



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE GOIÁS
UNIDADE UNIVERSITÁRIA DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTU SENSU* EM CIÊNCIAS
MOLECULARES



JHENTHUELLE FERNANDES GARCIA FERREIRA

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA A
DETERMINAÇÃO DE MEBENDAZOL EM FORMAS FARMACÊUTICAS POR
CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA E ESTUDO DE
ESTABILIDADE**

ANÁPOLIS – GO
2015

JHENTHUELLE FERNANDES GARCIA FERREIRA

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE
METODOLOGIA ANALÍTICA PARA A
DETERMINAÇÃO DE MEBENDAZOL EM
FORMAS FARMACÊUTICAS POR
CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA DE ALTA
EFICIÊNCIA E ESTUDO DE ESTABILIDADE**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação *Stricto sensu* em Ciências Moleculares da Universidade Estadual de Goiás como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Moleculares.

Área de concentração: Química Orgânica;

Orientador: Gilberto Benedito Lúcio de Aquino;

Co-orientadora: Giuliana Vila Verde.

ANÁPOLIS – GO
2015

Ferreira, Jhenthuelle Fernandes Garcia.

Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para a determinação de Mebendazol em formas farmacêuticas por cromatografia líquida de alta eficiência e estudo de estabilidade – 2015.

134 folhas. fig., tab.

Orientador: Dr. Gilberto Benedito Lúcio de Aquino
Co-orientadora: Dr^a. Giuliana Vila Verde.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Goiás, 2015.


1. Validação. 2. Mebendazol. 3. Estabilidade. I. Título.

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA A
DETERMINAÇÃO DE MEBENDÁZOL EM FORMAS FARMACÊUTICAS POR
CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA E ESTUDO DE
ESTABILIDADE

JHENTHUELLE FERNANDES GARCIA FERREIRA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Moleculares do Câmpus Anápolis de Ciências Exatas e Tecnológicas – Henrique Santillo, da Universidade Estadual de Goiás, apresentada como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Mestra em Ciências Moleculares.

Aprovada em 24/06/2015 por:



Profa. Dra. Giuliana Muniz Vila Verde Safadi (UEG)



Profa. Dra. Máisa Borges Costa (UEG)



Profa. Dra. Érika Crispim Resende (IFG)

ANÁPOLIS – GO
JUNHO 2015

*Ao meu amado esposo Ronnie
Peterson, a minha filha Júlia, a
minha mãe Berenice e aos meus
irmãos Jonhlesley e Jhenning.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelas oportunidades que tem me dado.

A minha mãe pelo amor e contínuo incentivo ao estudo.

Ao meu esposo pelo apoio e motivação.

A minha filha que faz parte da minha vida e que inconscientemente é a motivadora da continuidade dos meus estudos.

Aos meus irmãos por estarem sempre presentes.

Ao meu orientador Dr^o. Gilberto Lúcio Benedito de Aquino, pela orientação e por ser exemplo profissional e humano.

A professora Giuliana Vila Verde, por ser fonte de inspiração de mulher e profissional.

A Universidade Estadual de Goiás (UEG) em sua Unidade Universitária de Ciência Exatas e Tecnológicas (UnUCET) pelo programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Ciências Moleculares.

Aos meus gestores Fábio, Elvis, Cleber e Eduardo, por terem possibilitado a realização deste trabalho de pesquisa.

A minha cunhada Hailla Fernanda, pelo apoio.

RESUMO

O desenvolvimento e validação de metodologia analítica indicativa de estabilidade é um item imprescindível para o registro e comercialização de produtos farmacêuticos. O mebendazol, anti-helmíntico pertencente aos grupos dos benzimidazóis, atua impedindo a absorção de glicose pelos vermes, diminuindo assim seu tempo de sobrevivência e reprodução. Nos medicamentos, os fatores climáticos são de grande relevância na estabilidade, pois esta depende de fatores ambientais e de fatores relacionados ao próprio produto. Os métodos analíticos empregados nas análises de estabilidade devem estar validados e ser indicativos de estabilidade. Estes métodos devem ser sensíveis para avaliar a presença ou a formação qualitativa e quantitativa de produtos e/ou subprodutos de degradação. Foi desenvolvido e validado uma metodologia para análises de estudo de estabilidade em formas farmacêuticas para o mebendazol comprimidos 100 mg e 500 mg e suspensão oral 20 mg / mL, utilizando fase móvel solução aquosa volátil pH 2,1 e acetonitrila e coluna cromatográfica C18. As situações estressantes empregadas para o estresse e verificação dos degradantes foram oxidação, hidrólise ácida e básica, luz e umidade. A metodologia analítica desenvolvida foi submetida às análises de validação e os resultados obtidos demonstraram que a técnica analítica proposta é seletiva, linear na faixa estudada (0,2 - 130%), sensível, exata e robusta para quantificação de mebendazol nas formas farmacêuticas estudadas, frente a pequenas alterações no fluxo da fase móvel, temperatura da coluna cromatográfica, lotes e tipos de coluna, pH e composição da fase móvel e marca da membrana filtrante. Desta forma, foi possível o desenvolvimento e a validação de uma única metodologia para o estudo de estabilidade em mebendazol comprimidos e suspensão oral, 100 e 500 mg por comprimido e 20 mg / mL, respectivamente. Foram obtidos resultados de aproximadamente 7000 pratos teóricos, desvio padrão relativo de 0,1% na adequabilidade, linearidade com coeficiente de correlação linear aproximadamente 1, fator de simetria de aproximadamente 1,1. A degradação com formação maior número de degradantes ocorreu em meio oxidativo, porém com maior intensidade de degradação em meio básico. Nas análises de robustez, não foram observadas variações excedentes a 2% em relação a condição inicial do método, frente variações de fluxo em $\pm 0,1$ mL/min, na temperatura do compartimento das amostras em $\pm 5^{\circ}\text{C}$, pH da fase aquosa em $\pm 0,1$, proporção de fase móvel 80:20 (77:23 e 83:17). A utilização de uma única metodologia foi extremamente útil para analisar o comportamento do mebendazol frente às diferentes matrizes do medicamento. Isso possibilitou melhor avaliação dos resultados obtidos dos produtos de degradação frente as condições estressantes, o que poderá ser utilizado para fins de melhoria no produto final.

Palavras chave: Validação. Mebendazol. Estabilidade.

ABSTRACT

The development and validation of analytical methodology indicative of stability is an essential item for the registration and marketing of pharmaceuticals. Mebendazole, an anthelmintic belonging to the group of benzimidazole that acts to inhibit glucose uptake by the worms, thus reducing their time of survival and reproduction. In drugs, climatic factors are very important in the stability because this depends on environmental factors and factors related to the product itself. The analytical methods used in stability analyzes should be validated and be indicative of stability. These methods should be sensitive to the presence or to assess qualitative and quantitative formation of products and / or degradation products. It was developed and validated a methodology for the study of stability analyzes in pharmaceutical forms for mebendazole tablets 100 mg and 500 mg oral suspension and 20 mg / mL using mobile phase volatile aqueous solution pH 2.1 and acetonitrile (80:20) and C18 chromatographic column. Stressful situations used for stress and verification of degrading were oxidation, acid and base hydrolysis, light and moisture. The analytical methodology was developed subjected to validation tests and the results obtained demonstrated that the analytical technique is proposed selective, linear over the range studied (0.2 to 130%), sensitive, accurate, and robust for quantification of mebendazole in pharmaceutical forms studied, against small changes in the flow of mobile phase, temperature of the chromatographic column, batch and column types, pH and composition of the mobile phase and marks the filter membrane. Thus, it was possible to develop and validate a unique methodology for the study of stability in tablets and oral suspension mebendazole, 100 and 500 mg per tablet and 20 mg / mL, respectively. Results were obtained from about 7000 theoretical plates, relative standard deviation of 0.1% in suitability, linearity with correlation coefficient approximately 1, symmetry factor of approximately 1.1. Degradation with greater number of training degrading occurred in an oxid environment, but with greater intensity degradation in basic medium. In the robustness analysis , there were no variations exceeding 2 % in relation to the condition indicial method front flow variations in ± 0.1 mL / min, the temperature of the sample compartment within ± 5 °C, pH of the aqueous phase within ± 0.1 , mobile phase ratio of 80:20 (77:23 and 83:17). The use of a single method was extremely useful for analyzing the behavior of mebendazole across the different matrices of the drug. This allowed a better evaluation of the results of degradation products front of the stressful conditions which can be used for the purpose of improving the final product.

Keywords: Validation. Mebendazole. Stability.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estruturas químicas do albendazol (A), mebendazol (B), levamidazol (C), pamoato de pirantel (D) e ivermectina (E).....	10
Figura 2 – Estrutura molecular do mebendazol em 2D	13
Figura 3 – Estrutura molecular do mebendazol em 3D	14
Figura 4 - Estrutura molecular da benzofenona	15
Figura 5 - 2-amino-5-benzoilimidazol	20
Figura 6 - Principais metabólitos do mebendazol.....	21
Figura 7 - Fotodegradação dos Benzimidazóis	21
Figura 8 - Cromatogramas das análises cromatográficas após definição do método de análise.....	52
Figura 9 - Cromatogramas dos placebos e amostras dos comprimidos de mebendazol nas concentrações de 100 mg e 500 mg.....	53
Figura 10 - Cromatogramas das varreduras espectrais realizadas entre 200 e 400 nm das amostras demonstradas na figura 8.	54
Figura 11 - Cromatogramas das varreduras espectrais realizadas entre 200 e 400 nm das amostras demonstradas na figura 9	55
Figura 1 A - Cromatogramas das análises de estresse por aquecimento à 60°C por 24 horas	99
Figura 2 A - Cromatogramas na condição de hidrólise ácida com temperatura à 60°C por 24 horas.	100
Figura 3 A - Cromatogramas na condição de hidrólise alcalina com temperatura à 60°C por 20 minutos.....	101
Figura 4 A - Cromatogramas na condição de oxidação com temperatura à 60°C por 4 horas	102
Figura 5 A - Cromatogramas na condição de fotólise por 24 horas.	103
Figura 6 A - Cromatogramas na condição de umidade por 24 horas.....	104
Figura 7 A - Varredura realizada por detector PDA na condição de aquecimento a 60°C por 24 horas.	105
Figura 8 A - Varredura realizada por detector PDA na condição de hidrólise ácida com temperatura à 60°C por 24 horas.	106

Figura 9 A - Varredura realizada por detector PDA na condição de hidrólise alcalina com temperatura à 60°C por 20 minutos.....	107
Figura 10 A - Varredura realizada por detector PDA na condição de oxidação com temperatura à 60°C por 4 horas.....	108
Figura 11 A - Varredura realizada por detector PDA na condição de fotólise por 24 horas.....	109
Figura 12 A - Varredura realizada por detector PDA na condição de umidade por 24 horas.....	110
Figura 13 A - Cromatogramas na condição de estresse por aquecimento à 60°C por 24 horas.....	111
Figura 14 A - Cromatogramas na condição de hidrólise ácida com temperatura à 60°C por 24 horas.....	112
Figura 15 A - Cromatogramas na condição de hidrólise alcalina com temperatura à 60°C por 20 minutos.....	113
Figura 16 A - Cromatogramas na condição de oxidação com temperatura à 60°C por 4 horas.....	114
Figura 17 A - Cromatogramas na condição fotolítica com temperatura à 60°C por 24 horas.....	115
Figura 18 A - Cromatogramas na condição de umidade por 24 horas.....	116
Figura 19 A - Varredura realizada por detector detector PDA na condição de estresse por aquecimento a 60°C por 24 horas.....	117
Figura 20 A - Varredura realizada por detector detector PDA na condição de hidrólise ácida com temperatura à 60°C por 24 horas.....	118
Figura 21 A - Varredura realizada por detector detector PDA na condição de hidrólise alcalina com temperatura à 60°C por 20 minutos.....	119
Figura 22 A - Varredura realizada por detector PDA na condição de oxidação com temperatura à 60°C por 4 horas.....	120
Figura 23 A - Varredura realizada por detector PDA na condição de fotólise por 24 horas.....	121
Figura 24 A - Varredura realizada por detector PDA na condição de umidade à 60°C por 24 horas.....	122
Figura 25 A - Cromatogramas na condição estressante por aquecimento a 60°C por 24 horas.....	123

Figura 26 A - Cromatogramas na condição de hidrólise ácida com temperatura à 60°C por 24 horas	124
Figura 27 A - Cromatogramas na condição de hidrólise alcalina com temperatura à 60°C por 20 minutos.....	125
Figura 28 A -. Cromatogramas na condição de oxidação com temperatura à 60°C por 4 horas.	126
Figura 29 A - Cromatogramas na condição fotolítica com temperatura à 60°C por 24 horas	127
Figura 30 A - Cromatogramas na condição de umidade por 24 horas.....	128
Figura 31 A - Varredura realizada por detector PDA na condição normal com temperatura a 60°C por 24 horas.....	129
Figura 32 A - Varredura realizada por detector PDA na condição de hidrólise ácida com temperatura à 60°C por 24 horas	130
Figura 33 A - Varredura realizada por detector PDA na condição de hidrólise alcalina com temperatura à 60°C por 20 minutos.....	131
Figura 34 A - Varredura realizada por detector PDA na condição de oxidação com temperatura à 60°C por 4 horas.....	132
Figura 35 A - Varredura realizada por detector PDA na condição de fotólise por 24 horas	133
Figura 36 A - Varredura realizada por detector PDA na condição de umidade a 60°C por 24 horas.....	134

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Robustez – estabilidade das soluções analíticas (% horas) – Padrão e Mebendazol Suspensão Oral 20mg/mL	59
Gráfico 2 - Robustez – estabilidade das soluções analíticas (% horas) – Padrão e Mebendazol 100mg/cp	59
Gráfico 3 - Robustez – estabilidade das soluções analíticas (% horas) – Padrão e Mebendazol Suspensão Oral 500 mg/cp	60
Gráfico 4 – Equação da reta obtida pela regressão linear – Nível de Impureza.....	61
Gráfico 5 – Equação da reta obtida pela regressão linear – Nível de Teor	61
Gráfico 6 – Demonstrativo dos valores de recuperação de Mebendazol suspensão 20 mg/mL	63
Gráfico 7 - Demonstrativo dos valores de recuperação de Mebendazol 100 mg/cp	63
Gráfico 8 - Demonstrativo dos valores de recuperação de Mebendazol 500 mg/cp	64
Gráfico 9 – Resultados obtidos com a curva 1 no nível de impurezas	66
Gráfico 10 – Resultados obtidos com a curva 2 no nível de impurezas	67
Gráfico 11 – Resultados obtidos com a curva 3 no nível de impurezas	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –Eficácia de drogas no tratamento contra helmintos transmitidos pelo solo em doses únicas ou múltiplas	11
Tabela 2 - Propriedades preditas do Mebendazol.....	14
Tabela 3 - Limites de Quantificação para produtos de degradação	20
Tabela 4 - Classificação dos testes segundo a finalidade.....	23
Tabela 5 – Classificação em categorias.....	24
Tabela 6 - Faixas recomendadas para o teste de linearidade em preparações farmacêuticas.....	26
Tabela 7 - Fatores que devem ser considerados na determinação da robustez do método analítico	30
Tabela 8 - Reagentes usados e os respectivos fabricantes	33
Tabela 9 - Condições de estresse utilizadas nos testes de degradação.....	39
Tabela 10 - Diluições propostas para o teste de Linearidade Nível de Impureza	40
Tabela 11 - Diluições propostas para o teste de Linearidade Nível de Teor	41
Tabela 12 - Variação dos parâmetros empregados na análise de robustez	45
Tabela 13 - Demonstrativo de degradação provocado pelo estresse das soluções padrão, amostras de comprimidos 100mg e 500mg e Suspensão 20 mg/mL.....	56
Tabela 14 - Demonstrativo de degradação provocado pelo estresse das soluções padrão, amostras de comprimidos 100mg e 500mg e Suspensão 20 mg/mL.....	58
Tabela 15 - Resultados de precisão intermediária	62
Tabela 1 A - Resultados de adequação do sistema	78
Tabela 2 A - Resultados de especificidade / seletividade – Mebendazol	78
Tabela 3 A - Demonstrativo de degradação provocado pelo estresse do padrão....	79
Tabela 4 A - Demonstrativo de degradação provocado pelo estresse da amostra - Mebendazol suspensão oral 20 mg/mL.....	79
Tabela 5 A - Descritivo de picos cromatográficos no padrão e na amostra (Mebendazol suspensão oral 20 mg/mL)	80
Tabela 6 A - Demonstrativo de degradação provocado pelo estresse da amostra de Mebendazol comprimido 100 mg	80

Tabela 7 A - Descritivo de picos cromatográficos no padrão e na amostra (Mebendazol 100mg/cp).....	81
Tabela 8 A - Demonstrativo de degradação provocado pelo estresse da amostra – Mebendazol 500mg/cp.....	81
Tabela 9 A - Descritivo de picos cromatográficos no padrão e na amostra (Mebendazol 500mg/cp).....	81
Tabela 10 A - Descritivo de picos cromatográficos no padrão e na amostra (Mebendazol suspensão oral 20 mg/mL)	82
Tabela 11 A - Descritivo de picos cromatográficos no padrão e na amostra (Mebendazol 100mg/cp).....	83
Tabela 12 A - Descritivo resultante de picos cromatográficos no padrão e nas amostras de Mebendazol suspensão oral 20 mg/mL100mg/cp e 500mg/cp.....	83
Tabela 13 A - Robustez - estabilidade das soluções analíticas: Padrão e Mebendazol suspensão oral 20mg/mL	84
Tabela 14 A - Robustez - estabilidade das soluções analíticas – Padrão e Amostra de Mebendazol 100mg/cp	84
Tabela 15 A - Robustez - estabilidade das soluções analíticas – Padrão e Amostra de Mebendazol 500mg/cp	84
Tabela 16 A - Demonstrativo das áreas obtidas nos diferentes níveis de concentração para o teste de linearidade - Nível de Impureza	85
Tabela 17 A - Regressão linear dos dados da linearidade - Nível de Impureza.....	85
Tabela 18 A - Demonstrativo das áreas obtidas nos diferentes níveis de concentração para o teste de linearidade - Nível de Teor.....	86
Tabela 19 A - Regressão linear dos dados da linearidade - Nível de Teor	87
Tabela 21 A - Resultados de precisão repetibilidade – Mebendazol suspensão 20 mg/mL (2° dia – Analista 2).....	88
Tabela 22 A - Resultados de precisão intermediária – Mebendazol suspensão 20 mg/mL	88
Tabela 23 A - Resultados de precisão repetibilidade – Mebendazol 100mg/cp (1° dia – Analista 1)	89
Tabela 24 A -. Resultados de precisão repetibilidade – Mebendazol 100 mg/cp (2° dia – Analista 2).....	89
Tabela 25 A - Resultados de precisão intermediária – Mebendazol 100mg/cp.....	90

Tabela 26 A - Resultados de precisão repetibilidade – Mebendazol 500mg/cp (1° dia – Analista 1)	90
Tabela 27 A - Resultados de precisão repetibilidade - Mebendazol 500mg/cp (2° dia – Analista 2)	91
Tabela 28 A - Resultados de precisão intermediária - Mebendazol 500mg/cp	91
Tabela 29 A - Exatidão (Grau de Recuperação) – Mebendazol suspensão 20 mg/mL	92
Tabela 30 A - Exatidão (Grau de Recuperação) – Mebendazol 100 mg/cp	92
Tabela 31 A - Exatidão (Grau de Recuperação) – Mebendazol 500 mg/cp	93
Tabela 32 A – Robustez - Variação do fluxo da fase móvel.....	93
Tabela 33 A – Robustez - Resultados da variação da temperatura da coluna.....	94
Tabela 34 A – Robustez - Resultados da variação de diferentes lotes de colunas..	95
Tabela 35 A - Colunas representadas na Tabela 34 A.....	95
Tabela 36 A – Robustez - Resultados da variação no pH da fase móvel.....	96
Tabela 37 A – Robustez - Resultados da variação na composição da fase móvel ..	97
Tabela 38 A – Robustez - Resultados da variação na marca da membrana 0,45µm	98
Tabela 39 A - Resultados obtidos no Limite de Detecção / Quantificação	98

LISTA DE SIGLAS

ABAR : Associação Brasileira das Agências de Regulação;

ANVISA : Agência Nacional de Vigilância Sanitária;

CLAE : Cromatografia Líquida de Alta Eficiência;

CMD : concentração média determinada;

CV : Coeficiente de variação;

DPR: Desvio Padrão Relativo;

FDA : *Food and Drug Administration*;

FE : Fase Estacionária;

FM : Fase Móvel;

ICH : *International Conference on Harmonization*;

IFA : Insumo farmacêutico ativo;

ITD : Ingestão Total Diária;

IUPAC: *International Union of Pure and Applied Chemistry*;

LD : Limite de Detecção;

LQ : Limite de Quantificação;

PA : *Purity Angle*;

PDA : *Photo Diode Array*;

N : Número de pratos teóricos;

TH : *Threshold angle*;

TR: Tempo de retenção;

TRR: Tempo de retenção relativo;

USP : *United States Pharmacopeia*;

WHO : *World Health Organization*.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1 INFECÇÕES PARASITÁRIAS E HELMINTÍASES	4
2.1.1 Infecções por nematóides	8
2.1.1.1 <i>Ascaris lumbricoides</i>	9
2.2 FÁRMACOS ANTI-HELMÍNTICOS	9
2.2.1 Mebendazol	12
2.2.1.1 Polimorfismo	16
2.3 ESTABILIDADE DE FÁRMACOS E MEDICAMENTOS	17
2.4 VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA	22
2.4.1 Parâmetros para a validação	24
2.4.1.1 Especificidade	24
2.4.1.2 Linearidade	25
2.4.1.3 Limites de Detecção (LD) e de Quantificação (LQ)	26
2.4.1.4 Precisão e Exatidão	27
2.4.1.5 Estabilidade de Solução	28
2.4.1.6 Robustez	29
3 OBJETIVOS	31
3.1 OBJETIVO GERAL	31
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
4 MATERIAIS E MÉTODOS	32
4.1 AMOSTRA TESTE E PLACEBO	32
4.2 REAGENTES	32
4.3 EQUIPAMENTOS	33

4.4 CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS	34
4.4.1 Preparo da solução aquosa pH 2,1	34
4.5 PREPARO DAS AMOSTRAS E SOLUÇÕES.....	34
4.5.1 Preparo das soluções	34
4.5.1.1 Preparo da solução para diluição.....	34
4.5.2 Preparo das amostras.....	35
4.5.2.1 Preparo das amostras para teor	35
4.5.2.1.1 Preparo do padrão.....	35
4.5.2.1.2 Preparo da amostra de Mebendazol comprimidos 100 mg e 500 mg	35
4.5.2.1.3 Preparo das amostras de placebo de Mebendazol comprimido 100 mg e 500 mg.....	36
4.5.2.1.4 Preparo da amostra de Mebendazol Suspensão Oral 20 mg/mL	36
4.5.2.1.5 Preparo da amostra de Placebo de Mebendazol 20 mg/mL.....	36
4.5.2.1.6 Preparo da solução diluente	36
4.5.2.2 Preparo das amostras para teste de estresse	37
4.5.2.2.1 Preparo do Padrão	37
4.5.2.2.2 Preparo das Amostras de Mebendazol Comprimido 100 mg e 500 mg	37
4.5.2.2.3 Preparo da Amostra de Placebo de Mebendazol Comprimido 100 mg	37
4.5.2.2.4 Preparo da Amostra de Mebendazol Solução Oral 20 mg/mL..	38
4.5.2.2.5 Preparo da Amostra de Placebo de Mebendazol Solução Oral 20 mg/mL	38
4.5.2.2.6 Preparo da Solução Diluente.....	38

4.6 TESTES PARA VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA ANALÍTICA INDICATIVA DE ESTABILIDADE DE TEOR DO MEBENDAZOL	42
4.6.1 Adequação de Sistema.....	42
4.6.2 Especificidade	42
4.6.3 Estabilidade das Soluções	43
4.6.4 Linearidade	43
4.6.5 Limite de Detecção / Quantificação	43
4.6.6 Precisão.....	43
4.6.7 Exatidão.....	44
4.6.8 Robustez	44
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES	46
5.1 DESENVOLVIMENTO DA METODOLOGIA ANALÍTICA	46
5.1.1 Determinação da preparação das amostras	46
5.1.2 Condições Cromatográficas.....	47
5.2 VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA INDICATIVA DE ESTABILIDADE DO MEBENDAZOL.....	50
5.2.1 Adequação de Sistema.....	50
5.2.2 Especificidade e Estresse	50
5.2.3 Estabilidade de Soluções	58
5.2.4 Linearidade	60
5.2.5 Precisão.....	62
5.2.6 Exatidão.....	62
5.2.7 Robustez	64
5.2.8 Limite de Detecção / Quantificação	66
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	68
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70
APÊNDICES.....	78

1 INTRODUÇÃO

Todo cidadão brasileiro tem direito a água tratada e esgoto, isto é, o que assegura a Lei do Saneamento Básico, criada em 1979 e alterada em 2007 (BRASIL, 2007). No entanto, o que se vê é que o acesso a estas condições básicas de saúde ainda não foram alcançadas.

Em uma pesquisa realizada pelo Instituto Trata Brasil informou que em 2013, mais de 36 milhões de brasileiros ainda não tinham acesso a água potável e menos da metade da população, não teria acesso a tratamento de esgoto; em 2011, isso gerou mais de 400 mil internações por diarreia em todo o país, sendo que 53% desses casos teriam ocorrido em crianças com idade de 0 a 5 anos (BRASIL T., s. a.). Outra pesquisa realizada em 2013 pela ABAR (Associação Brasileira das Agências de Regulação), mostra que apenas 48% das cidades brasileiras possuem Regulação em saneamento básico; sem estas agências, o serviço de saneamento básico não é fiscalizado e a qualidade nem sempre assegurada (ABAR, 2013).

Depois do problema instaurado, medidas para tratamento devem ser tomadas, como o tratamento medicamentoso. O mercado dispõe de vários fármacos que podem utilizados no tratamento das parasitoses intestinais, porém os mais utilizados são os derivados de benzimidazóis, como o Mebendazol e o Albendazol. Os benzimidazóis são o grupo de fármaco mais amplamente utilizado devido a fácil administração e a elevada eficácia (FERNANDEZ, *et. al*, 2012).

No entanto, para que se tenha eficácia no tratamento medicamentoso, é de extrema importância que o fármaco tenha qualidade. Desta forma, o medicamento deve chegar ao consumidor com as mesmas características de quando foi produzido, ou seja, deve ser estável. As indústrias farmacêuticas devem possuir mecanismos que sejam capazes de garantir a qualidade de seus produtos e metodologias analíticas de análise que atendam às suas necessidades.

Para assegurar o tempo de validade dos medicamentos, análises de acompanhamento são realizadas periodicamente. Porém, além das condições ideais de armazenamento existem as condições reais, onde os medicamentos podem

passar por situações estressantes. Estas situações podem gerar produtos de degradação não desejáveis e afetar a saúde a quem estes medicamentos são administrados.

Quanto às metodologias analíticas empregadas para a quantificação de mebendazol, a farmacopeia brasileira apresenta o doseamento por titulometria em meio não aquoso; para os comprimidos, pode ser realizado por espectrofotometria de absorção no ultravioleta e por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE); descreve-se a utilização de coluna cromatográfica de 300 mm e fase móvel com mistura de tampão fosfato de potássio monobásico 0,05M e metanol. Já para a suspensão oral, não há metodologia de doseamento por CLAE. (ANVISA, 2010). Nas análises de rotina da indústria farmacêutica, a utilização de sais no sistema cromatográfico é desvantajosa devido à necessidade de paradas diárias para limpeza do equipamento. Quando se utiliza reagentes voláteis, essas paradas podem ser mais espaçadas.

Segundo a metodologia para doseamento nas farmacopeias brasileira e americana para o mebendazol comprimidos, o teor pode ser realizado por espectrofotometria com absorção no ultravioleta e por CLAE. O procedimento por CLAE utiliza na fase móvel tampão fosfato de potássio monobásico misturado a metanol pH 5,5 e coluna C18 de 300 mm de comprimento.

Nas farmacopeias Europeias 8.0, Britânica 2013 e Mexicana 2008, a metodologia de determinação do teor de mebendazol é realizada por titulometria em meio não aquoso.

Outras monografias oficiais foram consultadas. As farmacopeias Europeia sexta edição, Britânica 2013 e Mexicana 2008 apresentam metodologias de teor para o mebendazol por titulometria ou por espectrofotometria de absorção no ultravioleta. A farmacopeia Americana, USP (*United States Pharmacopeia*) 37, apresenta metodologia para o mebendazol comprimido e suspensão oral semelhante ao descrito na farmacopeia brasileira.

As metodologias analíticas utilizadas nas análises devem ser adequadas a formulação e sensíveis a presença de possíveis produtos que podem ser formados durante a perda da estabilidade de suas formulações. Desta forma, as metodologias analíticas devem ser indicativas de estabilidade, pois um produto de degradação

pode estar absorvendo em um mesmo comprimento de onda do ativo, e assim, em uma simples análise de teor mostrar ter um falso resultado e em conformidade com a especificação. Segundo a Legislação Brasileira Vigente (BRASIL, 2003), estas metodologias devem ser farmacopeicas ou validadas.

Sendo assim, os objetivos neste trabalho foram o estudo da estabilidade para as formas farmacêuticas de mebendazol comprimidos nas concentrações 100 e 500 mg e para a suspensão oral na concentração de 20 mg/mL, desenvolvimento e validação de uma única metodologia analítica indicativa de estabilidade para o mebendazol por cromatografia líquida de alta eficiência conforme os parâmetros estabelecidos na RE N° 899 (BRASSIL, 2003), que seja de simples preparação das amostras e que tenha tempo de análise reduzido. Além disso, pretende-se que esta metodologia utilize em sua fase móvel solventes voláteis e coluna cromatográfica pequena para otimização do tempo de análise.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 INFECÇÕES PARASITÁRIAS E HELMINTÍASES

O parasitismo consiste na associação entre seres vivos, no qual um beneficia-se em detrimento do outro. O parasita é o agressor enquanto o hospedeiro é o que abriga o parasita (NEVES, 2004).

As infecções parasitárias atingem um grande número de indivíduos. Estima-se que em torno de 17% da população mundial, mais de um bilhão de pessoas, estejam infectados por parasitas. A maior parte destas infecções ocorre em países em desenvolvimento, em regiões da África, Ásia, América Latina e Caribe (HARHAY, HORTON, & OLLIARO, 2010). Isto ocorre principalmente devido aos custos da saúde, que é fator determinante no tratamento. A incidência parasitária em algumas regiões pode chegar a 80% da população. O elevado custo da descoberta de drogas mais potentes e a pequena incidência destas infecções em países ricos do Ocidente, por muito tempo se combinaram na redução em incentivos para estudos nesta área. No entanto, esta situação pode estar mudando devido ao avanço das comunicações e ao crescimento dos países em desenvolvimento, no sentido de avançar em tratamentos mais eficazes (WILLIAMS & LEMKE, 2008).

Diversas são as doenças representadas por infecções parasitárias. Elas podem ser causadas por protozoários, como amebíase, giardíase, doença do sono, doença de Chagas, leishmaniose, malária, toxoplasmose, tricomoniase e pneumocistose (que é também considerada uma infecção fúngica); por helmintos (vermes), que por sua vez classificam-se em três classes: nematodos, cestodos e trematodos; por insetos como a sarna, piolhos (pediculose) e larvas (WILLIAMS & LEMKE, 2008).

Os helmintos fazem parte de um grupo de animais muito abrangente. Este numeroso grupo inclui animais de vida livre e de vida parasitária, distribuindo-se nos filos *Platyhelminthes*, *Nematoda* e *Ancathocephala* (COSTA, 2004). Os helmintos que infectam hospedeiros humanos são divididos em duas categorias ou filos:

platelmintos (vermes achatados) e asquelmintos ou nematoides (lombrigas) (WILLIAMS & LEMKE, 2008).

Os *platyhelminthes* (do grego, *platy* = chato) são os representantes mais simples dos helmintos. Possuem simetria bilateral e tem ausência de exo ou endoesqueleto, sendo achatados dorso-ventralmente; podem ou não apresentar tubo digestivo, não possuem anus e aparelho respiratório. Seu sistema excretor é bem simples, do tipo protonefrídico, e o tecido conjuntivo preenche os espaços entre os órgãos; eles podem ser de vida livre, ecto ou endoparasitas (COSTA, 2004). Os platelmintos podem ser subdivididos em três classes: Trematoda, Tubellaria e Cestoda; destas, as que parasitam os seres são os cestoides (vermes) e trematoides (vermes ou *schistosomas*). A classe nematoide inclui os helmintos como a lombriga, ancilostomídeos e os “vermes chicote”. Estes vermes possuem forma cilíndrica, variando em tamanho, proporção e estrutura (WILLIAMS & LEMKE, 2008).

Os nematoides (do grego, *nematos* = fio) são um grupo de animais cilíndricos e alongados. Neste grupo são encontrados representantes com diversos tipos de hábitat; englobam espécies saprófitas de vida livre aquática ou terrestre, parasitas vegetais, invertebrados ou vertebrados. Seu tamanho pode variar entre poucos milímetros a dezenas centímetros; possuem tubo digestivo completo, com abertura anal ou cloacal terminal ou próxima da extremidade posterior. Não possuem sistema circulatório ou vascular e a movimentação da oxihemoglobina no corpo é realizada por meio de contraturas do corpo. Os sexos em geral são separados mas existem hermafroditas. No desenvolvimento pós-embriônico, o nematoide passa por cinco estágios. O embrião que se forma dentro do ovo é a larva de primeiro estágio. No ciclo direto não há necessidade de hospedeiro intermediário, o oposto que ocorre no ciclo indireto, onde há a necessidade. Alcançando o estágio de larva infectante (geralmente terceiro estágio), para que ocorra o desenvolvimento, é necessário infectar o hospedeiro definitivo (COSTA, 2004).

Os diversos microrganismos que podem parasitar o trato gastrointestinal podem ser classificados em protozoários e helmintos (HARHAY, HORTON, & OLLIARO, 2010). Os helmintos (vermes) são organismos pluricelulares que podem viver livremente ou parasitar plantas e animais. O homem é um hospedeiro específico e definitivo para diferentes espécies de helmintos, possibilitando o

desenvolvimento e instalação, que ocorre mais comumente no intestino (CASTIÑEIRAS & MARTINS, 2000-2003).

Os vermes na fase adulta vivem no intestino, onde podem produzir milhares de ovos por dia. Os ovos são eliminados pelas fezes de indivíduos infectados. Em áreas onde o saneamento básico é insuficiente, esses ovos contaminam o solo e a água, pois os ovos eclodem no solo quando encontram condições climáticas favoráveis, como clima quente e úmido, comuns em países clima de tropical ou subtropical. A infecção é gerada pela ingestão da água ou vegetais contaminados. Os geo-helmintos são portanto o grupo de parasitas vermes nematoides que vivem no solo (BETHONY, *et al.*, 2006; WHO, 2014).

Além da infecção gerada pelo contato direto com os ovos, a outra forma de infecção é através da pele. As larvas liberadas no solo possuem a capacidade de penetração cutânea, podendo permeá-la e infectar o indivíduo. Contudo, a transmissão não ocorre diretamente de pessoa para pessoa ou com infecção de fezes frescas. Isto se deve ao fato de que os ovos necessitam de três semanas para atingirem seu ciclo e tornarem infecciosos. Esses vermes também não se multiplicam no hospedeiro humano; desta forma, a reinfecção ocorre somente após novo contato direto com os agentes infecciosos no meio ambiente (WHO, 2014).

As helmintoses intestinais estão entre as infecções mais comuns no mundo e afetam as comunidades mais pobres e mais necessitadas, que vivem com menos de 2 dólares por dia (BETHONY, *et al.*, 2006; WHO, 2014). Mais de 270 milhões de crianças em idade pré-escolar e mais de 600 milhões de crianças em idade escolar habitam em áreas onde esses parasitas são transmitidos de forma intensiva e encontram-se necessitadas de tratamento e de intervenções preventivas (WHO, 2014). Nas crianças a taxa de infecção é maior; isso ocorre porque nesta faixa etária, elas não apresentam maturidade e competências suficientes quanto a importância dos hábitos de higiene para eliminação dos parasitas (LOBATO, *et. al* 2012).

A contaminação mais severa causa um efeito significativo no desenvolvimento da criança, comprometendo tanto o físico quanto o intelecto, gerando desnutrição, retardo de crescimento, atraso intelectual e deficiência no processo de cognição e educação (BETHONY, *et al.*, 2006); a desnutrição gerada leva a deficiência na aprendizagem, ocasionando problemas na memória e na concentração (LOBATO, *et. al*, 2012). Isto se deve, pois, os vermes se alimentam também do sangue do

hospedeiro, resultando em perda de ferro e proteínas, além de dificultar a absorção de nutrientes. Podem causar também perda de apetite e elevar a deficiência nutricional (WHO, 2014). Além disso, em indivíduos infectados, a susceptibilidade a doenças como malária e tuberculose podem ser aumentada (BETHONY, *et al.*, 2006).

Além dos seres humanos, os parasitas podem afetar animais de estimação, gado e outros animais. Para tratamento dos animais, é comum a administração de doses contínuas de anti-helmínticos; esta prática deve ser evitada, pois a leva a resistência do helmíntico no animal e podendo afetar o homem. Desta forma, o tratamento com administração de drogas é mais indicado após diagnóstico positivo do acometimento (MEHTA, 2013).

A Assembleia Mundial da Saúde, em 2001, aprovou uma resolução na qual obriga os estados membros a se comprometerem no controle da morbidade de infecções por helmintos transmitidos pelo solo em países subdesenvolvidos, através da utilização em larga escala de medicamentos anti-helmínticos em crianças em idade escolar. A preocupação é de que o uso generalizado e frequente de anti-helmínticos leve à resistência aos medicamentos ou, pelo menos, um declínio na eficácia dos medicamentos já existentes no combate a longo prazo contra os geo-helmintos (BETHONY, *et al.*, 2006).

Conforme orientações estabelecidas, iniciativas para controle destes parasitas têm sido realizadas principalmente através da distribuição regular em massa de anti-helmínticos entre crianças (HARHAY, HORTON, & OLLIARO, 2010). Em 2011, mais de 300 milhões de crianças em idade pré-escolar ou escolar foram tratadas em países endêmicos, o que corresponde a 30% das crianças em risco. A organização mundial de saúde (*World Health Organization*, WHO) recomenda que o controle parasitário em áreas endêmicas deve ser realizado pela administração de anti-helmínticos em crianças de idade pré-escolar a escolar, em mulheres com idade fértil e em adultos com profissões de risco. Essa administração deve ser realizada anualmente, quando a taxa de contaminação da comunidade por geo-helmintos é entre 20 e 50% ou duas vezes ao ano, quando essa taxa é maior que 50% (WHO, 2014).

A melhor forma para reduzir o número de infecções por helmintos seria em investir em saneamento básico e educação sanitária, já que a deficiência nestas

questões são as principais formas de transmissão dos parasitas intestinais (BARBOSA & VIEIRA, 2013). Enquanto não se atingem os ideais em saneamento e higiene, o controle das parasitoses pode ser amenizado pela administração de drogas eficazes para cura ou controle da maior parte das helmintíases intestinais (SILVA, *et al.*, 2010).

Os parasitas que acometem o intestino humano podem ser classificados em nematoides e cestoides. Os nematoides são: *Ascaris lumbricoides*, *Trichuristrichiura*, *Ancylostomaduodenale*, *Necatoramericanus*, *Enterobiumvermicularis* e *Strongyloidesstercoralis*; Os cestoides são: *Taeniasaginata*, *Taeniasolium*, *Diphyllobothrium Latume* *Hymenolepsis nana* (MEHTA, 2013). Dos helmintos intestinais e de particular importância os geo-helmintos são os mais comuns, destacando-se as lombrigas (*Ascaris lumbricoides*), otrichuris (*Trichuristrichiura*) e os ancilostomídeos (*Ancylostomaduodenalee Necatoramericanus*) (WHO, 2014). Eles são tratados em conjunto porque podem ser comuns em um único indivíduo, especialmente em crianças que vivem em países subdesenvolvidos (BETHONY, *et al.*, 2006).

2.1.1 Infecções por nematoides

Mais de um bilhão de pessoas no mundo se infecta com uma ou mais espécies de nematódeos intestinais. Esses parasitas são mais comuns em regiões com saneamento fecal precário. Nas pessoas com nutrição marginal, as infecções intestinais por helmintos podem comprometer o crescimento e desenvolvimento (FAUCI & LONGO, 2013).

Os nematódeos intestinais incluem *Enterobius* (oxiúro), *Trichuris* (verme chicote), *Ascaris* (lombriga), *Necator* e *Ancylostoma* (os dois ancilóstomos), *Strongyloides* (pequeno verme cilíndrico) e *Trichinella*. *Enterobius*, *Trichuris* e *Ascaris* são transmitidas pela ingestão de ovos; os demais por ingestão de larvas. Para o tratamento o mebendazol ou pamoato de pirantel são efetivos. Esses fármacos matam os vermes adultos no colo, mas não os ovos, de modo que é indicado novo tratamento após duas semanas (LEVINSON, 2014).

O *Ascaris* é o parasita que infecta o homem com mais frequência, estando presente em países de clima tropical, subtropical e temperado. As más condições de

higiene e saneamento básico e utilizações de fezes como fertilizantes contribuem para a prevalência da ascaridíase (ÁRTICO, GARCIA, & FELLET, 2015).

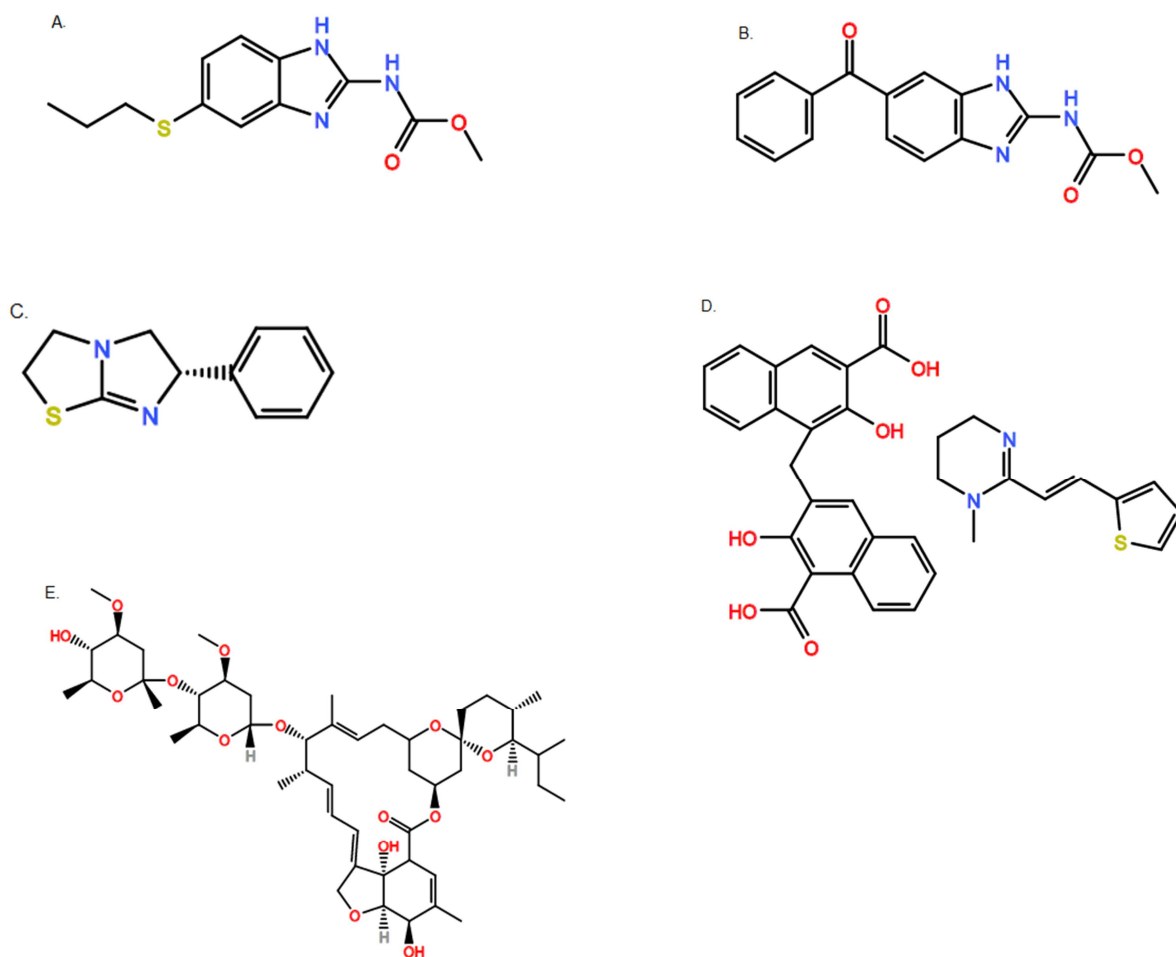
2.1.1.1 *Ascaris lumbricoides*

A infecção pela *Ascaris lumbricoides* ocorre pela ingestão de ovos, resultante da contaminação fecal-oral. Os ovos ingeridos eclodem no intestino e as larvas penetram na mucosa intestinal. A doença associada a essa infecção parasitária relaciona-se com a migração das larvas da circulação esplâncnica para a circulação sistêmica (jejuno-fígado-pulmão), com a formação de abscessos hepáticos ou pneumonite por *Ascaris*. As larvas migram para traqueia e são engolidas, voltando para o intestino sob a forma de vermes maduros. As massas de vermes maduros podem obstruir fisicamente o intestino ou a árvore biliar (ROBBINS & COTRAN, 2004).

