



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
INSTITUTO DE QUÍMICA  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA**



## **DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS PARA  
QUANTIFICAÇÃO DE IVERMECTINA EM MEDICAMENTOS  
VETERINÁRIOS**

**JOEL FERNANDO MAGRI ARANTES  
ORIENTADORA: Profa. Dra. SUSANNE RATH**

**CAMPINAS  
2011**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE  
QUÍMICA DA UNICAMP

Ar14d	<p>Arantes, Joel Fernando Magri. Desenvolvimento e validação de métodos para a quantificação de ivermectina em medicamentos veterinários / Joel Fernando Magri Arantes. -- Campinas, SP: [s.n], 2011.</p> <p>Orientadora: Profa. Dra. Susanne Rath.</p> <p>Mestrado - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.</p> <p>1. Ivermectina. 2. Medicamentos veterinários. 3. Cromatografia. I. Rath, Susanne. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título.</p>
-------	---

**Título em inglês:** Development and validation of methods to quantification of ivermectin in veterinary drugs

**Palavras-chaves em inglês:** Ivermectin, Veterinary drugs, Chromatography

**Área de concentração:** Química Analítica

**Titulação:** Mestre em Química na área de Química Analítica

**Banca examinadora:** Profa. Dra. Susanne Rath (orientadora), Profa. Dra. Isabel Cristina Sales Fontes Jardim (IQ-UNICAMP), Profa. Dra. Marili Villa Nova Rodrigues (CPQBA-UNICAMP)

**Data de defesa:** 24/01/2011



*Aos meus pais, Joel Arantes e Ida Angeli Magri Arantes e aos meus irmãos João Henrique Magri Arantes e Augusto Renato Magri Arantes. Dedico esse trabalho por todo amor que nos envolve e como reconhecimento ao esforço conjunto, incentivo e apoio a mim direcionado durante esses dois anos.*



## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pela oportunidade dessa conquista em minha vida.

À minha orientadora de mestrado, Profa. Dra. Susanne Rath, pela orientação, pela participação em minha formação acadêmica e pela amizade ao longo do período do meu mestrado.

À minha orientadora de IC, Profa. Dra. Marilza Castilho, pela iniciação nas atividades de pesquisa e pelo incentivo na realização do mestrado acadêmico.

Ao Prof. Dr. Jarbas José Rodrigues Rohwedder e seu aluno Mario Henrique Montazzoli Killner, por terem me recebido bem em seu laboratório e transmitido os ensinamentos para a realização dos estudos espectroscópicos e tratamento quimiométrico.

Aos companheiros de laboratório: Lívia, Kelly, Leandro, Martins, Laís, Keity, Ricardo, Cyntia, Rafael Porto, Amanda, Sandra, Izabela, Caio, César, Gabriela, Rafael Medeiros e Orlando, pela convivência e momentos de descontração. E, em especial, ao Leonardo Augusto de Barros, pela amizade sincera, pela paciência, por toda ajuda e pelas palavras de incentivo.

À UNICAMP, especialmente ao Instituto de Química e à CPG, por todo o suporte de infra-estrutura disponibilizado, pelo apoio acadêmico e pelo apoio técnico.

Aos meus pais, Joel Arantes e Ida Angeli Magri Arantes e meus irmãos, João Henrique e Augusto Renato, que são a base de minha vida e me deram todo suporte necessário para a conclusão do meu mestrado.

Aos queridos amigos: Deize, Miguel, Regiane, Elzio, Danilo, Kelli, Izabel e Gabriela, um agradecimento mais que especial pela amizade e apoio, especialmente durante esses dois anos.

E ao Paulo Fernando Chmik, um agradecimento especial pela dedicação e companheirismo nessa fase final.

Enfim, a todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho. Muito obrigado!



## **CURRICULUM VITAE**

Currículo Lattes: <http://lattes.cnpq.br/2830597325233628>

### **1. FORMAÇÃO ACADÊMICA**

---

- 2009-** **Mestrado em Química.** IQ/UNICAMP, Campinas, Brasil.
- 2011** Área de concentração: Química Analítica  
Título: Desenvolvimento e validação de métodos para quantificação de ivermectina em medicamentos veterinários.  
Orientadora: Profa. Dra. Susanne Rath
- 2004-** **Graduação em Licenciatura Plena em Química.** UFMT, Cuiabá,  
**2008** Brasil.

#### 1.1 Formação Complementar

- 2009** **Validação de métodos cromatográficos para análise de fármacos.** Universidade Estadual de Campinas, Campinas/SP, Brasil. (Carga horária: 32h).
- 2007** **Química Analítica Forense.** Encontro Nacional de Química Analítica, João Pessoa/PB, Brasil. (Carga horária: 7h).
- 2006** **Química Forense.** Sociedade Brasileira de Química. Águas de Lindóia/SP, Brasil. (Carga horária: 6h).
- 2006** **Programas de formação continuada de professores.** Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá/MT, Brasil. (Carga horária: 6h).
- 2005** **Dissipação de agrotóxicos no meio ambiente.** Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá/MT, Brasil. (Carga horária: 4h).
- 2005** **Química e toxicologia de pesticidas.** Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá/MT, Brasil. (Carga horária: 4h).

## 2. PRODUÇÃO CIENTÍFICA

---

### 2.1 Iniciação Científica

**2005-2006** Título: Desenvolvimento de metodologia eletroanalítica para a avaliação da capacidade antioxidante total do suco natural do pseudofruto do *Anacardium occidentale* Lin (caju).

Universidade Federal de Mato Grosso – Instituto de Ciências Exatas e da Terra.

Orientadora: Profa. Dra. Marilza Castilho

Bolsa: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico Tecnológico

**2006-2007** Título: Desenvolvimento de metodologia eletroanalítica para a avaliação da capacidade antioxidante total do EBEtOH da entrecasca do *Anacardium occidentale* Lin. (caju), bem como do suco natural e processado.

Universidade Federal de Mato Grosso – Instituto de Ciências Exatas e da Terra.

Orientadora: Profa. Dra. Marilza Castilho

Bolsa: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico Tecnológico

### 2.2 Apresentação de trabalhos em eventos científicos

**2010** ARANTES, J. F. M.; MORAIS, L. S. R.; RIBEIRO, C. C.; RATH, S. Determinação de ivermectina em medicamentos veterinários por HPLC-DAD. Simpósio Brasileiro de Cromatografia e Técnicas Afins, 2010, Campos do Jordão/SP, Brasil.

**2010** ARANTES, J. F. M.; MORAIS, L. S. R.; RATH, S. Validação de método por HPLC-DAD para a quantificação de abamectina em fármacos veterinários. Simpósio Brasileiro de Cromatografia e Técnicas Afins, 2010, Campos do Jordão/SP, Brasil.

- 2010** ARANTES, J. F. M.; MORAIS, L. S. R.; RIBEIRO, C. C.; RATH, S. Desenvolvimento e validação de método de quantificação de ivermectina em medicamentos veterinários por cromatografia líquida de alta eficiência. 50º Congresso Brasileiro de Química (CBQ), 2010, Cuiabá/MT, Brasil.
- 2007** ARANTES, J. F. M.; ALBERTI, G. E.; CASTILHO, M.; TEREZO, A. J. Avaliação da Capacidade Antioxidante de Extratos de *Anacardium occidentale* Lin. (caju). 14º Encontro Nacional de Química Analítica, 2007, João Pessoa/PB, Brasil.
- 2007** ARANTES, J. F. M.; CASTILHO, M. Desenvolvimento de metodologia eletroanalítica para estudo da capacidade antioxidante de extratos de *Anacardium occidentale* Lin. (caju). XV Seminário de Iniciação Científica, 2007, Cuiabá/MT, Brasil.
- 2006** ARANTES, J. F. M.; ALBERTI, G. E.; CASTILHO, M.; TEREZO, A. J.; KAWASHITA, N. H. ; LIMA, L. L. Avaliação da capacidade antioxidante de extratos naturais do *Anacardium occidentale* usando voltametria cíclica. 29ª Reunial Anual da Sociedade Brasileira de Química (SBQ), 2006, Águas de Lindóia/SP, Brasil.
- 2006** ARANTES, J. F. M.; CASTILHO, M. Desenvolvimento de metodologia eletroanalítica para avaliação da capacidade antioxidante total do suco natural do pseudofruto do *Anacardium occidentale* Lin. (caju). XIV Seminário de Iniciação Científica, 2006, Cuiabá/MT, Brasil.

### 2.3 Cursos de curta duração Ministrados

- 2007 Sal grosso, sal fino, salgado?** XI SemiPEQ – UFMT, 2007, Cuiabá/MT. (Carga horária: 4 h).

**2007 Vitamina C: Pra quê? X SemiPEQ – UFMT, 2007, Cuiabá/MT. (Carga horária: 4 h).**

**2007 Será que está quente ou será que está frio: entendendo calor e temperatura. IX SemiPEQ – UFMT, 2007, Cuiabá/MT. (Carga horária: 4 h).**

### **3. MONITORIAS**

---

**2010** Programa de Estágio em Docência (PED C). DQA/IQ/UNICAMP.  
QA 216 - Química Analítica II  
Prof. Coordenador: Dr. Ivo Milton Raimundo Júnior

**2010** Programa de Estágio em Docência (PED C). DQA/IQ/UNICAMP.  
QA 282 - Química Analítica Clássica  
Prof. Coordenador: Dr. Célio Pasquini

**2009** Programa de Estágio em Docência (PED C). DQA/IQ/UNICAMP.  
QA 217 - Química Analítica II  
Prof. Coordenadora: Dra. Anne-Hélène Fostier

**2007** A química que é um show! XI SemiPEQ – UFMT, 2007, Cuiabá/MT.  
Carga horária: 4 h.

**2007** Brincando com os indicadores. X SemiPEQ – UFMT, 2007, Cuiabá/MT.  
Carga horária: 4 h.

**2007** Química e Gourmet. IX SemiPEQ – UFMT, 2007, Cuiabá/MT. Carga horária: 4 h.

#### **4. EXPERIÊNCIA PROFISSIONAL**

---

**04/2008 – 11/2008**

**Escola Estadual Professora Adalgisa de Barros.**

Cargo: Docente

Nível: Ensino Médio



## RESUMO

### DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS PARA QUANTIFICAÇÃO DE IVERMECTINA EM MEDICAMENTOS VETERINÁRIOS

A ivermectina (IVM) é um antiparasitário da classe das avermectinas mundialmente utilizado na produção animal. Quando os fármacos apresentam teores fora das especificações, estes podem comprometer a saúde animal e/ou deixar resíduos no produto animal destinado ao consumo humano. Os objetivos deste trabalho foram desenvolver e validar um método analítico usando a cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjo de fotodiodos (HPLC-DAD) e avaliar um método alternativo, espectroscopia no infravermelho próximo (NIR) associada à quimiometria, para a quantificação de IVM em medicamentos veterinários. Os parâmetros cromatográficos foram estabelecidos seguindo as especificações da Farmacopéia Britânica e a validação foi baseada na Resolução nº 899 de 29/05/03 da ANVISA. A separação da IVM de seu homólogo foi realizada em uma coluna cromatográfica C18 Purospher STAR RP-18e (55 mm x 4,0 mm, 3 µm), fase móvel metanol:água (83:17, v/v), vazão de 1,0 mL min<sup>-1</sup>, temperatura de 30 °C e comprimento de onda de detecção de 245 nm. O método foi seletivo com os seguintes parâmetros de validação: linearidade ( $r = 0,9995$ ), intervalo de linearidade: 40 a 60 µg mL<sup>-1</sup>, exatidão: 96 - 104 %, precisão intra-dia: 0,5 a 4,8% e precisão inter-dia: 2,7%. Trinta e uma amostras (formulações injetáveis) foram analisadas e 45,2% estavam fora das especificações (valor declarado). Os estudos empregando a NIR foram executados na faixa espectral de 4000 a 14000 cm<sup>-1</sup>. Os espectros obtidos (média de 100 espectros) foram tratados com a ferramenta quimiométrica PCA (*Principal Component Analysis*) para a análise exploratória dos dados e um modelo de calibração foi construído por PLS (*Partial Least Squares*). O modelo de calibração baseou-se em validação cruzada usando 66 variáveis (4104,2 a 4354,9 cm<sup>-1</sup>), 5 componentes principais e 25 amostras. Embora o método NIR tenha mostrado algumas vantagens sobre o método cromatográfico, o emprego da HPLC ainda é necessário para confirmação de identidade.



## ABSTRACT

### DEVELOPMENT AND VALIDATION OF METHODS TO QUANTIFICATION OF IVERMECTIN IN VETERINARY DRUGS

Ivermectin (IVM) is an antiparasitic compound of the class of avermectins worldwide used in livestock production. When veterinary drugs present levels outside their specifications, they may compromise animal health and/or leave residues in animal products destined for human consumption. The aims of this work were the development and validation of an analytical method using high performance liquid chromatography with photodiode array detection (HPLC-DAD) and evaluation of an alternative method, near infrared spectroscopy (NIR) associated to chemometry, to the quantification of IVM in veterinary drugs. The chromatographic parameters were established according to the specifications of the British Pharmacopoeia and the validation was based on the Resolution n° 899 of 29/05/03 of ANVISA. The separation of IVM from his homologue was achieved using a C18 column Purospher STAR RP-18e (55 mm x 4,0 mm, 3  $\mu$ m), mobile phase of methanol:water (83:17, v/v), flow rate of 1.0 mL min<sup>-1</sup>, temperature of 30 °C and detection wavelength of 245 nm. The method was selective with the following validation parameters: linearity ( $r= 0.9995$ ), linear range: 40 a 60  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>, accuracy: 96 - 104%, intra-day precision: 0.5 to 4.8 % and inter-day precision: 2.7%. Thirty one samples (injectable formulations) were analyzed and 45.2% were outside their specifications (declared value). Near infrared studies were carried out in the spectral range of 4000 to 14000 cm<sup>-1</sup>. The NIR spectra obtained (average of 100 spectra) were treated with a chemometric tool Principal Component Analysis (PCA) for exploratory data analysis and a calibration model by Partial Least Square (PLS) was built. For this purpose, cross validation with 66 variables (4104.2 a 4354.9 cm<sup>-1</sup>), 5 principal components and 25 samples were employed. Even though, the NIR method had shown some advantages regarding to the chromatographic method, HPLC is still required for identity confirmation.



## ÍNDICE GERAL

Descrição	Página
LISTA DE TABELAS	xxiii
LISTA DE FIGURAS	xxv
<b>CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
I.1 CONTROLE DE QUALIDADE EM MEDICAMENTOS VETERINÁRIOS	3
I.2 ANTIPARASITÁRIOS	5
I.3 FARMACOPÉIAS	11
I.4 MÉTODOS DE QUANTIFICAÇÃO	13
I.4.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência	13
I.4.2 Espectroscopia no infravermelho próximo	17
I.5 QUIMIOMETRIA EM QUÍMICA ANALÍTICA	19
I.6 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS	21
I.6.1 Seletividade	23
I.6.2 Linearidade e Intervalo Linear	23
I.6.3 Exatidão	24
I.6.4 Precisão	25
I.6.5 Limite de Detecção	25
I.6.6 Limite de Quantificação	26
I.6.7 Robustez	26
<b>CAPÍTULO II - OBJETIVOS</b>	<b>27</b>
<b>CAPÍTULO III - EXPERIMENTAL</b>	<b>31</b>
III.1 ESTUDOS CROMATOGRÁFICOS (HPLC-DAD E TLC)	33
III.1.1 PADRÕES, REAGENTES E SOLUÇÕES	33
III.1.1.1 SOLUÇÕES ESTOQUE	33

<b>III.1.1.2</b> SOLUÇÕES DE TRABALHO	34
<b>III.1.1.3</b> AMOSTRAS E PREPARO DE AMOSTRA	34
<b>III.1.2</b> EQUIPAMENTOS	36
<b>III.1.3</b> PROCEDIMENTOS	36
<b>III.1.3.1</b> AVALIAÇÃO DAS FASES ESTACIONÁRIAS E DA FORÇA DA FASE MÓVEL	36
<b>III.1.3.2</b> AVALIAÇÃO DO EFEITO DA TEMPERATURA NA SEPARAÇÃO DA IVM B1a DO SEU HOMÓLOGO B1b	38
<b>III.1.3.3</b> AVALIAÇÃO DO PREPARO DE AMOSTRA PARA A ANÁLISE POR HPLC-DAD	39
<b>III.1.3.4</b> ESTABILIDADE DA SOLUÇÃO ESTOQUE DE IVM EM MeOH	40
<b>III.1.3.5</b> CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS E VALIDAÇÃO DO MÉTODO HPLC-DAD	40
<b>III.1.3.5.1</b> Seletividade	41
<b>III.1.3.5.2</b> Linearidade e Intervalo Linear	42
<b>III.1.3.5.3</b> Exatidão	43
<b>III.1.3.5.4</b> Precisão Intra-dia	44
<b>III.1.3.5.5</b> Precisão Inter-dia	45
<b>III.1.3.5.6</b> Robustez	45
<b>III.1.3.6</b> AVALIAÇÃO DO EFEITO MATRIZ	49
<b>III.1.3.7</b> ANÁLISE DE MEDICAMENTOS VETERINARIOS CONTENDO IVM POR HPLC-DAD	49
<b>III.1.3.7.1</b> Análise de amostras usando padronização externa	49
<b>III.1.3.7.2</b> Análise de amostras usando o método de adição padrão	50
<b>III.1.3.8</b> ENSAIOS DE IDENTIFICAÇÃO DE IVM B1a POR TLC	51
<b>III.2</b> ESTUDOS ESPECTROSCÓPICOS (NIR)	51
<b>III.2.1</b> PADRÕES, REAGENTES E SOLUÇÕES	51
<b>III.2.1.1</b> SOLUÇÕES ESTOQUE E DE TRABALHO	52
<b>III.2.1.2</b> AMOSTRAS	53
<b>III.2.2</b> EQUIPAMENTO	53

<b>III.2.3</b>	<b>PROCEDIMENTO</b>	54
<b>III.2.3.1</b>	<b>AQUISIÇÃO DOS DADOS ESPECTRAIS</b>	54
<b>III.2.3.2</b>	<b>TRATAMENTO DOS DADOS E SELEÇÃO DE VARIÁVEIS</b>	55
 <b>CAPÍTULO IV – RESULTADOS E DISCUSSÕES</b>		 57
<b>IV.1</b>	<b>LEVANTAMENTO DOS MEDICAMENTOS VETERINÁRIOS COMERCIALIZADOS NO BRASIL QUE CONTÉM IVERMECTINA COMO PRINCÍPIO ATIVO</b>	59
<b>IV.2</b>	<b>LEVANTAMENTO DAS EMPRESAS FARMACÊUTICAS BRASILEIRAS QUE FABRICAM MEDICAMENTOS VETERINÁRIOS COM IVERMECTINA COMO PRINCÍPIO ATIVO</b>	60
<b>IV.3</b>	<b>ESTUDOS CROMATOGRÁFICOS (HPLC-DAD E TLC)</b>	61
<b>IV.3.1</b>	<b>OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA COM DETECÇÃO POR ARRANJO DE DIODOS</b>	61
<b>IV.3.2</b>	<b>AVALIAÇÃO DO EFEITO DA TEMPERATURA NA SEPARAÇÃO DA IVM B1a DO SEU HOMÓLOGO B1b</b>	67
<b>IV.3.3</b>	<b>AVALIAÇÃO DO PREPARO DE AMOSTRA PARA A ANÁLISE POR HPLC-DAD</b>	72
<b>IV.3.4</b>	<b>ESTABILIDADE DA SOLUÇÃO ESTOQUE DE IVERMECTINA EM MeOH</b>	73
<b>IV.3.5</b>	<b>VALIDAÇÃO DO MÉTODO HPLC-DAD PARA A DETERMINAÇÃO DE IVM EM MEDICAMENTOS VETERINÁRIOS</b>	74
<b>IV.3.5.1</b>	<b>Seletividade</b>	75
<b>IV.3.5.2</b>	<b>Linearidade e Intervalo Linear</b>	81
<b>IV.3.5.3</b>	<b>Exatidão</b>	84
<b>IV.3.5.4</b>	<b>Precisão Intra-dia</b>	87
<b>IV.3.5.5</b>	<b>Precisão Inter-dia</b>	89
<b>IV.3.5.6</b>	<b>Robustez</b>	89
<b>IV.3.6</b>	<b>ANÁLISE DE AMOSTRAS DE MEDICAMENTOS VETERINARIOS CONTENDO IVM COMO PRINCÍPIO ATIVO POR HPLC-DAD</b>	91

<b>IV.3.6.1</b> Análise de amostras usando padronização externa	91
<b>IV.3.6.2</b> Análise de amostras usando o método de adição padrão	96
<b>IV.3.7</b> ENSAIOS DE IDENTIFICAÇÃO DE IVM B1a POR	99
CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA	
<b>III.2</b> ESTUDOS ESPECTROSCÓPICOS (NIR) - (Análise exploratória)	102
<b>IV.2.1</b> DADOS ESPECTRAIS	102
<b>IV.2.2</b> CLASSIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS POR PCA	106
<b>IV.2.3</b> AVALIAÇÃO DO MODELO NIR-PLS1 PARA QUANTIFICAÇÃO	113
DO TEOR DE IVERMECTINA EM MEDICAMENTOS VETERINÁRIOS	
<b>CAPÍTULO V – CONCLUSÕES</b>	119
<b>CAPÍTULO VI – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	123

---

## LISTA DE TABELAS

<b>nº</b>	<b>Descrição</b>	<b>Página</b>
I.1	Métodos baseados em HPLC para determinação de IVM em matrizes diversas.	15
I.2	Trabalhos baseados em NIR associado a quimiometria para análise de Fármacos.	18
I.3	Categoria dos testes conforme a finalidade da proposta (ANVISA, 2003).	22
I.4	Descrição dos ensaios necessários de acordo com sua proposta (ANVISA, 2003).	22
III.1	Otimização da separação da IVM B1a de seu homólogo B1b.	38
III.2	Formas de estocagem utilizadas para o estudo da estabilidade do analito em solução.	40
III.3	Fatores originais e fatores alterados dos parâmetros selecionados para a avaliação da robustez do método.	46
III.4	Legenda atribuída para os parâmetros selecionados.	47
III.5	Combinação entre os fatores positivos e negativos para cada um dos oito ensaios e legenda para os respectivos resultados.	47
III.6	Cálculos para avaliação do efeito dos parâmetros nas respostas de área e concentração.	48
III.7	Quantidade de padrão adicionado em cada ponto da curva por adição de padrão.	50
IV.1	Parâmetros de conformidade do sistema cromatográfico para a IVM B1a nas duas colunas cromatográficas.	67
IV.2	Valores de resolução entre IVM B1a e IVM B1b e seus respectivos tempos de retenção nas temperaturas de coluna de 30, 33, 35, 37, 39, 41, 43 e 45 °C.	71
IV.3	Áreas do pico cromatográfico correspondente a IVM B1a nas soluções da amostra 1 na concentração aproximada de 50 µg mL <sup>-1</sup> de IVM B1a em MeOH, sem uso de ultrassom e com o uso	73

	de 15 minutos de ultrassom na etapa de diluição.	
<b>IV.4</b>	Parâmetros do intervalo de trabalho.	81
<b>IV.5</b>	Resultados do teste de recuperação realizado para 11 amostras de medicamentos veterinários em solução injetável que não apresentaram efeito matriz.	86
<b>IV.6</b>	Os resultados da precisão inter-dia para as 31 amostras de medicamentos veterinários analisadas.	88
<b>IV.7</b>	Efeito dos parâmetros estudados para avaliar a robustez do método.	90
<b>IV.8</b>	Teores médios (n = 6) de IVM nas amostras analisadas por padronização externa.	92
<b>IV.9</b>	Resultados do teste de recuperação realizado para as amostras que apresentaram efeito matriz (Amostras 1 e 25).	96
<b>IV.10</b>	Teores médios (n = 3) de IVM nas amostras analisadas pelo método de adição padrão.	96
<b>IV.11</b>	Fator de retardamento da IVM B1a nas amostras de medicamentos veterinários e no padrão de IVM B1a obtidos a partir dos cromatogramas do teste de identificação por TLC.	100
<b>IV.12</b>	Resultados para a IVM obtidos pela previsão das amostras do conjunto de validação pelo modelo de calibração NIR-PLS1 em comparação aos resultados obtidos pelo método cromatográfico.	115
<b>IV.13</b>	Resultados para as amostras do conjunto de validação de medicamentos veterinários a 4% m/v L.P. através do conjunto de calibração NIR-PLS1, e erro de previsão em relação aos resultados obtidos pelo método cromatográfico.	118

---

## LISTA DE FIGURAS

nº	Descrição	Página
I.1	Estrutura química das avermectinas (adaptado de LI <i>et al.</i> , 2008).	6
I.2	Modo de ação das AVM na sinapse dos nematóides (adaptado de ÔMURA, 2008).	8
I.3	Estrutura química da Abamectina (Avermectina B1a e B1b) (adaptado de LI <i>et al.</i> , 2008).	9
I.4	Estrutura química da Ivermectina (22,23-diidroavermectina B1a e B1b) (adaptado de LI <i>et al.</i> , 2008).	10
III.1	Procedimento do preparo da amostra.	39
IV.1	Porcentagem de produtos veterinários contendo ivermectina como princípio ativo para cada formulação comercializados no Brasil.	59
IV.2	Quantidade de produtos veterinários comercializados contendo ivermectina e laboratórios brasileiros que os comercializam.	60
IV.3	Cromatograma para a separação entre IVM B1a e seu homólogo IVM B1b em solução padrão de IVM B1a em 35 µg mL <sup>-1</sup> . Coluna de separação ACE® C18 (250 mm x 4,6 mm, 5 µm), fase móvel composta por MeOH:H <sub>2</sub> O (88:12, v/v); vazão da fase móvel de 1,0 mL min <sup>-1</sup> , temperatura da coluna de 30 °C, comprimento de onda de detecção em 245 nm e volume de injeção de 50 µL.	65
IV.4	Cromatograma para a separação entre IVM B1a e seu homólogo IVM B1b em solução padrão de IVM B1a em 35 µg mL <sup>-1</sup> . Coluna de separação Purospher® STAR RP-18e (55 mm x 4,0 mm, 3 µm), fase móvel composta por MeOH:H <sub>2</sub> O (83:17, v/v); vazão da fase móvel de 1,0 mL min <sup>-1</sup> , temperatura da coluna de 30 °C, comprimento de onda de detecção em 245 nm e volume de injeção de 5 µL.	66
IV.5a	Cromatogramas obtidos para a separação da IVM B1a de seu homólogo IVM B1b na concentração 50 µg mL <sup>-1</sup> . Coluna de	68

- separação Purospher® STAR RP-18e (55 mm x 4,0 mm, 3 µm), fase móvel composta por MeOH:H<sub>2</sub>O (83:17, v/v); vazão da fase móvel de 1,0 mL min<sup>-1</sup>, comprimento de onda de detecção em 245 nm, volume de injeção de 5 µL e temperatura da coluna de 30, 33 e 35 °C.
- IV.5b** Cromatogramas obtidos para a separação da IVM B1a de seu homólogo IVM B1b na concentração 50 µg mL<sup>-1</sup>. Coluna de separação Purospher® STAR RP-18e (55 mm x 4,0 mm, 3 µm), fase móvel composta por MeOH:H<sub>2</sub>O (83:17, v/v); vazão da fase móvel de 1,0 mL min<sup>-1</sup>, comprimento de onda de detecção em 245 nm, volume de injeção de 5 µL e temperatura da coluna de 35, 37, 39 e 41 °C. 69
- IV.5c** Cromatogramas obtidos para a separação da IVM B1a de seu homólogo IVM B1b na concentração 50 µg mL<sup>-1</sup>. Coluna de separação Purospher® STAR RP-18e (55 mm x 4,0 mm, 3 µm), fase móvel composta por MeOH:H<sub>2</sub>O (83:17, v/v); vazão da fase móvel de 1,0 mL min<sup>-1</sup>, comprimento de onda de detecção em 245 nm, volume de injeção de 5 µL e temperatura da coluna de 43 e 45 °C. 70
- IV.6** Gráfico da resolução entre os picos cromatográficos referentes a IVM B1a e IVM B1b em função da temperaturas de coluna (30, 33, 35, 37, 39, 41, 43 e 45 °C). 71
- IV.7** Variação da concentração de IVM B1a durante estocagem por um período de 3 meses em três formas de estocagem: (A) frasco transparente a temperatura ambiente; (B) frasco âmbar a temperatura ambiente e (C) frasco transparente sob refrigeração (2 – 8 °C). 74
- IV.8** Regiões - (a) início (b) meio e (c) fim - referente ao pico cromatográfico da IVM B1a utilizadas para a avaliação da pureza de pico em um cromatograma característico registrado para a 76

- amostra 2 na concentração de  $\cong 50 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Fase estacionária Purospher® STAR RP-18e (55 mm x 4,0 mm, 3  $\mu\text{m}$ ); fase móvel MeOH:H<sub>2</sub>O 83:17 v/v; vazão: 1,0 mL min<sup>-1</sup>; temperatura a coluna: 30 °C, comprimento de onda de detecção em 245 nm e volume de injeção de 5  $\mu\text{L}$ .
- IV.9** Espectros de absorção UV da IVM B1a nos tempos de retenção da amostra 2 a aproximadamente 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de IVM (a) do início; (b) meio e (c) fim do pico cromatográfico correspondente a IVM B1a. Fase estacionária Purospher® STAR RP-18e (55 mm x 4,0 mm, 3  $\mu\text{m}$ ); fase móvel MeOH:H<sub>2</sub>O 83:17 v/v; vazão: 1,0 mL min<sup>-1</sup>; temperatura a coluna: 30 °C, comprimento de onda de detecção em 245 nm e volume de injeção de 5  $\mu\text{L}$ . 77
- IV.10** Espectro de absorção UV da IVM B1a no t<sub>R</sub> de máxima altura do pico cromatográfico da solução do padrão a 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Fase estacionária Purospher® STAR RP-18e (55 mm x 4,0 mm, 3  $\mu\text{m}$ ); fase móvel MeOH:H<sub>2</sub>O 83:17 v/v; vazão: 1,0 mL min<sup>-1</sup>; temperatura a coluna: 30 °C, comprimento de onda de detecção em 245 nm e volume de injeção de 5  $\mu\text{L}$ . 78
- IV.11** Cromatogramas registrados para o padrão de IVM na concentração de 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$  após 1 hora sob condições de degradação em (a) 60 °C; (b) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% v/v; (c) HCl 0,1 mol L<sup>-1</sup> e (d) NaOH 0,1 mol L<sup>-1</sup>. Fase estacionária Purospher® STAR RP-18e (55 mm x 4,0 mm, 3  $\mu\text{m}$ ); fase móvel MeOH:H<sub>2</sub>O 83:17 v/v; vazão: 1,0 mL min<sup>-1</sup>; temperatura: 30 °C; comprimento de onda de detecção em 245 nm e volume de injeção de 5  $\mu\text{L}$ . 79
- IV.12** Cromatogramas registrados para o padrão de IVM na concentração de 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$  após 24 horas sob condições de degradação em (a) 60 °C; (b) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% v/v; (c) HCl 0,1 mol L<sup>-1</sup> e (d) NaOH 0,1 mol L<sup>-1</sup>. Fase estacionária Purospher® STAR RP-18e (55 mm x 4,0 mm, 3  $\mu\text{m}$ ); fase móvel MeOH:H<sub>2</sub>O 83:17 v/v; 80

vazão: 1,0 mL min<sup>-1</sup>; temperatura: 30 °C; comprimento de onda de detecção em 245 nm e volume de injeção de 5 µL.

<b>IV.13</b>	(a) Curva analítica dinâmica no intervalo de concentração de padrão IVM B1a de 10 a 100 µg mL <sup>-1</sup> (equação da reta e coeficiente de regressão linear (r) inseridos no gráfico); (b) gráfico de resíduos para a curva analítica dinâmica.	82
<b>IV.14</b>	(a) Curva analítica (intervalo) na faixa de concentração de padrão IVM B1a de 40 a 60 µg mL <sup>-1</sup> (equação da reta e coeficiente de regressão linear (r) inseridos no gráfico); (b) gráfico de resíduos.	83
<b>IV.15</b>	Distribuição dos efeitos dos parâmetros em ordem crescente.	90
<b>IV.16</b>	(a) Curva analítica mediante fortificação – no intervalo de concentração de padrão IVM B1a de 40 a 60 µg mL <sup>-1</sup> (Equação da reta e coeficiente de regressão linear (r) inseridos no gráfico); (b) gráfico de resíduos para a curva analítica na matriz.	95
<b>IV.17</b>	Curva de adição padrão (a) Amostra 1 e (b) amostra 25. Equações das retas e coeficientes de regressão linear (r) estão inseridos nos respectivos gráficos.	97
<b>IV.18</b>	Gráfico de porcentagem para a classificação das amostras dentro ou fora das especificações de acordo com os resultados obtidos pelo método cromatográfico.	98
<b>IV.19</b>	Espectro na região do infravermelho próximo da (a) IVM em MeOH 30000 µg mL <sup>-1</sup> e (b) das amostras de solução injetável 1% m/v (1 a 11, 25 a 30 e 35).	103
<b>IV.20</b>	Espectro na região do infravermelho próximo (a) amostras em solução injetável 1% L.A m/v (20 a 24) e (b) solução injetável 4% L.P m/v (12 a 19).	104
<b>IV.21</b>	Espectro na região do infravermelho próximo das amostras (a) solução oral 0,08% m/v (31 a 33) e (b) solução injetável 3,5% L.A m/v (34).	105
<b>IV.22</b>	Gráfico de <i>scores</i> PC1 vs PC2 para os espectros de todas as amostras de medicamentos de ivermectina sem pré-tratamento.	107

<b>IV.23</b>	Gráfico da porcentagem de variância explicada por componente principal.	108
<b>IV.24</b>	Gráfico de <i>loadings</i> para o conjunto de amostras obtidos para a PC1 vs PC2.	109
<b>IV.25</b>	Gráfico de <i>loadings</i> do conjunto de amostras obtidos para a PC1 em função das variáveis.	109
<b>IV.26</b>	Espectro na região do infravermelho próximo da IVM e ABM 10000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em MeOH.	110
<b>IV.27</b>	Gráfico de <i>scores</i> PC1 vs PC2 para os conjunto de dados do grupo II.	111
<b>IV.28</b>	Gráfico de <i>loadings</i> para o conjunto de amostras do grupo II obtidos para a PC1 vs PC2.	112
<b>IV.29</b>	Gráfico de <i>loadings</i> do conjunto de amostras do grupo II obtidos para a PC1 em função das variáveis.	112
<b>IV.30</b>	Modelo de calibração NIR-PLS1 por validação cruzada com 5 componentes principais para as amostras de 1 a 30.	114
<b>IV.31</b>	Gráfico do erro de previsão para as amostras de medicamento do conjunto de validação em relação aos resultados do método cromatográfico.	114
<b>IV.32</b>	Modelo de calibração NIR-PLS1 por validação cruzada com 3 componentes principais para as amostras sintéticas com 0,5, 1, 2 e 3% m/v de IVM e a amostra 12 (4% m/v).	116
<b>IV.33</b>	Gráfico do erro de previsão para as amostras de medicamento veterinário 4 % L.P m/v do conjunto de validação em relação ao método cromatográfico.	117

---



---

---

# I. INTRODUÇÃO

---

---



## **I.1 - CONTROLE DE QUALIDADE EM MEDICAMENTOS VETERINÁRIOS**

O uso de medicamentos veterinários na produção animal é frequente e uma variedade de fármacos é empregada para fins terapêuticos, profiláticos, metafiláticos e/ou como promotores de crescimento. Esses medicamentos podem ser administrados aos animais por diferentes vias, incluindo a adição destes em rações.

Alterações voluntárias ou involuntárias nas concentrações declaradas dos produtos comerciais contendo fármacos veterinários exclusivos ou associados podem, isoladamente, responder por perdas significativas na indústria animal ou oferecer riscos à saúde humana. Portanto, é importante que as empresas realizem o controle de qualidade interno de seus produtos e que o governo exerça a fiscalização para garantir a conformidade dos mesmos.

Quando os medicamentos não são utilizados conforme as boas práticas veterinárias<sup>1</sup>, os mesmos podem não ser eficazes para o propósito em que são empregados na produção animal, levando à disseminação de doenças entre os animais e/ou conduzindo a presença de resíduos nos alimentos acima dos valores máximos permitidos de concentração, colocando em risco à saúde humana e prejudicando a oportunidade de negociação internacional pela perda de qualidade dos produtos finais da cadeia de produção animal (ANVISA, 2003).

Cabe destacar que devido à extensão territorial e as condições climáticas favoráveis, o Brasil é, a nível mundial, um dos maiores produtores de carne bovina. Segundo dados da Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carnes (ABIEC), o Brasil liderou a posição dos maiores exportadores de carne

---

<sup>1</sup> Uso oficialmente recomendado ou autorizado, incluindo os períodos de suspensão do tratamento, aprovados por autoridades nacionais, de medicamentos veterinários administrados em condições práticas.

bovina no mundo, nos dois últimos anos e, até outubro do ano de 2010 vem mantendo essa liderança (ABIEC, 2010).

