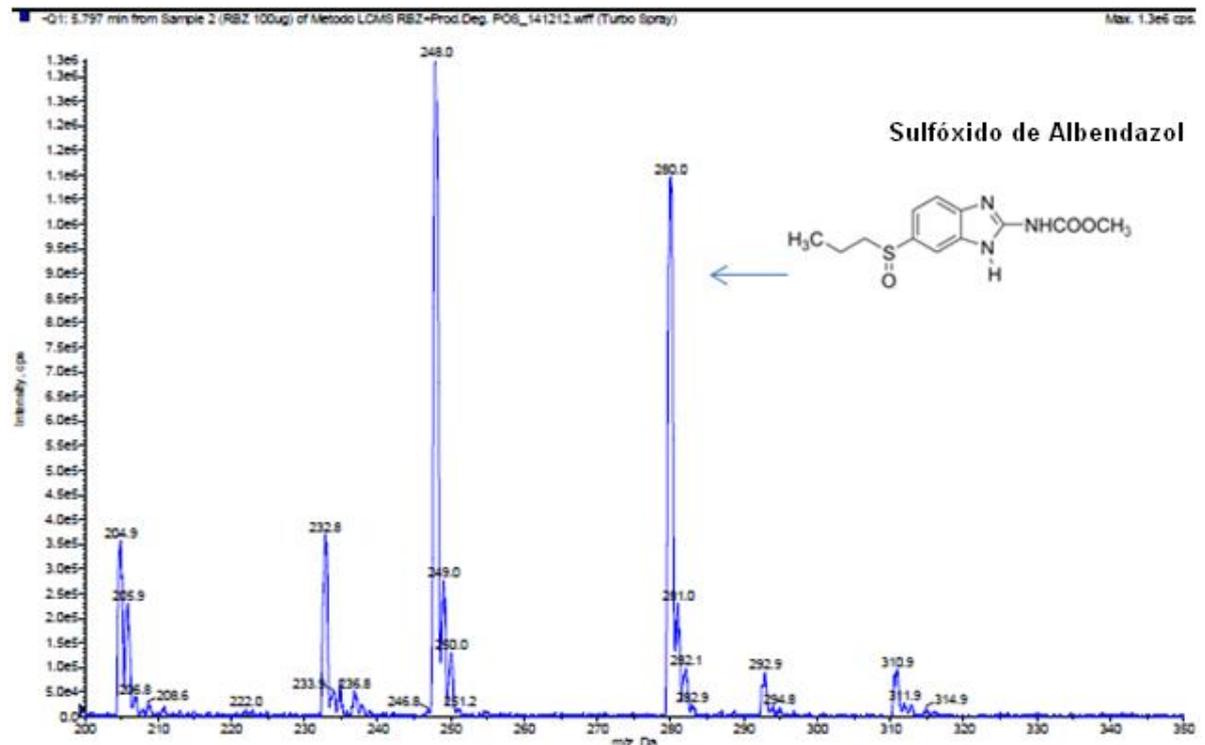


Figura 17 - Espectro do produto Ricobendazole

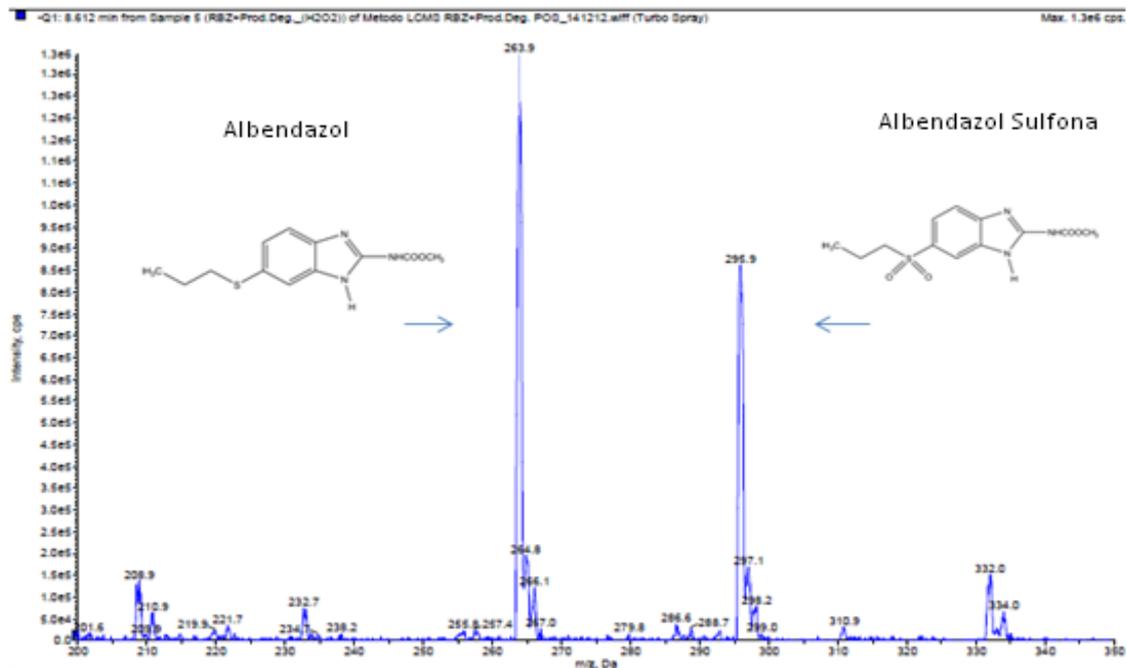


Figura 18 - Espectro do produto Ricobendazole[®] degradado com H₂O₂

Espectro do produto Ricobendazole[®] degradado com H₂O₂, apresentou a formação de dois produtos de degradação o Albendazol e o Albendazol Sulfona gerados através da oxidação do Sulfóxido de Albendazol, comprovando o esquema metabólico apresentado na figura 12.

Após a revisão da literatura ficou evidente que não são encontradas muitas publicações e compêndios oficiais mencionando a quantificação do Sulfóxido de Albendazol por cromatografia líquida de alta eficiência.

Discussão dos resultados obtidos por Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Para cromatografia líquida de alta eficiência foram testadas diferentes fases móveis e diferentes colunas cromatográficas, foram testadas as colunas C18 e C8 para verificar melhor separação. Foi observado que a coluna cromatográfica C18, 250x4,6 mm, 5µ Gemini[®], possibilitou a melhor resolução da banda cromatográfica do Sulfóxido de Albendazol.

Com o propósito de desenvolver uma metodologia simples, rápida e de baixo custo foi utilizado uma fase móvel constituída de tampão acetato de sódio 0,05mM pH5: acetonitrila (75:25 v/v). Foram testados diferentes pHs, mas o que se