2.2 FÁRMACOS ANTI-HELMÍNTICOS

Atualmente, cinco são as principais drogas que a Organização Mundial de Saúde (OMS) lista como medicamentos essenciais indicados para o tratamento contra helmínticos transmitidos pelo solo e infecções por *S. stercoralis*, embora existam inúmeros outros disponíveis no mercado. Estes cinco já são utilizados por pelo menos três décadas: benzimidazóis (albendazol e mebendazol), levamidazol, pamoato de pirantel e ivermectina (Figura 1). Os benzimidazóis interferem diretamente no sistema microtubular do verme, enquanto o levamidazol e o pamoato de pirantel atuam como antagonistas do receptor nicotínico de acetilcolina. Dentre estes, os benzimidazóis albendazol e o mebendazol são os medicamentos mais utilizados no tratamento e controle de helmínticos transmitidos pelo solo; eles são cada vez mais empregados na administração preventiva regular em populações de risco, sem diagnóstico prévio. A quimioterapia preventiva é defendida pela OMS e outros organizadores devido ao seu impacto na morbidade dos vermes, pela facilidade da administração oral, que pode ser realizada não necessariamente por um profissional da saúde, e pela segurança e eficácia dos medicamentos empregados (KEISER & UTZINGER, 2010).

Figura 1 - Estruturas químicas do albendazol (A), mebendazol (B), levamidazol (C), pamoato de pirantel (D) e ivermectina (E)



O resultado de eficácia realizado com estes cinco fármacos, administrados nas doses indicadas para doses únicas e múltiplas, estão demonstrados resumidamente na Tabela 1 (KEISER & UTZINGER, 2010).

Tabela 1 – Eficácia de drogas no tratamento contra helmintos transmitidos pelo solo em doses únicas ou múltiplas

Parasita	Droga	Dose	Taxa de Cura (%)
<i>A. lumbricoides</i>	Albendazol	400mg – dose única	88
	Mebendazol	500mg – dose única	95
		100mg – duas vezes por dia, por três dias consecutivos	92
	Pamoato de Pirantel	10mg/kg – dose única	88
		10mg/kg – por três dias consecutivos	92
	Levamidazol	2,5 mg/kg – dose única	92
Ancilóstomo	Albendazol	400mg – dose única	72
	Mebendazol	500mg – dose única	15
		100mg – duas vezes por dia, por três dias consecutivos	80
	Pamoato de Pirantel	10mg/kg – dose única	31
		10mg/kg – por três dias consecutivos	
	Levamidazol	2,5 mg/kg – dose única	68
<i>T. trichiura</i>	Albendazol	400mg – dose única	28
		400mg por três dias consecutivos	53
	Mebendazol	500mg – dose única	36
		100mg – duas vezes por dia, por três dias consecutivos	63
	Pamoato de Pirantel	10mg/kg – dose única	31
		10mg/kg – por três dias consecutivos	27
Levamidazol	2,5 mg/kg – dose única	10	
<i>S. stercoralis</i>	Ivermectina	200µg/kg – dose única	88
		200µg/kg – por dois dias consecutivos	96
	Albendazol	400mg – dose única	69
	Albendazol	400mg – duas vezes por dia durante três dias consecutivos	62

N/A: Não aplicável.

Medicamentos para tratamento de vermes, como o mebendazol (500 mg) e o albendazol (400 mg) estão disponíveis há muitos anos no mercado. O mebendazol tem sido muito utilizado em todo o mundo. Administrado oralmente, possui relativamente baixa absorção, apresenta pequenos efeitos colaterais e tem amplo espectro contra anti-helmínticos transmitidos pelo solo. Outras vantagens são o baixo custo, boa eficácia e a não intervenção sobre a microbiota intestinal (CAÑETE, *et. al*, 2009). Ambos albendazol e mebendazol são doados para os ministérios da saúde, através da OMS (Organização Mundial de Saúde). A meta global da OMS é eliminar a morbidade em crianças devido infecções por geo-helmintos até 2020 (WHO, 2014).

O mebendazol é anti-helmíntico sintético de benzimidazol. Seu principal mecanismo é de atuar impedindo a absorção de glicose pelos vermes, diminuindo assim seu tempo de sobrevivência e reprodução. Além disso, ele destrói os ovos de *Ancilostomideos*, *Ascaris* e *Trichuris*. Ele é indicado no tratamento contra o *Ascaris*, tênia, traças e *Trichuris*, porém, mais eficaz para infecções parasitárias e por *Trichuris* (MEHTA, 2013).

Comprimidos de mebendazol 500 mg de dose única são comercializados há mais de 40 anos e indicados tanto para adultos quanto para crianças. Como a reinfecção possivelmente pode ocorrer, recomenda-se que após 2 semanas da primeira dose seja novamente administrado (FRIEDMAN, ALI, & ALBONICO, 2012).

Outras formas de comercialização do mebendazol são em comprimidos de 100mg e suspensão oral 20 mg/mL, tanto para uso adulto como para uso pediátrico. Devido a maior facilidade de administração, de modo geral, a forma de suspensão oral é mais comumente indicada para crianças, enquanto os adultos aceitam melhor os comprimidos (KOGIEN & TEIXEIRA, 2011). A forma comprimido mastigável também está disponível em comprimidos de 100mg (DRUGBANK, 2014).

2.2.1 Mebendazol

O mebendazol, CAS 31431-39-7, possui estrutura molecular demonstrada na Figura 2 (DRUGBANK, 2014) e Figura 3 – Estrutura molecular do mebendazol em 3D (CHEMSPIDER, 2013), fórmula empírica $C_{16}H_{13}N_3O_3$ e massa molecular $295,3 \text{ g.mol}^{-1}$, sendo composto por 65,08% de carbono, 4,44% de hidrogênio, 14,23% de

nitrogênio e 16,25% de oxigênio. É classificado como uma pequena molécula e possui descrição de pó branco ou quase branco, podendo ser levemente amarelado; é inodoro e apresenta formas polimórficas. É praticamente insolúvel em água, álcool, clorofórmio, éter, diclorometano e em ácidos minerais diluídos; é livremente solúvel em ácido fórmico. Sua temperatura de ponto de fusão é em aproximadamente 290 °C. Deve ser armazenado protegido da luz (DRUGBANK, 2014; SWEETMAN, 2005; O'NEIL, *et. al.*, 2013).

O Mebendazol pode ser classificado como um benzimidazol, que atua interferindo no metabolismo de hidratos de carbono, inibindo a polimerização de microtubos. Classifica-se nas categorias antinematóide e modulador da tubulina. Sua nomenclatura IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*) é metil N-(6-benzoil-1H-1,3-benzodiazol-2-il) carbamato (DRUGBANK, 2014).

Algumas outras importantes propriedades preditas do mebendazol (figuras 2 e 3) estão descritas na Tabela 2 , . (CHEMSPIDER, 2013; DRUGBANK, 2014).

Figura 2 – Estrutura molecular do mebendazol em 2D

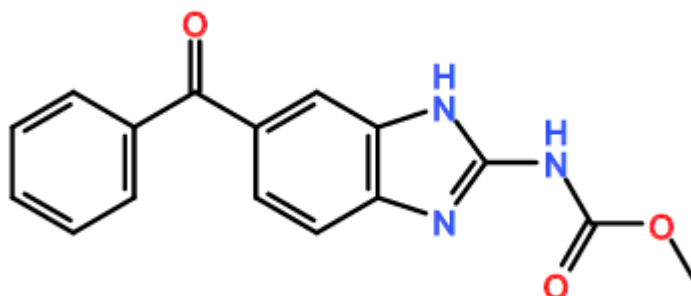


Figura 3 – Estrutura molecular do mebendazol em 3D

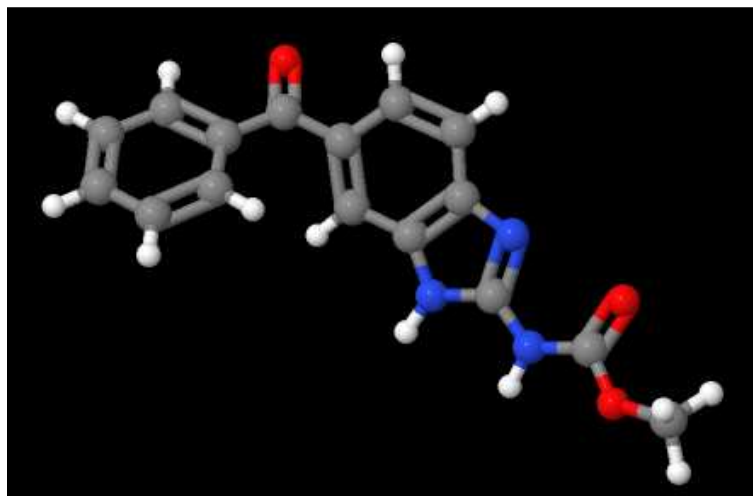
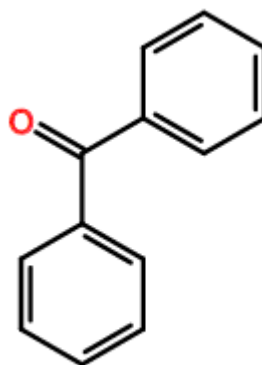


Tabela 2 - Propriedades previstas do mebendazol

Propriedade	Valor previsto
Índice de refração	1,703
Volume molar	Aproximadamente 213 cm ³
Número de aceptores de Hidrogênio	6
Número de doadores de Hidrogênio	2
Refratividade molar	Aproximadamente 82 cm ³
Polarizabilidade	Aproximadamente 33.10 ⁻²⁴ cm ³
Densidade	Aproximadamente 1,4 g/cm ³
Solubilidade em água	3,87 x 10 ⁻⁰² g/L
pKa (meio fortemente acidificado)	8,44
pka (meio fortemente básico)	3,93
Coefficiente de partição	Aproximadamente 3,0

O mebendazol é um composto orgânico, da classe do benzeno e derivados substituídos e subclasse das benzofenonas. As benzofenonas são compostos onde uma cetona central é ligada a dois grupamentos fenil, conforme demonstrado na Figura 4 (DRUGBANK, 2014).

Figura 4 - Estrutura molecular da benzofenona



O fármaco sintético mebendazol é indicado para o tratamento de *Enterobius vermicularis* (traça), *Trichuris trichiura* (vermes do tipo chicote), *Ascaris lumbricoides* (lombriga comum), *Ancylostomaduodenale* (ancilostomíase comum), *Necator americanus* (ancilostomíase americano), podendo ocorrer em infecções individuais ou mistas. Sua farmacodinâmica consiste em inibir a polimerização da tubulina, o que resulta na perda de microtubos citoplasmáticos. Seu mecanismo de ação consiste em atuar provocando “alterações degenerativas nas células intestinais e tegumento do verme por ligação ao sítio sensível à colchicina da tubulina, inibindo assim a sua montagem ou polimerização em microtúbulos”. Devido a esta perda dos microtúbulos citoplasmáticos, leva as fases larvais e as fases adultas dos parasitas sensíveis se tornam deficientes em glicose e assim esgotam os estoques de glicogênio. Como as alterações degenerativas ocorrem no retículo endoplasmático e mitocôndrias, associado com a liberação dos lisossomos ocorre redução nas quantidades de energia necessárias para a sobrevivência do helminto. Devido a esta baixa de energia, o parasita fica imobilizado e morre (DRUGBANK, 2014).

O mebendazol é pouco absorvido no trato gastrointestinal (5-10%), porém a ligação a proteínas é alta (90-95%). Seu metabolismo é principalmente hepático, cujo metabolito principal é o 2-amino-5-benzoilbenzimidazole; todos os outros metabólitos conhecidos são desprovidos de atividade anti-helmíntica. A via de eliminação é aproximadamente de 2% por fezes como fármaco inalterado e o restante, como metabolito primário. Para pacientes com função hepática normal, a meia-vida de eliminação é de 2,5 a 5,5 horas, podendo ser de até 9 horas; já em pacientes com deficiência na função hepática (colestase), a meia-vida de eliminação pode ocorrer em até 9 horas (DRUGBANK, 2014).

O mebendazol é administrado em doses significativamente altas. A quantidade deste ativo administrado diariamente pode chegar a quantidade de 500mg/dia. Segundo o recomendado pelo FDA para o limite impurezas que necessitam ser identificadas, mas não quantificadas, leva em consideração a dose máxima diária a ser administrada. Desta forma, considerando as doses máximas diárias do mebendazol, que está entre 10 mg e 2 g, esta deve ser de 0,2% ou 2mg, devendo considerar o menor valor. Desta forma, para o mebendazol, a quantidade máxima de impurezas para identificação seria de 1,0 mg em 500 mg de mebendazol. Já para quantificação, fármacos com dose máxima diária entre 100 mg e 2 g, ser de 0,2% ou de 3 mg, devendo considerar o menor valor. Assim sendo, não se devem ter impurezas em quantidade superior 1 mg de mebendazol na quantidade total administrada por dia (ADMINISTRATION, 2006).

Conforme apresentado, torna-se necessário o desenvolvimento e validação de metodologia analítica sensível para verificação da estabilidade nas formas farmacêuticas de mebendazol comprimidos e suspensão oral.

2.2.1.1 Polimorfismo

Polimorfo (do grego “muitas formas”) é o termo atribuído a uma das formas cristalinas em que uma mesma substância pode ser encontrada. As diferenças entre as formas envolvem igualmente a estrutura cristalina, número de átomos numa molécula de gás ou estrutura molecular de um líquido (HAWLEY, 1987).

Muitos compostos orgânicos e inorgânicos de relevância farmacêutica podem existir em uma ou mais formas cristalinas. Quando aplicado aos sólidos, o termo cristalino designa um cristal ideal, na qual as unidades estruturais, chamadas unidades celulares, se repetem regular e indefinidamente em três dimensões no espaço. Estas unidades celulares têm forma e orientações definidas por vetores translacionais a, b, e c. As formas cristalinas comumente encontradas para um dado fármaco são os polimorfos e os solvatos (VIPAGUNTA, BRITAIN, & GRANT, 2001).

A existência de formas polimórficas do fármaco pode afetar o desempenho da forma farmacêutica através da alteração de sua biodisponibilidade ou estabilidade, além de poder afetar a reprodutividade dos lotes industriais, tanto do fármaco quanto

do medicamento (BRYN, *et. al*, 1995). A influência do polimorfismo na biodisponibilidade é considerada a mais importante consequência do fenômeno na área farmacêutica e ocorre quando existe dependência entre a velocidade de dissolução *in vivo* e a velocidade de absorção. A concentração plasmática máxima (C_{max}) e o tempo necessário para obtê-la (t_{max}) são os principais parâmetros que sofrem impacto *in vivo*. Tal fato é o reflexo das consequências do polimorfismo na solubilidade, uma vez que a forma mais estável (menor energia livre) possui menor solubilidade. Isto resulta, na maioria dos casos, em menor velocidade de dissolução e, conseqüentemente, menor velocidade de absorção (SINGHAL & CURATOLO, 2004).

O mebendazol apresenta três formas polimórficas A, B e C, as quais exibem diferenças significativas na solubilidade e nas propriedades terapêuticas. A solubilidade das três formas polimórficas do mebendazol em meio fisiológico segue a seguinte ordem $B > C > A$. Baseado nestas diferenças de solubilidade, a forma C é a preferida para fabricação do medicamento, uma vez que sua solubilidade é suficiente para atingir a biodisponibilidade ótima sem a possível toxicidade da forma mais solúvel, forma B. Sabe-se que a forma A não tem atividade anti-helmíntica quando sozinha ou em misturas acima de 30% (VILLERS *et al.*, 2005).

2.3 ESTABILIDADE DE FÁRMACOS E MEDICAMENTOS

Segundo a Lei nº 5.991 de 17 de Dezembro de 1973, medicamento é o “produto farmacêutico, tecnicamente obtido ou elaborado, com finalidade profilática, curativa, paliativa ou para fins de diagnóstico” (BRASIL, 1973).

O início do século XX foi marcado pela descoberta de novos medicamentos. Nesse período, já havia o conhecimento de que os medicamentos poderiam produzir reações adversas. Apenas após acidentes graves ocorridos, foram tomadas no sentido de regulamentar o registro e acompanhamento dos medicamentos produzidos. Até a década de 80, as metodologias analíticas de avaliação da estabilidade dos medicamentos seguiam princípios técnicos e científicos sem interferências de competências normativas das autoridades sanitárias (CARVALHO, *et. al*, 2005).

Os fatores climáticos são de grande relevância na estabilidade dos produtos farmacêuticos, A estabilidade depende de fatores ambientais (temperatura, umidade e luz) e dos relacionados ao próprio produto (propriedades físicas e químicas de substâncias ativas e excipientes, forma farmacêutica e composição, processo de fabricação, tipo e propriedades dos materiais de embalagem) (BRASIL, 2005).

A maioria dos insumos farmacêuticos utilizados na composição dos medicamentos no Brasil são oriundos de importações (ANVISA, 2006). Como estes insumos são produzidos em regiões de zona climática diferente das dos países importadores, regulamentos foram adotados por diferentes países para previsão do prazo de validade de fármacos e medicamentos; nestes regulamentos, não havia uma homogeneidade e isso gerava divergências entre os profissionais da área. Na década de 90, o Japão, a União Europeia e os Estados Unidos da América se reuniram na ICH (Conferência Internacional de Harmonização) no sentido de padronizarem suas legislações (CARVALHO, *et. al*, 2005).

O Brasil internalizou as definições da ICH e instituiu um guia em 2004, a RE 398/04, que trata dos requerimentos técnicos para registro de medicamentos para uso humano (CARVALHO, *et. al*, 2005). O Brasil foi classificado na zona IV, clima quente e úmido, temperatura $30 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa. (U.R.) $70 \pm 5\%$. Novas consultas foram levantadas levando em vista a alteração da classificação da zona climática, levando em consideração dados meteorológicos. Na RE nº1 de 29 de julho de 2005, alterou a classificação climática para zona IVb (30°C ; 75% u.r.) para estabelecer condições de clima quente e muito úmido, justificado pela mesma alteração ocorrida em 2000 na ICH, com a observação de que as condições mais estressantes são as mais indicadas para avaliação da estabilidade (BRASIL, 2005).

O prazo de validade de um medicamento é definido como período de tempo que o medicamento pode ser utilizado. Este período determinado pelo fabricante é baseado em estudo de estabilidade, no qual se deve comprovar se o medicamento encontra-se apto para consumo se mantidas as condições de armazenamento e transporte. Neste estudo, testes de longa duração e de estabilidade acelerada são realizados. Nos testes de estabilidade também é avaliado o período de utilização do medicamento. No relatório de estudo de estabilidade, independentemente do tipo da forma farmacêutica, deve ser apresentado, além de outros, o teor do princípio ativo e

o método correspondente e a quantificação de produtos de degradação e o método analítico correspondente (BRASIL, 2005).

Os testes de degradação forçada são aqueles que consistem em submeter o medicamento a situações estressantes e assim verificar sua estabilidade frente a essas variações. Devem ser avaliados os efeitos de temperatura, umidade, oxidação, luz e a susceptibilidade a hidrólise em diferentes valores de pH. As análises dos produtos de degradação gerados nestes testes podem ser utilizadas para se estabelecer rotas de degradação e no desenvolvimento de métodos analíticos com especificidade e seletividade adequadas (BRASIL, 2012).

Os métodos analíticos empregados nas análises de estabilidade devem estar validados e ser indicativos de estabilidade. Estes métodos devem ser sensíveis para avaliar a presença ou a formação qualitativa e quantitativa de produtos e/ou subprodutos de degradação (BRASIL, 2012).

Em um método indicativo de estabilidade, o analito de interesse deverá apresentar pureza cromatográfica, que se dá pela comprovação de que não há interferência de excipientes, impurezas e produtos de degradação no pico cromatográfico do insumo farmacêutico ativo (IFA). Entende-se por produtos de degradação a denominação de impurezas resultantes de alterações químicas que podem surgir durante a fabricação ou armazenamento do medicamento. O estudo da presença destes produtos de degradação devem ser conduzidos de forma a se comparar a interferência da formulação ao IFA, desta forma, avaliações devem ser realizadas tanto de forma isolada quanto da associada (BRASIL, 2013).

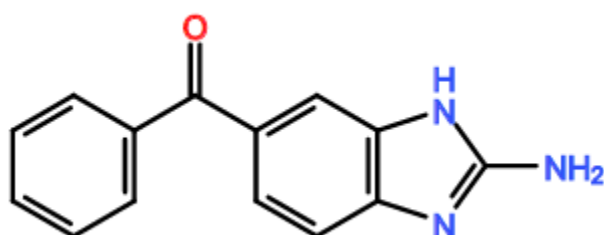
De acordo com a dose máxima diária do medicamento, são avaliados os limites de quantificação dos produtos de degradação formados nos produtos que estão em estudo de estabilidade, conforme descrito na Tabela 3. Desta forma, os métodos analíticos devem ser sensíveis para quantificar os produtos de degradação formados, caso estejam presentes (BRASIL, 2013).

Tabela 3 - Limites de Quantificação para produtos de degradação

Dose máxima diária de IFA administrado (mg)	Limites expressos em % ou em Ingestão Total Diária (ITD)	
	%	µg de ITD
< 10	1,0	50
10 -100	0,5	200
> 100 – 2000	0,2	3000
> 2000	0,15	-

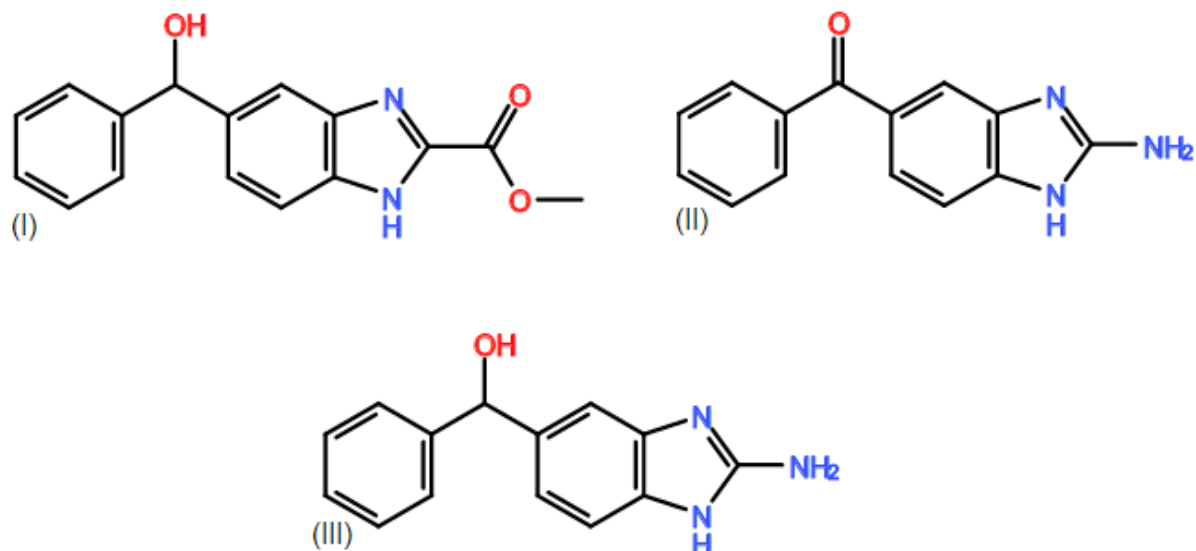
Em experimentos realizados por Al-Kurdi *et. al.* (1999), foi encontrado o 2-amino-5-benzoilbenzimidazole como produto de degradação obtido quando o mebendazol é aquecido. O experimento foi realizado com aquecimento sob refluxo do padrão de mebendazol com solução de hidróxido de sódio 1,0 M por 30 minutos, seguido de arrefecimento e neutralização com solução de ácido nítrico 1,0 M. A solução resultante foi evaporada e a substância obtida foi purificada. Análises realizadas para a caracterização possibilitaram a elucidação do possível composto, demonstrado na Figura 5.

Figura 5 - 2-amino-5-benzoilimidazol



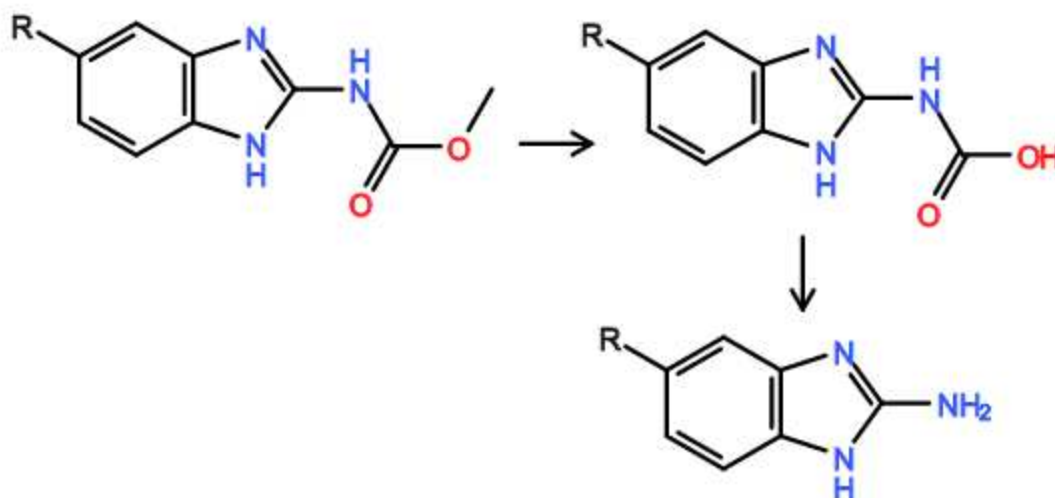
Nos metabólitos do mebendazol que podem ser encontrados no plasma sanguíneo estão o metil 5-(α -hidroxibenzil)-2-benzimidazol carbamato (I), que é o principal deles, seguidos pelos 2-amino-5-benzoilbenzimidazol (II) e o 2-amino-5-(α -hidroxibenzil)-benzimidazol (III), conforme representados na Figura 6 (ALLAN, 1980).

Figura 6 - Principais metabólitos do mebendazol: (I) metil 5-(α -hidroxibenzil)-2-benzimidazol carbamato; (II) 2-amino-5-benzoilbenzimidazol e (III) 2-amino-5-(α -hidroxibenzil)-benzimidazol.



O mebendazol, assim como todos benzimidazóis, é sensível à luz. O derivado da amina éster obtido com desmetilação seguida de descarboxilação do grupo carbâmico tem sido relatado como principal produto de fotodegradação e também indicados como o principal metabólito desses fármacos. A fotodegradação dos benzimidazóis está representado na Figura 7 (AL-KURDI *et. al.*, 1999).

Figura 7 - Fotodegradação dos Benzimidazóis



2.4 VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA

A validação assegura que o método analítico é apto para a finalidade ao qual foi desenvolvido e possui confiabilidade. Desta forma, quando um método é validado significa que este foi submetido a uma série de testes e os resultados foram satisfatórios. Os requisitos de uma validação são definidos por autoridades regulatórias (ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária, ICH, USP, FDA), porém, a abordagem para a validação pode ser variada, dando margem a diferentes interpretações (KAZAKEVICH & LOBRUTTO, 2007; SHABIR, 2003).

A validação analítica por CLAE é classificada nas seguintes categorias (ADAMOVIĆ, 1997; KAZAKEVICH & LOBRUTO, 2007):

- Análises de identificação;
- Análises quantitativas do conteúdo de substâncias relacionadas;
- Ensaio limites e semi-quantitativos para a avaliação de substâncias relacionadas;
- Análises quantitativas de conteúdo dos principais componentes ativos.

Para que um medicamento seja comercializado este deve ter o registro junto ao órgão regulador, que no Brasil é a ANVISA. A validação analítica da metodologia analítica do medicamento é um item requerido no processo para se obter o registro. Além disto, todos os equipamentos utilizados durante a validação devem ser submetidos periodicamente à qualificação e calibração (SHABIR, 2003), os analistas que realizam as análises devem estar aptos ao manuseio dos equipamentos e as substâncias químicas de referência utilizadas em toda a validação devem ter sua pureza comprovada e documentada (KAZAKEVICH & LOBRUTO, 2007).

Se a validação é por CLAE, parâmetros cromatográficos também devem ser avaliados. Os compêndios oficiais como a farmacopeia Brasileira dentre outros, especificam valores sobre a adequabilidade do sistema. Através de tratamentos estatísticos, valores limites para repetibilidade de injeções são avaliados. Além deste, fator de simetria do pico, resolução entre picos, fator de capacidade, desvio padrão relativo (DPR) e número de pratos teóricos (N) também devem ser avaliados (ANVISA, 2010). A adequabilidade do sistema (*System suitability*) se faz necessária para verificar se o sistema está adequado para as análises que serão realizadas (SHABIR, 2003).

A validação é, portanto um documento que evidencia a confiabilidade da metodologia analítica (ADAMOVICS, 1997). O método analítico indicativo de estabilidade classifica-se na categoria II, conforme Tabela 4. A RDC 899, publicada pela Anvisa em 29 de maio de 2003, apresenta um guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. De acordo com esta resolução, a metodologia será considerada validada desde que sejam avaliados os parâmetros: especificidade e seletividade; linearidade; intervalo; precisão; limite de detecção (sensibilidade); limite de quantificação; exatidão e robustez (BRASIL, 2003). De acordo com a aplicabilidade da metodologia desenvolvida, os parâmetros a serem avaliados na validação se fazem necessários (ADAMOVICS, 1997).

Tabela 4 - Classificação dos testes segundo a finalidade

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

De acordo com a finalidade do teste, a classificação é realizada em categorias e de acordo com esta, a realização de testes são exigidos, conforme Tabela 5 (BRASIL, 2003).

Tabela 5 – Classificação em categorias

Parâmetro	Categoria I	Categoria II		Categoria III	Categoria IV
		Quantitativo	Ensaio limite		
Especificidade	Sim	Sim	Sim	-	Sim
Linearidade	Sim	Sim	Não	-	Não
Intervalo	Sim	Sim	-	-	Não
Precisão Repetibilidade	Sim	Sim	Não	Sim	Não
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

2.4.1 Parâmetros para a validação

2.4.1.1 Especificidade

É a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz. Para análise qualitativa (teste de identificação) é necessário demonstrar a capacidade de seleção do método entre compostos com estruturas relacionadas que podem estar presentes. Isto deve ser confirmado pela obtenção de resultados positivos (preferivelmente em relação ao material de referência conhecido) em amostras contendo o fármaco, comparativamente com resultados negativos obtidos com amostras que não contém o fármaco, mas compostos estruturalmente semelhantes. Para análise quantitativa (teor) e análise de impurezas, a especificidade pode ser determinada pela comparação dos resultados obtidos de amostras (fármaco ou medicamento) contaminadas com quantidades

apropriadas de impurezas ou excipientes e amostras não contaminadas, para demonstrar que o resultado do teste não é afetado por esses materiais. Quando a impureza ou o padrão do produto de degradação não estiverem disponíveis, pode-se comparar os resultados do teste das amostras contendo impurezas ou produtos de degradação com os resultados de um segundo procedimento bem caracterizado (por exemplo metodologia farmacopeica ou outro procedimento validado). Estas comparações devem incluir amostras armazenadas sob condições de estresse (por exemplo: luz, calor, umidade, hidrólise ácida / básica, oxidação) (BRASIL, 2003).

Testes de especificidade necessitam de uma pesquisa cuidadosa do conhecimento disponível na área de aplicação, para que se encontrem todos os componentes que precisam ser testados. Assim sendo, o analito, a matriz com ou sem analito, matérias-primas do processo, impurezas dos materiais iniciais ou do processo, subprodutos e produtos de degradação ou metabólitos e reagentes em branco devem todos ser analisados. Às vezes se faz necessário expor todos os componentes e a matriz a condições extremas (calor, ácido, álcali, oxidação, radiação UV/Visível, luz fluorescente) para determinar possíveis produtos de degradação (INMETRO, 2007).

2.4.1.2 Linearidade

A linearidade é a habilidade de um método analítico em produzir resultados que sejam diretamente proporcionais à concentração do analito em amostras, em uma dada faixa de concentração. A quantificação requer que se conheça a dependência entre a resposta medida e a concentração do analito. Para avaliação das linearidades de um método analítico, os cálculos da regressão linear não são suficientes, e os valores residuais devem ser calculados (TAVERNIERS, LOOSE, & BOCKSTAELE, 2004). Um método pode apresentar linearidade e também apresentar tendência a erro; o cálculo dos valores residuais permite se a variação na linha de tendência é aleatória ou se apresenta tendência.

Pelo menos cinco concentrações devem ser avaliadas dentro da faixa de trabalho (*range*). As faixas mostradas na Tabela 6 têm sido recomendadas pela literatura e exigido por órgãos regulatórios (KAZAKEVICH & LOBRUTO, 2007).

Tabela 6 - Faixas recomendadas para o teste de linearidade em preparações farmacêuticas

Tipo de processo analítico	Faixa a ser coberta	
	%	Observação
Teor (conteúdo)	80 – 120	do valor declarado;
Teor (uniformidade de conteúdo)	70 – 130	do valor declarado;
Teor (dissolução)	± 30 ou 120	da faixa especificada
Impurezas / produtos de degradação		do LQ ou da especificação (limite da impureza), no mínimo, respectivamente;
Teor e produtos de degradação	120	do LQ ou do teor declarado para o ativo, no mínimo, respectivamente.

Legenda: LQ: Limite de Quantificação.

A linearidade é obtida por padronização interna ou externa e formulada como expressão matemática usada para o cálculo da concentração do analito a ser determinado na amostra real. A equação da reta que relaciona as duas variáveis é: $y = ax + b$; Onde: y = resposta medida (absorbância, altura ou área do pico, etc.); x = concentração; a = inclinação da curva de calibração = sensibilidade; b = interseção com o eixo y , quando $x = 0$. A linearidade de um método pode ser observada pelo gráfico dos resultados dos ensaios em função da concentração do analito ou então calculada a partir da equação da regressão linear, determinada pelo método dos mínimos quadrados. O coeficiente de correlação linear (r) é frequentemente usado para indicar o quanto pode ser considerada adequada a reta como modelo matemático (INMETRO, 2007).

2.4.1.3 Limites de Detecção (LD) e de Quantificação (LQ)

O LD representa a menor concentração de analito que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, utilizando um determinado procedimento

experimental. O LQ é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas (NUNES, 2010).

Para métodos instrumentais o LD é, estatisticamente em termos gerais, reconhecido como o nível em que o analito produz uma razão sinal ruído de cerca de 3:1, ao passo que o LQ é aquele que produz uma relação de 10:1 (SHABIR, 2003); (ANVISA, 2010). Outra abordagem aceita relaciona esses limites com o desvio padrão relativo (DPR%) que determinado nível resulta: LD, $DPR\% \leq 20\%$; e LQ, $DPR \leq 10\%$, ou o próprio limite aceito como critério de adequabilidade de sistema (KAZAKEVICH & LOBRUTTO, 2007).

2.4.1.4 Precisão e Exatidão

Precisão é um termo geral para avaliar a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, em condições definidas. É normalmente determinada para circunstâncias específicas de medição e as duas formas mais comuns de expressá-la são por meio da repetitividade e a reprodutibilidade, sendo usualmente expressas pelo desvio-padrão. Ambas repetitividade e reprodutibilidade são geralmente dependentes da concentração do analito e, deste modo, devem ser determinadas para um diferente número de concentrações e, em casos relevantes, a relação entre precisão e a concentração do analito deve ser estabelecida. O desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV%) pode ser mais útil neste caso, pois foi normalizado com base na concentração e deste modo ele é praticamente constante ao longo da faixa de interesse, contanto que esta não seja maior que 5%: $DPR = DP/CMD \times 100$ Onde: DP = desvio padrão; CMD = concentração média determinada (INMETRO, 2007).

De acordo com a ANVISA (2003), a exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro. Várias metodologias para a determinação da exatidão estão disponíveis:

- Fármaco. Aplicando-se a metodologia analítica proposta na análise de uma substância de pureza conhecida (padrão de referência); comparação dos

resultados obtidos com aqueles resultantes de uma segunda metodologia bem caracterizada, cuja exatidão tenha sido estabelecida.

- **Forma Farmacêutica:** na análise de uma amostra, na qual quantidade conhecida de fármaco foi adicionada a uma mistura dos componentes do medicamento (placebo contaminado); nos casos em que amostras de todos os componentes do medicamento estão indisponíveis, aceita-se a análise pelo método de adição de padrão, no qual adiciona-se quantidades conhecidas do analito (padrão de referência) ao medicamento.
- **Impurezas:** análise pelo método de adição de padrão, no qual adiciona-se quantidades conhecidas de impurezas e/ou produtos de degradação ao medicamento ou ao fármaco; no caso da indisponibilidade de amostras de certas impurezas e/ou produtos de degradação, aceita-se a comparação dos resultados obtidos com um segundo método bem caracterizado (metodologia farmacopeica ou outro procedimento analítico validado). A exatidão é calculada como porcentagem de recuperação da quantidade conhecida do analito adicionado à amostra, ou como a diferença percentual entre as médias e o valor verdadeiro aceito, acrescida dos intervalos de confiança.

Ainda de acordo com a ANVISA (2003), a exatidão do método deve ser determinada após o estabelecimento da linearidade, do intervalo linear e da especificidade. sendo verificada a partir de, no mínimo, 9 (nove) determinações contemplando o intervalo linear do procedimento, ou seja, 3 (três) concentrações, baixa, média e alta, com 3 (três) réplicas cada. A exatidão é expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente:

(1)

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

2.4.1.5 Estabilidade de Solução

A avaliação da estabilidade de solução analítica é feita para se verificar por quanto tempo as soluções padrão e amostra são estáveis ou para se demonstrar

que são estáveis pelo menos durante a duração normal da sequência analítica (SHABIR, 2003).

Para gerar resultados confiáveis e reprodutíveis, as amostras, os padrões e reagentes usados devem ser estáveis por um período razoável. A estabilidade das amostras e padrões é importante em termos de temperatura e tempo. Se uma solução não for estável em temperatura ambiente, a diminuição da temperatura pode aumentar a estabilidade das amostras e padrões. Com relação ao tempo, a estabilidade de dias ou meses é mais desejável, entretanto em alguns casos, as soluções precisam ser preparadas cada vez que forem realizadas as análises. Em certos tipos de amostras, faz-se necessário avaliar a estabilidade da substância para determinar o tempo de estocagem das amostras. Tempos longos de estocagem de amostras biológicas, por exemplo, aumentam a probabilidade de degradação dos compostos de interesse, com subsequente formação de metabólitos. Conhecendo a estabilidade, as análises podem ser completadas antes de ocorrer a degradação (RIBANI, *et. al*, 2004).

2.4.1.6 Robustez

A robustez de um método de ensaio mede a sensibilidade que este apresenta em face de pequenas variações. Um método diz-se robusto se revelar praticamente insensível a pequenas variações que possam ocorrer quando esse está sendo executado. Convém salientar que quanto maior for a robustez de um método, maior será a confiança desse relacionamento à sua precisão. Estas medições podem ser realizadas numa ordem aleatória (INMETRO, 2007).

A robustez de um método analítico é a medida de sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos. Indica sua confiança durante o uso normal. Durante o desenvolvimento da metodologia, deve-se considerar a avaliação da robustez. Constatando-se a susceptibilidade do método às variações nas condições analíticas, estas deverão ser controladas e precauções devem ser incluídas no procedimento. A Tabela 7 relaciona os principais parâmetros que podem resultar em variação na resposta do método (ANVISA, 2003).

Tabela 7 - Fatores que devem ser considerados na determinação da robustez do método analítico

Preparo das Amostras	Estabilidade das soluções analíticas
	Tempo de extração
Espectrofotometria	Variação do pH da solução
	Temperatura
	Diferentes fabricantes de solventes
Cromatografia Líquida	Variação do pH da fase móvel
	Variação na composição da fase móvel
	Diferentes lotes ou fabricantes de colunas
	Temperatura
	Fluxo da fase móvel
Cromatografia Gasosa	Diferentes lotes ou fabricantes de colunas
	Temperatura
	Velocidade do gás de arraste

A avaliação da robustez deve ser considerada durante a fase de desenvolvimento do método. Constatando-se suscetibilidade a variações nas condições analíticas, estas deverão ser adequadamente controladas ou precauções deverão ser incluídas no procedimento (ANVISA, 2003).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Desenvolver e validar uma única metodologia analítica para as formas farmacêuticas de mebendazol comprimidos 100 mg e 500 mg e suspensão oral 20 mg/mL por cromatografia líquida de alta eficiência para estudo de estabilidade, conforme os parâmetros estabelecidos na RDC 899.

3.2 Objetivos Específicos

Desenvolver uma metodologia analítica que tenha:

- Simples preparação das amostras;
- Tempo de análise reduzido;
- Fase móvel com solventes voláteis.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 AMOSTRA TESTE E PLACEBO

Foram utilizados mebendazol comprimidos, nas concentrações de 100 e 500 mg e mebendazol suspensão oral, com concentração de XX mg/mL. Foram também utilizados os placebos das respectivas formas farmacêuticas. Os lotes utilizados no desenvolvimento e validação do método analítico indicativo de estabilidade foram os mesmos para cada tipo de amostra, em quantidade suficiente para não ocorrer variação dos lotes, do início ao fim do estudo.

O peso médio dos comprimidos foi obtido após a pesagem de 20 unidades de cada concentração e realização da média. Já para a amostra líquida, foi determinada a densidade.

Estes valores foram utilizados nos testes de desenvolvimento e validação da metodologia analítica indicativa de estabilidade.

Os placebos dos comprimidos e da suspensão oral utilizados nos testes foram preparados pelo setor de desenvolvimento farmacotécnico da indústria fabricante. Estes possuíam a mesma formulação e foram preparados utilizando o mesmo processo empregado no preparo do produto, porém em menor escala, excluindo-se apenas o mebendazol.

4.2 REAGENTES

Os reagentes usados e os respectivos fabricantes estão resumidos na Tabela 8.

Tabela 8 - Reagentes usados e os respectivos fabricantes

Reagente	Fabricante
Ácido Clorídrico	Macron
Peróxido de Hidrogênio	Merck
Hidróxido de Sódio	Macron
XXXXXXXXXX	Merck
XXXXXXXXXX	Merck
Acetonitrila	Merck
XXXXXXXXXX	Merck

A água usada, de grau CLAE, foi preparada em um sistema de purificação com dois módulos: Elix[®]35 e Milli-Q Gradient, ambos da Millipore, cuja filtração final é com membrana 0,22 µm. A substância química de referência mebendazol foi obtida da USP (lote H0K198, 0,996mg/g).

4.3 EQUIPAMENTOS

- Balança Analítica: com precisão 0,1mg, do fabricante Toledo – modelo Ohaus Adventurer AR2140;
- Banho ultrassônico: fabricante Unique – modelo USC-5050A;
- Banho-maria: fabricante Nova Ética – modelo 314/10D;
- pHmetro: fabricante Micronal – modelo B474;
- Estufa: fabricante Nova Ética;
- Cromatógrafo líquido: Fabricante Waters, acoplado a detector de arranjo de fotodiodos; modelo do equipamento: Alliance 2695; modelo de detector: PDA 2998; *Software*: Empower 2;
- Colunas: XXXXXX C18 (X,X x XX) mm, X,X µm, marca Merck; XXXXXXXX C18 (X,X x XX) mm, X,X µm, marca Waters;
- Agitador magnético;
- Elix[®]35 e Milli-Q Gradient, ambos da Millipore.

XX
XX.

4.5.2.2 Preparo das amostras para teste de estresse

As amostras preparadas para o teste de estresse foram inicialmente preparadas conforme as amostras do teor (item 3.5.2.1), porém com o dobro da concentração. A adição das soluções estressantes foram realizadas na diluição final, transferindo-se 5,0 mL da solução em análise para balão volumétrico de 10,0 mL, completando o volume do balão com a solução estressante para submeter às diferentes condições estressantes.

4.5.2.2.1 Preparo do Padrão

O padrão para o teste de estresse foi preparado inicialmente conforme o padrão do teor (item 4.5.2.1.1), porém alterando o volume a ser pipetado de 5,0 mL para 10 mL e transferindo para balão volumétrico de 100 mL com o objetivo de se obter o dobro da concentração. Essa solução padrão estoque foi utilizada para diluição 1:1 com as soluções estressantes, a fim de se obter as condições descritas na Tabela 9. A seguir, filtrou-se em membrana XXX XX,X μm diretamente no *vial*.

4.5.2.2.2 Preparo das Amostras de Mebendazol Comprimido 100 mg e 500 mg

As amostras para o teste de estresse foram preparadas conforme a amostra do teor (item 4.5.2.1.2), porém, alterando o volume a ser pipetado de 5,0 mL para 10 mL e transferindo para balão volumétrico de 100 mL, conforme o preparo do padrão, descrito anteriormente no item 4.5.2.2.1.

4.5.2.2.3 Preparo da Amostra de Placebo de Mebendazol Comprimido 100 mg

O preparo dos placebos para o teste de estresse foi feito conforme o placebo do teor (item 3.5.2.2.3), porém, alterando o volume a ser pipetado de 5,0 mL para 10 mL e transferindo para balão volumétrico de 100 mL, conforme o preparo do padrão, descrito anteriormente no item 4.5.2.2.1.

4.5.2.2.4 Preparo da Amostra de Mebendazol Solução Oral 20 mg/mL

O preparo das amostras para o teste de estresse foram realizados conforme as amostras do teor (item 4.5.2.1.4), porém, alterando o volume a ser pipetado de 5,0 mL para 10 mL e transferindo para balão volumétrico de 100 mL, conforme o preparo do padrão, descrito anteriormente no item 4.5.2.2.1.

4.5.2.2.5 Preparo da Amostra de Placebo de Mebendazol Solução Oral 20 mg/mL

O preparo dos placebos para o teste de estresse foi realizado conforme descrito no item 3.5.2.2.5, porém, alterando o volume a ser pipetado de 5,0 mL para 10 mL e transferindo para balão volumétrico de 100 mL, conforme o preparo do padrão, descrito anteriormente no item 4.5.2.2.1.

4.5.2.2.6 Preparo da Solução Diluente

Os placebos para o teste de estresse foram realizados conforme o preparo do diluente do teor (item 4.4.2.1.6), porém, alterando o volume a ser pipetado de 5,0 mL para 10 mL e transferindo para balão volumétrico de 100 mL, conforme o preparo do padrão, descrito anteriormente no item 4.5.2.2.1.