Nos últimos anos, vários episódios foram documentados em relação ao embargo de produtos de origem animal provenientes do Brasil, em particular carne bovina. Entre os motivos destacam-se a não utilização de sistemas apropriados de identificação e marcação de rebanho, falha no controle de qualidade do rebanho e níveis de resíduos de fármacos veterinários acima do máximo permitido por legislação. No ano de 2010, a ivermectina (IVM) tem sido a responsável pelo embargo de carne do Brasil pelo Japão, Estados Unidos e Comunidade Européia.

A título de exemplo, em Maio de 2010, o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) decidiu suspender temporariamente as negociações entre o Brasil e os EUA, após autoridades norte-americanas detectarem níveis de resíduos de IVM acima do tolerado em carne proveniente do Brasil (*site O GLOBO*, 2010).

No final de Outubro de 2010, o governo japonês ordenou a inspeção de todos os produtos de carne bovina importados do Brasil, por detectar em um produto de origem brasileira uma concentração de IVM acima do nível permitido pelas normas japonesas (*site TOQUIO DIGITAL*, 26/10/2010; *site PECUARIA.com.br*, 2010). Recentemente, em 16 de Setembro de 2010, a Europa impediu a entrada de 20 toneladas de carne brasileira, pois o carregamento apresentava limite de resíduo de IVM acima do limite máximo permitido pela Comunidade Européia (*site AMAR*, 2010; *site R7*, 2010; *site PECUARIA.com.br*, 16/09/2010).

O monitoramento de resíduos de fármacos em alimentos já é objeto de avaliação sistemática realizada pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), através do Programa Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC) e tem sido fundamental para alavancar as exportações de alimentos para diversos países que definem tais práticas como condicionantes da negociação. Vale ressaltar que este programa é reconhecido e aceito como válido por todos os países com os quais o Brasil mantém acordos sanitários que

permitem a exportação de produtos de origem animal. No entanto, os medicamentos veterinários em geral, e em particular contendo IVM não são analisados em nenhum laboratório oficial e a avaliação de conformidade dos produtos produzidos pela indústria nacional ainda não é realizada. Deste modo, considerando que o controle da conformidade dos mesmos é de grande importância para que os produtos alcancem suas devidas finalidades e não comprometam a qualidade do produto final da cadeia de produção animal, o presente trabalho tem como objetivo o desenvolvimento e a validação de métodos de análise de medicamentos veterinários com ivermectina como princípio ativo, para verificação das dosagens declaradas pelas empresas farmacêuticas brasileiras.

## I.2 - ANTIPARASITÁRIOS

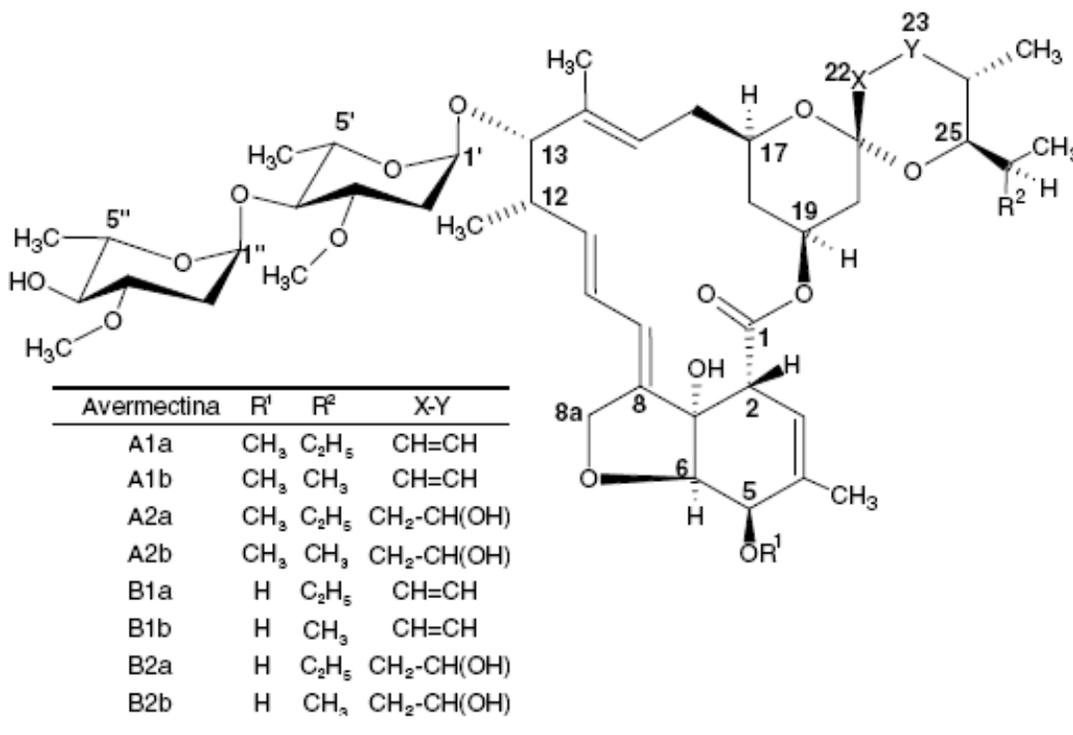
Para o controle de parasitoses são utilizados, de modo geral, fármacos pertencentes a quatro grupos químicos: benzimidazóis, pirimidinas, imidazotiazóis e lactonas macrocíclicas, que se diferenciam pelo mecanismo de ação e pelas formas de eliminação parasitária (MOLENTO, 2005). Entre esses, as lactonas macrocíclicas (ML) são os mais empregados na saúde animal (HERNÁNDEZ-BORGES *et al.*, 2007).

O grupo das ML compreende as avermectinas (AVM) e as milbemicinas (MBM), produtos naturais de fermentação do microorganismo *Streptomyces avermitilis* que apresentam propriedades estruturais e físico-químicas semelhantes (GOKBULUT *et al.*, 2009; SHOOP *et al.*, 1995). A diferença entre AVM e MBM é um substituinte monossacarídeo ou dissacarídeo na posição 13 do anel macrocíclico presente somente nas AVM (DANAHER *et al.*, 2006).

Foram identificadas oito diferentes AVM (**Figura I.1**) como produtos naturais da fermentação do fungo *Streptomyces avermitilis*, são eles; AVM A1a, AVM A1b, AVM B1a, AVM B1a, AVM A2a, AVM A2b, AVM B2a e AVM B2b, onde três (avermectinas A2a, B1a e B2a) são os produtos mais abundantes e a AVM B1a

apresenta a maior atividade antiparasitária dentre todos os homólogos (DANAHER *et al.*, 2006; LI *et al.*, 2008; ÔMURA & CRUMP, 2004).

A classificação das AVM em “A ou B”, “1 ou 2” ou ainda em “a ou b”, ocorre de acordo com algumas características comuns. As estruturas da série “A” possuem um grupo metoxila no carbono 5 e as da série “B” uma hidroxila na mesma posição (ÔMURA & CRUMP, 2004). Os componentes da série “1” apresentam uma dupla ligação entre os carbonos 22 e 23, já nos da série “2” tem-se uma ligação simples com um grupo hidroxila no carbono 23. A série “a” apresenta um grupo orgânico sec-butil no carbono 25, enquanto que na série “b” o substituinte é o grupo isopropil.



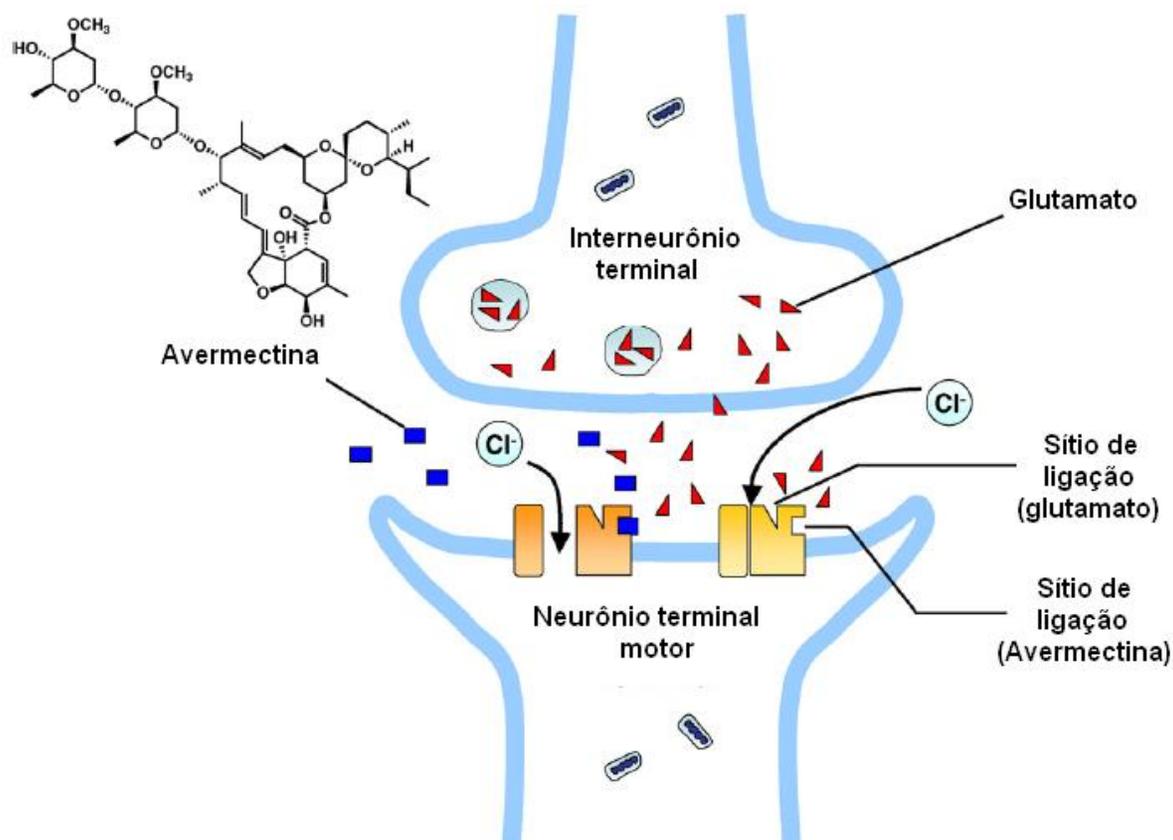
**Figura I.1** - Estrutura química das avermectinas (adaptado de LI *et al.*, 2008).

Esses produtos naturais de fermentação são usados contra um grande espectro de nematóides e artrópodes, muitos dos quais são importantes

endoparasitas e ectoparasitas, classificados como ML endectocidas (DANAHER *et al.*, 2006; KOLAR *et al.*, 2008; MOLINARI *et al.*, 2009; SUN *et al.*, 2005).

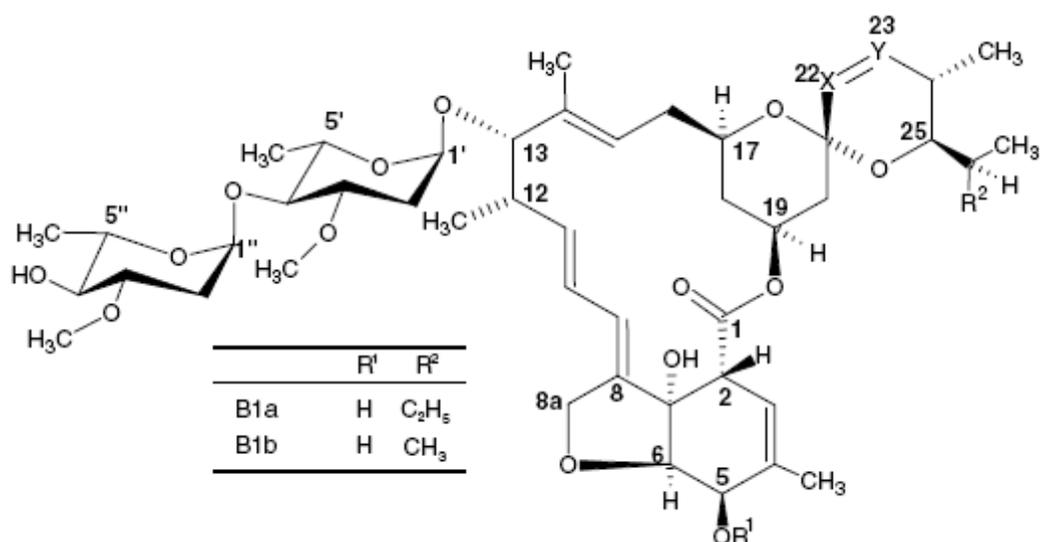
As AVM e sua atividade anti-helmíntica foram descobertas em 1974 por Ōmura, quando o microorganismo *Streptomyces avermitilis* foi isolado de uma amostra de solo no Japão e este demonstrou ter bioatividade potencial. Após estudos *in vivo* em camundongos infectados com *Nematospiroides dubius* foi descoberto um novo produto anti-helmíntico para a saúde animal (CAMPBELL *et al.*, 1983; GEARY, 2005; ŌMURA & CRUMP, 2004; ŌMURA, 2008).

As AVM agem inibindo os impulsos elétricos ao interagir com os canais receptores de neurotransmissores, induzindo à paralisia tônica da musculatura e imobilizando os parasitas (DANAHER *et al.*, 2006; TISLER & ERZEN, 2006; ŌMURA, 2008). Nos vertebrados, o ácido  $\gamma$ -amino butírico (GABA) e glicina bloqueiam a atividade elétrica em células nervosas e dos músculos pelo aumento de condutância dos íons cloreto. Em invertebrados, GABA e glutamato, bloqueiam a atividade elétrica, onde o neurotransmissor inibidor é liberado pela terminação nervosa pré-sináptica e este se liga à proteína pós-sináptica receptora a qual contém canais de íons cloreto. Após estabelecida a ligação AVM-receptor, o canal de íons é aberto e o cloreto flui do neurônio pós-sináptico hiperpolarizando a membrana e causando um efeito moderador dos impulsos nervosos, levando à morte do parasita por paralisia (**Figura I.2**) (DANAHER *et al.*, 2006; MELO *et al.*, 2002; ŌMURA & CRUMP, 2004, ŌMURA, 2008).



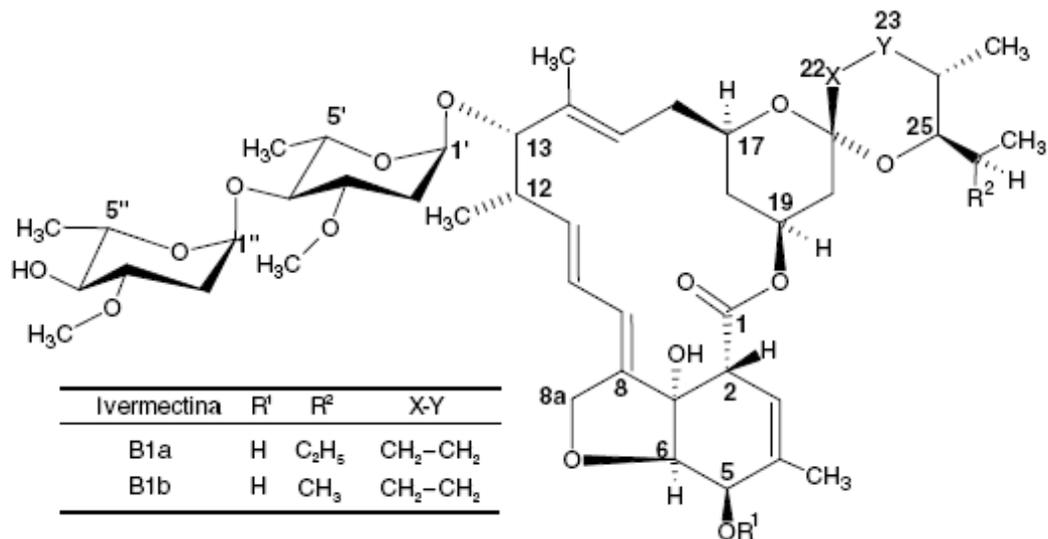
**Figura I.2** – Modo de ação das AVM na sinapse dos nematóides (adaptado de ÔMURA, 2008).

A AVM B1a, conhecida comercialmente por abamectina (ABM) (**Figura I.3**), é a mais importante AVM natural produzida pelo fungo *Streptomyces avermitilis* numa mistura de AVM B1a e AVM B1b, as quais apresentam atividades idênticas. A AVM B1a é produzida em quantidade superior a B1b, correspondente a aproximadamente 80% da mistura (DANAHER *et al.*, 2006; GEARY, 2005).



**Figura I.3** - Estrutura química da Abamectina (Avermectina B1a e B1b) (adaptado de LI *et al.*, 2008).

A partir da saturação da ligação entre os carbonos 22 e 23 da ABM, em 1981, os cientistas da Merck Sharp and Dohme sintetizaram a IVM (**Figura I.4**), que provou ser um derivado mais potente e mais seguro, mantendo a excelente atividade antiparasitária aliada a baixa toxicidade (LI *et al.*, 2008; MOLINARI *et al.*, 2009; ÔMURA & CRUMP, 2004; ÔMURA, 2008; SHOOP *et al.*, 1995).



**Figura I.4** - Estrutura química da Ivermectina (22,23-diidroavermectina B1a e B1b) (adaptado de LI *et al.*, 2008).

Ainda, a IVM mostrou uma atividade antiparasitária efetiva em baixas dosagens contra os dois maiores filões de parasitas, os nematóides (lombrigas) e os artrópodes (insetos, ácaros e carrapatos) (CAMPBELL *et al.*, 1983; MOLINARI *et al.*, 2009; ÔMURA, 2008).

No entanto, a IVM não é efetiva contra todos parasitas, entre esses, a tênia, alguns trematódeos, protozoários, bactérias e fungos, uma vez que nesses parasitas os neurotransmissores não se apresentam GABA dependentes (CAMPBELL *et al.*, 1983; GOKBULUT *et al.*, 2009; MOLINARI *et al.*, 2009; ÔMURA, 2008).

A IVM ou 22,23-diidroavermectina B1 é formada por mais de 80% da fração 22,23-diidroavermectina B1a (IVM B1a) e menos de 20% da fração 22,23-diidroavermectina B1b (IVM B1b) (GUPTA, 2007). A IVM B1a diferencia-se da IVM B1b no grupo orgânico substituinte do carbono 25, onde na IVM B1a possui um grupo sec-butila e a B1b um grupo isopropila.

Dentre as AVM utilizadas como drogas e inseticidas, a Abamectina (ABM) e Ivermectina (IVM) são as mais conhecidas devido ao seu amplo e recorrente uso

(CAMPBELL *et al.*, 1983; DANAHER *et al.*, 2006). Sua aplicação em bovinos, suínos, eqüinos, caprinos, camelos e ovinos é considerada segura em relação à dose para as espécies (DANAHER *et al.*, 2006; TISLER & ERZEN, 2006, GEARY, 2005). Ainda, são utilizados seguramente em cães, porém em doses baixas devido à toxicidade que apresentam algumas raças, por exemplo, Collie, Old English Sheepdog, Pastor Shetland, Pastor Alemão, Poodle e Labrador (CANGA *et al.*, 2009; MELO, 2002). Essa potencial toxicidade pode estar relacionada à deficiência de P-glicoproteína em algumas espécies, causando aumento da biodisponibilidade da droga e acumulando grandes quantidades destas no tecido do sistema nervoso central (SNC) (CANGA *et al.*, 2009; DANAHER *et al.*, 2006). Os animais jovens são os mais sensíveis à toxicidade da IVM (GUPTA, 2007).

A IVM entrou no mercado de saúde animal em 1981, como medicamento veterinário para eqüinos, e em apenas dois anos se tornou a opção mais empregada como antiparasitário (CAMPBELL *et al.*, 1983).

A rota de administração da Ivermectina afeta fortemente a farmacocinética e por ser extremamente baixa sua solubilidade em água, a via de administração subcutânea é mais eficiente seguida da rota oral (CANGA *et al.*, 2009).

### **I.3 – FARMACOPÉIAS**

As monografias farmacopeicas e outros métodos oficiais são designados para serem adequados às necessidades das entidades reguladoras, das pessoas envolvidas no controle de qualidade, e dos fabricantes de matérias-primas e de produtos farmacêuticos. Estas normas devem ser de qualidade adequada como base para a utilização segura dos medicamentos pelos pacientes e consumidores.

As Farmacopéias se destinam às atividades como produção e certificação de substâncias químicas de referência e padrões, elaboração de formulários nacionais, apoio e incentivo à formação e aperfeiçoamento de recursos humanos na área de controle de qualidade, apoio à pesquisa científica e tecnológica,

aprovação e publicação das Denominações Comuns Brasileiras (DCB) (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010). As especificações de qualidade dos produtos farmacêuticos e dos insumos utilizados na fabricação de todas as formulações até a embalagem final são de competência legal e exclusiva das Farmacopéias e, essas especificações estabelecem requisitos mínimos da qualidade dos insumos e das especialidades farmacêuticas produzidas em nosso País tanto para relações com comércio exterior quanto como parâmetros para ações da Vigilância Sanitária (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010).

A Farmacopéia Brasileira é uma entidade da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e, a atual encontra-se em sua quinta edição. A primeira edição foi publicada em 1929, e o CD da quinta edição foi lançado nos dias 13 e 14 de Dezembro de 2010. Ela é elaborada em parceria com universidades credenciadas e homologada pela Comissão da Farmacopéia Brasileira (CFB) e é o Código Oficial Farmacêutico do país, onde se estabelecem, dentre outras coisas, os requisitos mínimos de qualidade para fármacos, insumos, drogas vegetais, medicamentos e produtos para a saúde (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010).

A monografia oficial da Ivermectina está ausente no compêndio nacional, e ainda, a Farmacopéia Brasileira não apresenta sessão de monografias para medicamentos de uso animal.

Assim, a monografia oficial da Farmacopéia Britânica de 2009, *Ph Eur monograph* 1336, foi adotada como guia para o desenvolvimento de método para quantificação de Ivermectina em fármacos veterinários considerando a resolução da ANVISA RDC nº 37, de 6 de Julho de 2009 que estabelece que na ausência de monografia oficial de matéria prima, formas farmacêuticas, correlatos e métodos gerais inscritos na Farmacopéia Brasileira, poderá ser adotada monografia oficial, última edição, de outros compêndios, dentre eles: as Farmacopéias Alemã, Americana, Argentina, Britânica, Européia, Francesa, Internacional, Japonesa, Mexicana e Portuguesa (D.O.U - Seção 1, nº 128, Quarta-feira, 8 de Julho de 2009; BRITISH PHARMACOPOEIA, 2009).

Para seguir uma monografia como referência para o desenvolvimento de um método de quantificação, não basta ela estar presente na Farmacopéia, deve também ser específica para a finalidade proposta. Considerando o objetivo do presente trabalho - quantificação de IVM em medicamentos veterinários - foi considerada a monografia para a IVM da Farmacopéia Britânica, por esta estar presente em uma sessão exclusiva para medicamentos de uso veterinário (BRITISH PHARMACOPOEIA, 2009).

## **I.4 - MÉTODOS DE QUANTIFICAÇÃO**

Diversos trabalhos na literatura têm utilizado as recomendações das Farmacopéias como referência para desenvolvimento de métodos de quantificação de princípios ativos em medicamentos veterinários. A Farmacopéia Britânica descreve monografia para IVM em medicamentos utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC – *High Performance Liquid Chromatography*) como um dos métodos de quantificação (BRITISH PHARMACOPOEIA, 2009). A separação é realizada em uma coluna de fase reversa C18 (250 mm x 4,6 mm, 5 µm), fase móvel ternária (H<sub>2</sub>O:MeOH:ACN, 15:34:51 v/v/v), vazão 1,0 mL min<sup>-1</sup>, volume de injeção de 20 µL e a detecção é realizada a 254 nm.

### **I.4.1 – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência**

A HPLC é um método de separação de componentes de uma mistura baseado na migração diferencial devido aos equilíbrios estabelecidos entre os componentes em contato com duas fases, uma móvel e outra estacionária. As separações são processos físico-químicos governadas por diferentes mecanismos, dependendo da técnica empregada, que pode ser líquido-sólido,

líquido-líquido, líquida com fase ligada, quiral, troca iônica, bioafinidade ou exclusão (COLLINS, *et al.*, 2006). Em HPLC a fase estacionária é constituída por colunas recheadas com materiais especialmente preparados e a fase móvel é líquida, eluída a altas pressões (COLLINS, *et al.*, 2006).

Os primeiros métodos publicados para determinação de AVM utilizavam extração em fase sólida (SPE – *Solid Phase Extraction*) e partição líquido-líquido (LLE – *Liquid-Liquid Extraction*) seguidas da determinação por HPLC em fase normal, com detecção por UV (UV - *Ultraviolet*) (PIVNICHNY *et al.*, 1983; SCHNITZERLING & NOLAN, 1985). Posteriormente, métodos mais rápidos foram desenvolvidos empregando SPE, seguidos de determinação por cromatografia líquida em fase reversa (OHELER & MILLER, 1989).

Na literatura estão reportados alguns trabalhos que descrevem métodos de quantificação baseados em HPLC com detectores por arranjo de diodos, fluorescência e espectrometria de massas seqüencial e cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a espectrometria de massas em *tandem* (UHPLC-MS/MS) para a determinação do teor de IVM em nível de resíduos em carnes, plasma, leite, fezes, ovo, água e tecidos bovino (SOUZA, *et al.*, 2003; HOU, *et al.*, 2007; HSIEH, *et al.*, 2003; GARCIA-MAYOR, *et al.*, 2006; ASBAKK, *et al.*, 1999; PAYNE, *et al.*, 1995; FRENICH, *et al.*, 2010; INOUE, *et al.*, 2009; KROGH, *et al.*, 2008).

A maioria dos trabalhos reportados na literatura recomenda para a determinação de IVM a cromatografia em fase reversa.

Na **Tabela I.1**, estão descritos alguns métodos baseados em cromatografia líquida, com suas respectivas formas de detecção, coluna analítica e fase móvel empregada para a determinação de IVM em diferentes matrizes.

**Tabela I.1** – Métodos baseados em HPLC para determinação de IVM em matrizes diversas.

<b>Matriz Analisada</b>	<b>Preparo de Amostra</b>	<b>Coluna Analítica</b>	<b>Eluição Fase Móvel</b>	<b>Deteção</b>	<b>Referência</b>
Leite de Ovelha	LLE	Hypersil ODS (4,6 x 250 mm, 5 µm)	Gradiente (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> :ACN)	DAD	GARCIA-MAYOR, <i>et al.</i> 1999
Tecido Suíno	SPE	Brownlee C18 (4,6 x 220 mm, 5 µm)	Isocrático (ACN:MeOH:H <sub>2</sub> O, 45:45:10 v/v/v)	UV	Li <i>et al.</i> , 1997
Sangue e soro	SPE	Ultrasphere XL ODS (4,6 x 70 mm, 3 µm)	Isocrático (ACN:MeOH:H <sub>2</sub> O, 49:33:18 v/v/v)	UV	DICKINSON, 1990.
Tecidos Bovinos	SPE	Inertsil ODS (4,6 x 250 mm, 5 µm)	Isocrático (ACN:H <sub>2</sub> O:THF, 88:4:8 v/v/v)	FD	HOU <i>et al.</i> , 2007
Plasma Humano	SPE	Keystone BDS Hypersil C18 (4,6 x 250 mm, 5 µm)	Isocrático (ACN:H <sub>2</sub> O, 95:5 v/v)	FD	HSIEH <i>et al.</i> , 2003
Plasma Humano	SPE	Ultrasphere C18 (4,6 x 250 mm, 5 µm)	Isocrático (THF:ACN:H <sub>2</sub> O, 40:38:22 v/v/v)	FD	KITZMAN <i>et al.</i> , 2006

**Continuação da Tabela I.1 – Métodos baseados em HPLC para determinação de IVM em matrizes diversas.**

Leite Bovino	SPE	Spherisorb C18 ODS-2 (4,6 x 250 mm, 5 µm)	Isocrático (ACN:THF:H <sub>2</sub> O, 90:6:4 v/v/v)	FD	KOLBERG <i>et al.</i> , 2009
Fezes de Coelho	SPE	Inertsil ODS-3 (4,6 x 250 mm, 5 µm)	Isocrático (ACN:H <sub>2</sub> O:MeOH, 47,5:5:47,5 v/v/v)	FD	JIANG <i>et al.</i> , 2008
Fezes de Renas	SPE	Hypersil BDS (4,0 x 125 mm, 5 µm)	Isocrático (MeOH:H <sub>2</sub> O, 95:5 v/v)	FD	ASBAKK <i>et al.</i> , 1999
Fezes Bovina	SPE	Octadecil MC <sub>18</sub> (3,0 x 150 mm, 7 µm)	Isocrático (MeOH:H <sub>2</sub> O, 95:5 v/v)	FD	PAYNE <i>et al.</i> , 1995
Água	SPE	Zorbax Eclipse XDB-C8 (150 x 4.6, 5µm)	Gradiente (ACN:NH <sub>3</sub> :CH <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	MS-MS	KROG <i>et al.</i> , 2008
Água	HF-SLM	XTerra <sup>®</sup> MS C8 (4,6 x 250 mm, 5 µm)	Gradiente (ACN-MeOH- NH <sub>4</sub> HCO <sub>2</sub> :ACN)	MS-MS	RAICH-MONTIU <i>et al.</i> , 2008
Tecidos Bovinos	LLE	TSK-GEL ODS	Gradiente (ACN:H <sub>2</sub> O: NH <sub>4</sub> HCO <sub>2</sub> :CH <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	MS-MS	INOUE <i>et al.</i> , 2009

**ACN:** acetonitrila; **NH<sub>4</sub>HCO<sub>2</sub>:** formiato de amônio; **CH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:** ácido fórmico; **THF:** tetraidrofurano; **KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>:** fosfato monobásico de potássio; **MeOH:** metanol; **NH<sub>3</sub>:** amônia; **HF-SLM:** membrana líquida suportada em fibra oca; **LLE:** extração líquido-líquido; **SPE:** extração em fase sólida.; **FD:** detector de fluorescência; **MS/MS:** espectroscopia de massas em *tandem*.

## I.4.2 – Espectroscopia no infravermelho próximo

A espectroscopia no infravermelho próximo (NIR – *Near Infrared Spectroscopy*) é uma técnica espectroscópica vibracional. A região do infravermelho próximo compreende a faixa de 780 a 2500 nm, situada entre a banda vermelha e a luz visível (LUYPAERT *et al.*, 2007). Nesta região as bandas de absorção mais proeminentes são sobretons e bandas de combinação de vibrações fundamentais dos grupos funcionais -CH, -NH, -OH, -SH (BLANCO *et al.*, 1998; HUANG *et al.*, 2008; LUYPAERT *et al.*, 2007; PASQUINI, 2003).

A NIR tem sido adotada e bem aceita dentro das indústrias farmacêuticas para processo de monitoramento e controle de qualidade dos produtos (BLANCO *et al.*, 1998; JIANG *et al.*, 2010; REICH, 2005). Essa técnica tem se mostrado uma das mais eficientes e avançadas ferramentas para o monitoramento e controle de processos e qualidade de produtos na indústria (HUANG *et al.*, 2008). Atualmente, métodos analíticos baseados nela estão sendo utilizados na Europa e incorporados à farmacopéia oficial.

Nas últimas duas décadas a NIR têm possibilitado maiores vantagens para sua aplicação analítica. Entre elas, a principal apontada por diversos pesquisadores, é a possibilidade de obtenção do espectro sem qualquer tipo de pré-tratamento da amostra (BLANCO *et al.*, 1998; PASQUINI, 2003). Essa é a principal vantagem quando comparada com a cromatografia (CANDOLFI *et al.*, 1997). Outra vantagem é a facilidade de identificação e a determinação de parâmetros físico-químicos da amostra (BLANCO *et al.*, 1998). Ainda sua condição não destrutiva, precisa e de rápida análise, a insere em condição de técnica apropriada para aplicações industriais diversas.

Entretanto, é importante observar que na região do NIR existe dificuldade de obtenção de espectros puros devido a não especificidade de bandas de absorção, o que torna praticamente impossível fazer uso quantitativo ou qualitativo da técnica sem o auxílio de métodos de redução e discriminação de dados

(ZIÉMONS *et al.*, 2010). No entanto, o uso combinado da espectroscopia NIR e ferramentas quimiométricas têm permitido a obtenção de diversas informações sobre uma determinada amostra (BLANCO *et al.*, 1998; GELADI, 2003; REICH, 2005; WORKMAN *et al.*, 2003).

Assim, ao espectro total ou medidas tomadas em comprimentos de onda distintos são realizadas regressões lineares múltiplas, fazendo o uso de metodologias quimiométricas (LUYPAERT *et al.*, 2007; NICOLAI *et al.*, 2007). Dentre as ferramentas quimiométricas, destacam-se regressão de Mínimos Quadrados Parciais – PLS; *Partial Least Square* - (WEBSTER *et al.*, 2003) e Análise de Componentes Principais – PCA; *Principal Component Analysis* - (CANDOLFI *et al.*, 1997; COZZOLINO *et al.*, 2006). Na literatura estão disponíveis vários trabalhos que reportam a aplicação da espectroscopia NIR na indústria farmacêutica (LUYPAERT *et al.*, 2007; REICH *et al.*, 2005). Na **Tabela I.2**, estão apresentados alguns trabalhos que reportam o sucesso do uso da espectroscopia NIR associada à quimiometria para análises quantitativa de fármacos.

**Tabela I.2** - Trabalhos baseados em NIR associado a quimiometria para análise de Fármacos.

Fármaco	Calibração	Tipo de Amostra	Referência
Paracetamol	MLR	Xarope	CIURCZAK <i>et al.</i> , 1987
Cloxacilina Benzatina	MLR	Pomada	CORTI <i>et al.</i> , 1990a
Sulfato de Estreptomicina	MLR	Grânulos	CORN <i>et al.</i> , 1992
Cimetidina	MLR	Grânulos	CHASSEUR, 1987
Ácido Ascórbico	MLR	Grânulos	BLANCO <i>et al.</i> , 1993
Cloridrato de Ranitidina	MLR	Comprimidos	CORTI <i>et al.</i> , 1990b
Ácido Acetil Salicílico	PCR	Comprimidos	DRENNEN & LODDER, 1990
Dipirona Sódica	MLR e PLS1	Solução injetável	SANCHES, 2009

**MLR:** Regressão linear múltipla (MLR – *Multiple Linear Regression*); **PLS:** Mínimos quadrados Parciais; **PCR:** Regressão de componentes principais (PCR - *Principal Component Regression*)

Os trabalhos apontados na **Tabela I.2** são dito robustos e atendem as premissas de uma análise segura, com precisão e exatidão adequadas. Assim, apresentam potencialidade para serem empregados em processos de controle de qualidade de fármacos para identificação e averiguação de fraudes em medicamentos comerciais.

Um trabalho com uma AVM, a selamicina (SLM), foi realizado com o objetivo de desenvolver um método baseado na espectroscopia NIR associado à ferramenta quimiométrica PLS para a quantificação de SLM em formulações tópicas. O método se mostrou vantajoso quanto ao tempo de análise e efetivo para seus propósitos e, não apresentou diferença significativa de precisão e exatidão frente ao método baseado em HPLC, indicando que o método pode ser usado alternativamente à cromatografia. Porém devido a falta de dados de impurezas ou estabilidade, o método cromatográfico não pode ser substituído (WEBSTER *et al.*, 2003).

## I. 5. - QUIMIOMETRIA EM QUÍMICA ANALÍTICA

A quimiometria é uma área da química que aplica métodos matemáticos e estatísticos para selecionar experimentos de forma otimizada e para fornecer o máximo de informações com a análise dos dados obtidos (FERREIRA *et al.*, 1999).

A análise por componentes principais (PCA - *Principal Component Analysis*) consiste em uma manipulação da matriz de dados com o objetivo de representar as variações presentes em muitas variáveis, através de um conjunto menor de fatores (FERREIRA *et al.*, 1999). Para tanto, a dimensão dos dados originais é reduzida em um menor conjunto de dimensões chamadas de componentes principais (PC – *Principal Components*) (MATOS *et al.*, 2003). A matriz é decomposta e cada linha da matriz de dados é representada por um ponto em um gráfico. O espalhamento desses pontos é descrito por novos eixos (PC), os quais

geram dois novos conjuntos de dados chamados de *scores* e *loadings* (FERREIRA *et al.*, 1999; MATOS *et al.*, 2003). A combinação linear das novas variáveis são denominados “*scores*” e o quanto cada variável contribui para a combinação linear das variáveis originais é chamado de “*loadings*” (FERREIRA *et al.*, 1999). No contexto atual, cálculos permitem determinar com sucesso a partir de sinais analíticos misturados, agrupamento e/ou propriedades de uma amostra, através da detecção e avaliação das tendências de uma coleção de dados.

