

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**Desenvolvimento e validação de um método indicativo de  
estabilidade por cromatografia líquida de alta eficiência  
para determinação simultânea de diferentes  
antiparasitários em suas formulações farmacêuticas  
veterinárias**

**Michelli dos Santos Silva**

**Dissertação de Mestrado em Química**

**Vitória  
2015**

Michelli dos Santos Silva

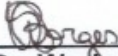
**Desenvolvimento e validação de um método indicativo de estabilidade por cromatografia líquida de alta eficiência para determinação simultânea de diferentes antiparasitários em suas formulações farmacêuticas veterinárias**

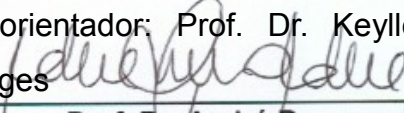
Desenvolvimento e validação de um método indicativo de estabilidade por cromatografia líquida de alta eficiência para determinação simultânea de diferentes antiparasitários em suas formulações farmacêuticas veterinárias

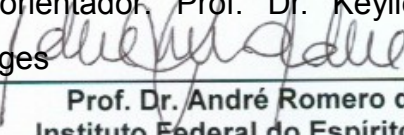
Michelli dos Santos Silva

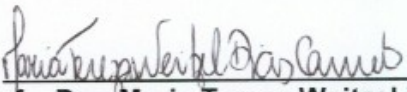
Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química do Centro de Ciências Exatas da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para a obtenção do Grau de Mestre em Química.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química do Centro de Ciências Exatas da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Química, na área de Química de Produtos Naturais. **Aprovado em 03/09/2015 por:**

  
Orientador: Prof. Dr. Warley de Souza Borges  
Universidade Federal do Espírito Santo  
Orientador

Co-orientador: Prof. Dr. Keyller Bastos Borges  


  
Prof. Dr. André Romero da Silva  
Instituto Federal do Espírito Santo

  
Profa. Dra. Maria Tereza Weitzel Dias Carneiro  
Universidade Federal do Espírito Santo

**VITÓRIA  
2015**



Dedico à Deus por me conceder essa graça, aos meus pais que me ensinaram as coisas simples, porém fundamentais da vida.

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus, por iluminar a minha vida e me fortalecer diante das dificuldades, por me conceder paciência e perseverança ao longo dessa caminhada.

Aos meus pais pelo incentivo e compreensão da minha ausência.

A minha irmã por me fazer acreditar que eu poderia chegar até aqui.

Ao meu orientador Prof. Dr. Warley de Souza Borges, pela oportunidade de aprendizado, paciência, respeito, confiança e incentivo na realização deste trabalho.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Keyller Bastos Borges, que com sua experiência me orientou na execução da validação.

Ao meu trabalho, Faculdade Multivix, por permitir a flexibilização do meu horário de trabalho para que pudesse me dedicar ao mestrado e concretizar essa realização profissional, minha sincera gratidão.

Aos amigos dos laboratórios de controle de qualidade da Aspen e de produtos naturais da UFES pelo aprendizado, incentivo e amizade.

Ao programa de Pós-Graduação em Química da UFES.

Enfim, muitos colaboraram para que esse trabalho fosse concluído e, neste momento, as palavras chegam a ser poucas para expressar a minha gratidão. Obrigada!

“Quando nada parece dar certo, vou ver o cortador de pedras martelando sua rocha talvez cem vezes, sem que uma única rachadura apareça. Mas na centésima

primeira martelada a pedra se abre em duas, e eu sei que não foi aquela que conseguiu isso, mas todas as que vieram antes. ”Jacob August Riis

## LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1** – Fórmula estrutural do febantel (metil (NE)-N-[[2-[(2-metoxiacetil)amino]-4-fenilsulfanililino]-(metoxicarbonilamino)metilideno]carbamato.....17
- FIGURA 2** – Fórmula estrutural do tiabendazol (4-(1H-benzimidazol-2-yl)-1,3tiazol).....18
- FIGURA 3** – Estrutura química do fármaco fluazuron N-[[4-cloro-3-[3-cloro-5-trifluorometil]piridina-2-ol] oxifenil]carbamoil]-2,6-difluorobenzamida).....19
- FIGURA 4** – Estrutura química do fármaco toltrazuril (1-metil-3-[3-metil-4-[4(trifluorometil sulfanil)fenoxi]fenil]-1,3,5-triazinano-2,4,6-triona).....20
- FIGURA 5** – Perfil cromatográfico das soluções padrão dos fármacos tiabendazol (a), febantel (b), toltrazuril (c) e fluazuron (d) no desenvolvimento do programa de gradiente.....44
- FIGURA 6** – Perfil cromatográfico das soluções padrão dos fármacos tiabendazol (a), febantel (b), toltrazuril (c) e fluazuron (d) com o programa de gradiente estabelecido.....45
- FIGURA 7** – Cromatograma da (A) fase móvel, (B) placebo e (C) soluções padrão dos fármacos tiabendazol, febantel, toltrazuril e fluazuron.....47
- FIGURA 8** – Cromatogramas obtidos para o teste de seletividade. (A) degradação neutra; (B) degradação ácida; (C) degradação básica; (D) degradação oxidativa (peróxido); (E) degradação por calor e (F) fotodegradação.....49
- FIGURA 9** – Cromatograma da solução placebo com degradação oxidativa submetido as mesmas condições da solução amostra.....50
- FIGURA 10** – Linearidade dos fármacos tiabendazol, febantel, toltrazuril e fluazuron.....51
- FIGURA 11** – Perfil cromatográfico das soluções padrão dos fármacos tiabendazol (a), febantel (b), toltrazuril (c) e fluazuron no teste de robustez.....53
- FIGURA 12** – Estabilidade das amostras dos fármacos tiabendazol, febantel, toltrazuril e fluazuron no período de 24 horas.....54

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1</b>	–	Classificação dos testes segundo sua finalidade.....	25
<b>TABELA 2</b>	–	Ensaio necessários para validação do método analítico, segundo sua finalidade.....	26
<b>TABELA 3</b>	–	Fatores considerados na determinação da robustez do método analítico.....	32
<b>TABELA 4</b>	–	Descrição do peso molecular, teor e marca das substâncias químicas de referência utilizadas no desenvolvimento e validação do método.....	34
<b>TABELA 5</b>	–	Descrição da composição, teor declarado, forma farmacêutica, fabricação e validade das amostras analisadas.....	34
<b>TABELA 6</b>	–	Descrição da marca, lote e validade dos reagentes e solventes utilizados no desenvolvimento e validação do método.....	35
<b>TABELA 7</b>	–	Esquema de diluição para o preparo das soluções utilizadas no ensaio de linearidade.....	40
<b>TABELA 8</b>	–	Parâmetros modificados para avaliação da robustez do método.....	41
<b>TABELA 9</b>	–	Solubilidade dos fármacos em diferentes solventes.....	42
<b>TABELA 10</b>	–	Programação de gradiente da fase móvel.....	44
<b>TABELA 11</b>	–	Resultados dos testes de adequação de sistema para determinação de tiabendazol, febantel, toltrazuril, e fluazuron.....	46

<b>TABELA 12</b> – Linearidade e limite de detecção e quantificação do método de análise de tiabendazol, febantel, toltrazuril, e fluazuron.....	50
<b>TABELA 13</b> – Precisão e exatidão para o método de análise de tiabendazol, febantel, toltrazuril, e fluazuron.....	52
<b>TABELA 14</b> – Determinação de método de análise para tiabendazol, febantel, toltrazuril, e fluazuron em formulações farmacêuticas .....	55

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA – Agência nacional de vigilância sanitária

CLAE – Cromatografia líquida de alta eficiência

DAD – Detector por arranjo de diodos

FDA - *Food and Drug Administration*

ICH - *International Conference on Harmonisation*

INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial do Brasil

LD – Limite de detecção

LQ – Limite de quantificação

MAPA - Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento

pH – Potencial hidrogeniônico

USP - The United States Pharmacopoeia

UV – Ultravioleta

## RESUMO

Este trabalho descreve um método analítico para a determinação simultânea de febantel, toltrazuril, tiabendazol e fluazuron em insumos farmacêuticos e suas formulações farmacêuticas veterinárias por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). A fim de investigar a estabilidade, os fármacos foram submetidos a processos de degradação sob diferentes condições como recomendado pela Conferência Internacional de Harmonização (ICH). As condições cromatográficas foram otimizadas utilizando uma coluna Zorbax Eclipse Plus C18 (100 x 3,0 mm, 3,5  $\mu\text{m}$ ) à temperatura ambiente (25 °C) com programação gradiente da fase móvel A (solução aquosa de ácido acético 0,1% V/V) e fase móvel B (acetonitrila) e fluxo de 1,0 mL.min<sup>-1</sup> em um tempo de eluição de 10 min e comprimento de onda com detecção UV de 250 nm. Nestas condições, o tempo de retenção dos fármacos em estudo foram: tiabendazol em 2,8 min, febantel em 5,7 min, toltrazuril em 6,1 min e fluazuron em 8,1 min. As curvas padrões foram lineares na faixa de concentração de 175 - 325  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  (coeficiente de correlação > 0,99). Parâmetros de validação, como a seletividade, linearidade, limite de detecção (0,004 - 0,118  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ), limite de quantificação (0,015 - 0,393  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ), precisão (desvio padrão relativo < 3,97%), exatidão (98,51 - 99,94%), e robustez, apresentaram resultados dentro dos padrões aceitáveis. Portanto, o método desenvolvido pode ser aplicado com sucesso para o controle de qualidade de rotina na análise de insumo farmacêutico em formulações farmacêuticas veterinárias.

**Palavras-chave:** CLAE, controle de qualidade, febantel, toltrazuril, tiabendazol, fluazuron, estabilidade.

## ABSTRACT

This study describes an analytical method for the simultaneous determination of febantel, toltrazuril, thiabendazole and fluazuron in bulk and their veterinary pharmaceutical formulations using high-performance liquid chromatography (HPLC). In order to investigate stability, pharmaceutical products were submitted to degradation processes under different conditions, such as recommended by the International Conference on Harmonization (ICH). The chromatographic conditions were optimized using a C18 column Zorbax Eclipse Plus (100 x 3,0 mm, 3.5  $\mu\text{m}$  of particle size) under room temperature with gradient programming of mobile phase A (acetic acid watery solution 0.1% W/W) and mobile phase B (acetonitrile) and flow rate of 1.0  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$  elution time of 10 min, and UV detection wavelength of 250nm. Under these conditions, retention time of study pharmaceuticals was: thiabendazole in 2.8 min; febantel in 5.7 min; toltrazuril in 6.1 min; and fluazuron in 8.1 min. Standard curves were linear at the concentration range of 175 - 325  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  (correlation coefficient > 0.99). Validation parameters, such as selectivity, linearity, detection limit (0.004 – 0.118  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), quantification limit (0.015 – 0.393  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), precision (relative standard deviation < 3.97%), accuracy (98.51 – 99.94%), and robustness showed results within acceptable standards. Therefore, the method developed can be applied successfully to routine quality control in the analysis of pharmaceutical inputs and their veterinary pharmaceutical formulations.

**Keywords:** HPLC, quality control, febantel, toltrazuril, thiabendazole, fluazuron, stability.

## SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	13
1.1	Doenças provocadas por parasitas em animais.....	14
1.2	Zoonoses.....	15
1.2.1	Larva <i>migrans</i> cutânea .....	15
1.2.2	Larva <i>migrans</i> visceral.....	15
1.3	Tratamento das parasitoses.....	16
1.3.1	Febantel.....	16
1.3.2	Tiabendazol.....	17
1.3.3	Fluazuron.....	18
1.3.4	Toltrazuril.....	19
1.4	Métodos analíticos para quantificação de febantel, tiabendazol, fluazuron e toltrazuril.....	20
1.5	Cromatografia.....	21
1.5.1	Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	22
1.6	Validação de métodos analíticos.....	23
1.6.1	Especificidade/Seletividade.....	26
1.6.2	Limite de detecção.....	27
1.6.3	Limite de quantificação.....	28
1.6.4	Linearidade.....	28
1.6.5	Precisão.....	29
1.6.5.1	Repetibilidade.....	29
1.6.5.2	Precisão intermediária.....	30
1.6.5.3	Reprodutibilidade.....	30
1.6.6	Exatidão.....	30
1.6.7	Robustez.....	31
2.	OBJETIVOS.....	33
2.1	Geral.....	33
2.2	Específicos.....	33
3.	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	34
3.1	Material.....	34
3.1.1	Substâncias químicas de referência e amostras de medicamentos de uso veterinário.....	34
3.1.2	Reagentes e solventes.....	35
3.1.3	Equipamentos e consumíveis .....	35
3.2	Estudo da solubilidade dos fármacos.....	36
3.3	Desenvolvimento e otimização do método por CLAE.....	36
3.3.1	Preparo da fase móvel.....	36
3.3.2	Condições cromatográficas/analíticas.....	36
3.3.3	Preparo das soluções padrão, dos placebos e das amostras.....	37
3.3.3.1	Solução padrão.....	37
3.3.3.2	Placebos e amostras.....	37
3.4	Validação do método por CLAE.....	37
3.4.1	Especificidade/Seletividade.....	38
3.4.2	Limite de detecção e limite de quantificação.....	39
3.4.3	Curva de calibração.....	39

3.4.4	Precisão.....	40
3.4.5	Exatidão.....	41
3.4.6	Robustez.....	41
3.4.7	Estudo da estabilidade da solução padrão.....	41
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	42
4.1	Solubilidade dos fármacos.....	42
4.2	Desenvolvimento e otimização do método.....	43
4.2.1	Otimização cromatográfica.....	43
4.3	Validação do método CLAE.....	47
4.3.1	Seletividade.....	47
4.3.2	Linearidade.....	48
4.3.3	Limite de detecção e limite de quantificação .....	51
4.3.4	Precisão e exatidão.....	51
4.3.5	Robustez.....	52
4.4	Estabilidade da solução no período de 24 horas.....	53
4.5	Aplicação do método em formulações farmacêuticas.....	54
5.	CONCLUSÃO.....	56
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57

## 1. INTRODUÇÃO

Os animais domésticos desempenham um importante papel na sociedade, contribuindo para o desenvolvimento emocional de crianças e o bem-estar de seus donos. Necessitam de cuidados básicos, como alimentação, abrigo e higiene, todavia apesar desses cuidados, são suscetíveis a enfermidades, como as parasitoses.<sup>1</sup> Os parasitos gastrintestinais nos animais de estimação, constituem um dos principais fatores de atraso no desenvolvimento do animal e são espoliadores de nutrientes com importância em saúde pública como agentes causadores de zoonoses, doenças de animais transmissíveis ao homem.<sup>2</sup>

A conscientização dos proprietários relacionada às medidas básicas de higiene após o contato com o animal e a vermifugação preventiva e regular é um fator importante no controle zoonótico, pois contribui para o controle e redução das parasitoses e para tal, existem diferentes antiparasitários disponíveis no mercado, sendo que grande parte do tratamento associam mais de um fármaco com diferentes mecanismos de ação para aumentar o espectro de ação, bem como a eficácia no controle da infecção.<sup>3</sup> Para os animais de grande porte, os medicamentos veterinários têm sido amplamente utilizados e administrados como aditivos em água

ou nos alimentos dos animais destinados ao consumo humano, com o intuito de prevenir o aparecimento de doenças e também como promotores de crescimento.<sup>4</sup>

A combinação de vários fármacos como febantel, toltrazuril, tiabendazol e fluazuron na terapia medicamentosa é usada comumente para erradicação de parasitoses.<sup>5</sup> No entanto, não foi encontrado na literatura nenhuma metodologia de análise simultânea desses fármacos que forneça valores próximos do esperado e com grau de repetibilidade entre os resultados, utilizando a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

Diante do exposto e a continua mudança na legislação da indústria farmacêutica veterinária, este trabalho visou à obtenção de um método de quantificação simultânea de febantel, toltrazuril, tiabendazol e fluazuron utilizando cromatografia líquida de alta eficiência, podendo ser empregado para avaliação desses antiparasitários na análise de rotina durante o controle de qualidade dos medicamentos no processo de fabricação, contribuindo para a melhoria da qualidade dos produtos veterinários comercializados no Brasil.