Durante a realização dos experimentos de estresse, além de se alterar a concentração de alguns reagentes foi necessário associar o aquecimento para as condições estressantes ácida, básica e oxidativa, já que nas condições iniciais as mesmas não sofreram degradação em extensão suficiente para a avaliação de produtos de degradação formados. As concentrações resultantes empregadas para o teste de estresse estão descritas na Tabela 9.

Tabela 9 - Condições de estresse utilizadas nos testes de degradação

Número atribuído à condição estressante	Condições de estresse	Condições estressantes
1	Aquecimento	60°C por 24 horas
2	Hidrólise Ácida	HCl 1,0 N a 60°C por 24 horas
3	Hidrólise Básica	NaOH 1,0 N por 20 minutos
4	Oxidação	H ₂ O ₂ 3,0% a 60°C por 4 horas
5	Fotólise	Luz artificial incidente por 24 horas
6	Umidade	Ambiente umedecido 24 horas

Para realização de estresse por umidade, realizou-se a exposição das amostras ao ambiente úmido. Para isso, criar o ambiente úmido, utilizou-se um dessecador e na parte inferior, adicionou-se água. Realizou-se a pesagem das amostras e espalhou-as em vidro de relógio; após decorridos 24 horas, realizou-se o procedimento de preparação conforme as amostras anteriores.

4.5.3 Análise de Linearidade / Faixa de Trabalho, Nível de LD e LQ de Mebendazol

4.5.3.1 Curva Padrão

Realizou-se a análise de uma curva de calibração do padrão no total de 17 soluções nas concentrações correspondentes a 0,2%, 0,5%, 1,0%, 1,5%, 2,0%, 2,5%, 5,0%, 10,0%, 25,0%, 50,0%, 70,0%, 80,0%, 90,0%, 100,0%, 110,0%, 120,0% e 130,0% da concentração de trabalho, e foram separadas em duas faixas: (a) de 0,2% a 2,0%, nível de impurezas; (b) de 2,5% a 130%, nível de teor. A justificativa da escolha desses valores é que são necessários no mínimo cinco pontos entre 80% e 120% da concentração teórica de trabalho da solução da amostra no teor, e 70% a 130% para abranger os valores do teste de uniformidade (KAZAKEVICH; LOBRUTTO, 2007). A justificativa dos demais pontos é de que o método deve ser

4.6 TESTES PARA VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA ANALÍTICA INDICATIVA DE ESTABILIDADE DE TEOR DO MEBENDAZOL

Os testes para validação de metodologia analítica foram realizados de acordo com a RE 899 (BRASIL, 2003) que dispõe sobre os testes para validação de metodologia analítica.

4.6.1 Adequação de Sistema

A adequabilidade do sistema foi determinada pelas 5 replicatas de injeções da solução padrão sendo avaliado o cumprimento dos parâmetros definidos na farmacopeia brasileira 5ª. edição. O teste de adequação é realizado para verificar a aptidão do sistema para realização das análises para dar início aos testes de validação; podem ser citados como os principais parâmetros avaliados o fator de capacidade, fator de simetria, pratos teóricos e resolução, quando aplicável (SHABIR, 2003).

4.6.2 Especificidade

As especificidades foram determinadas pelas injeções das soluções padrão, amostras, placebos, diluentes e fase móvel, utilizando os procedimentos de preparação e condições analíticas descritas anteriormente (item 3.5.1). Além das injeções realizadas em XXX nm, paralelamente foi realizada a varredura espectral utilizando detector de arranjo de fotodiodos, na região de 200 a 400 nm, para verificação da pureza dos picos. A pureza foi determinada utilizando o *software Empower 2* da Waters.

Inicialmente no teste de estresse, as amostras foram submetidas às condições ácida, básica e oxidativa em temperatura ambiente. No entanto, fez-se necessário elevar as concentrações dos diluentes ácido e básico, além de utilizar aquecimento para as condições ácida, básica e oxidativa, a fim de se estabelecer melhores resultados de degradação do ativo, já que nas condições iniciais não foram formados picos de degradantes.

4.6.3 Estabilidade das Soluções

Os ensaios de estabilidades de soluções analíticas foram realizados através da avaliação da variação das áreas iniciais das soluções padrão e amostra (item 3.5.1) recém preparadas (tempo zero) com as mesmas soluções depois de tempos pré-determinados, injetando as soluções em intervalos de 2 em 2 horas.

4.6.4 Linearidade

A linearidade foi determinada através das injeções em triplicata das diferentes concentrações das soluções padrão (item 3.5.3) abrangendo toda a faixa de concentração de análise. Ao todo foram analisados 17 níveis de concentração. As injeções foram processadas e os resultados foram tratados estatisticamente.

4.6.5 Limite de Detecção / Quantificação

Para determinação do Limite de Detecção / Quantificação foram realizadas 3 preparações em cada concentração da linearidade no nível de impurezas (item 3.5.3). As soluções foram injetadas e o resultado do processamento, tratado estatisticamente. Foi realizado o método do cálculo do desvio padrão (DPa) do intercepto com o eixo y.

4.6.6 Precisão

A precisão foi avaliada a partir dos testes de repetibilidade e da precisão intermediária da preparação das amostras (item 3.5.3). As amostras foram preparadas por diferentes analistas em dias diferentes. O resultado das seis preparações pelos diferentes analistas e em diferentes dias foram comparados e tratados estatisticamente. A precisão foi avaliada pela proximidade dos resultados, avaliadas a partir do cálculo do desvio padrão relativo.

4.6.7 Exatidão

As exatidões foram avaliadas através do grau de recuperação. O modo de preparo foi semelhante ao preparo das amostras (item 3.5.1.), sendo que o placebo e o ativo foram pesados separadamente; para o ativo foi realizado a pesagem da substância química de referência mebendazol de procedência da USP. No total, foram realizadas nove preparações, sendo três preparações em cada nível de concentração de trabalho, respectivamente, 80%, 100% e 120%.

4.6.8 Robustez

A robustez da metodologia foi avaliada a partir de pequenas variações alteradas propositalmente no método analítico, e comparadas ao resultado da análise inicial. Inicialmente foram preparadas soluções padrão e amostra, conforme as preparações do teste de especificidade (item 3.5.1). Foram realizadas cinco injeções do padrão e duas amostras, tanto para a condição inicial quanto nas variações dos parâmetros. Foram alterados os seguintes parâmetros: fluxo da fase móvel, temperatura da coluna cromatográfica, lotes ou tipo da coluna cromatográfica, pH da fase móvel, composição da fase móvel e marca da membrana de filtração, representados na Tabela 12.

Tabela 12 - Variação dos parâmetros empregados na análise de robustez

Parâmetro	Condição do método	Variações testadas
Fluxo da fase móvel (mL/min)	X,X	X,X e X,X
Temperatura da coluna (°C)	XX	XX e XX
Lotes ou tipos de coluna	XXXXXXXXXX C18 ¹	XXXXXXXXXX C18e ² e XXXXXXXXXX C18
pH da fase móvel (aquosa)	X,X	X,X e X,X
Composição da fase móvel	(80 : 20)	(77 : 23) e (83 : 17)
Marca da membrana de filtração	XXXXXXX	XXXXXX

Legenda: ¹ = lote 1; ² = lote 2.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 DESENVOLVIMENTO DA METODOLOGIA ANALÍTICA

5.1.1 Preparação das amostras

O ponto de partida para o desenvolvimento da metodologia analítica foram os dados de pesquisa, descritos na revisão bibliográfica sobre as propriedades físico-químicas do mebendazol e a observação do método analítico para o mebendazol comprimidos, descrito na farmacopeia brasileira 5ª Edição.

No item 3.4.1, no desenvolvimento da metodologia analítica proposta, para solubilização do mebendazol, foi utilizado ácido fórmico, reagente no qual é solúvel. Posteriormente, foi realizada diluição em solução diluente (descrito no item 3.5.1.1) para se obter resultados cromatográficos com menor ruído na linha de base e picos mais simétricos. Na preparação do padrão e das amostras, o tempo em que as preparações foram deixadas no ultrassom, 15 minutos, foi definido após realização de testes com o padrão juntamente com as amostras. O padrão solubiliza rapidamente, porém as amostras não. Foi adotado o mesmo tempo para que essas preparações pudessem ser preparadas simultaneamente. Um tempo maior de ultrassom das amostras em contato com o XXXX XXXXXXXX não tiveram impacto nos resultados. A quantidade de XXXX XXXXX utilizada nas preparações, X,X mL, foi testada tanto no padrão quanto nas amostras. Para o preparo do padrão, uma quantidade abaixo de X,X mL foi suficiente para ocorrer a solubilização, porém, nas amostras, foi necessário uma quantidade superior para a solubilização do ativo contido nas matrizes.

Antes de ser definida a faixa de trabalho, foram realizados testes de nível de detecção e quantificação, para verificar qual seria a melhor resposta a uma determinada concentração. Conforme definido no ICH, a quantidade máxima de impurezas no mebendazol encontrada deve ser no máximo 0,2% em relação à quantidade de mebendazol na dose máxima diária, pois impurezas maiores que 0,2% devem ser quantificadas. Foram observadas as doses máximas diárias dos

comprimidos e da suspensão, no qual a menor dose recomendada seria de 100 mg/dia. Desta forma, foi testada até se obter a concentração que teria resposta adequada ao nível de detecção / quantificação.

A concentração de trabalho de X,XX mg/mL foi a concentração em que foi alcançado o Limite de Detecção e Quantificação e obteve-se picos com resultados de detecção maior do que dez vezes o valor de ruído sem extrapolar o máximo de absorvância em 130%, maior ponto da linearidade. Além disso, a pesagem inicial de 50 mg propiciou reprodutibilidade quando se realizou a exatidão.

Definido o nível de detecção / quantificação foram preparadas soluções nas concentrações a 70 %, 100 % e 130 % da concentração de trabalho; previamente realizou-se uma estimativa na verificação da linearidade. Após tratamento estatístico e verificação de que o mesmo responderia linearmente, realizou-se as análises da linearidade, na concentração de impurezas estendendo até a concentração do teor.

Durante o desenvolvimento do método, o estresse foi realizado em condições extremas para verificar se algum pico de degradante interferiria na quantificação do pico de Mebendazol. Durante os testes de estresse foram observados a formação de picos oriundos da degradação do Mebendazol. Posteriormente, foram realizadas ajustes na metodologia analítica até se obter as separações cromatográficas necessárias.

5.1.2 Condições Cromatográficas

As condições cromatográficas foram ajustadas levando em consideração alguns pontos. Um deles, e de grande importância, seria o desenvolvimento de um método que não utilizasse reagentes inorgânicos na fase aquosa da fase móvel; além disso, o tempo da análise deveria ser o menor possível e ter boa separação entre os possíveis produtos de degradação formados.

A fase móvel utilizada foi de uma solução ácida com pH X,XX, ajustada com XXXXXXXXXXXX e com XXXXXXXX XXXXXXXX. A XXXXXXXX é um importante aditivo nas análises de compostos básicos, pois interagem com os grupamentos silanóis residuais da sílica. Embora os fabricantes de colunas mais modernas garantirem que o recobrimento dos grupamentos silanóis é eficiente em colunas do tipo XXXX e, ao realizar as análises, obteve-se pico de mebendazol com menor simetria,

comparando-se a análise na presença deste aditivo. A quantidade de XXXXXX utilizada foi ajustada até se obter simetria satisfatória, menor que 2 e o mais próximo possível de 1,0. O XXXX XXXXXXXX foi utilizado por ser um ácido forte, além de ter como elemento o XXXX, também utilizado como pareador iônico para o mebendazol, auxiliando na eluição do composto pela coluna cromatográfica. O pH X,XX foi definido primeiramente pelos valores de pKa do mebendazol, que são 3,93 e 8,44, selecionando um pH de no mínimo 1,5 unidades de diferença do valor do pH, garantindo assim que a molécula estivesse ionizada sob a forma de base livre. O valor do pH X,X respondeu melhor aos parâmetros de robustez.

O solvente acetonitrila foi selecionado em detrimento ao metanol, por demonstrar melhor resposta nas separações entre os picos, além de resultar em uma menor pressão no sistema de CLAE devido a sua menor viscosidade. A proporção da fase móvel de 80 : 20 (v:v) foi a que apresentou melhores resultados nos parâmetros cromatográficos tais como número de pratos teóricos maiores que 2000 e picos com fator de simetria próximo de 1,0.

Foi utilizado como diluentes o XXXXX XXXXX e a solução para diluição. Como o mebendazol não é solúvel na maioria dos solventes orgânicos foi necessário solubilizá-lo primeiramente em XXXXX XXXXXXXXXXXX e posteriormente foi feita uma segunda diluição em uma solução, que apresentava a mesma constituição da fase móvel. Diluições realizadas em soluções com a mesma composição que a da fase móvel possibilitam a redução nos picos de interferentes nos cromatogramas.

O tipo de detecção utilizado foi no comprimento de onda em XXX nm. Inicialmente, foram realizadas injeções teste com varredura para determinação do comprimento de onda onde o analito de interesse fosse livre de interferentes aliado com o máximo de absorbância. Em XXX nm foi observado resposta satisfatória para a absorção do mebendazol.

A coluna que obteve melhor separação entre os compostos e que gerou o pico de Mebendazol com melhor simetria foi a XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX. Esta coluna permitiu trabalhar em análises com fase móvel na faixa de pH de 2,0 a 8,0; o tamanho das partículas de sílica X,X µm auxiliou em uma boa separação, proporcionando uma boa seletividade. A coluna de tamanho reduzido foi escolhida para contribuir na agilidade nas análises.

O fluxo utilizado, X,X mL/minuto foi o que melhor atendeu aos parâmetros de robustez do método.

O volume de injeção utilizado, XX µL possibilitou picos com maior intensidade e reprodutibilidade do que XX e XX µL testados.

A temperatura do compartimento de coluna XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX°C foi escolhida a fim de possibilitar a realização da análise em equipamentos que não tenham forno para coluna; no entanto, deve-se ter rigoroso controle de temperatura do ambiente a fim de não se ter variações nos tempos de retenção. A temperatura de XX°C para o compartimento das amostras foi utilizada para se ter uma temperatura um pouco inferior à do ambiente, e diminuir degradações térmicas da amostra.

Para se obter a separação cromatográfica adequada, levou-se em consideração os processos característicos de transporte de massa que ocorrem dentro da coluna cromatográfica. Esses fenômenos são provocados pelas características da fase móvel e pelas propriedades fase estacionária; quando não bem ajustados, a influência desses fenômenos acarreta em perda de eficiência no processo de separação, ou seja, perda da eficiência da coluna. As principais medidas que expressam a eficiência da coluna são: (a) Número de pratos teóricos (η); (b) Altura equivalente a um prato teórico (H). O cálculo do número de pratos teóricos pode ser dado pela Equação 1, onde t_r é o tempo de retenção e W é a medida da largura da base do pico (REMOLO, 1998).

(2)

$$\text{Número de Pratos Teóricos} = 16 \times \left(\frac{t_r}{W}\right)^2$$

A separação cromatográfica entre dois picos adjacentes pode ser expressa pelo termo Resolução, o qual depende da eficiência da coluna (η) e da seletividade (α). A seletividade consiste na medida da separação entre extremos de dois picos (REMOLO, 1998)

Estabelecidas as condições cromatográficas, iniciou-se os testes de validação.

5.2 VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA INDICATIVA DE ESTABILIDADE DO MEBENDAZOL

5.2.1 Adequação de Sistema

A adequação de sistema foi realizada conforme preconizado na farmacopeia brasileira. Na adequação foram avaliadas cinco injeções consecutivas da solução padrão e realizado o tratamento estatístico. Foi obtido 0,1% de desvio padrão relativo (DPR) das replicatas de injeções da solução padrão. Esse valor é bem abaixo ao especificado na farmacopeia brasileira, que é no máximo 2,0 %; o tempo de retenção também praticamente não teve alterações nessas replicatas de injeções. Também foi obtido o valor de aproximadamente 1,1 de fator de simetria e 7000 para os pratos teóricos. Esses valores indicaram que o sistema estava apto para realização das análises.

O número de pratos teóricos é indicativo da eficiência da coluna, conforme citado na farmacopeia brasileira; nessa avaliação também são considerados a substância em análise, as condições de análise como fase móvel, fase estacionária e coluna. Desta forma, quanto mais alto o número de pratos teóricos, mais eficiente é a coluna.

O Fator de Cauda (T) obtido foi próximo de 1,0. O valor 1,0 indica que o pico está perfeitamente simétrico e, portanto, o valor diferente de 1,0 indica que o pico apresenta uma assimetria. O pico em estudo apresentou pequena assimetria; altos valores de assimetria são indesejados, pois à medida que este valor aumenta, a integração do pico e a precisão se tornam menos confiáveis. Valores ótimos de assimetria variam entre 0,8 e 1,3.

Todos os itens avaliados para adequabilidade do sistema apresentaram-se em conformidade aos parâmetros preconizados na farmacopeia brasileira, e desta forma, pode-se afirmar que o teste foi satisfatório.

5.2.2 Especificidade e Estresse

Ao realizar as análises, observou-se, que não houve nenhuma substância nas injeções de fase móvel, diluente, placebo e produtos de degradação interferindo nas

quantificações tanto do padrão quanto das amostras. As avaliações de pureza de pico foram verificadas utilizando o programa Empower 2 da Waters. O detector PDA (sigla inglesa de *Photo Diode Array*) foi utilizado para realização da varredura espectral e para avaliar a pureza dos picos cromatográficos. Durante o processamento, se o pico é puro, o valor de PA (*Purit Angle* – ângulo de pureza) é menor que TH (*Threshold angle* - limiar); isso indica que mesmo em diferentes comprimentos de onda, não há substância cromófora absorvendo no mesmo comprimento de onda (LEVIN, 1999). Foram obtidos valores de TH menores que PA, indicando a pureza espectral dos picos de Mebendazol tanto no padrão quanto nas amostras.

As Figuras 8 e 9 apresentam os cromatogramas obtidos na especificidade em XXX nm e as Figuras 10 e 11, as varreduras espectrais utilizando o detector de PDA. Observa-se que não há interferências de picos secundários juntos ao pico de mebendazol em nenhum dos cromatogramas.

Figura 8 - Cromatogramas das análises cromatográficas após definição do método de análise. Os cromatogramas da “Fase Móvel ou solução para diluição” e “Diluyente Inicial” são os mesmos para o mebendazol comprimido nas concentrações de 100 e 500 mg / comprimido.

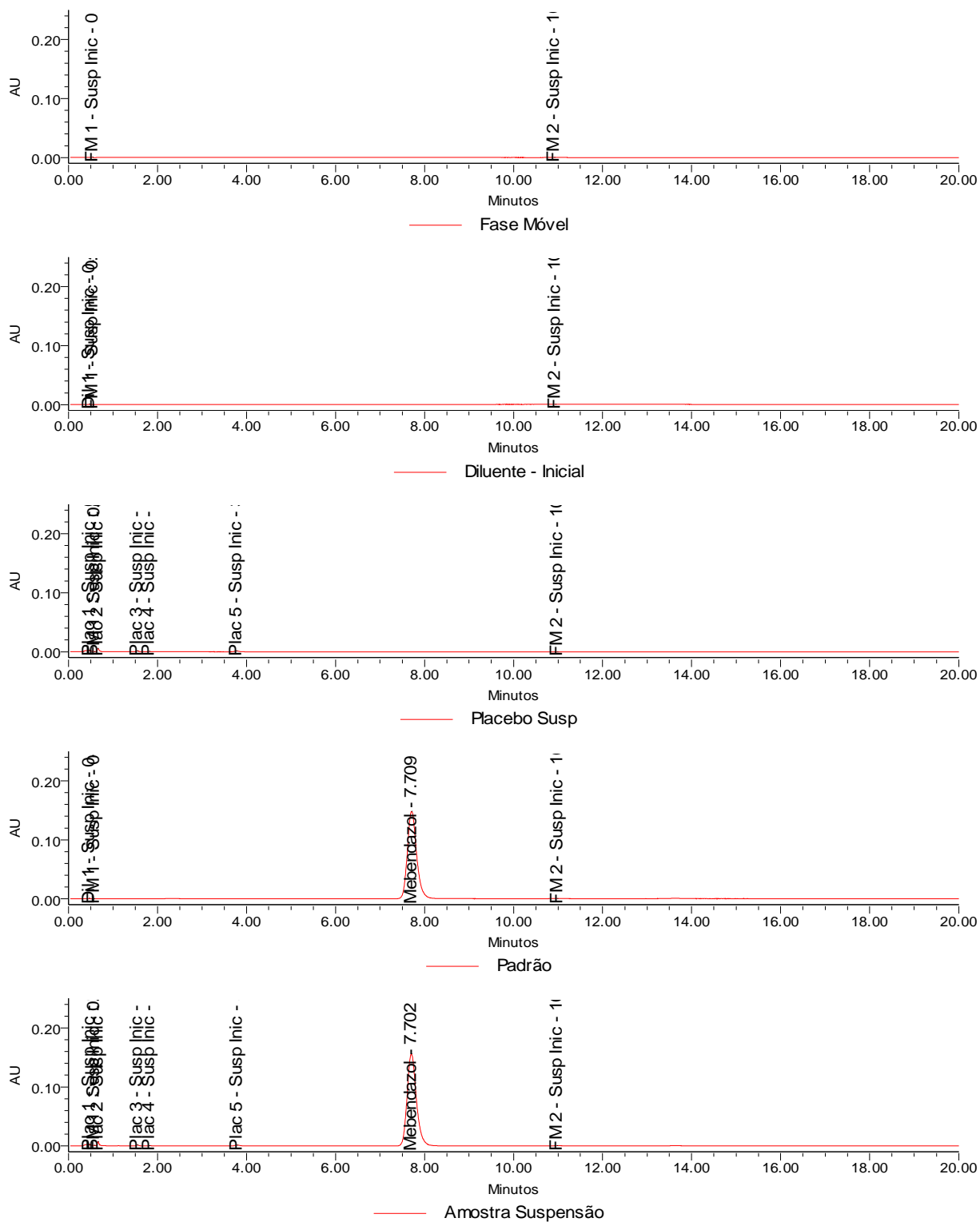


Figura 9 - Cromatogramas dos placebos e amostras dos comprimidos de mebendazol nas concentrações de 100 mg e 500 mg.

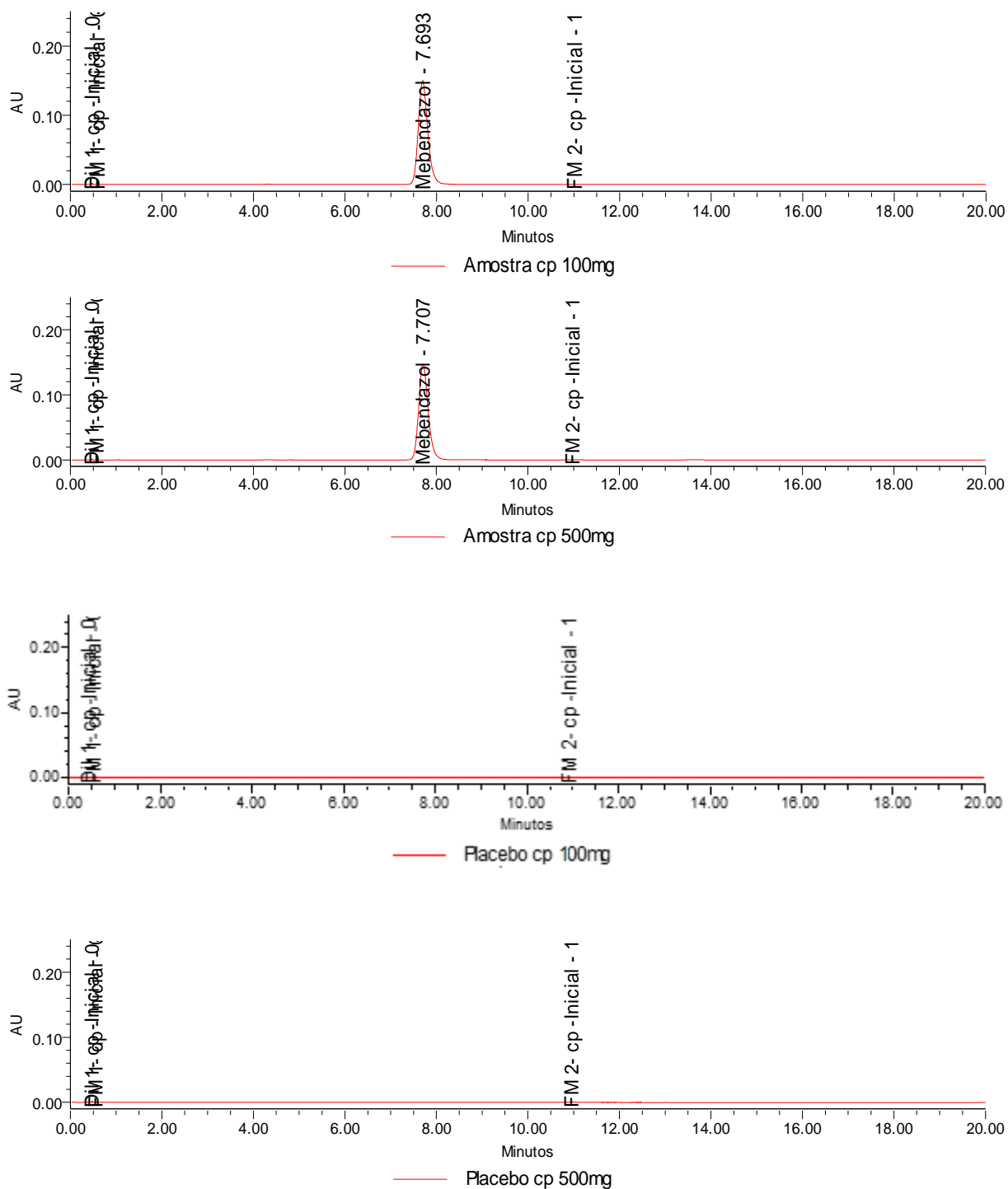


Figura 10 - Cromatogramas das varreduras espectrais realizadas entre 200 e 400 nm das amostras demonstradas na Figura 8.

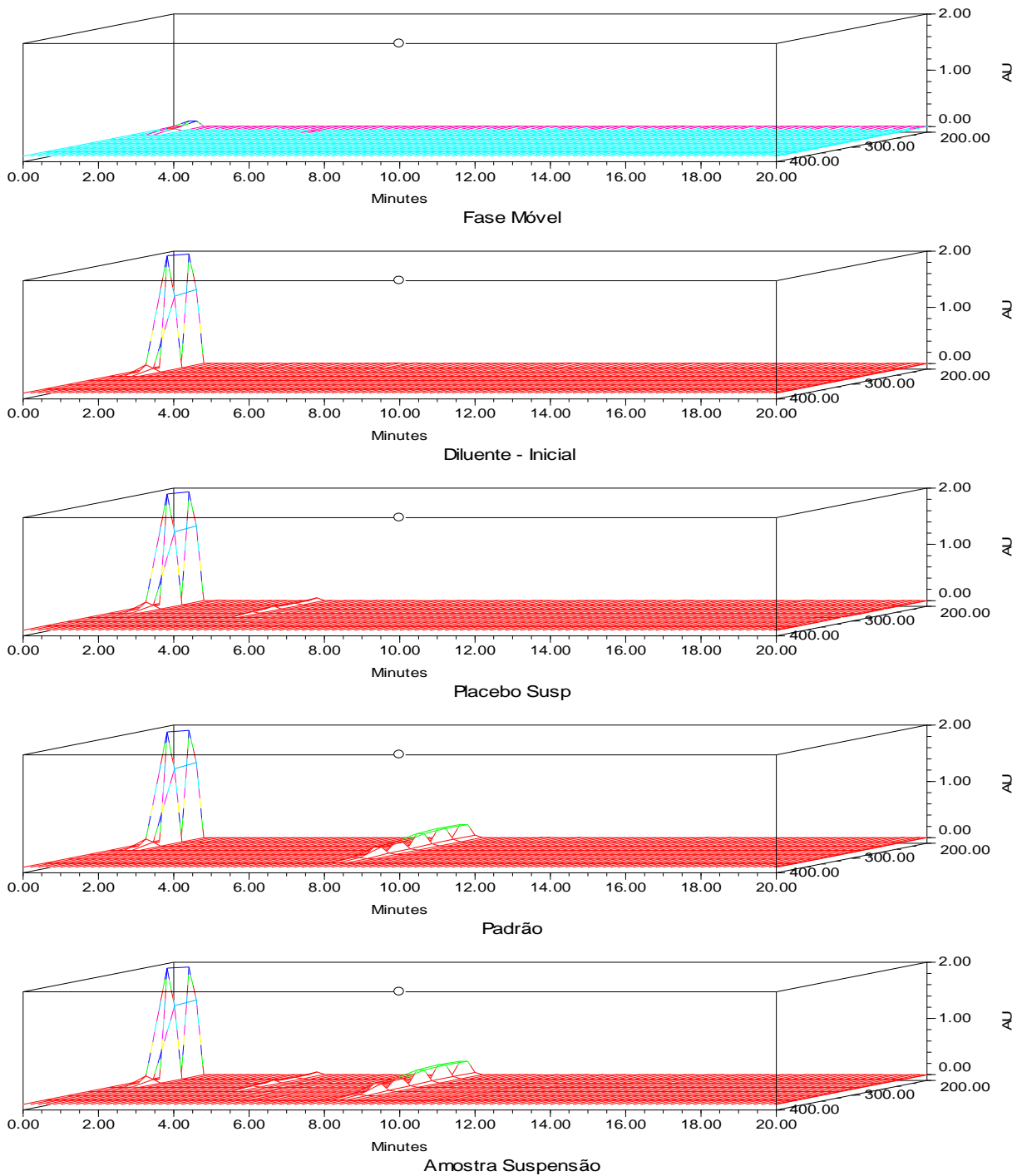
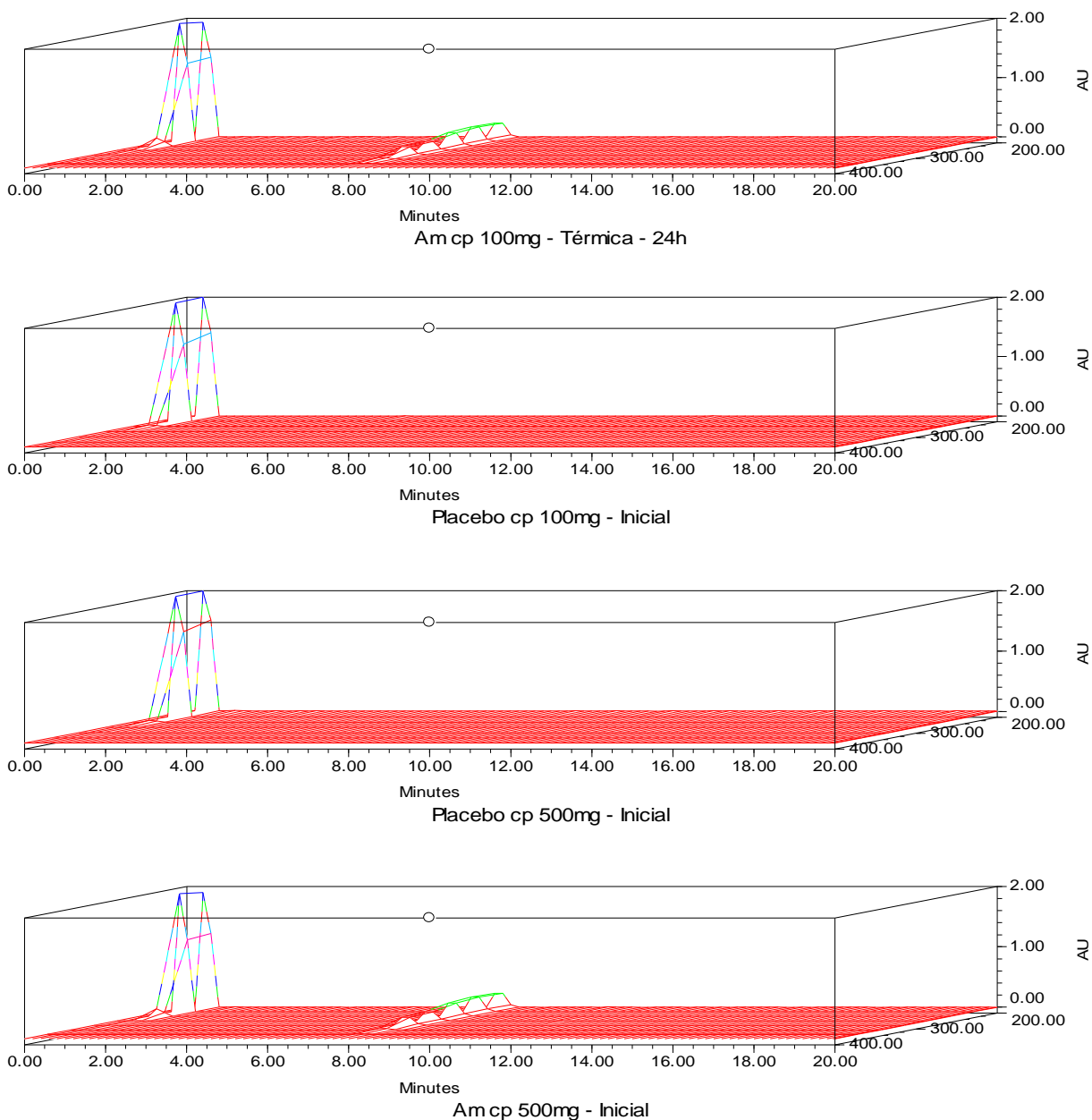


Figura 11 - Cromatogramas das varreduras espectrais realizadas entre 200 e 400 nm das amostras demonstradas na Figura 9. Observa-se que não há interferências de picos secundários juntos ao pico de mebendazol.



Para a determinação da especificidade, são aceitáveis interferências de até 2,0%, mas nas análises não foram encontrados interferentes. Variações de teor de até $\pm 2,0\%$ são consideradas variações intrínsecas do sistema. Foram encontrados valores de teor para o mebendazol de 101,23% para o mebendazol 100 mg/cp, 99,23% para o mebendazol 500 mg/cp e 105,06% para a suspensão 20 mg/mL.

Analisando os teores das soluções submetidas ao estresse, constatou-se que houve perda de teor em todas as condições para a solução padrão e amostra, conforme demonstrados na Tabela 13.

Não houve interferência do placebo ou dos produtos de degradação no tempo de retenção do ativo.

Tabela 13 - Demonstrativo de degradação provocado pelo estresse das soluções padrão, amostras de comprimidos 100mg e 500mg e Suspensão 20 mg/mL.

Condição de Estresse	Degradação %			
	Padrão	Amostra Mebendazol 100mg/cp	Amostra Mebendazol 500mg/cp	Amostra Mebendazol 20mg/mL
1	-3,19	-2,99	-3,06	-2,55
2	-2,23	-3,35	-2,11	-2,88
3	-24,20	-22,82	-20,01	-23,94
4	-10,86	-8,81	-14,11	-10,86
5	-5,66	-6,72	-6,17	-2,88
6	-3,74	-9,79	-3,18	-3,76

Legenda: 1 : Aquecimento; 2 : Hidrólise Ácida; 3 : Hidrólise Básica; 4 : Oxidação; 5 : Fotólise; 6 : Umidade.

Para verificação de possíveis produtos de degradação formados em situações estressantes, as amostras foram submetidas a condições de estresse em temperatura ambiente para as condições ácida, básica e oxidativa. No entanto, fez-se necessário alterar as concentrações dos diluentes ácido e básico, além de utilizar aquecimento para as condições ácida, básica e oxidativa, a fim de se estabelecer melhores resultados de degradação do ativo, resultando nas condições estressantes a que foram submetidas as soluções no estudo de degradação.

Observando as varreduras espectrais do mebendazol nas soluções submetidas ao teste de degradação, verificou-se que o pico de mebendazol permaneceu puro em todas as condições estressantes; isso pode ser constatado pela análise visual e também pelos resultados obtidos no processamento dessas amostras para a pureza de pico. Observou-se ainda que o mebendazol é suscetível a maior degradação nas condições degradantes básica e oxidativa associadas ao aquecimento, pois nestas condições ocorreram maior redução no teor do mebendazol em relação a análise inicial do teor obtido na especificidade.

A caracterização dos produtos de degradação formados não foi objeto de estudo neste trabalho, mas pode ser possível que um dos possíveis produtos que foram formados na degradação seja 2-amino-5-benzimidazol, já que esse produto é obtido com o aquecimento do mebendazol. Nos testes de estresse realizados, apenas a condição umidade não foi submetida ao aquecimento; em todas as demais condições foi necessário utilizar o aquecimento como auxílio para se degradar o mebendazol. A condição estressante umidade, também obteve redução no teor. Durante a exposição do mebendazol nessa condição, não se teve o cuidado de mantê-lo ao abrigo da luz; dessa forma, não é possível afirmar se apenas a condição degradante umidade foi suficiente para promover a degradação do Mebendazol, já que na presença da luz ele é degradado.

Os picos de degradação formados foram os mesmos tanto nas soluções do padrão quanto nas das amostras, pois apresentaram tempo de retenção relativo (TRR) praticamente iguais. Esses valores estão expressos na Tabela 14. Comparando os valores de degradação demonstrados nesta tabela, observa-se que a condição de estresse oxidativo é a que forma um maior quantidade de picos de degradantes e que degradantes mais comuns foram os nomeados com as numerações 6, 7 e 13, com TRR, respectivamente, 0,55, 0,61 e 1,77 em relação ao pico de Mebendazol.

Tabela 14 - Demonstrativo de degradação provocado pelo estresse das soluções padrão, amostras de comprimidos 100mg e 500mg e Suspensão 20 mg/mL.

Componente	TR médio (min)	TRR	Presença nas condições estressantes			
			Padrão	Am 100mg/cp	Am 500mg/cp	Am 20mg/mL
PD 1	0,73	0,09	4	4	4	4
PD 2	0,89	0,12	4	4	4	4
PD 3	1,03	0,13	4	4	4	4
PD 4	2,38	0,31	4	4	4	4
PD 5	3,15	0,41	4	4	4	4
PD 6	4,28	0,55	1,2,3,4,5,6	1,2,3,4,5,6	1,2,3,4,5,6	1,2,3,4,5,6
PD 7	4,76	0,61	2,3,4,5,6	2,3,4,5,6	2,3,4,5,6	2,3,4,5,6
PD 8	5,16	0,66	4	4	4	4
PD 9	5,44	0,70	4	4	4	4
PD 10	5,97	0,77	4	4	4	4
PD 11	7,03	0,91	4,5	4,5	4,5	4,5
PD 12	9,56	1,23	4	4	4	4
PD 13	13,70	1,77	1,2,3,4,5,6	1,2,3,4,5,6	1,2,3,4,5,6	1,2,3,4,5,6
PD 14	15,39	1,98	4	4	4	4

Legenda: PD : Produto de Degradação; Am : Amostra. Descrição da numeração nas condições estressantes: 1 : Aquecimento; 2 : Hidrólise ácida; 3 : Hidrólise básica; 4 : Oxidação; 5 : Fotólise; 6 : Umidade.

5.2.3 Estabilidade de Soluções

Antes do início da validação, foi realizado o teste de estabilidade das soluções analíticas. Este teste foi realizado primeiramente, pois, obtendo-se a informação da estabilidade das soluções padrão e amostras, poderia melhor realizar a programação das injeções das amostras no HPLC. A estabilidade das soluções foi avaliada num período de 24 horas, onde foram injetadas as soluções em intervalos de 2 horas. Os Gráficos 1 , 2 e 3 foram construídos a partir do resultado médio das áreas do padrão e das amostras resultantes nesses intervalos de tempo.

Conforme resultados demonstrados nestes gráficos, as soluções padrão, amostra de Mebendazol Suspensão Oral 20 mg/mL e Mebendazol 100 mg/cp apresentaram estáveis num prazo 24 horas, demonstrando variação inferior a 2,0%, comparada com o resultado inicial (tempo zero); porém, Mebendazol 500 mg/cp apresentou estável em um prazo de 16 horas.

Como a variação aceitável é de $\pm 2,0\%$, sugere-se que as soluções analíticas para as soluções padrão, amostras 100 mg/cp e 20 mg/mL (item 3.5.2) sejam

analisadas em no máximo 24 horas após o preparo, e de 500mg/cp, em até 16 horas, pois neste intervalo de tempo estas soluções demonstram-se estáveis.

Gráfico 1 – Robustez – estabilidade das soluções analíticas (% horas) – Padrão e Mebendazol Suspensão Oral 20mg/mL

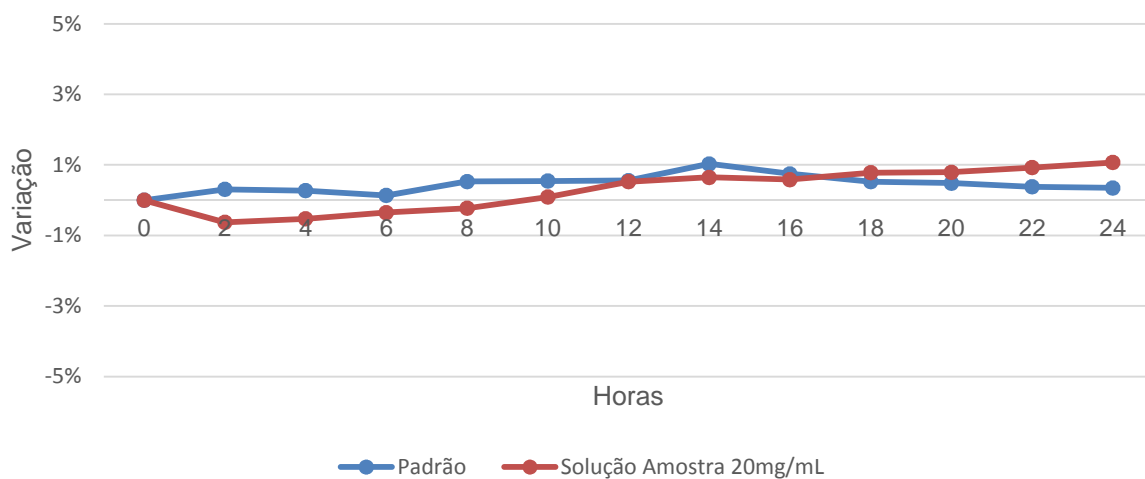


Gráfico 2 - Robustez – estabilidade das soluções analíticas (% horas) – Padrão e Mebendazol 100mg/cp

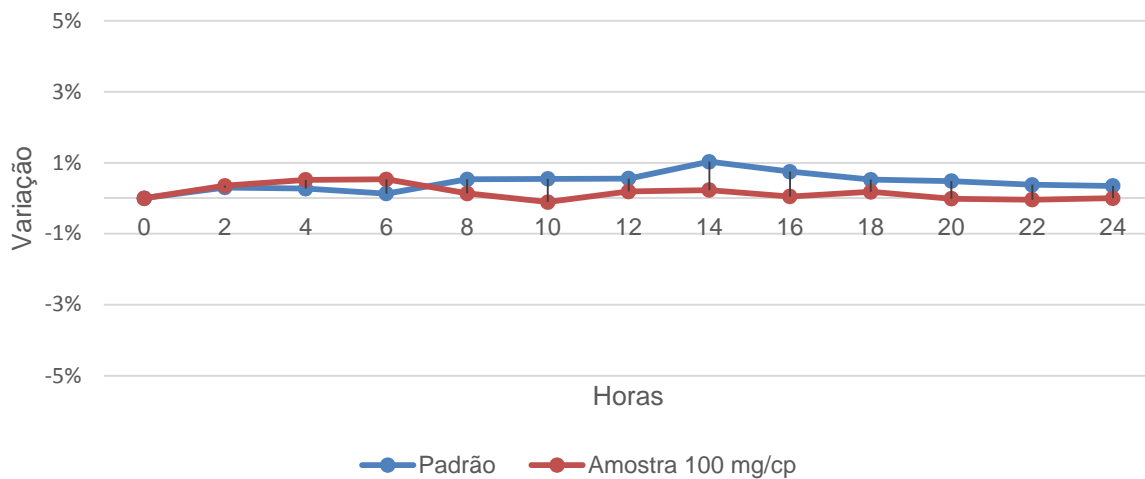
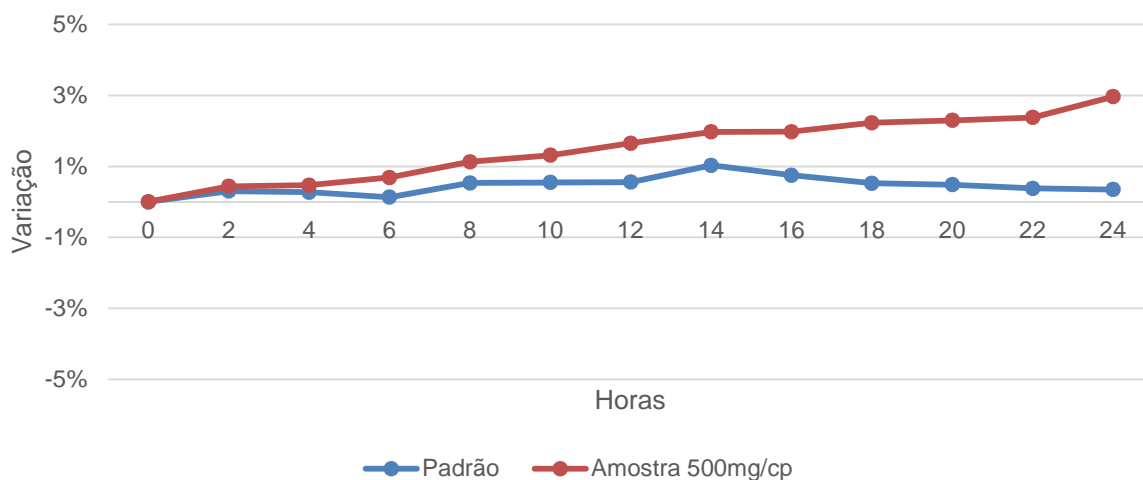


Gráfico 3 - Robustez – estabilidade das soluções analíticas (% horas) – Padrão e Mebendazol Suspensão Oral 500 mg/cp



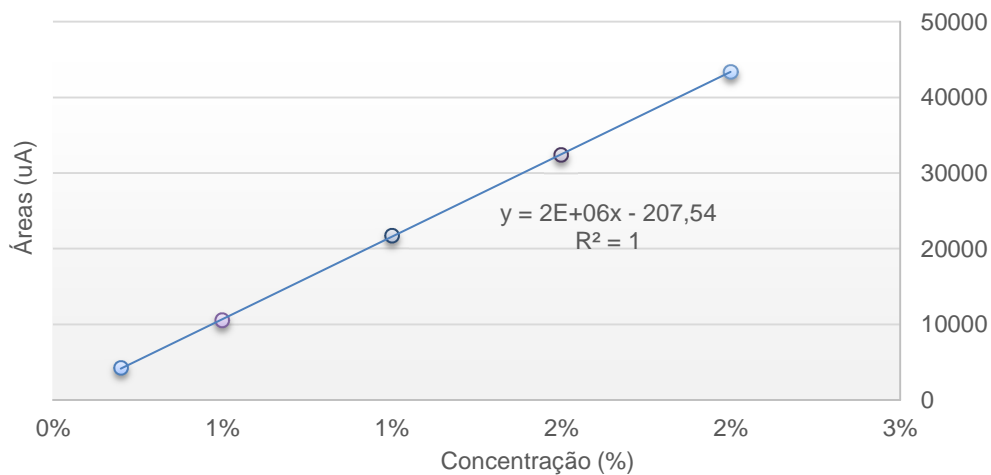
Acredita-se que o Mebendazol 500mg/cp, devido a sua alta concentração de ativo por comprimido, tenha em sua constituição menor quantidade de excipientes capazes de manter a estabilidade por mais tempo comparado as demais formas, Mebendazol 100 mg/cp e Mebendazol suspensão oral 20 mg/mL.

