

## VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA O DOSEAMENTO SIMULTÂNEO DE MEBENDAZOL E TIABENDAZOL POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

Núbia K. de Paula e Marcelo M. Sena\*

Unidade Universitária de Ciências Exatas e Tecnológicas, Universidade Estadual de Goiás, BR 153, km 98, 75000-000 Anápolis – GO, Brasil

Recebido em 26/4/06; aceito em 24/10/06; publicado na web em 14/5/07

VALIDATION OF ANALYTICAL METHODOLOGY FOR SIMULTANEOUS EVALUATION OF MEBENDAZOLE AND THIABENDAZOLE IN TABLETS BY HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY. The aim of this work was to develop and validate an analytical methodology for simultaneous determination of mebendazole and thiabendazole, two benzimidazoles used as anthelmintics. The method was based on high performance liquid chromatography, using a C18 column, a mobile phase composed of  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.05 mol  $\text{L}^{-1}$  and methanol 40:60 (v/v) and UV detection at 312 nm. The results showed that the method presented linearity from 60.0 to 140.0  $\mu\text{g mL}^{-1}$  for mebendazole and from 99.6 to 232.4  $\mu\text{g mL}^{-1}$  for thiabendazole and it was considered selective, accurate, precise and robust according to the specific resolution from ANVISA, the Brazilian regulatory agency.

Keywords: HPLC; quality control; benzimidazoles.

### INTRODUÇÃO

O mebendazol (MBZ)<sup>1</sup> e o tiabendazol (TBZ)<sup>2</sup> são agentes anti-helmínticos da classe dos benzimidazóis. Eles atuam produzindo paralisia ou lesando a cutícula do verme, resultando em digestão parcial ou na sua rejeição por mecanismos imunológicos. Os agentes anti-helmínticos podem também interferir no metabolismo do verme e, como as necessidades metabólicas desses parasitas variam acentuadamente de uma espécie para outra, os fármacos que se mostram altamente eficazes contra determinado tipo de verme podem ser ineficazes contra outros tipos<sup>3</sup>. Desta forma, a associação de MBZ e TBZ tem a vantagem de permitir o tratamento de verminoses múltiplas com um só medicamento. As estruturas moleculares do MBZ e do TBZ são mostradas na Figura 1. Os métodos oficiais para a determinação individual desses dois fármacos são baseados em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)<sup>4</sup>, mas não possibilitam a determinação simultânea de ambas as espécies, devido à similaridade dos tempos de retenção e à sobreposição espectral. Na literatura, tal determinação simultânea é relatada em apenas dois artigos, os quais se baseiam em um sistema em fluxo com detecção amperométrica<sup>5</sup> e em CLAE<sup>6</sup>.

Nos últimos anos, a necessidade de demonstrar a qualidade de medições químicas, através de sua comparabilidade, rastreabilidade e confiabilidade, vem sendo cada vez mais exigida, justificando o inter-

resse da comunidade acadêmica brasileira pelos diversos aspectos da validação analítica<sup>7-12</sup>. A validação de um método analítico pode ser definida como o processo pelo qual se estabelece, através de estudos de laboratório, que as características de desempenho do método satisfazem às exigências para as aplicações analíticas planejadas<sup>4</sup>. O uso oficial do termo “validação” começou nos final dos anos 70<sup>13</sup> e sua aplicação a métodos analíticos foi consolidada nos anos 90 através da ICH<sup>14</sup> (“International Conference on Harmonization”), na qual representantes de indústrias e agências reguladoras de diversos países harmonizaram as definições de parâmetros e requisitos, com o objetivo de suplantiar antigas diferenças nas definições adotadas pelas diversas organizações. No Brasil, dentre as áreas de interesse primordial pela validação analítica destaca-se a indústria farmacêutica, sendo que, nos últimos anos, os seus laboratórios de controle de qualidade estão se adequando às diretrizes da Resolução RE nº 899<sup>15</sup>, publicada pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) em 2003, e que se baseia no documento Q2B da ICH<sup>14</sup>. No estado de Goiás em particular, esse interesse é realçado pela presença do terceiro maior polo farmacêutico do país, instalado no Distrito Agroindustrial de Anápolis (DAIA) nos anos 90 e contando atualmente com 21 indústrias em funcionamento<sup>16,17</sup>.

