UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos
Área de Produção e Controle Farmacêuticos

Validação dos sistemas computadorizados empregados na determinação dos enantiômeros do nadolol e dos homólogos da ivermectina e da abamectina

Grazielle Prado Alexandre

Tese para obtenção do título de DOUTOR

Orientadora: Profª. Titular Maria Inês Rocha Miritello Santoro

São Paulo
2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos
Área de Produção e Controle Farmacêuticos

Validação dos sistemas computadorizados empregados na determinação dos enantiômeros do nadolol e dos homólogos da ivermectina e da abamectina

Grazielle Prado Alexandre

Versão corrigida da Tese conforme resolução CoPGr 6018.
O original encontra-se disponível no Serviço de Pós Graduação da FCF/USP

Tese para obtenção do título de
DOUTOR

Orientadora: Profª. Titular Maria Inês Rocha Miritello Santoro

São Paulo
2016

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Alexandre, Grazielle Prado
A381va Validação dos sistemas computadorizados empregados na determinação dos enantiômeros do nadolol e dos homólogos da ivermectina e da abamectina / Grazielle Prado Alexandre. -- São Paulo, 2016.
190p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Farmácia
Orientador : Santoro, Maria Inês Rocha Miritello

1. Cromatografia em líquido de alta eficiência : Análise química : Farmacologia 2. Fármaco : Controle de qualidade I. T. II. Santoro, Maria Inês Rocha Miritello, orientador.

615.19015 CDD

Grazielle Prado Alexandre

Validação dos sistemas computadorizados empregados na determinação dos enantiômeros do nadolol e dos homólogos da ivermectina e da abamectina

Comissao Julgadora
Tese para obtenção do título de DOUTOR

Profª. Titular Maria Inês Rocha Miritello Santoro
Orientador/Presidente

_____
1º. examinador

_____
2º. examinador

_____
3º. examinador

_____
4º. examinador

São Paulo, _____ de _____.

" O que eu faço, é uma gota no meio de um oceano.

Mas sem ela, o oceano será menor."

Madre Teresa de Cálcuta

Agradeço a Deus que me conduziu e tornou este sonho realidade. Pela sua presença e força.

A família pelo apoio e compreensão

AGRADECIMENTOS

À Professora Titular Maria Inês Rocha Miritello Santoro, sinceros agradecimentos pelos seus ensinamentos, por toda compreensão e carinho no decorrer desta jornada, não poderia explicar em palavras tudo que ela fez por mim, minha eterna gratidão e carinho.

À Professora Érika R. M. Kedor-Hackmann, pelas sugestões e contribuições no transcorrer desta jornada.

À Professora Maria Segunda A. Prado, pelo apoio, pelas suas contribuições e ensinamentos.

Ao Professor Anil Kumar Singh, por suas contribuições e ensinamentos.

Aos colegas do Laboratório que contribuiram no desenvolvimento deste trabalho.

Aos funcionários do serviço de Pós-graduação por todo auxílio.

A todos aqueles que de uma forma ou outra, contribuíram para a realização deste trabalho.

.

SUMÁRIO

RESUMO 22
ABSTRACT 24

1.INTRODUÇÃO..... 25

2. REVISÃO DA LITERATURA..... 29

2.1 ESTEREOQUÍMICA..... 29
2.1.1 Quiralidade e farmacodinânica..... 34
2.1.2 Quiralidade e farmacocinética..... 35
2.2 NADOLOL..... 35
2.2.1 Característica do fármaco 35
2.3 COMPOSTOS HOMÓLOGOS..... 37
2.4 IVERMECTINA..... 38
2.4.1 Característica do fármaco 38
2.5 ABAMECTINA 39
2.5.1 Característica do fármaco 39
2.6 Metodologia analítica 41
2.7 TÉCNICAS ANALÍTICAS 52
2.7.1 Cromatografia em fase líquida de alta eficiência (CLAE) 52
2.7.1.1 Cromatografia em fase líquida de alta eficiência (CLAE) aplicada a análise de enantiômeros..... 54

