



DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA ESPECTROFOTOMÉTRICA PARA DOSEAMENTO DE MEBENDAZOL MATÉRIA-PRIMA E SUSPENSÃO ORAL

Development and validation and of spectrophotometrical analytical methodology for quantification of mebendazole raw material and oral suspension

**Ezequiane Machadom Silva ; Livia Teixeira Duarte ; Andrezza Lopes Sousa;
Daniella Ramos Martins; Larissa da Cunha Almeida;
Paula Izabella Rocha de Magalhães Pereira;
Clévia Ferreira Duarte Garrote; Maria Teresa Freitas Bara***

¹ Laboratório de Controle de Qualidade de Medicamentos (LCQM), Faculdade de Farmácia; Universidade Federal de Goiás, Av. Universitária com 1^o Avenida s/n, Setor Universitário CEP: 74605-220 - Goiânia – GO. Brasil.

*Autor para correspondência e-mail: mbara@farmacia.ufg.br

Recebido em 15/05/2008 - Aceito em 22/12/2008

RESUMO: O mebendazol é um fármaco que atua como anti-helmíntico de amplo espectro de ação contra nematóides e cestóides. Entre as metodologias utilizadas para sua determinação, destaca-se a possibilidade de determinação quantitativa de mebendazol por meio de métodos espectrofotométricos, por apresentarem boa sensibilidade e ter custos mais acessíveis. O presente trabalho teve como objetivo desenvolver e validar uma metodologia analítica para determinação deste fármaco em matéria-prima e suspensão oral, utilizando a espectrofotometria de ultravioleta. O método mostrou ser simples, rápido, específico, linear, exato, preciso e robusto para ser executado na rotina de um laboratório de controle de qualidade, sendo uma alternativa aos métodos utilizados.

PALAVRAS-CHAVE: controle de qualidade, análise farmacêutica, espectrofotometria.

ABSTRACT: The mebendazole is a drug that acts as anti-helminthic of broad spectrum of action against nematodes and cestodes. Among the methodologies used for their determination, highlights the possibility for quantitative determination of mebendazole is through methods spectrophotometrics, to have good sensitivity and have cost more accessible. This study aimed to develop and validate a method for analytical determination of mebendazole in raw material and in oral suspension, using the ultraviolet spectrophotometry. The method proved to be simple, rapid, specific, linear, accurate, precise and robust to run the routine of a laboratory of quality control, and is an alternative to methods used.

KEYWORDS: quality control, pharmaceutical analysis, spectrophotometry.

INTRODUÇÃO

O mebendazol é um derivado benzimidazólico (Figura 1) utilizado como anti-helmíntico com elevada eficácia e tolerabilidade, além de um amplo espectro de ação contra nematóides e cestóides (KATZUNG, 1998; SILVA, 2006).

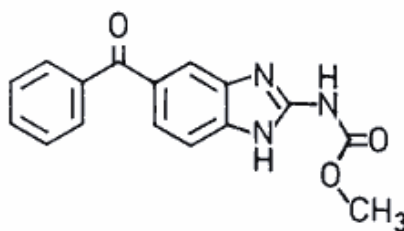


Figura 1 – Estrutura molecular do mebendazol

Dentre as atribuições de um laboratório de controle de qualidade destaca-se a garantia de que sejam feitas as validações necessárias, de procedimentos analíticos, calibração e qualificação dos equipamentos e vidrarias de precisão (LACHMAN et al., 2001; PINTO et al, 2003).

Uma validação visa demonstrar que o método é apropriado para a finalidade pretendida, garantindo por meio de estudos experimentais, que o método atenda aos parâmetros de especificidade, linearidade, intervalo, precisão, limite de detecção, limite de quantificação, exatidão e robustez adequados à análise (BRASIL, 2003).

A monografia do mebendazol – matéria-prima está presente na Farmacopéia Brasileira 4ª edição (2001), na qual o doseamento é feito por titulação em meio não aquoso. No entanto, considera-se que o método titulométrico possui menor sensibilidade e pode sofrer maior número de interferências quando comparado ao método espectrofotométrico. A Farmacopéia Brasileira 4ª Edição, 2005 descreve duas técnicas analíticas por espectrofotometria para suspensão oral de mebendazol, porém uma desta utiliza concentrações muito altas de ácido fórmico, o que a torna insalubre e de alta periculosidade para o analista. A outra técnica tem como desvantagem o uso de solventes orgânicos como isopropanol e clorofórmio (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2005). Além disso, ambas possuem etapa de extração líquido-líquido, que aumenta a possibilidade de interferências.