## **1.1 Doenças provocadas por parasitas em animais**

O contínuo crescimento do comércio de produtos direcionados a animais de estimação, como cães e gatos tem sido observado nos últimos anos, devido aos cuidados e preocupação com o bem-estar desses animais que atualmente é considerado um importante membro da família.<sup>1</sup> A utilização de medicamentos antiparasitários é empregada no tratamento de parasitoses que acometem a saúde de cães e gatos para evitar a transmissão da doença e aumentar a expectativa de vida desses animais.<sup>5</sup>

Os antiparasitários são os medicamentos mais prescritos e comercializados, sendo empregados no tratamento de diversas parasitoses que acometem a saúde de cães e gatos, como a ancilostomose, a dirofilariose, a toxocaríase, a tricurirose e a coccidiose.<sup>6</sup>

A ancilostomose, também conhecida por amarelão, é uma doença causada por vermes nematódeos. Entre os helmintos mais prevalentes nos cães e gatos estão os nematódeos *Ancylostoma caninum*, *Ancylostoma braziliense* e *Ancylostoma tubaeforme*, podendo ser responsáveis por uma série de distúrbios como anemia e

diarréia. A ingestão de larvas e a amamentação podem levar a infecção nesses animais ainda jovens e causar a morte.<sup>6</sup>

A dirofilariose cardiopulmonar é a doença mais comum e é causada por um dos principais parasitas que acomete a saúde dos cães. A *Dirofilaria immitis* transmitido através de mosquitos do gênero *Anopheles*, *Culex* e *Aedes*, sendo os sinais clínicos observados como a perda de peso, letargia, tosse, distensão abdominal e, em alguns casos, morte.<sup>6</sup>

A ingestão de ovos de parasitas do gênero *Toxocara* provoca a toxocaríase canina. Esses ovos na corrente sanguínea são levados para os pulmões onde eclodem formando as larvas. Essas larvas migram através do sistema respiratório e completam o ciclo no intestino produzindo novos ovos. Dentre os principais sinais clínicos estão a diarréia, vômito, anorexia, tosse e edema pulmonar.<sup>6</sup>

A tricurirose é uma doença provocada pela ingestão de ovos do parasita *Thichuris vulpis*, o qual se desenvolve em larvas no intestino dos cães. A maioria das infecções não provoca sinais clínicos, no entanto pode ocorrer diarreia com muco e em alguns casos com presença de sangue.<sup>6</sup>

A coccidiose é extremamente danosa para a indústria avícola, podendo também ocorrer nas indústrias de produção de bovinos e suínos. É uma doença entérica provocada por *Eimeria* ou *Isospora* spp. Os oocistos esporulados contendo esporozoítas são ingeridos a partir da água ou alimentos contaminados, completando todo o seu ciclo vital em um único animal.<sup>6</sup>

## 1.2 Zoonoses

As zoonoses são doenças transmitidas pelos animais ao homem, dentre as principais destacam-se a larva *migrans* cutânea e a larva *migrans* visceral.<sup>7</sup>

### 1.2.1 Larva *migrans* cutânea

A larva *migrans* cutânea, conhecida como dermatite serpigínea ou popularmente “bicho geográfico”, é uma dermatite provocada pela migração de larvas de nematódeos, presentes em solos contaminados por fezes de cães e gatos, em um hospedeiro não habitual, o homem. As larvas, ao entrar em contato com a

pele humana, perfuram o estrato epitelial, provocando lesões, eritema, prurido e inflamação. No Brasil, o *Ancylostoma braziliense* e o *Ancylostoma caninum* constituem os principais nematódeos envolvidos.<sup>8</sup>

### 1.2.2 Larva *migrans* visceral

A larva *migrans* visceral ou toxocaríase é uma doença causada pela ingestão de ovos embrionados dos nematódeos *Toxocara canis* e *Toxocara cati*. O risco de contágio é muito propenso em crianças, devido a facilidade de levar as mãos contaminadas na boca. A ingestão de ovos embrionados de *Toxocara* spp. é seguida pela eclosão e liberação das larvas nas porções altas do intestino delgado que, após invadirem a mucosa, podem entrar na circulação venosa e seguir para o fígado, coração, olhos e pulmões. Os sintomas clínicos, que dependem da intensidade do parasitismo e da localização, envolve febre, tosse e dificuldade respiratória podendo evoluir para hepatite, infiltração pulmonar e asma brônquica.<sup>8</sup>

## 1.3 Tratamento das parasitoses

Os medicamentos são usados na medicina veterinária no tratamento e prevenção de doenças ou como promotores de crescimento.<sup>10</sup> Atualmente no Brasil existem 6.573 produtos de uso veterinário com registro vigente no MAPA (Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento). Dentre estes produtos, cerca de 10% são antimicrobianos, antibióticos e antiparasitários com uso autorizado em bovinos, suínos, caprinos, ovinos e/ou aves e cuja presença de seus resíduos tem sido monitorada.<sup>9</sup>

O controle das zoonoses baseia-se em medidas preventivas, como a higiene das mãos após contato direto com o animal, a proibição do acesso de animais a parques, praias e espaços destinados à recreação das crianças, a redução da população de cães e gatos abandonados, a conscientização de proprietários para que recolham os dejetos deixados por seus animais em locais públicos e a

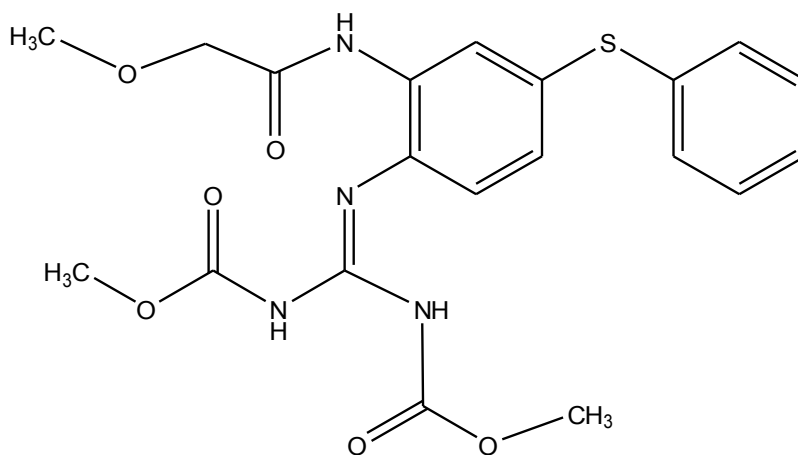
vermifugação periódica desses animais.<sup>1</sup> Para preservar a saúde dos animais e reduzir o risco das zoonoses a vermifugação periódica torna-se relevante para eliminar os vermes presentes no organismo dos cães e gatos, através da administração de um medicamento antiparasitário como o febantel, toltrazuril, tiabendazol e fluazuron.<sup>11</sup>

### 1.3.1 Febantel

Pertencente a classe de medicamentos antiparasitários, o febantel é um anti-helmíntico pró-benzimidazólico de amplo espectro que tem aprovação da Food and Drug Administration (FDA) para o uso em cães e gatos.<sup>11, 12</sup> Para esses animais, acima de seis meses de idade, a dose de 10 mg.kg<sup>-1</sup> é usada uma vez ao dia, por três dias consecutivos. Nessas dosagens é possível expelir infestações do *Ancylostoma caninum*, *Toxocara canis*, *Toxocara cati* e *Taenia* spp.<sup>11, 12</sup>

O modo de administração é oral, porém bem variável podendo ser ministrado na forma de uma pasta, uma suspensão ou misturado à ração do animal. Após a administração de doses terapêuticas, o febantel é rapidamente metabolizado em febendazol e oxfendazol que, por serem metabólitos ativos, atuam sobre os parasitos impedindo a síntese de microtúbulos pela inibição de  $\beta$ -tubulina, o que interrompe a migração dos cromossomos durante a mitose e meiose, e reduz o transporte de vesículas secretoras e do consumo de glicose, levando o parasita à morte.<sup>11, 12</sup>

O composto febantel de fórmula molecular C<sub>20</sub>H<sub>22</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub>S e peso molecular de 446,5 g.mol<sup>-1</sup> (Figura 1), é um pó cristalino branco ou quase branco, praticamente insolúvel em água, solúvel em acetona e levemente solúvel em etanol anidro. O ponto de fusão compreende a faixa de 129 a 130°C.<sup>13</sup>



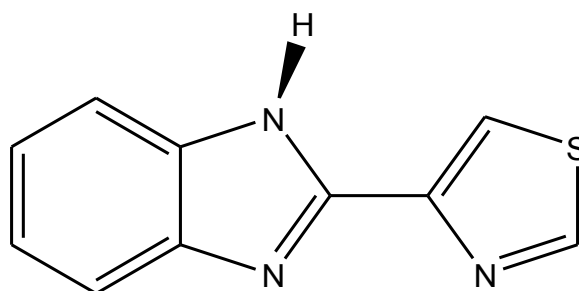
**Figura 1:** Fórmula estrutural do febantel (metil (NE)-N-[[2-[(2-metoxiacetil)amino]-4 fenilsulfanililino] (metoxicarbonilamino)metilideno]carbamato).  
Fonte: European, 2013.

### 1.3.2 Tiabendazol

O tiabendazol é um anti-helmíntico pertencente ao grupo dos benzimidazóis substituídos. Esse grupo apresenta amplo espectro e considera-se que atue através da inibição da polimerização da  $\beta$ -tubulina helmíntica, interferindo assim, nas funções dependentes dos microtúbulos, tais como a captura de glicose.<sup>11, 12</sup>

O fármaco tiabendazol é rapidamente absorvido pelo trato gastrointestinal, metabolizado muito rapidamente e eliminado pela urina na forma conjugada. Os efeitos adversos como distúrbios gastrointestinais são mais comuns, embora possam ocorrer tonturas, enjoo e reações alérgicas.<sup>11, 12</sup>

Quimicamente, o composto tiabendazol é uma molécula mais simples, sendo sua principal função o anel imidazólico condensado com o anel benzênico. Possui fórmula  $C_{10}H_7N_3S$  e peso molecular  $201,25 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$  como representado na figura 2.<sup>14</sup>



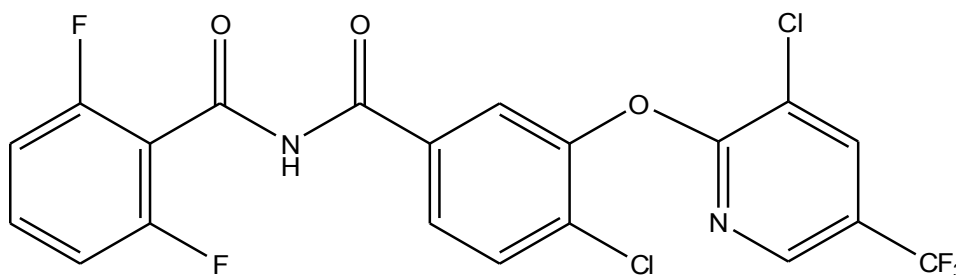
**Figura 2:** Fórmula estrutural do tiabendazol (4-(1H-benzimidazol-2-yl)-1,3-tiazol).  
Fonte: USP, 2015.

### 1.3.3 Fluazuron

O fluazuron, pertencente à classe dos benzoilfeniluréias, destaca-se no combate aos carrapatos do gênero *Boophilus*, que atacam principalmente rebanhos bovinos, podendo ser aplicado com doses entre 1,5 e 2,5 mg.kg<sup>-1</sup> dependendo das espécies dos carrapatos e da região em que se encontra o rebanho.<sup>11, 12</sup>

O mecanismo de ação do fluazuron impede a incorporação da quitina por parte dos carrapatos, impossibilitando o endurecimento da cutícula e carapaça. Desta forma, o artrópode fica impedido de sofrer o fenômeno de muda (larva, ninfa e adulta) e assim inibe o seu crescimento. Além disso, a falta de quitina ocasiona uma má formação dos ovos do carrapato, dificultando a proliferação do mesmo.<sup>11, 12</sup>

O fluazuron, representado na figura 3, é um composto polifuncionalizado e nota-se a presença de amidas, éteres, anel piridínico e halogênios como o flúor.<sup>11, 12</sup> Com peso molecular de 506,21 g.mol<sup>-1</sup> e fórmula molecular C<sub>20</sub>H<sub>10</sub>Cl<sub>2</sub>F<sub>5</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>, o fluazuron pode ser encontrado como um pó cristalino de cor branco ou rosada sem odor e com ponto de fusão elevado (219 °C).<sup>15</sup>



**Figura 3:** Estrutura química do fármaco Fluazuron (N-[[4-cloro-3-[3-cloro-5-(trifluorometil)piridina-2-ol]oxifenil]carbamoil]-2,6-difluorobenzamida).  
Fonte: Williams, 2006.

No que diz respeito a estabilidade, a molécula apresenta meia-vida de até 14 dias em pH ácido (pH 3) porém, é sensível a pH mais alcalinos resistindo apenas 30 minutos em pH 9. Sabe-se que este composto é pouco solúvel em água (<0,02 mg/L) mas tal fato pode ser ajustado pela mistura com solventes orgânicos como metanol, acetona, ciclohexanona e N-metil-2-pirrolidona.<sup>11, 12</sup>

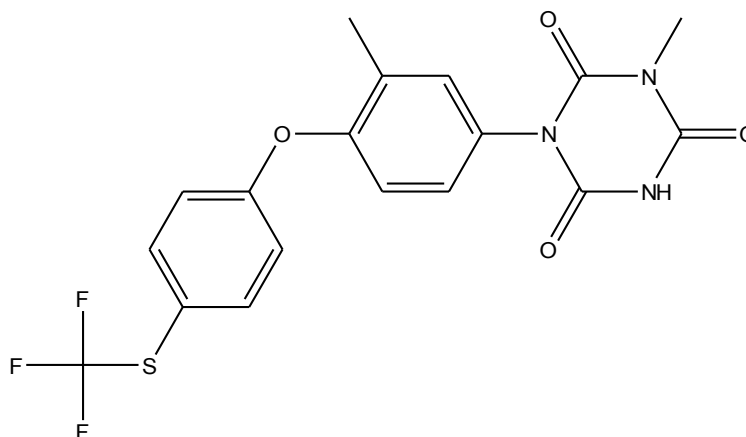
### 1.3.4 Toltrazuril

O toltrazuril é um medicamento anticoccidiano pertencente à classe das triazinonas simétricas, com propriedades coccidicidas de alta eficiência no tratamento da coccidiose aviária e de outros animais.<sup>16</sup>

O medicamento atua nas diferentes formas evolutivas do parasita, principalmente nos esquizontes, nos macrogametócitos e microgametócitos, alterando a função da cadeia respiratória e as enzimas mitocondriais. Tem sido proposto um método de terapia com o toltrazuril, denominado metafilático, que consiste no tratamento da coccidiose na fase subclínica, entre a terceira e quinta semana de idade das aves. Este tratamento pressupõe que, nesta faixa etária, as aves têm surtos da doença e, a partir desta premissa, estabelece-se o tratamento, que poderá ser acompanhado do uso de outros medicamentos coccidiostáticos na ração. A dose recomendada para tratamento da coccidiose é de 7mg/Kg de peso corporal ou ainda 25 ppm na água, em dose única.<sup>11, 12</sup>

Quimicamente, o toltrazuril é muito lipofílico, dificultando a administração em meios aquosos. Apresenta baixa acidez (pKa 7,42) devido exclusivamente ao grupo triazinatriona. Para solucionar tais problemas, são produzidos análogos do produto toltrazuril, como sulfóxidos e sulfonas.<sup>16</sup>

O composto apresenta fórmula molecular  $C_{18}H_{14}F_3N_3O_4S$  e peso molecular de 425,38 g.mol<sup>-1</sup> (figura 4).