2.7.2 Eletroforese capilar 56

2.5.3 Dicroísmo circular para identificação dos enantiômeros do nadolol 58

2.5.4 Difração de Raios X para avaliação do nadolol matéria-prima 59

3. OBJETIVOS..... 60

4. MATERIAL E MÉTODOS..... 61
4.1 Material..... 61
4.1.1 Reagentes..... 61

4.1.2 Padrões analíticos..... 61
4.1.3 Amostras..... 62
4.1.3.1 Ivermectina..... 62
4.1.3.2 Abamectina..... 62
4.1.3.3 Nadolol..... 62
4.1.4 Equipamentos..... 62
4.2 MÉTODOS ANALÍTICOS..... 64
4.2.1 CROMATOGRAFIA EM FASE LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE) PARA QUANTIFICAÇÃO DA IVERMECTINA H_2B1_a e H_2B1_b..... 64
4.2.1.2 Metodologia..... 64
4.2.1.3 Condições analíticas..... 64
4.2.1.4 Validação do método analítico para determinação da ivermectina H_2B1_a e H_2B1_b por cromatografia em fase líquida de alta eficiência (CLAE)..... 65
4.2.1.4.1 Seletividade..... 65
4.2.1.4.2 Linearidade..... 66
4.2.1.4.3 Limite de detecção (LD)..... 67
4.2.1.4.4 Limite de quantificação (LQ)..... 68
4.2.1.4.5 Repetibilidade..... 68
4.2.1.4.6 Precisão intermediária..... 69
4.2.1.4.7 Exatidão..... 69
4.2.1.4.7 Teste de estresse..... 71
4.2.1.4.7.1 Teste de estresse em meio ácido..... 72
4.2.1.4.7.2 Teste de estresse em meio alcalino..... 73
4.2.1.4.7.3 Teste de estresse em meio oxidante..... 74
4.2.1.4.7.4 Teste de estresse em meio neutro..... 75
4.2.1.4.8 Robustez..... 76
4.2.1.4.9 Estabilidade 76
4.2.1.5 Identificação das espécies moleculares da ivermectina H_2B1_a e H_2B1_b..... 76
4.2.2 CROMATOGRAFIA EM FASE LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE) PARA QUANTIFICAÇÃO DA ABAMECTINA H_2B1_a e H_2B1_b..... 77
4.2.2.1 Metodologia..... 77
4.2.2.2 Condições analíticas..... 78

4.2.2.3 Validação do método analítico para determinação da abamectina H_2B1_a e H_2B1_b por cromatografia em fase líquida de alta eficiência (CLAE)..... 78
4.2.2.3.1. Seletividade..... 78
4.2.2.3.2 Linearidade..... 79
4.2.2.3.3 Limite de detecção (LD)..... 81
4.2.2.3.4 Limite de quantificação (LQ)..... 81
4.2.2.3.5 Repetibilidade..... 81
4.2.2.3.6 Precisão intermediária..... 82
4.2.2.3.7 Exatidão..... 83
4.2.1.5.8 Teste de estresse..... 85
4.2.2.5.8.1 Teste de estresse em meio ácido..... 85
4.2.2.5.8.2 Teste de estresse em meio alcalino..... 86
4.2.2.5.8.3 Teste de estresse em meio oxidante..... 87
4.2.2.5.8.4 Teste de estresse em meio neutro..... 88
4.2.1.5.9 Robustez..... 89
4.2.1.5.10 Estabilidade 89
4.2.3 CROMATOGRAFIA EM FASE LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE) PARA QUANTIFICAÇÃO DOS ENANTIÔMEROS DO NADOLOL..... 90
4.2.2.1 Metodologia..... 90
4.2.2.2 Condições analíticas..... 90
4.2.3.3 Validação do método analítico para determinação dos enantiômeros do nadolol por cromatografia em fase líquida de alta eficiência (CLAE)..... 91
4.2.3.3.1 Seletividade 91
4.2.2.3.2 Linearidade..... 92
4.2.2.3.3 Limite de detecção (LD)..... 93
4.2.2.3.4 Limite de quantificação (LQ)..... 93
4.2.2.3.5 Repetibilidade..... 94
4.2.2.3.6 Precisão intermediária..... 95
4.2.2.3.7 Exatidão..... 95
4.2.1.5.8 Teste de estresse..... 97
4.2.2.5.8.1 Teste de estresse em meio ácido..... 97
4.2.2.5.8.2 Teste de estresse em meio alcalino..... 98
4.2.2.5.8.3 Teste de estresse em meio oxidante..... 99