apresentou melhor foi o pH de 5,0, o qual foi ajustado com ácido acético glacial. O comprimento de onda escolhido foi o de 290nm, assim como a vazão de 1,0mL por minuto, volume de injeção de 20µL e temperatura de 30°C para fase estacionária.

Foi estabelecido o comprimento de onda de 290 nm, pois dentre os outros testados para a detecção, foi este o que proporcionou os melhores resultados.

As condições foram escolhidas visto que o tempo de retenção e o tempo da corrida analítica foram adequados para análise de rotina.

A solução de Sulfóxido de Albendazol foi preparada na concentração de 100µg.mL⁻¹. Nesta concentração o composto apresentou-se dentro da faixa de linearidade obedecendo a lei de Lambert-Beer e está acima do limite de detecção 0,3µg.mL⁻¹ e do limite de quantificação 1,0µg.mL⁻¹.

Para o cálculo de limite de quantificação e detecção foram utilizados os parâmetros da curva analítica, que são estatisticamente confiáveis.

Para a diluição das soluções analisadas utilizou-se como solvente o metanol, já que após os testes efetuados com diferentes solventes, inclusive a fase móvel foi este que proporcionou as respostas mais satisfatórias em relação aos outros solventes.

Outras fases móveis foram testadas, mas a que possibilitou a determinação do Sulfóxido de Albendazol com uma boa simetria foi a fase móvel descrita anteriormente, no item 4.5.