**Figura 4:** Estrutura química do fármaco toltrazuril (1-metil-3-[3-metil-4-[4(trifluorometilsulfanil)fenoxi]fenil]-1,3,5-triazinano-2,4,6-triona).  
Fonte: Olsen et al., 2012.

#### 1.4 Métodos analíticos para quantificação de febantel, tiabendazol, fluazuron e toltrazuril

Os métodos descritos na literatura para quantificação de alguns desses fármacos é realizado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), variando o tipo de detector, como ultravioleta (UV), arranjo de diodos (DAD) ou espectrômetro de massas.<sup>1,15,16</sup>

A Farmacopéia Europeia (2013) descreve um método por CLAE-UV para quantificação do febantel em matéria-prima, porém não define métodos para formas farmacêuticas. Até o momento, a Farmacopéia Brasileira, Americana e Japonesa não apresentam método de quantificação do febantel. Na literatura foram encontrados métodos para quantificação do febantel em ração, produtos de origem animal e efluentes da indústria farmacêutica.<sup>1, 15, 16, 18</sup>

Para quantificação do tiabendazol em matéria prima, tanto a Farmacopéia Europeia quanto a Farmacopéia Americana descrevem métodos por CLAE-UV. A Farmacopéia Americana, também descreve metodologia por CLAE-UV para dosagem de tiabendazol em suspensão e comprimidos.<sup>14</sup>

Na pesquisa bibliográfica em compêndios oficiais como as farmacopeias europeia, americana e brasileira não foram encontrados métodos de quantificação por CLAE-UV dos fármacos toltrazuril e fluazuron.<sup>13, 14, 19</sup>

Por conseguinte, há um grande interesse no desenvolvimento de métodos analíticos rápidos, em quantificações simultâneas e que forneçam parâmetros apropriados para análises quantitativas de fármacos.<sup>20</sup> Apesar da ausência de método para quantificação simultânea desses fármacos em estudo, alguns autores relatam métodos com um desses fármacos.<sup>1, 13, 14, 21</sup> Pontes e colaboradores, descreveram um método por CLAE-EM/EM para determinação simultânea de antiparasitários em associações de uso veterinário.<sup>1</sup> Bialecka e Kulik, descrevem outro método por CLAE-DAD para quantificação simultânea de pamoato de pirantel, febendazol, praziquantel, febantel e epsiprantel em comprimidos de uso veterinário.<sup>21</sup>

## 1.5 Cromatografia

A descoberta da cromatografia como uma técnica analítica é geralmente atribuída ao botânico russo Mikhail Semenovitch Tswett que conseguiu, em 1903, separar pigmentos de cloroplastos contidos em folhas de plantas utilizando colunas de vidro recheadas com sólidos, finamente divididos e para arraste destes componentes empregou éter de petróleo.<sup>22</sup> Tswett passou a empregar o termo cromatografia para descrever as zonas coloridas que se moviam dentro da coluna de vidro, dando origem ao nome da técnica.<sup>23</sup>

A cromatografia é um processo analítico físico-químico de separação de substâncias em mistura, com base nas diferentes velocidades de migração dessas substâncias em razão das afinidades relativas por duas fases: a fase móvel (líquida ou gás) e a fase estacionária ou fixa (sólido ou líquido). Métodos cromatográficos podem ser empregados para identificação qualitativa e determinação quantitativa de espécies separadas.<sup>24</sup>

No processo cromatográfico o resultado de interações específicas entre as moléculas da amostra e as fases móvel e estacionária permite observar a separação dos componentes. Uma vez que a migração é dinâmica e depende do equilíbrio de distribuição de cada componente entre a fase móvel e a fase estacionária, a composição de ambas as fases, o fluxo e a temperatura de separação são variáveis que interferem nesse processo.<sup>25</sup> Considera-se, portanto, que a característica ideal para a fase estacionária é a seletividade, pois a interação dos componentes da mistura depende das forças intermoleculares, como iônica, apolar, e efeitos de afinidade e solubilidade. O ideal é que ocorra uma interação diferenciada entre os componentes da amostra, de forma a apresentar perfis de separação adequados no cromatograma.<sup>22</sup>

A cromatografia tem-se desenvolvido, com base no mecanismo de interação da substância solubilizada com a fase estacionária, dentre as quais podemos citar: papel, camada fina, troca iônica, permeação em gel, afinidade, gasosa, fluido supercrítico e cromatografia líquida de alta eficiência.<sup>24</sup>

A CLAE é a mais utilizada, devido à sensibilidade, fácil adaptação para determinações quantitativas acuradas, adequação à separação de espécies não

voláteis ou termicamente frágeis, além disso, a sua ampla aplicabilidade a substâncias de grande interesse para a indústria como aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, hidrocarbonetos, carboidratos, drogas, terpenóides, pesticidas, espécies organometálicas e muitas substâncias inorgânicas.<sup>24</sup>

### 1.5.1 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

A cromatografia líquida de alta eficiência, dentre as técnicas de separação, tem sido utilizada por laboratórios de análise de indústrias químicas e farmacêuticas devido ampla aplicabilidade.<sup>1</sup> Diferentemente da cromatografia líquida clássica, que faz uso de colunas de vidro com partículas irregulares e fluxo de fase móvel dependente da força da gravidade, a CLAE emprega colunas metálicas fechadas com tamanho de partículas de 3 a 5 mm e sistemas de bomba de alta pressão que fazem a fase móvel migrar a uma velocidade razoável através da coluna, permitindo diversas separações, resultando em operações mais reprodutíveis, rápidas e precisas.<sup>1, 25</sup>

O princípio de separação em cromatografia líquida é baseado tanto nas características físico-químicas dos analitos quanto nas interações entre a fase estacionária e a fase móvel. Durante a passagem da fase móvel sobre a fase estacionária, os analitos são distribuídos pelas duas fases de tal forma que cada um deles é seletivamente retido pela fase estacionária, resultando em migrações diferenciais. Dependendo do mecanismo envolvido na separação é possível classificar essa técnica em cromatografia por troca iônica, cromatografia por exclusão, cromatografia em fase normal e cromatografia em fase reversa.<sup>22</sup>

A CLAE em fase reversa é uma das técnicas mais utilizadas e difere da fase normal por possuir uma fase estacionária de menor polaridade e uma fase móvel de maior polaridade, apresentando como principal vantagem o menor custo nas análises. Além disso, desenvolvimentos recentes permitiram a obtenção de fases estacionárias mais seletivas e estáveis, impulsionando o aprimoramento dessa técnica.<sup>22, 26</sup>

Além de separar os analitos presentes na amostra de interesse, é importante realizar a quantificação dos mesmos e para isso é necessário a presença de um

detector, que meça as mudanças de concentração ou a massa dos compostos da amostra que está deixando a coluna cromatográfica.<sup>1, 24</sup>

## 1.6 Validação de métodos analíticos

Com o aumento das exigências em relação à fabricação de produtos de uso veterinário, a legislação da indústria veterinária tem apresentado frequentes mudanças. A Lei nº 12.689, de 19 de Julho de 2012, alterou o Decreto – Lei nº 467, de 13 de fevereiro de 1969 para estabelecer algumas diretrizes e definir produtos veterinários como:<sup>27, 28</sup>

Toda substância química, biológica, biotecnológica ou preparação manufaturada cuja administração seja aplicada de forma individual ou coletiva, direta ou misturada com os alimentos, destinada à prevenção, ao diagnóstico, à cura ou ao tratamento das doenças dos animais, incluindo os aditivos, suprimentos promotores, melhoradores da produção animal, medicamentos, vacinas, antissépticos, desinfetantes de uso ambiental ou equipamentos, pesticidas e todos os produtos que, utilizados nos animais ou no seu habitat, protejam, restaurem ou modifiquem suas funções orgânicas e fisiológicas, bem como os produtos destinados ao embelezamento dos animais (Brasil, 2012).

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), através da Instrução Normativa nº 13, de 03 de outubro de 2003, aprovou o regulamento de Boas Práticas de Fabricação de Produtos de Uso Veterinário, e exige do fabricante a elaboração de produtos veterinários de modo a assegurar sua adequabilidade ao uso pretendido, estando de acordo com os requisitos de identidade, pureza e segurança, baseando-se nas políticas da qualidade pré-estabelecidas, devendo possuir laboratórios de controle de qualidade adequados para realização dos ensaios necessários.<sup>29</sup> Além disso, o Decreto nº 5053, de 22 de abril de 2004, determina que a área de controle de qualidade possua, por escrito, as especificações e os métodos analíticos usados para matérias-primas, produtos semiacabados, acabados e materiais de embalagem, de acordo com as farmacopeias ou técnica analítica apresentada pelo fabricante validada, indicando os parâmetros dos limites de tolerância e dos desvios para as análises e dosagens dos fármacos da formulação.<sup>30</sup>

Em complementação as legislações citadas, o Conselho Federal de Farmácia (CFF) publicou a Resolução nº 504, de 29 de maio de 2009, regulamentando as atividades do farmacêutico na indústria de produtos veterinários de natureza farmacêutica, atribuindo a competência do profissional farmacêutico em todo processo de produção do medicamento bem como a elaboração e validação dos métodos analíticos utilizados.<sup>31</sup>

O desenvolvimento de metodologias analíticas para quantificação de fármacos, envolve a avaliação e otimização de condições, incluindo etapas de preparação da amostra, separação cromatográfica, detecção e quantificação. Atualmente, há um grande interesse no desenvolvimento de métodos analíticos rápidos e que forneçam parâmetros apropriados para análises quantitativas de fármaco.<sup>32</sup> A necessidade de avaliação na qualidade das medições químicas, mediante sua comparabilidade, rastreabilidade e confiabilidade, tem sido cada vez mais reconhecida e exigida, uma vez que dados analíticos não confiáveis podem conduzir a decisões desastrosas e a prejuízos financeiros irreparáveis. Para garantir que um novo método analítico gere informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra em análise, deve-se realizar uma avaliação denominada validação.<sup>32, 36</sup>

A validação de um método é um processo contínuo que começa no planejamento da estratégia analítica e continua ao longo de todo o desenvolvimento. Para registro de novos produtos, todos os órgãos reguladores do Brasil e de outros países exigem a validação de metodologia analítica e, para isso, a maioria deles tem estabelecido documentos oficiais que são diretrizes a serem adotadas no processo de validação. Um processo de validação bem definido e documentado oferece às agências reguladoras evidências objetivas de que os métodos e os sistemas são adequados para o uso desejado<sup>33, 34, 37</sup>

Os parâmetros fundamentais avaliados na validação de um método analítico são a seletividade, linearidade, precisão, exatidão, robustez, limite de detecção e limite de quantificação, além dos equipamentos e utensílios previamente calibrados e da devida qualificação e treinamento dos analistas.<sup>35, 36, 38</sup>

A Resolução - RE nº 899, de 29 de maio de 2003, apresenta um guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos, para garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas. Os testes necessários são classificados em quatro categorias conforme finalidade (tabela 1).<sup>37</sup>

**Tabela 1:** Classificação dos testes segundo sua finalidade.

<b>Categoria</b>	<b>Finalidade do teste</b>
I	Testes quantitativos para determinação do princípio ativo em produtos farmacêuticos ou matérias-primas
II	Testes quantitativos ou ensaio limite para determinação de impurezas e produtos de degradação em produtos farmacêuticos e matérias-primas
III	Testes de <i>performance</i> (por exemplo: dissolução, liberação do ativo)
IV	Testes de identificação

Fonte: Brasil, 2003.

Os ensaios exigidos para cada categoria, segundo sua finalidade estão descritos na tabela 2.

**Tabela 2:** Ensaios necessários para validação do método analítico, segundo sua finalidade.

<b>Parâmetro</b>	<b>Categoria I</b>	<b>Categoria II</b>		<b>Categoria III</b>	<b>Categoria IV</b>
		<b>Quantitativo</b>	<b>Ensaio Limite</b>		
Especificidade	Sim	Sim	Sim	*	Sim
Linearidade	Sim	Sim	Não	*	Não
Intervalo	Sim	Sim	*	*	Não

Precisão Repetibilidade	Sim	Sim	Não	Sim	Não
Precisão Intermediária	**	**	Não	**	Não
Limite de detecção	Não	Não	Sim	*	Não
Limite de quantificação	Não	Sim	Não	*	Não
Exatidão	Sim	Sim	*	*	Não
Robustez	Sim	Sim	Sim	Não	Não

\* Pode ser necessário, dependendo da natureza do teste específico.

\*\* Se houver comprovação da reprodutibilidade não é necessária a comprovação da precisão

Fonte: Brasil, 2003.

### 1.6.1 Especificidade/Seletividade

O primeiro teste realizado no desenvolvimento e validação de um método analítico é a seletividade para avaliar a capacidade que um método possui de analisar determinadas substâncias na presença de componentes tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz, que possam interferir na sua determinação.<sup>37</sup>

O Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial do Brasil (INMETRO), através do documento - DOQ-CGCRE-008, de junho de 2007: “Orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos” infere que um método que produz respostas para apenas um analito de interesse pode ser chamado específico e um método que produz resposta para vários compostos químicos com uma característica em comum, mas que pode distinguir a resposta entre eles, pode ser chamado de seletivo, como no caso de métodos cromatográficos.<sup>40</sup>

Para análises quantitativas e de impurezas em métodos cromatográficos, a avaliação da seletividade de um método pode ser estabelecida através da comparação dos resultados obtidos de amostras contaminadas com quantidades apropriadas de impurezas ou excipientes e amostras não contaminadas e a verificação da pureza dos picos cromatográficos demonstrando que os resultados

não são afetados por esses materiais. Outra forma de avaliação é determinar possíveis produtos de degradação, expondo todos os componentes e a matriz a condições extremas (luz, calor, umidade, hidrólise e oxidação).<sup>37</sup>

### 1.6.2 Limite de Detecção

O limite de detecção (LD) representa a menor concentração da substância em análise que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, utilizando um determinado procedimento experimental. É estabelecido por meio de análise de soluções de concentrações conhecidas e decrescentes do analito, até o menor nível detectável. Após determinado este menor nível, constrói-se três curvas de calibração contendo concentrações do fármaco próximo a esse nível.<sup>37, 40</sup>

Nos métodos instrumentais que demonstram o ruído da linha de base, como na cromatografia líquida de alta eficiência, a determinação do LD é realizada através da relação sinal-ruído, de soluções de concentrações conhecidas e decrescentes do analito, até o menor nível detectável.<sup>37, 40</sup>

A estimativa para o LD pode ser determinada com base na relação de três vezes o ruído da linha de base ou pela fórmula:

$$LD = \frac{DP}{IC} \times 3$$

Em que:

- DP: é o desvio padrão do intercepto com o eixo y de no mínimo três curvas de calibração construídas contendo a concentração do fármaco próximas ao suposto limite de quantificação.