5.2.4 Linearidade

A linearidade do método foi avaliada pelo cálculo do coeficiente de correlação linear, equação da reta e seus resíduos pelo tratamento estatístico dos mínimos quadrados.

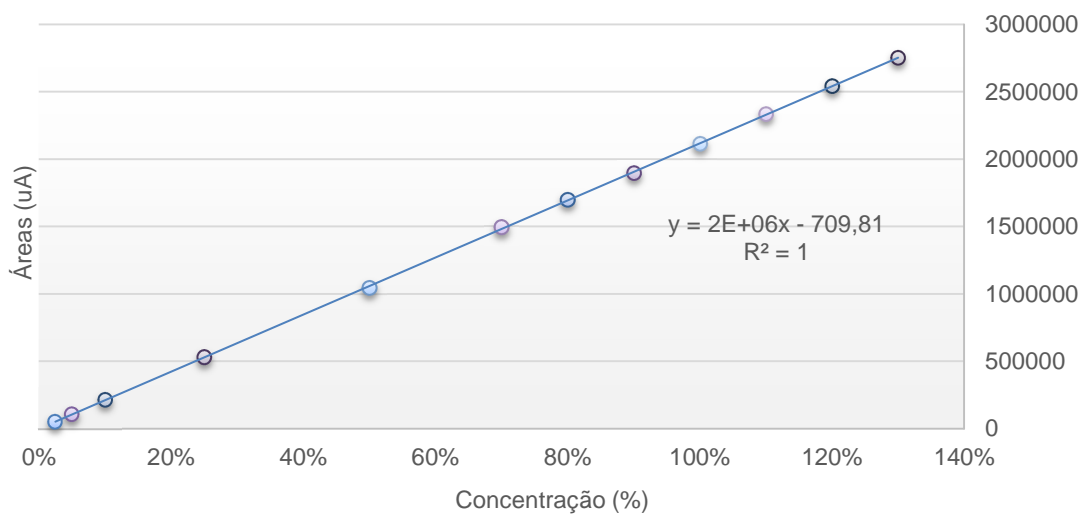
Primeiramente, verificou-se a linearidade no nível mais baixo, no nível das impurezas. As áreas obtidas foram tratadas estatisticamente o valor do coeficiente de correlação linear encontrado foi de aproximadamente 1,0. Foram utilizados os valores obtidos das áreas e da concentração para dar origem ao gráfico 4.

Gráfico 4 – Equação da reta obtida pela regressão linear – Nível de Impureza



A seguir, testou-se a linearidade na concentração do teor, acrescentando pontos entre a concentração do nível de impurezas e no nível do teor. Os valores obtidos deram origem ao gráfico 5. O índice de correlação linear obtido entre as áreas obtidas e concentração foi de aproximadamente 1,0.

Gráfico 5 – Equação da reta obtida pela regressão linear – Nível de Teor



Os coeficientes de correlação linear encontrados para as respostas entre Área e concentração foram superiores a 0,99. De acordo com Kasakevich e Lobrutto (2007), valores de R acima de 0,990 são suficientes para demonstrar a linearidade de uma metodologia analítica para teor de um produto farmacêutico.

5.2.5 Precisão

A verificação da precisão em uma metodologia analítica, dentro das rotinas é de grande importância, pois nela são avaliados os parâmetros de repetibilidade e de precisão intermediária. Assim, as amostras preparadas por analistas diferentes e em dias diferentes devem ter resposta semelhante.

A precisão foi avaliada em dois dias consecutivos, onde diferentes analistas realizaram a preparação de seis amostras cada. Estas amostras foram injetadas, processadas e os resultados das análises transcritos e calculados o DPR. Conforme demonstrado na Tabela 15, os valores de DPR encontrados nas precisões estavam abaixo de 5,0 %.. Este resultado baixo pode ser não só da habilidade dos analistas e do equipamento estar adequado, mas também devido à metodologia desenvolvida ter ficado simples de ser executada, o que era um dos objetivos a ser atingido.

Tabela 15 - Resultados de precisão intermediária

Amostras Mebendazol	Precisão – Dia 1 (%) Analista 1*	Precisão – Dia 2 (%) Analista 2*	Precisão Intermediária (%) *
A	0,47	1,53	1,09
B	0,66	1,73	1,45
C	0,24	0,47	0,61

Legenda: * DPR (%) das múltiplas preparações; A = 20mg/mL; B = 100 mg/cp; C = 500 mg/cp.

5.2.6 Exatidão

A exatidão foi avaliada pela determinação da eficiência da extração dos ativos em uma matriz (placebo) no procedimento de preparação das amostras. Os resultados obtidos em cada nível de concentração possibilitaram a construção dos Gráficos 6 ao 8. Ao observar os resultados, verifica-se que obteve-se êxito no grau

de recuperação, pois os valores obtidos estão dentro da especificação, que é de 98% a 102% (KAZAKEVICH e LOBRUTTO, 2007). Pode-se, portanto concluir que o método é exato no que se propôs ao procedimento para preparação das amostras.

Gráfico 6 – Demonstrativo dos valores de recuperação de Mebendazol suspensão 20 mg/mL

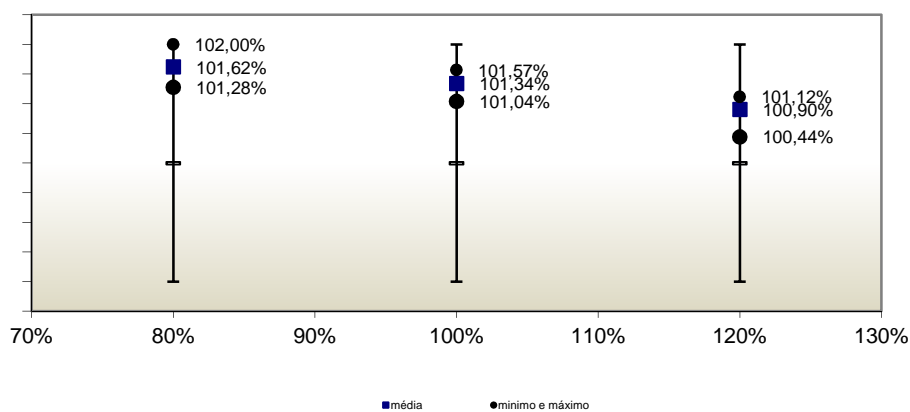


Gráfico 7 - Demonstrativo dos valores de recuperação de Mebendazol 100 mg/cp

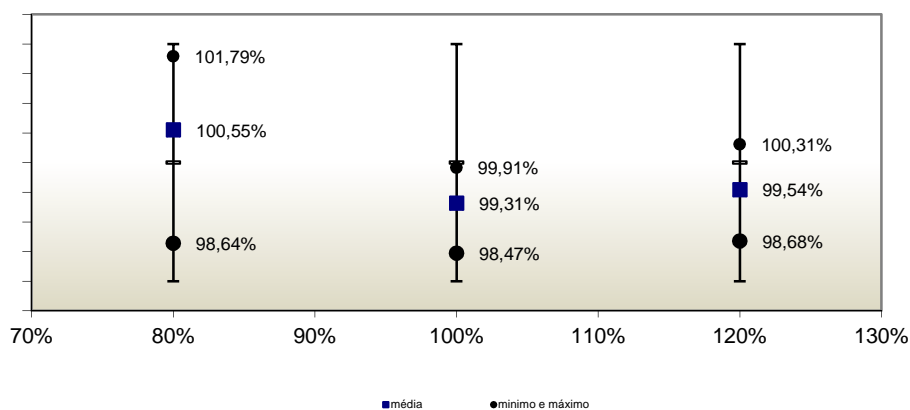
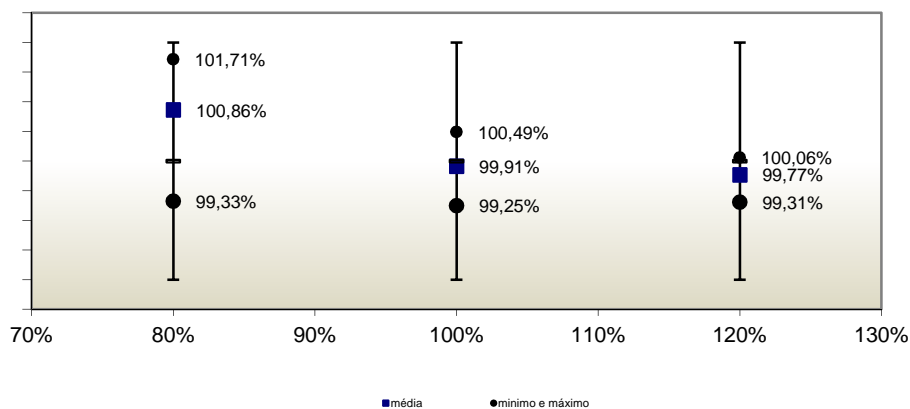


Gráfico 8 - Demonstrativo dos valores de recuperação de Mebendazol 500 mg/cp



5.2.7 Robustez

As propostas de variação em que o método foi submetido possibilitaram verificar que o método se manteve robusto frente às variações nos parâmetros avaliados.

Quando se realizou alteração no volume do fluxo da fase móvel de X,X mL/minuto para X,X mL/minuto, observou-se que o tempo de retenção foi maior e alterando para X,X mL/minuto, observou-se que o tempo de retenção foi menor. A velocidade com que a fase móvel permeia a coluna interfere diretamente na retenção do analito na coluna; quanto maior é a quantidade de solvente interagindo com o analito, maior é a mobilidade do analito na coluna, pois existem mais moléculas do solvente interagindo com o analito e assim, a eluição se torna mais rápida.

Ao realizar-se variações na temperatura do compartimento da coluna de XX°C para XX°C e XX°C, verificou-se que houve redução no tempo de retenção. Isso pode ser explicado pelo fator de capacidade (K'), também denominado fator de retenção. O aumento da temperatura causa um efeito inverso na retenção do analito, ocorrendo diminuição no valor de K' .

Ao verificar a robustez do método quanto a diferentes lotes de coluna, foram utilizadas duas colunas XXXXXX da Merck, com mesmas dimensões e de tamanho

da partícula (XX x XX mm; X µm). Ao variar a marca da coluna, optou-se pela coluna que estava disponível e que havia maior similaridade à coluna anterior que foi a XXXXXXXXX C18 da Waters, com dimensões X,X x XX mm X,X µm. Quando alterou-se a marca da coluna, o tamanho das partículas de sílica eram diferentes; nisto, observou-se que houve redução na eficiência da coluna, determinado por N. Quanto maior o tamanho das partículas da fase estacionária, maior o tamanho dos poros na sílica e conseqüentemente, pode haver alargamento das bandas e menor número de pratos teóricos.

Ao avaliar a alteração no pH da fase móvel de X,X para X,X e X,X, observou-se que praticamente não houve alterações na maioria dos parâmetros, sendo que o parâmetro que teve maior variação foi no tempo de retenção. O mebendazol tem maior interação com a fase móvel, a medida que ela se torna mais ionizada, com menor valor de pH. Tendo maior interação com a fase móvel, diminui a retenção.

Quando alterou-se a composição da fase móvel das proporção de (80 : 20) para (77 : 23) e (83 : 17), acarretou uma competição com os centros ativos da fase estacionária e o sistema passou a reger por meio de valores de outros coeficientes de partição ou pela existência de uma rede complexa de equilíbrios. Quando se utilizou uma mesma coluna, e as mesmas condições cromatográficas foram mantidas, pôde observar alterações no K'.

Nas análises de robustez da membrana filtrante, foram testadas duas marcas distintas. Ao verificar o teor, observou-se que praticamente não houve variação nos resultados, porém observou uma redução no número de pratos teóricos e aumento do valor da simetria. Durante a realização de todos os testes de robustez, a robustez de filtro foi o último teste a ser realizado. Durante a realização da validação com a coluna XXXXX XXXXXXXXXX, o aumento do valor da simetria e a redução do tempo de retenção (em comparação aos mesmos resultados do início dos testes) podem ter sido gerados pela diminuição da eficiência da coluna, devido ao desgaste ocorrido na coluna durante a realização das análises.

Em todas as análises realizadas, observou-se que o método se manteve robusto frente às pequenas alterações propostas, tanto para os resultados obtidos com a solução padrão quanto das amostras de comprimidos 100 mg e 500mg e também para a suspensão 20 mg/mL. Não foi observada nenhuma variação no resultado de teor superior ou inferior a 2,0% da condição original do método.

5.2.8 Limite de Detecção / Quantificação

O limite de detecção e quantificação foi realizado pelo método das três curvas de calibração no nível de impurezas. Para isso, foram preparadas 3 soluções em cada nível de concentração de impurezas e realizada uma injeção de cada solução. As áreas obtidas foram transpostas para planilha eletrônica e efetuado o tratamento estatístico. Os valores calculados para o limite de detecção e de quantificação demonstram considerável margem de segurança obtendo-se os valores calculados de 0,000008 mg/mL para o nível de detecção e 0,000028 mg/mL para o nível de quantificação.

A menor concentração da solução preparada para o nível de impurezas foi de X,XXX mg/mL e o valor de sensibilidade do método calculado para detecção de impurezas ficou abaixo do valor proposto, indicando que o método é sensível mesmo em concentrações menores que 0,001 mg/mL.

A representação dos resultados obtidos com a das três curvas estão demonstrados nos gráficos 9 a 11. Nesses gráficos percebe-se que mesmo em concentrações mais baixas, a metodologia apresenta resposta linear.

Gráfico 9 – Resultados obtidos com a curva 1 no nível de impurezas

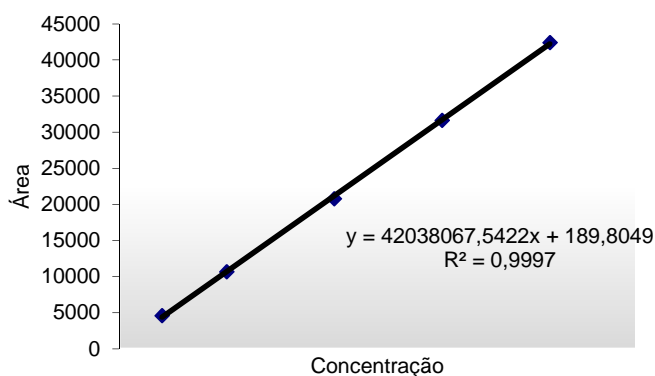


Gráfico 10 – Resultados obtidos com a curva 2 no nível de impurezas

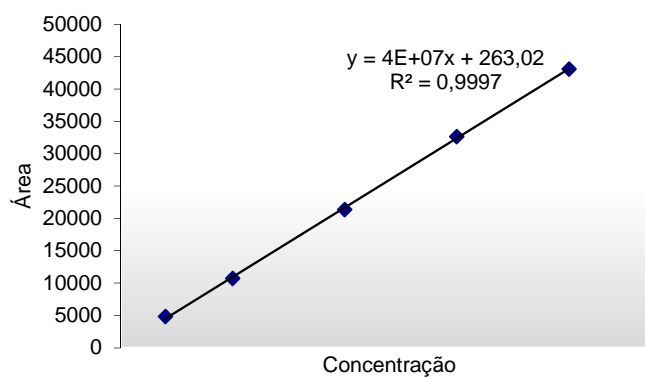
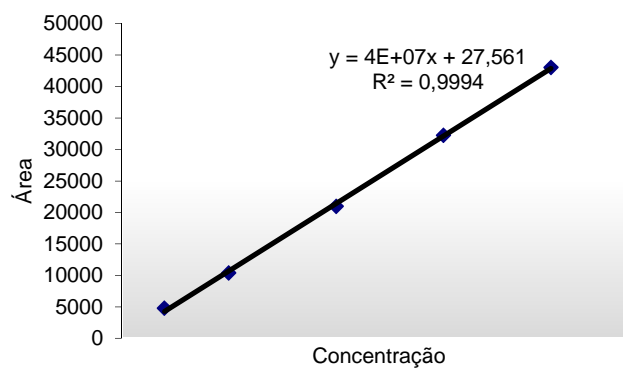


Gráfico 11 – Resultados obtidos com a curva 3 no nível de impurezas



6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os itens avaliados para especificidade / seletividade apresentaram-se dentro dos limites aceitáveis sendo que o diluente, a fase móvel, o placebo e os picos secundários atribuídos a produtos de degradação formados pelo estresse das amostras não apresentaram interferência no tempo de retenção do analito, indicando ausência de interferências detectáveis. Desta forma, pode-se afirmar que o método é específico / seletivo sendo capaz de medir o analito em presença de outros componentes. Além disso, a análise de pureza do pico demonstrou que o pico é puro e homogêneo, uma vez que o *Purity Angle* (PA) foi menor que o *Threshold* (TH) em todos os cromatogramas que contém o ativo, o que significa que o pico cromatográfico do analito é puro e não é atribuível a mais de um componente. O método proposto apresentou resposta linear mesmo em concentrações mais baixas.

O conhecimento das condições de degradação do mebendazol pode ser utilizado como ponto de partida para a melhoria de novas formulações e materiais de embalagem mais eficientes. Os produtos de degradação do mebendazol foram marcados pelo tempo de retenção relativo em relação ao pico principal, do mebendazol, no cromatograma. As médias dos valores obtidos para cada pico de degradante formado foram: 0,09; 0,12; 0,13; 0,31; 0,41; 0,55; 0,61; 0,66; 0,70; 0,77; 0,91; 1,23; 1,77; 1,98.

A fase móvel, desenvolvida com reagentes voláteis possibilitou a otimização das condições de análise no HPLC; uma vez que sais não eram precipitados nas tubulações, medidas periódicas de limpeza do sistema não precisaram ser tão frequentes, possibilitando a realização de sequências programadas mais longas. O tempo de análise também foi reduzido, através da combinação dos reagentes utilizados na fase móvel e também devido à redução no tamanho da coluna e nas partículas de sílica de sua composição. Conforme CIOLA (1998), na cromatografia a líquido, a fase móvel tem um papel extremamente importante, pois rege a distribuição de compostos entre duas fases, na ordem e tempo de eluição dos picos.

Foi possível o desenvolvimento e a validação de uma única metodologia analítica indicativa de estabilidade para o Mebendazol comprimidos e suspensão oral, 100 e 500 mg / comprimido e 20 mg/mL, respectivamente. A utilização de uma única metodologia foi extremamente útil para analisar o comportamento do

mebendazol frente às diferentes matrizes do medicamento. Isso possibilitou melhor avaliação dos resultados obtidos dos produtos de degradação nas análises de estudo de estabilidade de medicamentos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABAR. **Saneamento Básico - Regulação 2013**. Disponível em: <abar.org.br:http://abar.org.br/images/stories/pdf/saneamento-basico-regulacao-2013.pdf> Acesso em: 20 mai 2015.
- ADAMOVICS, J. A. **Chromatographic Analysis of Pharmaceuticals**. New York: Marcel Dekker, 1997.
- ADMINISTRATION, F. **Guidance for Industry Q3B (R2) Impurities in new drug products**. Rockville, MD, 2006.
- AL-KURDI, Z. et. al. **High performance liquid chromatography method for determination of methyl-5-benzoyl-2-benzimidazole carbamate (mebendazole) and its main degradation product in pharmaceutical dosage forms**. The Jordanian Pharmaceutical Manufacturing and Medical Equipment Co., Jordan Department of Chemistry, King Fahd University of Petroleum and Minerals. ELSEVIER, Talanta. Dharan, Saudi Arabia, 1999, p. 1089–1097.
- ALMAGRO, I.; ANDRES, M. S.; VERA, S.. **Determination of water-soluble vitamins in pharmaceutical preparation by reversed-phase high-performance liquid chromatography with a mobile phase containing sodium dodecylsulphate and n-propanol**. Chromatography. 2002, pp. 185-188.
- ANAND, G. et al.. **Early use of high-dose riboflavin in case of Brown-Vialetto-Van Laere syndrome**. Developmental Medicine & Child Neurology, 2011 pp. 187-189.
- ANVISA. **Farmacopeia Brasileira**. Volume 1, Editora Fiocruz, 5ª Edição, Brasília, 2010.
- ANVISA. **Farmacopeia Brasileira**. Volume 2, Editora Fiocruz, 5ª Edição, Brasília, 2010.
- ANVISA. **Insumos Farmacêuticos**. Revista Saúde Pública, 2006, p. 359-360.
- ANVISA. **Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003**.
- ANYAKORA, C. et. al. **HPLC analysis of nicotinamide, pyridoxine, riboflavin and thiamin in some selected food products in Nigeria**. African Journal of Pharmacy and Pharmacology, 13 mar 2008, 2(2), pp. 29-36.
- ARGETON, A. **Conceitos fundamentais de Cromatografia a Líquido de Alto Desempenho (HPLC)**. São José do Rio Preto: Conselho Regional de Química IV Região (SP), 2010 – Apoio: Caixa Econômica Federal.
- ÁRTICO, A. E.; GARCIA, M. R.; FELLET, R. L. **Biologia para Enfermagem**. Artmed, São Paulo 2015.
- BALL, G. F. **Vitamins - Their role din the human body**. Oxford - UK: Blackwell Publishing, 2004.
- BARBOSA, V. A.; VIEIRA, F. **O Educação sanitária como prática de prevenção de parasitoses intestinais em creches**. Instituto Metodista Izabela Hendrix, 2013.
- BASF. **Products for the food and pharmaceutical industry**. Singapore: Basf Corporation, 2003.

BETHONY, J. R. et al. **Soil-transmitted helminth infections: ascariasis, trichuriasis, and hookworm.** The Lancet, 367, 2006, p. 1521-1532.

BISHOP, A. M. et al. **Quantification of riboflavin in human urine using high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry.** Journal of Chromatography B, 6 mai 2011, p. 1823-1826.

BORGES, E. M.; BOTTOLI, C. B.; COLLINS, C. H. **Possibilidades e Limitações do uso da Temperatura em Cromatografia Líquida de Fase Reversa.** Química Nova, abr 2010, p. 945-953.

BORGES, E. M.; GORAIEB, K.; COLLINS, C. H. **O desafio de analisar solutos básicos por cromatografia líquida em modo reverso: Algumas alternativas para melhorar as separações.** Química Nova, 2012, 35(5), p. 993-1003.

BOWLING, F. G. **Pyridoxine supply in human development.** Seminars in Cell & Developmental Biology, 2011, p. 611-618.

BRASIL. **Dispõe sobre o controle sanitário do comércio de drogas, medicamentos, insumos farmacêuticos e correlatos, e dá outras providências.** Lei Nº 5.991, 1973

BRASIL. **RDC 899 de 29 de Maio de 2003.** ANVISA, 2003

BRASIL. **RE nº1. RE nº1 de 29 de julho de 2005.** ANVISA, 2005.

BRASIL. **Mebendazol.** In: A. N. Sanitária, Farmacopeia Brasileira (Vol. 2, pp. 1120-1121). FIOCRUZ, Brasília, 2010.

BRASIL. **Dispõe sobre a realização de estudos de estabilidade de insumos farmacêuticos ativos.** RDC 45, 2012.

BRASIL. **RDC nº 45, de 09 de Agosto de 2012.** ANVISA, 2012.

BRASIL. **RDC nº 58 de 20 de Dezembro de 2013.** ANVISA, 2013.

BRASIL, T. (s.d.). **Trata Brasil Saneamento é saúde.** Disponível em: <<http://www.tratabrasil.org.br/diagnostico-da-situacao-dos-planos-municipais-de-saneamento-basico-e-da-regulacao-dos-servicos-nas-100-maiores-cidades-brasileiras-3>> Acesso em: 20 mai 2015.

BRYN, S. **Pharmaceutical solids: A strategic approach to regulatory considerations.** Pharmaceutical Review, 1995, n.7, p. 945-954.

BUSZEWSKI, B.; ZBANYSZEK, W. **Determination of different solubility vitamins in pharmaceutical preparations. I. HPLC column switching.** Journal of Liquid Chromatography & Related Technology, 2002, p. 1229-1241.

CAÑETE, R. et al. **Mebendazole in parasitic infections other than those caused by soil-transmitted helminthes.** Elsevier, 2009, p. 437-442.

CARVALHO, J. P. et al. **Estabilidade de Medicamentos no Âmbito da Farmacovigilância.** Revista Fármacos e Medicamentos, 2005, p. 22-27.

CASS, Q. B.; DEGANI, A. L. **Desenvolvimento de Métodos por HPLC: Fundamentos, Estratégias e Validação.** UFSCar, 2001.

CASTELLI, et al. **Pharmacokinetics of Oral Cyanocobalamin Formulates With Sodium N-[8-(2-hydroxybenzoyl)amino]carylate (SNAC): An Open-Label,**

Randomized, Dingle-dose, Parallel-Group Study in Healthy Male Subjects. Clinical Therapeutics, 2011, No.7, p. 934-945.

CASTIÑEIRAS, T. M.; MARTINS, F. S. **Infecções por helmintos e enteroprotzoários.** CIVIS, 2003.

CHEMSPIDER. 2013. Disponível em: <<http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.3890.html?rid=db46a1c8-6a15-43b0-b62c-930180258502>> Acesso em: 5 fev 2015.

CHEN, P.; WOLF, W. R. **LC/UV/MS-MRM for the simultaneous determination of water-soluble vitamins in multi-vitamin dietary supplements.** Analytical and bioanalytical chemistry, 2007, p. 2441-2448.

CIOLA, R. **Fundamentos da Cromatografia a Líquido de Alto Desempenho** HPCL, 1998.

COATS, D.; SHELTON-DODGE, K.; OU, K. **Thiamine Deficiency in Cambodian Infants with end without Beriberi.** The Journal of Pediatrics, 2012, No.5, p. 843-847.

COLLINS, C.; BRAGA, G.; BONATO, P. **Introdução a métodos cromatográficos.** 6 ed., Unicamp, 1995.

COMBS, G. F. **The Vitamins: Fundamental Aspects in Nutrition and Health.** Elsevier Academic Press, San Diego - California, 2008.

COSTA, H. M. Helmintos, In: D. P. NEVES. **Parasitologia Humana.** Ed. Atheneu, 11ª Edição ed, São Paulo, 2004.

DELGADILLO, J.; AYALA, G. **Efectos de al deficiencia de riboflavina sobre el desarrollo del tejido dentoalveolar, en ratas.** Anales de la Facultad de Medicina, 2009, p. 19-27.

DRUGBANK. 2014. Disponível em: <<http://www.drugbank.ca/drugs/DB00643>> Acesso em: 10 abr 2015.

FARMACOPEIA BRITÂNICA. **British Pharmacopea.** Volume 2, London: The Stationery Office

FARMACOPEIA EUROPEIA. **European Pharmacopea.** Volume 2, 6ª Edition, Council of Europe, Stranbourg, 2013.

FARMACOPEIA MEXICANA. **Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos.** Nova Edición, Volume I, Secretaria de la Salud, Mexico, 2000.

FAUCI, A. S.; LONGO, D. L. **Gastroenterologia e Hepatologia de Harrison.** (AMGH, Trad.) McGraw-Hill Global Education Holdins, New York, 2013.

FOTSING, L. et. al. **Determination of six water-soluble vitamins in a pharmaceutical formulation by capillary electrophoresis.** Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 1997, p. 1113-1123.

FRIEDMAN, A. J.; ALI, S. M.; ALBONICO, M. **Safety of a New Chewable Formulation of Mebendazole for Preventive Chemotherapy Interventions to Treat Young Children in Countries with Moderate-to-High Prevalence of Soil Transmitted Helminth Infections.** Journal of Tropical Medicine, 2012.

GARMONOV, S. Y. et al. **Assay of ascorbic acid, thiamine, riboflavin, niacin, and pyridoxine in "Hexavit" by HPLC.** Pharmaceutical Chemistry Journal, 2011, p. 440-443.

GAZANION, E. et al. **In vitro activity of nicotinamide/antileishmanial drug combinations.** Parasitology International, 2011, p. 19-24.

GILPIN, R. K. **Pharmaceutical and Related Drugs.** Analytical Chemistry, 15 Jun 1999, p. 217R-233R.

GUIOCHON, G. **Basic principles of Chromatography.** Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, 6 ed., 2002.

HAMPEL, D.; YORK, E. R.; ALLEN, L. H. **Ultra-performance liquid chromatography tandem mass-spectrometry (UPLC-MS/MS) for the rapid, simultaneous analysis of thiamin, riboflavin, flavin adenine dinucleotide, nicotinamide and pyridoxal in human milk.** Journal of Chromatography B, 21 Jun 2012, p. 7-13.

HARHAY, M. O.; HORTON, J.; OLLIARO, P. L. **Epidemiology and control of human gastrointestinal parasites in children.** National Institutes of Health, 2010.

HARRIS, D. C. **Análise Química Quantitativa.** LTC, 6 ed., Rio de Janeiro, 2005.

HAWLEY, G. G. **Condensed chemical dictionary.** Van Nostrand Reinhold, New York, USA, 1987.

INMETRO. Junho de 2007. Disponível em: <http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8_02.pdf> Acesso em: 13 fev 2015.

IVANOCIC, D. et al. **Reversed-phase ion-pair HPLC determination of some water-soluble vitamins in pharmaceutical.** Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 1999, p. 999-1004.

KAUFFMAN, G. et al. **Thiamine Deficiency in ill Children.** The American Journal of Clinical Nutrition (doi: 10.3945/ajcn.111.018457), 2012, p. 616.

KAZAKEVICH, Y.; LOBRUTTO, R. **Stationary Phases.** In: HPLC for Pharmaceutical Scientists. New Jersey, The United States of America. 2007, p. 100-101.

KEISER, J.; UTZINGER, J. **The Drugs We Have and the.** In: **Advances in Parasitology Vol. 73.** Elsevier, 2010.

KLEJDUS, B. et al. **Simultaneous determination of water- and fat-soluble vitamin in pharmaceutical preparations by high-performance liquid chromatography coupled with array detection.** Analytica Chimica Acta, 2004, p. 57-67.

KOGIEN, M.; TEIXEIRA, C. A. **Mebendazol no tratamento de helmintíases intestinais – revisão de literatura e considerações de Enfermagem.** Enfermeria Global, 2011.

KRUMOVA, K.; FRIEDLAND, S.; COSA, G. **How lipid Unsaturation, Peroxyl radical Partitioning, and Chromanol Lipophilic Tail Affect the Antioxidant Activity of α -Tocopherol: Direct Visualization via High-Throughput Fluorescence Studies Conducted with Fluorogenic α -Tocopherol Analogues.** Journal of the American Chemical Society, 2012, p. 10102-10113.

KUMINEK, G. et al. **High-Performance Column Liquid Chromatographic Method for Simultaneous Determination Of Buclizine, Tryptophan, Pyridoxine, and Cyanocobalamin in Tablets and Oral Suspension.** *Journal of AOAC International*, 2011, p. 1785-1790.

LACEY, E. **Mode of Action of Benzimidazoles.** In: E. LACEY, *Parasitology Today*, Vol. 6, 1990.

LEVIN. **Considerations in Peak Purity.** Disponível em: <http://www.forumsci.co.il/HPLC/PEAK_PUR_web.pdf> Acesso em: 1 mai 2015.

LEVINSON, W. **Microbiologia Médica e Imunologia** Mc Graw Hill Education. (B. R. al., Trad.). 12 ed, Porto Alegre, 2014

LI, H. B.; CHEN, F. **Simultaneous determination of twelve water- and fat-soluble vitamins by high-performance liquid chromatography with diode array detection.** *Chromatographia*, ago 2001, p. 270-273.

LI, H.-B.; CHEN, F.; JIANG, Y. **Determination of vitamin B12 in multivitamin tablets and fermentation medium by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection.** *Journal of Chromatography A*, 2000, p. 243-247.

LI, K. **Simultaneous determination of nicotinamide, pyridoxine hydrochloride, thiamine mononitrate and riboflavin in multivitamin with minerals tablets by reversed-phase ion-pair high performance liquid chromatography.** *Biomedical Chromatography*, 2002, p. 504-507.

LOBATO, L. et. al. **Desenvolvimento de habilidades cognitivas de crianças afetadas por helmintos através da educação em saúde.** *Revista da sociedade brasileira de medicina tropical*, Julho-Agosto 2012, p.514-519.

LU, J.; FRANK, E. L. **Rapid HPLC Measurement of Thiamine and Its Phosphate Esters in Whole Blood.** *Clinical Chemistry - Automation and Analytical Techniques*, 2008, p. 901-906.

MCCALLEY, D. V. **The challenges of the analysis of basic compounds by high performance liquid chromatography: Some possible approaches for improved separations.** *Journal of Chromatography A*, 2010, p. 858-880.

MEHTA, P. N. **Drugs for intestinal helminths.** Elsevier. *Pediatric Infectious Disease*, 2013, p. 22-25.

MILLER, G. W. et al. **The α -Tocopherol Transfer Protein Is Essential for Vertebrate Embryogenesis.** *Plos One*, Out 2012, p. 1-9.

MONDRAGÓN, P. A.; VÁZQUEZ, O. L.; ROMERO, R. Á. **Development and validation of an HPLC Method for the Determination of Thiamine and Riboflavin in Green Leafy Vegetables Using Clara-Diastase.** *Journal of Food Science*, 2011, p. 639-642.

MORENO, P.; SALVADÓ, V. **Determination of eight water- and fat-soluble vitamins in multi-vitamin pharmaceutical formulation by high-performance liquid chromatography.** *Journal of Chromatography*, 2000, p. 207-215.

MULHOLLAND, M.; DOLPHIN, R. **Analysis of the fat-soluble vitamins using narrow-bore high-performance liquid chromatography with multichannel UV-VIS detection.** *Journal of Chromatography*, 1985, p. 285-291.

NEVES, D. P. Glossário. In: D. P. NEVES. **Parasitologia Humana**. 11ª Edição, Editora Atheneu. São Paulo, 2004.

NOVÁKOVÁ, L.; MATYSOVÁ, L.; SOLICH, P. **Advantages of application of UPLC in pharmaceutical analysis**. Talanta, 27 jul 2005, p. 908-918.

NUNES, A. M. **Validação de Métodos Analíticos**. Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil, 2010.

O'NEIL, M. J. et. al. **The Merck Index: an Enciclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals**. The Royal Society of Chemical, 2013.

ORTIZ, M. P. et. al. **Déficit de cianocobalamina que simula una enfermedad de Creutzfeldt-Jakob**. Neurologia, 2011, p. 307-318.

PETERS, F. T.; DRUMMER, O. H.; MUSSHOFF, F. **Validation of new methods. Forensic Science International**. 6 jun 2006, p. 216-224.

PLANALTO. **Presidência da República**. (s.d.).11.445, L. N. (5 de janeiro de 2007). Disponível em: <www.planalto.gov.br: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2007/lei/l11445.htm> Acesso em: 20 mai 2015.

RESOLUÇÃO-RE Nº 899. **RESOLUÇÃO-RE Nº 899, DE 29 DE MAIO DE 2003**. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/4983b0004745975da005f43fbc4c6735/RE_899_2003_Determina+a+publica%C3%A7%C3%A3o+do+Guia+para+valida%C3%A7%C3%A3o+de+m%C3%A9todos+anal%C3%ADticos+e+bioanal%C3%ADticos.pdf?MOD=AJPERES> Acesso em: 12 jan 2015.

REMOLO, C. **Fundamentos da Cromatografia a Líquido de Alto Desempenho – HPLC**. Edigard Blucher Ltda, 1998.

RIBANI, M. **Validação em Métodos Cromatográficos e Eletroforéticos**. Química Nova, 2004, p. 771-780.

ROBBINS; COTRAN. **Patologia: Bases Patológicas das Doenças**. Elsevier, Rio de Janeiro: (2004).

SAKODYNSKII, K.; CHMUTOV, K. M. S. **Tswett and Chromatography**. Chromatographia, 1972, p. 471-476.

SHABIR, G. A. **Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis: Understanding the differences and similarities between validation requirement of the US FDA, USP and ICH**. Journal of Chromatography A, 2003, p. 57-66.

SILVA, C. A. et al. **Condições de saneamento e a incidência de parasitoses intestinais como fatores de risco para o baixo rendimento escolar**. Revista Trabalhos Acadêmicos da Universidade Salgado de Oliveira, 2010.

SILVA, C. R.; JARDIM, I. C.; AIROLDI, C. H. **Novas Fases Estacionárias à Base de Sílica para Cromatografia Líquida de Alta Eficiência**. Química Nova, 2004, p. 270-276.

SINGH, V. P.; POON, J.-f.; ENGMAN, L. **Turning Pyridoxine into a Catalytic Chain-Breaking and Hydroperoxide-Decomposing Antioxidant**. The Journal of Organic Chemistry, 14 jan 2013, p. 1478-1479.

SINGHAL, D.; CURATOLO, W. **Drug polymorphism and dosage form design: a practical perspective**. *Adv Drug Deliv Rev*, 2004, p. 335-347.

SOFIA, F. et. al. **Protocolo de parasitoses intestinais**. *Acta Pediátrica Portuguesa Sociedade Portuguesa de Pediatria*, Portugal, 2012, p. 35-41.

SWARTZ, M. E. **Contemporary liquid chromatographic systems for method development**. *Separation Science and Technology*, 2008, p. 145-187.

SWEETMAN, S. C.. *Martindale*, 2005.

TAVERNIERS, I.; LOOSE, M. D.; BOCKSTAELE, E. V. **Trends in quality in the analytical laboratory, II. Analytical method validation and quality assurance**. *Trends in Analytical Chemistry* vol.23, 2004, p. 535-550.

UNGCHAROENSUK, C. et. al. **Sequence conservation in the Ancylostoma secreted protein-2 of Necator americanus (Na-ASP-2) from hookworm infected individuals in Thailand**. *Infection, Genetics and Evolution*, 2012, p. 1926-1932.

USP35. **Validation of compendial Methods**. NF31 Volume I. The United States Pharmacopeia The National Formulary. Official from May 1, 2013

USP36. **Mebendazole**. NF31 Volume III. The United States Pharmacopeia The National Formulary. Official from May 1, 2013

VILLERS, M. M. **Variable-temperature X-ray powder diffraction analysis of the crystal transformation of the pharmaceutically preferred polymorph C of mebendazole**. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2005 p. 435-441.

VIÑAS, P.; LÓPEZ, I. **Dispersive liquid-liquid microextraction coupled to liquid chromatography for thiamine determination in foods**. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 15 fev 2012, p. 1059-1066.

VIPPAGUNTA, S.; BRITTAIN, H. G.; GRANT, D. J. **Crystalline solids**. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2001, p.3-26.

WASHABAUGH, et. al. **Mechanism of Hydrolysis of a Thiazolium Ion: General Acid-Base Catalysis of the Breakdown of the Tetrahedral Addition Intermediate**. *Bioorganic Chemistry*, 1992 p. 296-312.

WATERS. **Processo de separação cromatográfica**. Disponível em: <http://www.waters.com/waters/pt_BR/How-Does-High-Performance-Liquid-Chromatography-Work%3F/nav.htm?locale=pt_BR&cid=10049055> Acesso em 25 jun 2013.

WATERS, C. B. **Fundamentos da Cromatografia Líquida**. Revisão 07 ed. Brasil: Waters - The Science of what's Possible, 2007.

WHO. **Soil-transmitted Helminth Infections**. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs366/en/>> Acesso em: 10 out. 2014.

WIELINSKI, S.; OLSZANOWSKI, A. **Simultaneous determination of retinol acetate, retinol palmitate, cholecalciferol, alpha-tocopherol acetate and alpha-tocopherol in capsules by non-aqueous reversed-phase HPLC and column backflushing**. *Chromatographia* Vol.50, p. 109-112.

WILLIAMS, A. **Lessons From Pellagra**. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, doi: 10.1136/Jnnp-2011-300645.17, 2011, p. 4-5.

WILLIAMS, D. A.; LEMKE, T. L. **Foye's Principles of Medicinal Chemistry** 6^a ed., Baltimore and Philadelphia, 2008.

WREN, S. A.; TCHELITCHEFF, P. **Use of ultra-performance liquid chromatography in pharmaceutical development.** Journal of Chromatography A, 2006, p. 140-146.

YAGI, T. et. al. **Contents of All Forms of Vitamin B6, Pyridoxine-b-Glucoside e 4-Pyridoxic Acid in Mature Milk of Japanese Women according to 4-Pyridoxolactone-Conversion High Performance Liquid Chromatography.** Journal of Nutritional Science and Vitaminology , 2013, p. 1-15.

APÊNDICES

APÊNDICE A - TABELAS

Tabela 1. A - Resultados de adequação do sistema

Parâmetro	Especificação	Resultado
Desvio Padrão Relativo (DPR)	≤ 2,0%	0,10 %
Número de Pratos Teóricos (N)	Informativo	7170,4
Fator de Cauda (T)	Aproximadamente 1	1,21
Tempo de Retenção	Informativo	7,68

Tabela 2 A -. Resultados de especificidade / seletividade – Mebendazol

Solução	Especificação	Concentração Corrigida (%)	E = 100 - I (%)	PA	TH
Padrão 100%	$PA < TH$	100,00	100,00	0,030	0,649
Solução diluente	≤ 2,0%	0,00	-	-	-
Fase Móvel	≤ 2,0%	0,00	-	-	-
Solução amostra susp. 20mg/mL	$PA < TH$	105,06	100,00	0,034	0,226
Solução placebo susp.	≤ 2,0%	0,00	-	-	-
Solução amostra 100mg/cp	$PA < TH$	101,23	100,00	0,045	0,944
Solução placebo 100mg/cp	≤ 2,0%	0,00	-	-	-
Solução amostra 500 mg/cp	$PA < TH$	99,23	100,00	0,032	0,665
Solução placebo 500mg/cp	≤ 2,0%	0,00	-	-	-

Legenda: E = Especificidade ; I = Interferência ; PA = Purity Angle , TH = Threshold , - = não aplicável

Tabela 3 A -. Demonstrativo de degradação provocada pelo estresse do padrão

Condição de Extresse	Condições	Degradação %	PA	TH
1. Aquecimento	60° por 24 horas	-3,19	0,038	0,861
2. Solução Ácida	HCl 1,0N 60°C por 24 horas	-2,23	0,026	0,221
3. Solução Básica	NaOH 1,0N 60°C por 20 minutos	-24,20	0,032	0,226
4. Solução Oxidativa	H ₂ O ₂ 3,0 % 60°C por 4 horas	-10,86	0,059	0,262
5. Solução Fotólise	Luz Incidente por 24 horas	-5,66	0,029	0,223
6. Solução Umidade	Ambiente Umedecido por 24 horas	-3,74	0,025	0,229

Legenda: PA = Purity Angle; TH = Threshold.

Tabela 4.A - Demonstrativo de degradação provocada pelo estresse da amostra - Mebendazol suspensão oral 20 mg/mL

Condição de Extresse	Condições	Degradação %	PA	TH
1. Aquecimento	60° por 24 horas	-2,55	0,099	3,877
2. Solução Ácida	HCl 1,0N 60°C por 24 horas	-2,88	0,027	0,221
3. Solução Básica	NaOH 1,0N 60°C por 20 minutos	-23,94	0,031	0,221
4. Solução Oxidativa	H ₂ O ₂ 3,0 % 60°C por 4 horas	-10,86	0,078	0,315
5. Solução Fotólise	Luz Incidente por 24 horas	-2,88	0,025	0,228
6. Solução Umidade	Ambiente Umedecido por 24 horas	-3,76	0,026	0,223

Legenda: PA = Purity Angle; TH = Threshold.

Tabela 5 A - Descritivo de picos cromatográficos no padrão e na amostra (Mebendazol suspensão oral 20 mg/mL)

Componente	TR (min)	TRR	Presença na condição	
			Padrão	Amostra
Produto de Degradação 1	0,73	0,09	4	4
Produto de Degradação 2	0,89	0,12	4	4
Produto de Degradação 3	1,03	0,13	4	4
Produto de Degradação 4	2,38	0,31	4	4
Produto de Degradação 5	3,15	0,41	4	4
Produto de Degradação 6	4,28	0,55	1,2,3,4,5,6	1,2,3,4,5,6
Produto de Degradação 7	4,76	0,61	2,3,4,5,6	2,3,4,5,6
Produto de Degradação 8	5,16	0,66	4	4
Produto de Degradação 9	5,44	0,70	4	4
Produto de Degradação 10	5,97	0,77	4	4
Produto de Degradação 11	7,03	0,91	4,5	4,5
Produto de Degradação 12	9,56	1,23	4	4
Produto de Degradação 13	13,70	1,77	1,2,3,4,5,6	1,2,3,4,5,6
Produto de Degradação 14	15,39	1,98	4	4

Legenda: 1 : Aquecimento; 2 : Hidrólise Ácida; 3 : Hidrólise Básica; 4 : Oxidação; 5 : Fotólise; 6 : Umidade.