O PLS (PLS - *Partial Least Square*) é um método de regressão que utiliza a modelagem de componentes principais e é eficiente para lidar com ruídos, linearidades e colinearidades (FERREIRA *et al.*, 1999). É recomendado quando se tem na matriz de dados variáveis altamente correlacionadas. O PLS tem se tornado uma ferramenta útil e importante em muitos campos da química, como físico-química, química analítica, química medicinal, ambiental e, ainda, como já citado, no controle de diversos processos industriais (FERREIRA *et al.*, 1999; MORGANO *et al.*, 2005).

A calibração multivariada via PLS pode ser aplicada mesmo na presença de interferentes, pois a seleção de múltiplas variáveis possibilita a detecção de dados errôneos e melhora a exatidão de previsão dos parâmetros. Para qualquer modelo de calibração multivariada, o número de componentes que deve ser empregado para sua construção deve ser determinado de modo a permitir o máximo de explicação das variáveis para o modelo de calibração, evitando incluir informações do ruído proveniente do conjunto de dados. A seleção otimizada permite a melhor previsão do modelo e para essa seleção o método de validação cruzada funciona bem. Esse método consiste na avaliação do erro de previsão de um dado modelo de calibração pela comparação das concentrações previamente conhecidas até que se obtenha o modelo com menor erro de previsão. São construídos “*i*” modelos (*i - 1*) nos quais as amostras são removidas uma a uma e cada novo modelo é utilizado para prever os dados removidos (FERREIRA *et al.*, 1999).

## I.6 – VALIDAÇÃO DE MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

Antes de realizar experimentos de validação ou mesmo análises de amostras, deve-se realizar uma etapa inicial de pré-validação, que se desenvolve pela qualificação dos equipamentos, para garantir que o sistema está operando de acordo com as especificações definidas, pela estabilidade das soluções analíticas e avaliação dos parâmetros de conformidade: fator de retenção ( $k$ ), fator de separação ( $\alpha$ ), resolução ( $R_s$ ), número de pratos ( $N$ ) e fator de assimetria ( $A_s$ ) (SHABIR, 2003; PASCHOAL *et al.*, 2008).

É importante avaliar a estabilidade das soluções analíticas para eliminar fatores que afetam a exatidão do método como, a degradação do analito. Monitorar as condições de estocagem é parte do processo do estudo de estabilidade da solução, para averiguar o tempo e a melhor condição na qual as soluções deverão ser estocadas (PASCHOAL *et al.*, 2008; RIBANI *et al.*, 2004). A avaliação dos parâmetros de conformidade do sistema cromatográfico deve ser determinada seguindo requisitos, preestabelecidos, para garantir uma análise de qualidade aceitável (RIBANI *et al.*, 2004).

O estudo de estabilidade deve ser realizado durante uma, duas, quatro semanas, ou quanto tempo mais for necessário, até que se observe alguma degradação e a quantificação dos componentes deve ser determinada por comparação entre soluções recém preparadas com soluções preparadas e testadas anteriormente, no mínimo 24 horas (PASCHOAL *et al.*, 2008).

A validação deve garantir, por meio de estudos experimentais, que a metodologia analítica desenvolvida atenda aos seus propósitos em conformidade com as exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados (ANVISA, 2003). Para que a metodologia possa ser considerada validada alguns parâmetros devem ser avaliados, os quais dependem da finalidade do teste (ANVISA, 2003; US-FDA, 2001). Métodos que visam ser aplicados na análise de fármacos são classificados, segundo a ANVISA, em quatro categorias, como apresentado na **Tabela I.3**. O conjunto de testes exigido

para a validação do método é dependente da proposta do método, como apresentado na **Tabela I.4**.

**Tabela I.3** - Categoria dos testes conforme a finalidade da proposta (ANVISA, 2003).

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

**Tabela I.4** - Descrição dos ensaios necessários de acordo com sua proposta (ANVISA, 2003).

<b>Parâmetro</b>	<b>Categoria I</b>	<b>Categoria II</b>		<b>Categoria III</b>	<b>Categoria IV</b>
		Quantitativo	Ensaio Limite		
<b>Especificidade</b>	x	x	x	*	x
<b>Linearidade</b>	x	x	Não	*	Não
<b>Intervalo</b>	x	x	*	*	Não
<b>Exatidão</b>	x	x	*	*	Não
<b>Repetibilidade</b>	x	x	Não	X	Não
<b>Precisão Intermediária</b>	**	**	Não	**	Não
<b>Limite de Detecção</b>	Não	Não	x	*	Não
<b>Limite de Quantificação</b>	Não	x	Não	*	Não
<b>Robustez</b>	x	x	x	Não	Não

\* pode ser necessário, dependendo da natureza do teste específico; \*\* se houver comprovação de reprodutibilidade não é necessária a comprovação da precisão intermediária.

### **I.6.1 - Seletividade**

É a capacidade do método em diferenciar e quantificar o analito na presença de outros componentes da amostra (ANVISA, 2003; THOMPSON *et al.*, 2002). Para determinar a seletividade de um método os componentes da matriz, produtos de degradação e impurezas devem ser avaliados com a finalidade de verificar a interferência ou não destes com o sinal analítico. Para análise quantitativa e análise de impurezas, a seletividade 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. Para análises qualitativas, deve-se demonstrar a capacidade de seleção do método, confirmada pela obtenção de resultados positivos em amostras contendo o fármaco ou negativos em amostras isentas do mesmo.

### **I.6.2 – Linearidade e Intervalo Linear**

A linearidade é a capacidade do método demonstrar que as respostas obtidas são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado (ANVISA, 2009; PASCHOAL *et al.*, 2008). É recomendado que a linearidade seja determinada pela análise, de no mínimo, cinco concentrações diferentes (ANVISA, 2003; EC, 2002)

O intervalo linear ou curva de trabalho é definido como a faixa de concentração onde o método apresenta exatidão, precisão e linearidade adequadas quando aplicados a amostras. Normalmente é derivado do estudo de linearidade e depende da aplicação pretendida do método (ANVISA, 2003).

### I.6.3 – Exatidão

A exatidão representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados e um valor aceito como referência usando um procedimento experimental para uma mesma amostra por repetidas vezes (THOMPSON *et al.*, 2002).

Várias metodologias para a determinação da exatidão são empregadas.

*Fármacos* - A exatidão pode ser determinada por aplicar a metodologia analítica proposta na análise de uma substância de pureza conhecida (padrão de referência), por comparação dos resultados obtidos com aqueles resultantes de uma segunda metodologia bem caracterizada, cuja exatidão tenha sido estabelecida, por ensaio de recuperação, no qual a recuperação reflete a quantidade de dado analito recuperado no processo em relação à quantidade real presente (por fortificação) na amostra ou por estudos colaborativos (ANVISA, 2003; BRITO *et al.*, 2003).

*Formas Farmacêuticas* - A exatidão pode ser determinada pela análise de uma amostra, onde se adiciona uma quantidade conhecida de fármaco a uma mistura dos componentes do medicamento (placebo contaminado). Em casos nos quais os componentes são indisponíveis, se aceita análise pelo método de adição de padrão. (ANVISA, 2003)

*Impurezas* - A exatidão pode ser determinada pelo método da adição de padrão, no qual são adicionadas quantidades conhecidas de impureza e/ou produtos de degradação ao medicamento ou ao fármaco ou, então, no caso da indisponibilidade de amostras de certas impurezas e/ou produtos de degradação. É aceitável comparar os resultados obtidos com um segundo método bem caracterizado (metodologia farmacopéica ou outro procedimento analítico validado) (ANVISA, 2003).

## **I.6.4 – Precisão**

É a avaliação da dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, em condições definidas (ANVISA 2003; ANVISA, 2009). A precisão pode ser expressa por meio da repetitividade e da reprodutividade (ANVISA, 2009). No entanto, como a reprodutividade nem sempre é possível de ser determinada, uma vez que envolve um ensaio interlaboratorial, é aceito avaliar a precisão intermediária ou inter-ensaios.

Para a validação de métodos em um único laboratório duas etapas são relevantes para esse parâmetro: precisão intra-ensaio; sob condições da repetibilidade e precisão inter-ensaios; nas condições de precisão intermediária.

A *Repetibilidade (precisão intra-ensaio)* avalia a concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo com o mesmo analista e mesma instrumentação (ANVISA, 2003).

A *Precisão intermediária (precisão inter-ensaio)* avalia a concordância entre os resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes, analistas diferentes e/ou equipamentos diferentes, sendo recomendado um mínimo de dois dias diferentes (ANVISA, 2003).

## **I.6.5 – Limite de Detecção**

O limite de detecção é determinado como a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado (não necessariamente quantificado) sob as condições experimentais estabelecidas (ANVISA, 2003).

Para testes quantitativos visando a determinação do princípio ativo em produtos farmacêuticos ou matérias primas esse parâmetro não é exigido pela ANVISA.

### **I.6.6 – Limite de Quantificação**

O limite de quantificação é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas, parâmetro determinado, principalmente para ensaios quantitativos de impurezas, produtos de degradação em fármacos e produtos de degradação em formas farmacêuticas e é expresso como concentração do analito na amostra (ANVISA, 2003; THOMPSON, 2002)

### **I.6.7 – Robustez**

Robustez é a medida da capacidade do método resistir a pequenas variações dos parâmetros, indicando confiança durante seu uso normal (ANVISA, 2003). Um método é considerado robusto quando se revelar praticamente insensível a pequenas variações que possam ocorrer quando o mesmo está sendo executado.

O ICH recomenda que a avaliação da robustez seja realizada no desenvolvimento do método e sugere como variáveis a serem avaliadas para um método de cromatografia líquida de alta eficiência: pH da fase móvel, composição da fase móvel, colunas de diferentes fornecedores ou lotes, temperatura e vazão (ICH, 1996).

---

---

# OBJETIVOS

---

---



Os **objetivos gerais** desse trabalho consistiram em desenvolver e validar um método para a quantificação de ivermectina em medicamentos veterinários, utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência com sistema de detecção por arranjo de diodos (HPLC-DAD) e avaliar o uso da espectroscopia no Infravermelho próximo (NIR) para a análise de medicamentos veterinários contendo ivermectina.

Os **objetivos específicos** compreenderam:

- ✓ Levantamento dos medicamentos veterinários disponíveis no Brasil que contém ivermectina como princípio ativo e as empresas que as comercializam.
- ✓ Estabelecimento de ensaios de identificação para ivermectina, usando a cromatografia em camada delgada (TLC).
- ✓ Estabelecimento e validação de método por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjo de diodos para determinação de ivermectina em medicamentos de uso veterinário em solução injetável.
- ✓ Análise de amostras de medicamentos veterinários contendo ivermectina 1% e 4% (m/v) em formulação injetável por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjo de diodo.
- ✓ Avaliação de método por espectroscopia no infravermelho próximo associada à quimiometria para a classificação e determinação do teor de ivermectina em medicamentos de uso veterinário.



---

## III. EXPERIMENTAL

---



## III.1 – ESTUDOS CROMATOGRÁFICOS (HPLC-DAD E TLC)

### III.1.1 – PADRÕES, REAGENTES E SOLUÇÕES

Os padrões analíticos utilizados foram:

- ✓ 22,23-diidroavermectina B1a (IVERMECTINA) 99%, Sigma-Aldrich.

Os reagentes e solventes utilizados foram:

- ✓ Metanol grau HPLC, Tedia
- ✓ Hidróxido de amônio, P.A., Synth
- ✓ Diclorometano grau HPLC, Tedia

A água utilizada foi purificada em sistema Milli-Q da Milipore (EUA).

#### III.1.1.1 – SOLUÇÕES ESTOQUE

Foram preparadas duas soluções estoque de IVM nas concentrações de  $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$  e  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Para tanto, foram pesados 10 mg, com precisão de  $\pm 0,01$  mg, do padrão analítico e transferido para balões volumétricos de 10 ou 100 mL, respectivamente. O volume dos balões foi completado com metanol grau HPLC.

As soluções estoque foram transferidas para frasco âmbar e armazenadas sob refrigeração ( $2-8 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ) por um período estabelecido de no máximo de 3 meses.

### III.1.1.2 – SOLUÇÕES DE TRABALHO

As soluções de trabalho para a otimização do método e para os estudos de linearidade, faixa de trabalho, sensibilidade e seletividade foram preparadas no intervalo de concentração de 10 a 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  pela diluição da solução estoque de IVM de 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$  em metanol (MeOH) grau HPLC.

As soluções de trabalho para os estudos de exatidão, precisão, robustez e análise das amostras foram preparadas no intervalo de concentração de 40 a 60  $\mu\text{g mL}^{-1}$  pela diluição da solução estoque de IVM de 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$  em MeOH grau HPLC.

A solução de trabalho para o desenvolvimento do teste de identificação por TLC foi preparada na concentração de 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (0,05% m/v) pela diluição da solução estoque de IVM de 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$  em MeOH grau HPLC.

### III.1.1.3 – AMOSTRAS E PREPARO DE AMOSTRA

Foram adquiridas no comércio do Estado de São Paulo as seguintes amostras:

- ✓ 18 medicamentos veterinários contendo IVM em solução injetável 1% m/v (10 empresas farmacêuticas diferentes).
- ✓ 05 medicamentos veterinários contendo IVM em solução injetável 1% m/v L.A.<sup>2</sup> (1 empresa farmacêutica).

---

<sup>2</sup> Longa Ação

- ✓ 08 medicamentos veterinários contendo IVM em solução injetável 4% m/v L.P.<sup>3</sup> (1 empresa farmacêutica).

Anterior a análise por HPLC-DAD as amostras foram diluídas para aproximadamente  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$  em MeOH grau HPLC, tomando como base as informações contidas no rótulo e filtradas em filtro de seringa ( $0,22 \mu\text{m}$ ).

O preparo de amostras para os medicamentos em solução injetável 1% m/v consistiu na transferência de uma alíquota de 1,0 mL da amostra para balão volumétrico de 10 mL, o qual foi avolumado com MeOH grau HPLC. Desta solução, uma alíquota de 0,500 mL foi transferida para balão volumétrico de 10,0 mL, o qual foi avolumado com MeOH grau HPLC.

O preparo de amostras para os medicamentos em solução injetável 4% m/v consistiu na transferência de uma alíquota de 0,250 mL da amostra para balão volumétrico de 10 mL, o qual foi avolumado com MeOH grau HPLC. Desta solução, uma alíquota de 0,500 mL foi transferida para balão volumétrico de 10,0 mL, o qual foi avolumado com MeOH grau HPLC.

O ensaio de identificação por TLC foi realizado para 12 amostras de 10 empresas farmacêuticas diferentes conforme especificado a seguir:

- ✓ 10 medicamentos veterinários contendo IVM em solução injetável 1% m/v (10 empresas farmacêuticas diferentes).
- ✓ 01 medicamento veterinário contendo IVM em solução injetável 1% m/v L.A. (1 empresa farmacêutica).
- ✓ 01 medicamento veterinário contendo IVM em solução injetável 4% m/v L.P. (1 empresa farmacêutica).

O preparo de amostras para os medicamentos em solução injetável 1% m/v consistiu na transferência de uma alíquota de 0,500 mL da amostra para balão volumétrico de 10,0 mL. O volume foi completado com MeOH grau HPLC.

---

<sup>3</sup> Liberação programada

O preparo de amostras para os medicamentos em solução injetável 4% m/v consistiu na transferência de uma alíquota de 0,125 mL da amostra para balão volumétrico de 10,0 mL. O volume foi completado com MeOH grau HPLC.

### **III.1.2 – EQUIPAMENTOS**

- ✓ Cromatógrafo à líquido composto por um sistema de bombeamento binário (pistão duplo) modelo 1525 (WATERS, EUA), forno 1500 (WATERS, EUA), injetor Rheodyne 7725 com alça de amostragem de 5 ou 50 µL, associado a sistema de detecção por arranjo de diodos PDA modelo 2996 (WATERS, EUA).
- ✓ Balança analítica OHAUS<sup>®</sup>, Analytical Plus modelo AP250D, Suíça.
- ✓ Lavadora Ultra-sônica computadorizada USC 700 UNIQUE, Frequência 55 KHz, Potência 45 Watts, Brasil.
- ✓ Compressor Aspirador Fanem, modelo 089-CAL, Diapump<sup>®</sup>, Brasil.
- ✓ Sistema de purificação de água, Milli-Q<sup>®</sup> Academic, Millipore, EUA.

### **III.1.3 – PROCEDIMENTOS**

#### **III.1.3.1 – AVALIAÇÃO DAS FASES ESTACIONÁRIAS E DA FORÇA DA FASE MÓVEL**

Para o estabelecimento do método cromatográfico foram avaliadas duas colunas de fase reversa C18 de fabricantes diferentes:

- ✓ ACE<sup>®</sup> C18 (250 mm x 4,6 mm, 5 µm), ACT, Escócia.
- ✓ Purospher<sup>®</sup> STAR RP-18e (55 mm x 4,0 mm, 3 µm), Merck, Alemanha.

Como fase móvel foi utilizada uma mistura de água e metanol. Ainda, foi avaliada a vazão (0,8 a 1,2 mL min<sup>-1</sup>) e a temperatura (25 °C a 35 °C). Esse último parâmetro foi importante, uma vez que em ensaios prévios realizados foi verificado que a temperatura exerce um efeito significativo sobre a separação dos dois compostos (IVM B1a e seu homólogo B1b).

De modo a não saturar a coluna de separação, foi selecionado um volume de injeção de 5 µL para a coluna Purospher<sup>®</sup> e 50 µL para a coluna ACE<sup>®</sup>.

Para o teste das fases estacionárias foi utilizada uma solução contendo IVM em metanol grau HPLC na concentração de 35 µg mL<sup>-1</sup>. Foi utilizado o cromatógrafo a líquido Waters modelo 1525 com sistema de bombeamento por pistão duplo e detecção por arranjo de diodos. Foi injetada a solução contendo IVM com uma fase móvel inicial de MeOH:H<sub>2</sub>O 90:10 v/v (eluição isocrática) e então, foram otimizadas a temperatura, vazão e força da fase móvel para obter no menor tempo possível a separação entre a IVM B1a e seu homólogo B1b com resolução superior a 3,0 conforme recomendações da Farmacopéia Britânica. A composição da fase móvel, temperatura e vazão testadas para cada fase estacionária estão descritas na **Tabela III.1**.

As vazões utilizadas foram selecionadas de modo que a pressão do sistema não ultrapassasse a pressão definida para cada coluna de separação. A vazão foi avaliada de 0,8 a 1,2 mL min<sup>-1</sup> para a coluna ACE<sup>®</sup> C18 (250 mm x 4,6 mm, 5 µm), e de 1,0 mL min<sup>-1</sup> para a coluna Purospher<sup>®</sup> STAR RP-18e (55 mm x 4,0 mm, 3 µm).

A separação cromatográfica da IVM B1a e seu homólogo B1b foi otimizada de acordo com as especificações da Farmacopéia Britânica (British Pharmacopoeia, 2009).

**Tabela III.1** - Otimização da separação da IVM B1a de seu homólogo B1b.

Coluna	Volume de Injeção ( $\mu\text{L}$ )	FM (MeOH:H <sub>2</sub> O)	Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ )	Vazão ( $\text{mL min}^{-1}$ )
ACE	50	90:10	27	0,8
	50	90:10	27	1,0
	50	90:10	27	1,2
	50	90:10	30	1,0
	50	90:10	35	1,0
	50	89:11	30	1,0
	50	88:12	30	1,0
Purospher	5	90:10	25	1,0
	5	87:13	25	1,0
	5	86:14	25	1,0
	5	85:15	25	1,0
	5	84:16	25	1,0
	5	84:16	30	1,0
	5	83:17	30	1,0

### III.1.3.2 – AVALIAÇÃO DO EFEITO DA TEMPERATURA NA SEPARAÇÃO DA IVM B1a DO SEU HOMÓLOGO B1b

Para avaliar a influência da temperatura na separação cromatográfica dos picos referentes a IVM B1a e B1b, foi utilizada uma solução de IVM em metanol grau HPLC na concentração de  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ . A coluna cromatográfica utilizada foi a Purospher<sup>®</sup> STAR RP-18e e a fase móvel MeOH:H<sub>2</sub>O, 83:17 v/v. O volume de injeção foi de  $5 \mu\text{L}$  e a vazão de  $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ . As temperaturas avaliadas foram: 30, 33, 35, 37, 39, 41, 43 e  $45^{\circ}\text{C}$ .

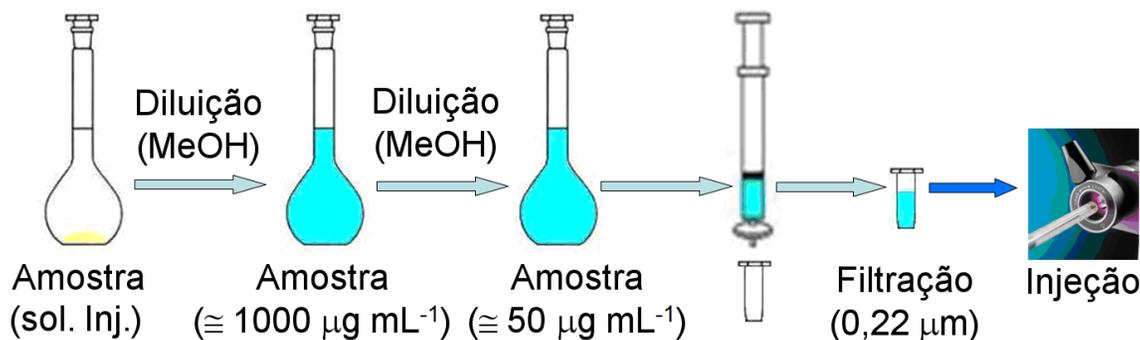
### III.1.3.3 – AVALIAÇÃO DO PREPARO DE AMOSTRA PARA A ANÁLISE POR HPLC-DAD

Para a otimização do preparo de amostra foi selecionada uma amostra de medicamento veterinário em solução injetável 1% m/v e foi verificado se o uso do banho ultrassônico seria vantajoso ou não. Dois procedimentos de preparo de amostras foram avaliados:

- ✓ Diluição do medicamento veterinário (solução injetável 1% m/v) em MeOH grau HPLC sem o uso de banho ultrassônico.
- ✓ Diluição do medicamento veterinário (solução injetável 1% m/v) em MeOH grau HPLC com o uso de 15 minutos de banho ultrassônico.

Todas as soluções de amostras diluídas foram filtradas (filtro de membrana 0,22  $\mu\text{m}$ ) antes de serem injetadas no cromatógrafo.

O procedimento empregado para o preparo de amostra está apresentado na **Figura III.1**.



**Figura III.1.** Procedimento do preparo da amostra.

### III.1.3.4 – ESTABILIDADE DA SOLUÇÃO ESTOQUE DE IVM EM MeOH

O estudo de estabilidade das soluções estoque de IVM foi realizado por comparação entre os sinais obtidos pela análise cromatográfica da solução estoque de IVM em MeOH grau HPLC na concentração de  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  estocada sob 3 formas diferentes (**Tabela III.2**) com uma solução estoque recém preparada de IVM em MeOH grau HPLC na concentração de  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

As análises foram realizadas conforme método descrito no *item III.1.3.5*.

As soluções estoque de IVM foram estocadas por um período máximo de três meses.

**Tabela III.2.** Formas de estocagem utilizadas para o estudo da estabilidade do analito em solução.

	Temperatura	Frasco	Tempo
Condição 1	Ambiente	Transparente	3 meses
Condição 2	Ambiente	Âmbar	3 meses
Condição 3	2 - 8 °C	Transparente	3 meses

### III.1.3.5 – CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS E VALIDAÇÃO DO MÉTODO HPLC-DAD

As condições cromatográficas utilizadas foram:

- ✓ Fase estacionária Purospher® STAR RP-18e (55 mm x 4,0 mm, 3  $\mu\text{m}$ )
- ✓ Fase móvel composta de MeOH:H<sub>2</sub>O 83:17 (v/v)

- ✓ Vazão de 1,0 mL min<sup>-1</sup>
- ✓ Temperatura de 30 °C
- ✓ Comprimento de onda de detecção de 245 nm.

E a validação do método HPLC-DAD consistiu na avaliação das seguintes figuras de mérito: seletividade, linearidade, intervalo linear, exatidão, precisão intra-dia, precisão inter-dias e robustez.

### **III.1.3.5.1 – Seletividade**

A seletividade do método foi avaliada de duas formas:

- ✓ Teste de pureza do pico
- ✓ Teste de degradação do fármaco

O teste de pureza do pico foi realizado mediante análise cromatográfica de: uma solução de trabalho preparada com padrão de IVM B1a em MeOH na concentração de 50 µg mL<sup>-1</sup> e de soluções da amostra preparadas pela diluição do medicamento veterinário contendo IVM em solução injetável 1% m/v para uma concentração aproximada de 50 µg mL<sup>-1</sup>, levando em consideração as informações do rótulo.

Foi comparado o espectro na região do UV do tempo de retenção da máxima altura do pico cromatográfico referente a IVM B1a na solução do padrão com os espectros UV da IVM B1a em três tempos de retenção diferentes (início, meio e fim) do pico cromatográfico referente a IVM B1a nas soluções amostra (medicamento veterinário em solução injetável 1% m/v). Foi verificado se ocorria coeluição de compostos do excipiente e/ou impurezas.

Para avaliar a seletividade frente à presença de possíveis produtos de degradação, foi realizado o teste de degradação do fármaco, no qual uma solução de trabalho com padrão de IVM na concentração de  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$  foi submetida a quatro condições de estresse para forçar a degradação da IVM:

- ✓ Meio ácido -  $\text{HCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$
- ✓ Meio básico -  $\text{NaOH } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$
- ✓ Meio oxidante -  $\text{H}_2\text{O}_2$  3% v/v
- ✓ Temperatura -  $60 \text{ }^\circ\text{C}$

O padrão de IVM foi submetido às quatro condições de estresse por 24 horas e foi verificado se houve a formação de produtos de degradação que pudessem eluir no tempo de retenção do analito de interesse uma e 24 horas após o início do teste pela análise cromatográfica sob as condições descritas no *item III.1.3.5*.

As soluções foram filtradas em filtros de seringa ( $0,22 \mu\text{m}$ ) antes de serem injetadas no cromatógrafo a líquido nas condições estabelecidas.

### **III.1.3.5.2 – Linearidade e Intervalo Linear**

Para definir a faixa linear (intervalo) foi construída previamente uma curva analítica (dinâmica) em uma faixa de concentração mais ampla. Para tanto foram preparadas soluções contendo IVM em MeOH em concentrações correspondentes a 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 e  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ . As soluções foram injetadas no cromatógrafo empregando as condições previamente estabelecidas no *item III.1.3.5*. As áreas obtidas nos cromatogramas correspondentes aos picos

cromatográficos da IVM B1a foram plotadas vs a concentração ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). A partir do método dos mínimos quadrados foi estabelecida a equação da reta.

A partir da curva dinâmica, foi selecionada uma faixa de concentração para a aplicação do método (intervalo). Como ponto médio foi selecionada a concentração de  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$  de IVM. Conforme preconizado pela ANVISA, a curva de trabalho deve se estender de 80 a 120% do valor de concentração do ponto médio. Assim, foram preparadas cinco soluções contendo IVM em MeOH em concentrações correspondentes a 40, 45, 50, 55 e  $60 \mu\text{g mL}^{-1}$  e injetadas no cromatógrafo sob as condições cromatográficas estabelecidas e descritas no *item III.1.3.5*.

Pela regressão linear dos valores de área (uA) vs concentração ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) obtidos através dos cromatogramas registrados para as cinco soluções da curva analítica, foi obtida a sensibilidade e a linearidade do método. A sensibilidade é expressa pelo coeficiente angular da reta e a linearidade pelo coeficiente de regressão linear (r). Ainda, foi avaliado o gráfico de resíduos.

### **III.1.3.5.3 – Exatidão**

A exatidão do método foi avaliada pelo teste de recuperação mediante fortificação das amostras com padrão de IVM B1a em dois níveis de concentração:

- ✓ Baixo 34% de IVM B1a
- ✓ Alto 66% de IVM B1b

Todas as análises foram realizadas em triplicata.

Em uma primeira etapa a amostra foi diluída em MeOH 1:10 v/v. Esta solução foi denominada  $S_{\text{am dil}}$ .

Para a fortificação a nível baixo, um alíquota de 0,330 mL da solução  $S_{am\ dil}$  e uma alíquota de 0,170 mL da solução estoque de ivermectina a  $1000\ \mu\text{g mL}^{-1}$  foram transferidas para balão volumétrico de 10,0 mL. O balão foi avolumado com MeOH grau HPLC.

Para a fortificação a nível alto, um alíquota de 0,170 mL da solução  $S_{am\ dil}$  e uma alíquota de 0,330 mL da solução estoque de ivermectina a  $1000\ \mu\text{g mL}^{-1}$  foram transferidas para balão volumétrico de 10,0 mL. O balão foi avolumado com MeOH grau HPLC.

Todas as soluções foram filtradas em filtro de seringa ( $0,22\ \mu\text{m}$ ) e analisadas pelo método cromatográfico sob as condições descritas no *item III.1.3.5*.

Os valores de recuperação foram calculados considerando o valor de IVM determinado em sextuplicata nas amostras dos medicamentos veterinários por padronização externa a partir da curva analítica no solvente.

Conforme as orientações da Farmacopéia Britânica, o teor de IVM em medicamentos veterinários sob formulação injetável deve estar compreendido no intervalo de 95 a 105 %.

#### **III.1.3.5.4 – Precisão Intra-dia**

A precisão intra-dia foi avaliada para todas as amostras de medicamentos veterinários em solução injetável mediante determinação do teor de IVM por padronização externa através da curva analítica no solvente. Foram realizadas seis determinações em um mesmo dia, pelo mesmo analista e no mesmo equipamento.

As soluções foram filtradas em filtros de seringa ( $0,22\ \mu\text{m}$ ) e injetadas no cromatógrafo a líquido nas condições estabelecidas e descritas no *item III.1.3.5*.

A precisão foi expressa pelo coeficiente de variação (CV).

### **III.1.3.5.5 – Precisão Inter-dia**

A precisão inter-dia foi avaliada mediante determinação do teor de IVM em uma amostra de medicamento veterinário em solução injetável 1% m/v. Foram realizadas doze determinações divididas em dois dias e realizadas por analistas diferentes no mesmo equipamento.

As soluções foram filtradas em filtros de seringa (0,22  $\mu\text{m}$ ) e injetadas no cromatógrafo a líquido nas condições estabelecidas e descritas no *item III.1.3.5*.

A precisão inter-dia foi expressa pelo coeficiente de variação (CV).

### **III.1.3.5.6 – Robustez**

Para determinar a robustez do método foi utilizado o teste de Youden. Para tanto, foram realizados 8 ensaios variando 7 parâmetros.

Os parâmetros avaliados no estudo da robustez do método desenvolvido para a quantificação de IVM em medicamentos veterinários foram:

- ✓ Composição da fase móvel (MeOH:H<sub>2</sub>O)
- ✓ pH da fase móvel
- ✓ Vazão da fase móvel (mL min<sup>-1</sup>)
- ✓ Uso de ultra-som no preparo de amostra
- ✓ Solvente para diluir a amostra

- ✓ Temperatura da coluna (°C)
- ✓ Coluna cromatográfica

Para cada fator estudado foi definida uma pequena variação. Essas variações estão apresentadas na **Tabela III.3**. Os fatores originais foram convencionados como positivos e os fatores alterados como negativos.

Aos parâmetros foram atribuídas legendas conforme apresentados na **Tabela III.4**.

Uma vez definidas as variações dos fatores e as respectivas legendas, foram estabelecidos oito ensaios, cada um contendo uma combinação diferente entre os fatores positivos e negativos. Na **Tabela III.5** pode ser observada a combinação entre os fatores para cada um dos oito ensaios e as legendas para seus respectivos resultados.

**Tabela III.3** – Fatores originais e fatores alterados dos parâmetros selecionados para a avaliação da robustez do método.

Parâmetros	Fatores Originais (+)	Fatores Alterados (-)
Proporção (MeOH:H <sub>2</sub> O)	83:17 v/v	81:19 v/v
pH da fase móvel	6,5	6,7
Vazão da fase móvel	1,0 mL min <sup>-1</sup>	0,9 mL min <sup>-1</sup>
Uso de Ultrassom	0 min	5 min
Solubilização da amostra	MeOH	Fase móvel
Temperatura da coluna	30 °C	33 °C
Coluna cromatográfica	Purospher <sup>®</sup> STAR RP-18e (55 mm x 4,0 mm, 3 µm)	ACE <sup>®</sup> C18 (250 mm x 4,6 mm, 5 µm)

**Tabela III.4** – Legenda atribuída para os parâmetros selecionados.

Parâmetros	Legenda
Proporção (MeOH:H <sub>2</sub> O)	A
pH da fase móvel	B
Vazão da fase móvel	C
Uso de Ultrassom	D
Solubilização da amostra	E
Temperatura da coluna	F
Coluna cromatográfica	G

**Tabela III.5** - Combinação entre os fatores positivos e negativos para cada um dos oito ensaios e legenda para os respectivos resultados.

Parâmetro	Ensaio							
	1	2	3	4	5	6	7	8
A	+	+	+	+	-	-	-	-
B	+	+	-	-	+	+	-	-
C	+	-	+	-	+	-	+	-
D	+	+	-	-	-	-	+	+
E	+	-	+	-	-	+	-	+
F	+	-	-	+	+	-	-	+
G	+	-	-	+	-	+	+	-
Resultado (Concentração)	s	t	u	v	w	x	y	Z

A partir de uma amostra de medicamento em solução injetável 1% m/v, foi preparada uma solução amostra do medicamento em concentração aproximada de 1000 µg mL<sup>-1</sup> em MeOH, considerando as especificações do rótulo. A partir dessa solução foi realizada uma segunda diluição em MeOH ou em MeOH:H<sub>2</sub>O

(83:17, v/v) para uma concentração aproximada de 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . As soluções foram filtradas em filtro de seringa e analisadas conforme os parâmetros cromatográficos estabelecidos e descritos no *item III.1.3.5* de acordo com as combinações descritas na **Tabela III.5**.

Os experimentos foram realizados de forma aleatória.

As áreas dos picos obtidos nos cromatogramas foram transformadas em concentração e corresponderam ao resultado de cada um dos ensaios, de 1 a 8 (s, t, u, v, w, x, y e z).

A avaliação do efeito para cada parâmetro foi realizada mediante o cálculo da média dos resultados de concentração dos fatores positivos pela diferença da média dos resultados de concentração dos fatores negativos, conforme apresentado na **Tabela III.6**.

**Tabela III.6** – Cálculos para avaliação do efeito dos parâmetros nas respostas de área e concentração.

Parâmetro	Efeito (Área)
A	$(s+t+u+v)/4 - (w+x+y+z)/4$
B	$(s+t+w+x)/4 - (u+v+y+z)/4$
C	$(s+u+w+y)/4 - (t+v+x+z)/4$
D	$(s+t+y+z)/4 - (u+v+w+x)/4$
E	$(s+u+x+z)/4 - (t+v+w+y)/4$
F	$(s+v+w+z)/4 - (t+u+x+y)/4$
G	$(s+v+x+y)/4 - (t+u+w+z)/4$

Os valores dos efeitos foram distribuídos em uma linha horizontal, onde o menor valor foi alocado na extremidade esquerda e o maior valor na extremidade direita.

### **III.1.3.6 - AVALIAÇÃO DO EFEITO MATRIZ**

O efeito matriz foi avaliado mediante fortificação do excipiente empregado na formulação solução injetável 4% m/v L.P (fornecido por um fabricante) em 5 níveis de concentração: 40, 45, 50, 55 e 60  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . A equação da reta foi estabelecida pelo método dos mínimos quadrados e a sensibilidade e linearidade determinadas a partir desta.

Para avaliar se o excipiente proporciona efeito matriz, uma amostra de medicamento injetável 4% m/v L.P. foi analisada empregando a curva analítica obtida através da fortificação do excipiente e de outra obtida no solvente.

Os resultados obtidos foram comparados mediante teste estatístico “t pareado”, considerando um nível de confiança de 95%.

### **III.1.3.7 – ANÁLISE DE MEDICAMENTOS VETERINARIOS CONTENDO IVM POR HPLC-DAD**

#### **III.1.3.7.1 – Análise de amostras usando padronização externa**

As amostras que não apresentaram efeito matriz foram analisadas por padronização externa. Todas as análises foram realizadas em sextuplicata.

As amostras de medicamentos veterinários em formulação injetável foram preparadas conforme descrito no *item III.1.1.3*.

As soluções foram filtradas em filtros de seringa e injetadas no cromatógrafo a líquido nas condições estabelecidas e descritas no *item III.1.3.5*.

### III.1.3.7.2 – Análise de amostras usando o método de adição padrão

Para as amostras que apresentaram efeito matriz, ou seja, recuperação inferior a 95% ou superior a 105%, a IVM foi quantificada mediante método de adição de padrão.

Para o método de adição de padrão as amostras foram previamente diluídas para uma concentração de aproximadamente  $45 \mu\text{g mL}^{-1}$  considerando as informações do rótulo e elas foram adicionadas de ivermectina em concentrações equivalente a 0, 1, 3, 5 e  $7 \mu\text{g mL}^{-1}$  de padrão, conforme apresentado na **Tabela III.7**.