- IC: é a inclinação da curva.<sup>35, 37</sup>

### 1.6.3 Limite de quantificação

O limite de quantificação (LQ) representa a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas. Assim como para o limite de detecção, a determinação do LQ é realizada através da relação sinal-ruído, de soluções de

concentrações conhecidas e decrescentes do analito, até o menor nível quantificável. <sup>37, 40</sup>

A estimativa para o LQ pode ser determinada com base na relação de dez vezes o ruído da linha de base ou pela fórmula:

$$\text{LQ} = \frac{\text{DP}}{\text{IC}} \times 10$$

Em que:

- DP: é o desvio padrão do intercepto com o eixo y de no mínimo três curvas de calibração construídas contendo a concentração do fármaco próximas ao suposto limite de quantificação.

- IC: é a inclinação da curva. <sup>37, 40</sup>

#### 1.6.4 Linearidade

A linearidade corresponde à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em análise, dentro de uma determinada faixa de aplicação. <sup>37, 40</sup>

De acordo com a RE nº 899, de 29 de maio de 2003, no mínimo cinco concentrações diferentes, contemplando 80 a 120% da concentração teórica do teste, devem ser avaliadas por inspeção visual de uma representação gráfica. Se visualizado uma relação linear aparente entre os dados, esses devem ser avaliados por métodos estatísticos apropriados, como determinação do coeficiente de correlação, intersecção com o eixo Y, coeficiente angular e desvio padrão relativo. <sup>37</sup>

#### 1.6.5 Precisão

A precisão representa a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, sob condições definidas, gerando concordância entre repetidas medidas da mesma propriedade. Os parâmetros geralmente são expressos através do desvio

padrão (DP) ou desvio padrão relativo (DPR), de um número suficiente de amostras.<sup>37, 40</sup>

O cálculo do DPR é realizado através da seguinte fórmula:

$$\text{DPR} = \frac{\text{DP}}{\text{CM}} \times 10$$

Em que:

- CM: é a concentração média determinada

O valor máximo aceitável é definido de acordo com a metodologia empregada, a concentração do analito na amostra, tipo de matriz e a finalidade do método, não sendo admitidos valores superiores a 5%.<sup>37</sup>

A precisão pode ser considerada em três níveis: repetitividade, precisão intermediária e reprodutibilidade.<sup>37</sup>

#### **1.6.5.1 Repetibilidade**

A repetibilidade expressa o grau de concordância entre os resultados de medições sucessivas de uma mesma amostra, efetuadas sob um mesmo procedimento de medição, mesmo observador, mesmo instrumento em condições idênticas de uso, mesmo local e repetições em curto período de tempo.<sup>37</sup>

De acordo com as orientações sobre validação de métodos, o mínimo de nove determinações, contemplando três concentrações (baixa, média e alta) com triplicatas ou seis determinações a 100% da concentração do teste devem ser realizadas.<sup>37, 41</sup>

#### **1.6.5.2 Precisão intermediária**

A precisão intermediária, expressa o grau de concordância entre os resultados de medições sucessivas de uma mesma amostra, efetuadas sob um mesmo procedimento de medição, porém com diferentes analistas, dias diferentes

ou equipamentos diferentes.<sup>37, 40</sup> Em resumo, de acordo com a RE nº 899, de 29 de maio de 2003, é a concordância entre os resultados de um mesmo laboratório por meio da utilização de um mesmo método analítico.<sup>37</sup>

### 1.6.5.3 Reprodutibilidade

Reprodutibilidade, é o grau de concordância entre os resultados das medições de um mesmo mensurando, obtidas sob condições variadas de medição.<sup>40</sup> Normalmente, é aplicada como forma de colaboração entre laboratórios, de modo a verificar o desempenho dos métodos, sendo considerada em situações como a padronização de procedimentos analíticos a serem incluídos, como por exemplo, em farmacopéias.<sup>37</sup> Uma vez sendo comprovada a reprodutibilidade em ensaios de validação, não é necessária a comprovação da precisão intermediária.<sup>37</sup>

### 1.6.6 Exatidão

A exatidão de um método analítico representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e um valor de referência aceito, ou seja, a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro.<sup>37, 40</sup> É determinada após o estabelecimento da linearidade, precisão e seletividade, com no mínimo nove determinações (três réplicas) para cada faixa de concentração (baixa, média e alta).<sup>37, 41</sup>

Segundo a RE nº 899, de 29 de maio de 2003, pode ser expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente, conforme a seguinte fórmula:

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

A exatidão pode ser determinada pela aplicação do método analítico a um padrão de referência ou pela comparação dos resultados obtidos com o método em questão a um segundo método já validado.<sup>37</sup>

Para determinação da exatidão de fármacos na aplicação do método, deve-se realizar análise de um padrão de referência ou a comparação dos resultados obtidos com uma segunda metodologia validada.<sup>37</sup> Na forma farmacêutica, a análise de uma amostra a qual foi adicionada quantidade conhecida de fármaco a uma mistura dos componentes do medicamento (placebo contaminado) ou, na falta desses, pela adição do padrão de referência ao medicamento são avaliadas.<sup>37</sup> No caso das impurezas, realiza-se o ensaio através da análise pelo método de adição de padrão, no qual se adiciona quantidades conhecidas de impurezas e/ou produtos de degradação ao medicamento ou fármaco, ou ainda, na indisponibilidade das amostras de impurezas, a comparação dos resultados obtidos pelo método em questão com um segundo método validado.<sup>37</sup>

#### 1.6.7 Robustez

A robustez de um método analítico é a medida de sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos, o que demonstra a confiança dos resultados obtidos durante o uso normal.<sup>37</sup> Durante o desenvolvimento da metodologia, deve-se considerar a avaliação da robustez e constatando-se a susceptibilidade do método a variações nas condições analíticas, estas deverão ser controladas e precauções devem ser incluídas no procedimento.<sup>37</sup>

Entre os fatores investigados destacam-se: temperatura, pH, grau de pureza de reagentes, composição de fase móvel e velocidade de fluxo.<sup>37</sup> Esses fatores podem variar de acordo com o método a ser avaliado, conforme mostra a tabela 3.

**Tabela 3:** Fatores considerados na determinação da robustez do método analítico.

---

Preparo das amostras	- Estabilidade das soluções analíticas - Tempo de extração
----------------------	---

---

---

Espectrofotometria	<ul style="list-style-type: none"><li>- Variação do pH da solução</li><li>- Temperatura</li></ul>
Cromatografia líquida	<ul style="list-style-type: none"><li>- Variação do pH da fase móvel</li><li>- Variação na composição da fase móvel</li><li>- Diferentes lotes ou fabricantes de colunas</li><li>- Temperatura</li><li>- Fluxo da fase móvel</li></ul>
Cromatografia gasosa	<ul style="list-style-type: none"><li>- Diferentes lotes ou fabricantes de colunas</li><li>- Temperatura</li><li>- Velocidade do gás de arraste</li></ul>

---

Fonte: Brasil, 2003.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Geral

- Desenvolver e validar um método analítico para a determinação simultânea de quatro fármacos antiparasitários por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

## **2.2 Específicos**

- Realizar um estudo da solubilidade dos fármacos;
- Otimizar os parâmetros cromatográficos para validação do método analítico;
- Desenvolver e validar um método analítico para a determinação de febantel, fluazuron, toltrazuril e tiabendazol por cromatografia líquida de alta eficiência em insumos farmacêuticos e suas formulações farmacêuticas veterinárias;
- Quantificar os fármacos em suas apresentações farmacêuticas veterinárias disponíveis em lojas de produtos veterinários de diferentes fabricantes;
- Verificar por um período de 24 horas a estabilidade das substâncias químicas de referência.

### 3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Substâncias químicas de referência e amostras de medicamentos de uso veterinário

As substâncias de referência utilizadas estão relacionadas na Tabela 4, com a descrição do peso molecular, teor e marca.

**Tabela 4:** Descrição do massa molar, teor e marca das substâncias químicas de referência utilizadas no desenvolvimento e validação do método.

Analito	Massa Molar (g.mol <sup>-1</sup> )	Teor (% m/m)	Marca
Tiabendazol	201,25	100,00	Natural Pharma
Febantel	446,48	100,14	Mylan Laborator. Ltda.
Toltrazuril	425,38	99,78	Jintan Lingyun A. Health
Fluazuron	506,21	98,16	Yangzhou T.P

Fonte: Certificado de análise e USP, 2014.

As amostras foram adquiridas no comércio local de Vitória em farmácias de manipulação e lojas de produtos de uso veterinário e estão descritas na tabela 5.

**Tabela 5:** Descrição da composição, teor declarado, forma farmacêutica, fabricação, validade e lote das amostras analisadas.

Amostra/Lote	Fabricação/ Validade	Composição/ Teor declarado
1 - 130184	Jun/2013 – Jun 2017	Tiabendazol 500 mg comprimidos
2 - 130222	Nov/2012 – Nov/2016	Tiabendazol 50 mg.g <sup>-1</sup> pomada
3 - 130345	Jul 2014 – Jan 2015	Fluazuron 5 mg cápsula
4 - 001/14	Jan/2014 – Jan/2017	Febantel 5mg/ comprimido
5 - 10447	Jul 2014 – Jan 2015	Febantel manipulado 5mg/cápsula
6 -10448	Jul 2014 – Jan 2015	Toltrazuril manipulado suspensão 2,5%

### 3.1.2 Reagentes e solventes

Os reagentes e solventes utilizados no desenvolvimento e validação da metodologia analítica estão descritos na tabela 6.

**Tabela 6:** Descrição da marca, lote e validade dos reagentes e solventes utilizado no desenvolvimento e validação do método.

Reagentes e solventes	Teor (% v/v)	Marca	Lote	Validade
Ácido acético glacial P.A	99,50	Vetec	DCBC1070	Fev/20
Ácido clorídrico P.A	37,50	Vetec	1202126	Abr/16
Peróxido de hidrogênio	30,00	Vetec	135678	Abr/17
Hidróxido de sódio P.A	99,50	Vetec	1305789	Nov/16
Acetonitrila	99,99	Panreac	420595	Nov/16
Metanol	99,99	Panreac	510487	Dez/16
Água ultrapura	N.A	Elga UK*	N.A	N.A

\* Deionizada com resistividade de 18,2  $\Omega$ m, purificado pelo sistema PURELAB Ultra (ELGA UK).

### 3.1.3 Equipamentos e consumíveis

Foi utilizado um equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência da Agilent Technologies, modelo 1260 infinity (Waldbronn, Alemanha) equipado com bomba quaternária (G1311A) e detector UV/DAD (G1314B). Os dados foram obtidos e processados com OpenLab – EzChrom. Para separação e validação dos fármacos foi utilizada uma coluna Zorbax Eclipse Plus C18 – Rapid Resolution (100 x 3,0 mm, 3,5  $\mu$ m de diâmetro interno), volume de injeção das amostras de 10  $\mu$ L injetadas manualmente. Todos os experimentos foram realizados em temperatura ambiente (25 °C), utilizando balança analítica Bioscale (Modelo FA2204), micropipeta automática 100 – 1000  $\mu$ L (Eppendorf 351115A) e filtro de membrana Millipore Millex PVDF 0,45  $\mu$ m de poro.

### 3.2 Estudo da solubilidade dos fármacos

A solubilidade do tiabendazol, febantel, toltrazuril e fluazuron foi avaliada utilizando solventes de diferentes polaridades, como a acetonitrila, metanol, acetato de etila e água. Para a realização do teste, cerca de 1 mg de cada fármaco foi quantitativamente transferido para um tubo de ensaio, e em seguida alíquotas de cada solvente foram sucessivamente adicionadas até completa solubilização da substância. Os ensaios foram realizados individualmente para cada fármaco, sob agitação manual e solvente à temperatura ambiente (25°C). A faixa de solubilidade foi expressa de acordo com os termos descritivos da Farmacopeia Brasileira.<sup>19</sup>

### **3.3 Desenvolvimento e otimização do método por CLAE**

#### **3.3.1 Preparo da fase móvel**

A fase móvel *A* foi preparada em um balão volumétrico de 1000 mL, transferindo-se 1,0 mL de ácido acético glacial P.A. e completando-se o volume com água purificada. Em seguida, a fase móvel foi filtrada e desgaseificada em banho de ultrassom.

A fase móvel *B* contendo acetonitrila foi transferida para o reservatório do cromatógrafo.

#### **3.3.2 Condições cromatográficas/ analíticas**

Foi utilizado um equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência da Agilent Technologies, modelo 1260 infinity, equipado com bomba quaternária e detector UV/DAD. Os dados foram obtidos e processados com OpenLab – EzChrom. Para separação e validação das substâncias foi utilizada uma coluna Zorbax Eclipse Plus C18 – Rapid Resolution (100 x 3,0 mm, 3,5 µm de diâmetro interno) e o volume de injeção das amostras de 10 µL. Todos os experimentos foram realizados em temperatura ambiente (25°C), uma eluição com programa de gradiente da fase móvel *A* (solução aquosa de ácido acético 0,1% v/v) e fase móvel *B* (acetonitrila) e

com vazão de  $1,0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ , tempo de eluição de 10 minutos e absorvância medida em 250 nm.

### **3.3.3. Preparo das soluções padrão, dos placebos e das amostras**

#### **3.3.3.1 Solução padrão estoque**

No preparo da solução padrão estoque ( $1,5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), as substâncias químicas de referência febantel, toltrazuril e fluazuron foram pesadas em balança analítica e em seguida, solubilizadas separadamente em acetonitrila. A substância química de referência tiabendazol foi solubilizada com ácido acético glacial e em seguida acetonitrila (1:10). As soluções foram estocadas em frascos âmbar e ao abrigo da luz.

#### **3.3.3.2 Placebos e amostras**

As amostras na forma farmacêutica de comprimidos foram trituradas com auxílio do gral e pistilo, as cápsulas esvaziadas para a obtenção do pó, a pomada retirada e pesada diretamente e a suspensão retirado. Em seguida, todas as amostras foram pesadas e solubilizadas em acetonitrila para obter a concentração estabelecida previamente de  $0,250 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  para cada fármaco. Estas soluções foram levadas ao ultrassom por 20 minutos e filtradas com membrana Millipore Millex PVDF  $0,45 \mu\text{m}$  de poro.

As soluções de placebo (sem os fármacos) contendo as formulações idênticas aos medicamentos em análise foram preparadas conforme descrito acima. Todas as amostras foram preparadas e analisadas em triplicatas.

### **3.4 Validação do método por CLAE**

Após a otimização do método, este foi por fim validado segundo os critérios descritos na Resolução – RE n° 899, de 29 de março de 2003, ANVISA, categoria I que dispõe sobre testes quantitativos para a determinação de fármacos em produtos farmacêuticos ou matérias-primas.