Tabela 6 A -. Demonstrativo de degradação provocado pelo estresse da amostra de Mebendazol comprimido 100 mg

Condição de Estresse	Condições	Degradação %	PA	TH
1. Aquecimento	60°C por 24 horas	-2,99	0,035	0,774
2. Solução Ácida	HCl 1,0N 60°C por 24 horas	-3,35	0,033	13,612
3. Solução Básica	NaOH 1,0N 60°C por 20 minutos	-22,82	0,059	15,466
4. Solução Oxidativa	H ₂ O ₂ 3,0 % 60°C por 4 horas	-8,81	0,589	61,399
5. Solução Fotólise	Luz Incidente por 24 horas	-6,72	0,043	0,873
6. Solução Umidade	Ambiente Umedecido por 24 horas	-9,79	0,042	1,027

Colocar a legenda de PA e TH

Tabela 7 A - Descritivo de picos cromatográficos no padrão e na amostra (Mebendazol 100mg/cp)

Componente	TR (min)	TRR	Presença na Condição de Estresse	
			Padrão	Amostra
Produto de Degradação 1	0,73	0,09	4	4
Produto de Degradação 2	0,89	0,12	4	4
Produto de Degradação 3	1,03	0,13	4	4
Produto de Degradação 4	2,38	0,31	4	4
Produto de Degradação 5	3,15	0,41	4	4
Produto de Degradação 6	4,28	0,55	1,2,3,4,5,6	1,2,3,4,5,6
Produto de Degradação 7	4,76	0,62	2,3,4,5,6	2,3,4,5,6
Produto de Degradação 8	5,16	0,66	4	4
Produto de Degradação 9	5,44	0,70	4	4
Produto de Degradação 10	5,97	0,77	4	4
Produto de Degradação 11	7,03	0,91	4,5	4,5
Produto de Degradação 12	9,56	1,23	4	4
Produto de Degradação 13	13,70	1,77	1,2,3,4,5,6	1,2,3,4,5,6
Produto de Degradação 14	15,39	1,98	4	4

Legenda: 1 : Aquecimento; 2 : Hidrólise Ácida; 3 : Hidrólise Básica; 4 : Oxidação; 5 : Fotólise; 6 : Umidade.

Tabela 8 A - Demonstrativo de degradação provocado pelo estresse da amostra – Mebendazol 500mg/cp

Condição de Estresse	Condições	Degradação %	PA	TH
1. Aquecimento	60°C por 24 horas	-3,06	0,042	0,753
2. Solução Ácida	HCl 1,0N 60°C por 24 horas	-2,11	0,033	13,533
3. Solução Básica	NaOH 1,0N 60°C por 20 minutos	-20,01	0,066	18,410
4. Solução Oxidativa	H ₂ O ₂ 3,0 % 60°C por 4 horas	-14,11	0,607	64,869
5. Solução Fotólise	Luz Incidente por 24 horas	-6,17	0,044	0,931
6. Solução Umidade	Ambiente Umedecido por 24 horas	-3,18	0,040	1,295

Tabela 9 A. Descritivo de picos cromatográficos no padrão e na amostra (Mebendazol 500mg/cp)

Componente	TR (min)	TRR	Presença na Condição de Estresse	
			Padrão	Amostra
Produto de Degradação 1	0,73	0,09	4	4
Produto de Degradação 2	0,89	0,12	4	4
Produto de Degradação 3	1,03	0,13	4	4
Produto de Degradação 4	2,38	0,31	4	4
Produto de Degradação 5	3,15	0,41	4	4
Produto de Degradação 6	4,28	0,55	1,2,3,4,5,6	1,2,3,4,5,6
Produto de Degradação 7	4,76	0,61	2,3,4,5,6	2,3,4,5,6
Produto de Degradação 8	5,16	0,66	4	4
Produto de Degradação 9	5,44	0,70	4	4
Produto de Degradação 10	5,97	0,77	4	4
Produto de Degradação 11	7,03	0,91	4,5	4,5
Produto de Degradação 12	9,56	1,23	4	4
Produto de Degradação 13	13,70	1,77	1,2,3,4,5,6	1,2,3,4,5,6
Produto de Degradação 14	15,39	1,98	4	4

Legenda: 1 : Aquecimento; 2 : Hidrólise Ácida; 3 : Hidrólise Básica; 4 : Oxidação; 5 : Fotólise; 6 : Umidade.

Tabela 10 A - Descritivo de picos cromatográficos no padrão e na amostra (Mebendazol suspensão oral 20 mg/mL)

Componente	TR (min)	TRR	Presença na Condição de Estresse	
			Padrão	Amostra
Produto de Degradação 1	0,73	0,09	4	4
Produto de Degradação 2	0,89	0,12	4	4
Produto de Degradação 3	1,03	0,13	4	4
Produto de Degradação 4	2,38	0,31	4	4
Produto de Degradação 5	3,15	0,41	4	4
Produto de Degradação 6	4,28	0,55	1,2,3,4,5,6	1,2,3,4,5,6
Produto de Degradação 7	4,76	0,61	2,3,4,5,6	2,3,4,5,6
Produto de Degradação 8	5,16	0,66	4	4
Produto de Degradação 9	5,44	0,70	4	4
Produto de Degradação 10	5,97	0,77	4	4
Produto de Degradação 11	7,03	0,91	4,5	4,5
Produto de Degradação 12	9,56	1,23	4	4
Produto de Degradação 13	13,70	1,77	1,2,3,4,5,6	1,2,3,4,5,6
Produto de Degradação 14	15,39	1,98	4	4

Legenda: 1 : Aquecimento; 2 : Hidrólise Ácida; 3 : Hidrólise Básica; 4 : Oxidação; 5 : Fotólise; 6 : Umidade.

Tabela 11 A - Descritivo de picos cromatográficos no padrão e na amostra (Mebendazol 100mg/cp)

Componente	TR (min)	TRR	Presença na Condição de Estresse	
			Padrão	Amostra
Produto de Degradação 1	0,73	0,09	4	4
Produto de Degradação 2	0,89	0,12	4	4
Produto de Degradação 3	1,03	0,13	4	4
Produto de Degradação 4	2,38	0,31	4	4
Produto de Degradação 5	3,15	0,41	4	4
Produto de Degradação 6	4,28	0,55	1,2,3,4,5,6	1,2,3,4,5,6
Produto de Degradação 7	4,76	0,62	2,3,4,5,6	2,3,4,5,6
Produto de Degradação 8	5,16	0,66	4	4
Produto de Degradação 9	5,44	0,70	4	4
Produto de Degradação 10	5,97	0,77	4	4
Produto de Degradação 11	7,03	0,91	4,5	4,5
Produto de Degradação 12	9,56	1,23	4	4
Produto de Degradação 13	13,70	1,77	1,2,3,4,5,6	1,2,3,4,5,6
Produto de Degradação 14	15,39	1,98	4	4

Legenda: 1 : Aquecimento; 2 : Hidrólise Ácida; 3 : Hidrólise Básica; 4 : Oxidação; 5 : Fotólise; 6 : Umidade.

Tabela 12 A -. Descritivo resultante de picos cromatográficos no padrão e nas amostras de Mebendazol suspensão oral 20 mg/mL100mg/cp e 500mg/cp

Componente	TR (min)	TRR	Presença na Condição de Estresse	
			Padrão	Amostra
Produto de Degradação 1	0,73	0,09	4	4
Produto de Degradação 2	0,89	0,12	4	4
Produto de Degradação 3	1,03	0,13	4	4
Produto de Degradação 4	2,38	0,31	4	4
Produto de Degradação 5	3,15	0,41	4	4
Produto de Degradação 6	4,28	0,55	1,2,3,4,5,6	1,2,3,4,5,6
Produto de Degradação 7	4,76	0,61	2,3,4,5,6	2,3,4,5,6
Produto de Degradação 8	5,16	0,66	4	4
Produto de Degradação 9	5,44	0,70	4	4
Produto de Degradação 10	5,97	0,77	4	4
Produto de Degradação 11	7,03	0,91	4,5	4,5
Produto de Degradação 12	9,56	1,23	4	4
Produto de Degradação 13	13,70	1,77	1,2,3,4,5,6	1,2,3,4,5,6
Produto de Degradação 14	15,39	1,98	4	4

Legenda: 1 : Aquecimento; 2 : Hidrólise Ácida; 3 : Hidrólise Básica; 4 : Oxidação; 5 : Fotólise; 6 : Umidade.

Tabela 13 A -. Robustez - estabilidade das soluções analíticas: Padrão e Mebendazol suspensão oral 20mg/mL

Espec. (horas)	0	2	4	6	8	10	12
Padrão ≤2%	0,00	0,31	0,27	0,13	0,53	0,55	0,56
Amostra ≤2%	0,00	-0,63	-0,53	-0,35	-0,23	0,09	0,53
Espec. (horas)	14	16	18	20	22	24	
Padrão ≤2%		1,03	0,75	0,52	0,48	0,38	0,35
Amostra ≤2%		0,65	0,59	0,78	0,79	0,92	1,07

Legenda: Espec. : Especificação.

Tabela 14 A -. Robustez - estabilidade das soluções analíticas – Padrão e Amostra de Mebendazol 100mg/cp

Espec. (horas)	0	2	4	6	8	10	12
Padrão ≤2%	0,00	0,31	0,27	0,13	0,53	0,55	0,56
Amostra ≤2%	0,00	0,35	0,52	0,53	0,14	-0,11	0,19
Espec. (horas)	14	16	18	20	22	24	
Padrão ≤2%		1,03	0,75	0,52	0,48	0,38	0,35
Amostra ≤2%		0,23	0,05	0,18	-0,01	-0,04	0,00

Legenda: Espec. : Especificação.

Tabela 15 A -. Robustez - estabilidade das soluções analíticas – Padrão e Amostra de Mebendazol 500mg/cp

Espec. (horas)	0	2	4	6	8	10	12
Padrão ≤2%	0,00	0,31	0,27	0,13	0,53	0,55	0,56
Amostra ≤2%	0,00	0,44	0,47	0,69	1,13	1,31	1,65
Espec. (horas)	14	16	18	20	22	24	
Padrão ≤2%		1,03	0,75	0,52	0,48	0,38	0,35
Amostra ≤2%		1,97	1,98	2,23	2,29	2,38	2,96

Legenda: Espec. : Especificação.

Tabela 16 A - Demonstrativo das áreas obtidas nos diferentes níveis de concentração para o teste de linearidade - Nível de Impureza

%	Concentração de Mebendazol (mg/mL)	Áreas (uA)	Média Áreas (uA)
0,2	X,XXXXXX	4247	4266
		4356	
		4196	
0,5	X,XXXXXX	10543	10519
		10465	
		10548	
1,0	X,XXXXXX	21647	21652
		21564	
		21745	
1,5	X,XXXXXX	32402	32324
		31998	
		32571	
2,0	X,XXXXXX	43402	43183
		42947	
		43199	

Tabela 17 A - Regressão linear dos dados da linearidade - Nível de Impureza

Parâmetro	Especificação	Valor
a - intercepto	informativo	-207,5
b coeficiente angular	informativo	2178436
Equação da Reta	informativo	$y = 2178436x - 207,5$
R coeficiente de correlação	$\geq 0,99$	1,0000

Tabela 18 A - Demonstrativo das áreas obtidas nos diferentes níveis de concentração para o teste de linearidade - Nível de Teor

%	Concentração (mg/mL)	Áreas (uA)	Média Áreas (uA)
2,5	X,XXXXX	53160	52969
		52862	
		52885	
5,0	X,XXXXX	107127	106423
		106395	
		105748	
10,0	X,XXXXX	212734	211972
		211648	
		211534	
25,0	X,XXXXX	528367	529395
		528958	
		530859	
50,0	X,XXXXX	1044535	1044121
		1042948	
		1044880	
70,0	X,XXXXX	1492372	1493051
		1493830	
		1492950	
80,0	X,XXXXX	1699686	1700604
		1700631	
		1701495	
90,0	X,XXXXX	1897909	1896157
		1894593	
		1895969	
100,0	X,XXXXX	2110369	2111210
		2112137	
		2111123	
110,0	X,XXXXX	2335162	2334646
		2335512	
		2333263	
120,0	X,XXXXX	2541627	2538962
		2540571	
		2534687	
130,0	X,XXXXX	2752362	2753949
		2755601	
		2753885	

Tabela 19 A - Regressão linear dos dados da linearidade - Nível de Teor

Parâmetro	Especificação	Valor
a - intercepto	informativo	-709,8
b coeficiente angular	informativo	2117846
Equação da Reta	informativo	$y = 2117846x - 709,8$
R - coeficiente de correlação	$\geq 0,99$	1,0000

Tabela 20 A - Resultados de precisão repetibilidade – Mebendazol suspensão 20mg/mL (1° dia – Analista 1)

Preparação	Leitura	Área (uA)	Área Média (uA)
1	1	2231028,1	2234130,5
	2	2237232,9	
2	1	2217132,5	2217904,2
	2	2218675,9	
3	1	2206987,4	2209022,6
	2	2211057,8	
4	1	2223280,1	2224191,2
	2	2225102,4	
5	1	2238240,8	2236085,6
	2	2233930,5	
6	1	2217679,8	2217855,6
	2	2218031,5	
Especificação de DPR: máximo 5%			DPR obtido: 0,47%

Tabela 21 A - Resultados de precisão repetibilidade – Mebendazol suspensão 20 mg/mL (2º dia – Analista 2)

Preparação	Leitura	Área (uA)	Área Média (uA)
7	1	2215955,9	2214185,9
	2	2212415,9	
8	1	2217233,0	2219988,2
	2	2222743,4	
9	1	2239018,7	2235675,8
	2	2232333,0	
10	1	2245446,6	2246923,6
	2	2248400,6	
11	1	2280233,9	2278303,3
	2	2276372,8	
12	1	2176240,4	2176706,7
	2	2177173,0	
Especificação de DPR: máximo 5%			DPR obtido: 1,53%

Tabela 22 A - Resultados de precisão intermediária – Mebendazol suspensão 20 mg/mL

Preparação	Área Média (uA)	Preparação	Área Média (uA)
1	2234130,5	7	2214185,9
2	2217904,2	8	2219988,2
3	2209022,6	9	2235675,8
4	2224191,2	10	2246923,6
5	2236085,6	11	2278303,3
6	2217855,6	12	2176706,7
Especificação de DPR: máximo 5%			DPR obtido: 1,09%

Tabela 23 A - Resultados de precisão repetibilidade – Mebendazol 100mg/cp (1° dia – Analista 1)

Preparação	Leitura	Área (uA)	Área Média (uA)
1	1	2169384,4	2168106,5
	2	2166828,7	
2	1	2133985,7	2136074,1
	2	2138162,6	
3	1	2145695,4	2144845,4
	2	2143995,4	
4	1	2145372,9	2148576,2
	2	2151779,5	
5	1	2128610,3	2126297,4
	2	2123984,5	
6	1	2139719,4	2140394,4
	2	2141069,5	
Especificação de DPR-: máximo 5%			DPR obtido: 0,66%

Tabela 24 A - Resultados de precisão repetibilidade – Mebendazol 100 mg/cp (2° dia – Analista 2)

Preparação	Leitura	Área (uA)	Área Média (uA)
7	1	2134996,7	2135294,2
	2	2135591,7	
8	1	2141955,5	2144289,0
	2	2146622,6	
9	1	2157176,9	2157872,6
	2	2158568,4	
10	1	2077216,0	2077713,0
	2	2078210,0	
11	1	2094026,7	2095071,5
	2	2096116,3	
12	1	2072210,1	2072283,3
	2	2072356,5	
Especificação de DPR-: máximo 5%			DPR obtido: 1,73%

Tabela 25 A - Resultados de precisão intermediária – Mebendazol 100mg/cp

Preparação	Área Média (uA)	Preparação	Área Média (uA)
1	2168106,5	7	2135294,2
2	2136074,1	8	2144289,0
3	2144845,4	9	2157872,6
4	2148576,2	10	2077713,0
5	2126297,4	11	2095071,5
6	2140394,4	12	2072283,3
Especificação de DPR:- máximo 5%			DPR obtido: 1,45%

Tabela 26 A - Resultados de precisão repetibilidade – Mebendazol 500mg/cp (1° dia – Analista 1)

Preparação	Leitura	Área (uA)	Área Média (uA)
1	1	2132160,5	2127543,4
	2	2122926,4	
2	1	2136970,4	2128946,0
	2	2120921,7	
3	1	2139468,1	2136626,9
	2	2133785,7	
4	1	2115910,4	2122000,3
	2	2128090,2	
5	1	2132018,7	2131427,9
	2	2130837,2	
6	1	2132788,4	2133075,7
	2	2133363,0	
Especificação de DPR:- máximo 5%			DPR obtido: 0,24%

Tabela 27 A - Resultados de precisão repetibilidade - Mebendazol 500mg/cp (2° dia – Analista 2)

Preparação	Leitura	Área (uA)	Área Média (uA)
7	1	2105076,7	2106065,1
	2	2107053,6	
8	1	2110275,7	2111672,8
	2	2113069,9	
9	1	2105234,4	2105574,8
	2	2105915,2	
10	1	2117965,3	2120211,3
	2	2122457,4	
11	1	2092740,3	2094523,9
	2	2096307,6	
12	1	2123212,9	2120525,9
	2	2117839,0	
Especificação de DPR: máximo 5%			DPR obtido: 0,24%

Tabela 28 A.- Resultados de precisão intermediária - Mebendazol 500mg/cp

Preparação	Área Média (uA)	Preparação	Área Média (uA)
1	2127543,4	7	2106065,1
2	2128946,0	8	2111672,8
3	2136626,9	9	2105574,8
4	2122000,3	10	2120211,3
5	2131427,9	11	2094523,9
6	2133075,7	12	2120525,9
Especificação de DPR: máximo 5%			DPR obtido: 0,61%

Tabela 29 A - Exatidão (Grau de Recuperação) – Mebendazol suspensão 20 mg/mL

Replicata	80% Conc. (%)	100% Conc. (%)	120% Conc. (%)
A1	81,45	101,25	120,53
	81,55	101,40	120,56
	81,60	101,57	121,18
A2	81,06	101,28	121,18
	81,02	101,28	121,26
	81,43	101,04	121,34
A3	81,33	101,32	121,13
	81,17	101,39	121,25
	81,06	101,57	121,34
Média	81,30	101,34	121,09
Mínimo	81,02	101,04	120,53
Máximo	81,60	101,57	121,34
Exatidão (98,0 a 102,0%)	101,62	101,34	100,90

Tabela 30 A - Exatidão (Grau de Recuperação) – Mebendazol 100 mg/cp

Replicata	80% Conc. (%)	100% Conc. (%)	120% Conc. (%)
A1	80,95	99,70	118,47
	80,96	99,79	118,43
	81,08	99,91	118,41
A2	78,99	98,52	120,15
	79,06	98,47	120,34
	78,91	98,73	120,37
A3	81,43	99,45	119,71
	81,26	99,59	119,40
	81,32	99,64	119,73
Média	80,44	99,31	119,45
Mínimo	78,91	98,47	118,41
Máximo	81,43	99,91	120,37
Exatidão (98,0 a 102,0%)	100,55	99,31	99,54

Tabela 31 A - Exatidão (Grau de Recuperação) – Mebendazol 500 mg/cp

Replicata	80% Conc. (%)	100% Conc. (%)	120% Conc. (%)
A1	79,46	99,89	119,97
	79,63	100,14	120,02
	79,86	99,97	120,07
A2	81,29	100,45	119,73
	81,30	100,46	119,91
	81,37	100,49	119,99
A3	81,08	99,28	119,28
	81,17	99,25	119,33
	81,05	99,26	119,17
Média	80,69	99,91	119,72
Mínimo	79,46	99,25	119,17
Máximo	81,37	100,49	120,07
Exatidão (98,0 a 102,0%)	100,86	99,91	99,77

Tabela 32 A – Robustez - Variação do fluxo da fase móvel

Parâmetro	Especificação	Tipo	X,X mL/min	X,X* mL/min	X,X mL/min
Desvio Padrão Relativo (DPR)	≤ 2,0 %	P	1,35	0,07	0,99
Eficiência da Separação Nº de Pratos Teóricos	Informativo	P	7527,8	7390,1	7283,3
		A ¹	7537,3	7323,3	7263,1
		A ²	7551,7	7351,6	7147,0
		A ³	7541,7	7507,9	7219,4
Fator de Cauda Simetria do Pico	Aproximadamente 1,0	P	1,17	1,16	1,19
		A ¹	1,17	1,16	1,19
		A ²	1,18	1,17	1,19
		A ³	1,18	1,16	1,20
K' (Fator de Capacidade)	K' ≥ 1,0	P	24,97	23,07	21,97
		A ¹	24,93	23,10	21,90
		A ²	24,97	23,07	21,94
		A ³	24,97	23,04	21,97
Tempo de Retenção	Informativo	P	8,15	7,56	7,21
		A ¹	8,14	7,57	7,19
		A ²	8,15	7,56	7,20
		A ³	8,15	7,55	7,21
Teor da Amostra (A ¹)	107,24% ± 2,0%	A ¹	108,58%	107,24 %	108,64%
	105,10% a 109,39%				
Teor da Amostra (A ²)	102,54% ± 2,0%	A ²	101,12%	102,54%	100,81%
	100,49% a 104,59%				
Teor da Amostra (A ³)	101,46% ± 2,0%	A ³	100,00	101,46	101,93
	99,43% a 103,49%				

Legenda: P - Solução padrão; A - Solução amostra; ¹ - 20 mg/mL; ² - 100 mg/cp; ³ - 500 mg/cp, * - Condição original do método.

Tabela 33 A – Robustez - Resultados da variação da temperatura da coluna

Parâmetro	Especificação	Tipo	XX,X°C	XX,X*°C	XX,X°C
Desvio Padrão Relativo (DPR)	≤ 2,0 %	P	1,07	0,07	0,84
Eficiência da Separação Nº de Pratos Teóricos	Informativo	P	7538,1	7390,1	7283,6
		A ¹	6551,0	7323,3	7963,4
		A ²	6673,8	7351,6	7762,8
		A ³	6735,0	7507,9	7858,4
Fator de Cauda Simetria do Pico	≤ 2,0	P	1,17	1,16	1,19
		A ¹	1,25	1,16	1,12
		A ²	1,25	1,17	1,15
		A ³	1,24	1,16	1,12
K' (Fator de Capacidade)	Aproximadamente 1,0	P	24,97	23,07	21,97
		A ¹	25,16	23,10	21,60
		A ²	25,08	23,07	21,58
		A ³	25,10	23,04	21,59
Tempo de Retenção	Informativo	P	8,15	7,56	7,21
		A ¹	8,21	7,57	7,10
		A ²	8,19	7,56	7,09
		A ³	8,19	7,55	7,09
Teor da Amostra (A ¹)	107,24% ± 2,0%	A ¹	106,63%	107,24%	106,41%
	105,10% a 109,39%				
Teor da Amostra (A ²)	102,54% ± 2,0%	A ²	101,54%	102,54%	103,22%
	100,49% a 104,59%				
Teor da Amostra (A ³)	101,46% ± 2,0%	A ³	100,98%	101,46%	102,49%
	99,43% a 103,49%				

Legenda: P - Solução padrão; A - Solução amostra; ¹ - 20 mg/mL; ² - 100 mg/cp; ³ - 500 mg/cp, * - Condição original do método.

Tabela 34 A – Robustez - Resultados da variação de diferentes lotes de colunas

Parâmetro	Especificação	Tipo	Coluna 2	Coluna 1*	Coluna 3
Desvio Padrão Relativo (DPR)	≤ 2,0 %	P	0,87	0,07	0,32
Eficiência da Separação Nº de Pratos Teóricos	Informativo	P	6789,4	7390,1	5577,2
		A ¹	6495,4	7323,3	5493,7
		A ²	6418,4	7351,6	5408,7
		A ³	6503,8	7507,9	5503,6
Fator de Cauda Simetria do Pico	Aproximadamente 1,0	P	1,19	1,16	1,25
		A ¹	1,19	1,16	1,27
		A ²	1,20	1,17	1,26
		A ³	1,18	1,16	1,26
K' (Fator de Capacidade)	K' ≥ 1,0	P	22,58	23,07	21,58
		A ¹	22,59	23,10	21,59
		A ²	22,59	23,07	21,59
		A ³	22,59	23,04	21,59
Tempo de Retenção	Informativo	P	7,58	7,56	7,09
		A ¹	7,61	7,57	7,09
		A ²	7,60	7,56	7,09
		A ³	7,60	7,55	7,09
Teor da Amostra (A ¹)	107,24% ± 2,0%	A ¹	106,07%	107,24%	106,21%
	105,10% a 109,39%				
Teor da Amostra (A ²)	102,54% ± 2,0%	A ²	102,50%	102,54%	101,19%
	100,49% a 104,59%				
Teor da Amostra (A ³)	101,46% ± 2,0%	A ³	100,50%	101,46%	101,22%
	99,43% a 103,49%				

Legenda: P - Solução padrão; A - Solução amostra; ¹ - 20 mg/mL; ² - 100 mg/cp; ³ - 500 mg/cp, * - Condição original do método.

Tabela 35 A - Colunas representadas na Tabela 34 A

Coluna	Descrição da Coluna	Número de Série
Coluna 01	XXXXXXXXXX XX x X,X mm; X µm	XXXXXXXXXX
Coluna 02	XXXXXXXXXX XX x X,X mm; X µm	XXXXXXXXXX
Coluna 03	XXXXXXXXXX XX x X,X mm; X µm	XXXXXXXXXX

Tabela 36 A – Robustez - Resultados da variação no pH da fase móvel

Parâmetro	Especificação	Tipo	pH X,X	pH X,X*	pH X,X
Desvio Padrão Relativo (DPR)	≤ 2,0 %	P	0,04	0,07	1,80
Eficiência da Separação Nº de Pratos Teóricos	Informativo	P	7389,6	7390,1	7507,2
		A ¹	7551,7	7323,3	7390,3
		A ²	7118,2	7351,6	7463,9
		A ³	7366,1	7507,9	7435,0
Fator de Cauda Simetria do Pico	Aproximadamente 1,0	P	1,16	1,16	1,19
		A ¹	1,27	1,16	1,18
		A ²	1,25	1,17	1,19
		A ³	1,26	1,16	1,19
K' (Fator de Capacidade)	K' ≥ 1,0	P	23,07	23,07	24,07
		A ¹	22,91	23,10	24,09
		A ²	23,04	23,07	24,08
		A ³	23,04	23,04	24,07
Tempo de Retenção	Informativo	P	7,56	7,56	7,87
		A ¹	7,51	7,57	7,88
		A ²	7,55	7,56	7,87
		A ³	7,55	7,55	7,87
Teor da Amostra (A ¹)	107,24% ± 2,0%	A ¹	107,69%	107,24%	106,51%
	105,10% a 109,39%				
Teor da Amostra (A ²)	102,54% ± 2,0%	A ²	103,72%	102,54%	101,74%
	100,49% a 104,59%				
Teor da Amostra (A ³)	101,46% ± 2,0%	A ³	102,37%	101,46%	101,19%
	99,43% a 103,49%				

Legenda: P - Solução padrão; A - Solução amostra; ¹ - 20 mg/mL; ² - 100 mg/cp; ³ - 500 mg/cp, * - Condição original do método.

Tabela 37 A – Robustez - Resultados da variação na composição da fase móvel

Parâmetro	Especificação	Tipo	(77:23)	(80:20)*	(83:17)
Desvio Padrão Relativo (DPR)	≤ 2,0 %	P	0,59	0,07	0,10
Eficiência da Separação Nº de Pratos Teóricos	Informativo	P	5300,4	7390,1	5231,5
		A ¹	5098,9	7323,3	5193,8
		A ²	5055,1	7351,6	5243,4
		A ³	5182,0	7507,9	5170,4
Fator de Cauda Simetria do Pico	Aproximadamente 1,0	P	1,27	1,16	1,33
		A ¹	1,31	1,16	1,34
		A ²	1,30	1,17	1,33
		A ³	1,29	1,16	1,33
K' (Fator de Capacidade)	K' ≥ 1,0	P	14,23	23,07	35,82
		A ¹	14,13	23,10	36,50
		A ²	14,15	23,07	36,04
		A ³	14,18	23,04	35,77
Tempo de Retenção	Informativo	P	4,78	7,56	11,56
		A ¹	4,75	7,57	11,78
		A ²	4,76	7,56	11,63
		A ³	4,77	7,55	11,55
Teor da Amostra (A ¹)	107,24% ± 2,0% 105,10% a 109,39%	A ¹	107,78%	107,24%	106,91%
Teor da Amostra (A ²)	102,54% ± 2,0% 100,49% a 104,59%	A ²	102,79%	102,54%	102,91%
Teor da Amostra (A ³)	101,46% ± 2,0% 99,43% a 103,49%	A ³	102,74%	101,46%	102,62%

Legenda: P - Solução padrão; A - Solução amostra; ¹ - 20 mg/mL; ² - 100 mg/cp; ³ - 500 mg/cp, * - Condição original do método.

Tabela 38 A – Robustez - Resultados da variação na marca da membrana XXX X,XXµm

Parâmetro	Especificação	Tipo	XXXXXXX	*XXXXXX	
Desvio Padrão Relativo (DPR)	≤ 2,0 %	P	0,13	0,07	
Eficiência da Separação Nº de Pratos Teóricos	Informativo	P	5116,5	7390,1	
		A ¹	5071,6	7323,3	
		A ²	5059,8	7351,6	
Fator de Cauda Simetria do Pico	Aproximadamente 1,0	A ³	5109,4	7507,9	
		P	1,32	1,16	
		A ¹	1,33	1,16	
		A ²	1,32	1,17	
K'(Fator de Capacidade)	K' ≥ 1,0	A ³	1,31	1,16	
		P	22,66	23,07	
		A ¹	22,68	23,10	
		A ²	22,68	23,07	
Tempo de Retenção	Informativo	A ³	22,68	23,04	
		P	7,43	7,56	
		A ¹	7,43	7,57	
		A ²	7,44	7,56	
Teor da Amostra (A ¹)	107,24% ± 2,0% 105,10% a 109,39%	A ³	7,43	7,55	
		P	107,56%	107,24%	
		A ¹	102,54% ± 2,0% 100,49% a 104,59%	102,78%	102,54%
		A ²	102,10%	101,46%	
Teor da Amostra (A ²)	101,46% ± 2,0% 99,43% a 103,49%	A ³	102,10%	101,46%	
		P	102,10%	101,46%	
		A ¹	102,10%	101,46%	
		A ²	102,10%	101,46%	

Legenda: P - Solução padrão, A - Solução amostra; ¹ - 20 mg/mL; ² - 100 mg/cp; ³ - 500 mg/cp, * - Condição original do método.

Tabela 39 A – Resultados obtidos no Limite de Detecção / Quantificação

Concentração (mg/mL)	Áreas - Curva 1	Áreas - Curva 2	Áreas - Curva 3
X,XXXXX	4640	4855	4807
X,XXXXX	10706	10714	10415
X,XXXXX	20782	21382	20968
X,XXXXX	31665	32627	32257
X,XXXXX	42455	43088	43035

APÊNDICE B - FIGURAS

Figura 1 A -. Cromatogramas das análises de estresse por aquecimento à 60°C por 24 horas (Legenda: Plac: Placebo, Pd: Padrão, Am: Amostra, Dil: Diluente e Susp: Suspensão).

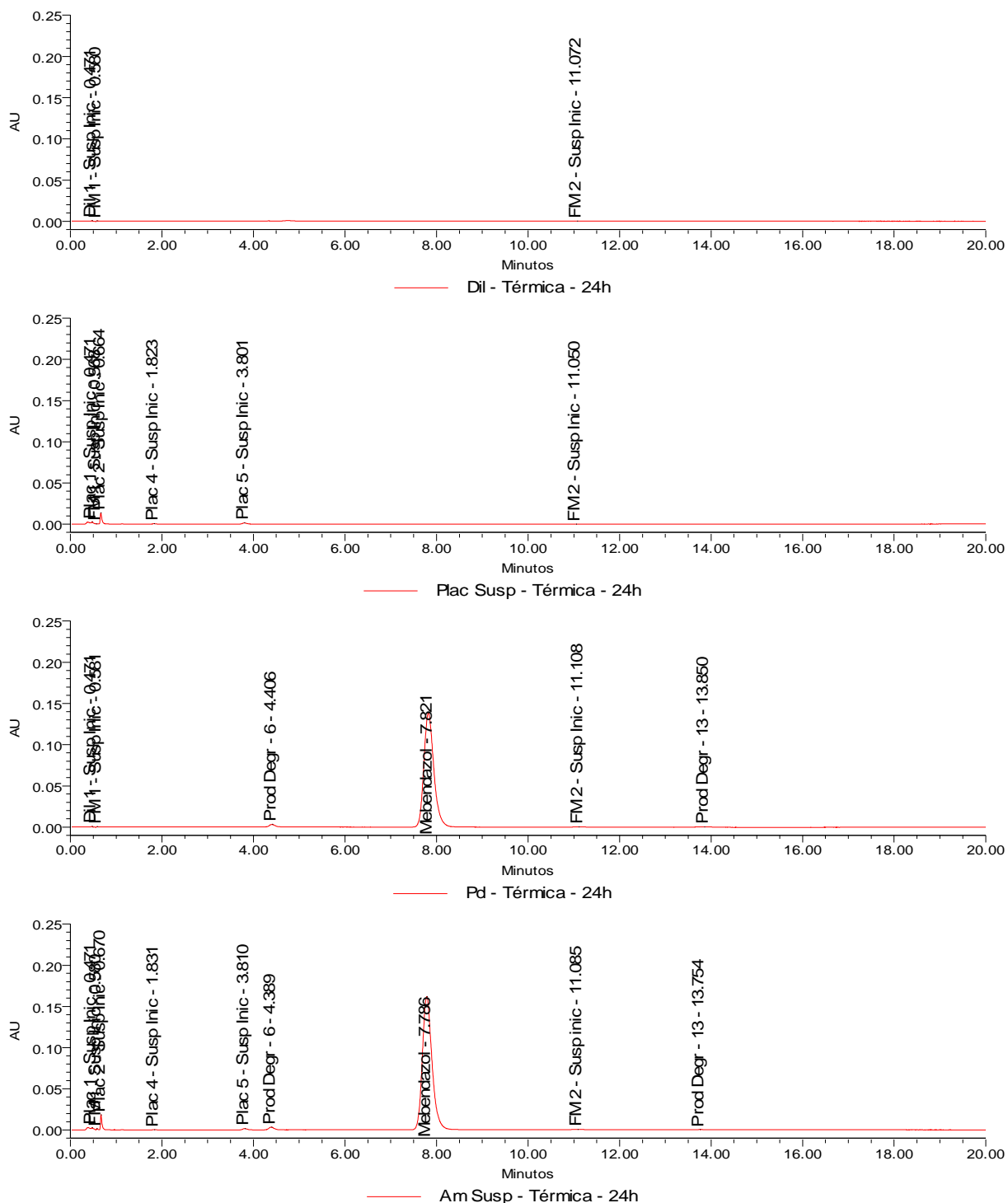


Figura 2 A -. Cromatogramas na condição de hidrólise ácida com temperatura à 60°C por 24 horas (Legenda: Plac: Placebo, Pd: Padrão, Am: Amostra, Dil: Diluente e Susp: Suspensão).

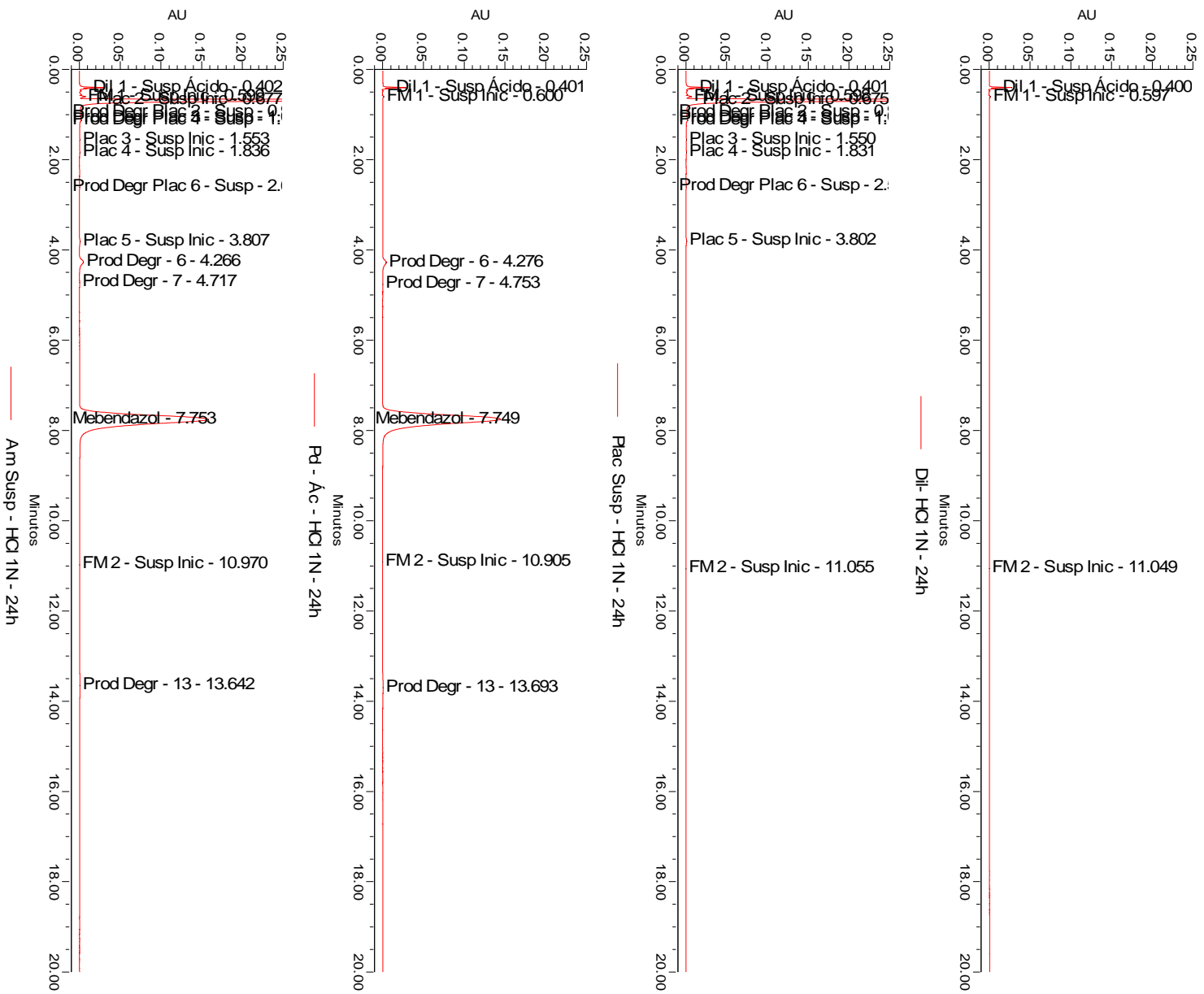


Figura 3 A -. Cromatogramas na condição de hidrólise alcalina com temperatura à 60°C por 20 minutos (Legenda: Plac: Placebo, Pd: Padrão, Am: Amostra, Dil: Diluente e Susp: Suspensão).

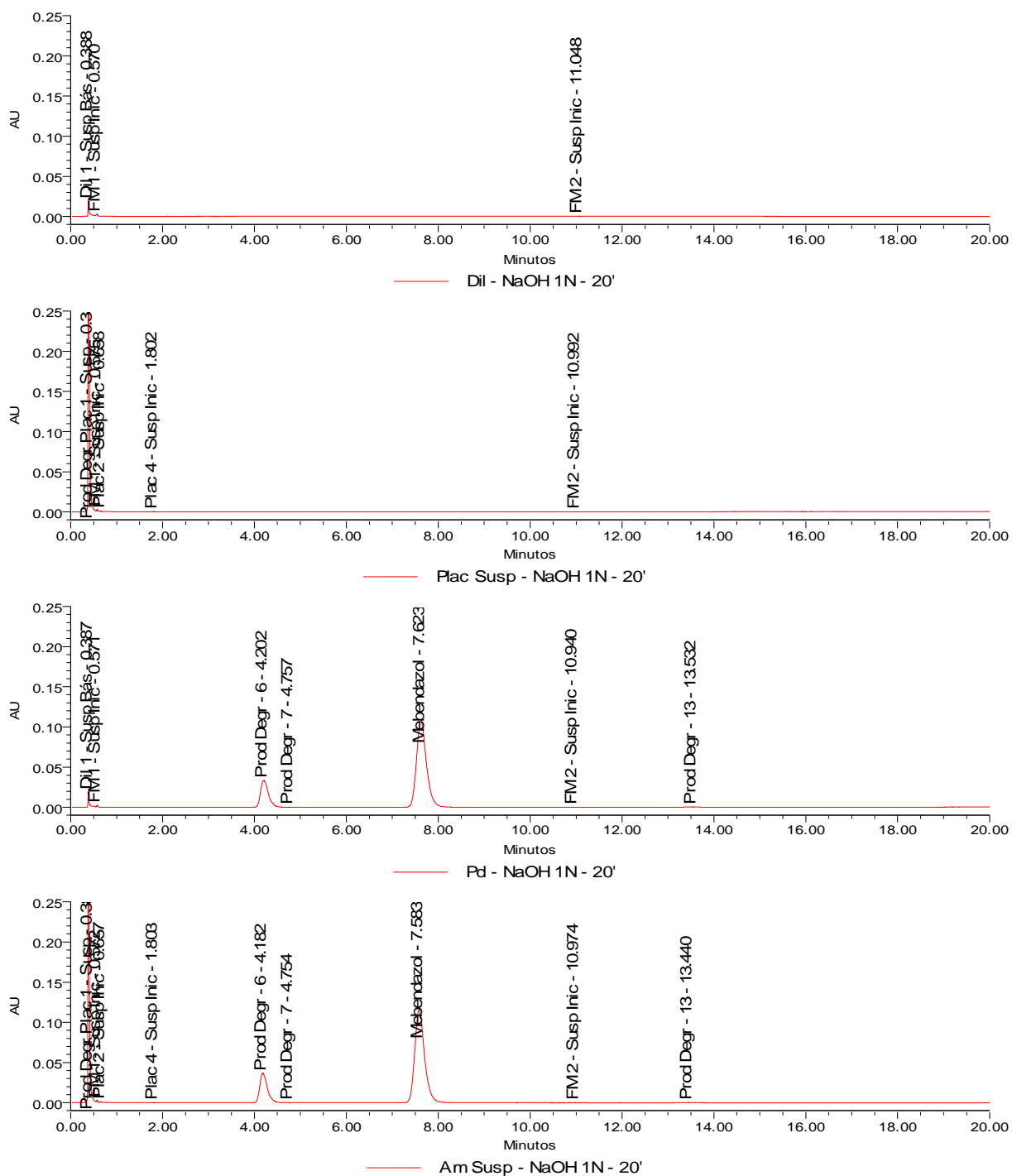


Figura 4 A -. Cromatogramas na condição de oxidação com temperatura à 60°C por 4 horas (Legenda: Plac: Placebo, Pd: Padião, Am: Amostra; Dil: Diluente e Susp; Suspensão).

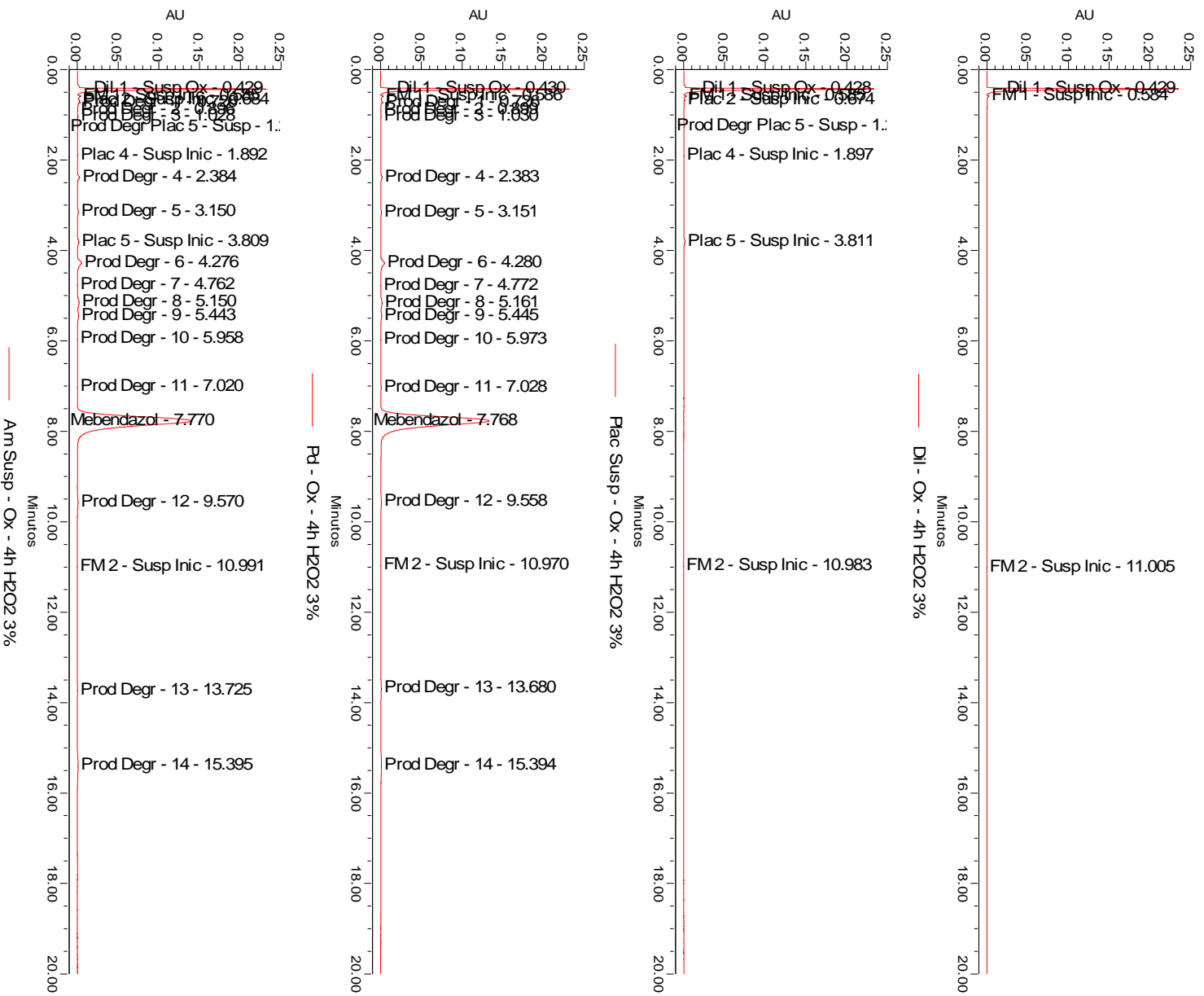


Figura 5 A - Cromatogramas na condição de fotólise por 24 horas (Legenda: Pd: Padrão, Am: Amostra; Susp: Suspensão e Dil: Diluente).