**Tabela III.7** - Quantidade de padrão adicionado em cada ponto da curva por adição de padrão.

Solução	Concentração de amostra ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Concentração de padrão ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )
1	45	0,0
2	45	1,0
3	45	3,0
4	45	5,0
5	45	7,0

### **III.1.3.8 – ENSAIOS DE IDENTIFICAÇÃO DE IVM B1a POR TLC**

Foram empregadas placas cromatográficas de Sílica gel 60 F<sub>254</sub> de dimensões de 10 cm de largura por 20 cm de altura. Nas placas foram aplicadas aproximadamente 2 µL da solução padrão de IVM na concentração de 0,05 % m/v (500 µg mL<sup>-1</sup>) e 2 µL de cada amostra de medicamento veterinário previamente diluído para uma concentração aproximada de 0,05 % m/v.

As placas foram introduzidas em uma cuba de vidro saturada com a fase móvel composta de 1 volume de amônia concentrada (NH<sub>3</sub>), 9 volumes de MeOH e 90 volumes de diclorometano (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). Após percolação da fase pela placa, as mesmas foram expostas ao ar até secar. A revelação dos cromatogramas foi realizada mediante uso de uma lâmpada UV (254 nm) para detecção da IVM B1a.

Foram calculados os fatores de retardamento obtidos para as amostras e estes comparados com o fator de retardamento obtido para o padrão de ivermectina.

## **III.2 – ESTUDOS ESPECTROSCÓPICOS (NIR)**

### **III.2.1 – PADRÕES, REAGENTES E SOLUÇÕES**

Os padrões analíticos utilizados foram:

- ✓ 22,23-diidroavermectina B1a (IVERMECTINA) (IVM) 99%, Sigma-Aldrich.

- ✓ Avermectina B1a (ABAMECTINA) (ABM) 92%, Chem Service.

Os reagentes e solventes utilizados foram:

- ✓ Metanol grau HPLC, Tedia

### III.2.1.1 – SOLUÇÕES ESTOQUE E DE TRABALHO

Foram preparadas duas soluções estoque de IVM nas concentrações de  $10000 \mu\text{g mL}^{-1}$  e  $30000 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

A solução de  $10000 \mu\text{g mL}^{-1}$  foi preparada mediante transferência de uma massa de 100 mg do padrão de IVM, pesada com precisão de  $\pm 0,01$  mg, para balão volumétrico de 10 mL. O balão foi avolumado com MeOH grau HPLC.

A solução estoque de IVM de  $30000 \mu\text{g mL}^{-1}$  foi preparada mediante transferência de uma massa de 30 mg do padrão de IVM, pesada com precisão de  $\pm 0,01$  mg, para balão volumétrico de 1 mL. O balão foi avolumado com MeOH grau HPLC.

As soluções de trabalho de IVM foram preparadas a partir da diluição da solução estoque com MeOH nas concentrações de 100, 500, 1000, 2500 e 5000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

Também foi preparada uma solução estoque de ABM de  $10000 \mu\text{g mL}^{-1}$ . A solução foi preparada mediante transferência de uma massa de 10 mg do padrão de ABM, pesada com precisão de  $\pm 0,01$  mg, para balão volumétrico de 1 mL. O balão foi avolumado com MeOH grau HPLC.

### **III.2.1.2 – AMOSTRAS**

Foram adquiridas no comércio do Estado de São Paulo as seguintes amostras:

- ✓ 18 medicamentos veterinários contendo IVM em solução injetável 1% m/v (10 empresas farmacêuticas diferentes).
- ✓ 05 medicamentos veterinários contendo IVM em solução injetável 1% m/v L.A. (1 empresa farmacêutica).
- ✓ 08 medicamentos veterinários contendo IVM em solução injetável 4% L.P. m/v (1 empresa farmacêutica).
- ✓ 03 medicamentos veterinários contendo IVM em solução oral 0,08% m/v (1 empresa farmacêutica).
- ✓ 01 medicamento veterinário contendo IVM em solução injetável 3,5% L.A. m/v (1 empresa farmacêutica)
- ✓ 01 medicamento veterinário contendo ABM em solução injetável 1% m/v (1 empresa farmacêutica).

As amostras de uma mesma empresa foram sempre de lotes diferentes.

### **III.2.2 – EQUIPAMENTO**

- ✓ Espectrofotômetro no infravermelho próximo ABB Bomem, modelo MB160D, Arid-Zone™, Canadá.

### **III.2.3 – PROCEDIMENTO**

#### **III.2.3.1 – AQUISIÇÃO DOS DADOS ESPECTRAIS**

Para a aquisição dos dados espectrais foi utilizada uma célula de quartzo de caminho óptico de 1,0 mm.

Foram obtidos espectros médios de 100 varreduras na região do infravermelho próximo sob temperatura ambiente na faixa de 4000 – 14000  $\text{cm}^{-1}$  para:

- ✓ 35 amostras de medicamentos veterinários contendo IVM
- ✓ 01 amostra de medicamento veterinário contendo ABM 1% m/v
- ✓ MeOH grau HPLC
- ✓ Soluções padrão de IVM nas concentrações de 100, 500, 1000, 2500, 5000, 10000 e 30000  $\mu\text{g mL}^{-1}$
- ✓ Solução padrão de ABM em 10000  $\mu\text{g mL}^{-1}$
- ✓ 05 amostras preparadas a partir da diluição de um medicamento veterinário (solução injetável 4% m/v) em seu excipiente para: 3%, 2%, 1% e 0,5% m/v.

As amostras não sofreram qualquer tratamento prévio anterior a análise.

### III.2.3.2 - TRATAMENTO DOS DADOS E SELEÇÃO DE VARIÁVEIS

O tratamento quimiométrico dos dados espectrais junto à seleção das variáveis mais relevantes para a determinação do teor de IVM nas amostras foi realizado através do *software* The Unscrambler 9.6, utilizando as ferramentas de análise por PCA (*Principal Component Analysis*) e PLS-1 (*Partial Least Square*).



---

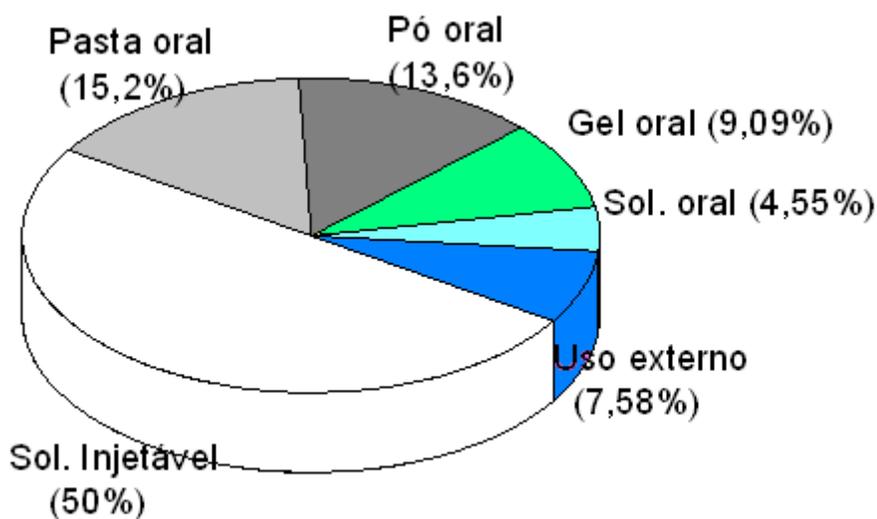
## IV. RESULTADOS E DISCUSSÕES

---



## IV.1 – LEVANTAMENTO DOS MEDICAMENTOS VETERINÁRIOS COMERCIALIZADOS NO BRASIL QUE CONTÉM IVERMECTINA COMO PRINCÍPIO ATIVO

Os dados obtidos junto ao Ministério de Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) e do Compêndio de Produtos Veterinários - SINDAN (CPVS) apontam que os antiparasitários que contém IVM como princípio ativo estão comercialmente disponíveis no Brasil em seis formulações diferentes, a saber: solução injetável, pasta oral, pó oral, gel oral, solução oral e de uso externo (site CPVS, 2010). A partir dos medicamentos registrados no CPVS, obtiveram-se os dados percentuais para cada formulação conforme apresentado na **Figura IV.1**.

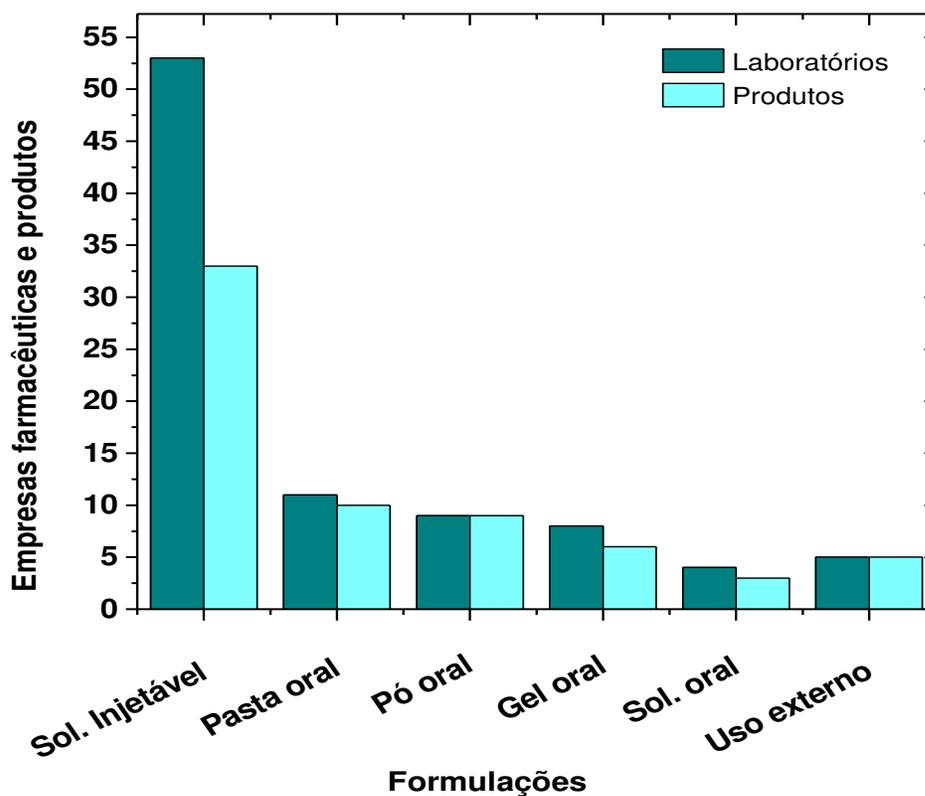


**Figura IV.1** - Porcentagem de produtos veterinários contendo ivermectina como princípio ativo para cada formulação comercializados no Brasil.

Entre essas, a solução injetável representa a formulação mais comercializada, como apresentado na **Figura IV.1**.

## IV.2 – LEVANTAMENTO DAS EMPRESAS FARMACÊUTICAS BRASILEIRAS QUE FABRICAM MEDICAMENTOS VETERINÁRIOS COM IVERMECTINA COMO PRINCÍPIO ATIVO

Ao realizar o levantamento das empresas farmacêuticas brasileiras que fabricam medicamentos veterinários com IVM como princípio ativo foi constatado, a partir dos dados apresentados no CPVS, que mais de 50 empresas diferentes comercializam medicamentos veterinários contendo IVM. Ainda, a formulação injetável é produzida por um maior número de empresas em relação às demais formulações (**Figura IV.2**).



**Figura IV.2** - Quantidade de produtos veterinários comercializados contendo ivermectina e laboratórios brasileiros que os comercializam.

Frente ao grande número de empresas farmacêuticas brasileiras que comercializam os medicamentos veterinários contendo IVM como princípio ativo, o sucesso comercial e o largo emprego destes antiparasitários no Brasil é certamente confirmado.

### **IV.3 – ESTUDOS CROMATOGRÁFICOS (HPLC-DAD E TLC)**

Baseada na monografia descrita na Farmacopéia Britânica (BRITISH PHARMACOPOEIA, 2009), a técnica de quantificação de IVM em medicamentos veterinários é a cromatografia líquida de alta eficiência e o ensaio de identificação deve ser realizado por cromatografia em camada delgada.

Os estudos cromatográficos tiveram como objetivo selecionar as melhores condições cromatográficas, como fase estacionária, composição da fase móvel, temperatura de coluna e vazão da fase móvel visando atender os parâmetros de conformidade do sistema segundo as recomendações da Farmacopéia Britânica e validar o método desenvolvido para a determinação de IVM em medicamentos veterinários.

#### **IV.3.1 – OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA COM DETECÇÃO POR ARRANJO DE DIODOS**

Para a escolha das melhores condições cromatográficas, ou seja, fase estacionária, tipo de eluição, composição da fase móvel, temperatura da coluna e vazão da fase móvel, foram levados em consideração os seguintes parâmetros cromatográficos:

- ✓ Resolução
- ✓ Número de pratos
- ✓ Fator de assimetria
- ✓ Fator de retenção

A resolução ( $R_s$ ) fornece informações a respeito da separação entre dois picos adjacentes. É esperado que entre o pico de interesse e o interferente potencial mais próximo (impureza ou produto de degradação), a resolução seja no mínimo de 1,5. Uma resolução igual ou superior a 1,5 indica separação completa dos compostos (COLLINS *et al.*, 2006). Porém conforme recomendações da Farmacopéia Britânica, esse valor deve se apresentar no mínimo 3,0 para a IVM B1a e seu homólogo IVM B1b (BRITISH PHARMACOPOEIA, 2009).

O valor de resolução foi estimado através da diferença entre os máximos dos picos de interesse e a média da base dos picos, conforme a equação **IV.1** (COLLINS *et al.*, 2006).

$$R_s = 2 \left( \frac{t_{R_2} - t_{R_1}}{w_{b_2} + w_{b_1}} \right) \quad \text{(IV.1)}$$

Onde  $t_{R_1}$  e  $t_{R_2}$  são os tempos de retenção de dois compostos que apresentam picos adjacentes e  $w_b$  a largura da base do pico.

Em HPLC, a composição da fase móvel é determinante no processo de separação, o que pode ser observado através da equação geral da resolução (**IV.2**) onde dois dos três parâmetros - eficiência ( $N$ ), seletividade ( $\alpha$ ) e o fator de retenção ( $k$ ) - apresentam forte influência pela composição da fase móvel.

Características físico-químicas, força e seletividade devem ser consideradas para a seleção de solventes para aplicar como fase móvel (COLLINS *et al.*, 2006).

$$R_s = \left( \frac{\sqrt{N}}{4} \right) \left( \frac{k}{k+1} \right) \left( \frac{\alpha-1}{\alpha} \right) \quad (\text{IV.2})$$

O fator de retenção ( $k$ ) é determinado pela razão entre os tempos de retenção relativo das moléculas e o tempo de retardamento do sistema ( $t_0$ ), conforme a equação **IV.3** (COLLINS *et al.*, 2006).

$$k = \frac{(t_R - t_M)}{t_M} = \frac{t'_R}{t_M} \quad (\text{IV.3})$$

O pico do analito deve estar bem separado de outros picos e do pico correspondente ao tempo de retenção de um composto não retido (tempo de retardamento do sistema –  $t_M$ ).

Quando o fator de retenção é inferior a 1,0 significa que os compostos estão eluindo muito rápido, portanto é adequado que o fator de retenção seja superior a dois, mas não atinja valores muito altos, pois esses acarretam em longo tempo de análise (COLLINS *et al.*, 2006; RIBANI *et al.*, 2004; SHABIR, 2003).

O fator de assimetria ( $A_s$ ) é um indicador da simetria do pico. Quando o pico é exatamente simétrico o valor de  $A_s$  é equivalente a unidade (COLLINS *et al.*, 2006).

Na literatura, são considerados simétricos os picos cujo valor de assimetria esteja contido no intervalo de 0,9 a 1,2 (RIBANI *et al.*, 2004; SHABIR, 2003; SNYDER *et al.*, 1979). Porém, a Farmacopéia Britânica estende esse intervalo até 2,5 para o pico cromatográfico referente a IVM B1a (BRITISH PHARMACOPOEIA, 2009).

O fator de assimetria é calculado a partir da equação **IV.4** (COLLINS *et al.*, 2005), onde “a” refere-se a primeira meia largura de base do pico cromatográfico medido a 10% da altura e “b” a meia largura posterior do pico cromatográfico também medido a 10% da altura.

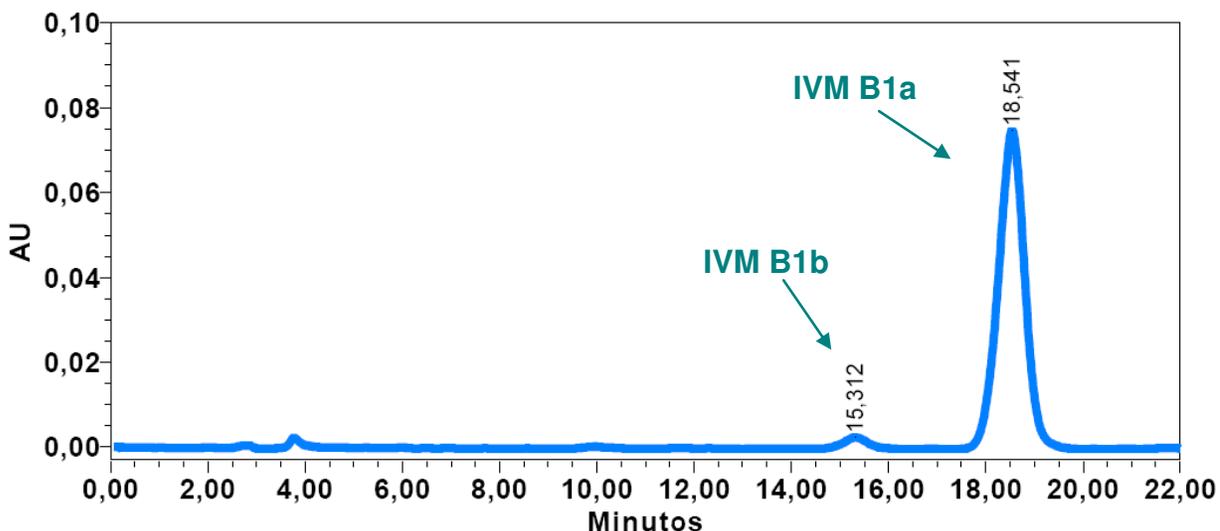
$$A_s = \frac{b}{a} \quad \text{(IV.4)}$$

O número de pratos (N) mede o grau de alargamento do pico. Assim, determina a eficiência da interação da fase estacionária com cada componente de uma mistura que estejam eluindo através da mesma. Essa grandeza é obtida com o auxílio da equação **IV.5**. Em geral o valor de N, deve ser superior a 2000 para cromatografia líquida de alta eficiência. Sendo maior a eficiência, quanto maior for o número de pratos (RIBANI *et al.*, 2004; SHABIR, 2003).

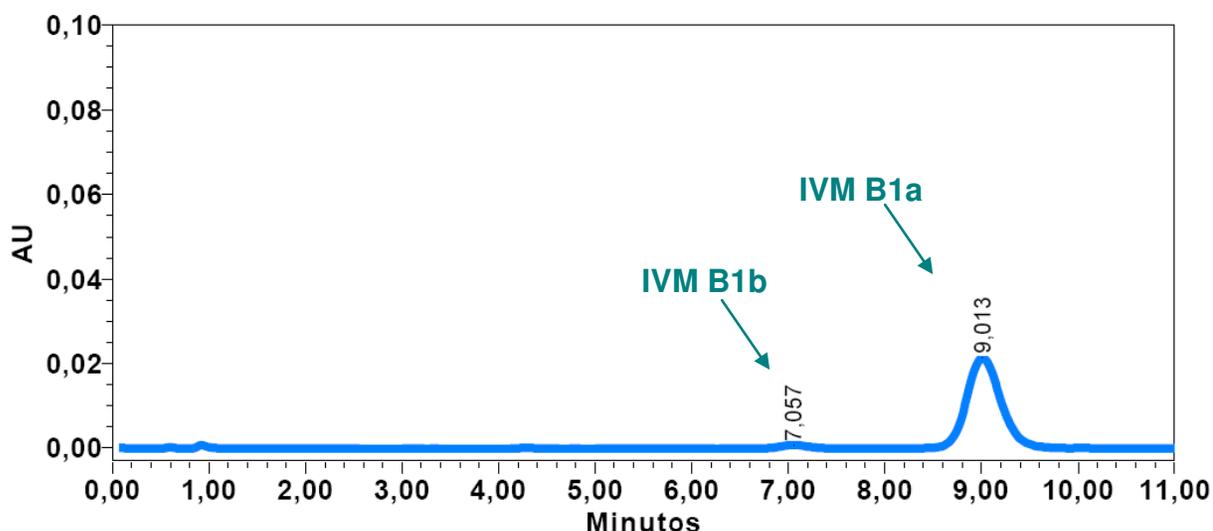
$$N = 16 \frac{t'_R{}^2}{w_b} \quad \text{(IV.5)}$$

No presente trabalho, foram avaliadas duas colunas cromatográficas, ambas com fase estacionária C18, para realizar a separação da IVM B1a de seu homólogo IVM B1b. A princípio foram avaliadas a composição da fase móvel constituída de metanol e água. A vazão empregada foi de 1,0 mL min<sup>-1</sup> e a temperatura do forno da coluna de 30 °C. Tanto a coluna ACE<sup>®</sup> C18 (250 mm x 4,6 mm, 5 µm) como a coluna Purospher<sup>®</sup> STAR RP-18e (55 mm x 4,0 mm, 3 µm) permitiu a separação da IVM B1a da IVM B1b com a resolução de acordo com as recomendações da Farmacopéia Britânica e os demais parâmetros cromatográficos conforme as recomendações estabelecidas na literatura. Para a coluna ACE a composição ótima da fase móvel foi de MeOH:H<sub>2</sub>O 88:12 v/v e para a coluna Purospher a proporção de MeOH:H<sub>2</sub>O foi de 83:17 v/v.

Um cromatograma característico obtido sob as condições ótimas definidas para a coluna cromatográfica ACE<sup>®</sup> C18 (250 mm x 4,6 mm, 5 μm) está apresentado na **Figura IV.3** e um cromatograma característico obtido sob as condições ótimas definidas para a coluna cromatográfica Purospher<sup>®</sup> STAR RP-18e (55 mm x 4,0 mm, 3 μm) está apresentado na **Figura IV.4**.



**Figura IV.3** – Cromatograma obtido para a separação entre IVM B1a e seu homólogo IVM B1b em solução padrão de IVM B1a 35 μg mL<sup>-1</sup>. Coluna de separação ACE<sup>®</sup> C18 (250 mm x 4,6 mm, 5 μm), fase móvel composta por MeOH:H<sub>2</sub>O (88:12, v/v); vazão da fase móvel de 1,0 mL min<sup>-1</sup>, temperatura da coluna de 30 °C, comprimento de onda de detecção em 245 nm e volume de injeção de 50 μL.



**Figura IV.4** – Cromatograma obtido para a separação entre IVM B1a e seu homólogo IVM B1b em solução padrão de IVM B1a  $35 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Coluna de separação Purospher<sup>®</sup> STAR RP-18e (55 mm x 4,0 mm, 3  $\mu\text{m}$ ), fase móvel composta por MeOH:H<sub>2</sub>O (83:17, v/v); vazão da fase móvel de  $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ , temperatura da coluna de  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ , comprimento de onda de detecção em 245 nm e volume de injeção de  $5 \mu\text{L}$ .

O tempo de retardamento do sistema para a coluna Purospher<sup>®</sup> STAR RP-18e (55 mm x 4,0 mm, 3  $\mu\text{m}$ ) corresponde a 0,5 minuto e o tempo de retardamento do sistema para a coluna ACE<sup>®</sup> C18 (250 mm x 4,6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ) corresponde a 2,8 minutos. Portanto, os tempos de retenção relativos para a IVM B1b nas duas colunas cromatográficas são adequados, considerando que o tempo de retenção relativo para o primeiro analito deve se apresentar no mínimo de duas vezes o tempo de retardamento do sistema (EC).

Os parâmetros de conformidade do sistema cromatográfico para as duas colunas cromatográficas estão apresentados na **Tabela IV.1**, onde são apresentados os parâmetros de resolução entre os compostos IVM B1a e IVM B1b, fator de retenção, fator de assimetria, número de pratos e seletividade para a IVM B1a. Ainda, é apresentado o valor de repetitividade do sistema cromatográfico, obtido através do coeficiente de variação percentual das áreas

obtidas através dos cromatogramas registrados para uma mesma solução de trabalho de padrão de IVM 35  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , em sextuplicata.

**Tabela IV.1** - Parâmetros de conformidade do sistema cromatográfico para a IVM B1a nas duas colunas cromatográficas.

Coluna	N	$R_s^I$	As	k	$\alpha^{II}$	CV / % (n =6)
ACE	5359	3,44	0,96	5,62	1,25	0,4
Purospher	3244	3,64	1,1	17,0	1,29	0,6

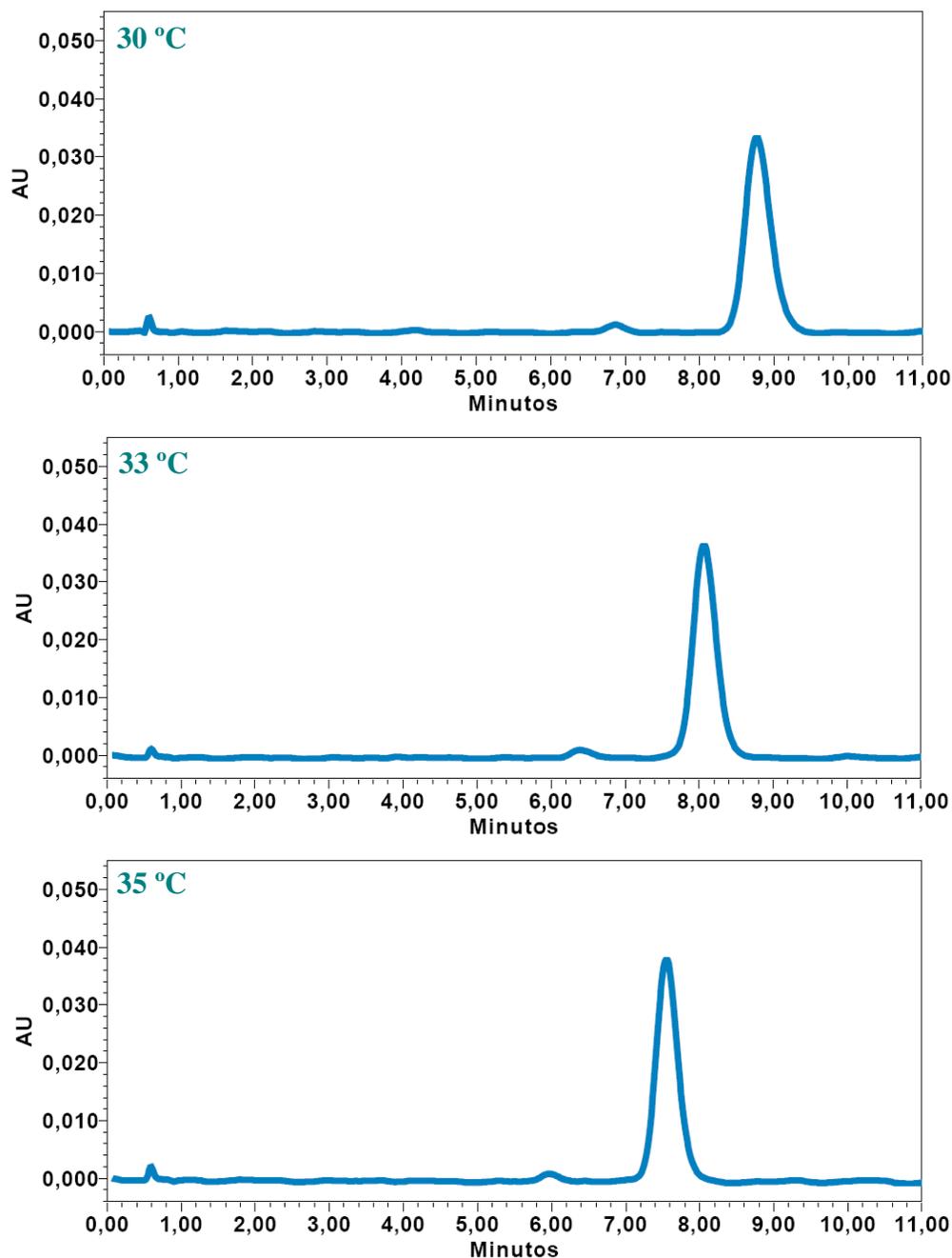
I) entre IVM B1a e IVM B1b II) IVM B1a

As duas colunas apresentaram todos os parâmetros de conformidade para o sistema cromatográfico adequados. Porém, com a coluna cromatográfica Purospher® STAR RP-18e (55 mm x 4,0 mm, 3  $\mu\text{m}$ ) foi obtido um tempo de análise equivalente a metade do obtido com a coluna cromatográfica ACE® C18 (250 mm x 4,6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ). Portanto, a coluna Purospher® STAR RP-18e (55 mm x 4,0 mm, 3  $\mu\text{m}$ ) foi selecionada para os estudos cromatográficos subseqüentes.

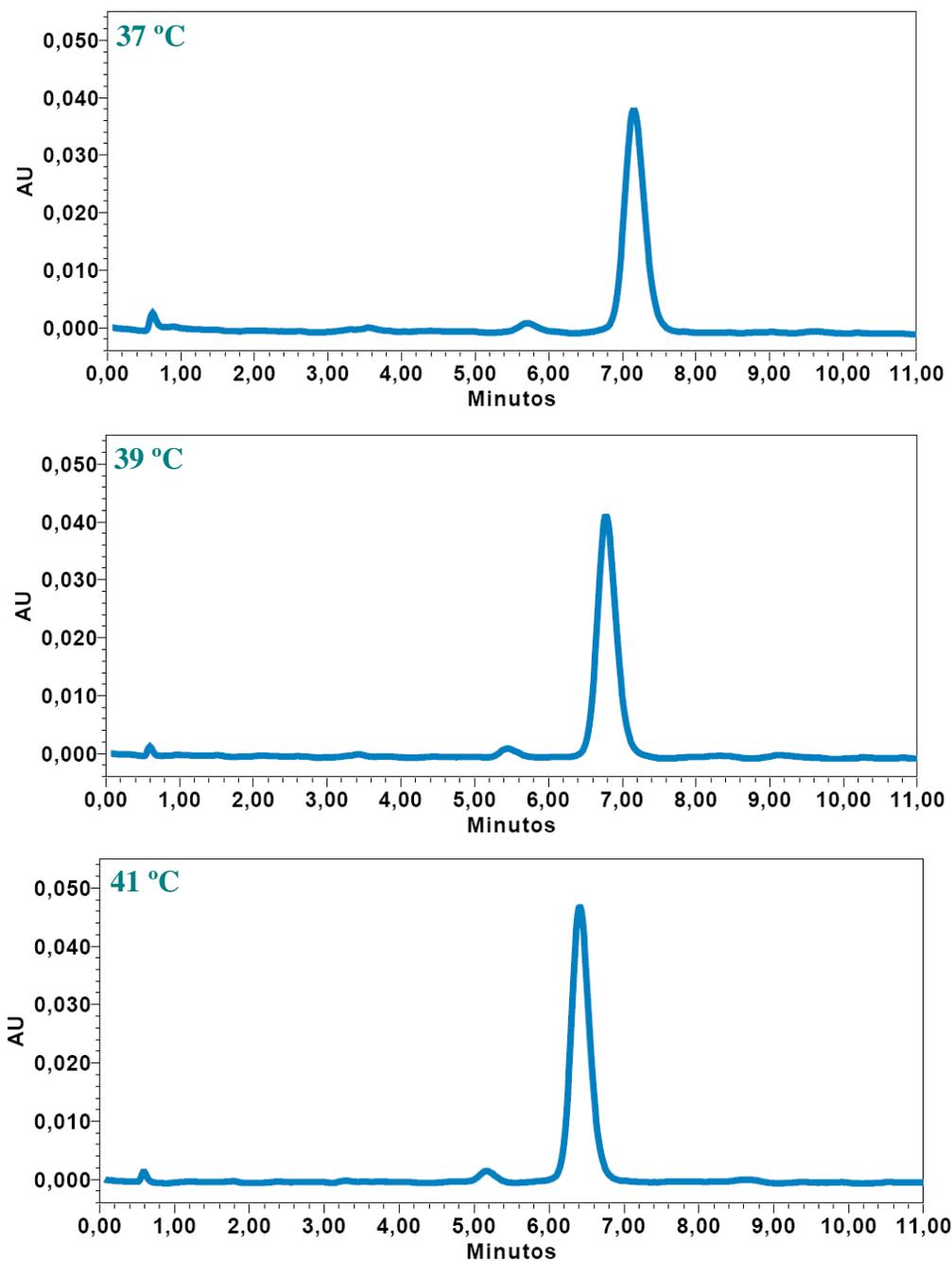
### IV.3.2 – AVALIAÇÃO DO EFEITO DA TEMPERATURA NA SEPARAÇÃO DA IVM B1a DO SEU HOMÓLOGO B1b

Foi observado que a temperatura da coluna afetou a separação da IVM B1a e seu homólogo IVM B1b. Portanto, foi realizado um estudo para a separação dos compostos a diferentes temperaturas, no intervalo de 30 a 45 °C.

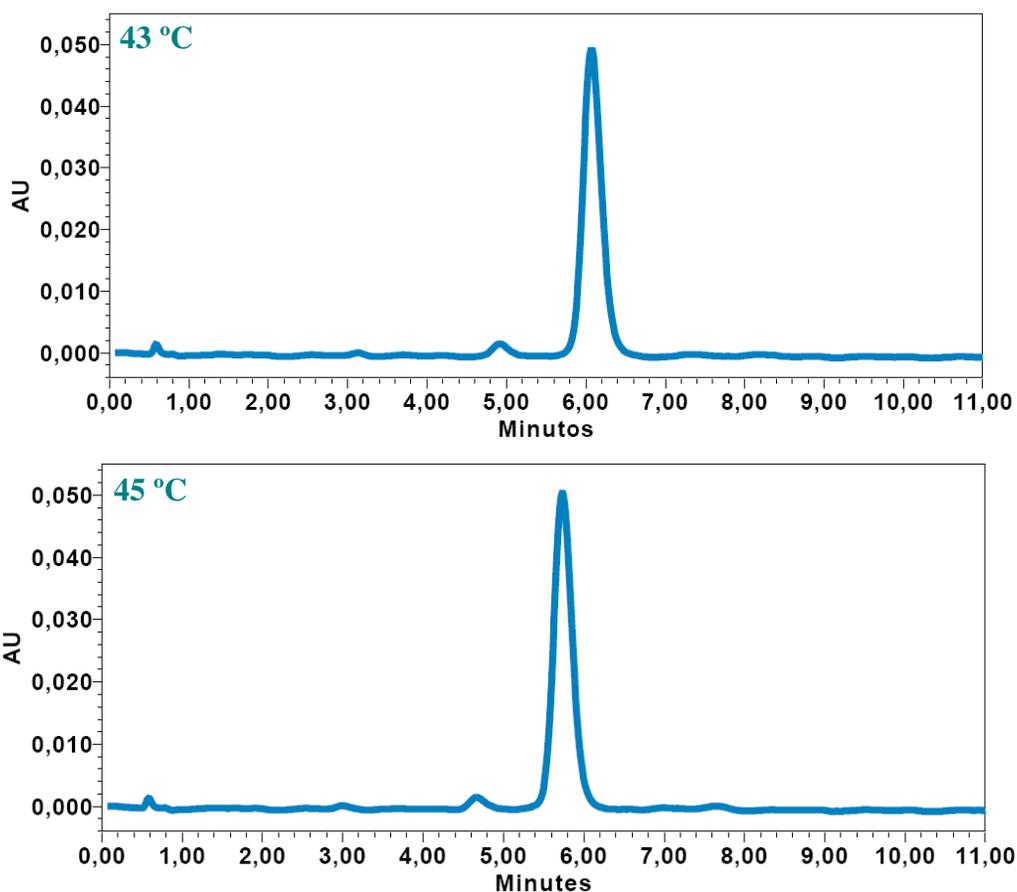
Os cromatogramas da separação da IVM B1a e seu homólogo IVM B1b obtidos nas temperaturas de 30, 33, 35, 37, 41, 43 e 45° C são mostrados na **Figura IV.5.a**, **Figura IV.5.b** e **Figura IV.5.c**.



**Figura IV.5.a** - Cromatogramas obtidos para a separação da IVM B1a de seu homólogo IVM B1b. Concentração de IVM B1a  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Coluna Purospher<sup>®</sup> STAR RP-18e (55 mm x 4,0 mm, 3  $\mu\text{m}$ ), fase móvel composta por MeOH:H<sub>2</sub>O (83:17, v/v); vazão da fase móvel de  $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ , comprimento de onda de detecção em 245 nm, volume de injeção de  $5 \mu\text{L}$  e temperatura da coluna de 30, 33 e 35 °C.