A adequação do sistema foi determinada a partir de seis injeções replicadas da solução padrão contendo  $0,250 \mu\text{g.mL}^{-1}$  de febantel, toltrazuril, tiabendazol e fluazuron foi preparada por diluição em acetonitrila.<sup>14</sup>

### 3.4.1 Especificidade/Seletividade

A especificidade do método foi avaliada por comparação dos tempos de retenção dos fármacos no cromatograma com a solução padrão e do placebo. As injeções foram em triplicata. Um estudo de degradação forçada foi realizado sob a gama de condições recomendadas nas diretrizes do ICH (International Conference on Harmonisation), como ácida, básica, neutra, oxidativa, luz solar e sob condições térmicas. Uma solução padrão estoque dos fármacos ( $1,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) foi usada ao longo dos estudos de degradação forçada para indicar a estabilidade e a seletividade do método proposto.<sup>35</sup>

- Degradação ácida: O estudo foi realizado a partir da decomposição ácida com 5 mL de solução padrão, 5 mL de solução HCl  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$  e  $1 \text{ mol.L}^{-1}$  a  $80 \text{ }^\circ\text{C}$  durante 5 h, respectivamente. As soluções resultantes foram arrefecidas até à temperatura ambiente, neutralizadas com solução de NaOH  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$  e  $1 \text{ mol.L}^{-1}$ , respectivamente e diluídas com água para 25 mL para obter uma concentração de  $0,250 \mu\text{g.mL}^{-1}$ .
- Degradação básica: O estudo foi realizado à decomposição básica com 5 mL de solução padrão, 5 mL de solução NaOH  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$  e  $1 \text{ mol.L}^{-1}$  a  $80 \text{ }^\circ\text{C}$  durante 5 h, respectivamente. As soluções resultantes foram arrefecidas até à temperatura ambiente, neutralizadas com solução de HCl  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$  e  $1 \text{ mol.L}^{-1}$ , respectivamente e diluídas com água para 25 mL para obter a concentração de  $0,250 \mu\text{g.mL}^{-1}$ .
- Degradação neutra: O estudo foi realizado com água deionizada a  $80 \text{ }^\circ\text{C}$  durante 5 h. A solução resultante foi diluída para obter a concentração de  $0,250 \mu\text{g.mL}^{-1}$ .

- Degradação oxidativa: No estudo da degradação induzida, utilizou-se peróxido de hidrogênio 3% v/v e aqueceu a 80 °C durante 5 h. A solução resultante foi diluída com água para obter a concentração de 0,250 µg.mL<sup>-1</sup>.
- Degradação térmica: O estudo foi realizado com ácido clorídrico metanólico 0,1 mol.L<sup>-1</sup> a 80 °C durante 5 h. A solução resultante foi diluída com água para obter a concentração de 0,250 µg.mL<sup>-1</sup>.
- Degradação por luz solar (fotodegradação): O estudo foi realizado expondo a solução com concentração de 0,250 µg.mL<sup>-1</sup> em lâmpada fluorescente por 24 horas.

### **3.4.2 Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)**

Os limites de detecção e quantificação foram determinados com base nas respostas do desvio padrão e regressão da curva de calibração e estimados a partir da relação sinal/ruído.<sup>37</sup> Para tanto, uma solução contendo 0,250 µg.mL<sup>-1</sup> de cada analito foi diluída em acetonitrila de forma seriada até a menor banda detectável.

O LD foi obtido através da menor concentração que resultou em uma banda de três vezes o ruído da linha de base, e o LQ como a menor concentração a qual resultou em um sinal/ruído igual ou maior que dez.<sup>37</sup>

### **3.4.3 Curva de calibração**

A linearidade foi determinada em triplicata em sete níveis de concentração, conforme estabelecido na RE N° 899, contemplando a faixa de 80 a 120% da concentração teste estabelecida previamente (0,250 µg.mL<sup>-1</sup>). Para realização desse ensaio, soluções estoques foram preparadas e diluídas de modo a obter uma faixa de concentração de 0,175 a 0,325 µg.mL<sup>-1</sup> (ou seja, 0,175, 0,200, 0,225, 0,250, 0,275, 0,300 e 0,325 µg.mL<sup>-1</sup>) para febantel, tiabendazol, toltrazuril e fluazuron. Detalhes do preparo das curvas de calibração são demonstrados na tabela 7.

**Tabela 7:** Esquema de diluição para o preparo das soluções utilizadas no ensaio de linearidade.

Níveis de concentração	Volume da solução estoque ( $\mu\text{L}$ )	Volume de acetonitrila ( $\mu\text{L}$ )	Volume final (mL)	Concentração final ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )			
				TIAB	FEBA	TOLTR	FLUA
1	175	0,800	1,5	0,175	0,175	0,175	0,175
2	200	0,700	1,5	0,200	0,200	0,200	0,200
3	225	0,600	1,5	0,225	0,225	0,225	0,225
4	250	0,500	1,5	0,250	0,250	0,250	0,250
5	275	0,400	1,5	0,275	0,275	0,275	0,275
6	300	0,300	1,5	0,300	0,300	0,300	0,300
7	325	0,200	1,5	0,325	0,325	0,325	0,325

NOTA: Solução estoque:  $1,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$  de tiabendazol (TIAB), febantel (FEBA), toltrazuril (TOLTR) e fluazuron (FLUA).

As áreas registradas para cada analito em cada nível de concentração foram submetidas á análise de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados para calcular a equação de calibração e coeficiente de correlação ( $r$ ). Como critério de aceitação, o coeficiente de regressão dever ser superior a 0,99 e nenhum desvio maior que 5% nos valores de precisão e exatidão devem ser observados em cada nível de concentração. O intervalo de trabalho foi estabelecido de 80 a 120% da concentração teste estabelecida previamente ( $0,250 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ), conforme estabelecido na RE N° 899.<sup>37</sup>

#### 3.4.4 Precisão

A precisão do método foi determinada por estudos de repetibilidade e precisão intermediária. Na repetibilidade, soluções de trabalho foram preparadas e diluídas contemplando 3 níveis de concentração dos fármacos ( $0,200$ ,  $0,250$  e  $0,300 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) conforme demonstrado na tabela 7, no mesmo dia sob as mesmas condições experimentais. A precisão intermediária foi realizada em um mesmo equipamento, durante três dias consecutivos, abrangendo os mesmos níveis de concentração teste da repetibilidade (80, 100 e 120%). A dispersão dos resultados foi avaliada através da porcentagem do desvio padrão relativo (DPR, %), conforme estabelecido na RE N° 899.<sup>37</sup>

### 3.4.5 Exatidão

A exatidão foi determinada através do método de adição do padrão. Para realização do ensaio, soluções de trabalho dos fármacos foram preparadas nos mesmos níveis de concentração estabelecida no item 3.4.4 do ensaio da precisão e submetidas à análise nas condições pré-determinadas, para a obtenção das áreas das bandas de cada analito em cada nível de concentração. A exatidão foi expressa como porcentagem da área recuperada e o intervalo de confiança no nível de 95% também foram considerados como critério para avaliação do parâmetro de exatidão.<sup>37</sup>

### 3.4.6 Robustez

A robustez do método foi avaliada considerando alguns parâmetros que poderiam afetar a resposta dos analitos. As amostras foram preparadas em triplicatas, tendo os parâmetros alterados na porcentagem de acetonitrila da fase móvel e na vazão conforme tabela 8.

**Tabela 8:** Parâmetros modificados para avaliação da robustez do método.

Parâmetro modificado	Varição 1	Nominal	Varição 2
Porcentagem de acetonitrila na fase móvel (%)	55	60	65
Fluxo da fase móvel (mL)	0,900	1,000	1,100

### 3.4.7 Estudo da estabilidade da solução padrão

As amostras foram preparadas na concentração de 0,250  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . A estabilidade da solução de trabalho foi avaliada por um período de 24 horas, sendo seus cromatogramas obtidos após o preparo nos tempos 0h, 2h, 4h, 8h, 12h, 16h e 24h.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Solubilidade dos fármacos

A solubilidade dos fármacos é uma propriedade que influencia diferentes aspectos relativos à farmacocinética e a estabilidade química da molécula, exigindo a escolha do solvente mais adequado para aplicações analíticas como no desenvolvimento de um método de análise.<sup>42, 43</sup> O estudo da solubilidade dos fármacos tiabendazol, febantel, fluazuron e toltrazuril é um importante critério para otimização da etapa de preparo das amostras, tendo em vista que as substâncias de interesse possuem características físico químicas semelhantes.<sup>43</sup>

O teste foi realizado conforme classificação da Farmacopeia Brasileira.<sup>19</sup> Os resultados obtidos estão descritos na tabela 9.

**Tabela 9:** Solubilidade dos fármacos em diferentes solventes.

Solventes	Substância			
	Tiabendazol	Febantel	Toltrazuril	Fluazuron
Água	Insolúvel	Insolúvel	Insolúvel	Insolúvel
Acetonitrila	Ligeiramente solúvel	Solúvel	Solúvel	Solúvel
Metanol	Pouco solúvel	Solúvel	Solúvel	Ligeiramente solúvel
Acetato de etila	Ligeiramente solúvel	Solúvel	Pouco solúvel	Ligeiramente solúvel

Observa-se que os fármacos apresentaram boa solubilidade em acetonitrila, exceto o tiabendazol que apresentou baixa solubilidade. Entretanto, a Farmacopeia Americana (USP, 2015) descreve que o tiabendazol apresenta boa solubilidade em meio ácido, provavelmente devido a polaridade que a molécula de tiabendazol apresenta. Assim, misturas de acetonitrila com soluções ácidas foram testadas para avaliar a solubilidade. Dentre as diferentes misturas avaliadas, a proporção de 95:5

(Acetonitrila:Ácido acético) promoveu completa solubilização do fármaco. Sendo assim, optou-se por utilizar o solvente acetonitrila para todos os fármacos, acrescentado ao tiabendazol a solução ácida.

## **4.2 Desenvolvimento e otimização do método**

### **4.2.1 Otimização cromatográfica**

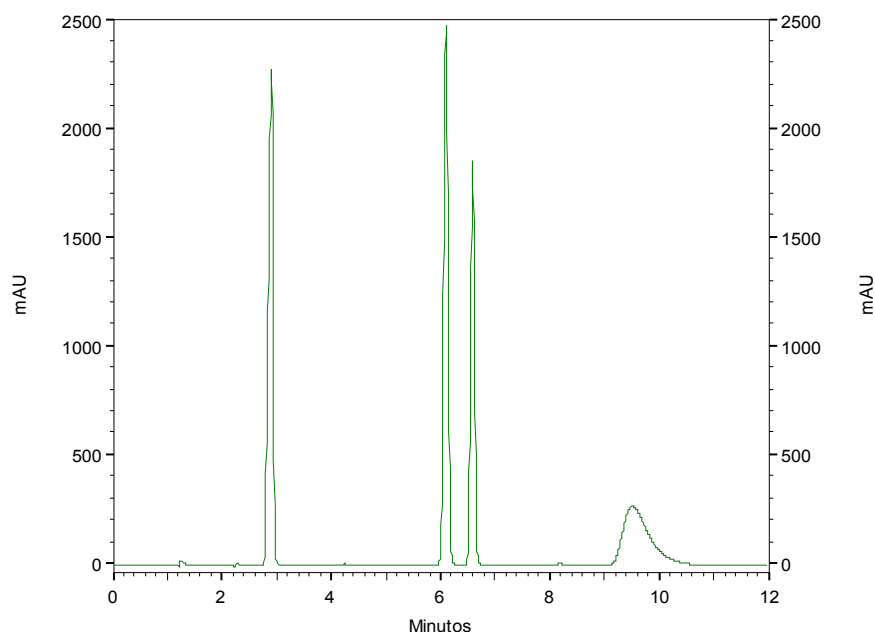
Os parâmetros cromatográficos iniciais utilizados para desenvolver o método para quantificação dos fármacos em estudo foram baseados nos dados da revisão bibliográfica e farmacopeias, ou seja, nos pontos em comum entre os métodos existentes para quantificação do tiabendazol, febantel, toltrazuril e fluazuron.<sup>1, 13, 14</sup>

No desenvolvimento dessa nova metodologia a proposta foi obter um perfil cromatográfico com boa resolução e menor tempo de eluição possível. A fim de alcançar esses objetivos, vários parâmetros foram avaliados com base nas estruturas químicas dos compostos para separação através da seleção da programação por gradiente de fase móvel e coluna cromatográfica. Assim sendo, foram testados 26 programas de gradiente, variando a proporção de fase móvel.<sup>44</sup>

A acetonitrila foi escolhida como eluente, porque demonstrou características de separação melhor do que o metanol. Quando metanol foi utilizado como eluente, não foi capaz de proporcionar uma separação global adequada dos compostos no perfil cromatográfico. As bandas cromatográficas apresentadas para o febantel e toltrazuril ficaram ampliadas mesmo em nível muito baixo. Os diferentes programas de gradiente com ácido acético 0,1% v/v também mostraram diferentes comportamentos de retenção e valores diferentes de solução desse ácido foram testados com acetonitrila. Foram preparadas duas fases móveis, denominadas em fase móvel A (ácido acético 0,1% v/v) e fase móvel B (acetonitrila), e utilizado uma coluna Zorbax Eclipse Plus C18 (100 x 3,0 mm, 3,5 µm) com fluxo de 1,0 mL.min<sup>-1</sup>.

Separações limitadas ou parciais foram obtidas utilizando programações por gradiente. No entanto, as moléculas foram fortemente retidas na coluna e as separações ainda se apresentavam incompletas. O perfil cromatográfico do

fluazuron demonstrado na figura 5, ficou comprometido e uma análise em diferentes proporções de gradiente foi então realizada.

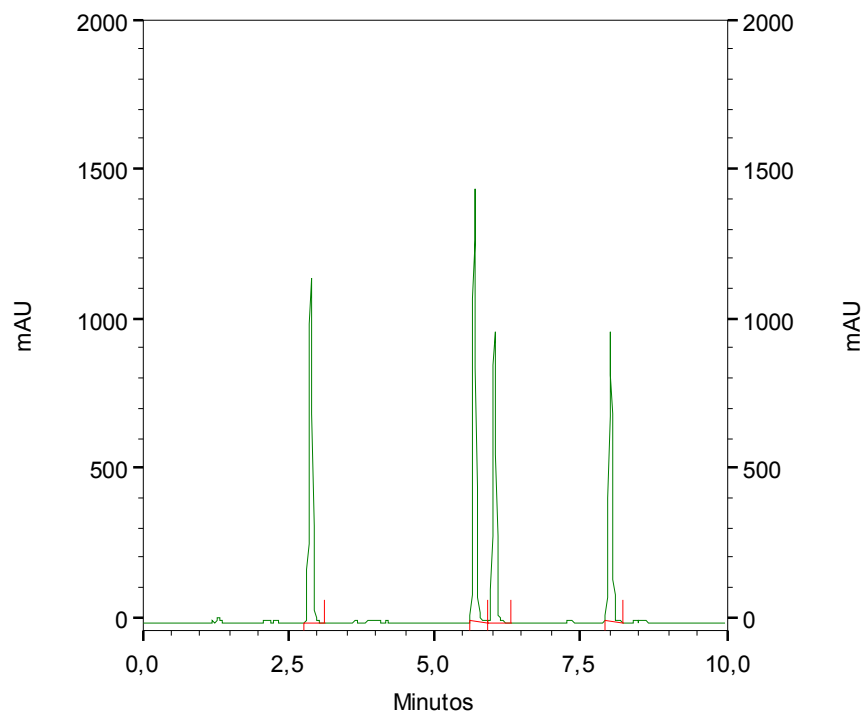


**Figura 5:** Perfil cromatográfico das soluções padrão dos fármacos tiabendazol (a), febantel (b), toltrazuril (c) e fluazuron (d) no desenvolvimento do programa de gradiente.