Este trabalho visou o desenvolvimento e validação de uma metodologia espectrofotométrica para o doseamento de mebendazol em matérias-primas e em suspensão oral, que seja uma alternativa mais viável à rotina de um laboratório de controle de qualidade.

MÉTODOS

Material e equipamento

Foram utilizadas mebendazol SQR (Farmacopéia Brasileira), mebendazol - matéria-prima e suspensão oral de mebendazol manipulada em farmácia com manipulação.

Os solventes utilizados possuíam grau analítico e foram utilizados ácido fórmico 99% (Vetec) e etanol absoluto grau UV/HPLC (JT Baker).

A vidraria utilizada foi certificada pela RBC (Rede Brasileira de Calibração).

Doseamento de Mebendazol matéria-prima e suspensão oral

Preparo do padrão:

Transferir 25 mg de padrão secundário de mebendazol para balão volumétrico de 25 mL.

Acrescentar 12 mL de ácido fórmico P.A. (99,0%) e solubilizar com agitação e/ou banho de ultrassom. Completar o volume com etanol P.A.

Transferir 1 mL desta solução para balão volumétrico de 100 mL e completar o volume com etanol P.A. Esta solução contém 0,01 mg/mL.

Preparo da amostra

Transferir o equivalente a 100 mg de mebendazol para balão volumétrico de 100 mL.

Acrescentar 12 mL de ácido fórmico P.A. (99,0%) e solubilizar com agitação e/ou banho de ultrassom.

Completar o volume com etanol P.A. Transferir 1 mL desta solução para balão volumétrico de 100 mL e completar o volume com etanol P.A.

Medir as absorbâncias das soluções resultantes (padrão e amostra) em 310nm, utilizando etanol para o ajuste do zero.

Calcular o teor de mebendazol na amostra a partir das leituras obtidas.

→ Cálculos:

$$T = \frac{C_p \times A_a \times 100}{C_t \times A_p}$$

Onde:

T = teor da amostra em porcentagem;
 C_p = concentração do padrão (mg/mL);
 A_a = absorvância da amostra;
 C_t = concentração teórica da amostra;
 A_p = absorvância do padrão.

Foram utilizados espectrofotômetros (B582/Micronal e Cary 50/Varian) e comprimento de onda de leitura de 310 nm. O ajuste do zero foi feito com etanol absoluto.

No estudo da validação do método para matéria-prima foram avaliados os parâmetros: especificidade, linearidade, precisão, limite de quantificação, limite de detecção, exatidão e robustez.

Os parâmetros avaliados na validação do método para o produto-acabado foram : especificidade, linearidade, intervalo, precisão (repetibilidade e precisão intermediária), exatidão e robustez.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O desenvolvimento de métodos analíticos empregados na avaliação de qualidade é de fundamental importância e colabora com as Boas Práticas de Fabricação, integrando os procedimentos relacionados com a Garantia da Qualidade (GIL, 2007).

Todo método desenvolvido e não descrito em farmacopéia ou formulários oficiais deve ser validado, sendo avaliados os seguintes parâmetros: especificidade, linearidade, intervalo, precisão, exatidão e robustez, quando se trata da quantificação do analito em formas farmacêuticas. Para este fim, outros documentos podem ser empregados, além do guia da ANVISA (BRASIL, 2003), tais como United States Pharmacopoeia - USP (2007), International Conference on Harmonisation – ICH Q2, (2005), Food and Drug Administration - FDA (1994), Instituto Nacional de Metrologia – INMETRO (2003), visando uma validação.

O desenvolvimento da metodologia analítica para substituir a análise titrimétrica constante na monografia da Farmacopéia Brasileira (2001) baseou-se inicialmente na solubilidade do fármaco em ácido fórmico e etanol (Farmacopéia Brasileira, 2005). Para tanto, demonstrou-se inicialmente a especificidade do método empregado na análise da matéria-prima, uma vez que o mesmo não sofreu interferência do solvente utilizado no comprimento de onda de detecção (310nm). Os espectros da varredura das soluções padrão e amostra foram idênticos, já o espectro da varredura do solvente não apresentou nenhum pico de absorção (Figura 2).