**Figura IV.5.b** - Cromatogramas obtidos para a separação da IVM B1a de seu homólogo IVM B1b. Concentração de IVM B1a  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Coluna Purospher<sup>®</sup> STAR RP-18e (55 mm x 4,0 mm, 3  $\mu\text{m}$ ), fase móvel composta por MeOH:H<sub>2</sub>O (83:17, v/v); vazão da fase móvel de  $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ , comprimento de onda de detecção em 245 nm, volume de injeção de  $5 \mu\text{L}$  e temperatura da coluna de 35, 37, 39 e 41 °C.



**Figura IV.5.c** - Cromatogramas obtidos para a separação da IVM B1a de seu homólogo IVM B1b. Concentração de IVM B1a  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Coluna Purospher® STAR RP-18e (55 mm x 4,0 mm, 3  $\mu\text{m}$ ), fase móvel composta por MeOH:H<sub>2</sub>O (83:17, v/v); vazão da fase móvel de  $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ , comprimento de onda de detecção em 245 nm, volume de injeção de 5  $\mu\text{L}$  e temperatura da coluna de 43 e 45 °C.

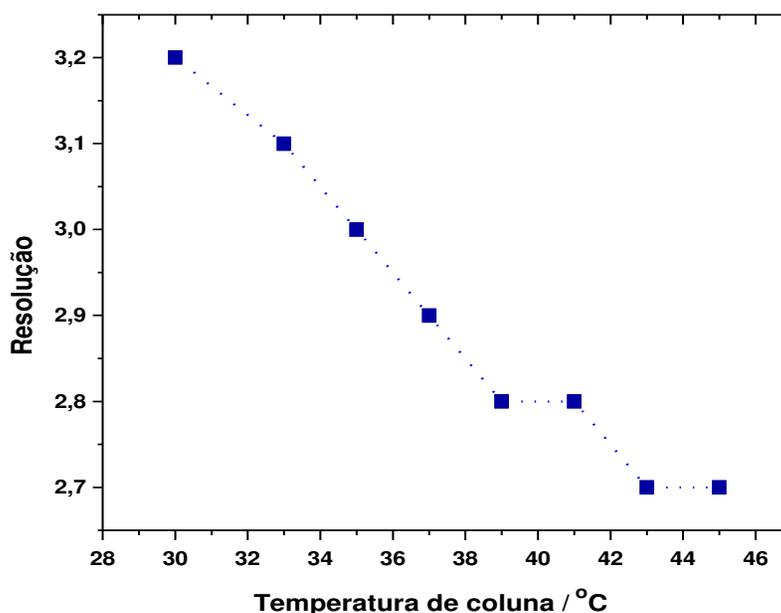
A avaliação da influência da temperatura na separação cromatográfica da IVM B1a da IVM B1b foi verificada pela variação do tempo de retenção dos dois compostos e a resolução entre eles. Os valores para os parâmetros cromatográficos avaliados estão apresentados na **Tabela IV.2**.

**Tabela IV.2** – Valores de resolução entre IVM B1a e IVM B1b e seus respectivos tempos de retenção nas temperaturas de coluna de 30, 33, 35, 37, 39, 41, 43 e 45 °C.

		Temperatura (°C)							
		30	33	35	37	39	41	43	45
<b>IVM B1b</b>	<b>t<sub>R</sub> (min)</b>	6,6	6,1	5,9	5,7	5,4	5,2	4,9	4,7
<b>IVM B1a</b>	<b>t<sub>R</sub> (min)</b>	8,7	8,0	7,5	7,2	6,8	6,4	6,0	5,7
	<b>Rs<sup>I</sup></b>	3,2	3,1	3,0	2,9	2,8	2,8	2,7	2,7

I) resolução entre a IVM B1a e seu homólogo IVM B1b

A variação da resolução entre a IVM B1a e IVM B1b em função da temperatura está apresentada na **Figura IV.6**.



**Figura IV.6** – Gráfico da resolução entre os picos cromatográficos referentes a IVM B1a e IVM B1b em função da temperaturas de coluna (30, 33, 35, 37, 39, 41, 43 e 45 °C). Condições cromatográficas descritas nas **Figuras IV.5a, IV.5b e IV.5c**.

A partir dos resultados obtidos é possível verificar que a resolução entre a IVM B1a e IVM B1b diminui com o aumento da temperatura. Nesse sentido a temperatura é um ponto crítico do método considerando que, segundo as especificações da Farmacopéia Britânica, a resolução entre os dois compostos deve ser no mínimo de 3,0. Temperaturas superiores a 37 °C levam a resoluções menores do que 3,0 e, portanto, não são adequadas para a finalidade do método em questão. A temperatura ótima selecionada foi de 30 °C, pois nessa temperatura o sistema se estabiliza mais rapidamente.

### **IV.3.3 – AVALIAÇÃO DO PREPARO DE AMOSTRA PARA A ANÁLISE POR HPLC-DAD**

As amostras de IVM em formulação injetável são veiculadas em excipiente pouco solúvel em água. Sendo assim, foi necessário o emprego de metanol para a diluição das mesmas. Cabe destacar também que a IVM é pouco solúvel em água e solúvel em metanol (BRITISH PHARMACOPOEIA, 2009).

Para realizar a diluição das amostras foi avaliado o emprego do ultrassom por um tempo de 15 min. Para tanto, uma amostra foi analisada em triplicata. O resultado obtido através de teste estatístico “t” ( $t_{\text{calculado}} = -0,04$  frente ao  $t_{\text{crítico}} = \pm 2,78$ ) mostrou que não há diferença significativa ( $P < 0,05$ ) entre os resultados obtidos com e sem o emprego do ultrassom na etapa de dissolução. Sendo assim, o ultrassom não foi empregado no preparo de amostras. A **Tabela IV.3** mostra os resultados obtidos na avaliação do uso do ultrassom.

Todas as análises foram realizadas em triplicata.

**Tabela IV.3** – Áreas do pico cromatográfico correspondente a IVM B1a nas soluções da amostra 1 na concentração aproximada de 50 µg mL<sup>-1</sup> de IVM B1a em MeOH, sem uso de ultrassom e com o uso de 15 minutos de ultrassom na etapa de diluição.

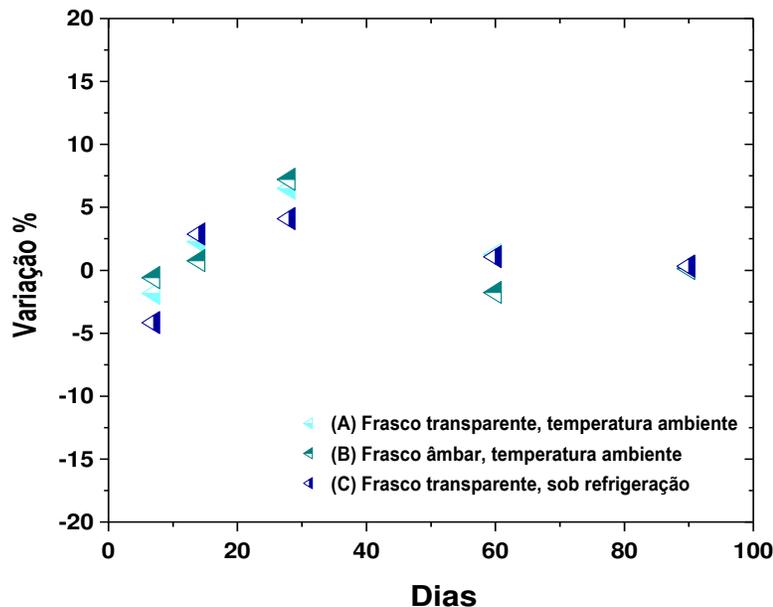
Soluções	Área do pico cromatográfico referente a IVM B1a / uA	
	Sem Ultrassom	15 minutos de Ultrassom
1	956067	958575
2	960278	964042
3	973332	973710

#### IV.3.4 – ESTABILIDADE DA SOLUÇÃO ESTOQUE DE IVERMECTINA EM MeOH

A estabilidade da solução estoque de IVM em MeOH foi avaliada durante três meses sob diferentes condições de estocagem: (A) frasco transparente a temperatura ambiente; (B) frasco âmbar a temperatura ambiente e (C) frasco transparente sob refrigeração (2 - 8 °C). A princípio foi estabelecido que uma variação de 5% na concentração seria aceitável, uma vez que essa variação representaria a própria precisão do método.

A **Figura IV.7** apresenta a variação na concentração de IVM durante o período avaliado. Embora tenha sido verificada uma variação da concentração de IVM superior a 5% após um mês, essa variação não pode ser atribuída a uma possível degradação, pois, após o segundo mês essa variação não foi confirmada. Considerando o estudo em todo período avaliado, pode-se afirmar que a solução

estoque do padrão de IVM é estável sob todas as formas avaliadas de armazenamento por um período mínimo de três meses.



**Figura IV.7** - Variação (%) da concentração de IVM B1a durante estocagem por um período de 3 meses em três formas de estocagem: (A) frasco transparente a temperatura ambiente; (B) frasco âmbar a temperatura ambiente e (C) frasco transparente sob refrigeração (2 – 8 °C). Concentração da solução estocada: 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

#### **IV.3.5 – VALIDAÇÃO DO MÉTODO HPLC-DAD PARA A DETERMINAÇÃO DE IVM EM MEDICAMENTOS VETERINÁRIOS**

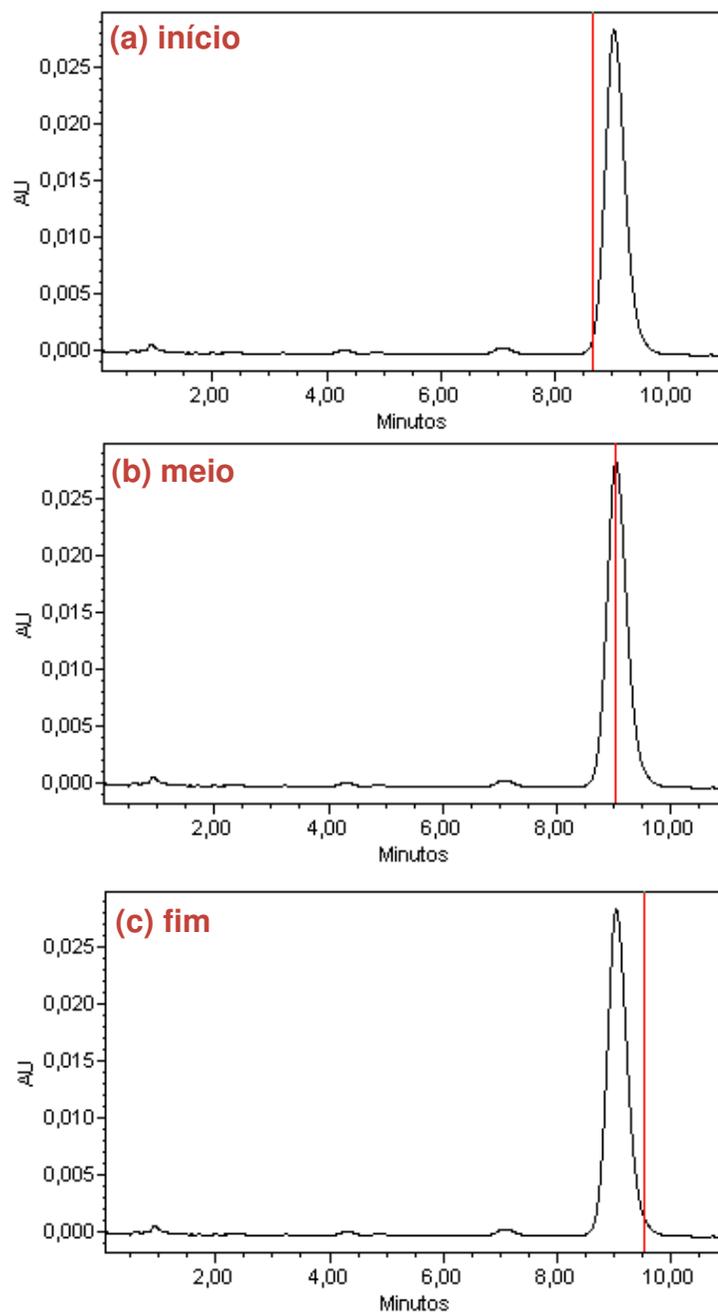
A validação deve garantir, por meio de estudos experimentais, que o método analítico desenvolvido atenda aos seus propósitos em conformidade com as exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados (ANVISA, 2003). A validação do método foi baseada na Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária –

ANVISA. Uma vez que o objetivo do método se enquadra na Categoria I (testes quantitativos para a determinação do princípio ativo em produtos farmacêuticos ou matérias-primas), foram avaliadas as seguintes figuras de mérito: linearidade, intervalo linear, exatidão, seletividade, precisão (intra e inter-dias) e robustez (ANVISA, 2003).

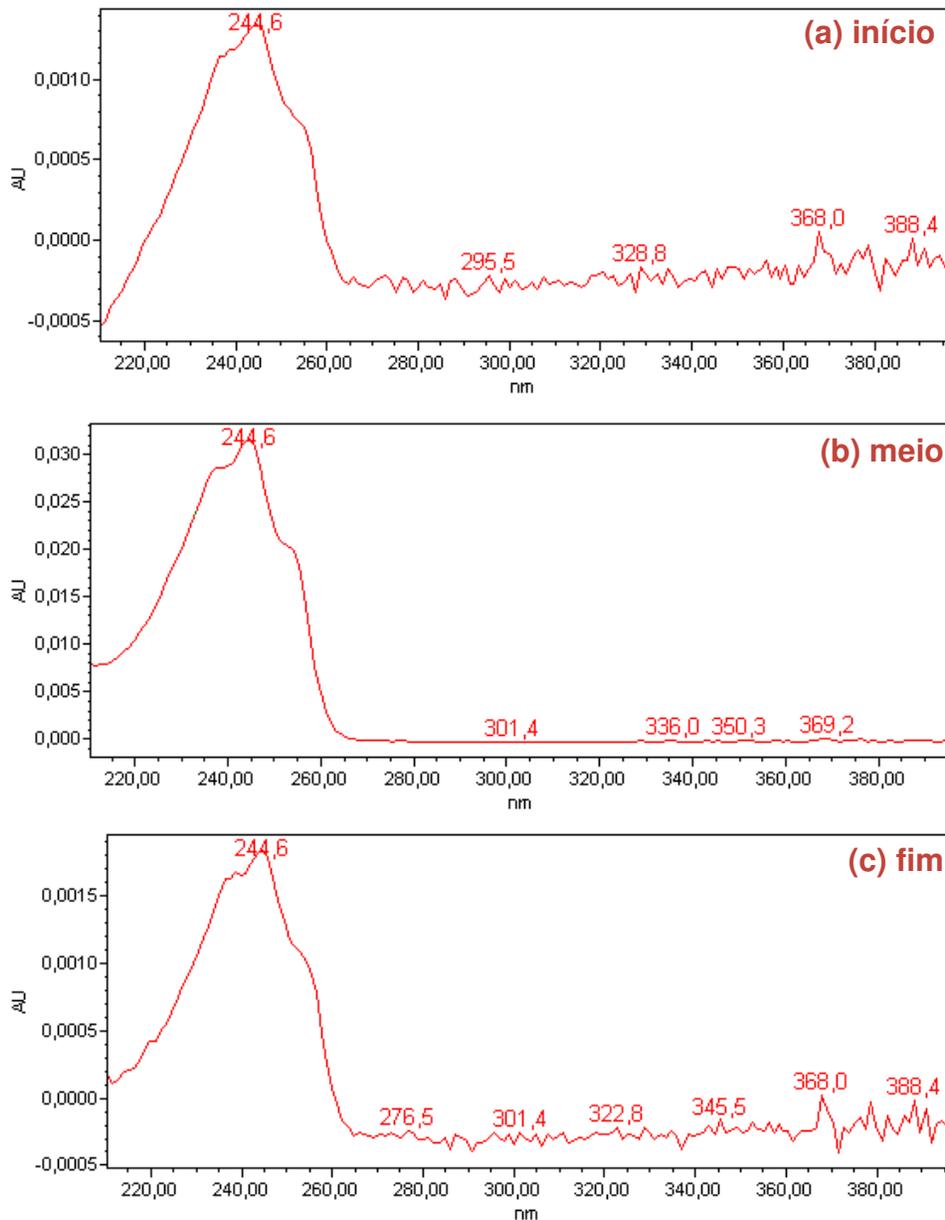
#### **IV.3.5.1 – Seletividade**

A seletividade foi avaliada mediante: (I) pureza do pico na análise de amostras, verificando se havia algum interferente da formulação, produtos de degradação e/ou impurezas que pudessem apresentar o mesmo tempo de retenção da IVM e (II) na presença de produtos de degradação formados após exposição da IVM a condições de estresse (meio ácido, básico, oxidante e temperatura). As condições experimentais estão descritas no *item III.1.3.5.1*.

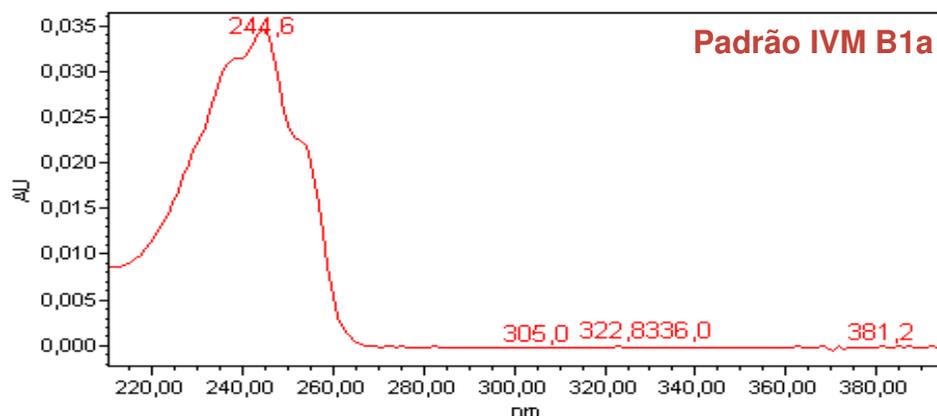
Para avaliar a possível co-eluição de compostos provenientes do excipiente, uma amostra de medicamento veterinário, formulação injetável, foi analisada pelo método cromatográfico desenvolvido e avaliada a pureza do pico. Na análise das amostras de formulação injetável não foi verificada a presença de compostos com tempos de retenção próximos a IVM e, portanto, não há compostos presentes nestas formulações que venham a afetar a seletividade do método. Nesta amostra foi avaliada a pureza do pico em três regiões de tempo que compreendem o pico da IVM B1a (início, meio e fim – **Figura IV.8**) e os respectivos espectros de absorção no UV nos diferentes tempos de retenção estão apresentados na **Figura IV.9**. O espectro de absorção no UV do pico cromatográfico referente ao padrão de IVM B1a está apresentado na **Figura IV.10**. Os espectros de absorção na região do UV foram obtidos através de cromatogramas registrados sob as condições estabelecidas e descritas no *item III.1.3.5* do capítulo III.



**Figura IV.8** – Regiões - **(a)** início **(b)** meio e **(c)** fim - referente ao pico cromatográfico da IVM B1a utilizadas para a avaliação da pureza de pico em um cromatograma característico registrado para a amostra 2 na concentração de  $\cong 50 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Fase estacionária Purospher® STAR RP-18e (55 mm x 4,0 mm, 3  $\mu\text{m}$ ); fase móvel MeOH:H<sub>2</sub>O 83:17 v/v; vazão: 1,0 mL min<sup>-1</sup>; temperatura a coluna: 30 °C, comprimento de onda de detecção em 245 nm e volume de injeção de 5  $\mu\text{L}$ .



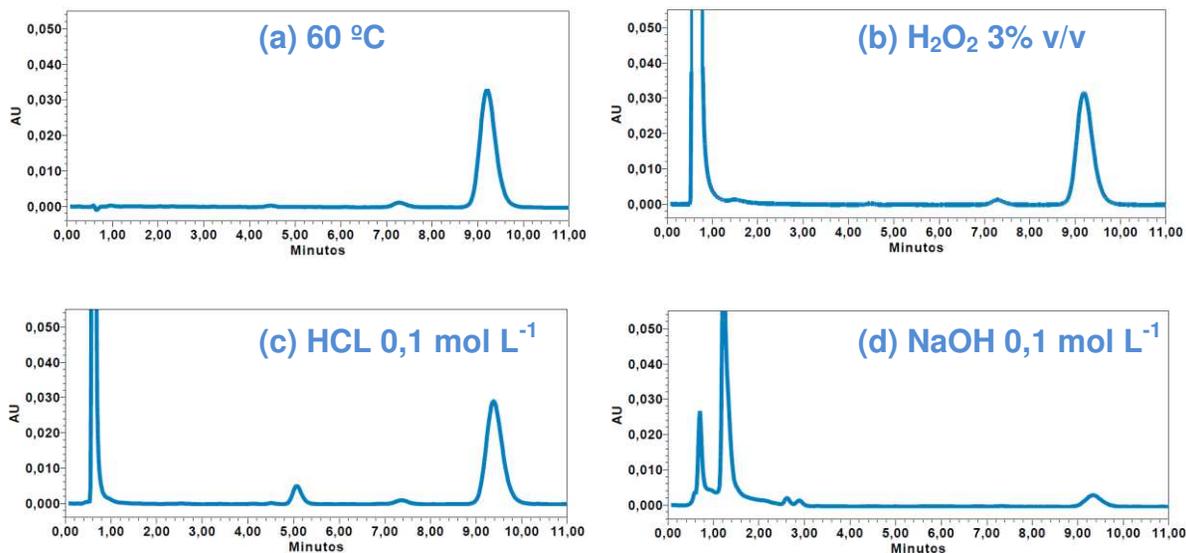
**Figura IV.9** - Espectros de absorção UV da IVM B1a nos tempos de retenção da amostra 2 a aproximadamente  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$  de IVM **(a)** do início; **(b)** meio e **(c)** fim do pico cromatográfico correspondente a IMV B1a. Fase estacionária Purospher® STAR RP-18e (55 mm x 4,0 mm, 3  $\mu\text{m}$ ); fase móvel MeOH:H<sub>2</sub>O 83:17 v/v; vazão: 1,0 mL min<sup>-1</sup>; temperatura a coluna: 30 °C, comprimento de onda de detecção em 245 nm e volume de injeção de 5  $\mu\text{L}$ .



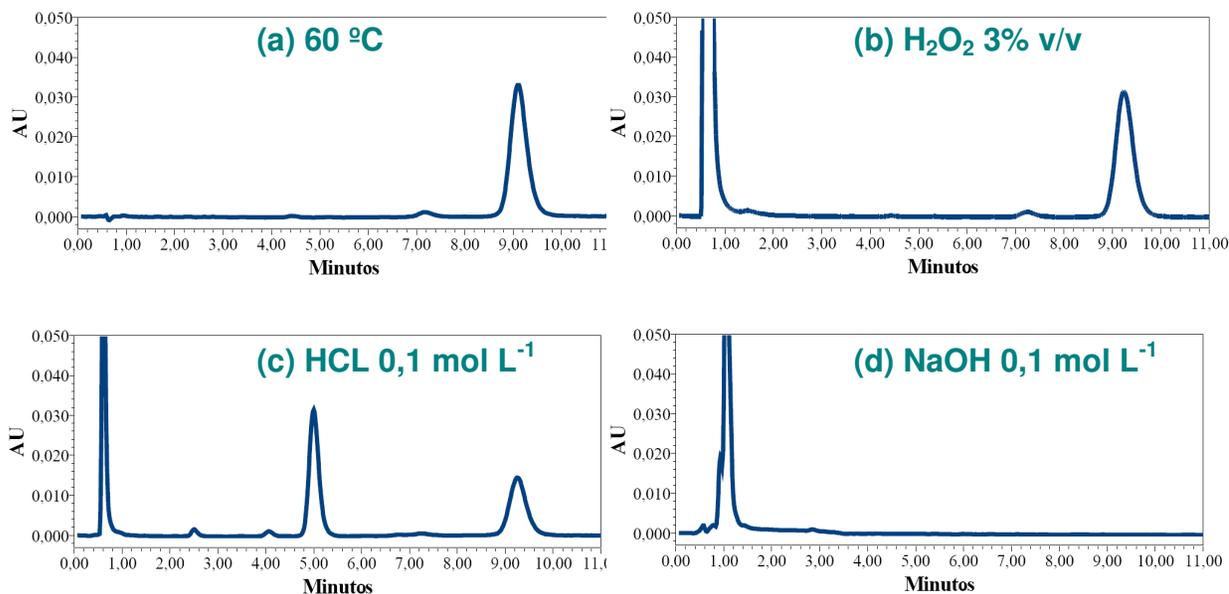
**Figura IV.10** - Espectro de absorção UV da IVM B1a no  $t_R$  de máxima altura do pico cromatográfico da solução do padrão a  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Fase estacionária Purospher® STAR RP-18e (55 mm x 4,0 mm, 3  $\mu\text{m}$ ); fase móvel MeOH:H<sub>2</sub>O 83:17 v/v; vazão: 1,0 mL min<sup>-1</sup>; temperatura a coluna: 30 °C, comprimento de onda de detecção em 245 nm e volume de injeção de 5  $\mu\text{L}$ .

No teste de pureza do pico não foi observado co-eluição de outros compostos da formulação com a IVM B1a, visto que durante toda extensão do pico da IVM B1a proveniente da amostra o espectro é puro (**Figura IV.9** e **Figura 10**).

Ainda, a seletividade foi avaliada após exposição da IVM a condições de estresse para forçar a formação de produtos de degradação e garantir, que uma vez formados estes não eluiriam no tempo de retenção da IVM. Para tanto, a IVM foi exposta a: (a) temperatura de 60 °C; (b) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% v/v; (c) HCl 0,1 mol L<sup>-1</sup> e (d) NaOH 0,1 mol L<sup>-1</sup> durante 1 e 24 horas. As análises foram realizadas pelo método cromatográfico previamente desenvolvido e os cromatogramas estão apresentados na **Figura IV.11** (1 hora) e **Figura IV.12** (24 horas).



**Figura IV.11** - Cromatogramas registrados para o padrão de IVM na concentração de  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$  após 1 hora sob condições de degradação em **(a)**  $60 \text{ }^\circ\text{C}$ ; **(b)**  $\text{H}_2\text{O}_2$  3% v/v; **(c)**  $\text{HCl}$   $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  e **(d)**  $\text{NaOH}$   $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ . Fase estacionária Purospher<sup>®</sup> STAR RP-18e (55 mm x 4,0 mm,  $3 \mu\text{m}$ ); fase móvel MeOH:H<sub>2</sub>O 83:17 v/v; vazão:  $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ ; temperatura:  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ ; comprimento de onda de detecção em 245 nm e volume de injeção de  $5 \mu\text{L}$ .



**Figura IV.12** - Cromatogramas registrados para o padrão de IVM na concentração de  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$  após 24 horas sob condições de degradação em **(a)**  $60 \text{ }^\circ\text{C}$ ; **(b)**  $\text{H}_2\text{O}_2$  3% v/v; **(c)**  $\text{HCl}$   $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  e **(d)**  $\text{NaOH}$   $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ . Fase estacionária Purospher<sup>®</sup> STAR RP-18e (55 mm x 4,0 mm, 3  $\mu\text{m}$ ); fase móvel  $\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$  83:17 v/v; vazão:  $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ ; temperatura:  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ ; comprimento de onda de detecção em 245 nm e volume de injeção de  $5 \mu\text{L}$ .

Através deste estudo foi verificado que a IVM B1a é estável em peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$  a 3 %, v/v) e a temperatura de  $60 \text{ }^\circ\text{C}$  durante 24 horas, porém se apresentou instável em  $\text{HCl}$   $\text{mol L}^{-1}$  e  $\text{NaOH}$   $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  a partir da primeira hora.

Também não foi verificado nenhum produto de degradação co-eluído com a IVM B1a (**Figura IV.11** e **Figura 12**). Assim, todos os testes realizados confirmam a seletividade do método para a aplicação pretendida.

### IV.3.5.2 – Linearidade e Intervalo Linear

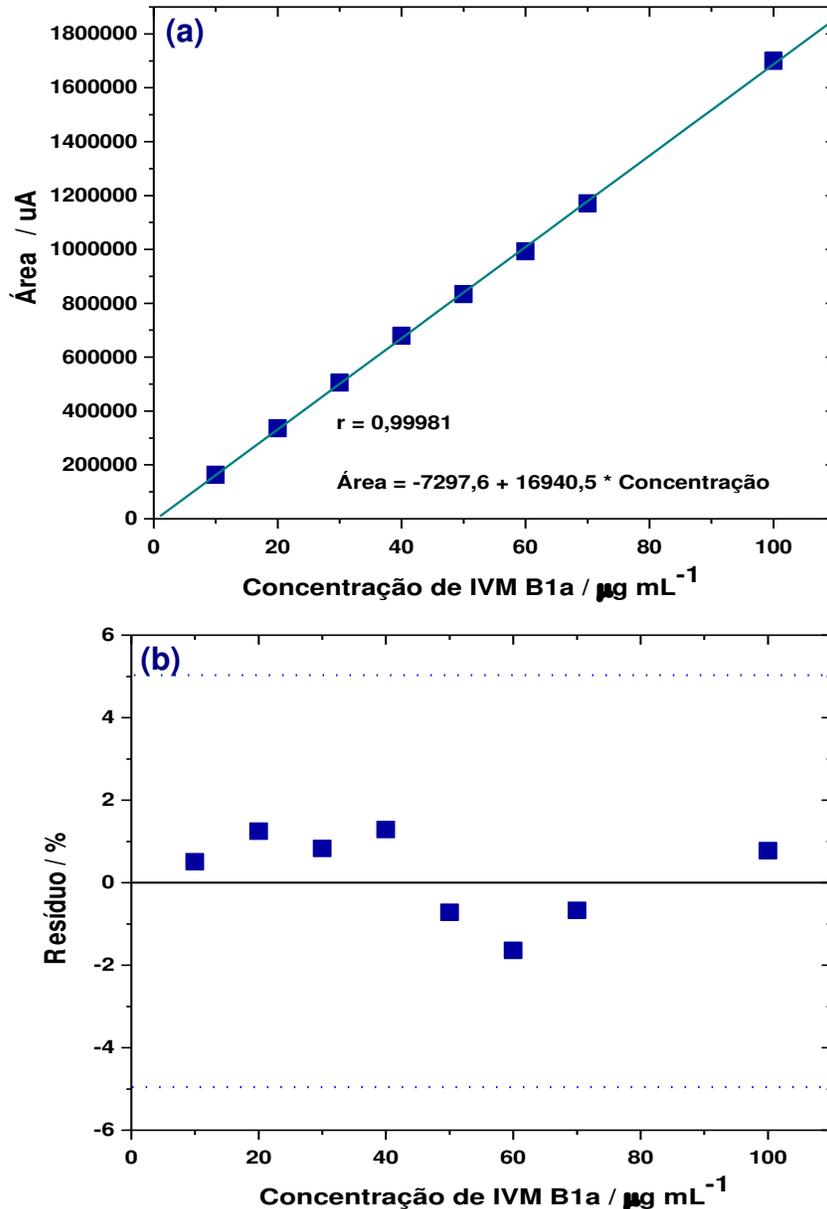
Para qualquer método quantitativo, existe uma faixa de concentração do analito onde o método pode ser aplicado, obtendo linearidade entre a resposta do instrumento e a concentração conhecida do analito (ANVISA, 2003; PASCHOAL *et al.*, 2008). Para avaliar a linearidade e estabelecer o intervalo do método, foi inicialmente construída uma curva analítica em uma faixa de concentração mais ampla, denominada neste trabalho de curva analítica dinâmica. A partir dessa curva foi selecionada uma faixa de concentração menor, denominada de intervalo linear, respeitando a recomendação da ANVISA, ou seja, de 80 a 120% da concentração teste. A curva analítica dinâmica, compreendendo o intervalo de 10 – 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , e o respectivo gráfico de resíduos estão apresentados na **Figura IV.13**. A partir desta curva foram estabelecidos o intervalo linear e a linearidade do método, tomando como critério a resposta do detector e a quantidade a ser injetada no sistema sem sobrecarregar a coluna analítica.

O intervalo definido foi de 40 a 60  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de IVM. É importante notar que o ponto médio da curva deve corresponder à concentração nominal de IVM no medicamento veterinário a ser analisado. A linearidade foi expressa pelo coeficiente de correlação linear ( $r$ ) que deve ser superior a 0,99 (ANVISA, 2003).

As curva analítica correspondente ao intervalo e seu respectivo gráfico de resíduos estão apresentadas na **Figura IV.14**. A faixa linear, coeficiente de correlação linear ( $r$ ) e a sensibilidade do método estão descritos na **Tabela IV.4**.

**Tabela IV.4** – Parâmetros do intervalo de trabalho.

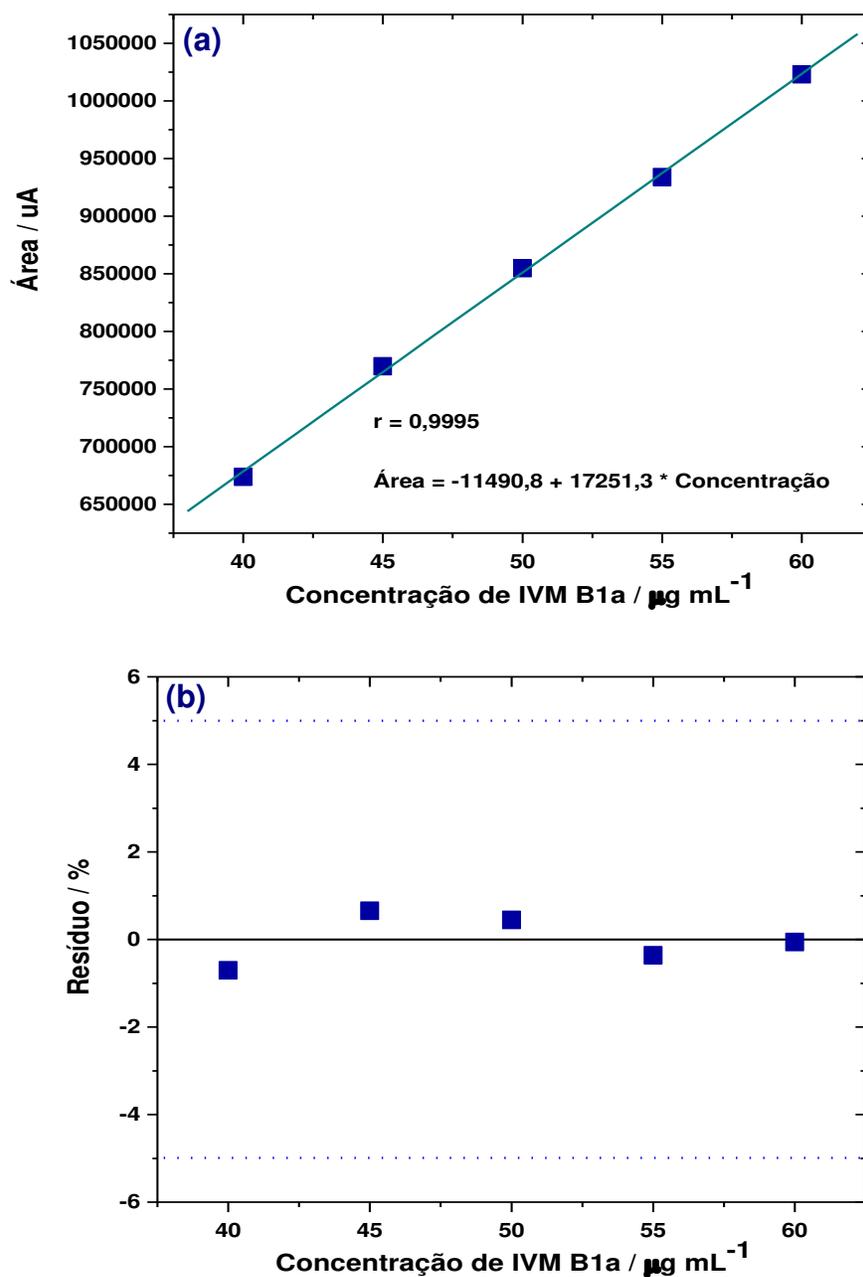
	Parâmetros		
	Faixa Linear ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Linearidade	Sensibilidade ( $\mu\text{A} / \mu\text{g mL}^{-1}$ )
IVM B1a	40 - 60	0,9995	17251,3



**Figura IV.13** – (a) Curva analítica dinâmica no intervalo de concentração de padrão IVM B1a de 10 a 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (equação da reta e coeficiente de regressão linear ( $r$ ) inseridos no gráfico); (b) gráfico de resíduos para a curva analítica dinâmica.

Apesar do intervalo dinâmico ter se mostrado linear em toda a faixa de concentração (10 a 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), foi observado pelo gráfico de resíduos que na faixa de concentração de 10 a 40  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e na faixa de 50 a 70  $\mu\text{g mL}^{-1}$  existe

uma tendência na dispersão dos resíduos. Então, foi selecionado o intervalo de 40 a 60  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , para o intervalo e estudo da linearidade.