4.2.2.5.8.4 Teste de estresse em meio neutro..... 100
4.2.1.5.9 Robustez..... 101
4.2.1.5.10 Estabilidade 101
4.2.3 IDENTIFICAÇÃO DOS ENANTIÔMEROS DO NADOLOL UTILIZANDO DICROISMO CIRCULAR 102
4.2.5. DIFRAÇÃO DE RAIOS X DA MATÉRIA-PRIMA NADOLOL 102

5. RESULTADOS 104

5.1 VALIDAÇÃO DO SISTEMA COMPUTADORIZADO DO EQUIPAMENTO DE ELETROFORESE CAPILAR..... 104
5.1.1 Análise de risco 105
5.1.2 Qualificação de instalação 107
5.1.2.1 Qualificação de instalação do *hardware*..... 107
5.1.2.2 Qualificação de instalação do *software* 108
5.1.3 Qualificação de operação 109
5.1.4 Qualificação de desempenho..... 112
5.2 VALIDAÇÃO DO SISTEMA COMPUTADORIZADO DO EQUIPAMENTO DE CROMATOGRAFIA EM FASE LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA..... 117
5.2.1 Análise de risco 118
5.2.2 Qualificação de instalação 120
5.2.2.1 Qualificação de instalação do *hardware*..... 120
5.2.2.2 Qualificação de instalação do *software* 121
5.2.3 Qualificação de operação 122
5.2.4 Qualificação de desempenho..... 125
5.3 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE) PARA QUANTIFICAÇÃO DA IVERMECTINA H_2B1_a e H_2B1_b..... 130
5.3.1 Seletividade..... 131
5.3.2 Linearidade..... 131
5.3.3 Teste de adequabilidade do sistema..... 133
5.3.4 Precisão 133
5.3.5 Exatidão..... 134
5.3.6 Teste de estresse..... 134
5.3.7 Robustez e estabilidade..... 136

5.3.8 Identificação das espécies moleculares de ivermectina H_2B1_a e H_2B1_b..... 137
5.4 CROMATOGRAFIA EM FASE LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE) PARA QUANTIFICAÇÃO DA ABAMECTINA H_2B1_a e H_2B1_b..... 141
5.4.1 Seletividade..... 141
5.4.2 Linearidade..... 142
5.4.3 Teste de adequabilidade do sistema..... 144
5.4.4 Precisão 144
5.4.5 Exatidão..... 145
5.4.6 Teste de estresse..... 145
5.4.7 Robustez e estabilidade..... 147
5.5 CROMATOGRAFIA EM FASE LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE) PARA QUANTIFICAÇÃO DOS ENANTIÔMEROS DO NADOLOL CÁPSULAS 148
5.5.1 Seletividade..... 149
5.5.2 Linearidade..... 149
5.5.3 Teste de adequabilidade do sistema 153
5.5.4 Precisão..... 153
5.5.5 Exatidão 154
5.5.6 Teste de estresse..... 155
5.5.7 Robustez 156
5.5.8 Estabilidade 156
5.6 DICROISMO CIRCULAR DOS ENANTIÔMEROS DO NADOLOL COLETADOS SEPARADAMENTE..... 157
5.7 DIFRAÇÃO DE RAIOS X DO NADOLOL 158
5.8 ELETROFORESE CAPILAR 160

6. DISCUSSÃO..... 165

6.1 VALIDAÇÃO DO SISTEMA COMPUTADORIZADO DO SISTEMA DE ELETROFORESE CAPILAR..... 165
6.2 VALIDAÇÃO DO SISTEMA COMPUTADORIZADO DO SISTEMA DE CROMATOGRAFIA EM FASE LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA..... 166
6.3 CROMATOGRAFIA EM FASE LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA PARA QUANTIFICAÇÃO DA IVERMECTINA H_2B1_a e H_2B1_b..... 166