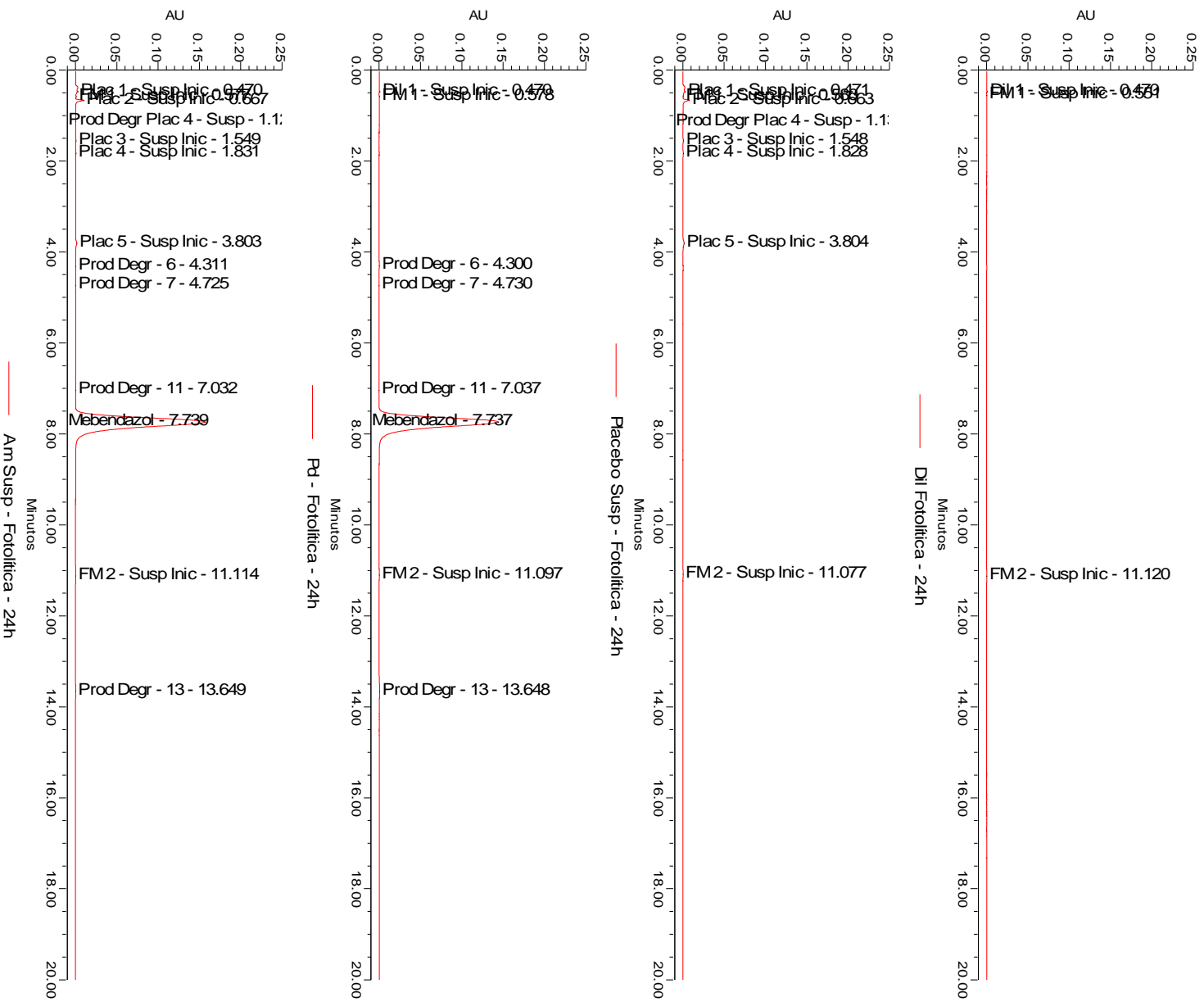


Figura 6 A - Cromatogramas na condição de unidade por 24 horas (Legenda: Plac: Placebo, Pd: Padrão, Am: Amostra e Susp: Suspensão).

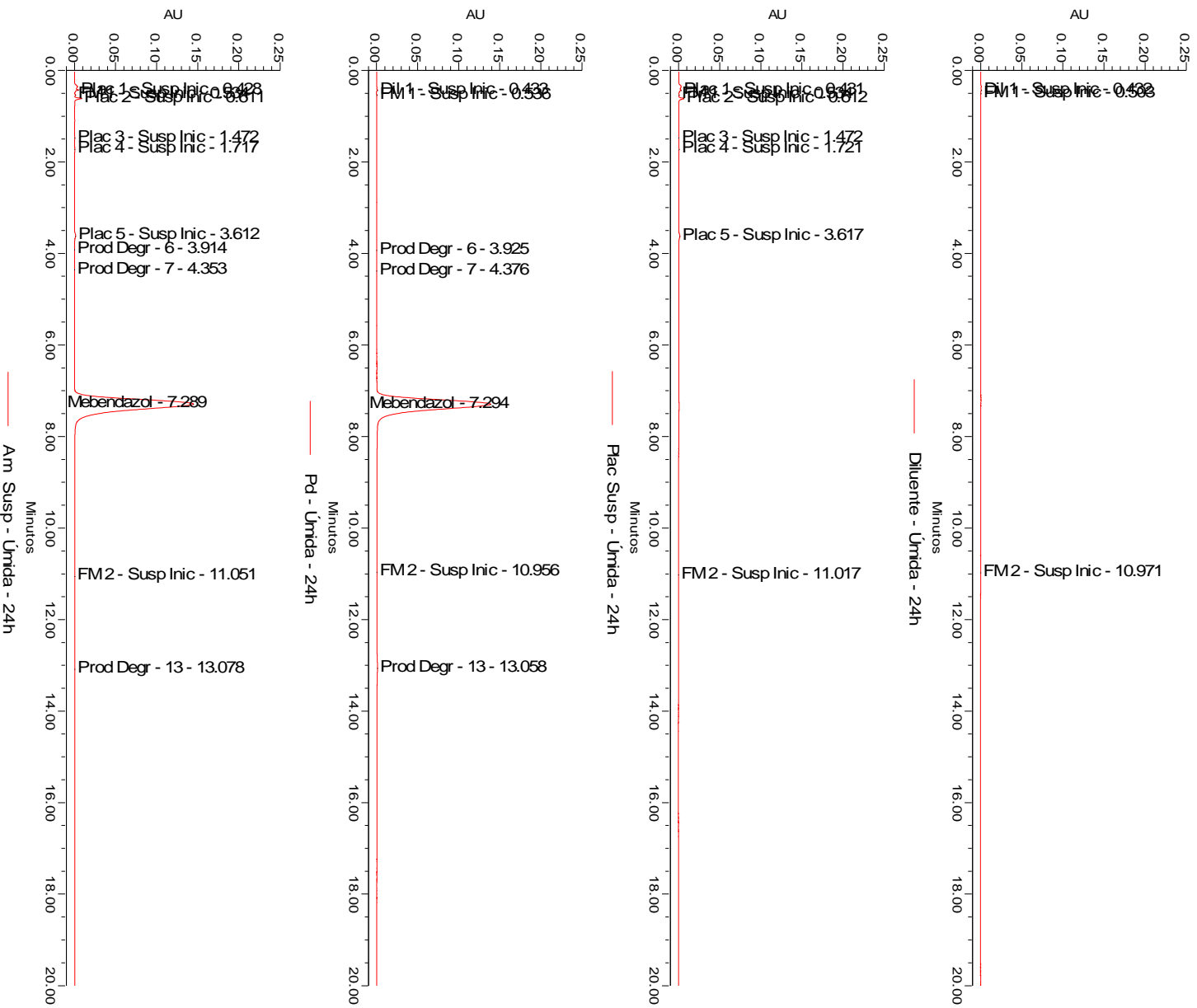


Figura 7 A - Varredura realizada por detector PDA na condição de aquecimento a 60°C por 24 horas. (Legenda: Plac: Placebo, Pd: Padrão, Am: Amostra e Dil: Diluente e Susp: Suspensão).

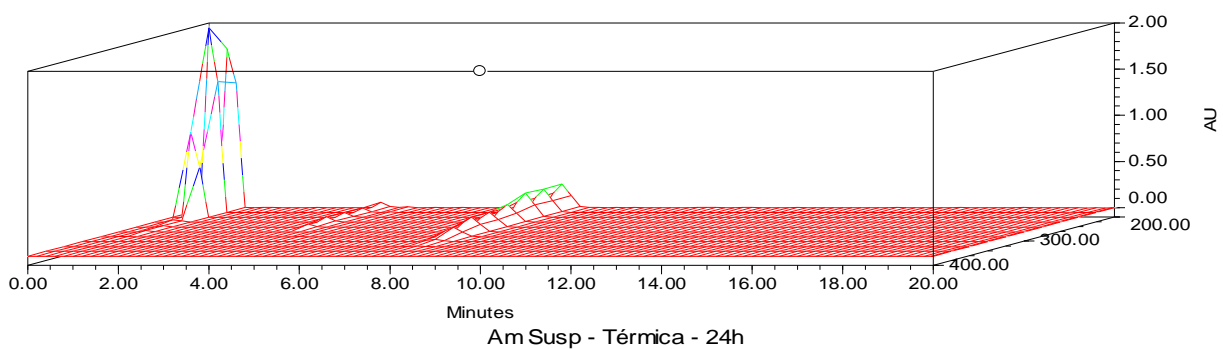
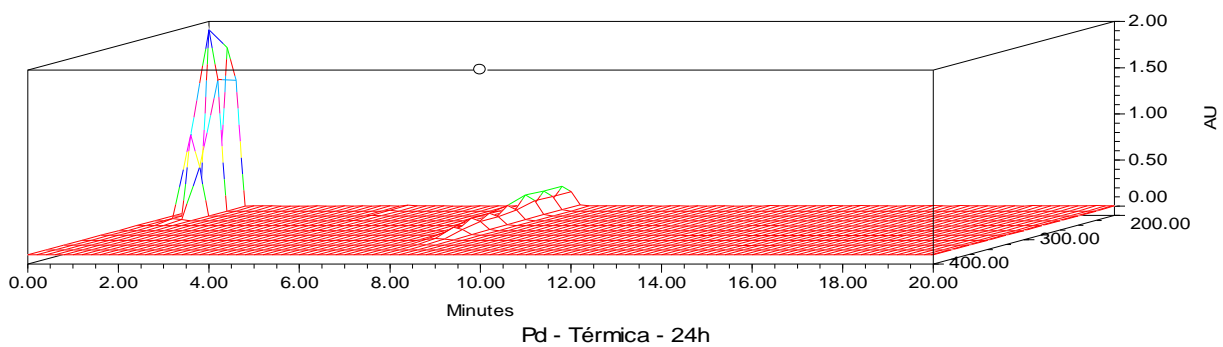
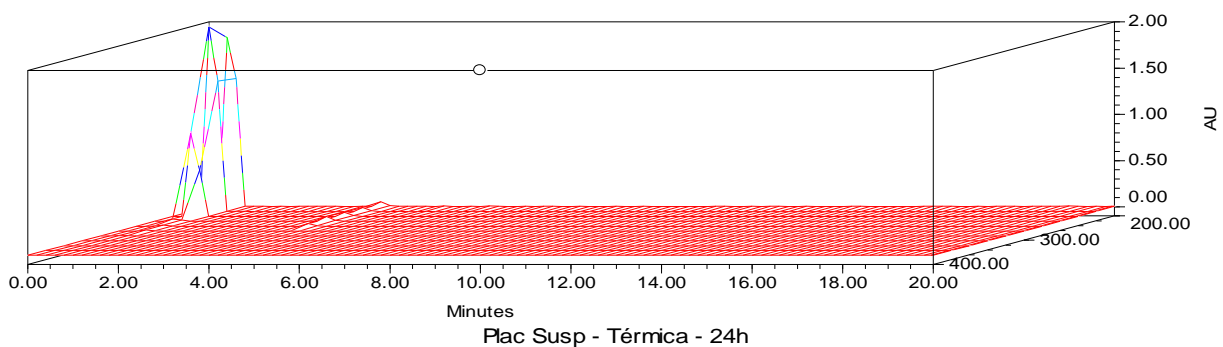
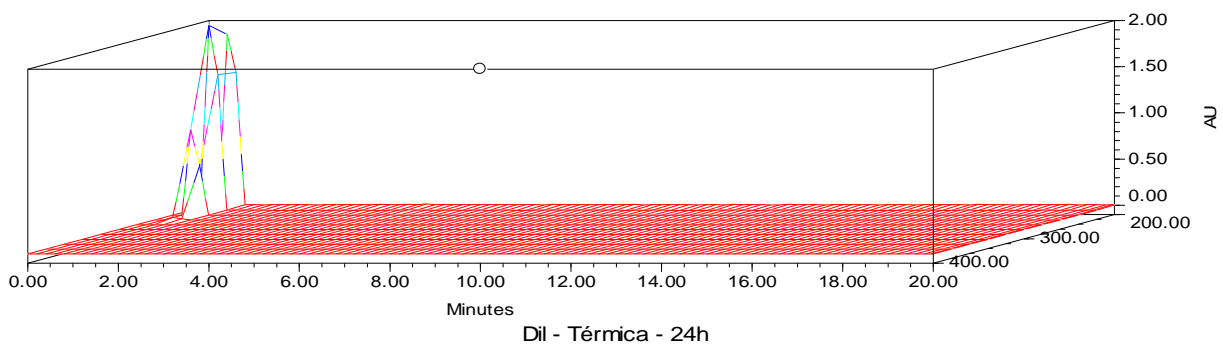


Figura 8 A - Varredura realizada por detector PDA na condição de hidrólise ácida com temperatura à 60°C por 24 horas. (Legenda: Plac: Placebo, Pd: Padrão, Am: Amostra; Dil: Diluente e Susp: Suspensão).

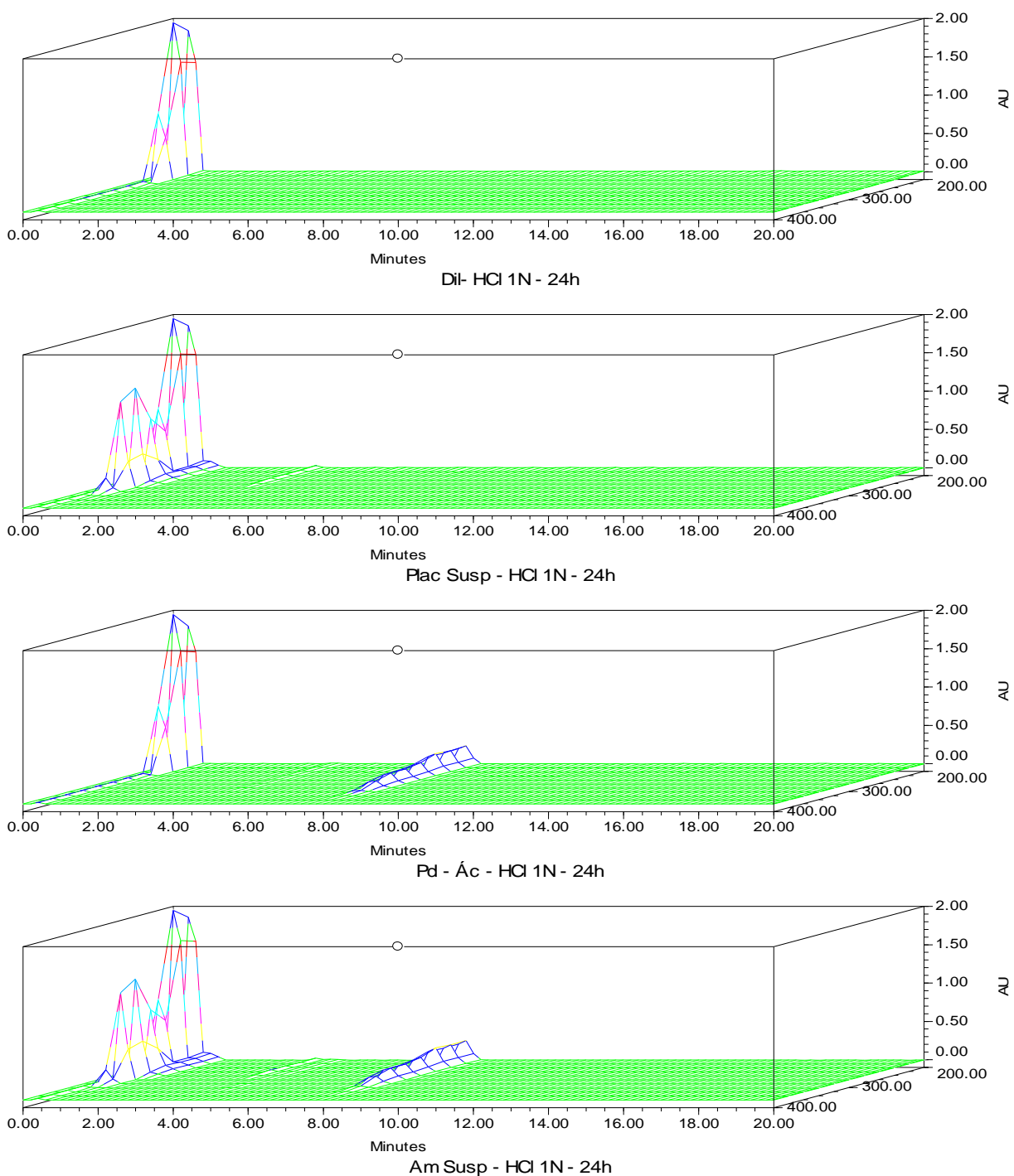


Figura 9 A - Varredura realizada por detector PDA na condição de hidrólise alcalina com temperatura à 60°C por 20 minutos. (Legenda: Plac: Placebo, Pd: Padrão, Am: Amostra; Dil: Diluente e Susp: Suspensão).

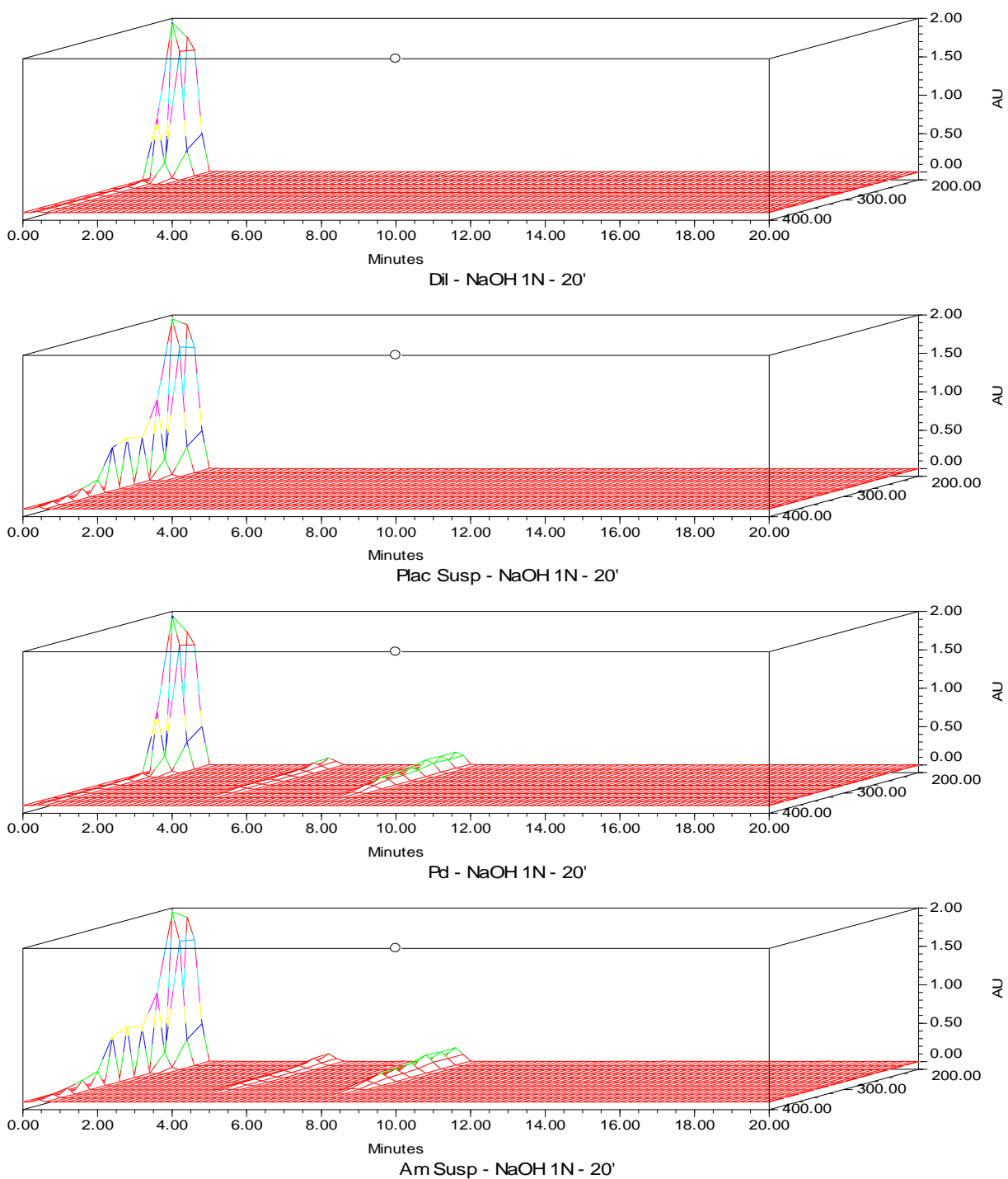


Figura 10 A - Varredura realizada por detector PDA na condição de oxidação com temperatura à 60°C por 4 horas. (Legenda: Plac: Placebo, Pd: Padrão, Am: Amostra; Dil: Diluente e Susp: Suspensão).

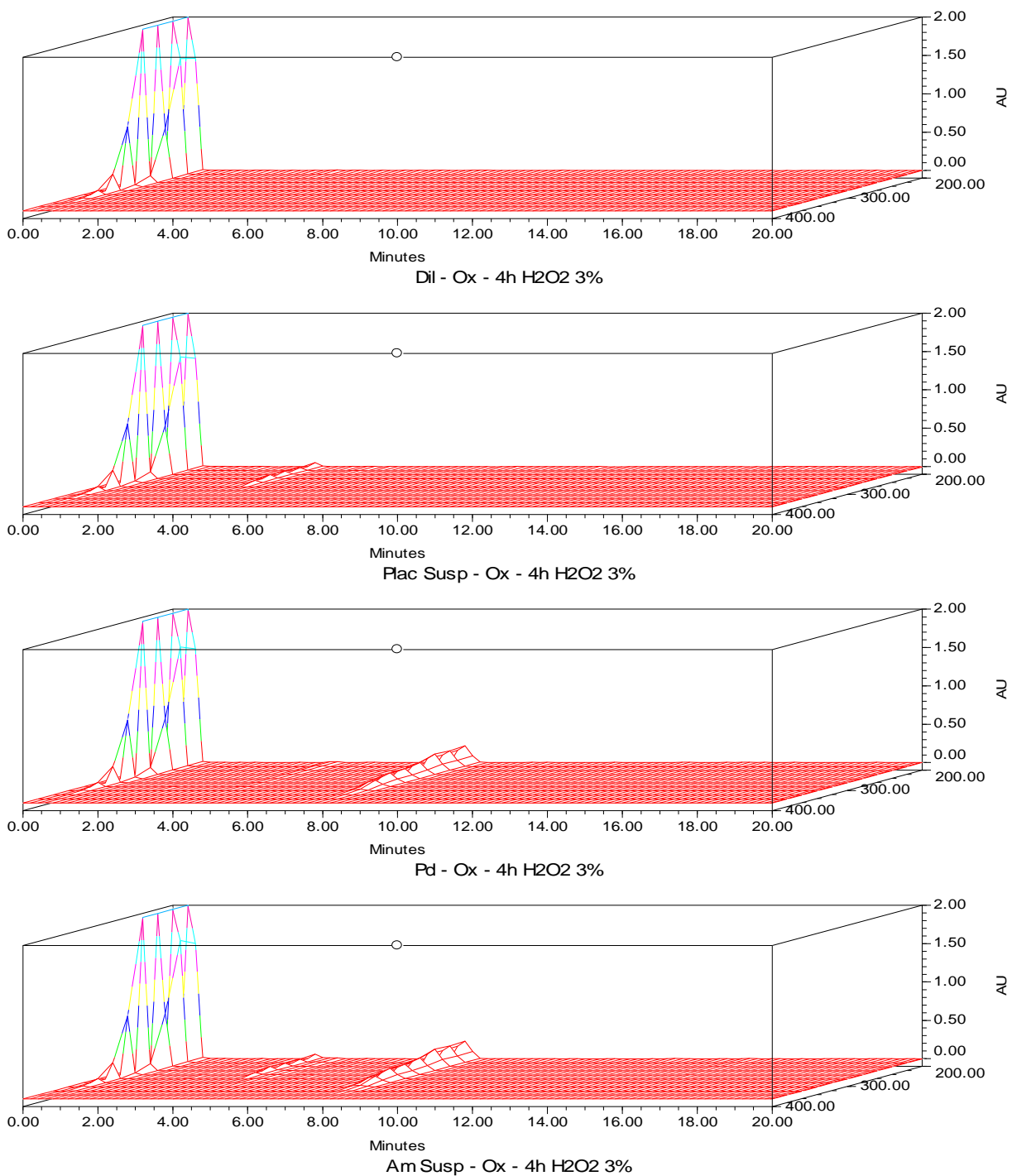


Figura 11 A - Varredura realizada por detector PDA na condição de fotólise por 24 horas. (Legenda: Pd: Padrão, Am: Amostra; Dil: Diluente e Susp: Suspensão).

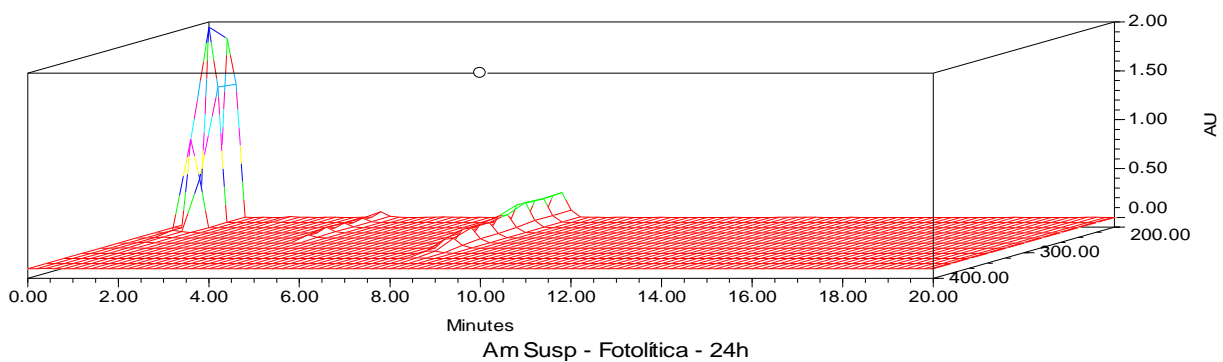
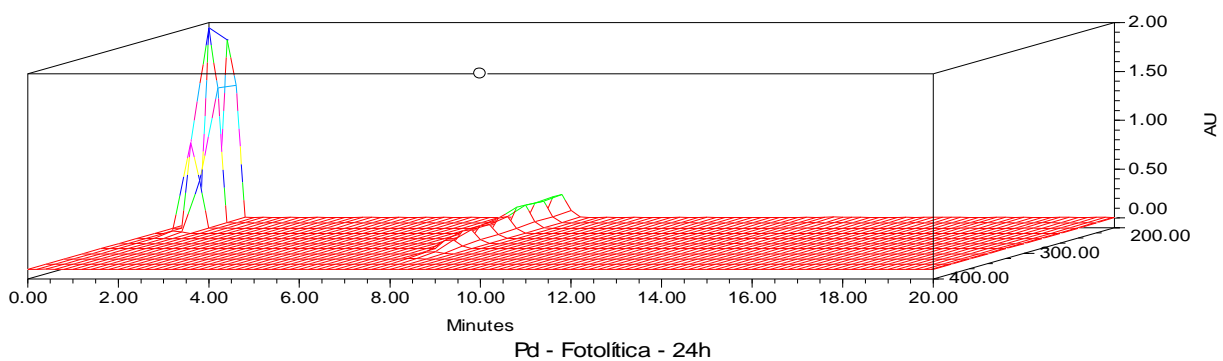
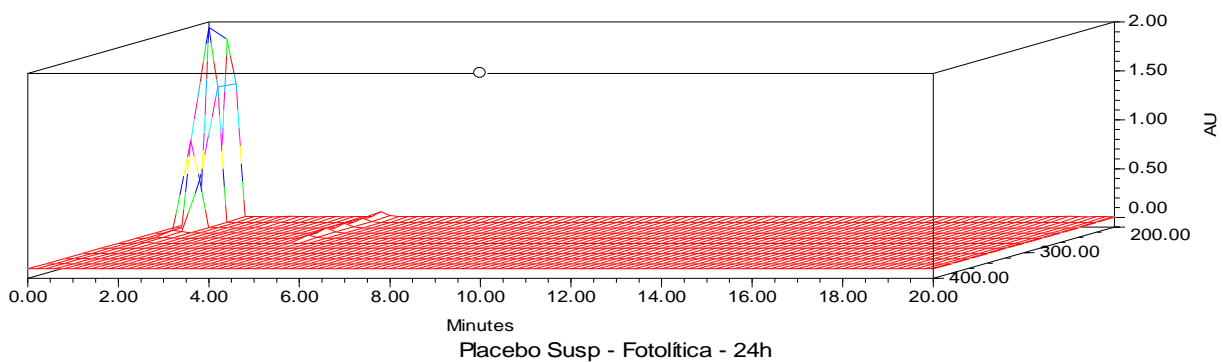
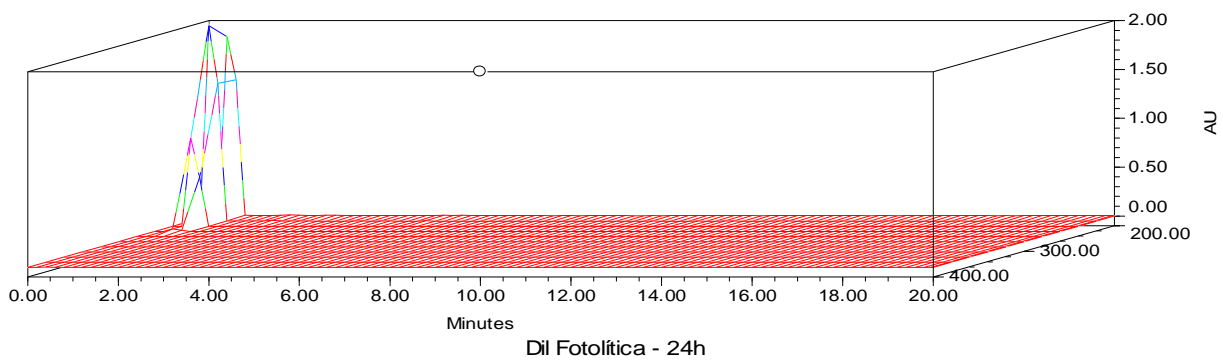


Figura 12 A - Varredura realizada por detector PDA na condição de umidade por 24 horas (Legenda: Plac: Placebo, Pd: Padrão, Am: Amostra e Susp: Suspensão).

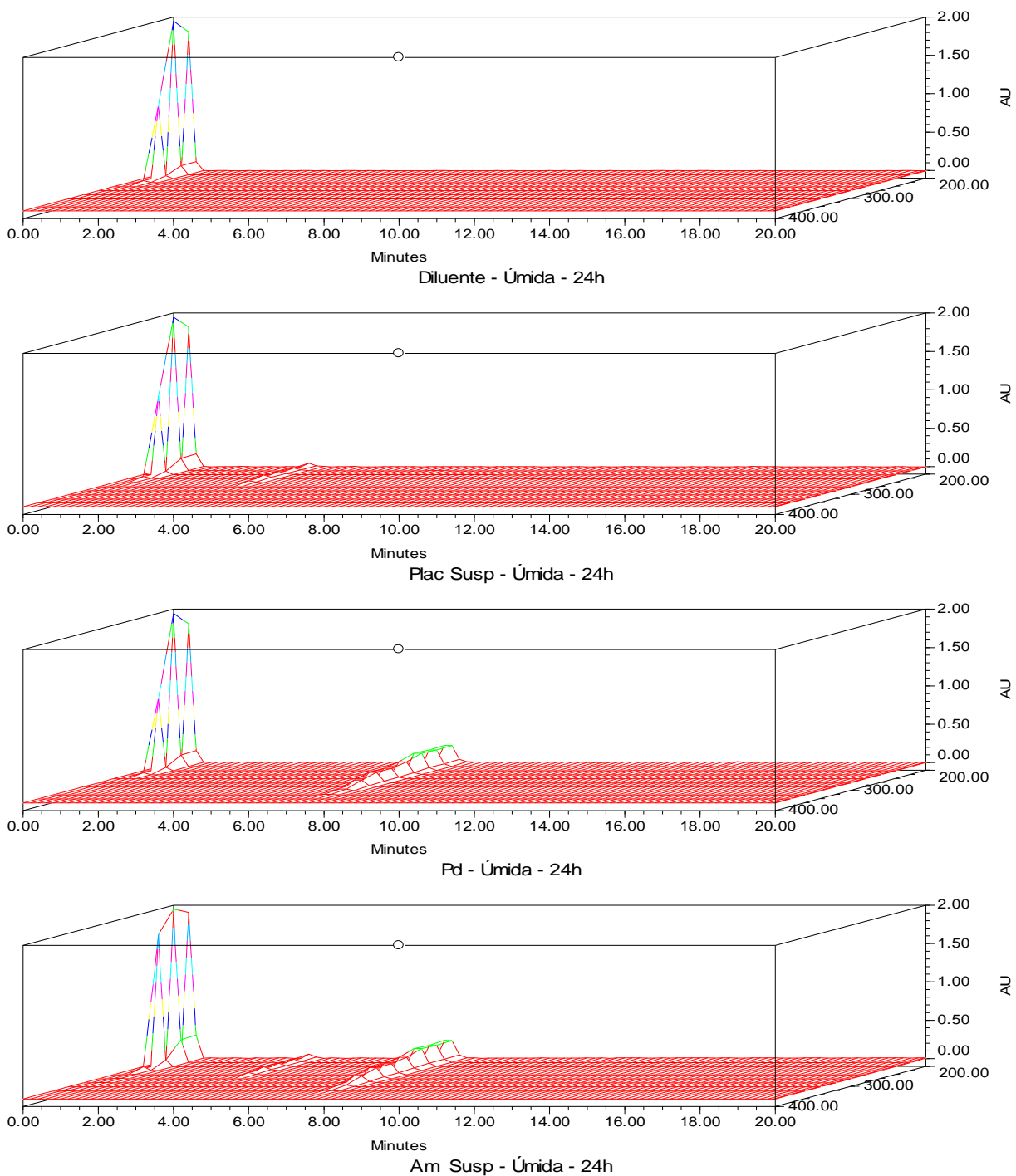


Figura 13 A - Cromatogramas na condição de estresse por aquecimento à 60°C por 24 horas (Legenda: Plac: Placebo, Pd: Padrão, Am: Amostra, Dil: Diluente e cp: Comprimido).

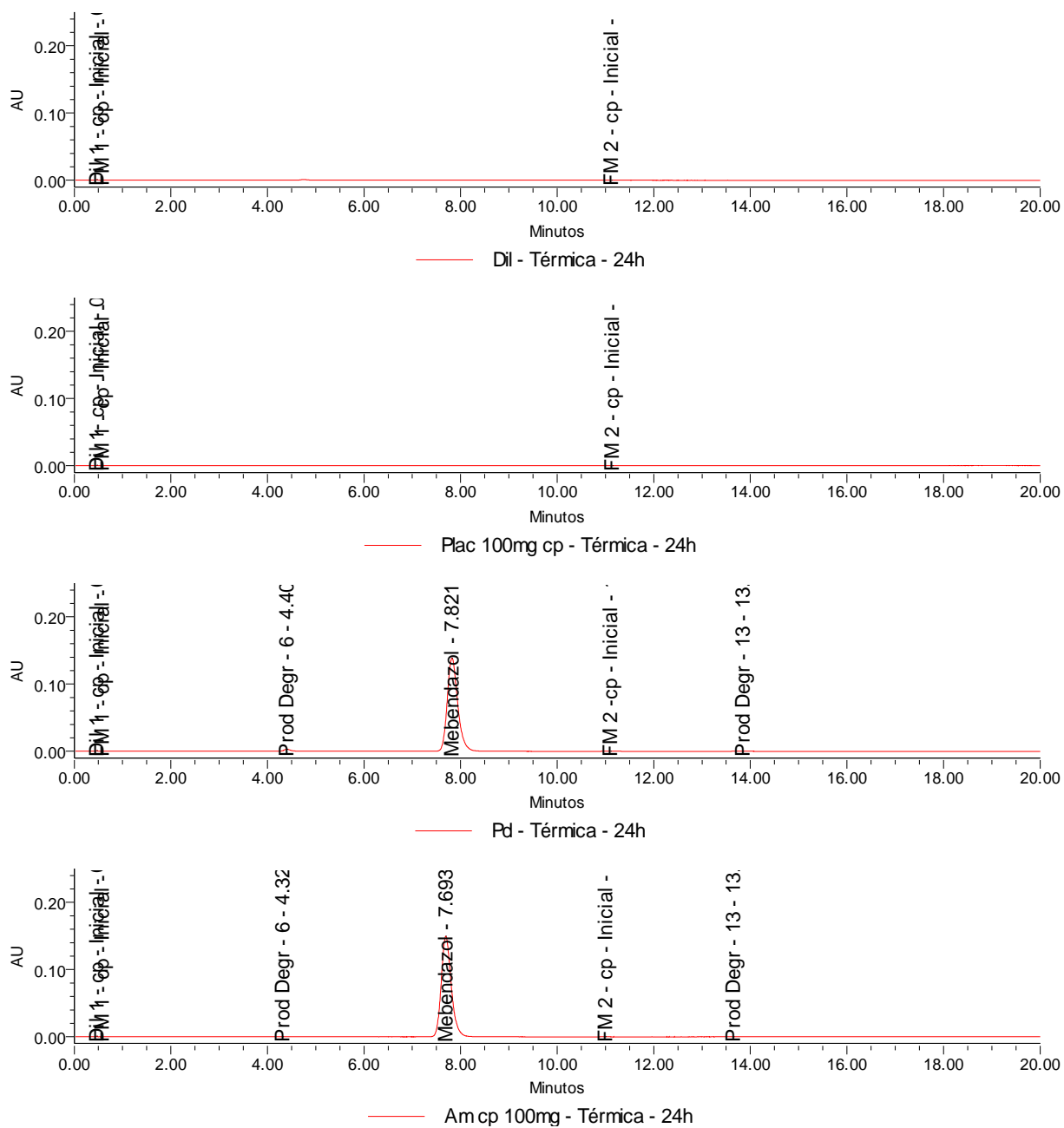


Figura 14 A - Cromatogramas na condição de hidrólise ácida com temperatura à 60°C por 24 horas. (Legenda: Plac: Placebo, Pd: Padrão, Am: Amostra e Dil: Diluente).

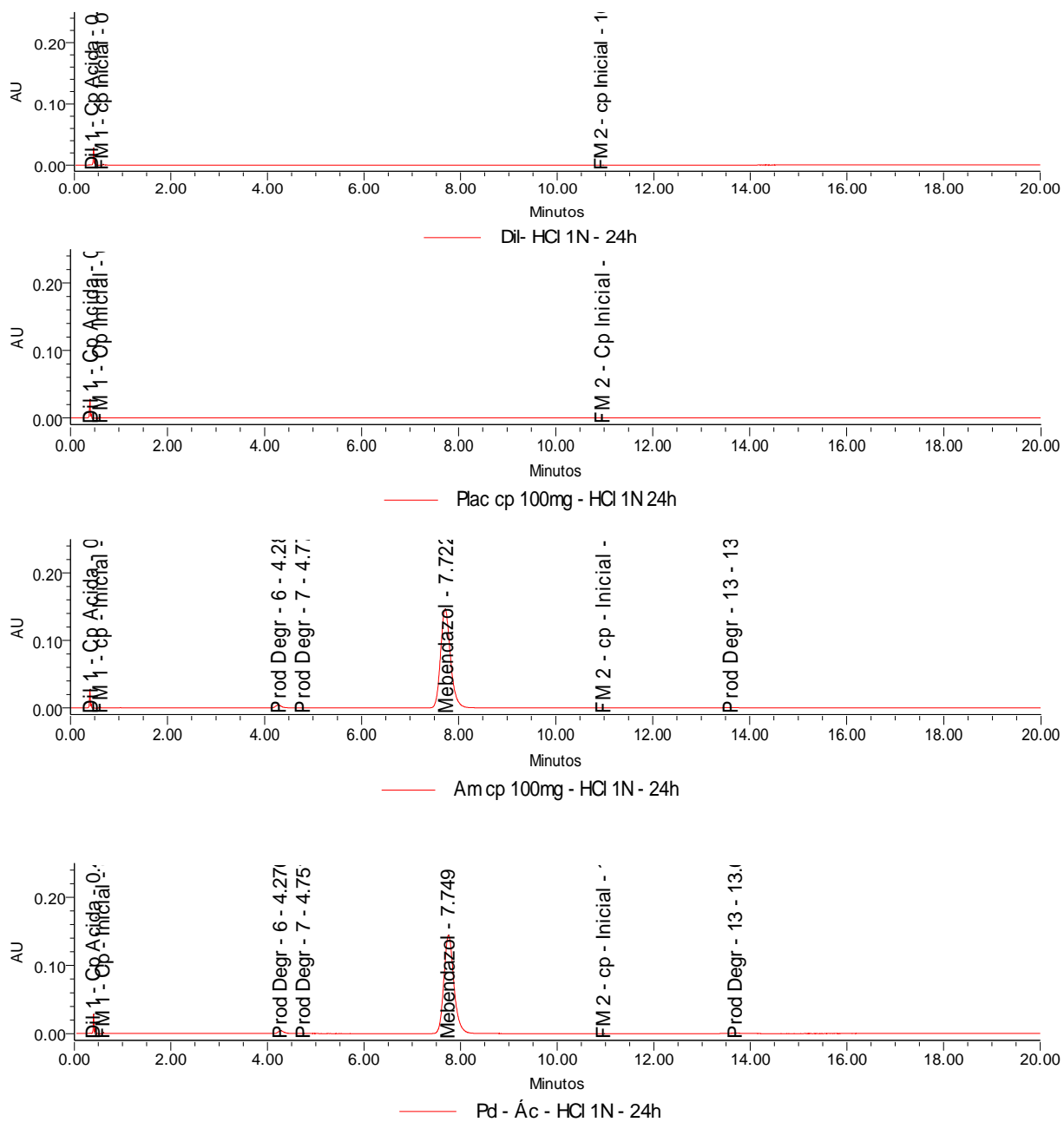


Figura 15 A -. Cromatogramas na condição de hidrólise alcalina com temperatura à 60°C por 20 minutos. (Legenda: Plac: Placebo, Pd: Padrão, Am: Amostra, Dil: Diluente e cp:Comprimido)

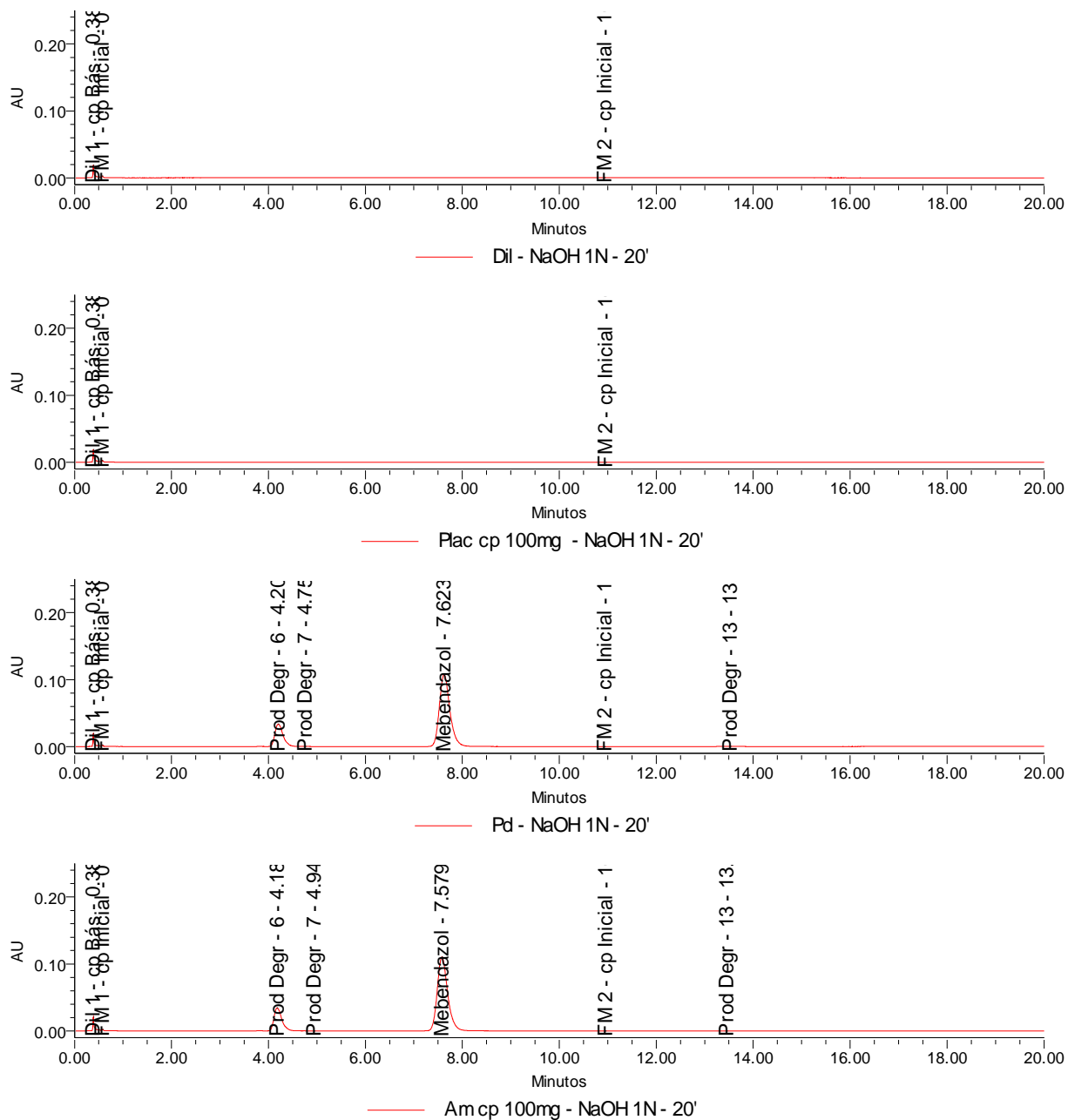


Figura 16 A - Cromatogramas na condição de oxidação com temperatura à 60°C por 4 horas (Legenda: Plac: Placebo, Pd: Padrão, Am: Amostra, Dil: Diluente e cp: Comprimido).