**Figura IV.14** – (a) Curva analítica (intervalo) na faixa de concentração de padrão IVM B1a de 40 a 60  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (equação da reta e coeficiente de regressão linear (r) inseridos no gráfico); (b) gráfico de resíduos.

O coeficiente de correlação linear ( $r = 0,9995$ ) se apresentou adequado conforme as recomendações da ANVISA ( $r > 0,99$ ), portanto, o método responde linearmente entre o sinal analítico e a concentração de IVM B1a no intervalo de trabalho estabelecido para o método (40 a 60  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). Ainda, o gráfico de resíduo apontou que todos os valores se encontram dentro do intervalo aceitável de 5% distribuídos de forma aleatória em torno do valor médio, indicando que não há tendência.

#### **IV.3.5.3 – Exatidão**

A exatidão de um método analítico é a medida da proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro, usando um procedimento experimental para uma mesma amostra por repetidas vezes. É importante ressaltar que o analito presente na amostra pode apresentar um comportamento diferente daquele quando o mesmo é adicionado sobre uma amostra branco, principalmente quanto se trata de medicamentos veterinários (PASCHOAL *et al.*, 2008).

Os quatro métodos principais para avaliar a exatidão são:

- ✓ Uso de material de referência certificado (MRC);
- ✓ Comparação do método proposto com um método de referência;
- ✓ Uso de ensaios de recuperação na matriz;
- ✓ Estudos colaborativos.

Quando disponíveis, o uso dos MRC são os preferidos, pois estão diretamente relacionados com padrões internacionais. Esse processo de avaliação consiste em analisar um número satisfatório de replicatas desse material e comparar os resultados obtidos com o valor certificado (BRITO *et al.*, 2003).

A exatidão pode ser avaliada mediante comparação entre resultados obtidos pelo método proposto com os resultados obtidos para as mesmas amostras por outro método validado. Após análise de diferentes amostras pelos dois métodos, as diferenças obtidas para cada amostra são contabilizadas e comparadas com o valor desejado (BRITO *et al.*, 2003).

O ensaio de recuperação é o método mais utilizado para validação de processos analíticos e foi o utilizado nesse trabalho. A recuperação reflete a quantidade de dado analito, recuperado no processo, em relação à quantidade real presente (por fortificação) na amostra. A exatidão é expressa como erro sistemático percentual intrínseco ao processo (BRITO *et al.*, 2003). Cabe ressaltar que foi necessário se trabalhar com a fortificação da amostra, pois, o excipiente não estava disponível para todas as amostras.

Estudos colaborativos implicam na aceitação de pelo menos oito laboratórios em desenvolver determinado método. Somente na impossibilidade de se reunir os oito laboratórios requeridos é permitido que se conduza o estudo com o mínimo absoluto de cinco (BRITO *et al.*, 2003).

Neste trabalho, a exatidão do método foi avaliada mediante teste de recuperação. Para tanto, 13 amostras de medicamentos contendo IVM nas formulações injetáveis 1% m/v, 1% m/v L.A. e 4% m/v L.P foram fortificadas com IVM em dois níveis: baixo (fortificação da amostra com 34% de padrão de IVM) e alto (fortificação da amostra com 66% de padrão de IVM), conforme procedimento descrito no *item III.1.3.5.3*.

A amostra sem fortificação foi previamente analisada em sextuplicata e as amostras fortificadas, cada nível, em triplicata. A quantificação foi realizada por padronização externa usando o intervalo anteriormente estabelecido.

Das 13 amostras analisadas, duas estavam fora deste critério, evidenciando efeito matriz. Sendo assim, essas duas amostras foram analisadas pelo método de adição de padrão. A exatidão do método para medicamentos veterinários em solução injetável é confirmada quando a recuperação se situa no intervalo de 95 a 105 % (BRITISH PHARMACOPOEIA, 2009).

Os resultados para a exatidão variaram de 96 a 104% e estão de acordo com o valor aceito e preconizado pela ANVISA. Os resultados estão apresentados na **Tabela IV.5**, sendo que os valores de recuperação foram calculados utilizando a equação **IV.6**.

$$\text{Recuperação} \cdot (\%) = 100 \times \left( \frac{\text{Concentração} \cdot \text{amostra}}{\text{Concentração} \cdot \text{amostra} \cdot \text{fortificada}} \right) \quad (\text{IV.6})$$

**Tabela IV.5** – Resultados do teste de recuperação realizado para 11 amostras de medicamentos veterinários em solução injetável que não apresentaram efeito matriz.

Amostra	Recuperação (%)	Formulação	Concentração Nominal (% m/v)	EF
2	96 – 101	Solução Injetável	1	B
3	96 – 97	Solução Injetável	1	C
4	97 – 98	Solução Injetável	1	D
5	101	Solução Injetável	1	E
6	97 – 98	Solução Injetável	1	F
11	99 – 100	Solução Injetável	1	G
12	97 – 98	Solução Injetável L.P	4	G
17	97 – 101	Solução Injetável L.P	4	G
23	99 – 104	Solução Injetável L.A	1	G
26	98 – 101	Solução Injetável	1	I
35	97 – 100	Solução Injetável	1	J

EF) Empresa Farmacêutica; L.P) Liberação Programada; L.A) Longa Ação

#### IV.3.5.4 – Precisão Intra-dia

A precisão é o parâmetro que avalia a proximidade entre várias medidas efetuadas na mesma amostra e representa a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos para uma mesma amostra (ANVISA, 2003; RIBANI, 2004). Para a validação de métodos em um único laboratório (*single-laboratory validation*), duas etapas são relevantes para esse parâmetro:

- Precisão intra-ensaio: sob condições de repetibilidade, descreve as variações observadas durante uma única corrida analítica;
- Precisão inter-ensaios: descreve o grau de variações observadas em diferentes corridas analíticas.

A precisão é expressa como a estimativa do desvio-padrão ou coeficiente de variação (CV) das diversas medidas. O CV é dado pela equação IV.7 (ANVISA, 2003).

$$CV \cdot (\%) = 100 \times \left( \frac{s}{x} \right) \quad (\text{IV.7})$$

Onde “s” é a estimativa do desvio padrão das medidas e “x” é a concentração média determinada (ANVISA, 2003).

A precisão intra-dia foi realizada mediante análise das 31 amostras em sextuplicata pelo mesmo analista, no mesmo dia e no mesmo equipamento, conforme descrito no *item III.1.3.5.4*. Os resultados estão apresentados na **Tabela IV.6**. A ANVISA preconiza que a precisão, expressa pelo CV, seja igual ou inferior a 5% (ANVISA, 2003).

Os resultados da precisão inter-dia variaram de 0,5 a 4,8% estando de acordo com o estabelecido pela ANVISA.

**Tabela IV.6** - Os resultados da precisão inter-dia para as 31 amostras de medicamentos veterinários analisadas.

<b>Amostra</b>	<b>CV / %</b>	<b>Formulação</b>	<b>Concentração nominal (% , m/v)</b>	<b>EF</b>
1	2,3	Solução Injetável	1	A
2	0,7	Solução Injetável	1	B
3	1,0	Solução Injetável	1	C
4	1,0	Solução Injetável	1	D
5	1,0	Solução Injetável	1	E
6	1,0	Solução Injetável	1	F
7	1,0	Solução Injetável	1	F
8	1,0	Solução Injetável	1	F
9	1,0	Solução Injetável	1	F
10	1,0	Solução Injetável	1	F
11	0,5	Solução Injetável	1	G
12	1,0	Solução Injetável L.P	4	G
13	1,1	Solução Injetável L.P	4	G
14	0,9	Solução Injetável L.P	4	G
15	1,7	Solução Injetável L.P	4	G
16	0,5	Solução Injetável L.P	4	G
17	0,5	Solução Injetável L.P	4	G
18	1,2	Solução Injetável L.P	4	G
19	1,0	Solução Injetável L.P	4	G
20	1,0	Solução Injetável L.A	1	G
21	0,9	Solução Injetável L.A	1	G
22	1,0	Solução Injetável L.A	1	G
23	3,5	Solução Injetável L.A	1	G
24	0,5	Solução Injetável L.A	1	G
25	4,8	Solução Injetável	1	H
26	0,8	Solução Injetável	1	I
27	2,0	Solução Injetável	1	I
28	2,1	Solução Injetável	1	I
29	1,1	Solução Injetável	1	I
30	2,3	Solução Injetável	1	I
35	2,5	Solução Injetável	1	J

EF) Empresa Farmacêutica

#### IV.3.5.5 – Precisão Inter-dia

A precisão inter-dia foi avaliada mediante análise da amostra 2 em dois dias diferentes, por dois analistas diferentes e no mesmo equipamento, conforme descrito no *item III.1.3.5.5*.

Todas as análises foram realizadas em sextuplicata em cada dia. A precisão inter-dia, expressa pelo CV, foi de 2,7% e, portanto, também adequado segundo recomendações da ANVISA.

#### IV.3.5.6 – Robustez

A robustez é a medida da capacidade do método resistir a pequenas variações dos parâmetros analíticos, indicando confiança durante seu uso normal (ANVISA, 2003).

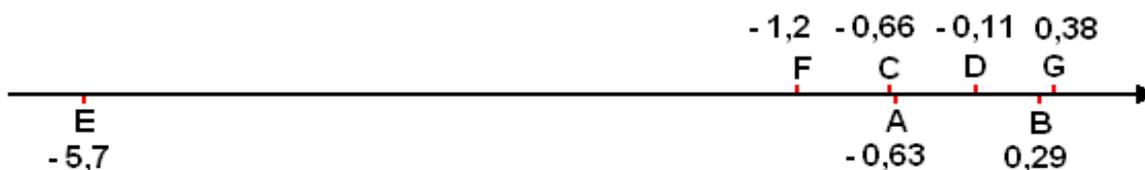
A princípio foram selecionados fatores que poderiam resultar em uma variação na resposta medida, como: proporção dos solventes que compõe a fase móvel (MeOH/H<sub>2</sub>O), pH da fase móvel, vazão da fase móvel, uso de ultrassom no preparo de amostra, solvente de solubilização da amostra, temperatura da coluna e coluna cromatográfica. Então, foram realizadas pequenas variações nesses fatores (conforme descrito na **Tabela III.3** do *item 1.3.5.6*) para ponderar seus efeitos no método desenvolvido. Todas as análises foram realizadas conforme descrito no *item III.1.3.5.6*.

A avaliação do efeito foi realizada mediante execução aleatória de oito ensaios e para cada parâmetro foi realizado o cálculo da média dos resultados de concentração dos fatores positivos pela diferença da média dos resultados de concentração dos fatores negativos. Os resultados obtidos pela avaliação dos

efeitos dos parâmetros - variação da concentração ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) - estão apresentados na **Tabela IV.7** e distribuídos em uma linha em ordem crescente (**Figura IV.15**) para melhor visualização. Ainda, na **Tabela IV.7**, estão apresentados os valores de erro relativo calculado para cada parâmetro em relação a variação obtida quando nenhum parâmetro do método sofreu alteração (Ensaio 1).

**Tabela IV.7** – Efeito dos parâmetros estudados para avaliar a robustez do método.

Parâmetro e legenda		Efeito ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Erro relativo (%)
Proporção da fase móvel	A	- 0,63	- 1,2
pH da fase móvel	B	0,29	0,57
Vazão da fase móvel	C	- 0,66	- 1,3
Uso do ultrassom	D	- 0,11	- 0,21
Solubilização da amostra	E	- 5,7	- 11
Temperatura da coluna	F	-1,2	-2,5
Coluna de separação	G	0,38	0,75



**Figura IV.15** – Distribuição dos efeitos dos parâmetros em ordem crescente.

A partir da avaliação dos efeitos para a mudança de cada parâmetro, foi observado que o método apresenta variações muito baixas (< 5%), exceto quando a amostra é solubilizada parcialmente em meio aquoso (variação superior a 11%). Isso já era esperado, já que a solubilidade da IVM em água é muito baixa. Portanto, a amostra deve ser solubilizada em metanol.

Em relação aos demais parâmetros, verifica-se que o método é robusto.

### **IV.3.6 – ANÁLISE DE AMOSTRAS DE MEDICAMENTOS VETERINARIOS CONTENDO IVM COMO PRINCÍPIO ATIVO POR HPLC-DAD**

Conforme apresentado no *item IV.1*, os medicamentos veterinários em solução injetável demandam maior observação de suas conformidades, pois sua grande representatividade no mercado brasileiro torna esses produtos de mais fácil acesso. Assim, no presente trabalho desenvolvido, foram analisadas 31 amostras de medicamentos veterinários em solução injetável com características diferentes.

#### **IV.3.6.1 - Análise de amostras usando padronização externa**

Anterior a análise, todas as amostras de medicamentos de formulações diferentes e/ou fabricantes diferentes foram avaliadas quanto a um possível efeito matriz. Para tanto, as amostras foram fortificadas em dois níveis (baixo e alto) e calculadas a recuperação. O procedimento empregado está detalhado nos *itens III.1.3.5.3 e III.1.3.7.1*. Na ausência de efeito matriz, ou seja, recuperação no intervalo de 95 a 105%, a quantificação de IVM nas amostras de medicamentos veterinários foi realizada por padronização externa. Quando comprovado ausência

de efeito matriz para amostras de uma mesma empresa farmacêutica e mesma formulação, apenas proveniente de lotes diferentes, não foi avaliado novamente o efeito matriz.

Das 31 amostras de medicamentos veterinários disponíveis, apenas duas apresentaram efeito matriz. Sendo assim, a IVM foi quantificada em 29 amostras por padronização externa e duas amostras por análise de adição padrão. Na **Tabela IV.8** estão apresentados os resultados das análises dos medicamentos veterinários contendo IVM por padronização externa.

**Tabela IV.8** - Teores médios (n = 6) de IVM nas amostras analisadas por padronização externa.

Amostra	IC (g 100 mL <sup>-1</sup> )	Formulação	CN (% m/v)	EF
2	1,03 ± 0,01	Solução Injetável	1	B
3	1,01 ± 0,01	Solução Injetável	1	C
4	1,00 ± 0,01	Solução Injetável	1	D
5	1,06 ± 0,01	Solução Injetável	1	E
6	1,07 ± 0,01	Solução Injetável	1	F
7	1,08 ± 0,01	Solução Injetável	1	F
8	1,07 ± 0,01	Solução Injetável	1	F
9	1,02 ± 0,01	Solução Injetável	1	F
10	1,07 ± 0,01	Solução Injetável	1	F
11	1,04 ± 0,01	Solução Injetável	1	G
12	4,03 ± 0,04	Solução Injetável L.P	4	G
13	4,59 ± 0,05	Solução Injetável L.P	4	G
14	4,49 ± 0,04	Solução Injetável L.P	4	G
15	4,31 ± 0,07	Solução Injetável L.P	4	G
16	4,47 ± 0,02	Solução Injetável L.P	4	G
17	4,22 ± 0,02	Solução Injetável L.P	4	G
18	4,45 ± 0,05	Solução Injetável L.P	4	G
19	4,29 ± 0,04	Solução Injetável L.P	4	G
20	1,05 ± 0,01	Solução Injetável L.A	1	G
21	1,12 ± 0,01	Solução Injetável L.A	1	G

**Cont. Tabela IV.8** - Teores médios (n = 6) de IVM nas amostras analisadas por padronização externa.

Amostra	IC (g 100 mL <sup>-1</sup> )	Formulação	CN (% m/v)	EF
22	1,10 ± 0,01	Solução Injetável L.A	1	G
23	1,19 ± 0,04	Solução Injetável L.A	1	G
24	1,08 ± 0,01	Solução Injetável L.A	1	G
26	1,00 ± 0,01	Solução Injetável	1	I
27	1,06 ± 0,02	Solução Injetável	1	I
28	1,06 ± 0,02	Solução Injetável	1	I
29	1,02 ± 0,01	Solução Injetável	1	I
30	0,98 ± 0,02	Solução Injetável	1	I
35	1,00 ± 0,03	Solução Injetável	1	J

EF) Empresa Farmacêutica; IC) Intervalo de Confiança; CN) Concentração Nominal; LP) Liberação Programada; LA) Longa Ação.

O intervalo de confiança (IC) com (P = 0,05) foi calculado através da equação **IV.8** (SKOOG *et al.*, 2006).

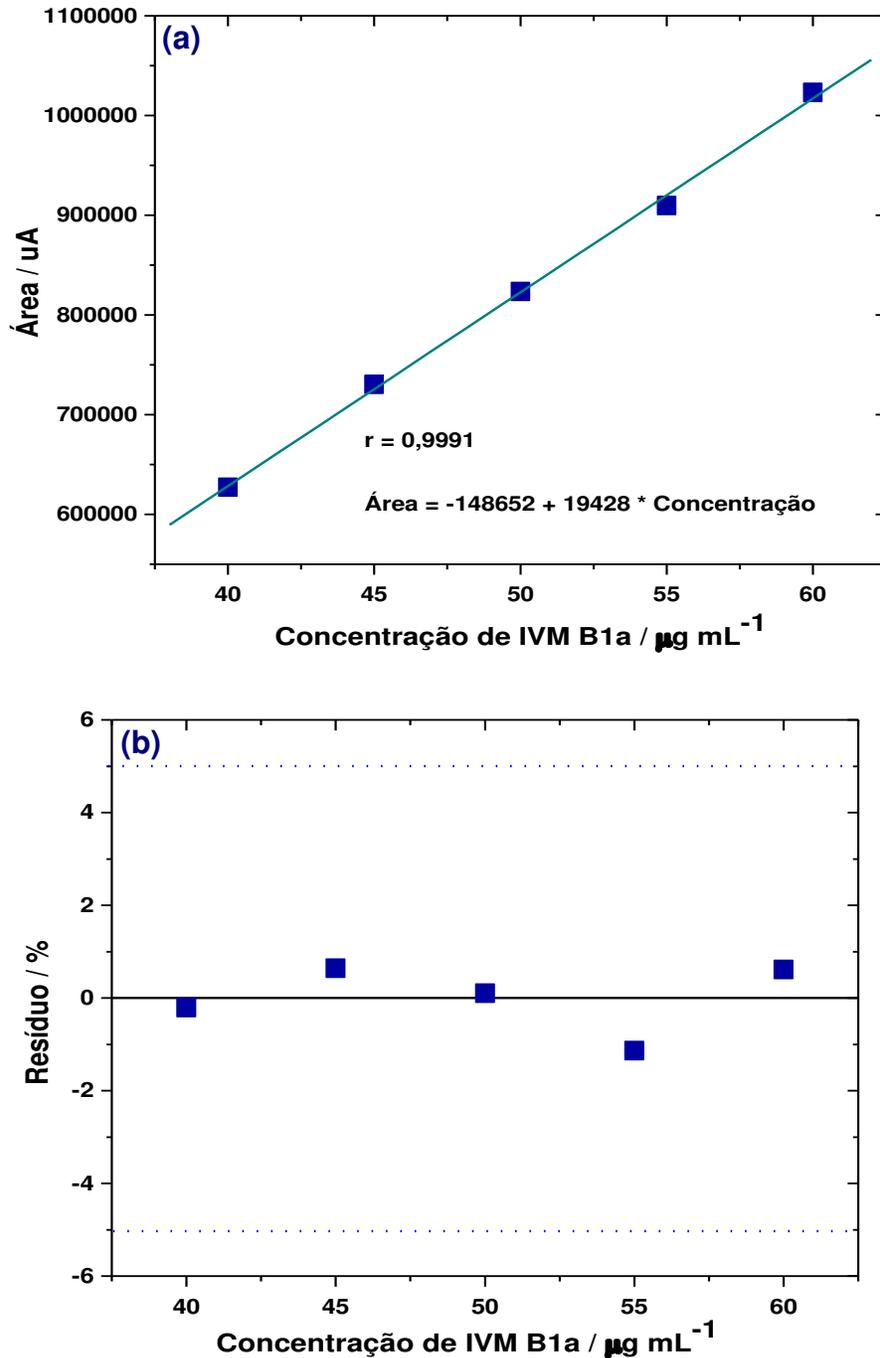
$$IC = \bar{x} \pm \left( \frac{ts}{\sqrt{n}} \right) \quad \text{(IV.8)}$$

Onde, “n” número de replicatas, “t” é o valor tabelado para “n-1” e “s” é a estimativa do desvio padrão.

Para as amostras 12 a 19 (solução injetável 4% m/v) estava disponível o excipiente da formulação. Para essas amostras foi construída uma curva na matriz do excipiente (**Figura IV.16**) e os teores de IVM foram calculados a partir desta curva, assim como também por padronização externa. O procedimento experimental está detalhado no *item III.1.3.6*.

É possível notar, ao comparar a inclinação (coeficiente angular) da curva analítica na matriz do excipiente **Figura IV.16** com a inclinação da curva analítica de trabalho - intervalo do método (**Tabela IV.14** do *item IV.3.5.2*) - que a matriz praticamente não influencia na sensibilidade do método. Os resultados obtidos pelas duas curvas analíticas foram comparados mediante teste “t” e foi verificado que a um nível de confiança de 95% que não existe diferença entre os mesmos ( $t_{\text{calculado}} = -0,43$  frente ao  $t_{\text{crítico}} = \pm 2,23$ ).

Esses resultados corroboram a ausência de efeito matriz nestas amostras.



**Figura IV.16** – (a) Curva analítica mediante fortificação – no intervalo de concentração de padrão IVM B1a de 40 a 60  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (Equação da reta e coeficiente de regressão linear (r) inseridos no gráfico); (b) gráfico de resíduos para a curva analítica na matriz.

### IV.3.6.2 - Análise de amostras usando o método de adição padrão

A quantificação de IVM nas amostras de medicamentos veterinários que apresentaram efeito matriz - recuperação fora do intervalo de 95 a 105 – foi realizada pelo método de adição padrão, conforme descrito no *item III.1.3.7.2*.

Apenas duas amostras do total de 31 amostras de medicamentos veterinários contendo IVM apresentaram recuperação fora do intervalo estabelecido pela Farmacopéia Britânica (**Tabela IV.9**) e, portanto, foram quantificadas pelo método de adição padrão (amostras 1 e 25). O resultado do teor médio ( $n = 3$ ) de IVM para essas amostras foram obtidos por extrapolação da curva de adição padrão e estão apresentados na **Tabela IV.10**.

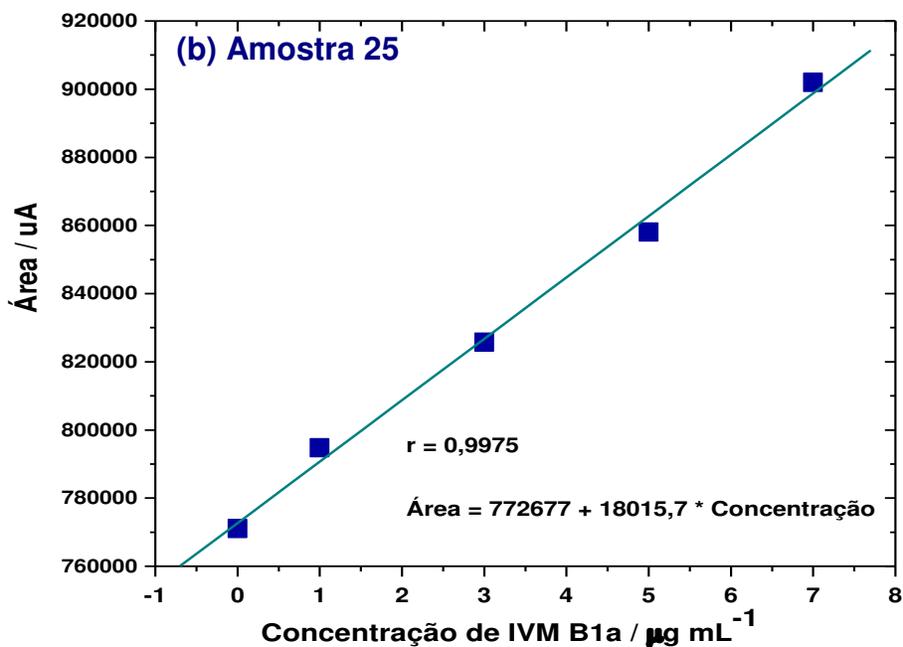
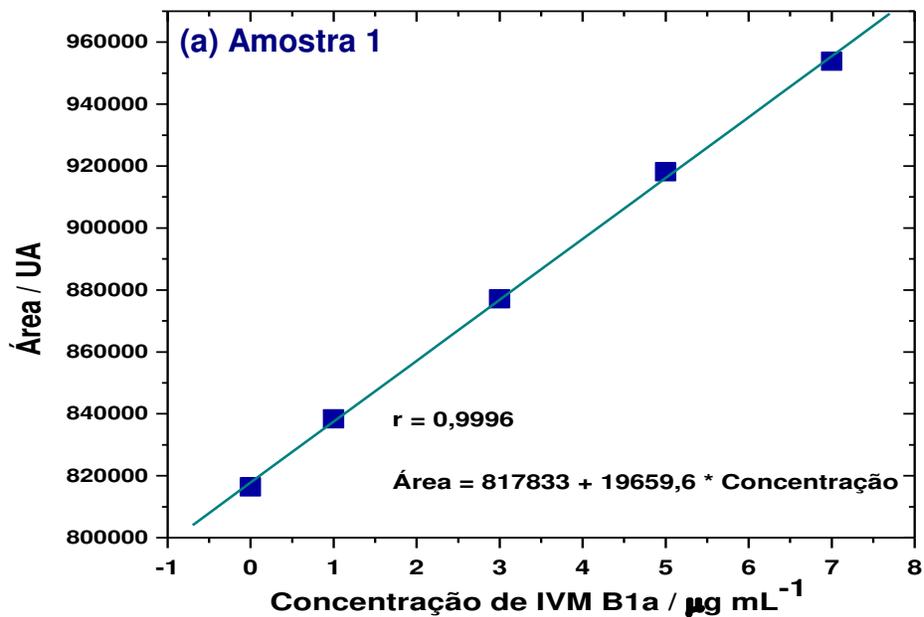
Na **Figura IV.17** estão apresentadas curvas de adição padrão levantadas para a análise das amostras 1 e 25 pelo método de adição padrão.

**Tabela IV.9** - Resultados do teste de recuperação realizado para as amostras que apresentaram efeito matriz (Amostras 1 e 25).

Amostra	Recuperação (%)	Formulação	Concentração Nominal (% m/v)	EF
1	96 – 101	Solução Injetável	1	A
25	97 – 100	Solução Injetável	1	H

**Tabela IV.10** - Teores médios ( $n = 3$ ) de IVM nas amostras analisadas pelo método de adição padrão.

Amostra	IC ( $\text{g } 100 \text{ mL}^{-1}$ )	Formulação	CN (% m/v)	EF
1	$0,91 \pm 0,04$	Solução Injetável	1	A
25	$0,91 \pm 0,08$	Solução Injetável	1	H

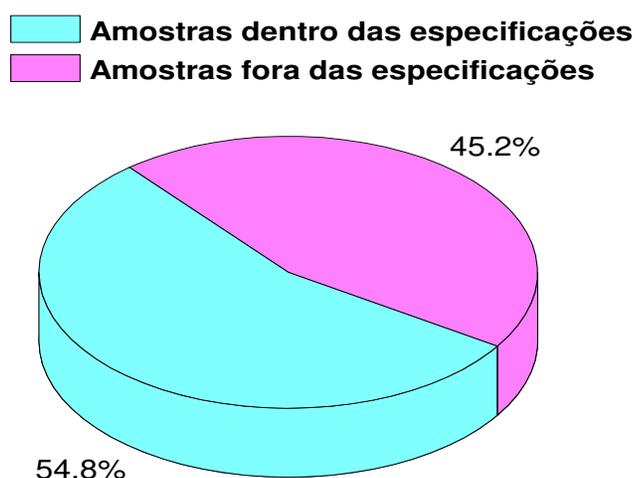


**Figura IV.17** - Curva de adição padrão (a) Amostra 1 e (b) amostra 25. Equações das retas e coeficientes de regressão linear ( $r$ ) estão inseridos nos respectivos gráficos.

O método de análise por adição padrão é necessário somente quando não se encontra disponível o excipiente das amostras (ANVISA, 2003).

É um procedimento moroso e, portanto, restringe o número de amostras a serem analisadas quando o procedimento é realizado na íntegra (triplicata). Essa impossibilidade de se analisar muitas amostras em um único dia, traz um obstáculo quando aplicado às indústrias, onde se requer diariamente a análise de um número muito grande de amostras. Ainda seu custo é superior se comparado ao método de padronização externa. Dessa forma o método de análise por adição padrão deve ser utilizado somente quando necessário.

Os resultados obtidos pelas análises, tanto por padronização externa quanto por adição padrão dos medicamentos veterinários contendo IVM como princípio ativo, indicam que 45,2% do total das 31 amostras analisadas contêm o teor de IVM fora das especificações, ou seja, fora do intervalo de 95 a 105% do valor nominal (**Figura IV.18**) (BRITISH PHARMACOPOEIA, 2009). Esses resultados indicam a necessidade do controle de qualidade dos medicamentos veterinários comercializados no Brasil.



**Figura IV.18** – Gráfico de porcentagem para a classificação das amostras dentro ou fora das especificações de acordo com os resultados obtidos pelo método cromatográfico.

### IV.3.7 – ENSAIOS DE IDENTIFICAÇÃO DE IVM B1a POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA

De modo geral, as monografias descritas nas farmacopéias apresentam um item que remete a um ensaio de identificação. Esse ensaio tem como objetivo verificar a presença do composto ativo na matéria prima e/ou no produto acabado.

Pela Farmacopéia Brasileira são considerados testes para identificação aqueles que utilizam métodos espectrofotométricos, cromatográficos, químicos e biológicos. A priorização dos testes deve seguir a seguinte seqüência: espectro no infravermelho, espectro no ultravioleta, cromatografia em camada delgada, picos em cromatografia líquida de alta eficiência ou cromatografia a gás, reações químicas características para grupos e funções e reações para íons.

Neste trabalho, foram realizados dois testes de identificação no produto acabado: espectro UV do pico cromatográfico referente a IVM e cromatografia em camada delgada (TLC). Os testes de identificação foram realizados conforme descrito no *item II.1.3.8*. Apesar da detecção utilizada pelo método HPLC ser também de caráter qualitativo, portanto, capaz de identificar a substância alvo do teste pela comparação entre seu espectro no UV com o espectro no UV de uma substância padrão certificada, o teste de identificação por TLC foi realizado, pois nesse trabalho foram seguidas as orientações da Farmacopéia Britânica que estabelece como teste de identificação a TLC para a identificação da IVM.

Os resultados do teste de identificação por TLC realizado para 12 amostras estão apresentados na **Tabela IV.11**.

**Tabela IV.11** – Fator de retardamento da IVM B1a nas amostras de medicamentos veterinários e no padrão de IVM B1a obtidos a partir dos cromatogramas do teste de identificação por TLC.

Placa	Padrão/Amostra	Formulação	Concentração	
			Nominal (% m/v)	R <sub>F</sub> (cm)
1	Padrão IVM B1a	-	-	0,68
	Amostra 1	Solução Injetável	1	0,69
	Amostra 2	Solução Injetável	1	0,69
	Amostra 3	Solução Injetável	1	0,70
	Amostra 4	Solução Injetável	1	0,71
2	Padrão IVM B1a	-	-	0,71
	Amostra 5	Solução Injetável	1	0,68
	Amostra 6	Solução Injetável	1	0,68
	Amostra 11	Solução Injetável	1	0,69
	Amostra 12	Solução Injetável L.P	4	0,70
3	Padrão IVM B1a	-	-	0,68
	Amostra 23	Solução Injetável L.A	1	0,67
	Amostra 25	Solução Injetável	1	0,68
	Amostra 26	Solução Injetável	1	0,68
	Amostra 35	Solução Injetável	1	0,70

R<sub>F</sub>) Fator de Retardamento

Os resultados do fator de retardamento (R<sub>F</sub>) foram calculados através da equação IV.9 (COLLINS *et al.*, 2006).

$$R_F = \left( \frac{d_r}{d_m} \right) \quad \text{(IV.9)}$$

Onde, “ $d_r$ ” corresponde à distância percorrida pela substância e “ $d_m$ ” a distância percorrida pela fase móvel (COLLINS *et al.*, 2006).

O resultado foi observado pela igualdade do fator de retardamento para IVM B1a no padrão com aqueles correspondentes a IVM B1a nas amostras.

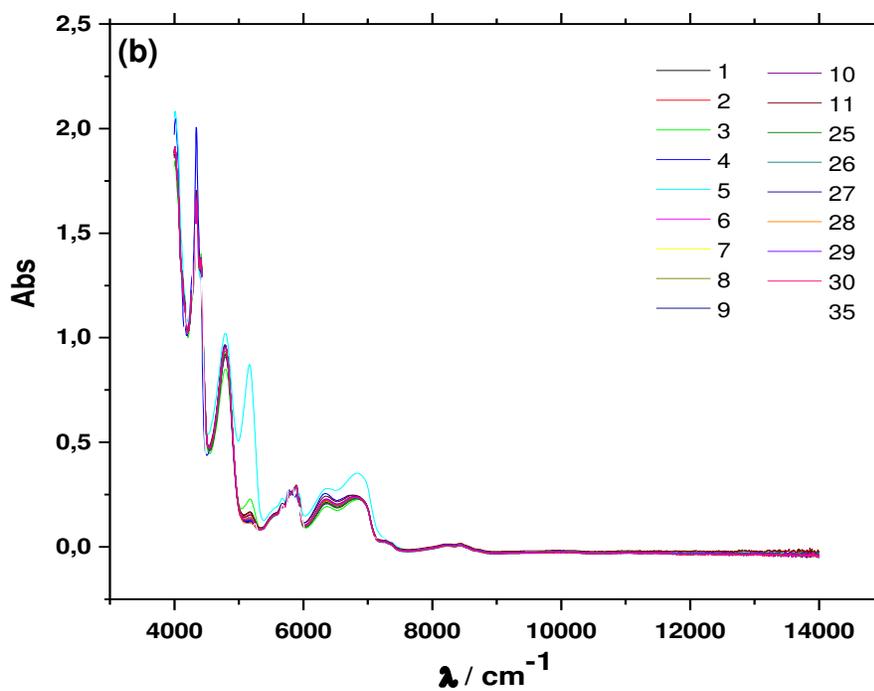
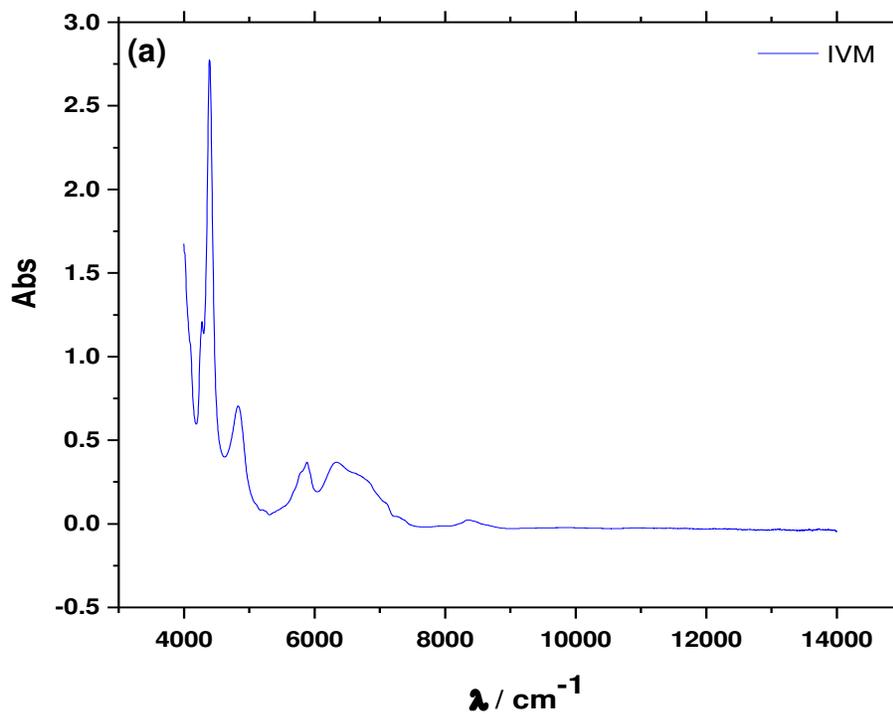
Em todas as amostras o teste de identificação deu resultado positivo, indicando a presença de IVM B1a nos medicamentos veterinários.