Na tentativa de melhorar o perfil cromatográfico para o fluazuron e reduzir o tempo de eluição dos analitos, modificações na proporção de fase móvel A e B foi realizada, iniciando com 90% de fase móvel A. Entretanto, o aumento na proporção da fase móvel B em um intervalo de tempo de eluição grande, a banda do fluazuron (d) permanecia por mais tempo na coluna e conseqüente com perfil cromatográfico assimétrico. Assim, reduzindo o tempo de eluição a banda do fluazuron apresentou-se adequado e as modificações foram realizadas até obter uma excelente otimização cromatográfica (Figura 6), sendo estabelecido o programa de gradiente da fase móvel para a validação do método analítico de acordo com a Tabela 10.

**Tabela 10:** Programação de gradiente da fase móvel.

Tempo (min)	Fase móvel A (% V/V)	Fase móvel B (% V/V)
0.00	100	0
2.00	40	60
3.00	40	60
6.00	10	90
7.00	10	90
10.00	100	0



**Figura 6:** Perfil cromatográfico das soluções padrão dos fármacos tiabendazol (a), febantel (b), toltrazuril (c) e fluazuron (d) com o programa de gradiente estabelecido na tabela 10.

Em virtude da excelente otimização cromatográfica obtida, foi testada a adequação do sistema conforme os parâmetros descritos no ICH, 2005 e USP, 2015.

Para verificação da adequação do sistema cromatográfico foi realizado antes de cada execução da validação seis injeções repetidas de solução padrão para avaliação da assimetria, números de pratos teóricos, DPR das áreas das bandas e tempos de retenção do perfil cromatográfico. Para todas as injeções os resultados foram satisfatórios conforme demonstrado na tabela 11.

**Tabela 11:** Resultados dos testes de adequação de sistema para determinação de tiabendazol, febantel, toltrazuril e fluazuron.

Parâmetros	Recomendação USP	Dia	Substância	Mínimo	Máximo	DPR, % <sup>b</sup>	Status
Tempo de retenção, min	DPR, % <2	1	Tiabendazol	2,847	2,881	0,41	Aprova do
			Febantel	5,741	5,787	0,27	Aprova do
			Toltrazuril	6,081	6,127	0,27	Aprova do
			Fluazuron	8,041	8,127	0,38	Aprova do
		2	Tiabendazol	2,847	2,883	0,42	Aprova do
			Febantel	5,741	5,801	0,34	Aprova do
			Toltrazuril	6,081	6,141	0,34	Aprova do
			Fluazuron	8,041	8,161	0,51	Aprova do
		3	Tiabendazol	2,847	2,873	0,34	Aprova do
			Febantel	5,727	5,741	0,08	Aprova do
			Toltrazuril	6,061	6,073	0,08	Aprova do
			Fluazuron	8,013	8,041	0,12	Aprova do
Repetitividade	DPR, % <2	1	Tiabendazol	7742968	8072674	1,73	Aprova do
			Febantel	9188943	9633921	1,86	Aprova do
			Toltrazuril	6210642	6565544	2,07	Aprova do
			Fluazuron	6962024	7272437	1,46	Aprova do
		2	Tiabendazol	8256144	8448595	0,99	Aprova do
			Febantel	9561013	9805610	1,04	Aprova do
			Toltrazuril	6498809	6711520	1,26	Aprova do
			Fluazuron	7214386	7418061	1,05	Aprova do
		3	Tiabendazol	7962055	8157661	0,86	Aprova do

			Febantel	9247328	9379257	0,54	Aprova do
			Toltrazuril	6267968	6354686	0,55	Aprova do
			Fluazuron	6975050	7074112	0,54	Aprova do
			Tiabendazol	8226	9913	6,07	Aprova do
		1	Febantel	44812	50032	4,07	Aprova do
			Toltrazuril	54240	57646	2,12	Aprova do
			Fluazuron	75518	77964	1,11	Aprova do
			Tiabendazol	8513	9833	6,91	Aprova do
Pratos teóricos	> 2000	2	Febantel	44848	48363	2,77	Aprova do
			Toltrazuril	54391	56539	1,64	Aprova do
			Fluazuron	73443	77716	2,08	Aprova do
			Tiabendazol	8154	9454	5,91	Aprova do
		3	Febantel	45501	49359	3,18	Aprova do
			Toltrazuril	54861	58388	2,42	Aprova do
			Fluazuron	77288	80865	1,65	Aprova do
			Tiabendazol	0,96531	0,98398	0,64	Aprova do
		1	Febantel	1,00664	1,05137	1,39	Aprova do
			Toltrazuril	1,01621	1,07067	1,95	Aprova do
			Fluazuron	1,02364	1,07588	1,66	Aprova do
			Tiabendazol	0,97333	0,98754	0,51	Aprova do
Assimetria	< 2	2	Febantel	1,00387	1,04132	1,27	Aprova do
			Toltrazuril	1,03839	1,09901	1,91	Aprova do
			Fluazuron	1,00871	1,06743	1,97	Aprova do
			Tiabendazol	0,94481	0,97534	1,07	Aprova do
		3	Febantel	1,00398	1,03625	1,25	Aprova do
			Toltrazuril	1,01379	1,05792	1,46	Aprova do
			Fluazuron	1,02086	1,04708	1,01	Aprova do

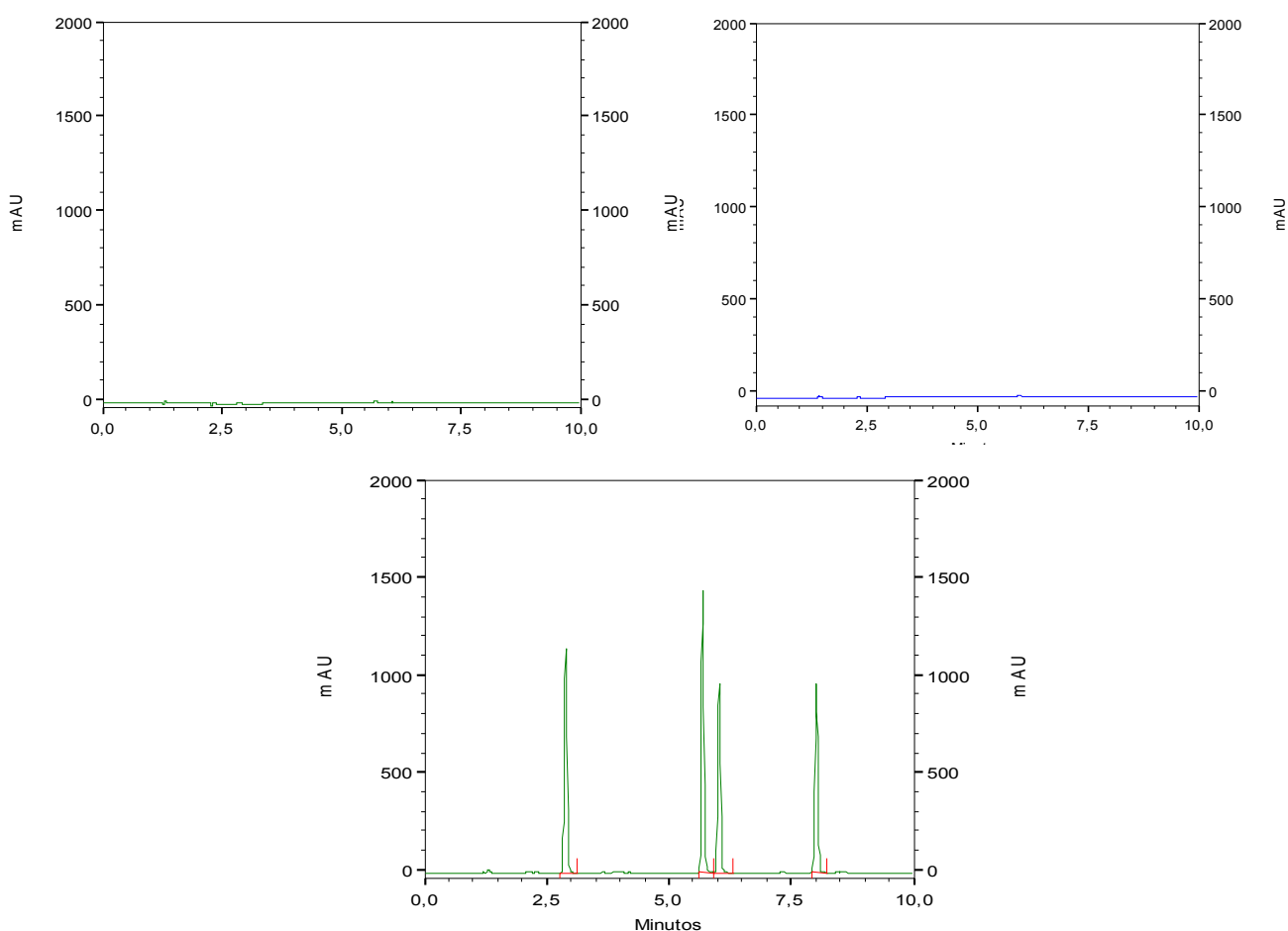
<sup>a</sup> valores de 0,200 µg.mL<sup>-1</sup>

<sup>b</sup> valores de 6 replicatas.

### 4.3 Validação do método CLAE

### 4.3.1 Seletividade

O cromatógrafo líquido de alta eficiência é considerado um equipamento de alta seletividade. Dessa forma, bandas com eluição próximas podem ser distinguidas quando comparadas com padrões. Apesar da alta seletividade, as amostras foram submetidas às degradações ácida, básica, oxidativa, neutra, luz solar e térmica para observar alguma possível interferência nos tempos de retenção dos analitos. Os cromatogramas da figura 7 (A, B e C) indicam, respectivamente, a análise da fase móvel, do placebo e das soluções padrão dos fármacos em estudo. Além disso, o método desenvolvido foi bem sucedido em separar os produtos de degradação e o placebo, comprovando a seletividade do método analítico desenvolvido.

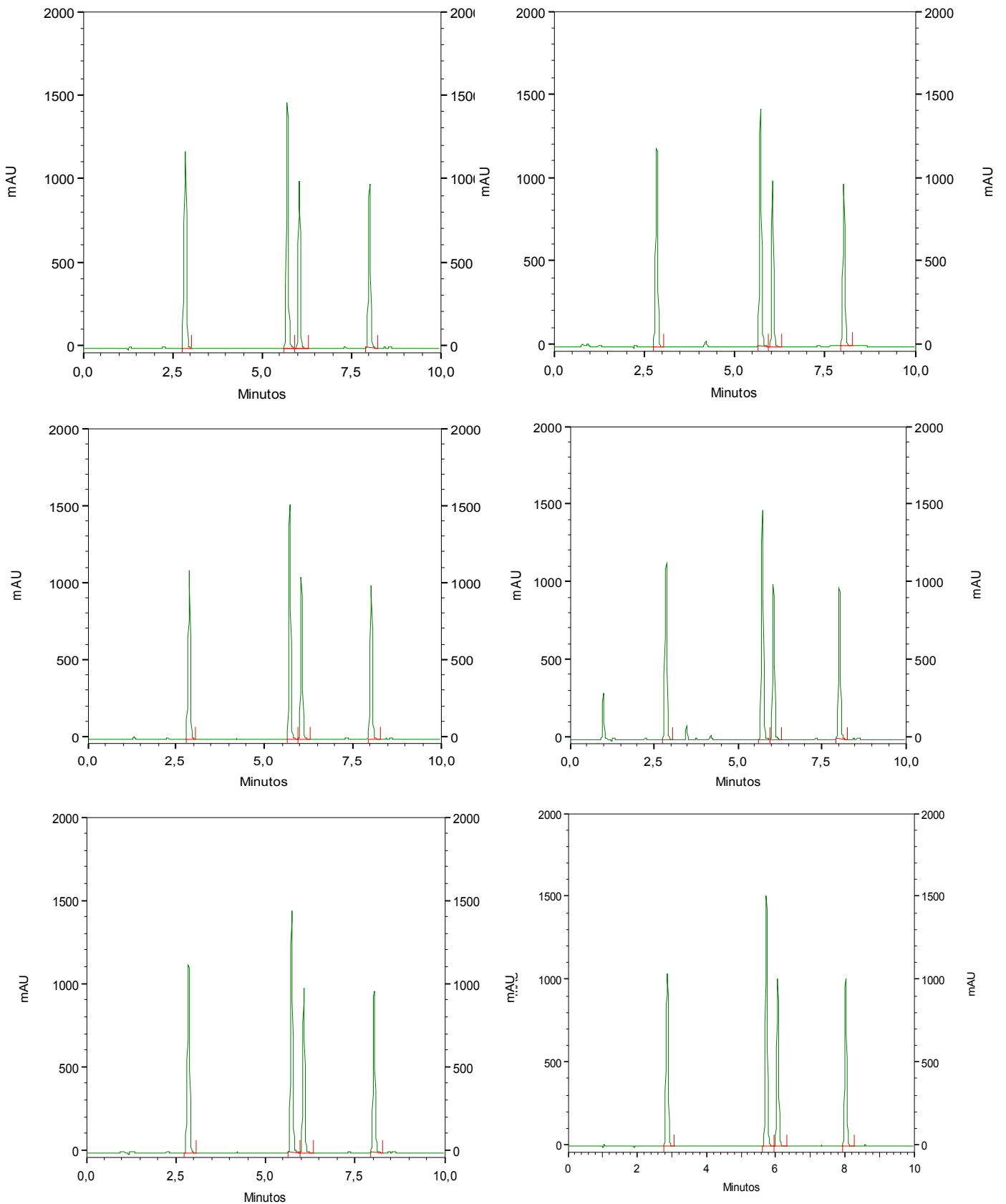


**Figura 7:** Cromatograma da (A) fase móvel, (B) placebo e (C) soluções padrão dos fármacos tiabendazol, febantel, toltrazuril e fluazuron.