Dado o interesse regional e buscando maior aproximação entre a universidade e o setor produtivo, este trabalho visou atender uma demanda específica de indústria farmacêutica local. O seu objetivo foi desenvolver e validar uma metodologia analítica baseada em CLAE, simples e de menor custo em relação à única alternativa descrita na literatura<sup>6</sup>, para o doseamento simultâneo dos fármacos MBZ e TBZ.

### PARTE EXPERIMENTAL

#### Reagentes e padrões

Os reagentes utilizados foram ácido fórmico (Synth) de pureza analítica, fosfato de potássio monobásico (Merck) e metanol (Merck), ambos de grau cromatográfico. Os padrões primários de MBZ e TBZ foram obtidos da USP (“United States Pharmacopeia”), ambos de potência 100,0%. Os padrões secundários de trabalho

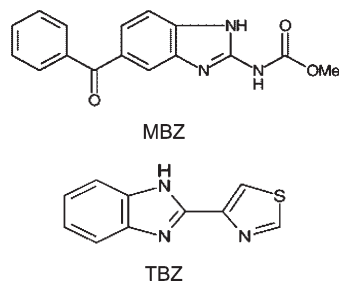


Figura 1. Fórmulas estruturais do MBZ e do TBZ

\*e-mail: marcsen@ueg.br

apresentaram potências de 99,91% (MBZ) e 101,31% (TBZ), determinadas pelo método oficial (CLAE)<sup>4</sup>.

### Instrumentação

Utilizou-se um sistema cromatográfico constituído de um módulo de separação Waters 2695, detector Waters 2487, coluna analítica tipo C18 Waters/XTerra RP18, de diâmetro de 4,6 mm e comprimento de 150 mm. Com o intuito de se avaliar a precisão intermediária e a robustez do método, empregou-se alternativamente outra coluna analítica, tipo C18 Agilent/Zorbax eclipse XDB, de mesmas dimensões que a primeira.

### Metodologia

A fase móvel utilizada foi uma mistura de tampão fosfato de potássio monobásico 0,05 mol L<sup>-1</sup> e metanol na proporção de 40:60 (v/v), em um fluxo de 1,0 mL min<sup>-1</sup>. O melhor comprimento de onda para a detecção dos dois princípios ativos foi selecionado em 312 nm. O volume de injeção foi 10 µL. A solução padrão foi preparada pela dissolução de 83,0 mg de TBZ e 50,0 mg de MBZ em 7,5 mL de ácido fórmico, em um balão de 50,0 mL, o qual foi completado com metanol. Em seguida, 5,00 mL desta solução foram diluídos na fase móvel, em balão de 50,0 mL. A concentração final de MBZ foi 0,100 mg mL<sup>-1</sup> e de TBZ, 0,166 mg mL<sup>-1</sup>. O doseamento das amostras foi realizado transferindo-se um núcleo teórico (peso correspondente a um comprimido) para um balão de 100,0 mL, contendo 15,0 mL de ácido fórmico. Após agitação por 5 min, o volume foi completado com metanol e a solução foi filtrada em papel de filtro. Em seguida, foi feita a diluição para que as concentrações teóricas fossem as mesmas da solução padrão. Cada comprimido apresentava a seguinte composição de princípios ativos: 166,0 mg de TBZ e 100,0 mg de MBZ.