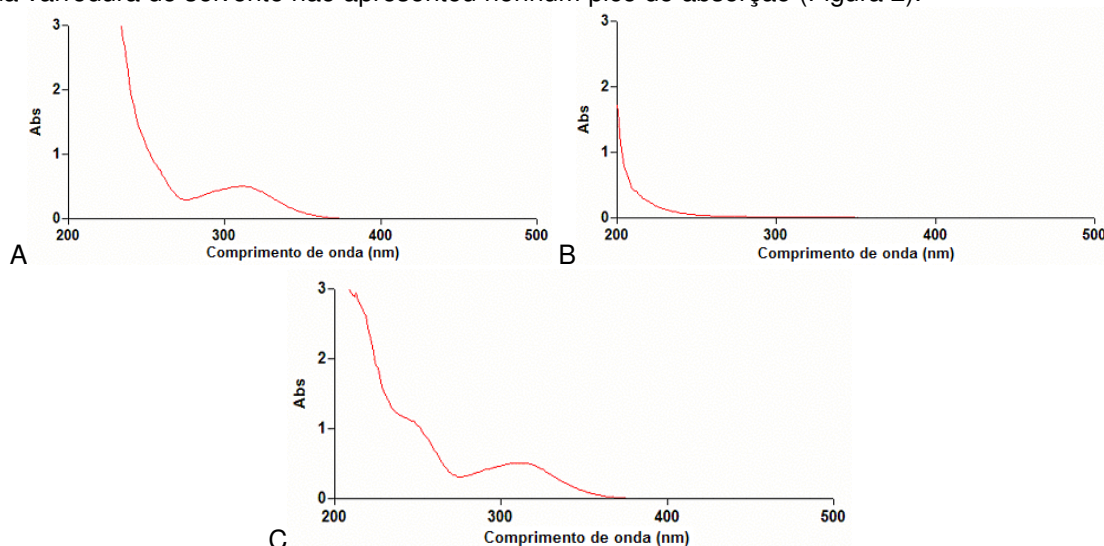


Figura 2 – Espectros de absorção do padrão (A), solvente (B) e amostra (C), respectivamente.

Os resultados para o parâmetro de linearidade (Figura 3) demonstraram que o método apresenta intervalo linear na faixa de 50 a 150%.

Curva de calibração mebendazol

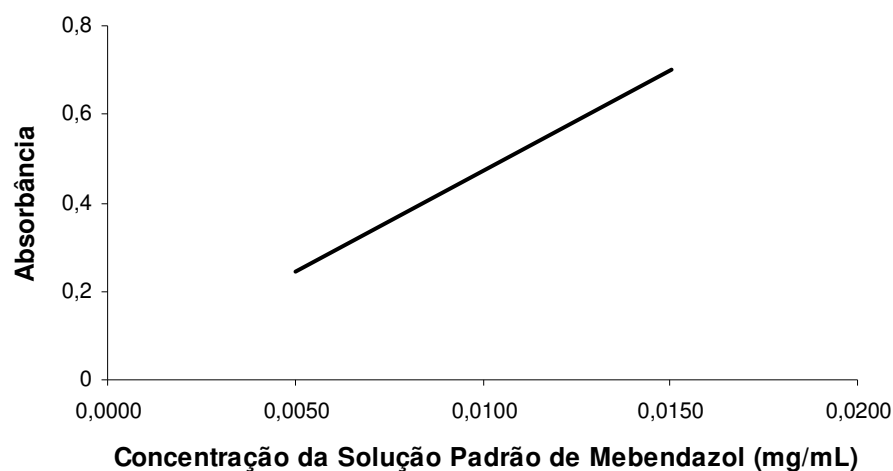


Figura 3 – Linearidade: $y = 45,155x + 0,0186$ $r = 0,99989$

O método apresentou-se preciso nos dois níveis avaliados (Tabelas 1 e 2), com coeficientes de variação (CV) inferiores ao especificado pela resolução vigente (5,0%), 0,82 e 1,3%, respectivamente para repetibilidade e precisão intermediária.