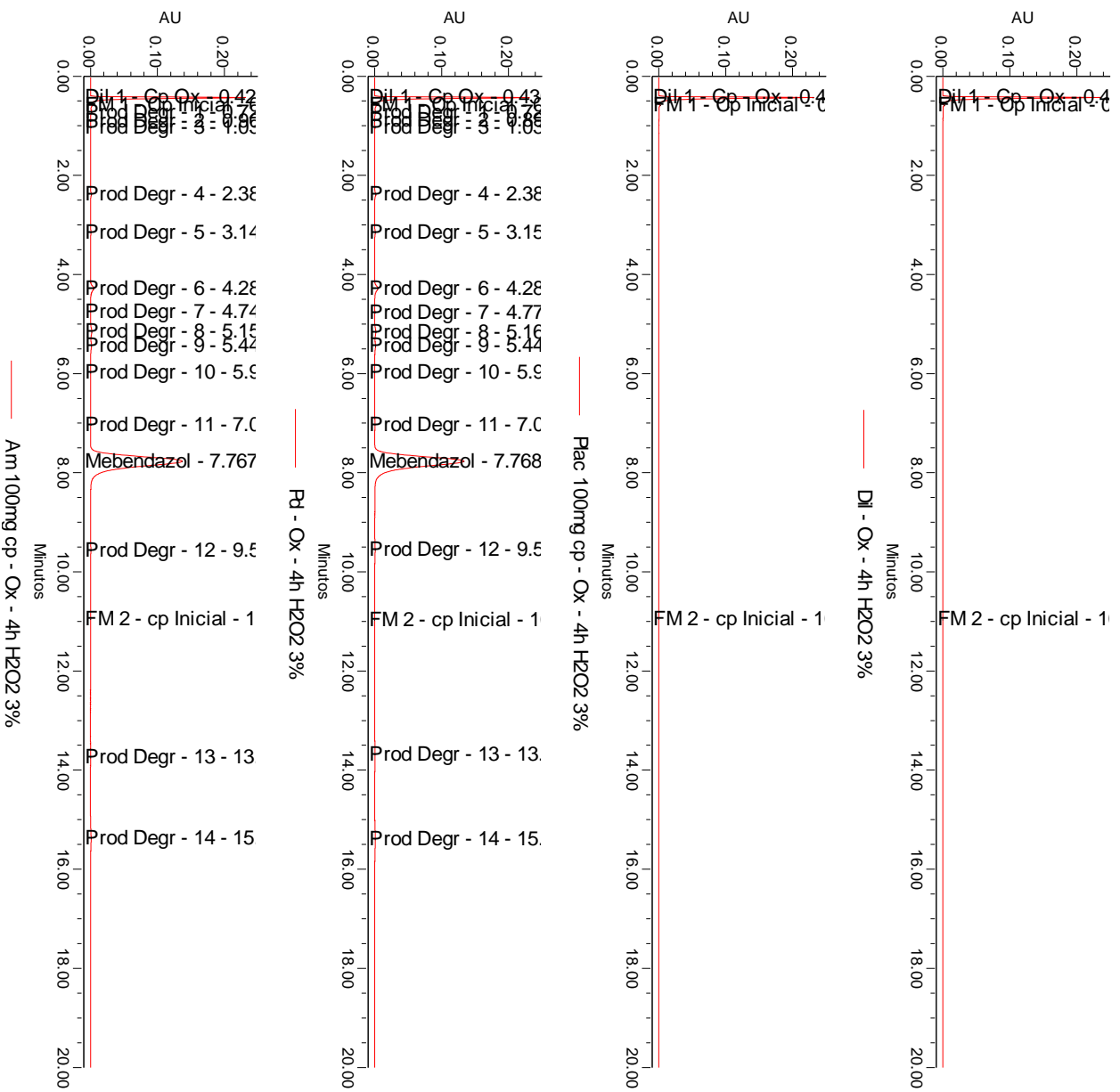


Figura 17 A - Cromatogramas na condição fotolítica com temperatura à 60°C por 24 horas (Legenda: Plac: Placebo, Pd: Padrão, Am: Amostra, Dil: Diluente e cp: Comprimido).

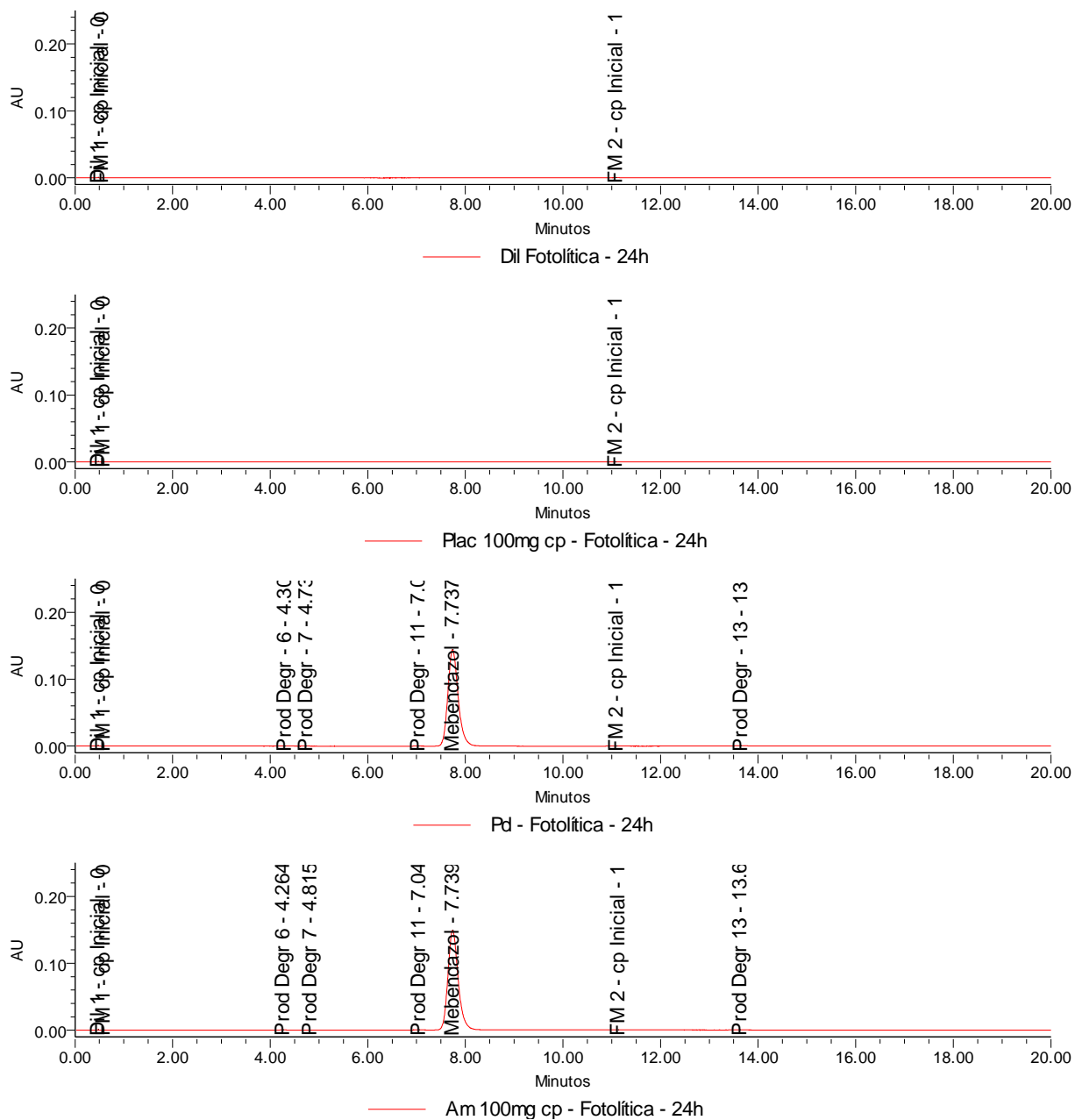


Figura 18 A - Cromatogramas na condição de umidade por 24 horas (Legenda: Plac: Placebo, Pd: Padrão, Am: Amostra, Dil: Diluente e cp: Comprimido).

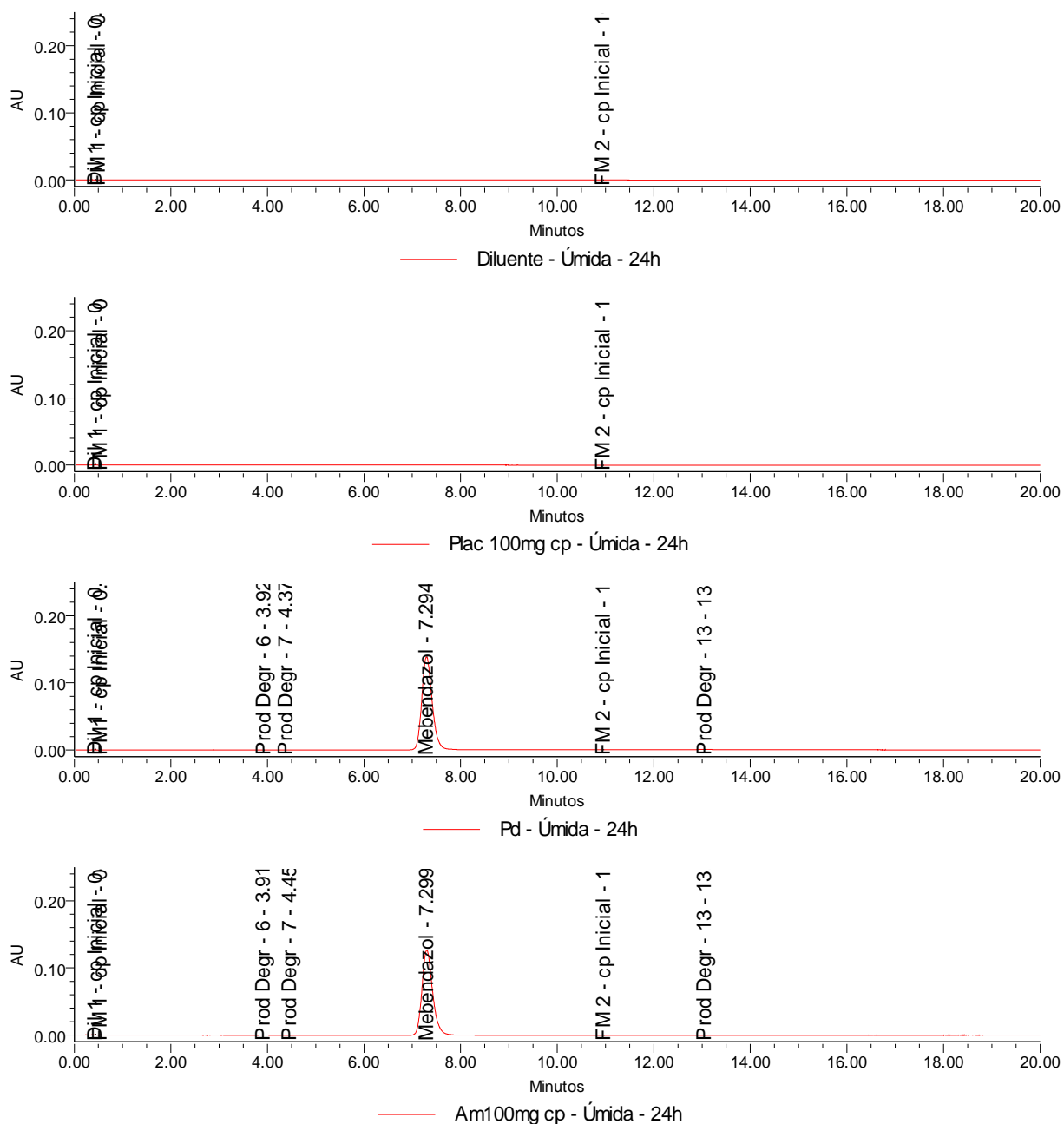


Figura 19 A -. Varredura realizada por detector detector PDA na condição de estresse por aquecimento a 60°C por 24 horas (Legenda: Plac: Placebo, Pd: Padrão, Am: Amostra, Dil: Diluente e cp: Comprimido).

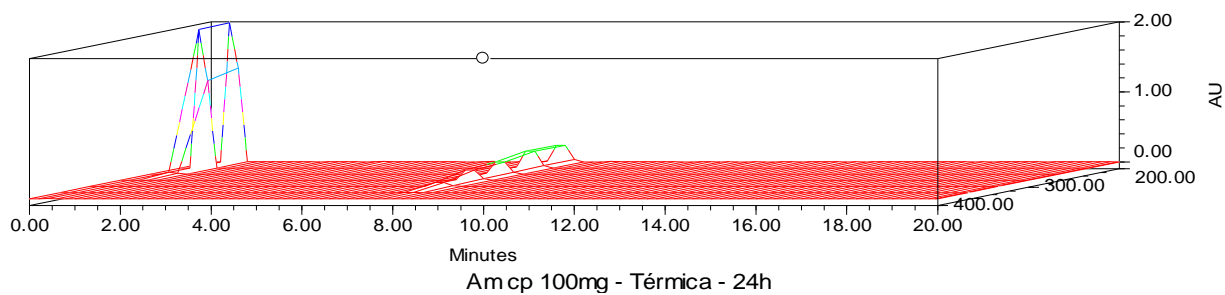
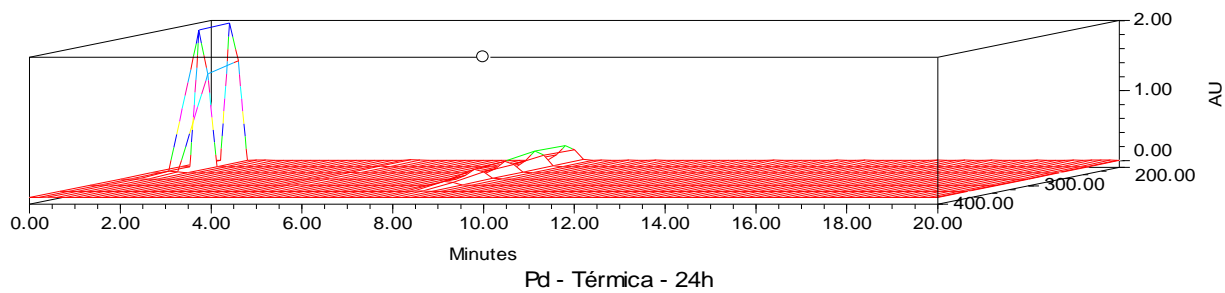
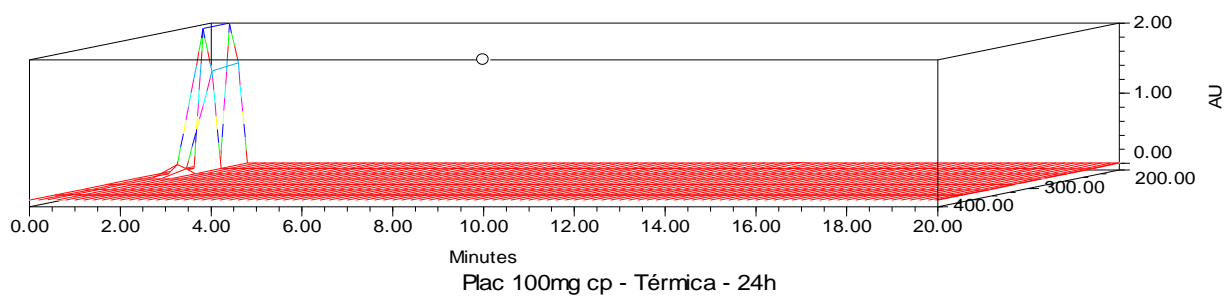
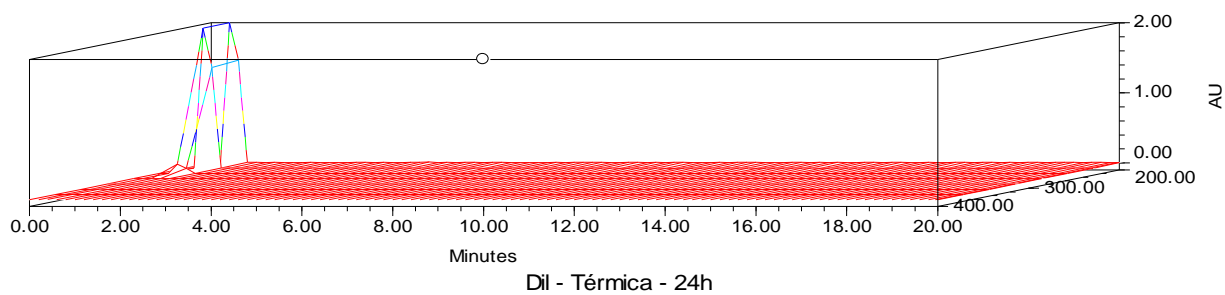


Figura 20 A -. Varredura realizada por detector detector PDA na condição de hidrólise ácida com temperatura à 60°C por 24 horas (Legenda: Plac: Placebo, Pd: Padrão, Am: Amostra, Dil: Diluente e cp: Comprimido).

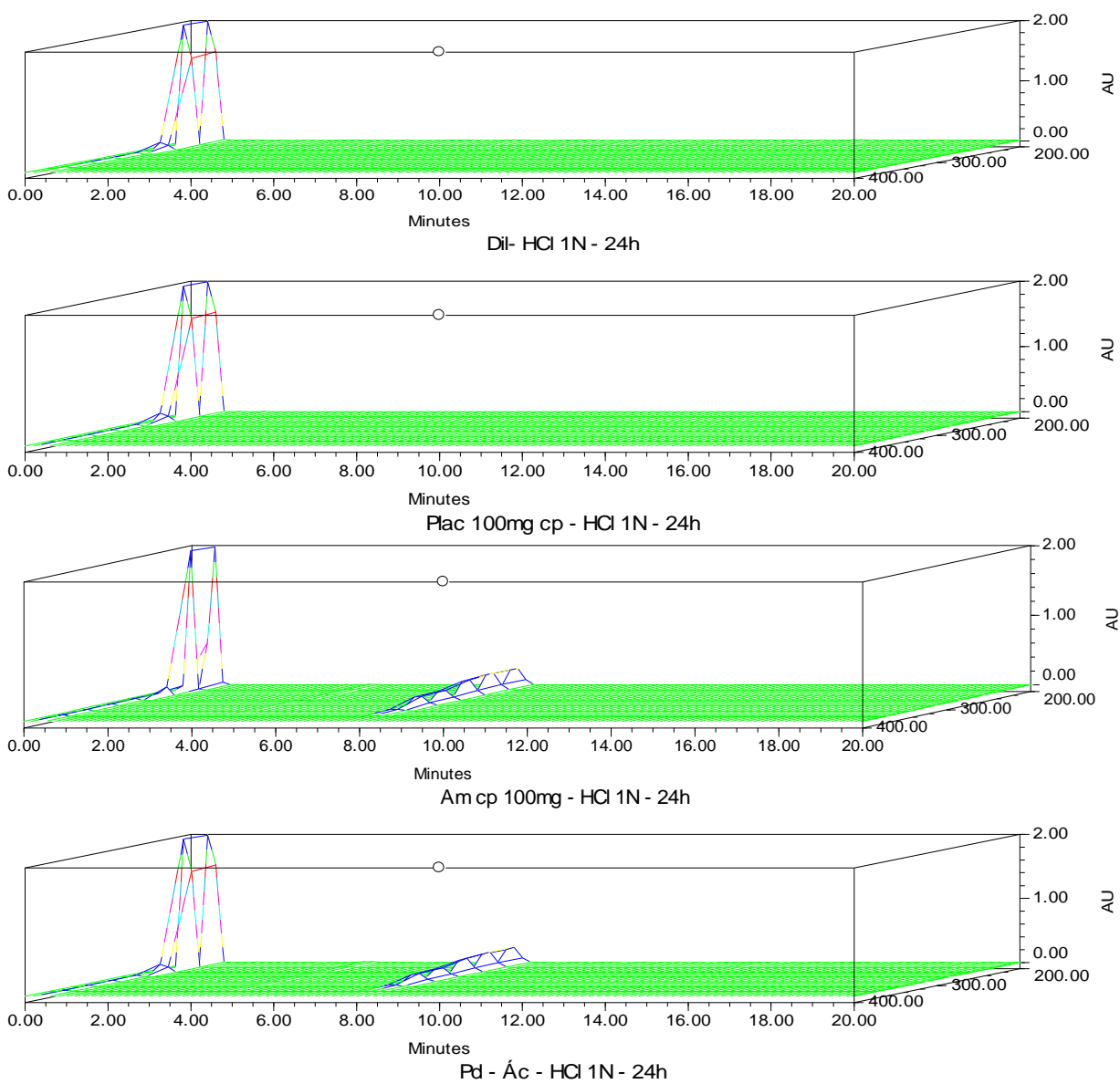


Figura 21 A. Varredura realizada por detector PDA na condição de hidrólise alcalina com temperatura à 60°C por 20 minutos (Legenda: Plac: Placebo, Pd: Padrão, Am: Amostra, Dil: Diluente e cp: Comprimido).

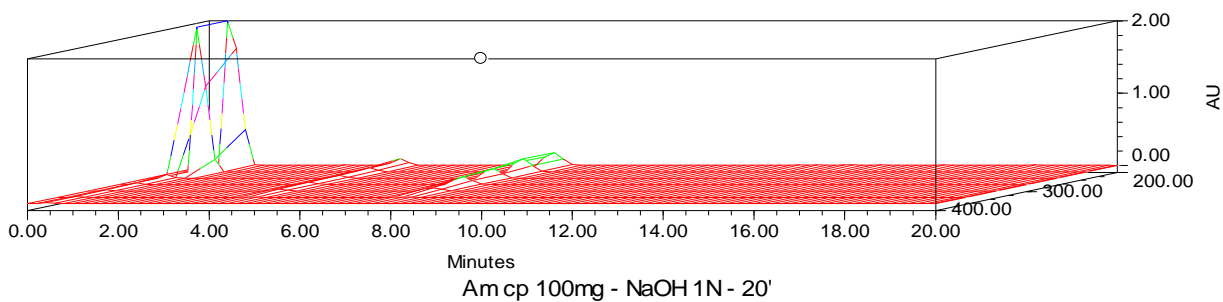
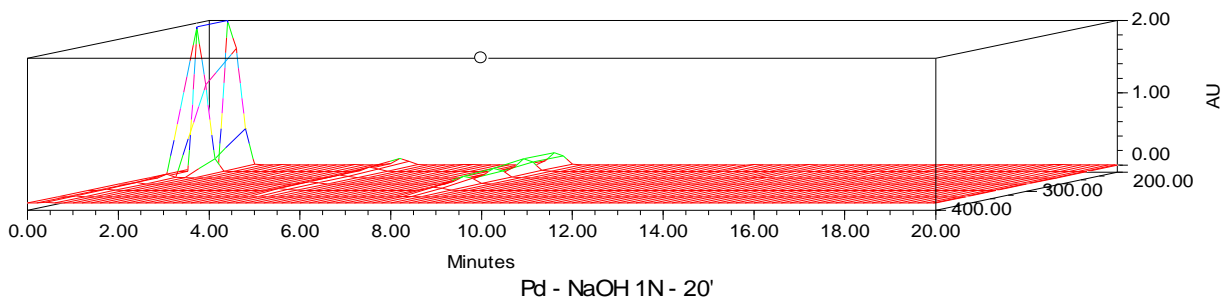
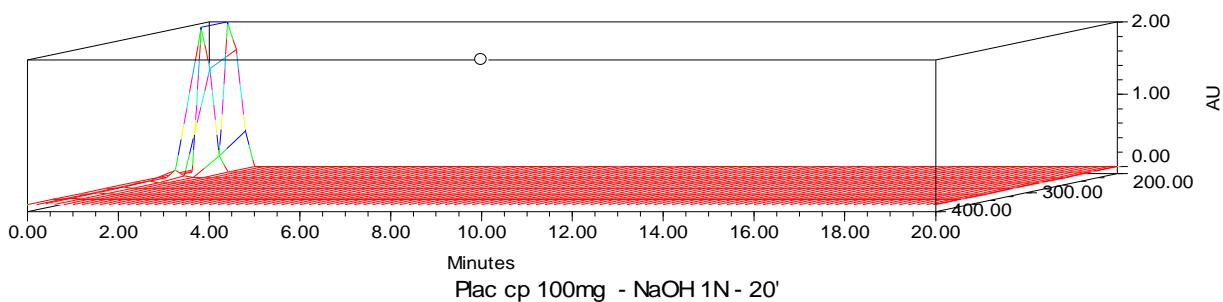
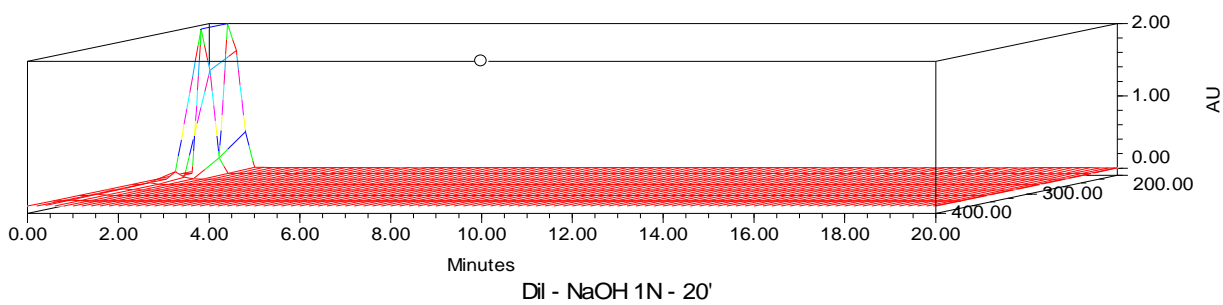


Figura 22 A - Varredura realizada por detector PDA na condição de oxidação com temperatura à 60°C por 4 horas (Legenda: Plac: Placebo, Pd: Padrão, Am: Amostra, Dil: Diluente e cp: Comprimido).

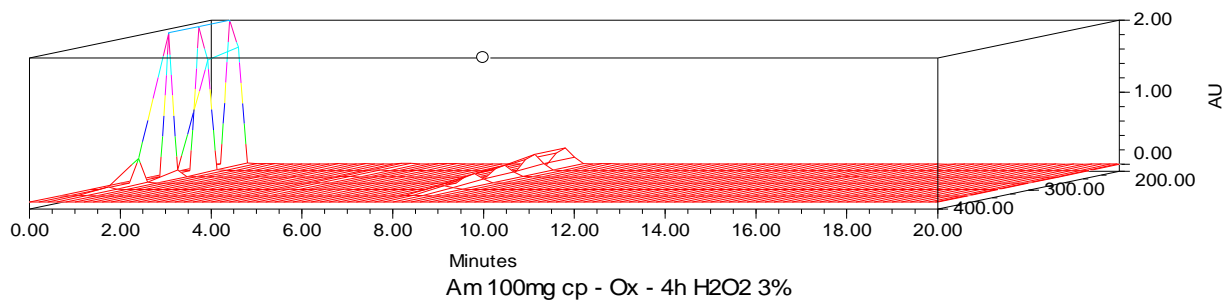
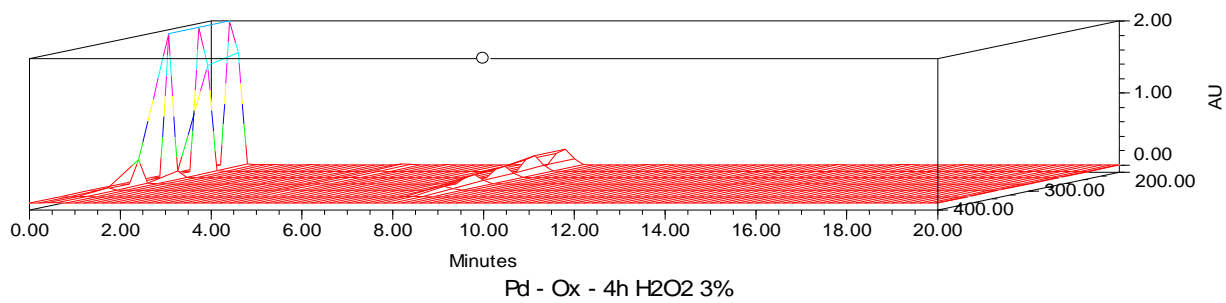
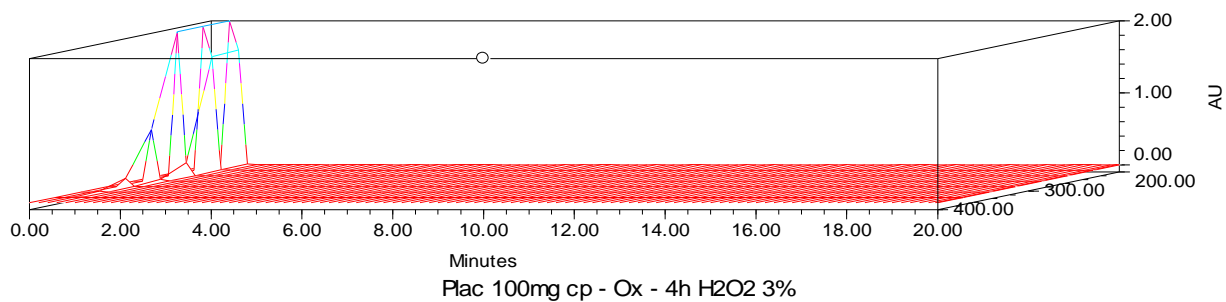
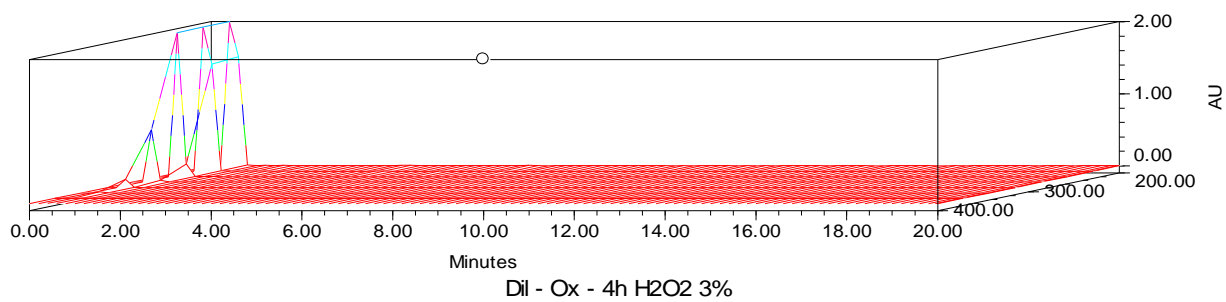


Figura 23 A - Varredura realizada por detector PDA na condição de fotólise por 24 horas (Legenda: Plac: Placebo, Pd: Padrão, Am: Amostra, Dil: Diluente e cp: Comprimido).

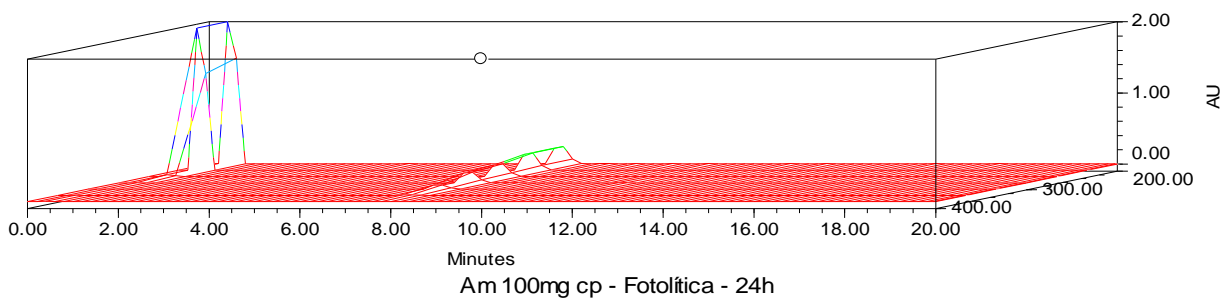
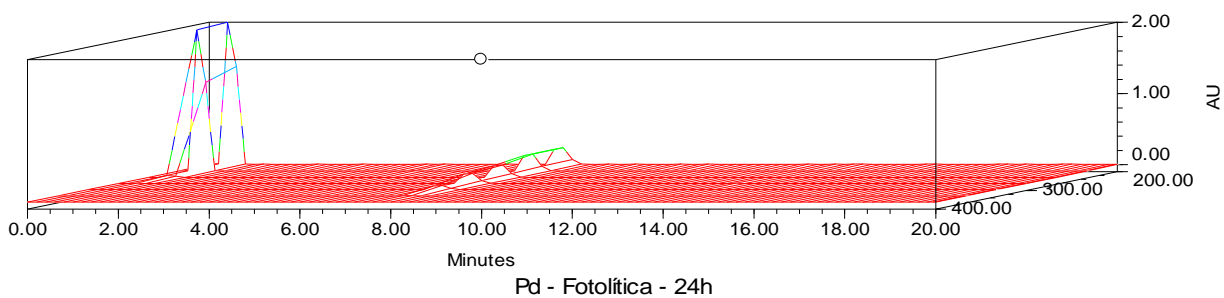
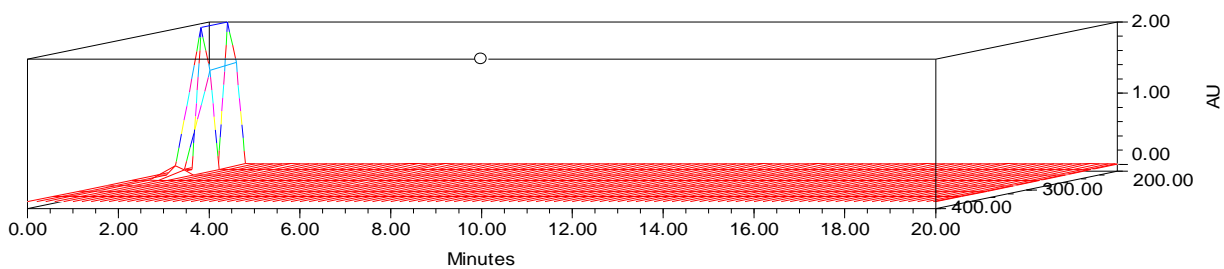
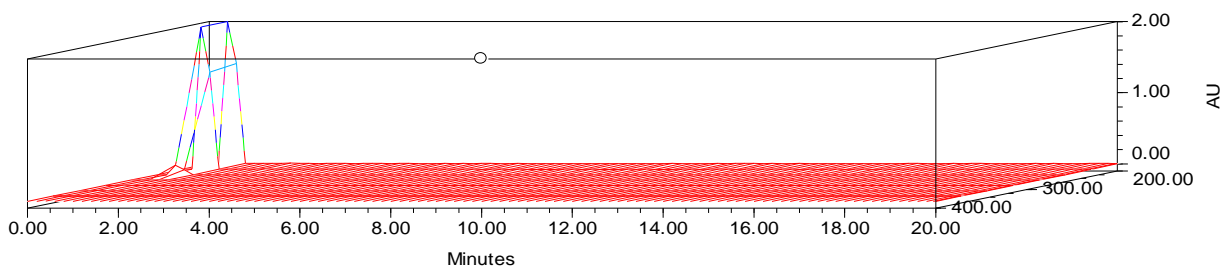


Figura 24 A - Varredura realizada por detector PDA na condição de umidade à 60°C por 24 horas (Legenda: Plac: Placebo, Pd: Padrão, Am: Amostra, Dil: Diluente e cp: Comprimido).

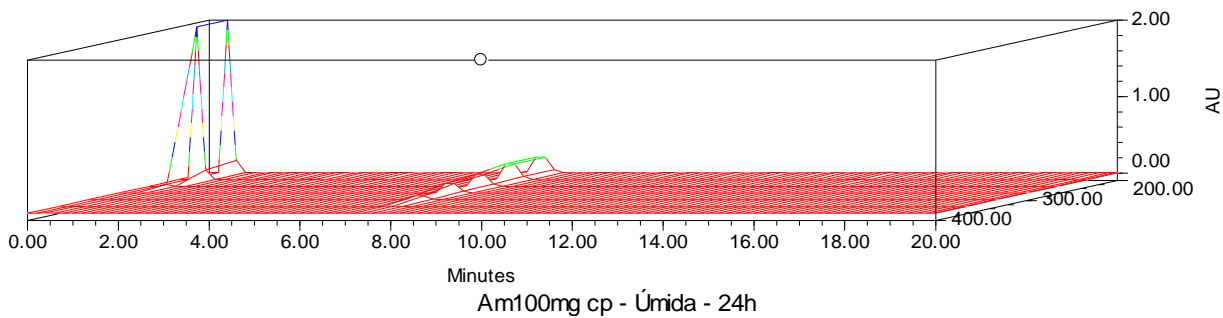
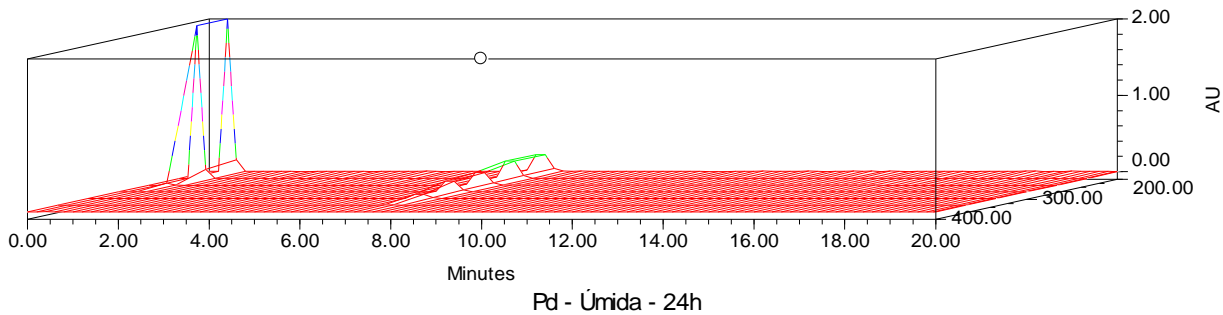
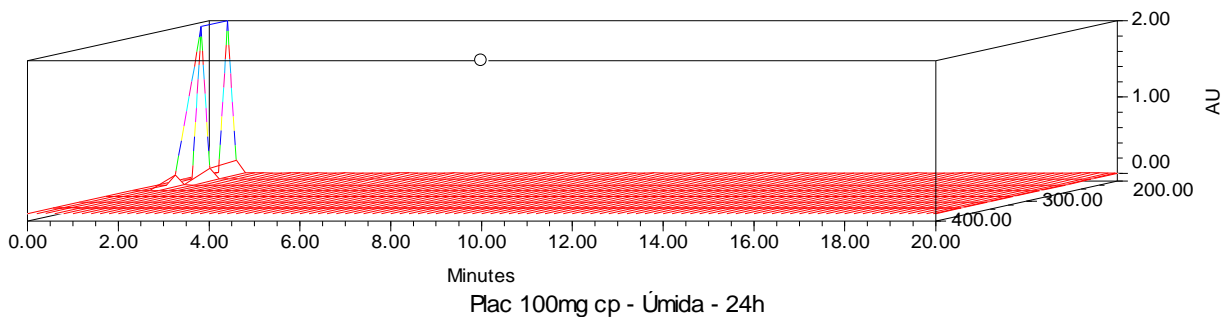
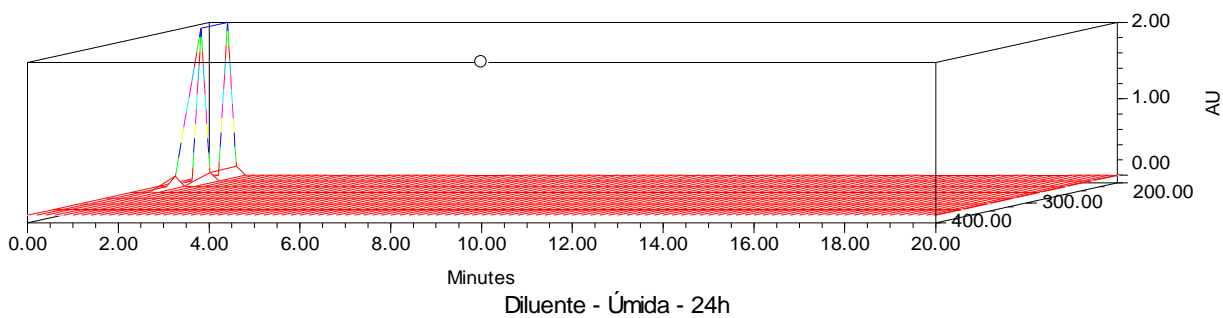


Figura 25 A - Cromatogramas na condição estressante por aquecimento a 60°C por 24 horas. (Legenda: Plac: Placebo, Pd: Padrão, Am: Amostra, Dil: Diluente e cp: Comprimido).

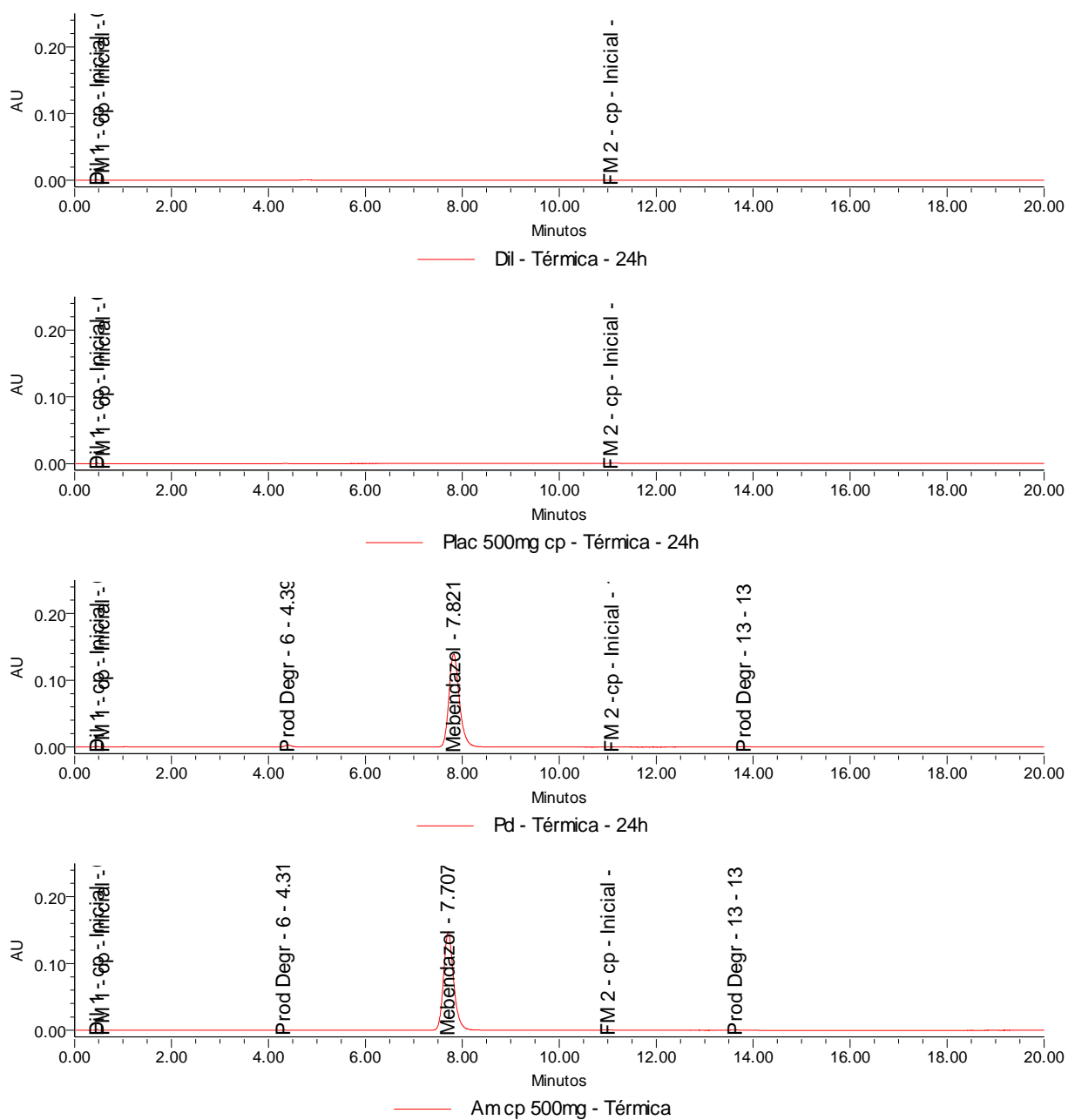


Figura 26 A - Cromatogramas na condição de hidrólise ácida com temperatura à 60°C por 24 horas (Legenda: Plac: Placebo, Pd: Padrão, Am: Amostra, Dil: Diluente e cp: Comprimido).