Para a validação do método analítico foi realizado o ensaio de seletividade que garante que a banda cromatográfica de resposta seja exclusivamente do composto de interesse.

A curva analítica foi construída traçando-se a área da banda cromatográfica versus a concentração. Foi encontrado um coeficiente de correlação de 0.9994 para o Sulfóxido de Albendazol e todas as análises estatísticas pertinentes para garantir a certeza do resultado como análise de variância, análise de resíduos, intervalo de confiança para resposta analítica, teste de falta de ajuste foram realizadas e os resultados foram satisfatórios. Para o método proposto a curva analítica foi traçada na concentração de 80 a 120 µg/mL⁻¹. A faixa utilizada foi conforme o ICH (2005)⁹ que descreve que para ensaios de substâncias e produto acabado é indicado um range de 80 a 120% da concentração teórica.

Os resultados do teste de adequabilidade do sistema foram realizados para garantir que o sistema cromatográfico estava adequado para o processo de validação, gerando resultados confiáveis.

A exatidão foi avaliada em 3 níveis de concentração. A recuperação média encontrada foi de 99% para Sulfóxido de Albendazol. Os valores encontrados demonstram que o método é exato, pois a recuperação obtida está dentro da faixa de 98 a 102% do valor teórico.^{9,36}

Para o método de degradação forçada, após a exposição em meio ácido observamos que não ocorreu degradação e após a exposição em meio básico e em meio oxidante a banda cromatográfica do Sulfóxido de Albendazol sofreu degradação. Mesmo após a exposição a estes três meios, não houve alteração no tempo de retenção do Sulfóxido de Albendazol e os produtos de degradação gerados foram identificados por espectrometria de massas.

Após mudanças deliberadas nos parâmetros de análise, não observamos alterações significativas na resposta instrumental e nos valores de DPR, que foram inferiores a 1% em todos os casos. Quando o pH da fase móvel foi alterado para 5.1 o DPR foi de 0,4 e pH 4.9 foi de 0,2. Quando o fluxo de vazão da fase móvel foi alterado para 1.02mL/min o DPR foi de 0,7 e com vazão de 0.98mL/min o DPR foi de 0,2. Quando a temperatura da fase estacionária foi alterada para 29°C o DPR foi de 0,3 e quando alterada para 31°C o DPR foi de 0,3. Quando a proporção do solvente orgânico da fase móvel foi alterada para 26%v/v de acetonitrila o DPR foi de 0,4 e quando alterada para 24%v/v o DPR foi de 0,3.

Todos os resultados obtidos no ensaio de robustez foram satisfatórios. Assim, o método proposto pode ser considerado confiável e robusto.

Transferência do método analítico por CLUE

Após todos os parâmetros da validação terem sido atendidos por CLAE, o método posteriormente foi covalidado por cromatografia de ultra eficiência (CLUE) mantendo-se a mesma fase móvel de Tampão Acetato de Sódio 0,05M:Acetonitrila(75:25), fase estacionária BEH[®] C18 (50mmx2,1mmx1,7µm), vazão 0,21 mL.min⁻¹, volume de injeção de 0,3 µL. Detector UV à 290 nm, tempo de retenção do ativo de 1,0 min e o tempo total de corrida analítica de 4,0 min., a faixa linear de trabalho foi mantida e todos os parâmetros da validação foram atendidos

Este procedimento gerou uma diminuição do tempo de análise e uma economia de solvente, isto proporciona para o laboratório de controle de qualidade da empresa Ourofino Saúde Animal um ganho em agilidade, proporcionando a possibilidade da realização da análise tanto por CLAE quanto por CLUE de acordo com a disponibilidade de equipamentos no momento. Isto, para um laboratório de controle de qualidade é importante para realização da rotina diária de análises, pois quanto menor o tempo de análise do produto menor será o seu custo final.