### **III.2 – ESTUDOS ESPECTROSCÓPICOS (NIR) - (Análise exploratória)**

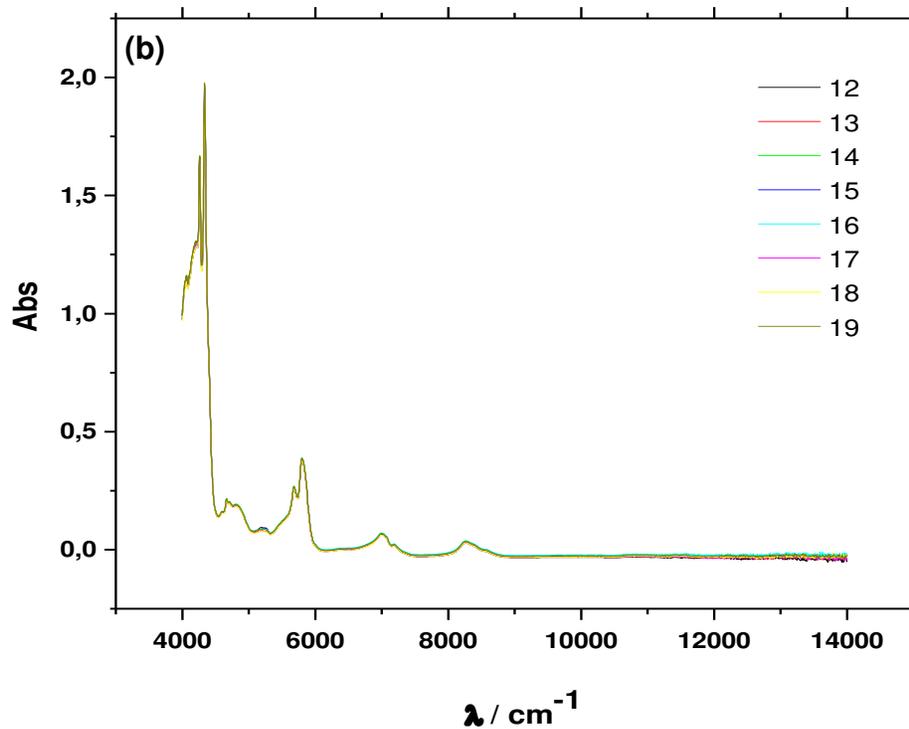
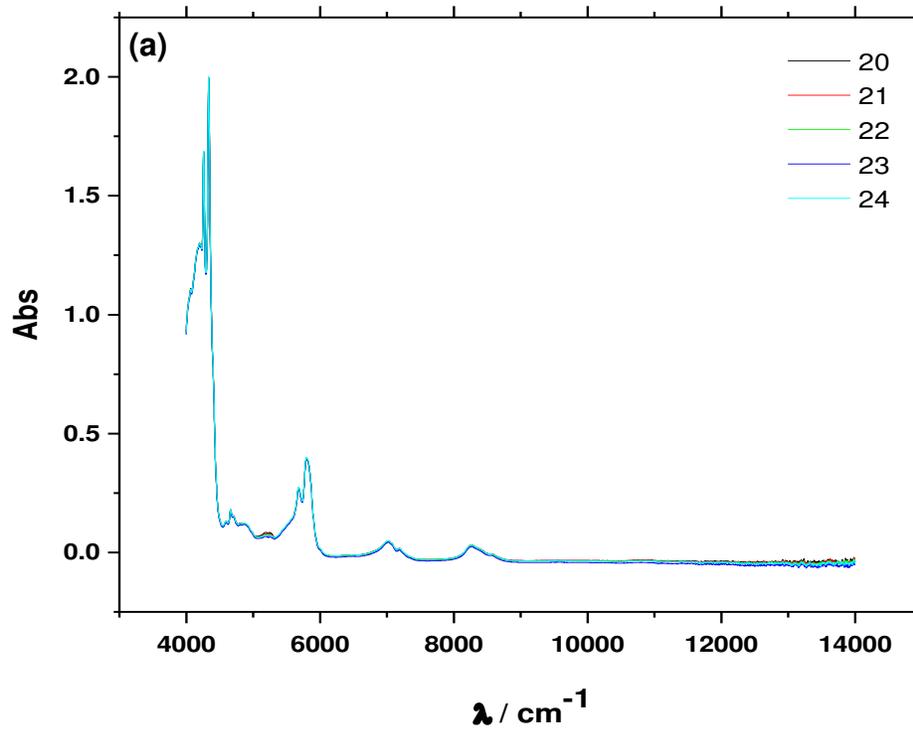
A técnica NIR é uma técnica não destrutiva e de rápida análise, o que faz com que seja uma técnica apropriada para diversas aplicações industriais. No entanto, para aplicação analítica faz-se necessário o emprego de ferramentas quimiométricas (LUYPAERT *et al.*, 2007; NICOLAI *et al.*, 2007), destacando a regressão por mínimos quadrados parciais (PLS) e análise de componentes principais (PCA) (CANDOLFI *et al.*, 1997; COZZOLINO *et al.*, 2006; WEBSTER, *et al.*, 2003). Conforme reportado na literatura, a espectroscopia NIR recentemente tem sido adotada e bem aceita dentro das indústrias farmacêuticas para processo de monitoramento e controle de qualidade dos produtos e atualmente, métodos analíticos baseados no NIR estão sendo utilizados na Europa e incorporados à Farmacopéia oficial (BLANCO *et al.*, 1998; JIANG *et al.*, 2010; REICH, 2005).

#### **IV.2.1 – DADOS ESPECTRAIS**

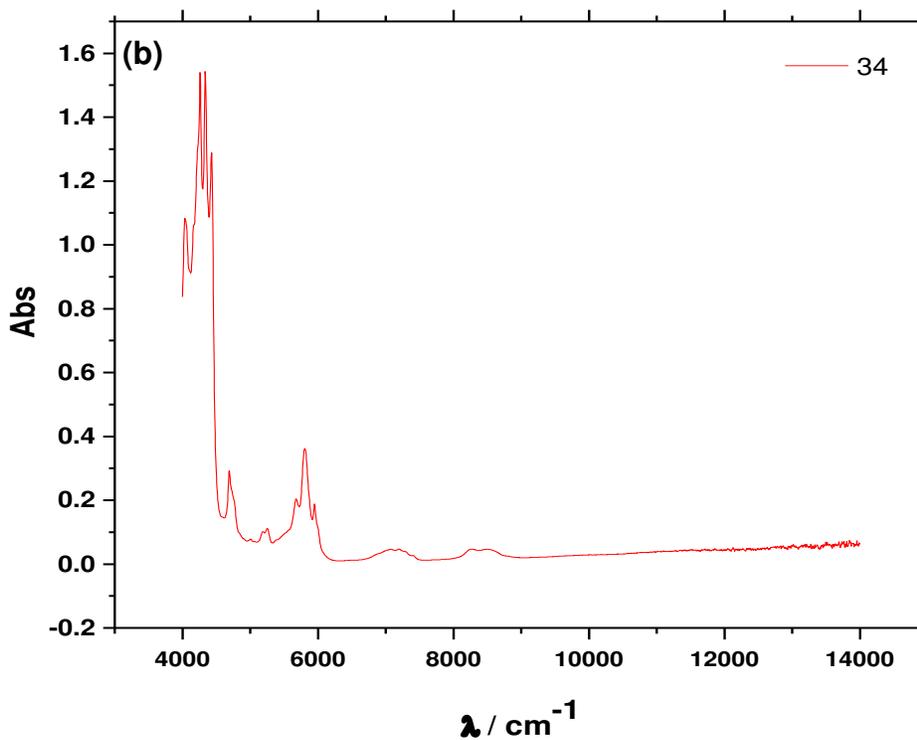
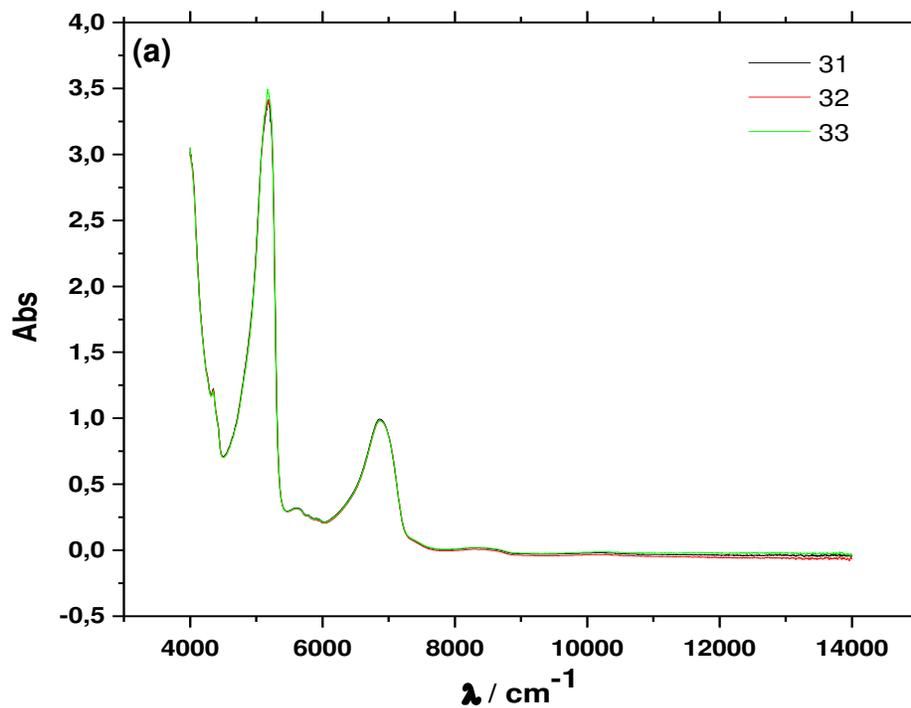
Inicialmente foram registrados espectros na região de 4000 – 14000  $\text{cm}^{-1}$ , utilizando, para tanto, soluções de IVM em metanol nas concentrações 100, 500, 1000, 2500, 5000, 10000 e 30000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , solução de ABM em metanol na concentração de 10000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , amostras de medicamentos veterinários de diferentes formulações (injetável 1% m/v, injetável 1% L.A m/v, injetável 4% L.P m/v, solução oral 0,08% m/v e injetável 3,5% L.P m/v) sem qualquer diluição e amostras preparadas nas concentrações de 0,5, 1, 2 e 3% m/v. Os espectros registrados para as amostras comerciais e para a solução do padrão de IVM a 30000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , estão apresentados na **Figura IV.19**, **Figura IV.20** e **Figura IV.21**.



**Figura IV.19** - Espectros na região do infravermelho próximo da **(a)** IVM em MeOH  $30000 \mu\text{g mL}^{-1}$  e **(b)** das amostras de solução injetável 1% m/v (1 a 11, 25 a 30 e 35).



**Figura IV.20** - Espectros na região do infravermelho próximo **(a)** amostras em solução injetável 1% L.A m/v (20 a 24) e **(b)** solução injetável 4% L.P m/v (12 a 19).



**Figura IV.21** - Espectros na região do infravermelho próximo das amostras **(a)** solução oral 0,08% m/v (31 a 33) e **(b)** solução injetável 3,5% L.A m/v (34).

Entre os comprimentos de onda de 4000 a 5130  $\text{cm}^{-1}$  é observada a região das bandas de combinação e de 4880 a 9525  $\text{cm}^{-1}$  a região de sobretom (primeira região de sobretom, 4878 a 6780  $\text{cm}^{-1}$  e, segunda região de sobretom, 6060 a 9525  $\text{cm}^{-1}$ ).

Ao comparar todos os espectros NIR das amostras com o do padrão de IVM em MeOH, pode-se notar que as mesmas regiões de combinação e de sobretom presentes de forma proeminente no espectro NIR do padrão de IVM em MeOH estão presentes de mesma forma nos espectros das amostras.

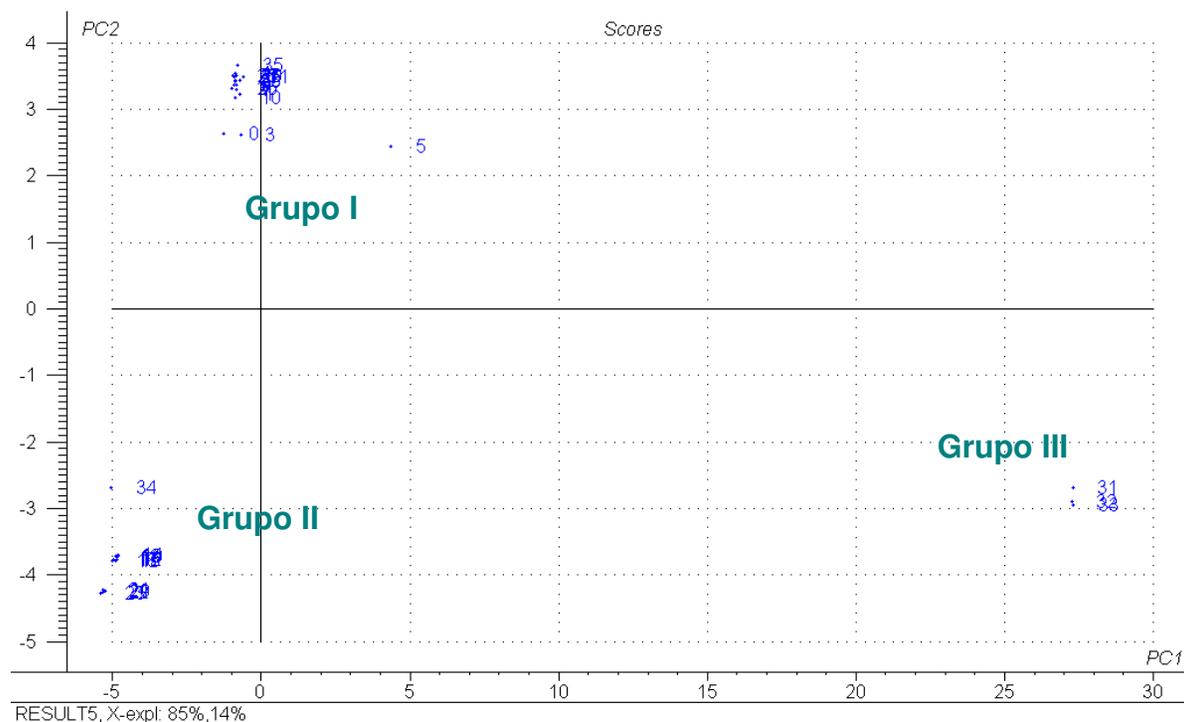
Ainda, os espectros NIR das amostras apresentam bandas de combinação e sobretons características para cada tipo de formulação que não estão presentes no espectro NIR do padrão de IVM em MeOH. Nos espectros NIR das amostras de medicamentos em formulação de solução injetável 1% m/v L.A, solução injetável 4% m/v L.P. e solução injetável 3,5% m/v L.P. (**Figura IV.20 e Figura IV.21(b)**) é verificada a grande semelhança entre o perfil espectral, o que sugere que essas amostras pertencem a uma mesma categoria e atribui-se esse agrupamento à possível semelhança na composição dos excipientes. As amostras de medicamento em solução oral 0,08% m/v apresentam banda característica da água ( $\cong 5155$  e  $\cong 6945 \text{ cm}^{-1}$ ) (**Figura IV.21(a)**).

Para a análise exploratória e construção do modelo de calibração multivariada foi utilizada a região de combinação na faixa de 4000 a 7657  $\text{cm}^{-1}$ .

## IV.2.2 – CLASSIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS POR PCA

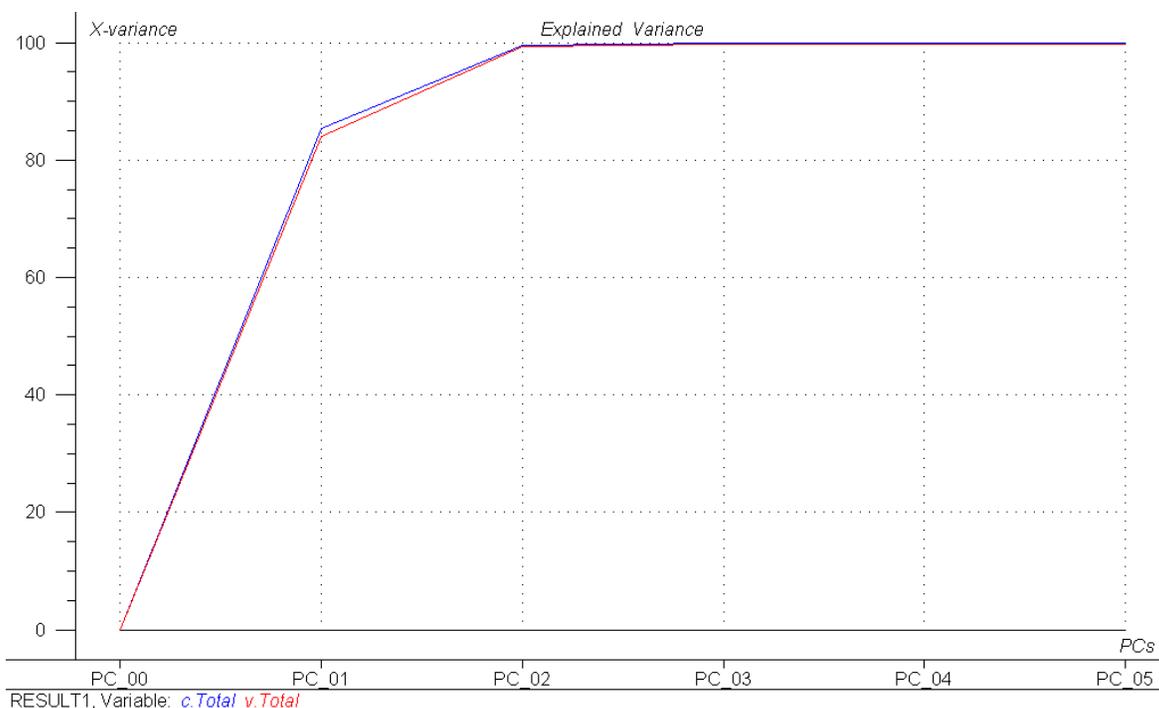
Com a finalidade de identificar padrões de informação entre as amostras foi realizada análise dos dados por PCA, onde foram selecionadas 950 variáveis (região dos espectros das amostras correspondente a faixa de 3996,0 – 7656,8  $\text{cm}^{-1}$ ), onde se observa as bandas de absorção de maior relevância para a construção do modelo de calibração. Um total de 35 amostras contendo IVM e uma amostra de ABM foram utilizadas para a construção do gráfico de PC1 vs

PC2, sem pré-tratamento dos dados espectrais (**Figura IV.22**). A amostra de abamectina (Amostra 0) foi empregada para verificar a possibilidade de discriminação da mesma entre as amostras contendo IVM como princípio ativo.



**Figura IV.22** - Gráfico de *scores* PC1 vs PC2 para os espectros de todas as amostras de medicamentos de ivermectina sem pré-tratamento.

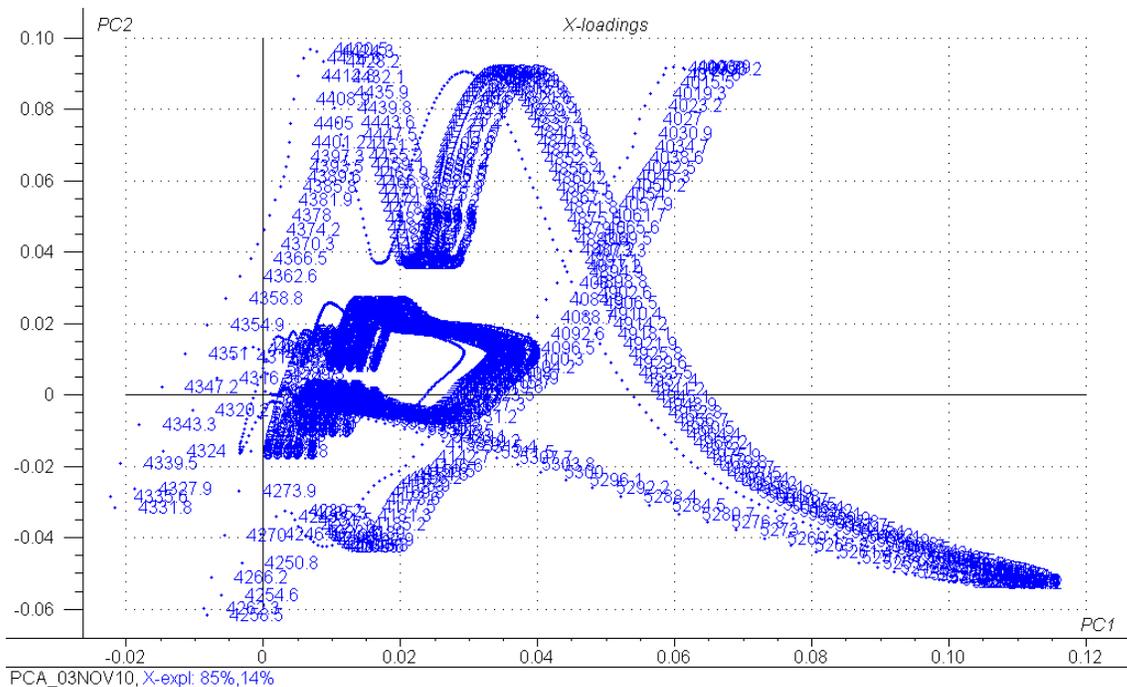
Foi verificado que com apenas duas componentes principais (PC – *principal components*), 99,0% da variância espectral puderam ser explicados (PC1 = 85% e PC2 14%) (**Figura IV.23**).



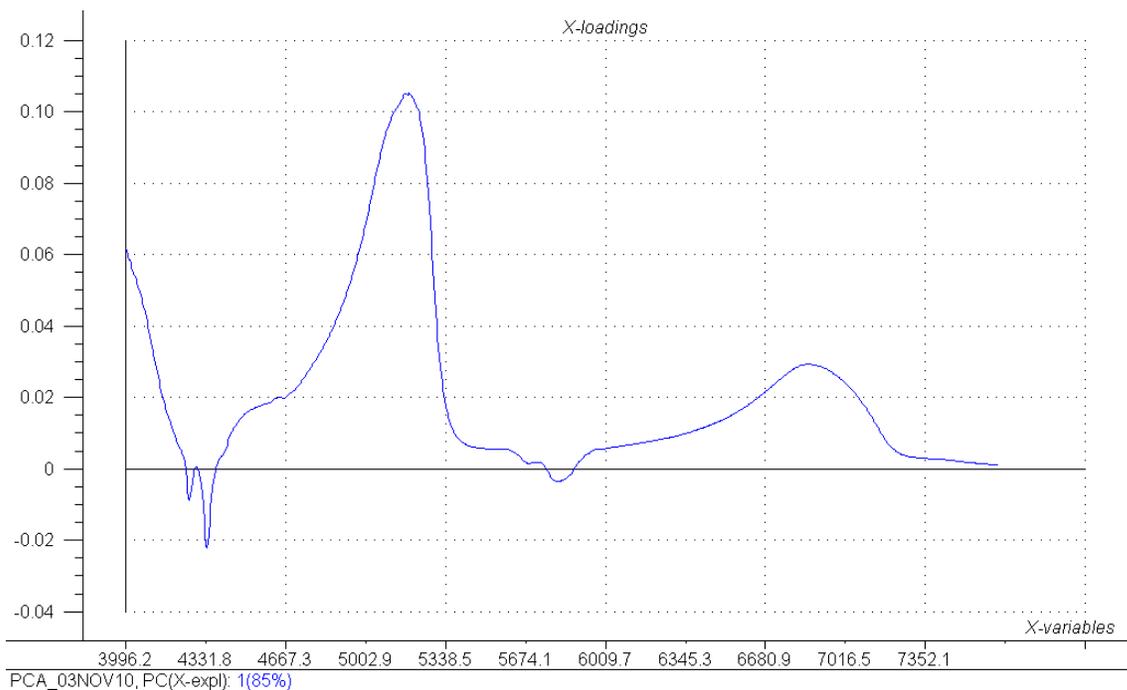
**Figura IV.23** - Gráfico da porcentagem de variância explicada por componente principal.

As amostras dos medicamentos foram classificadas em três grupos distintos e, considerando os dados conhecidos das amostras, foi constatado que o **grupo I** é representado por medicamentos em formulação de solução injetável 1% m/v, o **grupo II** por medicamentos em formulação de solução injetável 1% m/v L.A, solução injetável 4% m/v L.P. e solução injetável 3,5% m/v L.P. e o **grupo III** por medicamentos em formulação de solução oral 0,08% m/v. Ainda, ao investigar os grupos separadamente, foi notado que para todos os grupos existe uma tendência dos medicamentos se separarem de acordo com o laboratório de origem.

Através do gráfico de *loadings*, apresentado na **Figura IV.24**, pode ser verificado o conjunto de variáveis que mais contribuem para a discriminação das amostras em cada grupo. Ainda, na **Figura IV.25**, pode ser observado o peso para cada variável para essa discriminação.

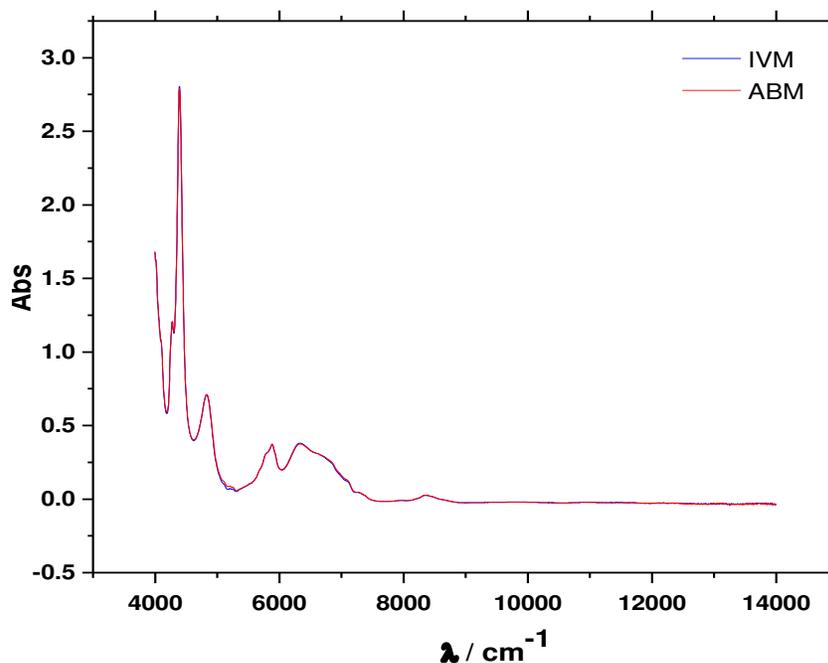


**Figura IV.24** - Gráfico de *loadings* para o conjunto de amostras obtidos para a PC1 vs PC2.



**Figura IV.25** - Gráfico de *loadings* do conjunto de amostras obtidos para a PC1 em função das variáveis.

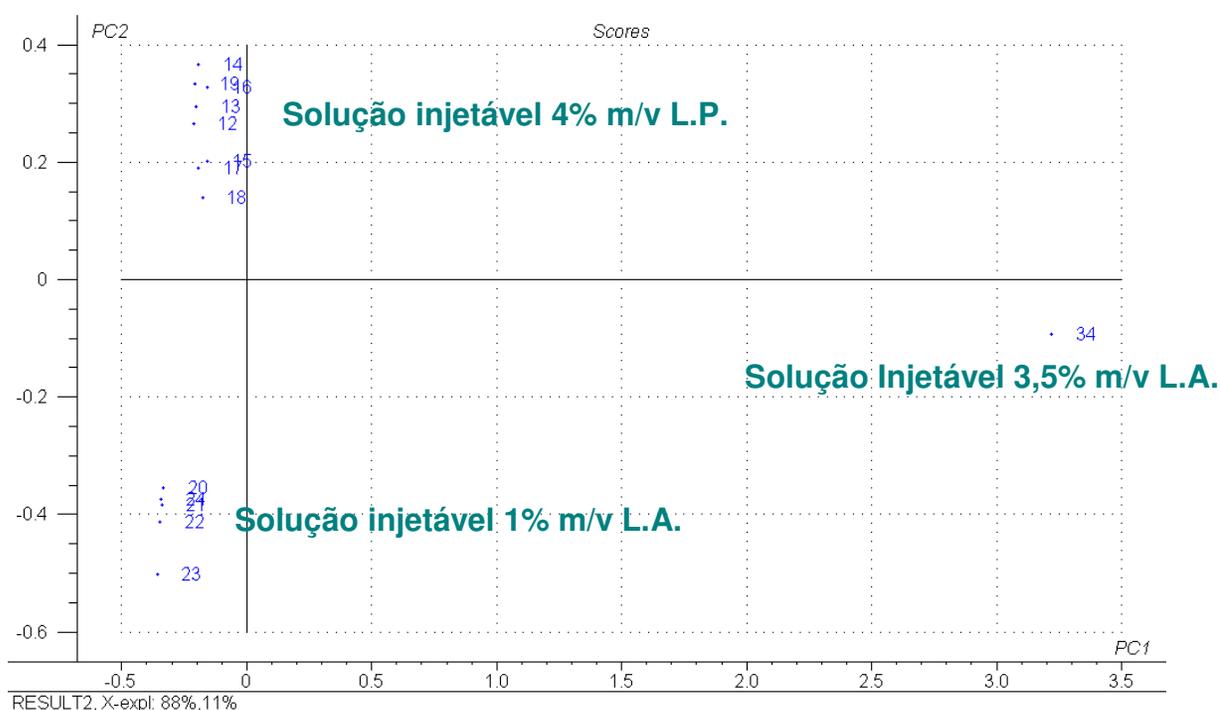
Não foi possível diferenciar a amostra de medicamento contendo abamectina das amostras de medicamentos com ivermectina como princípio ativo. Ao comparar os espectros na região do infravermelho próximo para os compostos, foi observado a semelhança do perfil espectral (**Figura IV.26**), ou seja, não seria possível discriminar os compostos nestas condições experimentais. Assim, encontrou-se para o método baseado em HPLC uma vantagem, pois, com este, uma possível adulteração dos medicamentos contendo IVM pela substituição do mesmo por ABM pode ser verificada pelo surgimento de um novo pico no cromatograma e ausência do pico característico da IVM.



**Figura IV.26.** Espectro na região do infravermelho próximo da IVM e ABM 10000  $\mu\text{g mL}^{-1}$  em MeOH.

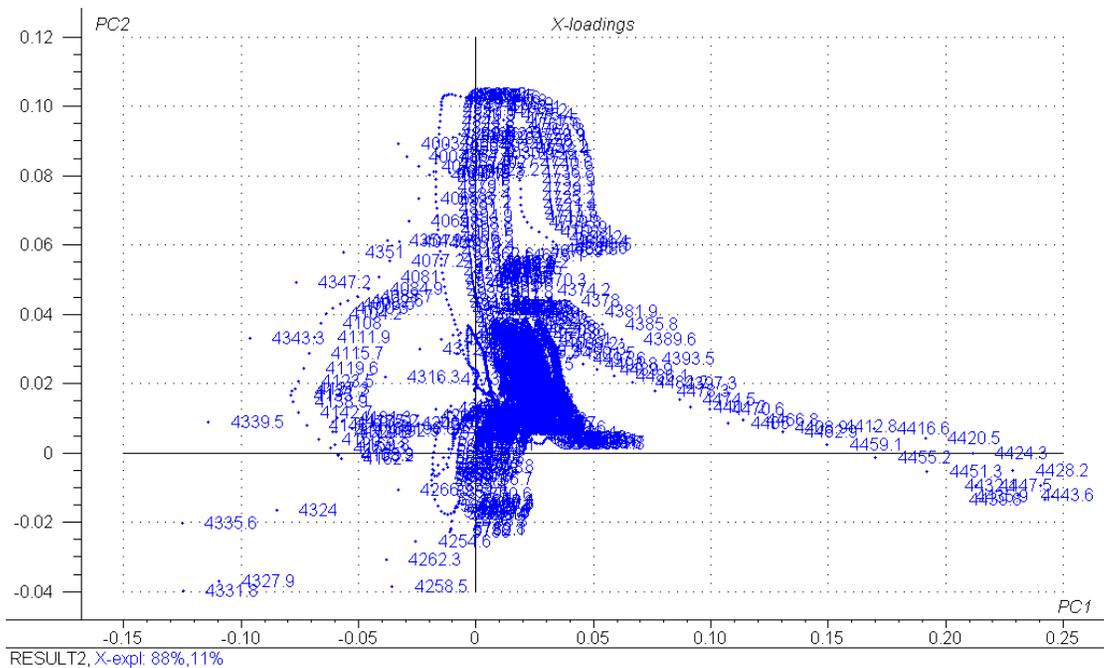
Ao fazer a análise dos dados do **grupo II** separadamente foi observado que as amostras se distribuíram em três subgrupos, IVM em solução injetável 1% m/v L.A., IVM em solução injetável 4% m/v L.P. e IVM em solução injetável 3,5% m/v

L.A. (**Figura IV.27**). Pelos resultados obtidos fica evidente que a técnica de espectroscopia no infravermelho próximo associada à PCA é uma ferramenta promissora para a classificação das amostras de medicamentos contendo IVM quanto sua concentração e formulação.

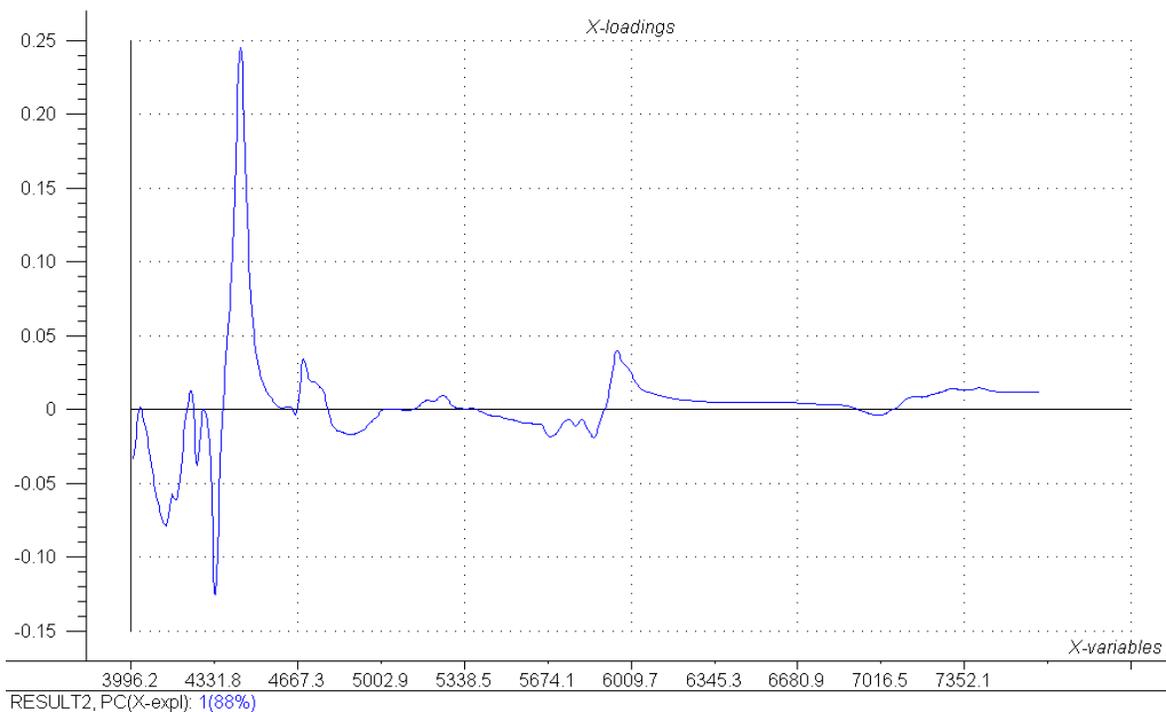


**Figura IV.27.** Gráfico de *scores* PC1 vs PC2 para os conjunto de dados do grupo II.

Através do gráfico de *loadings*, apresentado na **Figura IV.28**, pode ser verificado o conjunto de variáveis que mais contribuem para a discriminação das amostras em cada grupo. Ainda, na **Figura IV.29**, pode ser observado o peso para cada variável para essa discriminação.