A validação da metodologia analítica foi conduzida segundo a Resolução da ANVISA RE nº 899<sup>15</sup>. Ela consistiu na avaliação das seguintes figuras de mérito: seletividade; linearidade e faixa de aplicação; precisão; exatidão e robustez. Além disso, a conformidade do sistema cromatográfico foi verificada a partir de um estudo no qual foram feitas 5 injeções de mesma amostra padrão e foram avaliados os parâmetros fator de retenção (k) e desvio padrão relativo (DPR) dos picos cromatográficos. A seletividade foi determinada através da análise de 3 placebos da formulação; o teste para doseamento do MBZ incluiu o TBZ como um dos constituintes do placebo e vice-versa. A linearidade foi estudada em 5 níveis de concentração igualmente espaçados, em uma faixa de 60,0 a 140,0 µg mL<sup>-1</sup> para o MBZ e de 99,6 a 232,4 µg mL<sup>-1</sup> para o TBZ; todas as injeções foram repetidas três vezes e as determinações foram feitas em triplicata. A exatidão foi avaliada através da análise de 9 amostras compostas por 100% do placebo, 100% do outro princípio ativo e fortificadas pelo analito em estudo, nos níveis de concentração de 80, 100 e 120%. A precisão do método foi avaliada em dois níveis: repetibilidade e precisão intermediária. Na avaliação da repetibilidade, foram analisadas triplicatas nos três níveis de concentração estudados no teste de exatidão para cada analito. Na avaliação da precisão intermediária, 6 determinações sucessivas de uma solução no nível de 100% para ambos os analitos foram repetidas em dois dias diferentes e usando duas colunas cromatográficas de fabricantes diferentes ("Waters" e "Agilent"). Como fator de robustez, a estabilidade da solução analítica foi monitorada por 2 h.

### RESULTADOS E DISCUSSÃO

Um trabalho anterior relatou a determinação simultânea de MBZ e TBZ utilizando uma fase móvel constituída por tetra-hidrofurano,

acetonitrila e ácido fórmico 0,5%, com detecção em 254 nm<sup>6</sup>. Buscando maior economia e rapidez na análise, substituiu-se o tetra-hidrofurano e a acetonitrila pelo metanol como componente da fase móvel. Ao mesmo tempo, selecionou-se um comprimento de onda, 312 nm, de maior sensibilidade para determinação do TBZ<sup>2</sup>. Mais importante, nestas condições, mantendo-se uma boa resolução, conseguiu-se reduzir o tempo de corrida praticamente à metade em relação ao trabalho anterior<sup>6</sup>: de cerca de 12 min para 6 min e meio. Um cromatograma típico obtido para a determinação de uma amostra é mostrado na Figura 2.

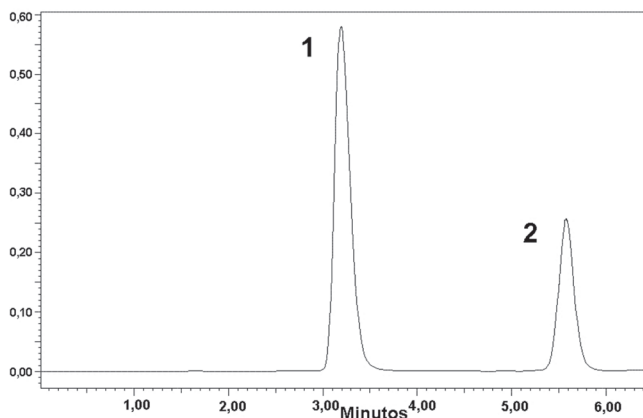


Figura 2. Cromatograma obtido para o doseamento de TBZ (1) e de MBZ (2) em uma amostra

O sistema cromatográfico empregado mostrou-se em conformidade com as especificações adotadas: fator de retenção (k) maior que 1,0 para TBZ e maior que 2,0 para MBZ e DPR menor que 1,00%. O valor de k variou entre 2,4 e 2,8 para MBZ e entre 1,1 e 1,3 para TBZ, enquanto o DPR variou entre 0,05 e 0,11% para o MBZ, e entre 0,07 a 0,40% para TBZ.