Segue abaixo um cromatograma do produto Ricobendazole® obtido por CLUE:

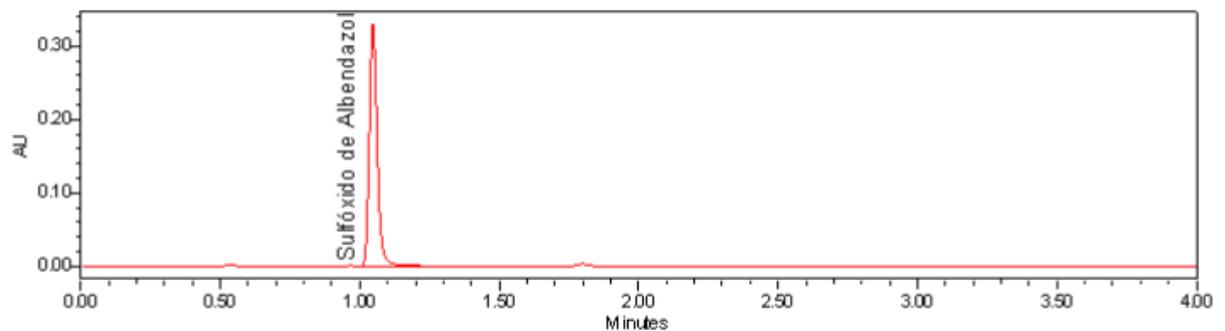


Figura 19 - Cromatograma do produto Ricobendazole® obtido por CLUE

5. CONCLUSÃO

Considerando a revisão da literatura e os resultados experimentais obtidos, concluiu-se que: O método proposto para determinação quantitativa do Sulfóxido de Albendazol em solução injetável é simples, rápido, eficiente e econômico quando comparado aos poucos métodos descritos na literatura por se tratar de um princípio ativo específico da linha veterinária, todos os parâmetros exigidos para a validação de um método analítico foram atendidos e o método pode ser utilizado em laboratório de controle de qualidade para análise de rotina do Ricobendazole® com eficiência e certeza do resultado obtido, devido ao processo de validação. O método desenvolvido apresenta a rapidez necessária para a rotina do laboratório e a capacidade do método em identificar possíveis produtos de degradação formados tendo em vista que o mesmo foi submetido a condições extremas e os produtos de degradação formados foram identificados por espectrometria de massas, concluindo de forma muito satisfatória que o risco da geração de produtos de degradação tóxicos, no caso do Ricobendazole® não ocorre, pois os produtos gerados e identificados não apresentam toxicidade, esta afirmação pode ser feita pois os mesmos são conhecidos e descritos pela literatura, demonstrando a preocupação crescente da indústria veterinária com a qualidade dos seus produtos e busca pela adequação as normas legais, com isso demonstrando o respeito ao cliente. A empresa Ourofino Agronegócio mostra a mesma preocupação e a busca por conhecimento e inovação constante sempre à frente do mercado.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. MAXIMIANO, A. C. A. Teoria geral da administração: da revolução urbana à revolução digital. São Paulo: Atlas, 2002, cap. 8-9.
2. PEREIRA FILHO, W. R.; BARROCO, R. Gestão da qualidade na indústria farmacêutica. São Paulo: Thompson, 2004, cap.15, p. 211-215.
3. VIEIRA FILHO, Geraldo. Gestão da Qualidade Total – Uma abordagem prática. Campinas: Alínea, 2003.
4. MARSHALL JR., Isnard. Et al. Gestão da Qualidade. Rio de Janeiro: FGV, 2004.
5. MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Nº 13, 03 out. 2003. Diário Oficial da União, Brasília, 2003.
6. MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Decreto nº 5053, de 22 de abril de 2004. Aprova o regulamento de fiscalização de produtos de uso veterinário e dos estabelecimentos que os fabriquem ou comerciem, e dá outras providências. Diário Oficial da União, Brasília, 23 abr. 2004.
7. ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC Nº 210, 04 de agosto 2003. Diário Oficial da União, Brasília, 2003.
8. ICH - International Conference on Harmonization; Validation of Analytical Procedures: Methodology, Q2B (CPMP/ICH/281/95), 1995.
9. ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Resolução - RE nº 1, de 29 de Julho de 2005, Brasília, 2005.
10. Secretária de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde, Portaria SVS/MS nº 500, de 9 de Outubro de 1997, Brasília, 1997.
11. ICH - International Conference on Harmonization; Validation of Analytical Procedures: Methodology, Q2 (R1), USA, 2010.
12. ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Resolução RE nº 899, de 29 de Maio 2003, Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Brasília, 2003.
13. ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária; Resolução RE nº 398 de Novembro de 2004, Guia para realização de estudos de estabilidade. Brasília, 2004.
14. PROCON - Código de Defesa do consumidor, Fundação PROCON SP. Lei Federal 8.078/1990, Brasília, 1990.