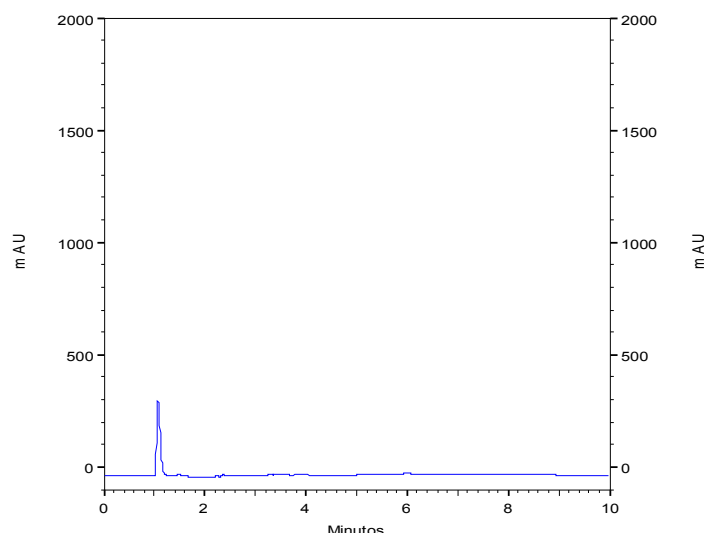
De acordo com a ICH, os requisitos avaliados fornecem evidências de como a qualidade de um medicamento varia com o tempo na exposição de fatores ambientais, tais como temperatura, luz, oxigênio, pH, e umidade. O método desenvolvido foi capaz de identificar os fármacos e os produtos de degradação em uma única eluição. Os cromatogramas demonstrados na figura 8 são relativos aos estudos de degradação forçada. Não foi encontrado nenhum pico adicional, exceto para a degradação oxidativa (figura 8D), em que foram observadas duas novas bandas no tempo de retenção de 1,12 min e 3,49 min não coelundo com as demais bandas. Assim sendo, a figura 9 representa o cromatograma de injeção relativo a degradação oxidativa realizada no placebo. Observou-se novamente a banda no tempo de retenção próximo a 1 minuto, demonstrando que esta relacionado a presença do peróxido de hidrogênio utilizado na solução de degradação oxidativa, sendo provavelmente produtos de degradação, e não aos fármacos em análise. Além disso, essas bandas observadas não afetou os parâmetros cromatográficos como a resolução e área das bandas dos fármacos.

#### **4.3.2 Linearidade**

A curva de calibração foi linear, analisando soluções padrão em sete níveis de concentração ( $0,175 - 0,325 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ). A área da banda de concentração foi submetida a regressão linear pela análise dos mínimos quadrados para calcular a equação de calibração e do valor  $r$ . A equação linear, coeficiente de correlação e valores DPR são apresentados na tabela 12. Todos os valores de  $R$  foram superiores a 0,99, mostrando linearidade excelente conforme figura 10.



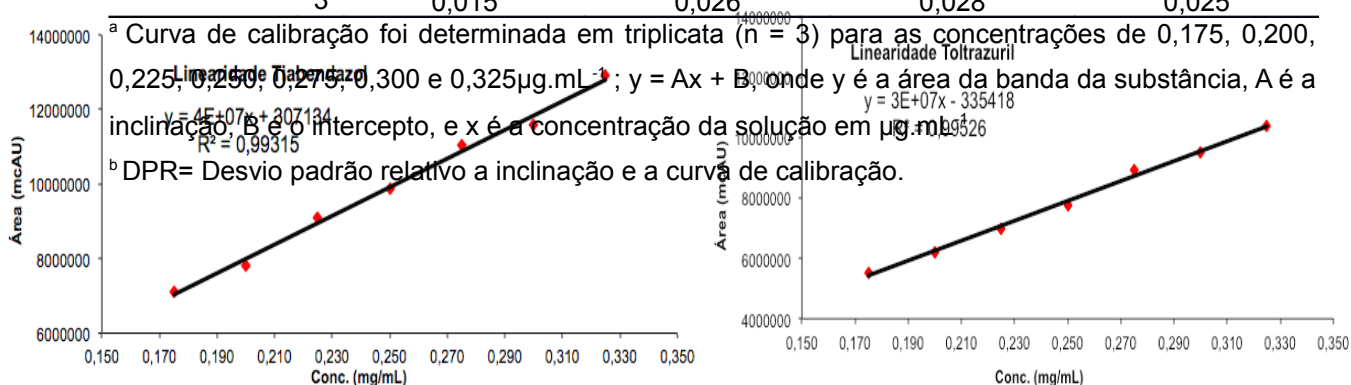
**Figura 8:** Cromatogramas obtidos para o teste de seletividade. (A) degradação neutra; (B) degradação ácida; (C) degradação básica; (D) degradação oxidativa (peróxido); (E) degradação por calor e (F) fotodegradação.

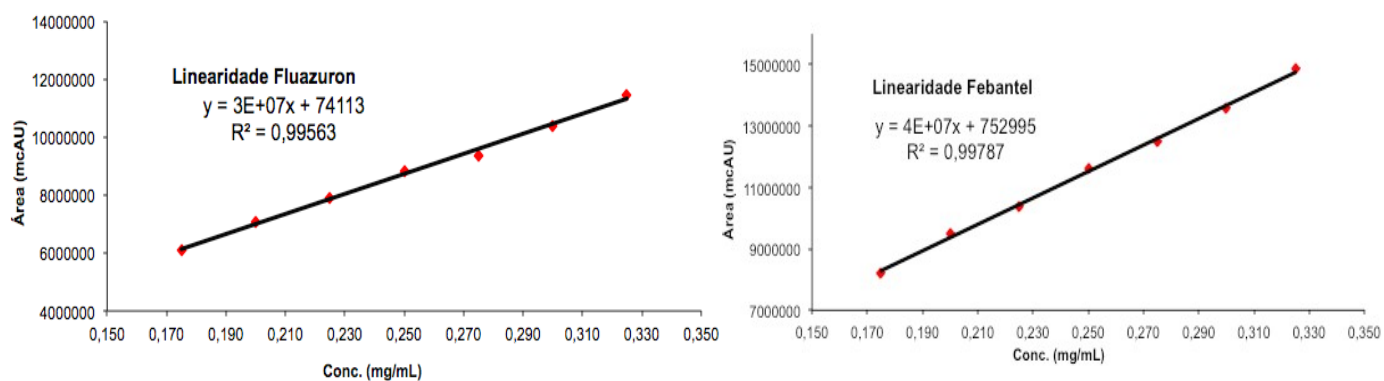


**Figura 9:** Cromatograma da solução placebo com degradação oxidativa submetido as mesmas condições da solução amostra.

**Tabela 12:** Linearidade e limite de detecção e quantificação do método de análise de tiabendazol, febantel, toltrazuril e fluazuron.

Parâmetros	D i a	Substância			
		Tiabendazol	Febantel	Toltrazuril	Fluazuron
Equação Linear <sup>a</sup>	1	$y = 4E+07x + 3760,1$	$y = 4E+07x + 457596$	$y = 3E+07x - 45695$	$y = 4E+07x - 69314$
	2	$y = 4E+07x + 121057$	$y = 5E+07x + 319716$	$y = 3E+07x - 274016$	$y = 4E+07x - 497772$
	3	$y = 4E+07x - 279336$	$y = 5E+07x + 220831$	$y = 3E+07x - 292226$	$y = 4E+07x - 388170$
Coeficiente de correlação (r)	1	0,9961	0,9964	0,9968	0,9974
	2	0,9966	0,9969	0,9956	0,9961
	3	0,9974	0,9962	0,9957	0,9976
Faixa, $\mu\text{g.mL}^{-1}$	1	0,175 - 0,325	0,175 - 0,325	0,175 - 0,325	0,175 - 0,325
	2	0,175 - 0,325	0,175 - 0,325	0,175 - 0,325	0,175 - 0,325
	3	0,175 - 0,325	0,175 - 0,325	0,175 - 0,325	0,175 - 0,325
DPR, % <sup>b</sup>	1	3,76	3,32	3,43	3,08
	2	3,53	3,42	3,97	2,07
	3	0,57	1,06	1,16	1,09
LD, $\mu\text{g.mL}^{-1}$	1	0,012	0,024	0,009	0,013
	2	0,014	0,016	0,028	0,014
	3	0,004	0,008	0,008	0,008
LQ, $\mu\text{g.mL}^{-1}$	1	0,039	0,079	0,032	0,045
	2	0,046	0,054	0,092	0,047
	3	0,015	0,026	0,028	0,025





**Figura 10:** Linearidade dos fármacos tiabendazol, febantel, toltrazuril e fluazuron.

#### 4.3.3 Limite de detecção e limite de quantificação

O limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) foram gerados utilizando os valores médios das três curvas padrão independentes. Os valores gerados no cálculo do LD e LQ estão demonstrados na tabela 12. A elevada sensibilidade da detecção do método desenvolvido para muitas substâncias químicas diminui a necessidade de se empregar grandes quantidades (volume ou massa) de amostra e de solventes orgânicos, normalmente exigidos na etapa de preparação das amostras, para que o analito alcance níveis de concentração suficientes para ser detectado e não afete a reprodutibilidade do sinal analítico e os resultados de análise.<sup>45</sup>

#### 4.3.4 Precisão e exatidão

A precisão e exatidão do método, foram avaliadas através do cálculo do DPR para três determinações de soluções de tiabendazol, febantel, toltrazuril e fluazuron em três concentrações (0,200, 0,250, e 0,300  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) realizadas em 3 dias sob as mesmas condições experimentais. Os valores de concentração esperados para os

valores da concentração analisada estão próximos dos valores especificados e o DPR abaixo de 5%, conforme descritos na RE nº 899, demonstrando que o método é preciso e exato dentro do intervalo desejado (tabela 13).<sup>37</sup>

Os métodos descritos em compêndios oficiais, não demonstram a possibilidade de determinação simultânea para quantificação dos fármacos em estudo, apenas métodos de quantificação individual. A análise simultânea possibilita rapidez, conseqüente baixo custo devido a redução no tempo dessas análises e avaliação de possíveis interferências geradas pela matriz, possibilitando ampliar as aplicações para uma diversidade de analitos que poderão ser aplicados em análise de rotina no controle de qualidade de medicamentos.<sup>35, 37</sup>

**Tabela 13:** Precisão e exatidão para o método de análise de tiabendazol, febantel, toltrazuril e fluazuron.

Parâmetros	Concentração Nominal - $\mu\text{g.mL}^{-1}$												
	Dia	Tiabendazol			Febantel			Toltrazuril			Fluazuron		
		0,20	0,30		0,20	0,30		0,20	0,30		0,20	0,25	
(n=3)	0	0,250	0	0	0,250	0	0	0,250	0	0	0	0,300	
Concentração analisada $\mu\text{g.mL}^{-1}$	1	0,19	0,29	0,20	0,253	0,29	0,20	0,29	0,20	0,29	0,20	0,25	
		9	7	1	9	9	1	9	1	9	2	1	0,300
	2	0,20	0,30	0,20	0,253	0,29	0,19	0,29	0,19	0,29	0,20	0,25	
		0	0	0	9	9	9	9	0,251	8	1	2	0,300
Precisão (DPR), %	3	0,20	0,30	0,19	0,249	0,30	0,20	0,30	0,20	0,30	0,20	0,24	
		0	3	9	0,249	4	0	0,249	6	1	8	0,304	
	1	1,72	1,01	1,85	1,849	0,99	2,07	1,10	1,46	1,32	1,049	1,049	
		7	4	8	1,849	1	5	1,667	1	2	7	1,049	
Exatidão, %	2	0,99	0,88	1,03	0,77	1,26	0,85	1,04	2,44	0,889	0,889		
		0	7	9	2,328	2	2	2,414	2	7	5	0,889	
	3	0,86	1,84	0,54	1,75	0,55	1,81	0,54	1,50	0,934	0,934		
		2	1,280	0	2	1,352	0	5	1,527	2	6	3	0,934
Exatidão, %	1	99,4	99,0	99,6	99,6	99,4	99,6	99,0	99,5	99,93	99,93		
		9	5	1	98,67	3	2	98,93	1	0	7	99,93	
	2	99,8	99,9	99,9	99,7	99,5	99,4	99,6	99,3	99,6	99,3		
		4	3	4	98,77	99,7	6	99,56	5	6	8	99,85	
Exatidão, %	3	99,7	98,9	99,3	98,7	99,7	98,1	99,5	99,4	99,5	99,4		
		5	2	6	99,64	7	5	99,71	3	6	0	98,51	

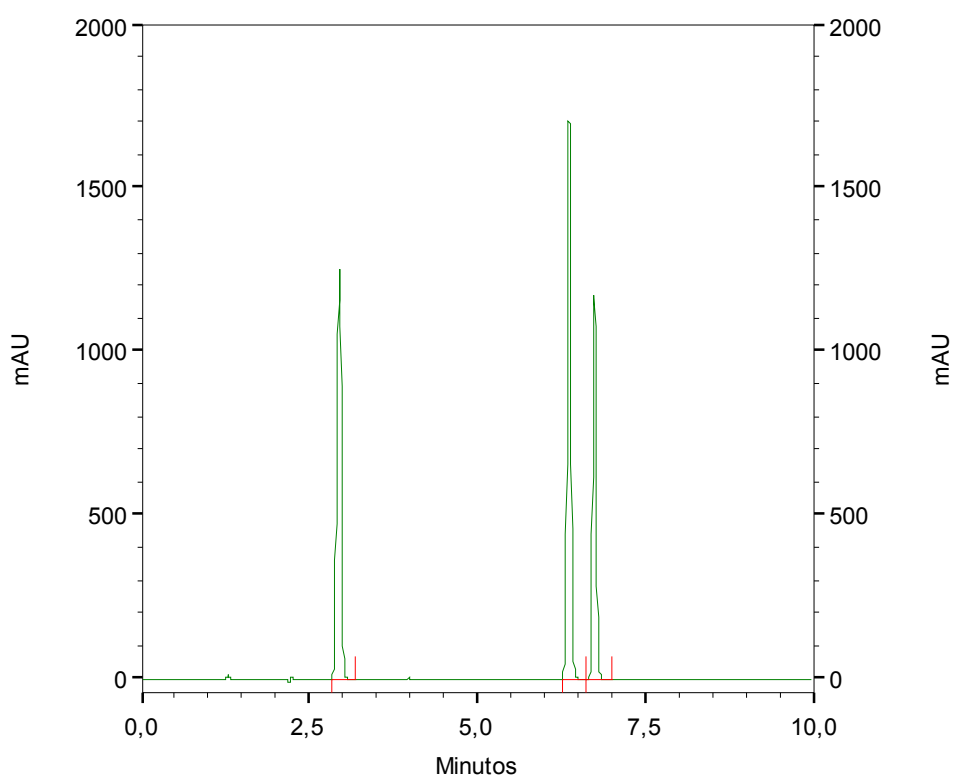
#### 4.3.5 Robustez

A robustez de um procedimento analítico é a medida da sua capacidade de permanecer inalterado por pequenas variações deliberadas dos parâmetros do método, fornecendo uma indicação da sua confiabilidade durante o uso normal.<sup>46</sup>

Para realização do ensaio de robustez, uma solução de trabalho contendo 0,250  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  de cada fármaco foram preparadas em triplicatas e analisadas na

condição otimizada e modificada do método. Sendo assim, os valores de áreas obtidos nas condições de mudança na proporção de fase móvel B (acetonitrila) e mudança na vazão da fase móvel foram comparados com aqueles obtidos na condição otimizada.<sup>35, 37</sup>

O ensaio de robustez indicou que redução na porcentagem da fase móvel B pode comprometer a exatidão dos resultados de fluazuron, uma vez que dentro do tempo de eluição a banda não eluiu e houve mudança nos tempos de eluição das outras bandas presentes cromatograma (figura 11). As modificações propostas na vazão da fase móvel não modificaram o tempo de eluição de cada banda em análise. Todas as modificações propostas e os resultados obtidos é importante salientar que não invalidam o método, mas sim determinam quais são os cuidados que o operador precisa ter durante a análise desses fármacos.<sup>47</sup>



**Figura 11:** Perfil cromatográfico das soluções padrão dos fármacos tiabendazol (a), febantel (b), toltrazuril (c) e fluazuron no teste de robustez.