**Figura IV.28** - Gráfico de *loadings* para o conjunto de amostras do grupo II obtidos para a PC1 vs PC2.

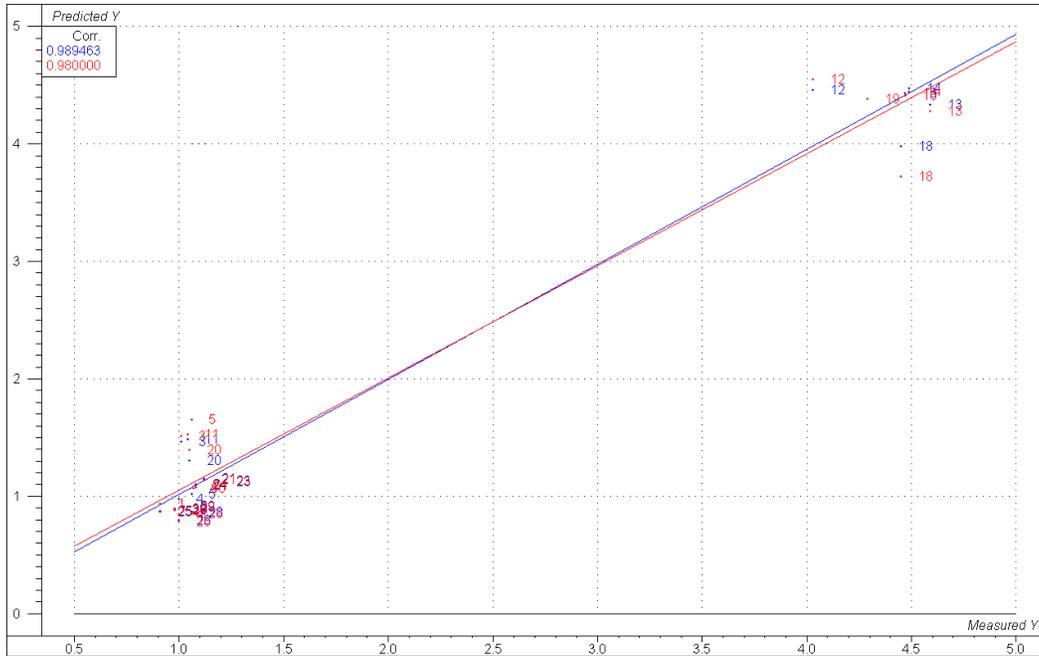


**Figura IV.29** - Gráfico de *loadings* do conjunto de amostras do grupo II obtidos para a PC1 em função das variáveis.

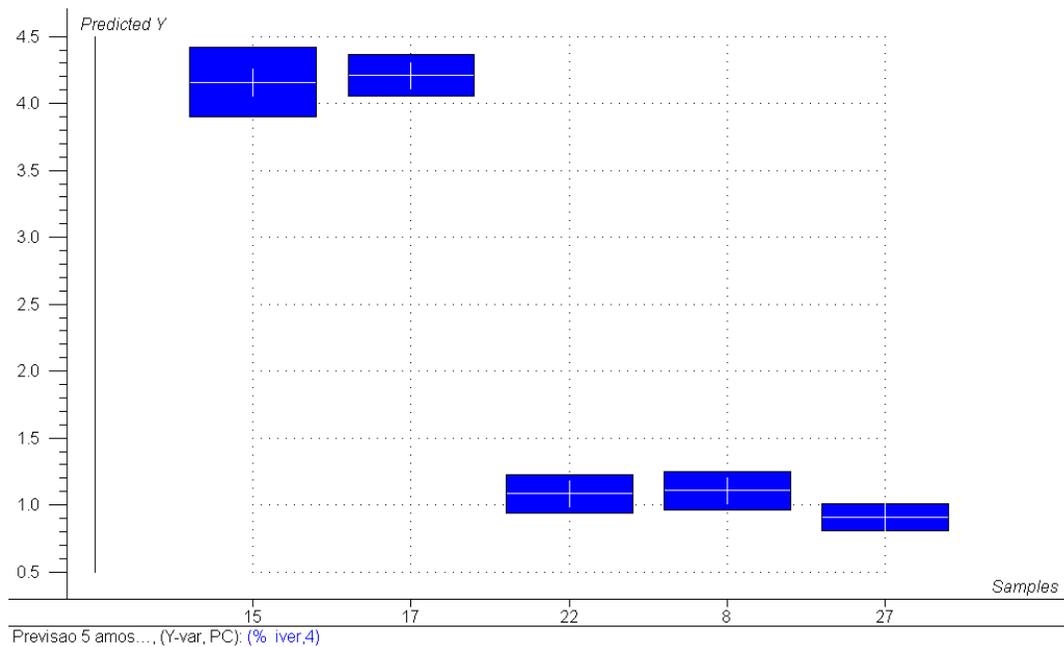
### IV.2.3 – AVALIAÇÃO DO MODELO NIR-PLS1 PARA QUANTIFICAÇÃO DO TEOR DE IVERMECTINA EM MEDICAMENTOS VETERINÁRIOS

Para avaliar o modelo NIR-PLS1 para a quantificação de IVM, foi realizada a regressão de dados por PLS-1 e construído um modelo de calibração por validação cruzada com 5 componentes principais para 25 amostras contendo IVM, amostras de 1 a 30 (**Figura IV.30**). A partir da observação do gráfico de *loadings* (**Figura IV.29**) para a classificação das amostras quanto sua concentração no grupo II, foram observadas as variáveis que mais contribuíram para essa discriminação. Assim, foram selecionadas 66 variáveis (região dos espectros no infravermelho das amostras correspondente a faixa espectral de 4104,2 a 4354,9  $\text{cm}^{-1}$ ). O valor da concentração de referência para todas as amostras de IVM foram os obtidos por meio do método cromatográfico, apresentados na **Tabela IV.8**.

Em seguida, foi construído um modelo de validação com 5 amostras (8, 15, 17, 22 e 27), contando com quatro componentes principais, para a previsão do teor de IVM nas mesmas usando o modelo de calibração. Na comparação dos resultados obtidos para as amostras do conjunto de validação por NIR-PLS1 com os resultados provenientes das análises cromatográficas, foi observado um erro relativo na faixa de 0,3 a 14,4 % (**Figura IV.31**).



**Figura IV.30** - Modelo de calibração NIR-PLS1 por validação cruzada com 5 componentes principais para as amostras de 1 a 30.



**Figura IV.31.** Gráfico do erro de previsão para as amostras de medicamento do conjunto de validação em relação aos resultados do método cromatográfico.

Das 5 amostras, apenas uma apresentou em erro relativo maior que 5%. De modo geral, considerando que o desvio apresentado na **Tabela IV.12** em todas as amostras previstas se apresentam inferior ao erro de previsão do modelo de calibração (RMSEP = 0,29 g 100 mL<sup>-1</sup>), foi verificado que os valores de previsão são próximos àqueles de referência. Portanto, apesar de ser pouco conclusivo por se tratar de um conjunto de calibração com apenas duas concentrações nominais, os resultados obtidos (**Tabela IV.12**) sugerem que o método de determinação do teor de IVM em medicamentos veterinários baseado no NIR e associado à quimiometria, tem potencial para atender aos propósitos das análises.

**Tabela IV.12** - Resultados para a IVM obtidos pela previsão das amostras do conjunto de validação pelo modelo de calibração NIR-PLS1 em comparação aos resultados obtidos pelo método cromatográfico.

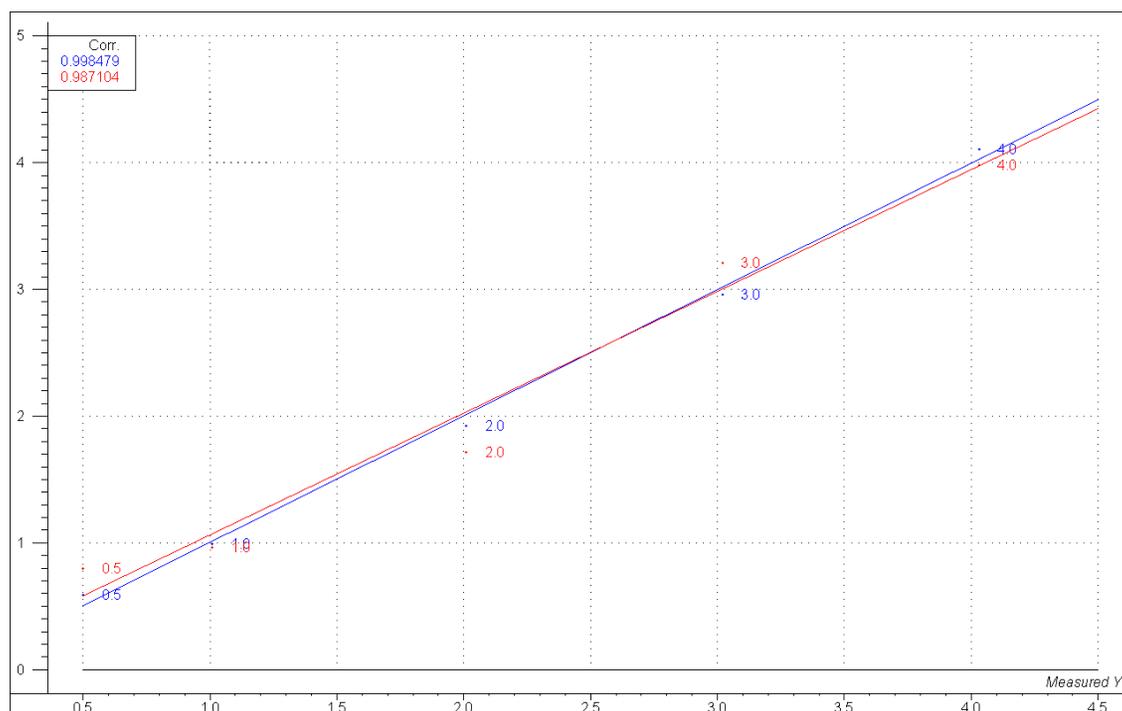
<b>Amostra</b>	<b>Previsão (g 100 mL<sup>-1</sup>)</b>	<b>Referência (g 100 mL<sup>-1</sup>)</b>	<b>Desvio (g 100 mL<sup>-1</sup>)</b>	<b>Erro de previsão (%)</b>
<b>8</b>	1,11	1,07	0,14	3,4
<b>15</b>	4,16	4,31	0,26	3,5
<b>17</b>	4,21	4,22	0,16	0,3
<b>22</b>	1,08	1,10	0,14	1,4
<b>27</b>	0,91	1,06	0,10	14,4

Na tentativa de validação de um modelo com mais concentrações do princípio ativo, foram preparadas amostras em concentrações de 0,5 a 4% m/v de IVM, a partir da diluição de uma amostra comercial de IVM 4% m/v em seu excipiente.

Para tanto foi realizado um pré-tratamento pela derivada para os espectros médios (100 varreduras) do excipiente, das amostras preparadas com 0,5, 1, 2 e 3% m/v de IVM e para a amostra 12 (IVM 4% m/v). Pela regressão dos dados por

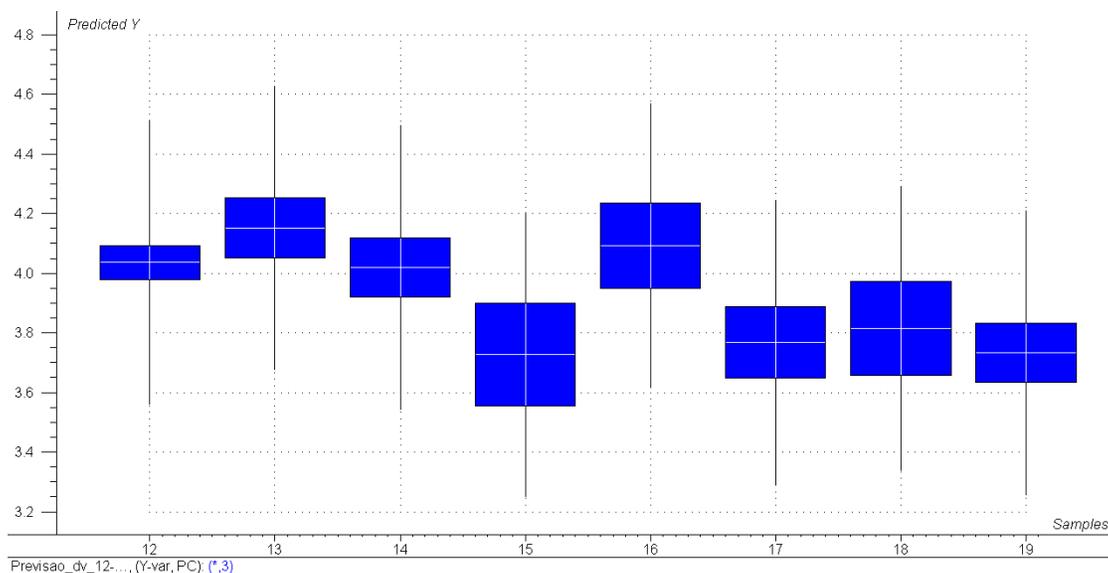
PLS-1 foi construído um modelo de calibração por validação cruzada com 3 componentes principais.

Foram selecionadas 101 variáveis (região dos espectros das amostras de 4061,7 a 4451,3  $\text{cm}^{-1}$ ), também levando em consideração o gráfico de *loadings* para a classificação das amostras quanto sua concentração no grupo II (**Figura IV.29**). O valor da concentração de referência para todas as amostras de IVM foram os obtidos pelo cálculo de diluição utilizando os resultado obtido para a amostra 12 pelo método cromatográfico, apresentado na **Tabela IV.8**. Em seguida, foi construído um modelo de validação com 8 amostras (12 a 19), contando com quatro componentes principais, para a previsão do teor de IVM nas mesmas usando o modelo de calibração (**Figura IV.32**).



**Figura IV.32** - Modelo de calibração NIR-PLS1 por validação cruzada com 3 componentes principais para as amostras sintéticas com 0,5, 1, 2 e 3% m/v de IVM e a amostra 12 (4% m/v).

Na comparação dos resultados obtidos para as amostras do conjunto de validação por NIR-PLS1 com os resultados provenientes das análises cromatográficas, foi observado um erro relativo na faixa de 0,25 a 14,2% (**Figura IV.33** e **Tabela IV.13**). Apesar de todos os desvios para as amostras do conjunto de validação se apresentarem inferiores ao erro de previsão para o modelo de calibração (RMSEP = 0,21 g 100 mL<sup>-1</sup>), foi observada proximidade entre os valores obtidos pelo método cromatográfico com os previstos pelo modelo multivariado NIR-PLS1 para apenas uma das 8 amostras, o que pode ser observado pelo erro de previsão inferior a 5% (**Tabela IV.13**). A amostra 12 foi utilizada para o preparo das demais amostras de concentrações decrescentes que deram origem ao modelo de calibração para a validação. Isso sugere que a matriz exerce forte influência na determinação de IVM pelo método NIR-PLS1 e que o excipiente não é reprodutivo para cada lote.



**Figura IV.33** - Gráfico do erro de previsão para as amostras de medicamento veterinário 4 % L.P m/v do conjunto de validação em relação ao método cromatográfico.

**Tabela IV.13** – Resultados para as amostras do conjunto de validação de medicamentos veterinários a 4% m/v L.P. através do conjunto de calibração NIR-PLS1, e erro de previsão em relação aos resultados obtidos pelo método cromatográfico.

<b>Amostra</b>	<b>Referência (g 100 mL<sup>-1</sup>)</b>	<b>Previsão (g 100 mL<sup>-1</sup>)</b>	<b>Desvio (g 100 mL<sup>-1</sup>)</b>	<b>Erro de previsão / %</b>
<b>12</b>	4,03	4,04	0,06	0,25
<b>13</b>	4,59	4,15	0,10	-9,6
<b>14</b>	4,49	4,02	0,10	-10,5
<b>15</b>	4,31	3,73	0,17	-13,4
<b>16</b>	4,47	4,09	0,14	-8,5
<b>17</b>	4,22	3,77	0,12	-10,6
<b>18</b>	4,45	3,82	0,16	-14,2
<b>19</b>	4,29	3,73	0,10	-13,0

Na tentativa de se construir um modelo de calibração multivariada com os dados dos espectros da IVM em MeOH grau HPLC, foram selecionadas as variáveis que mais contribuem para a explicação da variância na determinação do teor de IVM nas amostras de medicamento veterinário. No entanto, não foi observada uma relação linear entre os valores de previsão para a validação do modelo. Assim, não foi possível construir um modelo de calibração multivariada da IVM em metanol. É sugerido que o MeOH afeta ou mascara as variáveis que discriminam as amostras quanto suas concentrações.

Os resultados preliminares obtidos indicam a necessidade de estudos adicionais para avaliar com mais profundidade o efeito matriz.

---

---

# CONCLUSÕES

---

---



Medicamentos veterinários contendo ivermectina são comercializados no Brasil por mais de 50 empresas diferentes, o que evidencia o sucesso comercial que esses medicamentos tem tido no Brasil, assim como o seu amplo emprego como antiparasitário na criação de animais de grande porte, em particular animais destinados ao consumo humano.

Um dos pontos críticos na qualidade destes medicamentos é que o Brasil ainda não exerce fiscalização dos mesmos e não existe monografia descrita na Farmacopéia Brasileira para o doseamento de ivermectina nas formulações comercializadas no Brasil. Ainda, não existem dados disponíveis sobre a qualidade dos mesmos.

Neste trabalho foi desenvolvido e validado um método, empregando a cromatografia líquida de alta eficiência, para a quantificação de ivermectina em formulações injetáveis. Cabe ressaltar que é importante separar a ivermectina B1a e de seu homólogo B1b. Pelo estudo das condições ótimas para a separação da ivermectina B1a de seu homólogo B1b, foi observado que as duas colunas avaliadas são adequadas para a separação dos mesmos. Assim, não se faz necessário o emprego de uma coluna C18 capeada, o que reduz o custo para a aplicação do método. As melhores condições para a separação da Ivermectina B1a de seu homólogo foram obtidas com a fase estacionária Purospher® STAR RP-18e (55 mm x 4,0 mm, 3 µm) sob 30 °C, proporção MeOH:H<sub>2</sub>O 83:17 v/v, vazão 1,0 mL min<sup>-1</sup> com volume de injeção de 5 µL.

Para as formulações injetáveis o preparo de amostras consistiu apenas na dissolução do produto em metanol. O uso de ultrassom não foi necessário.

O método desenvolvido para quantificação de IV B1a em medicamentos veterinários foi validado, apresentando-se adequado frente à avaliação das figuras de mérito exigidas conforme sua finalidade. Comparado ao método cromatográfico

oficial, foi possível observar que o método desenvolvido apresenta maior simplicidade e requer menor tempo de análise.

A análise das amostras de medicamentos veterinários (31 ao total) em formulação injetável reforça a necessidade do controle de qualidade dos fármacos comercializados no Brasil, visto que os resultados apontam que aproximadamente 45% dos medicamentos analisados encontram-se fora das especificações de concentração informadas no rótulo do produto.

O método NIR associado às ferramentas quimiométricas PCA e PLS-1 mostrou algumas vantagens frente à cromatografia, pois, é rápido, não gera resíduos, não requer uso de solventes e dispensa o preparo de amostra. Porém, para ser desenvolvido, são requeridos os resultados do método cromatográfico.

Utilizando o PCA para a investigação de padrão nas informações dos espectros das amostras, foi possível discriminar as amostras quanto a sua formulação (solução injetável, solução injetável de longa ação e solução oral) e concentração (4% m/v e 1% m/v).

Utilizando o PLS-1, foi observada a potencialidade do método na determinação do teor de ivermectina nas mesmas, considerando que o erro de previsão das amostras de validação inferiores a 5% são aceitáveis.

---

---

REFERÊNCIAS  
BIBLIOGRÁFICAS

---

---



ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos, RE nº 899, de 29/05/2003. D.O.União, 02/06/2003. Disponível em ([http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899\\_03re.htm](http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm)). Acesso em: Fevereiro de 2010.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia para validação de métodos analíticos e controle de qualidade interna das análises de monitoramento do plano nacional de resíduos e contaminantes - PNCRC animal, 2009. Disponível em ([http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899\\_03re.htm](http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm)). Acesso em: Novembro de 2010.

AMAR - Jornal da Associação de Defesa do Meio Ambiente Araucária. Europa retém lote de carne bovina brasileira com Ivermectina, confirma ministério. Publicado dia 16/09/2010. Disponível em (<http://amarnatureza.org.br/site/europa-retem-lote-de-carne-bovina-brasileira-com-ivermectina-confirma-ministerio,69790/>). Acesso em: Novembro de 2010.

ABIEC - Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carnes. Exportação de carne bovina do Brasil. Disponível em (<http://www.abiec.com.br>). Acesso em: Dezembro de 2010.

ÅSBAKK, K.; BENDIKSEN, H.R.; OKSANEN, A. Ivermectin in reindeer feces: Determination by HPLC. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47: 999-1003, 1999.

BLANCO, M.; COELLO, J.; ITURRIAGA, H.; MASPOCH, S.; DE LA PEZUELA, C. Determination of ascorbic acid in pharmaceutical preparations by near infrared reflectance spectroscopy. *Talanta*, 40: 1671-1676, 1993.

BLANCO, M.; COELLO, J.; ITURRIAGA, H.; MASPOCH, S., DE LA PEZUELA, C. Near-infrared spectroscopy in the pharmaceutical industry. *Analyst*, 123: 135–150, 1998.

BRITISH PHARMACOPOEIA. Monographs: Medicinal and Pharmaceutical Substances: *Ph Eur Monograph 1336*, I & II: 3298-3304, 2009.

BRITO, N.M.; JUNIOR, O.P.A.; POLESE, L.; RIBEIRO, M.L. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão, *Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente*, 13: 129-146, 2003.

CAMPBELL, W.C.; FISHER, M.H.; STAPLEY, E.O.; ALBERS-SCHÖNBERG, G.; Jacob, T.A. Ivermectin: A potent new antiparasitic agent. *Science*, 221:832-828, 1983.

CANDOLFI, A.; MASSARTA, S.; HEUERDINGB, S. Investigation of sources of variance which contribute to NIR-spectroscopic measurement of pharmaceutical formulations. *Analytica Chimica Acta*, 345: 185-196, 1997.

CANGA, A.G.; PRIETO, A.M.S.; LIÉBANA, J.D.; MARTÍNEZ, N.F.; VEGA, M.S.; VIEITEZ, J.G. The pharmacokinetics and metabolism of ivermectin in domestic animal species. *The Veterinary Journal*, 179: 25-37, 2009.

CHASSEUR, J.C. On-line assay of cimetidine granules by near infrared reflectance spectroscopy. *Chimica Oggi*, 6: 21-24, 1987.

CIURCZAK, E.W., TORLINI, R.P., Analysis of solid and liquid dosage forms using near-infrared reflectance spectroscopy. *Spectroscopy*, 2: 41-43, 1987.

COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. Fundamentos de Cromatografia, 1<sup>a</sup> edição, Editora UNICAMP, Campinas-SP, 2006.

CORTI, P.; DREASSI, E.; CORBINI, G.; MONTECCHI, L.; PAGGI, J. Application of near infrared reflectance spectroscopy to pharmaceutical quality control. II. Assay of cloxacillin benzathine in creams. *Analisis*, 18: 117-121, 1990a.

CORTI, P.; DREASSI, E.; CORBINI, G.; LONARDI, S.; VIVIANI, R.; MOSCONI, L.; BERNUZZI, M. Application of near-infrared reflectance to the analytical control of pharmaceuticals. Assay of ranitidine hydrochloride and water content in tablets. *Pharmaceutica Acta Helvetiae*, 65: 28-32, 1990b.

CORN, P.; SAVINI, L.; DREASSI, E.; CERAMELLI, G.; MONTECCHI, L.; LONARDI, S. Application of NIRS to the control of pharmaceuticals identification and assay of several primary materials. *Pharmaceutica Acta Helvetiae*, 67: 57-61, 1992.

COZZOLINO, D.; PARKER, M.; DAMBERGS, R.G.; HERDERICH, M. Chemometrics and visible-near infrared spectroscopic monitoring of red wine fermentation in a pilot scale. *Biotechnology and Bioengineering*, 95: 1101-1107, 2006.

CPVS – Compêndio de Produtos Veterinários – SINDAN. Disponível em (<http://www.cpvs.com.br/cpvs/index.html>). Acesso em: Novembro de 2010.

DICKINSON, C.M. Improved high-performance liquid chromatographic method for quantitation of ivermectin in whole blood, serum or muscle tissue. *Journal of Chromatography*, 528: 250-257, 1990.

DRENNEN J.K.; LODDER R.A. Nondestructive near-infrared analysis of intact tablets for determination of degradation products. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 79: 622-627, 1990.

DANAHER, M.; HOLWELLS, L.C.; CROOKS, S.R.H.; CERKVENIK-FLAJS, V.; O'KEEFFE M. Review of methodology for the determination of macrocyclic lactone residues in biological matrices. *Journal of Chromatography B*, 844:175-203, 2006.

D.O.U - Diário Oficial da União. Seção 1, nº 128, Quarta-feira, 8 de Julho de 2009, Disponível em: (<http://www.in.gov.br/imprensa/visualiza/index.jsp?jornal=1&pagina=40&data=08/07/2009>). Acesso em: Setembro de 2010.

EC - European Commission; Official Journal of the European Communities, 17/08/2002, L221/8-36.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA, ANVISA. Disponível em: (<http://www.anvisa.gov.br/hotsite/farmacopeia/index.htm>). Acesso em: Abril de 2010.

FERREIRA, M.M.C.; ANTUNES, A.M.; MELGO, M.S.; VOLPE, P.L.O. Quimiometria I: calibração multivariada, um tutorial, *Química Nova*, 22: 724-731, 1999.

FRENICH A.G.; DEL MAR AGUILERA-LUIZ, M.; VIDAL, J.L.M.; ROMERO-GONZÁLEZ, R. Comparison of several extraction techniques for multiclass analysis of veterinary drugs in eggs using ultra-high pressure liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 661: 150–160, 2010.

GARCÍA-MAYOR, M.A.; GARCINUÑO, R.M.; FERNÁNDEZ-HERNANDO, P.; DURAND-ALEGRÍ, J.S. Liquid chromatography–UV diode-array detection method for multi-residue determination of macrolide antibiotics in sheep's Milk. *Journal of Chromatography A*, 1122: 76–83, 2006.

GEARY, T.G. Ivermectin 20 years on: maturation of a wonder drug. *Trends in Parasitology*, 21: 530-532, 2005.

GELADI, P. Chemometrics in spectroscopy. Part 1. Classical chemometrics. *Spectrochimica Acta Part B*, 58: 767–782, 2003.

GOKBULUT, C.; BILGILI, A.; HANEDAN, B.; AKSIT, D.; AKSOY, A.M.; TURGUT, C. Breed-related plasma disposition of ivermectin following subcutaneous administration in Kilis and Damascus goats. *Research in Veterinary Science*, 87:445-448, 2009.

GUPTA, R.C. Ivermectin and Selamycin. *Veterinary toxicology*, 45: 508-513, 2007.

HERNÁNDEZ-BORGES, J.; RAVELO-PÉREZ, L.M; HERNÁNDEZ-SUÁREZ, E.M.; CARNERO, A.; RODRÍGUEZ-DELGADO, M.A. Analysis of abamectin residues in avocados by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*, 1165: 52–57, 2007.

HSIEH, J.Y.K.; LIN, L.; FANG, W.; MATUSZEWSKI, K. Robotic sample preparation and HPLC determination of the major component of ivermectin in human plasma. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, 26: 895-910, 2003.

HOU, X.L.; WU, Y.; SHEN, J.; WANG, L.; DING, S. Multi-residue analysis of avermectins in bovine liver and muscle by liquid chromatography–fluorescence detector. *Chromatographia*, 65: 77-80, 2007.

HUANG, H.; YU, H.; XU, H.; YING, Y. Near infrared spectroscopy for on/in-line monitoring of quality in foods and beverages: A review. *Journal of Food Engineering*, 87:303–313, 2008.

INOUE, K.; YOSHIMI, Y.; HINO, T.; OKA, H. Simultaneous determination of avermectins in bovine tissues by LC-MS/MS. *Journal of Separation Science*, 32: 3596-3602, 2009.

ICH - International Conference on Harmonization. Validation of Analytical Procedures: Methodology, Q2B, Step 4, Consensus Guideline, 6 November 1996.

JIANG, Y.; DAVID, B.; TUA, P.; BARBINB, Y. Recent analytical approaches in quality control of traditional chinese medicines - A review. *Analytica Chimica Acta*, 657:9-18, 2010.

JIANG, H.; ZHOU, D.; LI, H.; XU, F.; LI, C.; SHEN, J.; LI, X.; DING, S. LC-fluorescence detection of abamectin, ivermectin, doramectin, and eprinomectin in rabbit feces. *Chromatographia*, 68, 2008.

KITZMAN, D.; WEI, S-Y.; FLECKENSTEIN, L. Liquid chromatographic assay of ivermectin in human plasma for application to clinical pharmacokinetic studies. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 40: 1013–1020, 2006.

KOLAR, L.; ERZEN, N.K.; HOGERWERF, L.; VAN GESTEL, C.A.M. Toxicity of abamectin and doramectin to soil invertebrates. *Environmental Pollution*, 151:182-189, 2008.

KOLBERG, D.I.S.; PRESTA, M. A.; WICKERT, C.; ADAIME M.B.; ZANELLA, R. Rapid and accurate simultaneous determination of abamectin and ivermectin in bovine milk by high performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal Of The Brazilian Chemical Society*, 20: 1220-1226, 2009.

KROGH, K.A.; BJÖRKLUND, E.; LOEFFLER, D.; FINK, G.; HALLING-SØRENSEN, B.; TERNES, T.A. Development of an analytical method to determine avermectins in water, sediments and soils using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1211: 60–69, 2008.

LI, M.; CHEN, Z.; LIN, X.; ZHANG, X.; SONG, Y.; WEN, Y.; LI, J. Engineering of avermectin biosynthetic genes to improve production of ivermectin in *Streptomyces avermitilis*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 18:5359-5363, 2008.

LI, J.S.; LI, X.W.; HU, H.B. Immunoaffinity column cleanup procedure for analysis of ivermectin in swine liver, *Journal of Chromatography B*, 696: 166-171, 1997.

LUYPAERT, J.; MASSART, D.L.; HEYDEN, Y.V. Near-infrared spectroscopy applications in pharmaceutical analysis. *Talanta*, 72: 865–883, 2007.

MATOS, G.D.; PEREIRA-FILHO, E.R.; POPPI, R.J.; ARRUDA, M.A.Z., Análise exploratória em química analítica com emprego de quimiometria: PCA e PCA de imagens. *Revista Analytica*, 6: 38-50, 2003.

MORGANO, M.A.; FARIA, C.G.; FERRÃO, M.F.; BRAGAGNOLO, N.; FERREIRA, M.M.C. Determinação de proteína em café cru por espectroscopia NIR e regressão PLS<sup>1</sup>. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 25: 25-31, 2005.

MELO, M.M.; De OLIVEIRA, N.J.F.; LAGO, L.A. Intoxicações causadas por pesticidas em cães e gatos. Parte II: amitraz, estricnina, fluoracetado de sódio e fluoracetamida, rodenticidas anticoagulantes e avermectinas. *Continuous Education Journal*, 5: 259-267, 2002.

MOLENTO, M. B. Resistência parasitária em helmintos de eqüídeos e propostas de manejo. *Ciência Rural*, 35: 1469-1477, 2005.

MOLINARI, G.; SOLONESKI, S.; REIGOSA, M.A.; LARRAMENDY, M. L. In vitro genotoxic and cytotoxic effects of ivermectin and its formulation ivomec® on Chinese hamster ovary (CHO<sub>K1</sub>) cells. *Journal of Hazardous Materials*, 165: 1074-1082, 2009.

NICOLAI, B.M.; BEULLENS, K.; BOBELYN, E.; PEIRS, A.; SAEYS, W.; THERON, K.I.; LAMMERTYN, J. Nondestructive measurement of fruit and vegetable quality by means of NIR spectroscopy: A review. *Postharvest Biology and Technology*, 46: 99-118, 2007.

O GLOBO, Economia. Brasil suspende exportação de carne bovina processada aos EUA. Publicado dia 28/05/2010. Disponível em (<http://oglobo.globo.com/economia/mat/2010/05/28/brasil-suspende-exportacao-de-carne-bovina-processada-aos-eua-916725742.asp>). Acesso em: Novembro de 2010.

OEHLER, D.D.; MILLER, J.A. Liquid chromatographic determination of ivermectin in bovine serum. *Journal - Association of Official Analytical Chemists*, 72: 59, 1989.

ÕMURA, S. Ivermectin: 25 years and still going strong. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 31: 91-98, 2008.

ÕMURA, S., CRUMP, A. The life and times of ivermectin - a success story. *Microbiology. Nature Reviews Microbiology*, 2: 984-989, 2004.

PACHOAL, J.A.R.; RATH, S.; AIROLDI, F.P. da S.; REYES, F.G.R. Validação de métodos cromatográficos para a determinação de resíduos de medicamentos em alimentos. *Química Nova*, 31: 1190-1198, 2008.

PASQUINI, C. Near infrared spectroscopy: Fundamentals practical aspects and analytical applications. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 14: 198-219, 2003.

PAYNE, L.D.; HICKS, M.B.; WEHNER, T.A. Determination of abamectin and/or ivermectin in cattle feces at low parts per billion levels using HPLC with fluorescence detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43: 1233-1237, 1995.

PECUARIA.com.br. UE barra carne processada do Bertin-JBS. Publicado dia 16/09/2010. Disponível em (<http://www.pecuaria.com.br/info.php?ver=9011>). Acesso em: Novembro de 2010.

PECUARIA.com.br. Japão detecta resíduo de ivermectina na carne. Publicado dia 26/10/2010. Disponível em (<http://www.pecuaria.com.br/info.php?ver=9248>). Acesso em: Novembro de 2010.

PIVNICHNY, J.V.; SIM, J.S.K.; ZIMMERMAN, L.A. Direct determination of avermectins in plasma at nanogram levels by high-performance liquid chromatography. *Pharmaceutical Science*, 72: 1447-1450, 1983.

R7, Economia. Europa barra entrada de 20 toneladas de carne brasileira. Publicado dia 16/09/2010. Disponível em (<http://noticias.r7.com/economia/noticias/europa-barra-entrada-de-20-toneladas-de-carne-brasileira-20100916.html>). Acesso em: Novembro de 2010.

RAICH-MONTIU, J., KROGH, K.A., GRANADOS, M., JÖNSSON, J.Å., HALLING-SØRENSEN, B. Determination of ivermectin and transformation products in environmental waters using hollow fibre-supported liquid membrane extraction and liquid chromatography–mass spectrometry/mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1187: 275–280, 2008.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Química Nova*, 27: 771-780, 2004.

REICH, G. Near-infrared spectroscopy and imaging: Basic principles and pharmaceutical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57: 1109-1143, 2005.

SANCHES, F.A.C. Desenvolvimento de uma Metodologia para o Controle de Qualidade de Medicamento Injetável, sem Violação da Ampola, usando Espectroscopia NIR e Técnicas Quimiométricas. 72p. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal da Paraíba (UFPB), Centro de ciências exatas e da natureza, Departamento de química, João Pessoa/PB, 2009.

SCHNITZERLING, H.J.; NOLAN, J. Normal phase liquid chromatographic determination of nanogram quantities of ivermectin in cattle blood or plasma. *Journal - Association of Official Analytical Chemists*, 68: 36-40, 1985.

SNYDER, L.R.; KIRKLAND, J.J. Introduction to modern liquid chromatography, 2<sup>a</sup> edição, John Wiley & Sons, New York, 1979.

SHABIR, G.A. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis. *Journal of Chromatography A*, 987: 57-66, 2003.

SHOOP, W.L., MROZIK, H., FISHER, M.H. Structure and activity of avermectins and milbemycins in animal health. *Veterinary Parasitology*, 59: 139-156, 1995.

SKOOG, D.A.; WEST, D.M.; HOLLER, F.J.; CROUCH, S.R. Fundamentos de Química Analítica, Tradução da 8<sup>a</sup> edição americana, Thomson, São Paulo, 2006.

SOUZA, S.V.C.; SILVA, G.; DINIZ, M.H.G.M.; SANTOS, E.V.; LIMA, J.A.; TEODORO, J.C. Determinação de resíduos de avermectinas em fígado bovino por cromatografia líquida de alta eficiência. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 23: 54-58, 2003.

SUN, Y.; DIAO, X.; ZHANG, Q.; SHEN, J. Bioaccumulation and elimination of ivermectin B<sub>1a</sub> in the earthworms (*Eisenia fetida*). *Chemosphere*, 60: 699-704, 2005.

TISLER, T.; ERZEN, N.K. Abamectin in the aquatic environment. *Ecotoxicology*, 15: 495-502, 2006.

THOMPSON, M.; ELLISON, S.L.R.; WOOD, R. Harmonized guidelines for single laboratory validation of methods of analysis. *Pure Applied Chemistry*, 74: 835-855, 2002.

TOQUIO DIGITAL, Economia. Empresa comenta sobre a Ivermectina detectada pelo Japão em produtos brasileiros. Publicado dia 12/10/2010. Disponível em ([http://www.toquiodigital.com/index.php?option=com\\_content&view=article&id=889:empresa-comenta-sobre-a-ivermectina-detectada-pelo-japao-em-produtos-brasileiros&catid=5:produtos&Itemid=16](http://www.toquiodigital.com/index.php?option=com_content&view=article&id=889:empresa-comenta-sobre-a-ivermectina-detectada-pelo-japao-em-produtos-brasileiros&catid=5:produtos&Itemid=16)). Acesso em: Novembro de 2010.

US-FDA - United States Food and Drug Administration. Center for Drug Evaluation and Research, Center for Veterinary Medicine, Department of Health and Human Services; Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation, May, 2001.

WEBSTER, G.K.; FARRAND, D.A.; JOHNSON, E.; LICHMAN, M.A.; BROAD, N.; MARIS, S. Use of near-infrared spectrometry for quantitative determinations of selamycin and moisture in topical formulations. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 33: 21-32, 2003.

WORKMAN, J.; KOCH, M.; VELTKAMP, D.J. Process Analytical Chemistry. *Analytical Chemistry*, 75: 2859-2876, 2003.

ZIÉMONS, E.; MANTANUS, J.; LEBRUN, P.; ROZET, E.; EVRARD, B.; HUBERT, Ph. Acetaminophen determination in low-dose pharmaceutical syrup by NIR spectroscopy. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 53: 510–516, 2010.