15. CYTRYNOWICZ, M.M. Origens e trajetórias da Indústria farmacêutica no Brasil. São Paulo: Narrativa Um, 2007, p.192.
16. BUSO, Giampaolo. “Evolução do mercado de insumos veterinários destinados a bovinocultura no Brasil”. Apresentado no “II Workshop Brasileiro de Gestão de Sistemas Agroalimentares”, Ribeirão Preto, São Paulo, 1999.
17. TOWNSEND, L.B., Wise, D.S., “The Synthesis and chemistry of certain anthelmintic benzimidazoles”. *Parasitology Today*, 6:107-112, 1990.
18. GOTTSCHALL, D.W., THEODORIDES, V.J., WANG, R., “The metabolism of benzimidazole anthelmintics”. *Parasitology Today* 6: 118-124, 1990.
19. LANUSSE, C.E., VIRKEL, G.L., SÁNCHEZ, S.F., ÁLVAREZ, L.I., LIFSCHITZ, A.I., IMPERIALE, F., MONFRINOTTI, A. “Ricobendazole kinetics and availability following subcutaneous administration of a novel injectable formulation to calves”. *Research in Veterinary Science* 65: 5-10, 1998.
20. LACEY, E. “Mode of action of benzimidazoles”. *Parasitology Today* 6:112-114, 1990.
21. MCKELLAR, Q.A., SCOTT, E.W., “The benzimidazole anthelmintic agents-a review. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*”, 13:223-247, 1990.
22. CRISTÒFOL, C., NAVARRO, M., FRANQUELO, C., J.E., V., CARRETERO, A., RUBERTE, J., ARBOIX, M. “Disposition of netobimin, albendazole and its metabolites in the pregnant rat: Developmental toxicity.” *Toxicology and Applied Pharmacology*, 144:56-61, 1997.
23. NOVÁKOVÁ, L., SOLICHOVÁ, D.; SOLICH, P.; “Advantages of ultra performance liquid chromatography over high-performance liquid chromatography: comparison of different analytical approaches during analysis of diclofenac gel.” *J Sep Sci.*, 68,908. 2006.
24. SWARTZ, M.E.,J. “O estado da arte da cromatografia líquida de ultra eficiência”, *Quím. Nova* , 32 (1):28, 2009.
25. AQINO NETTO, F.R., NUNES, D.S.S., *Cromatografia: princípios básicos e técnicas afins*. Rio de Janeiro: Interciência, 2003, 187p.
26. Eurachem Working Group; *The Fitness for Purpose of Analytical Methods, A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics*, 1998.
27. International Standard Organization; *General Requirements for the Competence of Testing and Calibration Laboratories*, ISO/IEC 17025, 1999.
28. United States Pharmacopeia Convention; *US Pharmacopeia 24, Validation of Compendial Methods <1225>*, Rockville, 1999.