#### 4.4 Estabilidade da solução no período de 24 horas

A estabilidade foi avaliada através da comparação das áreas das amostras recém-preparadas com aquelas obtidas após 2h, 4h, 8h, 12h, 16h e 24h do preparo.

Os resultados foram satisfatórios no estudo de estabilidade da solução padrão de tiabendazol, febantel, toltrazuril e fluazuron na concentração de 0,250  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  em intervalos de tempo diferentes durante 24 horas. A variação da porcentagem de área é de +/- 10% em relação ao valor estabelecido de 100% do teor para cada área dos fármacos, com isso a variação encontrada devem estar entre 90 e 110%.<sup>35, 37, 48</sup> Os valores encontrados estão na faixa de 97 a 103% e os DPR dos valores obtidos foram menores que 1%, sendo assim os dados obtidos nos experimentos provaram que as amostras utilizadas durante os ensaios foram estáveis até o período de 24 h conforme demonstrado na figura 12.

**Figura 12:** Estabilidade das amostras dos fármacos tiabendazol, febantel, toltrazuril e fluazuron no período de 24 horas.

#### 4.5 Aplicação do método em formulações farmacêuticas

A Tabela 14 apresenta as diferentes formas farmacêuticas avaliadas, concentrações recomendadas e os valores encontrados de teor, além do DPR. Analisando esses valores, observa-se que, com exceção da amostra de febantel manipulado 5mg/cápsula, as concentrações dos fármacos encontradas apresentam-se dentro do limite especificado que é de 90,0 a 110,0% para os métodos que empregam cromatografia líquida de alta eficiência.<sup>35, 37</sup> A tecnologia farmacêutica associada as boas práticas de manipulação adotada na produção dos medicamentos influenciam nos resultados de teor. Na amostra de febantel manipulado 5mg/cápsula, certamente os valores abaixo da especificação deve-se a inadequada boa prática de manipulação.

	0h	2h	4h	8h	12h	16h	24h	Média	DPR
Tiabendazol	100,00	98,05	99,72	98,28	97,48	98,95	99,43	98,28	0,95
Febantel	100,00	97,57	98,34	98,74	96,95	95,81	97,77	98,77	0,99
Toltrazuril	100,00	100,37	101,62	100,31	99,93	100,19	99,94	100,19	0,55
Fluazuron	100,00	100,24	101,65	99,88	101,28	100,52	102,53	100,52	0,92

**Tabela 14:** Determinação de método de análise para tiabendazol, febantel, toltrazuril e fluazuron em formulações farmacêuticas.

Amostra	Recomendação USP %	Teor, %	DPR, %
Tiabendazol 500mg/ comprimido	90,0 - 110,0	96,03	1,17
		94,45	
		94,37	
Tiabendazol pomada 50mg/g	90,0 - 110,0	95,04	0,20
		94,76	
		95,97	
Fluazuron 5mg/cápsula	90,0 - 110,0	95,12	0,65
		96,01	
		97,13	
Febantel 5mg/ comprimido	90,0 - 110,0	99,52	1,50
		97,42	
		98,39	
Febantel manipulado 5mg/cápsula	90,0 - 110,0	84,95	1,22
		86,45	
		88,38	
Toltrazuril manipulado suspensão 2,5%	90,0 - 110,0	96,44	1,05
		97,88	
		97,00	

## 5. CONCLUSÃO

Neste trabalho foi desenvolvido e validado um método por CLAE para a determinação simultânea de tiabendazol, febantel, toltrazuril e fluazuron em insumos farmacêuticos e suas formulações farmacêuticas veterinárias. O método desenvolvido provou ser adequado para determinação dos fármacos, uma vez que demonstrou ser seletivo, linear, preciso, exato, robusto e com indicativo de estabilidade, podendo desta forma ser utilizado em análises de rotina em controle de

qualidade. As principais vantagens observadas incluem a sensibilidade de detecção dos fármacos e a rapidez na análise das amostras, com uma eluição de 10 minutos, o que permite a análise de grande número de amostras num curto período de tempo. O estudo de robustez indicou, que modificações no método desenvolvido pode impedir a detecção do fluazuron, em função disso as condições do método não devem ser modificadas. Todos os analitos apresentaram boa estabilidade em solução quando avaliados no período de 24 horas. Quando doseados os fármacos nas formas farmacêuticas analisadas os valores de teor obtidos estavam dentro do especificado (90 a 110% do teor declarado para cada fármaco), exceto para Febantel manipulado 5mg/cápsula (concentração de febantel de 86,59%). Este resultado indica a necessidade de um melhor controle de qualidade desse produto, tendo em vista que baixas doses de febantel podem comprometer a sua eficácia enquanto que altas doses podem ser tóxicas para os animais. Desta forma, o método desenvolvido poderá ser implementado com segurança na rotina de controle de qualidade da indústria veterinária, sendo uma alternativa para análise desses fármacos. Por fim, com uma adequação e o desenvolvimento de uma técnica de preparo de amostra, o método pode ser estendido a outras matrizes mais complexas, como por exemplo, fluidos biológicos como plasma, soro, urina entre outros.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. PONTES, F. L. D.; PONTAROLO, R.; CAMPOS, F. R.; GASPARETTO, J. C.; CARDOSO, M. A.; PIANTAVINI, M. S.; TRINDADE, A. C. L. B. Development and validation of an HPLC-MS/MS method for simultaneous determination of ivermectin, febantel, praziquantel, pyrantel pamoate and related compounds in fixed dose combination for veterinary use. *Asian Journal of pharmaceutical and clinical research*. *Asian J. Pharm. Clin. Res.*, v. 6, p.191-200, 2013.
2. BOWMAN, D. D. **Georgis parasitologia veterinária**. 9ª Ed. Rio de Janeiro: Editora Elsevier, 2010.
3. PRIETSCH, R. F.; PEREIRA, R. A.; BRAUNER, C. C.; RABASSA, V. R.; CORRÊA, M. N.; DEL PINO, F. B. Formas farmacêuticas de liberação modificada utilizadas em ruminantes: uma revisão. *Science and animal health*. **2**, 3-26, 2014.
4. SILVA, E. P.; SOUZA, J. R.; CALDAS, E. D. Resíduos de medicamentos veterinários em leite e ovos. *Química nova*. **37**, 2014.
5. SPINOSA, H. S.; GERNIAK, S. L.; BERNARDI, M. M. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. 5ª Ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2011.
6. FOREYT, W. J. **Parasitologia veterinária: manual de referência**. 5ª Ed. São Paulo: Editora Roca, 2005.
7. REY, L. **Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem e nos trópicos ocidentais**. 4ª Ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2011.
8. NEVES, D. P.; MELO, A. L.; GENARO, O.; LINARDI, P. M. **Parasitologia humana**. 12ª Ed. Rio de Janeiro: Editora Atheneu, 2011.

9. MAPA, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/animal>. Acesso em: 23 de maio de 2015.
10. ADAMS, H. R. **Farmacologia e terapêutica em veterinária**. 8ª Ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2003.
11. WEBSTER, C. R. L. **Farmacologia clinica em medicina veterinária**. 1ª Ed. São Paulo: Editora Roca, 2005.
12. FDA, Food and Drug Administration. Disponível em: <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/animaldrugsatfda/details.cfm?dn=133-%20953>>. Acesso em: 23 de maio de 2015.
13. EUROPEAN, Pharmacopoeia. 8ª Ed. Strasbourg: Council of Europe, 2013.
14. USP. The United States Pharmacopoeia. 38ª Ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2015.
15. MOLONEY, M., CLARKE, L., O'MAHONY, J., GADAJ, A., O'KENNEDY, R., DANAHER, M. Determination of 20 coccidiostats in egg and avian muscle tissue using ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1253 (2012) 94–104.
16. OLSEN, J., BJORKLUND, E., KROGH, K. A., HANSEN, M. Development of an analytical methodology for the determination of the antiparasitic drug toltrazuril and its two metabolites in surface water, soil an. *Analytica Chimica Acta*, 755 (2012) 69–76.
17. WILLIAMS, M. **The Merck index: an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals**. 14ª Ed. Whitehouse Station, NJ: Merck, 2006.
18. KANG, J., FAN, C.L., CHANG, Q.Y., BU, M.N., ZHAO, Z.Y., WANG, W., PANG, G.F. Simultaneous determination of multi-class veterinary drug residues in different

muscle tissues by modified QuEChERS combined with HPLC-MS/MS. RSC Advanced 6, 6285-6293, 2014.

19. BRASIL. **Farmacopeia brasileira**. 5ª Ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2010.

20. GOMES, F. P., GARCIA, P. L. Development and validation of a simple and sensitive high performance liquid chromatographic method for the simultaneous determination of anastrozole, bicalutamide, tamoxifen, and their syntetic impurities. Talanta, **101**, 495-503, 2012.

21. BIALECKA, W.; KULIK, A. Determination of active substances in multicomponent veterinary preparations of antiparasitic action by HPLC method. Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research, v. 67, n. 5, p. 463-468, 2010.

22. COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Introdução a Métodos Cromatográficos**. 7ª Ed. Campinas: Editora da Unicamp, 1997.

23. HARRIS, Daniel C. **Análise Química Quantitativa**. 5ª Ed. Rio de Janeiro: LTC Editora, 2001.

24. SKOOG, A. D. ; WEST, D. M. ; HOLLER, F. J.. **Fundamentos de Química Analítica**. 8ª Ed. São Paulo: Cengage Learning, 2008.

25. SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Princípios de análise instrumental**. 5ª Ed. Porto Alegre: Bookman, 2002.

26. MALDANER, L.; JARDIM, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia líquida de ultra eficiência. Química Nova, v. 32, n. 01, p.214-222, 2009.

27. BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Decreto-lei n. 467, de 13 de fevereiro de 1969. Dispõe sobre a fiscalização de produtos de uso veterinário, dos estabelecimentos que os fabricam e dá outras providências. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 14 fev. 1969. Disponível

em:<[http://www.rr-americas.oie.int/in/proyectos/Camevet/Normas\\_paises/Normativas%20Paises/Brasil/DECR0467.htm](http://www.rr-americas.oie.int/in/proyectos/Camevet/Normas_paises/Normativas%20Paises/Brasil/DECR0467.htm) >. Acesso em: 29 de maio de 2015.

28. BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Lei n. 12.689, de 19 de julho de 2012. Altera o Decreto-Lei nº 467, de 13 de fevereiro de 1969, para estabelecer o medicamento genérico de uso veterinário; e dispõe sobre o registro, a aquisição pelo poder público, a prescrição, a fabricação, o regime econômico-fiscal, a distribuição e a dispensação de medicamentos genéricos de uso veterinário, bem como sobre a promoção de programas de desenvolvimento técnico-científico e de incentivo à cooperação técnica para aferição da qualidade e da eficácia de produtos farmacêuticos de uso veterinário. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 20 jul. 2012. Disponível em: <[http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/\\_Ato2011-2014/2012/Lei/L12689.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2011-2014/2012/Lei/L12689.htm)>. Acesso em: 29 de maio de 2015.

29. BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n. 13, de 03 de outubro de 2003. Aprova o Regulamento de Boas Práticas de Uso Veterinário e o Glossário. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 06 out. 2003. Disponível em: <<http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=visualizarAtoPortalMapa&chave=830709255>>. Acesso em: 29 de maio de 2015.

30. BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Decreto n. 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 República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 24 abr. 2004. Disponível em: <<http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=visualizarAtoPortalMapa&chave=416587280>>. Acesso em: 29 de maio de 2015.

31. BRASIL. Conselho Federal de Farmácia. Resolução n. 504, de 29 de maio de 2009. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 13 jul. 2009. Disponível em: <<http://www.cff.org.br/userfiles/file/resolucoes/504.pdf>>. Acesso em: 29 de maio de 2015.

32. PINTO, M. C. Desenvolvimento e validação de um método analítico para quantificação de nimesulida no plasma humano utilizando cromatografia líquida de alta eficiência. Bragança Paulista - SP, 2009. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade São Francisco – USF.

33. WHO-World Health Organization Expert Committee on Specifications for Pharmaceutical Preparations. *Thirty-second report*, WHO Technical Report Series, n.823, Geneva, 1992.

34. CODEX Alimentarius Commission on Methods of Analysis and Sampling. *Criteria for Evaluating Acceptable Methods of Analysis for Codex Purposes*, CX/MAS 95/3, 1995.

35. ICH, International Conference on Harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use. Guideline on validation of analytical procedure: methodology, 1996.

36. GUIDO, R. V. C.; ANDRICOPULO, A. D.; OLIVA, G. Planejamento de fármacos, biotecnologia e química medicinal: aplicações em doenças infecciosas. Revista Estudos Avançados. São Paulo, v. 24, n. 70, p. 81-98, 2010.

37. ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RE n. 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Brasília: Diário Oficial da União, 2003.

38. SHAH, V. P. et al. Bionalytical method validation – A revisit with a decade of progress. *Pharmaceutical Research*, v. 17, n.12, p. 1551-1557, 2000.

39. VESSMAN, J. Selectivity or specificity? Validation of analytical methods from the perspective of an analytical chemist in the pharmaceutical industry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 14, n. 8-10, p.867-869, 1996.

40. INMETRO. DQO–CGCRE–008: orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos. Disponível em:  
<[http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8\\_02.pdf](http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8_02.pdf)>  
Acesso em: 29 de maio de 2015.

41. ICH, Harmonised Tripartite Guideline, Q2 (R1), Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, 2005.

42. MAXIMIANO, F. P.; COSTA, G. H. Y.; SOUZA, J.; FILHO, M. S. S. Caracterização físico-química do fármaco antichagásico benznidazol. *Química nova*. v. 33, 2010.

43. ABDELWAHAB, N.S., ABDEIRAHMAN, M.M. Stability indicating RP-HPLC method for the determination of flubendazole in pharmaceutical dosage forms. *RSC Advanced*, **5**, 10927-10935, 2015.

44. HAVLIKOVA, L.; BRABCOVA, I.; SATINSKY, D.; MATYSOVA, J.; LUSKACOVA, A.; OSICKA, Z.; SOLICH, P. Optimisation of an HPLC method for the simultaneous determination of pyrantel pamoate, praziquantel, fenbendazole, oxfendazole and butylhydroxyanisole using a phenyl stationary phase. *Analytical methods*, **4**, 1592-1597, 2012.

45. SANTOS, W. T. P.; AZEVEDO, E. F., RICCHTER, E. M., ALBUQUERQUE, Y. D. T. Construção e caracterização de um detector eletroquímico para análise em fluxo. *Química nova*. v. 32, n. 9, 2412-2416, 2009.

46. BRANCACCIO, A.; MARESCA, P.; ALBRIZIO, S.; FATTORE, M.; COZZOLINO, M.; SECCIA, S. Development and validation of a diode array high performance liquid chromatography method to determine seized street cocaine sample purity. *RSC Advanced* **5**, 2584-2590, 2013.

47. DEJAEGHER, B.; HEYDEN, Y. V. Ruggedness and robustness testing. *Journal of Chromatography A* 1158, 138–157, 2007.

48. SILVA, K. E. R.; ALVES, L. D. S.; SOARES, M. F. R.; PASSOS, R. C. S.; FARIA, A. R.; ROLIM, P. J. Modelos de avaliação da estabilidade de fármacos e medicamentos para a indústria farmacêutica. *Revista de ciências farmacêuticas básica e aplicada*. v. 30, n.2, p. 129-135, 2009.