Tabela 1 – Resultados da Precisão (repetibilidade)

Determinações	Massas pesadas (mg)	Concentração teórica da amostra (mg/mL)	Concentração real da amostra (mg/mL)	Recuperação (%)	Absorbâncias
D_1	100,2	0,01002	0,01019	101,73	0,4789
D_2	100,3	0,01003	0,01035	103,20	0,4860
D_3	100,8	0,01008	0,01038	102,95	0,4872
D_4	100,4	0,01004	0,01026	102,19	0,4819
D_5	100,5	0,01005	0,01027	102,22	0,4825
D_6	100,5	0,01005	0,01014	100,88	0,4764
				Média	
				102,20	
				DP	
				0,839945672	
				DPR	
				0,821885964	

DP = desvio padrão DPR= desvio padrão relativo

Tabela 2 – Resultados da Precisão (intermediária)

Determinações	Massas pesadas (mg)	Concentração teórica da amostra (mg/mL)	Concentração real da amostra (mg/mL)	Teor (%)	Absorbâncias
D_1	100,1	0,01001	0,01006	100,49	0,4728
D_2	100,2	0,01002	0,01027	102,51	0,4824
D_3	100,3	0,01003	0,01030	102,71	0,4838
D_4	100,2	0,01002	0,01019	101,73	0,4789
D_5	100,0	0,01000	0,01030	103,00	0,4837

D_6	100,1	0,01001	0,00998	99,73	0,4694
				Média	
				101,70	
				DP	
				1,320066686	
				DPR	
				1,298046905	

DP = desvio padrão DPR= desvio padrão relativo

A exatidão do método foi outro parâmetro comprovado, sendo encontrados valores entre 97,38 e 103,88 para as três concentrações investigadas (Tabela 3).

Tabela 3 – Resultados da Exatidão

Determinações	Massas pesadas (mg)	Concentração teórica da amostra (mg/mL)	Concentração real da amostra (mg/mL)	Recuperação (%)	Absorbâncias	Média Recuperação (%)	DP	DPR	Recuperação (mg/mL)
D_1	50,1	0,00501	0,00486	96,98	0,2380				0,00485882
D_2	50,0	0,00500	0,00491	98,28	0,2405	97,3867	0,7781	0,80	0,004914184
D_3	50,1	0,00501	0,00485	96,89	0,2378				0,00485439
D_4	100,2	0,01002	0,01020	101,76	0,4790				0,010195992
D_5	100,3	0,01003	0,01036	103,24	0,4862	102,7610	0,8702	0,85	0,010355442
D_6	100,8	0,01008	0,01041	103,28	0,4887				0,010410807
D_7	150,2	0,01502	0,01562	104,01	0,7240				0,015621747
D_8	150,2	0,01502	0,01569	104,48	0,7272	103,88	0,6779	0,65	0,015692614
D_9	150,3	0,01503	0,01550	103,14	0,7186				0,015502159

DP = desvio padrão DPR= desvio padrão relativo

Os limites de detecção ($6,63 \times 10^{-5}$ mg/mL) e de quantificação ($2,21 \times 10^{-5}$ mg/mL) obtidos demonstram que o método é sensível.

O método foi robusto para variações de até 2 unidades no comprimento de onda e para variações da marca do espectrofotômetro. Os coeficientes de variação obtidos estão dentro dos limites preconizados (Tabela 4).

Tabela 4 – Resultados da robustez

Parâmetro	Absorvância	Média	Concentração real da amostra (mg/mL)	DP	DPR
λ (nm)	308	0,4765	0,477367	0,01016	0,005551
	310	0,4833			

	312	0,4723				
Equipamento	1	0,4833	0,479650	0,01021	0,005162	1,07617 6
	2	0,4760				

DP = desvio padrão DPR= desvio padrão relativo

O método quando empregado para análise da suspensão oral de mebendazol apresentou-se específico, pois foram observados picos de absorvância no comprimento de onda 310 nm para o padrão e a amostra, não sendo observado pico significativo na varredura da matriz (Figura 4).