O método se mostrou seletivo, já que os cromatogramas do placebo não mostraram nenhum pico, enquanto os picos do MBZ e do TBZ apresentaram o mesmo tempo de retenção dos padrões.

O método apresentou linearidade em uma faixa de 60,0 a 140,0 µg mL<sup>-1</sup> para MBZ e 99,6 a 232,4 µg mL<sup>-1</sup> para TBZ, o que corresponde a uma variação de 60 a 140% no teor dos fármacos na formulação analisada. As curvas de calibração, obtidas pelo método dos mínimos quadrados, apresentaram as seguintes equações:

$$y = 21016,906 + 29615,645x \quad (\text{MBZ})$$

$$y = 16723,862 + 43163,721x \quad (\text{TBZ})$$

Ambas as curvas apresentaram coeficiente de correlação (r) igual a 0,99998, o que está de acordo com o critério mínimo aceitável pela ANVISA<sup>15</sup>, que é  $r = 0,99$ .

A exatidão foi avaliada nos níveis de 80, 100 e 120% e os resultados são mostrados na Tabela 1 para MBZ e TBZ, respectivamente. O grau de recuperação variou entre 99,5 e 100,6% para MBZ e 98,4 e 100,3% para TBZ, o que está dentro das especificações esperadas (98 a 102%)<sup>15</sup>.

A repetibilidade foi avaliada para triplicatas dos mesmos três níveis estudados quanto à exatidão e os resultados são mostrados na Tabela 2 para MBZ e TBZ, respectivamente. Os valores máximos de DPR observados foram 0,37% para MBZ e 0,48% para TBZ. Na avaliação da precisão intermediária, as determinações para soluções 100% de cada um dos fármacos foram repetidas em dois dias diferentes, usando-se uma coluna cromatográfica de um fabricante diferente a cada dia. Os valores de DPR, mostrados na Tabela 3, também estiveram dentro dos critérios aceitáveis (DPR ≤ 5%)<sup>15</sup>.

**Tabela 1.** Avaliação da exatidão para doseamento do MBZ e do TBZ

MBZ		TBZ	
Quantidade adicionada ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Quantidade determinada ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Quantidade adicionada ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Quantidade determinada ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )
80,0	80,0	132,8	133,2
80,0	80,5	132,8	132,9
80,0	80,1	132,8	132,9
100,0	100,1	166,0	166,4
100,0	100,3	166,0	165,3
100,0	100,5	166,0	165,6
120,0	120,0	199,2	196,0
120,0	120,3	199,2	197,7
120,0	119,4	199,2	197,5

**Tabela 2.** Avaliação da repetibilidade para doseamento do MBZ e do TBZ, expressa através do desvio padrão relativo (DPR) para as áreas dos picos

Ensaio – Nível (%)	DPR (%)	
	MBZ	TBZ
80	0,33	0,14
100	0,21	0,36
120	0,37	0,48

**Tabela 3.** Avaliação da precisão intermediária para doseamento do MBZ e do TBZ, expressa através do desvio padrão relativo (DPR) para as áreas dos picos. Cada determinação foi a média de seis corridas

Ensaio	DPR (%)	
	MBZ	TBZ
1º dia	0,09	0,08
2º dia	0,13	0,16

O método também foi considerado robusto por apresentar estabilidade das soluções analíticas por até 2 h após a sua preparação (DPR máximo observado de 0,22%) e resultados precisos para análises feitas em um sistema cromatográfico diferente, usando uma outra coluna analítica (Zorbax Eclipse XDB C18).

É interessante mencionar ainda que os limites de detecção e de quantificação não foram estimados, porque não existe interesse em usar este método para determinar concentrações em níveis próximos a esses limites. A estimativa dessas figuras de mérito é exigida apenas na determinação de impurezas e produtos de degradação em formulações farmacêuticas e matérias-primas<sup>15</sup> ou nas situações de validação de limpeza. A validação de limpeza é feita para os equipamentos de produção e é conduzida através da determinação da substância considerada como “pior caso”, cuja principal característica é possuir a menor dose mínima terapêutica<sup>18,19</sup>.