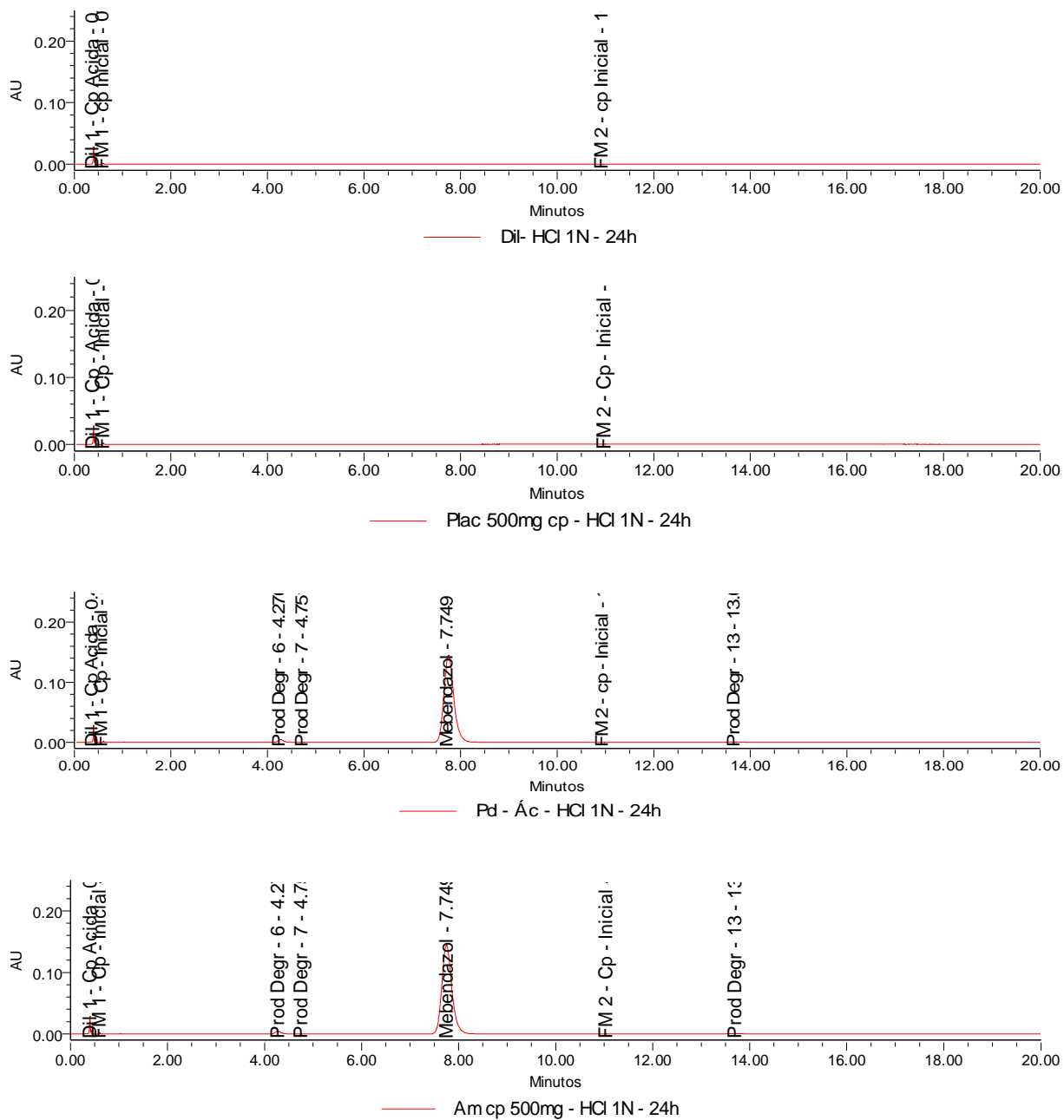
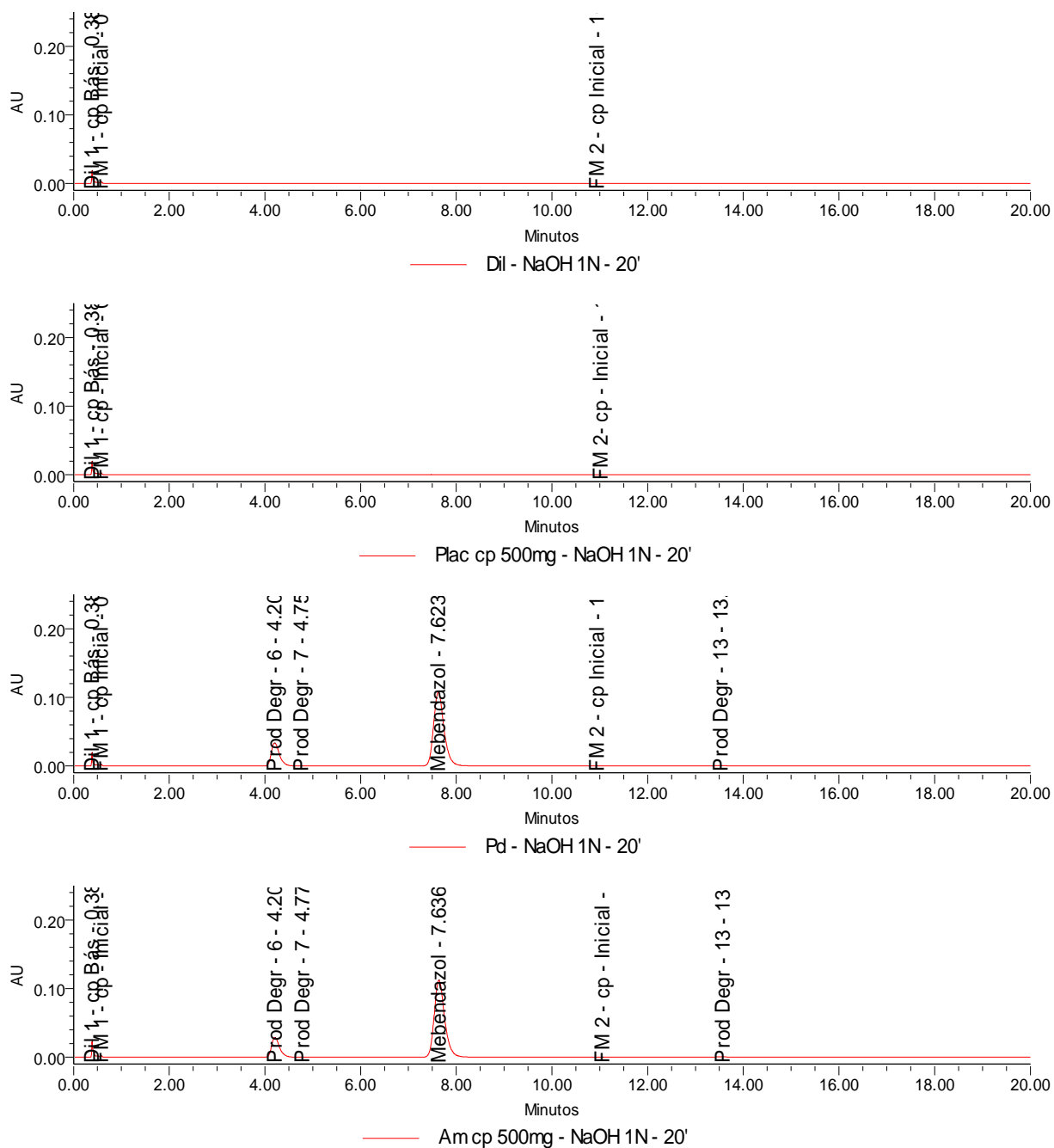


Figura 27 A - Cromatogramas na condição de hidrólise alcalina com temperatura à 60°C por 20 minutos (Legenda: Plac: Placebo, Pd: Padrão, Am: Amostra, Dil: Diluente e cp: Comprimido).



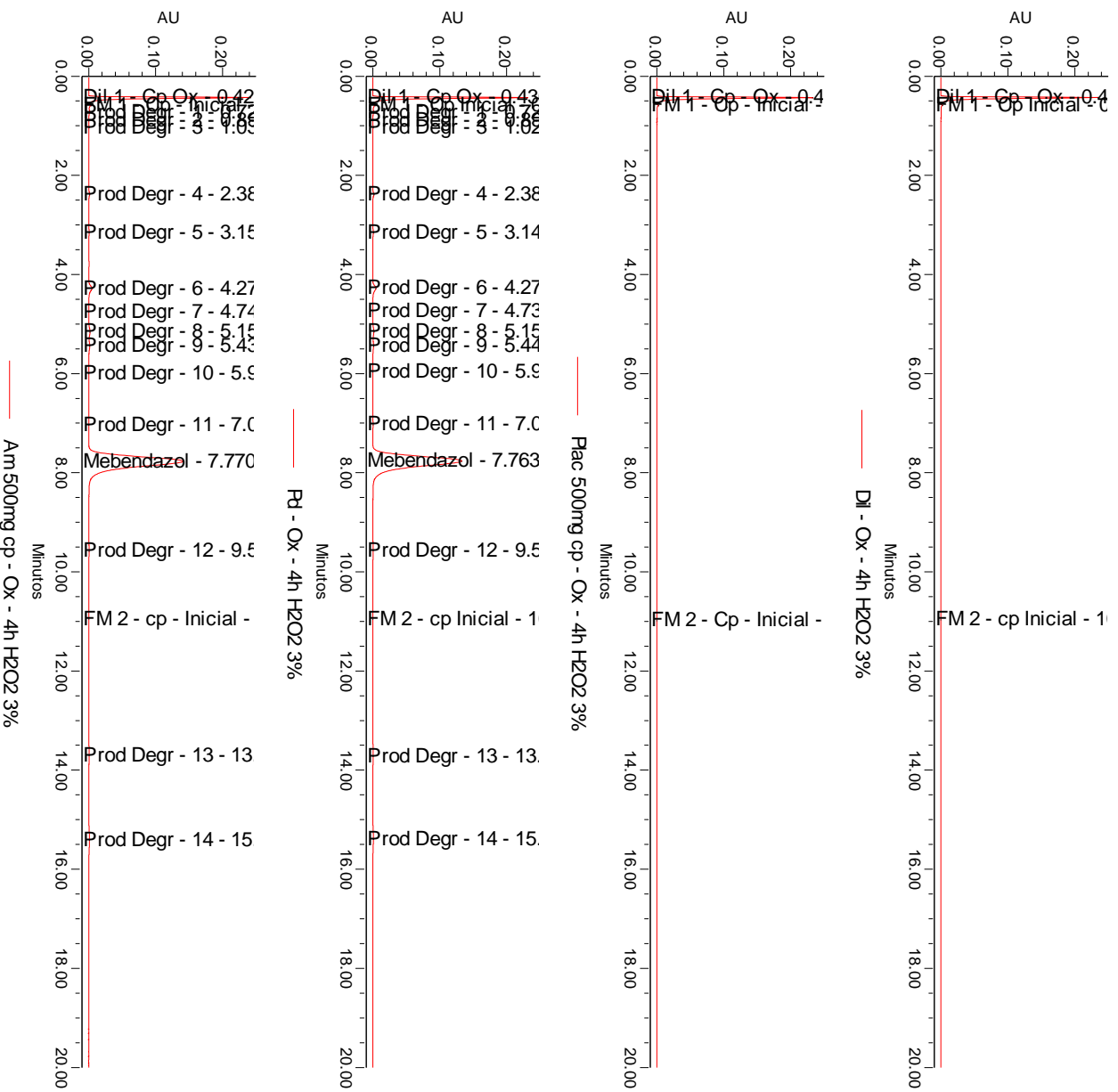


Figura 28 A - Cromatogramas na condição de oxidação com temperatura à 60°C por 4 horas (Legenda: Plac: Placebo, Pd: Padrão, Am: Amostra, Dil: Diluente e cp: Comprimido).

Figura 29A - Cromatogramas na condição fotolítica com temperatura à 60°C por 24 horas (Legenda: Plac: Placebo, Pd: Padrão, Am: Amostra, Dil: Diluente e cp: Comprimido).

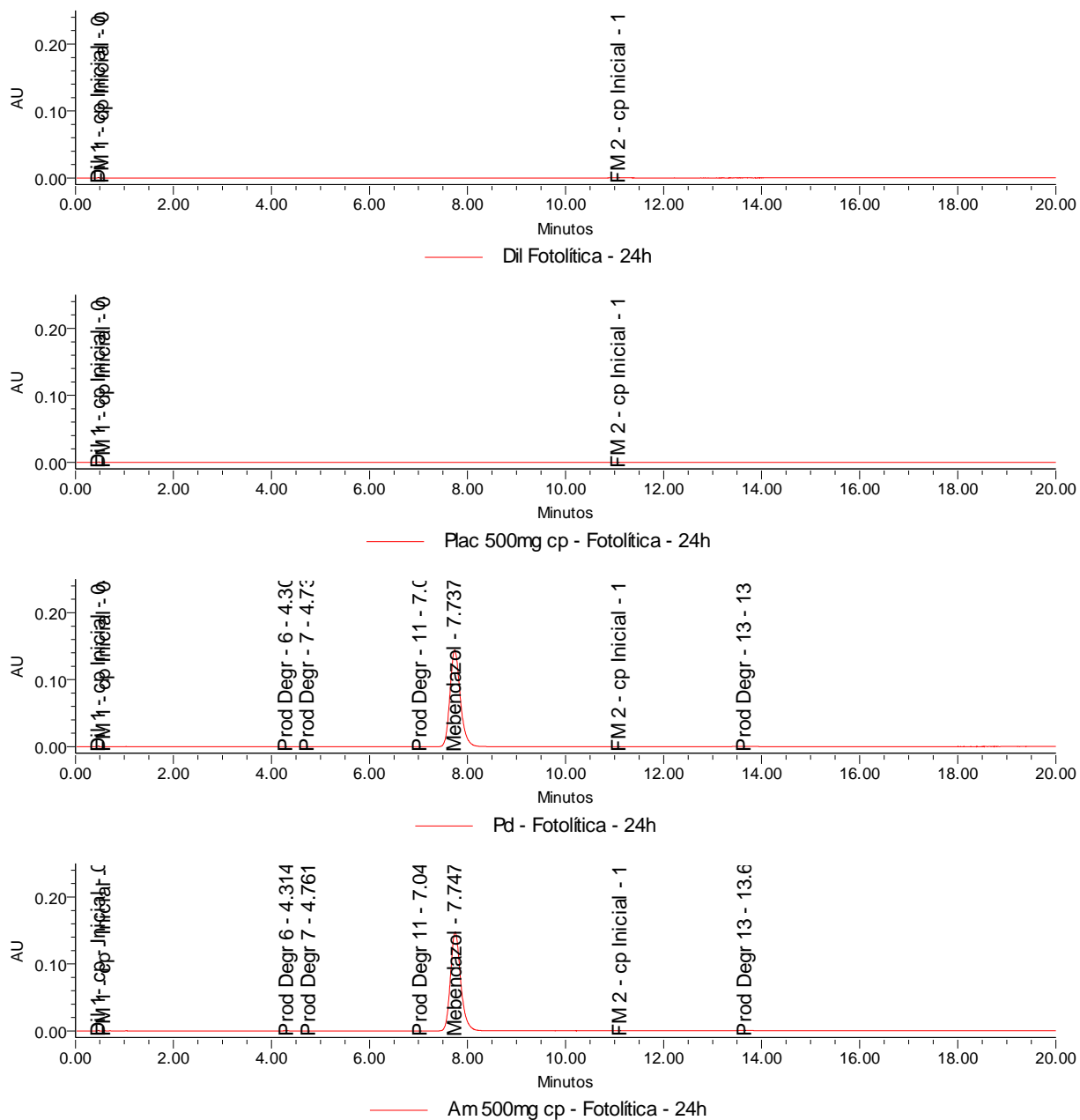


Figura 30 A - Cromatogramas na condição de umidade por 24 horas (Legenda: Plac: Placebo, Pd: Padrão, Am: Amostra, Dil: Diluente e cp: Comprimido).

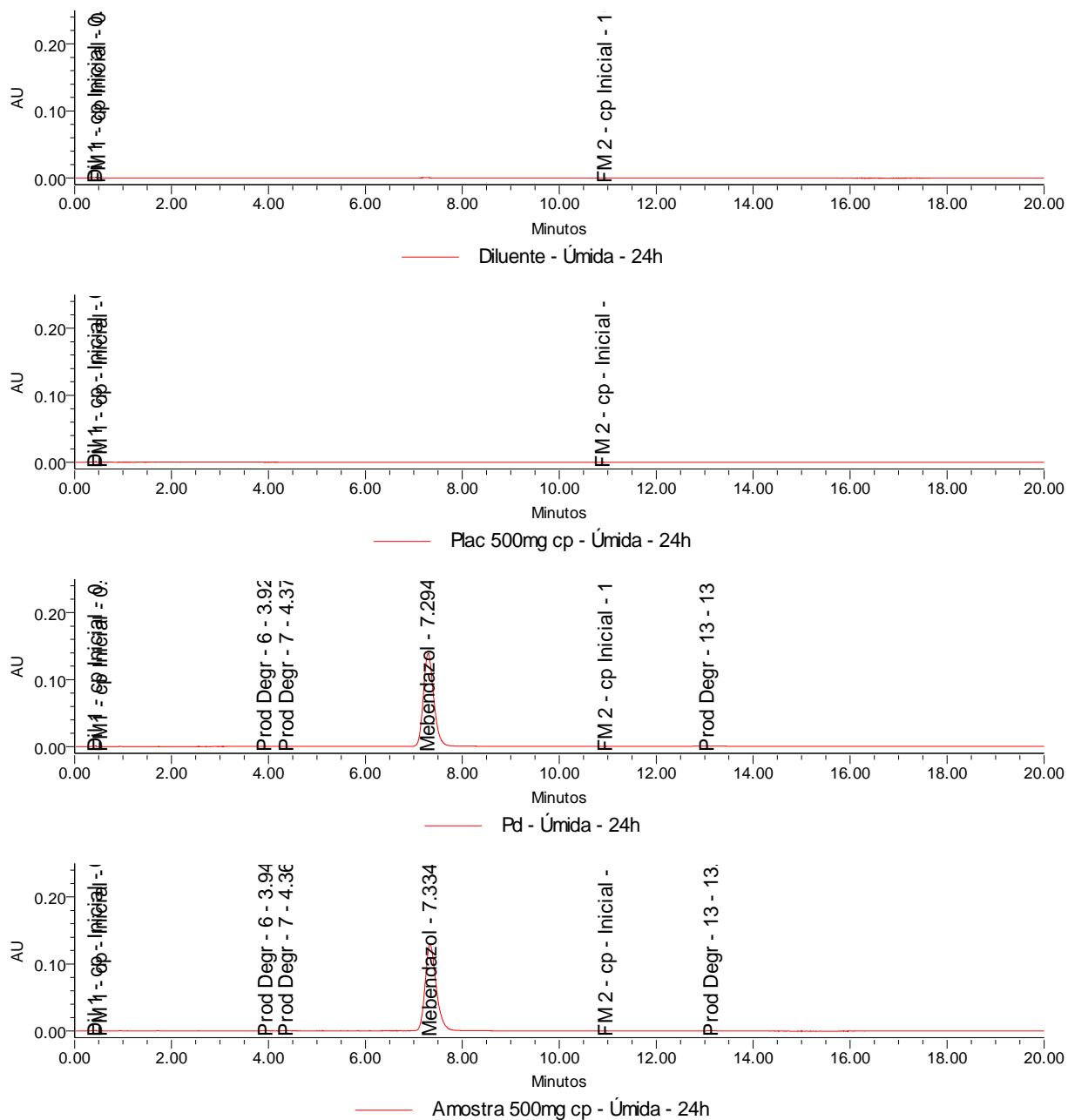
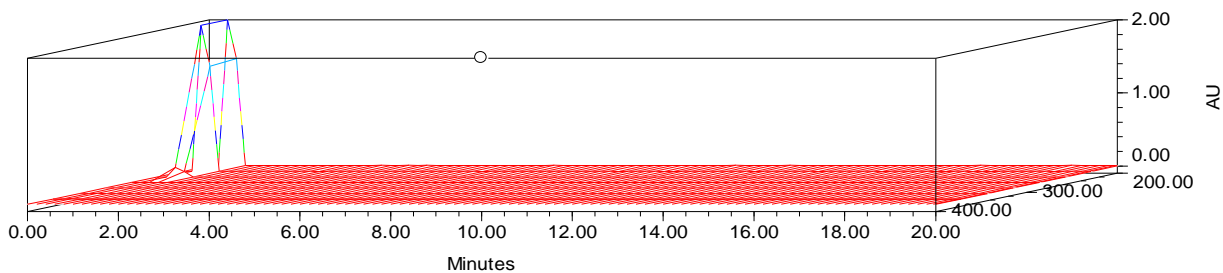
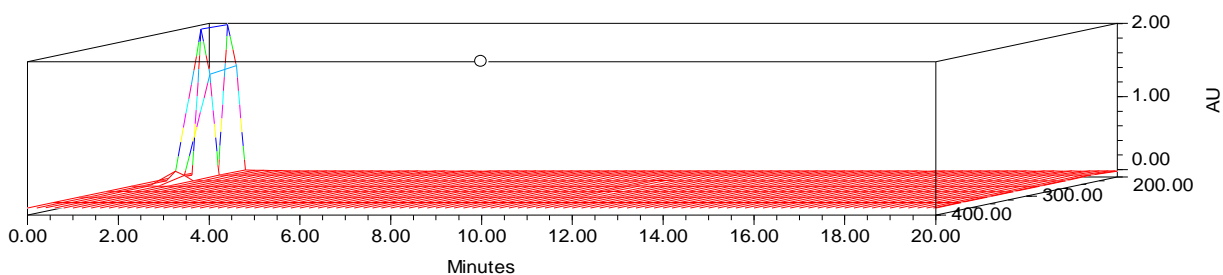


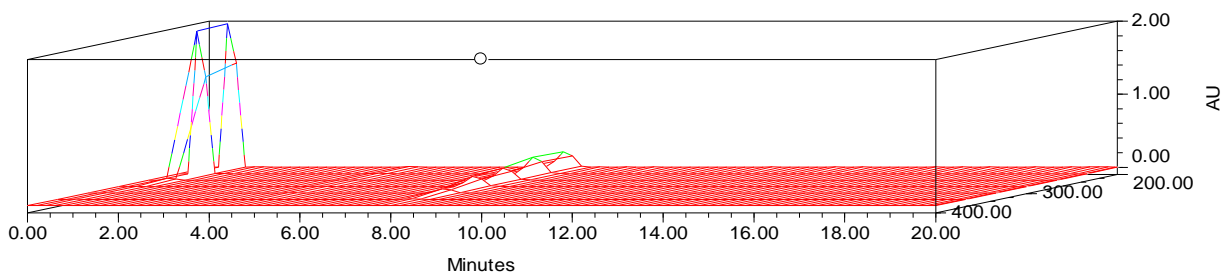
Figura 31 A - Varredura realizada por detector PDA na condição normal com temperatura a 60°C por 24 horas (Legenda: Plac: Placebo, Pd: Padrão, Am: Amostra, Dil: Diluente e cp: Comprimido).



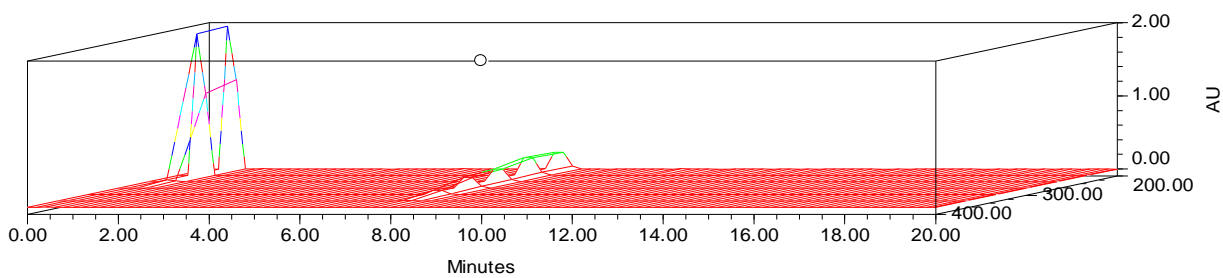
Dil - Térmica - 24h



Plac 500mg cp - Térmica - 24h



Pd - Térmica - 24h



Am cp 500mg - Térmica

Figura 32 A - Varredura realizada por detector PDA na condição de hidrólise ácida com temperatura à 60°C por 24 horas (Legenda: Plac: Placebo, Pd: Padrão, Am: Amostra, Dil: Diluente e cp: Comprimido).

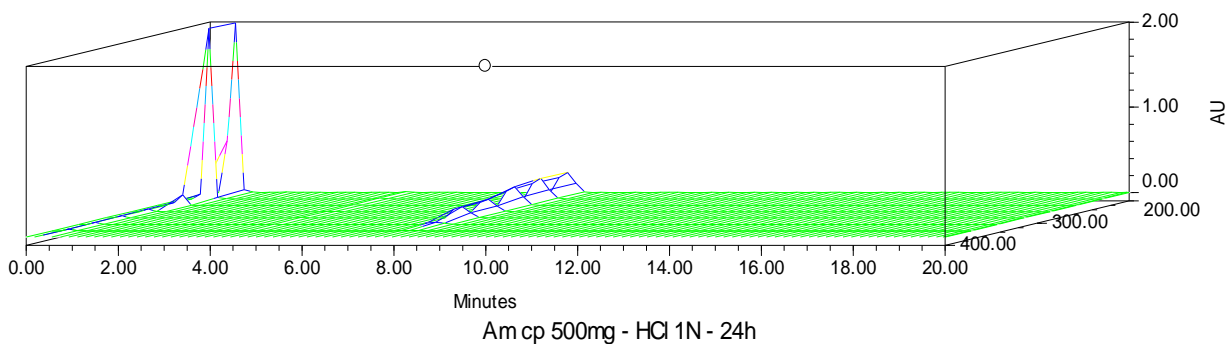
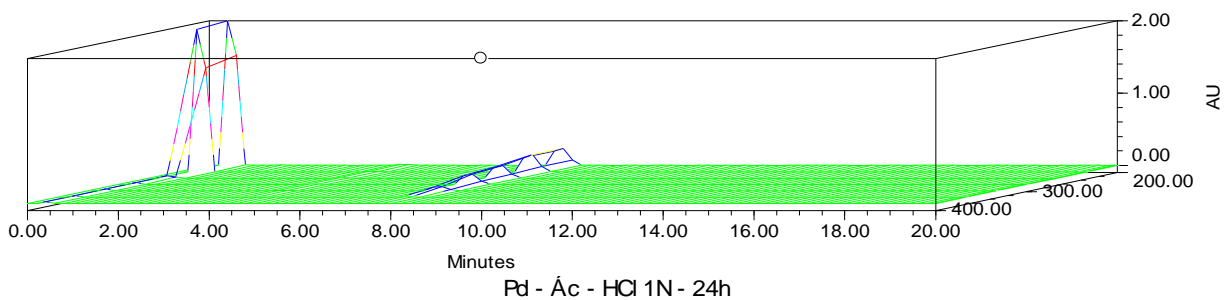
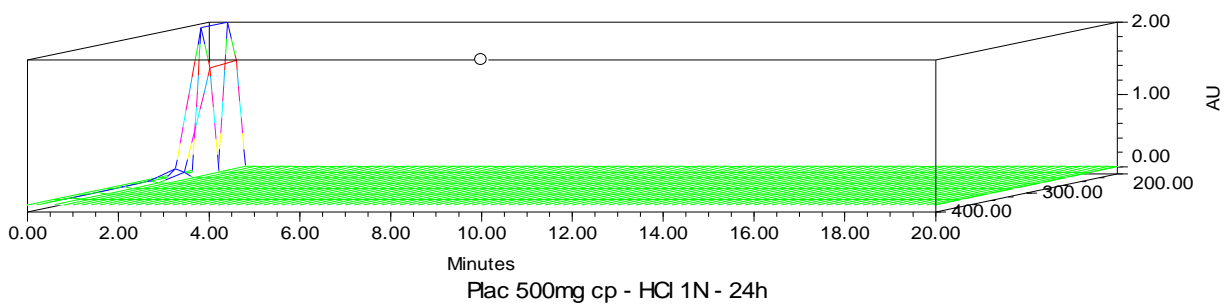
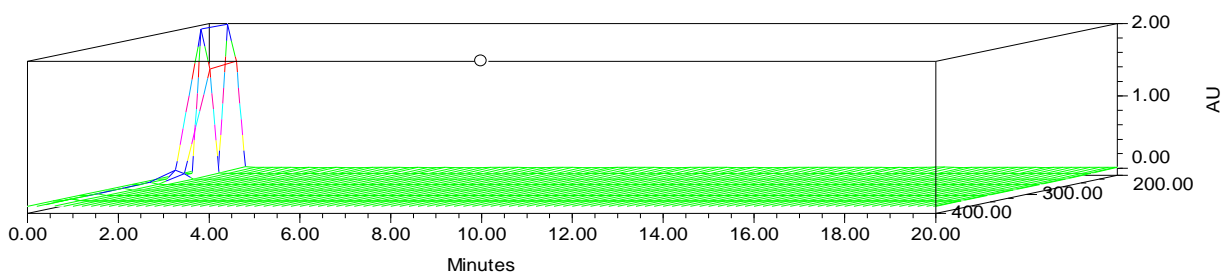


Figura 33 A -. Varredura realizada por detector PDA na condição de hidrólise alcalina com temperatura à 60°C por 20 minutos (Legenda: Plac: Placebo, Pd: Padrão, Am: Amostra, Dil: Diluente e cp: Comprimido).

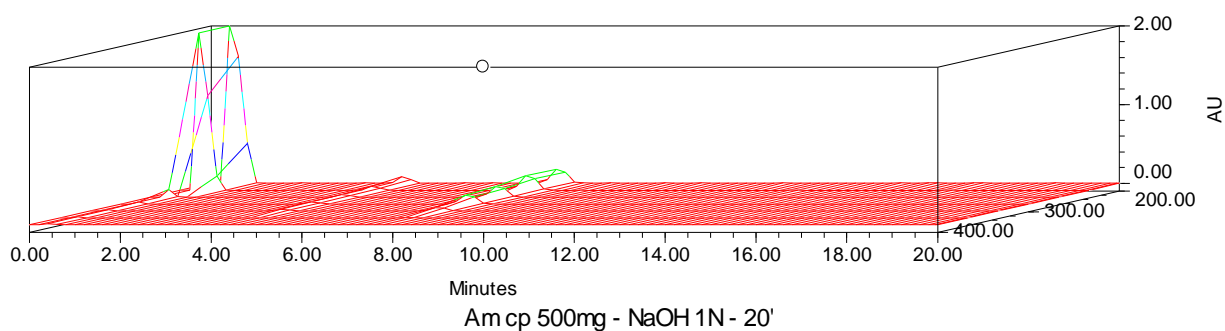
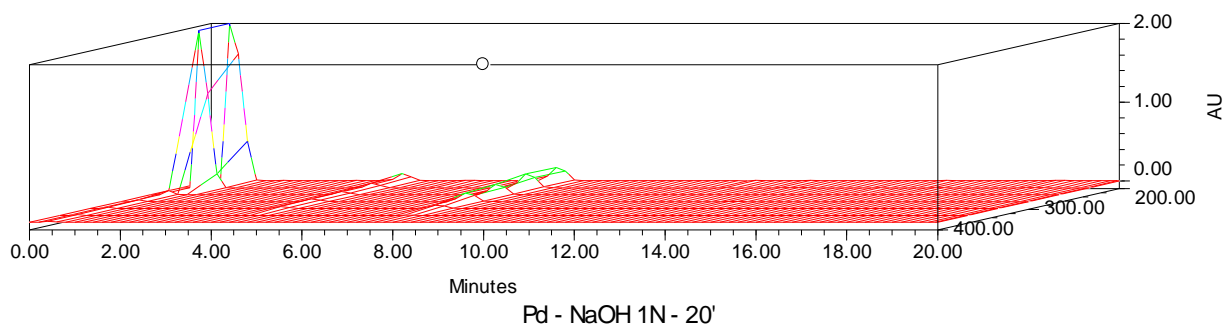
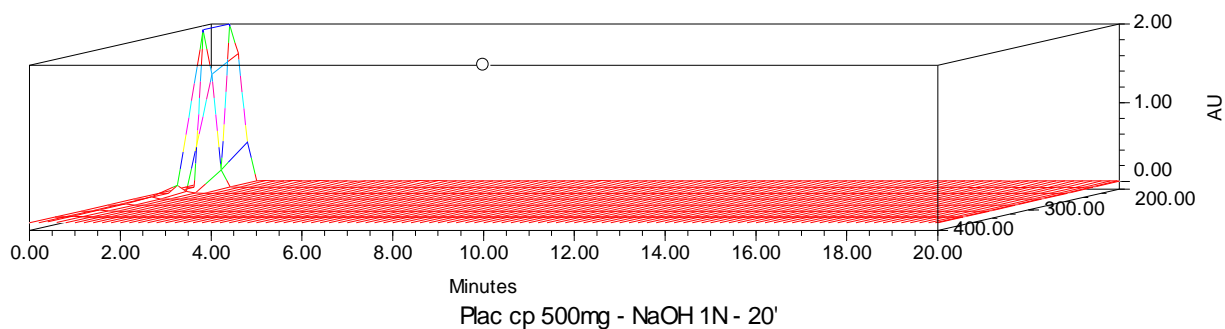
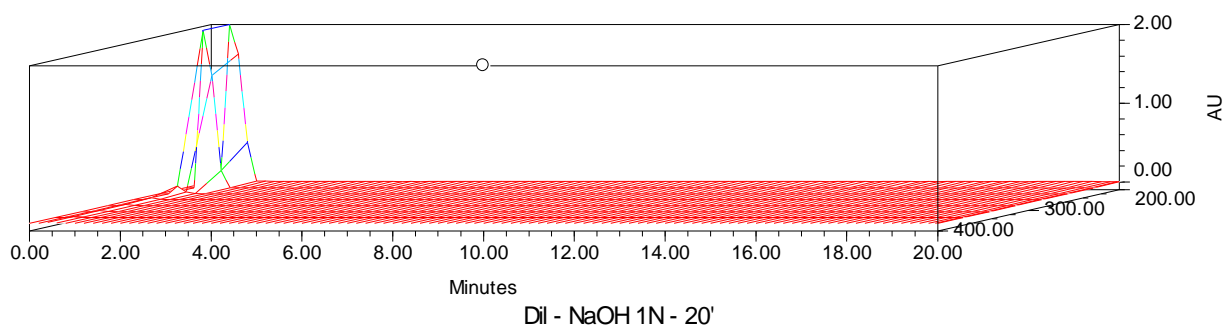


Figura 34 A - Varredura realizada por detector PDA na condição de oxidação com temperatura à 60°C por 4 horas (Legenda: Plac: Placebo, Pd: Padrão, Am: Amostra, Dil: Diluente e cp: Comprimido).

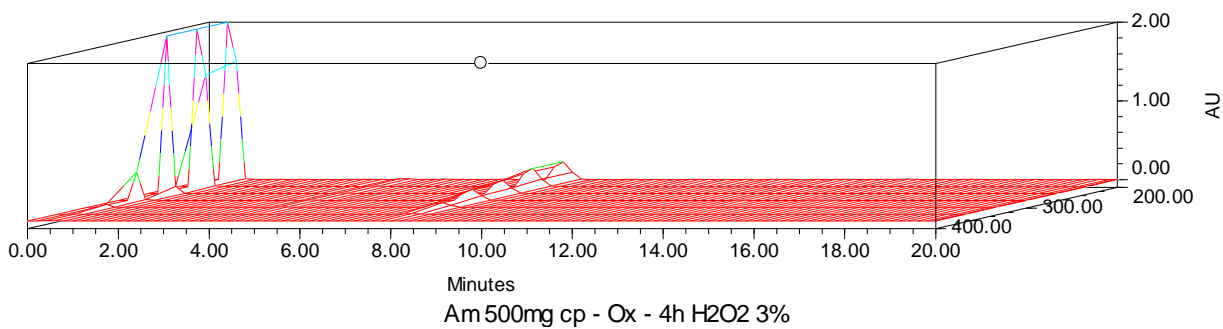
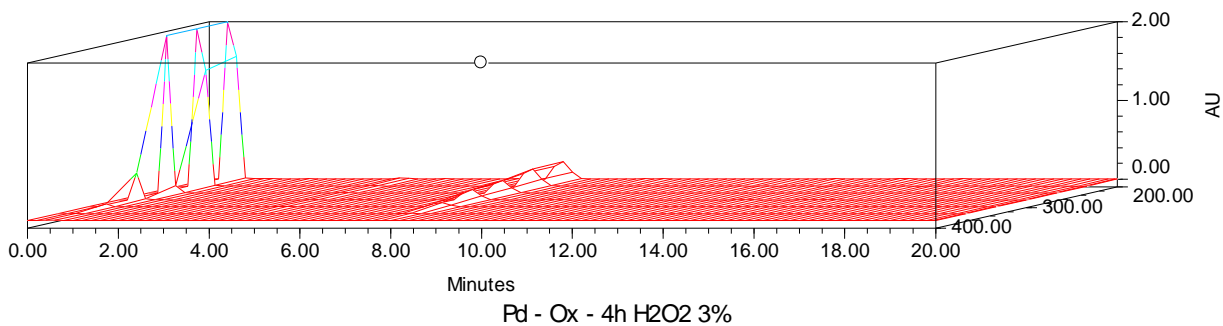
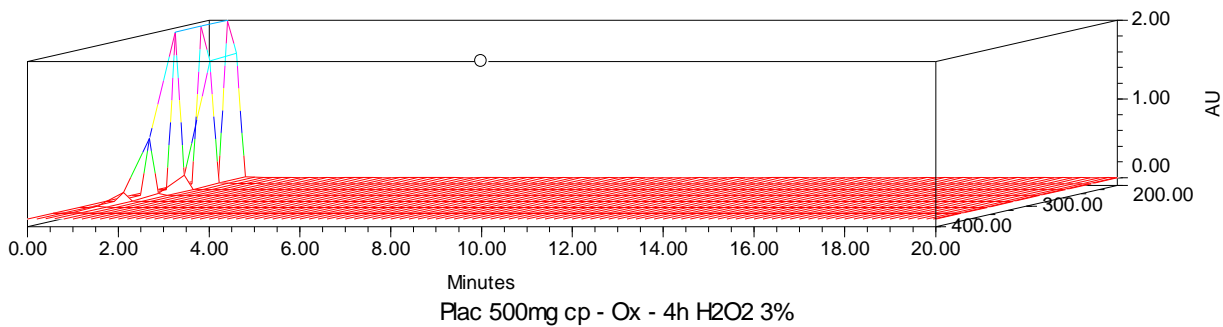
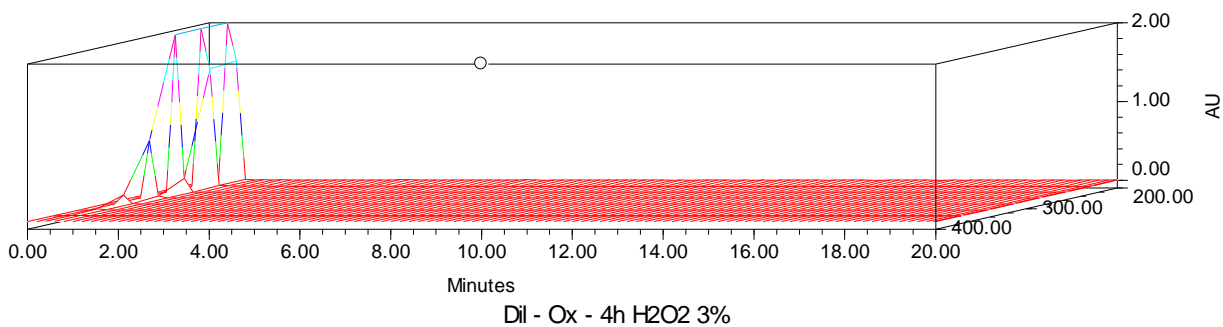


Figura 35 A - Varredura realizada por detector PDA na condição de fotólise por 24 horas (Legenda: Plac: Placebo, Pd: Padrão, Am: Amostra, Dil: Diluente e cp: Comprimido).

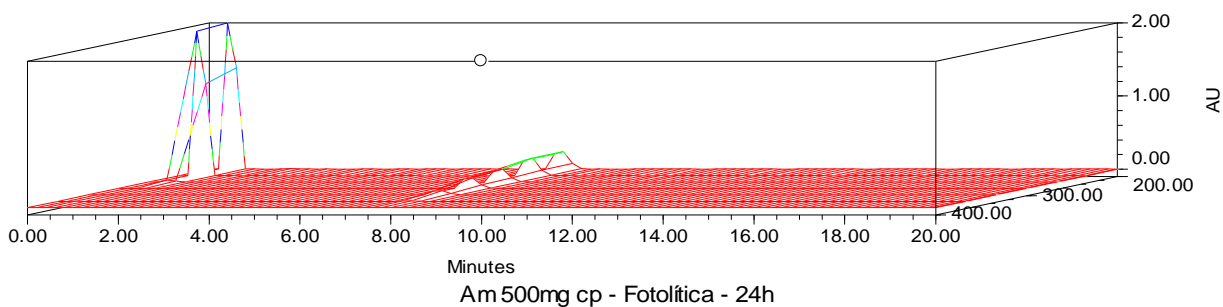
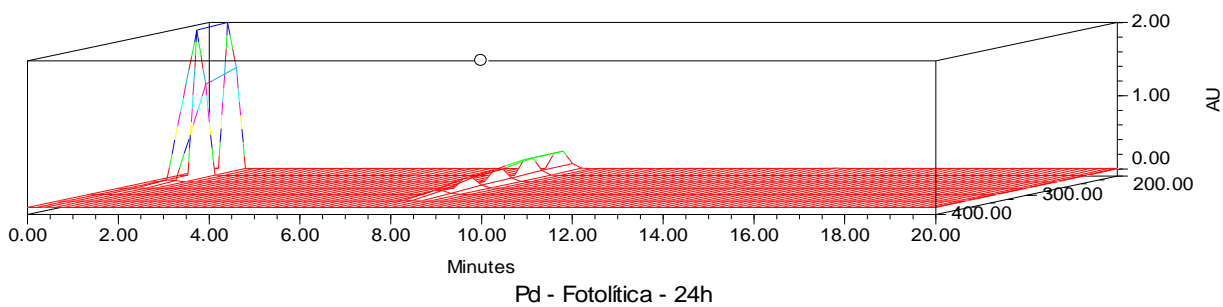
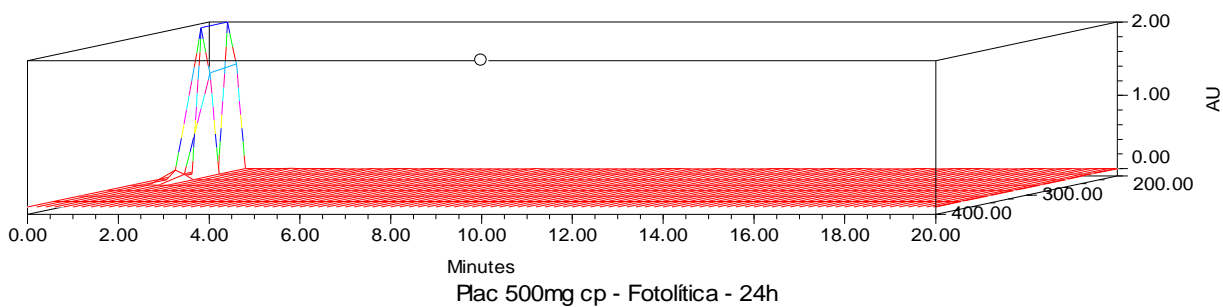
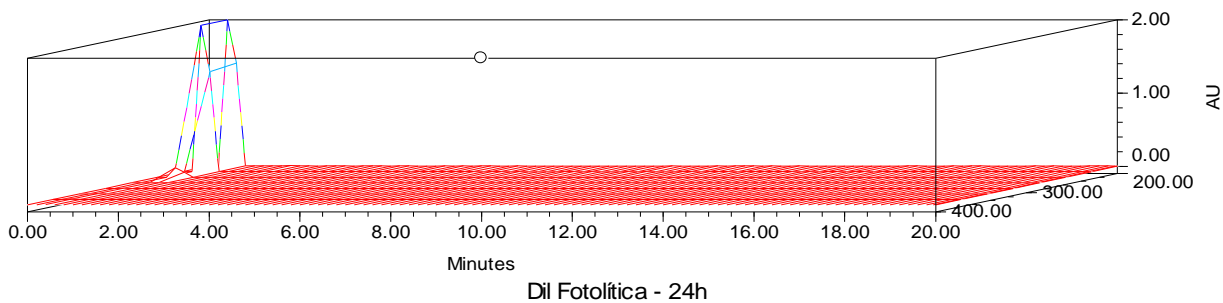


Figura 36 A - Varredura realizada por detector PDA na condição de umidade a 60°C por 24 horas. (Legenda: Plac: Placebo, Pd: Padrão, Am: Amostra, Dil: Diluente e cp: Comprimido).