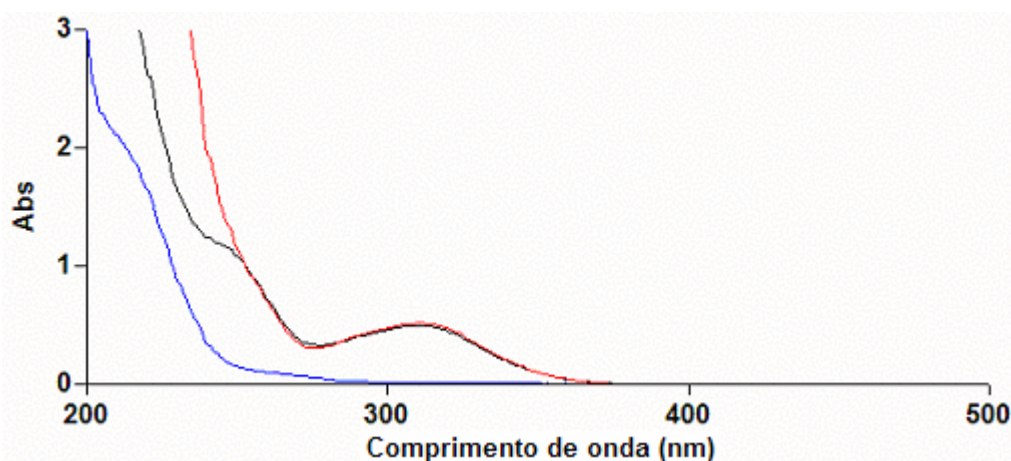


Figura 4: Espectros de absorção - Matriz (azul), amostra (preto) padrão (vermelho) de mebendazol

O intervalo linear para a análise da suspensão de mebendazol foi estabelecido entre as concentrações de 0,005mg/mL a 0,0151mg/mL (Figura 2).

O método proposto neste estudo demonstrou precisão e obteve-se um DPR de 2,27 para a repetibilidade e 2,12 para a precisão intermediária (Tabelas 5 e 6).

Tabela 5 – Resultados da Precisão (repetibilidade) – suspensão oral

Determinações	Massas pesadas (g)*	Volume equivalente (mL)	Equivalente em mg	Concentração teórica da amostra (mg/mL)	Concentração real da amostra (mg/mL)	Recuperação (%)	Absorbâncias
D_1	6,3880	5,027546041	100,5509208	0,01006	0,01032	102,63	0,4846
D_2	6,3447	4,993467653	99,86935306	0,00999	0,01055	105,66	0,4951
D_3	6,3874	5,027073823	100,5414765	0,01005	0,01000	99,45	0,4701
D_4	6,3404	4,990083425	99,8016685	0,00998	0,01008	101,03	0,4739
D_5	6,3832	5,023768298	100,475366	0,01005	0,01006	100,09	0,4727
D_6	6,3422	4,991500079	99,83000157	0,00998	0,01000	100,20	0,4703

Média

DP

2,311435766

DPR
2,277007852

*Densidade (g/mL) : 1,270597612. DP = desvio padrão DPR= desvio padrão relativo
A densidade foi empregada para transformar a massa pesada em volume da suspensão oral.

Tabela 6 – Resultados da Precisão (intermediária) – suspensão oral

Determinações	Massas pesadas (g)*	Volume equivalente (mL)	Equivalente em mg	Concentração teórica da amostra (mg/mL)	Concentração real da amostra (mg/mL)	Recuperação (%)	Absorbâncias
D_1	6,5088	5,122619235	102,4523847	0,01025	0,00991	96,73	0,4661
D_2	6,5643	5,166299386	103,3259877	0,01033	0,01023	99,00	0,4805
D_3	6,4936	5,110656383	102,2131277	0,01022	0,01031	100,88	0,4842
D_4	6,4741	5,095309303	101,9061861	0,01019	0,01018	99,86	0,4781
D_5	6,4109	5,045569023	100,9113805	0,01009	0,01029	101,94	0,4831
D_6	6,4099	5,044781993	100,8956399	0,01009	0,01035	102,57	0,4859

Média

DP

2,12995894

DPR

2,126505067

*Densidade (g/mL): 1,270597612. DP = desvio padrão DPR= desvio padrão relativo
A densidade foi empregada para transformar a massa pesada em volume da suspensão oral.