29. World Health Organization Expert Committee on Specifications for Pharmaceutical Preparations; *Thirty-second report*, WHO Technical Report Series, No.823, Geneva, 1992.
30. VESSMAN, J.; STEFAN, R. I.; STADEN, J. F. V.; DANZER, K.; LINDNER, W.; BURNS, D. T.; FAJGELJ, A.; MÜLLER, H.; *Pure Appl. Chem.* 2001, 73: 1381.
31. BARROS Neto, B.; PIMENTEL, M. F.; ARAÚJO, M. C. U. “Recomendações para calibração em química analítica” - Parte I. Fundamentos e calibração com um componente (calibração univariada). *Quim. Nova*, 25: 856, 2002.
32. Chui, Q. S. H.; Zucchini, R. R.; Lichtig, J.; “Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos”. *Quim. Nova* 2001, 24:374.
33. INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial; Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos, DOQ-CGCRE-008, 2003.
34. International Standard Organization; *Statistics-Vocabulary and Symbols- Part 1: Probability and General Statistical Terms*, ISO 3534-1, 1993.
35. DEGANI, A. L. G.; CASS, Q. B.; VIEIRA, P. C. “Cromatografia um breve ensaio.” *Química Nova na Escola*, nº 7, p. 21-25, 1998
36. COLLINS, C. H.; BRAGA, A. L. E BONATO, P. S. *Introdução a métodos cromatográficos*. Editora da UNICAMP, 1997
37. COLLINS, C.H.; BRAGA, G. L.; PIERINA, S. B. *Fundamentos de Cromatografia*. Editora da UNICAMP, 2006
38. SANTORO, M.I.R.M., *Introdução ao controle de qualidade de medicamentos*. São Paulo: Atheneu, Editora da USP, 1988, 122p.
39. BELAZ, K. R. A.; PEREIRA-FILHO, E. R.; OLIVREIRA, R.V. Development of achiral and chiral 2D HPLC methods for analysis of albendazole metabolites in microsomal fractions using multivariate analysis for the in vitro metabolism. *Journal of Chromatography B*, 932 (2013) 26 – 33.
40. BISTOLETTI, M.; MORENO, L.; ALVAREZ, L.; LANUSE, C. Multiresidue HPLC method to measure benzimidazole anthelmintic in plasma and egg from laying hens. Evaluation of albendazole metabolites residue profiles. *Food Chemistry*, 126 (2011) 793–800.
41. WU, Z.; MEDLICATT, N. J.; RAZZAK, M.; TUCKER, I. G. Development and optimization of a rapid HPLC method for analysis of ricobendazole and albendazole sulfone in sheep plasma. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 39 (2005) 225–232.

42. K.M. Cooper^a*, M. Whelan^b, D.G. Kennedy, G. Trigueros^d, A. Cannavane, P.E. Boon^f, D. Wapperom^f and M. Danaher^b. Anthelmintic drug residues in beef: UPLC-MS/MS method validation, European retail beef survey, and associated exposure and risk assessments. *Food Additives and Contaminants*, Vol.29, No. 5, May 2012, 746–760.
43. Xiaojun Zhang, Hanxiang Xu, Hong Zhang, Yuanming Guo, Zhiyuan Dai, Xuechang Chen. Simultaneous determination of albendazole and its metabolites in fish muscle tissue by stable isotope dilution ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* (2011) 401:727–734.
44. D. Marciocha & J. Kalka & J. Turek-Szytow & J. Surmacz-Górska. A Pretreatment Method for Analysing Albendazole by HPLC in Plant Material. *Water Air Soil Pollut* (2013) 224:1646.
45. Tomasz Grabowski, Jerzy Jan Jaroszewski, Anna Świerczewska, Sawicka^a, Tomasz Maślanka, Włodzimierz Markiewicz and Hubert Ziółkowski. Application of ultra-performance columns in high performance liquid chromatography for determination of albendazole and its metabolites in turkeys. *Biomed. Chromatogr.* 2011; 25: 1159–1167.
46. Kuldeep Sharma, Murugesh Kandaswamy, Chandan Mithra, Ashok Kumar Meena, Sanjeev Giri, Sriram Rajagopal and Ramesh Mullangi*. Highly sensitive LC-MS/MS-ESI method for simultaneous quantitation of albendazole and ricobendazole in rat plasma and its application to a rat pharmacokinetic study. *Biomed. Chromatogr.* 2012; 26: 247–255.
47. Iliana González-Hernández, María Isabel Ruiz-Olmedo, Graciela Cárdenas and Helgi Jung-Cook. A simple LC-MS/MS method to determine plasma and cerebrospinal fluid levels of albendazole metabolites (albendazole sulfoxide and albendazole sulfone) in patients with neurocysticercosis. *Biomed. Chromatogr.* 2012; 26: 267–272.