Finalmente, de acordo com os estudos de linearidade, precisão e exatidão, foi determinada a faixa de aplicação do método analítico dentro dos intervalos compreendidos de 80 a 120 mg mL<sup>-1</sup> para o MBZ e de 133 a 199 mg mL<sup>-1</sup> para o TBZ (80 a 120% dos teores na formulação estudada).

## CONCLUSÃO

O método analítico proposto para determinação simultânea de MBZ e TBZ pode ser considerado um método alternativo, uma vez que não está descrito em farmacopéias ou formulários oficiais. Este método foi validado segundo a Resolução RE nº 899<sup>15</sup> e foi considerado rápido (tempo de corrida de apenas 6 min e meio), seletivo, exato, preciso e robusto para a determinação de formulações farmacêuticas com composições semelhantes às amostras estudadas. Além disso, este trabalho atendeu a uma demanda específica de uma indústria farmacêutica da cidade de Anápolis, representando um interessante exemplo de aproximação entre a universidade pública e o setor produtivo e contribuindo para o desenvolvimento do estado de Goiás.

## REFERÊNCIAS

- Al-Badr, A. A.; Tariq, M. Em *Analytical Profiles of Drug Substances* 16; Florey, K., ed.; Academic Press: San Diego, **1987**, p. 291.
- Kapoor, V. K. Em ref.1, p. 611.
- Rang, H.; Dale, M.; Ritter, J.; *Farmacologia*, 4ª ed., Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2001.
- The United States Pharmacopeia, 25<sup>th</sup> rev., U.S.P. Convention: Rockville, 2002.
- de Prada, A. G. V.; Mena, M. L.; Reviejo, A. J.; Pingarron, J. M.; *Anal. Lett.* **2004**, 37, 65.
- Orsine, E. M. A.; Kedor-Hackmann, E. R. M.; Santoro, M. I. R. M.; *Drug Dev. Ind. Pharm.* **2000**, 26, 879.
- Ribani, M.; Bottoli, C. B. G.; Collins, C. H.; Jardim, I. C. S. F.; Melo, L. F. C.; *Quim. Nova* **2004**, 27, 771.
- Braga, J. W. B.; Poppi, R. J.; *Quim. Nova* **2004**, 27, 1004.
- Fonseca, S. G. C.; da Silva, L. B. L.; Castro, R. F.; de Santana, D. P.; *Quim. Nova* **2004**, 27, 157.
- Moretto, L. D.; Shib, M.; *Rev. Pharm. Technol.* **2000**, 4, 44.
- Diogo, A. N. M.; dos Santos, T. C.; Resende, D. K.; Rozenfeld, S.; Cabral, L. M.; *Estudos* **2005**, 32, 2047.
- Guimarães, R. C.; Leal, A. A. X.; *Braz. Arch. Biol. Technol.* **2006**, 49, 59.
- United States Food and Drug Administration; *Good Manufacturing Practices*, 1978, apud ref. 10.
- International Conference on Harmonization Tripartite Guideline; *Validation of Analytical Procedures: Methodology*, Fed. Regist. **1997**, 62, 27463.
- Agência Nacional de Vigilância Sanitária; Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos, Resolução – RE nº 899, de 29 de maio de 2003.
- <http://www.teuto.com.br/anu%20generico/INDEX.HTM>, acessada em Março 2006.
- Napolitano, H. B.; Oliva, G.; *Estudos* **2005**, 32, 1873.
- Hwang, R. C.; Kowalski, D. L.; Truelove, J. E.; *Pharm. Techn.* **1997**, 21, 62.
- Rodrigues, C. F.; não publicado.