A exatidão do método foi comprovada através dos percentuais de recuperação encontrados entre 95,71 e 100,69% nas três concentrações analisadas (Tabela 7).

Tabela 7 – Resultados da exatidão – suspensão oral

Determinações	Massas pesadas (g)	Volume equivalente (mL)	Equivalente (mg)	Concentração teórica da amostra (mg/mL)	Concentração real da amostra (mg/mL)	Recuperação (%)	Absorbâncias	Média Recuperação (%)	DP
D_1	3,1900	2,48055988	49,6112	0,00496	0,00472	95,17	0,2318	95,709	1,2440
D_2	3,3543	2,60832037	52,1664	0,00522	0,00507	97,13	0,2474		
D_3	3,1791	2,47208398	49,4417	0,00494	0,00469	94,82	0,2303		
D_4	6,3874	5,02707382	100,5415	0,01005	0,00999	99,36	0,4697	100,095	0,7131
D_5	6,3404	4,99008343	99,8017	0,00998	0,01006	100,79	0,4728		
D_6	6,3422	4,99150008	99,8300	0,00998	0,01000	100,14	0,4700		
D_7	5,8861	5,05157913	151,5474	0,01515	0,01543	101,80	0,7152	100,69	1,3586
D_8	5,8761	5,04299691	151,2899	0,01513	0,01500	99,17	0,6961		
D_9	5,8611	5,03012358	150,9037	0,01509	0,01526	101,10	0,7075		

DP = desvio padrão

A robustez do método foi comprovada, os resultados demonstram que as variações de até 2 unidades no comprimento de onda e variações da marca do espectrofotômetro não interferem no método analítico (Tabela 4).

O método proposto neste estudo para análise de suspensão oral de mebendazol apresenta como vantagens a utilização de quantidades 10 vezes menores de ácido fórmico, não tem a etapa de partição líquido-líquido, em relação ao método farmacopéico (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2005) e utiliza somente etanol como solvente orgânico, que é menos agressivo ao ambiente e à saúde do analista.

CONCLUSÕES

O método proposto neste estudo é válido para o doseamento de mebendazol matéria-prima e suspensão oral - para a formulação estabelecida - por apresentar os parâmetros de validação adequados à análise em questão, sendo uma alternativa aos métodos descritos nas monografias da Farmacopéia Brasileira 2001 e 2005.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Resolução – RE n° 899, de 29 de Maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Brasília, 2003.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA, Parte II, 3º Fascículo, 4. ed. São Paulo: Atheneu Editora, 2001

FARMACOPÉIA BRASILEIRA, Parte II, Sexto Fascículo, 4. ed. São Paulo: Atheneu Editora, 2005

GIL, E.S. *Controle de qualidade físico-químico de qualidade de medicamentos*. Pharmabooks. 2ª edição. 2007

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL – INMETRO. DOQ-CGCRE-008: Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos. Brasil, 2003. Disponível em: <http://www.inmetro.gov.br>. Acesso em 10 set. 2007.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION (ICH) Q2. Validation of analytical procedures: text and methodology, 2005. Disponível em: <http://www.ich.org>. Acesso em 29 set. 2007

KATZUNG, B. G. *Farmacologia básica e clínica*. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 1998.

LACHMAN, L.; HANNA, S. A.; LIN, K. Controle e Garantia de Qualidade. In: LACHMAN, L.; LIEBERMAN, H. A.; KANING, J. L. *Teoria e Prática na Indústria Farmacêutica*. Volume II. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2001. Cap. 27. p.799-1104.

PINTO, T. J. A.; KANECO, T. M.; OHARA, M. T. *Controle Biológico de Qualidade de Produtos Farmacêuticos, Correlatos e Cosméticos*. 2 ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2003. p. 219- 258.

SILVA, P. *Farmacologia*. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2006

UNITED STATES. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration. Reviewer Guidance: validation of chromatographic methods, 1994. Disponível em <http://www.fda.gov/cder>. Acesso em 02 ago.2007.

UNITED STATES PHARMACOPEIA – The National Formulary – 30th edition, NF 25, Rockville: The United States Pharmacopeial Convention, 2007.