6.4 CROMATOGRAFIA EM FASE LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA PARA QUANTIFICAÇÃO DA ABAMECTINA H_2B1_a e H_2B1_b..... 169
6.5 CROMATOGRAFIA EM FASE LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA PARA QUANTIFICAÇÃO DOS ENANTIÔMEROS DO NADOLOL..... 172
6.6 DICROISMO CIRCULAR DOS ENANTIÔMEROS DO NADOLOL..... 175
6.7 DIFRAÇÃO DE RAIOS X DO NADOLOL..... 176
6.8 DETERMINAÇÃO POR ELETROFORESE CAPILAR 176

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS..... 178

8. REFERÊNCIAS..... 179

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Métodos analíticos descritos na literatura para a determinação do nadolol

Tabela 2. Métodos analíticos descritos na literatura para a determinação da ivermectina

Tabela 3. Métodos analíticos descritos na literatura para a determinação da abamectina

Tabela 4. Preparação das amostras para a determinação da linearidade da ivermectina

Tabela 5. Preparação de amostras para determinação da exatidão do método por CLAE para determinação da ivermectina

Tabela 6. Condições empregadas nos testes de estresse (KLICK, 2005)

Tabela 7. Preparação das amostras para a determinação da linearidade da abamectina

Tabela 8. Preparação de amostras para determinação da exatidão do método por CLAE para determinação da abamectina

Tabela 9. Condições empregadas nos testes de estresse (KLICK, 2005)

Tabela 10. Preparação das amostras para a determinação da linearidade da nadolol

Tabela 11. Preparação de amostras para determinação da exatidão do método para determinação do nadolol por CLAE

Tabela 12. Condições empregadas nos testes de estresse (KLICK, 2005).

Tabela 13. Testes de qualificação de instalação do *hardware* do sistema computadorizado de EC

Tabela 14. Testes de qualificação de instalação do *software* do sistema computadorizado de EC

Tabela 15. Outros testes de qualificação de instalação do sistema computadorizado de EC

Tabela 16. Testes realizados para assegurar a qualificação operacional do sistema computadorizado do equipamento de EC

Tabela 17. Critérios para considerar o sistema computadorizado do equipamento de EC validável

Tabela 18. Testes de qualificação de instalação do *hardware* do sistema computadorizado do equipamento de CLAE

Tabela 19. Testes de qualificação de instalação do *software* do sistema computadorizado do equipamento de CLAE

Tabela 20. Outros testes de qualificação de instalação do sistema computadorizado do equipamento de CLAE

Tabela 21. Testes realizados para assegurar a qualificação operacional do sistema computadorizado do equipamento de CLAE

Tabela 22. Testes realizados para assegurar a qualificação de desempenho do sistema computadorizado do equipamento de CLAE

Tabela 23. Critérios para considerar o sistema computadorizado do equipamento de CLAE validável

Tabela 24. Valores obtidos nos ensaios de seletividade para a ivermectina por CLAE

Tabela 25. Regressão linear dos dados e limites de detecção e de quantificação obtidos na determinação da ivermectina H_2B_{1a} e H_2B_{1b} por CLAE

Tabela 26. Resultados estatísticos obtidos no teste de adequabilidade do sistema

Tabela 27. Resultados estatísticos obtidos no ensaio de precisão para determinação da ivermectina H_2B_{1a} e H_2B_{1b} por CLAE

Tabela 28. Resultados estatísticos obtidos no teste de recuperação após adição das soluções padrão da ivermectina à solução amostra do comprimido analisadas por CLAE

Tabela 29. Resultados obtidos nos ensaios de estabilidade e robustez (após modificações no comprimento de onda para detecção no UV e na composição da fase móvel) em relação às condições iniciais

Tabela 30. Resultados obtidos a partir do cromatograma da solução do padrão

Tabela 31. Resultados obtidos a partir do cromatograma da solução da amostra

Tabela 32. Valores obtidos nos ensaios de seletividade para a abamectina por CLAE

Tabela 33. Regressão linear dos dados e limites de detecção e de quantificação obtidos na determinação da abamectina H_2B_{1a} e H_2B_{1b} por CLAE

Tabela 34. Resultados estatísticos obtidos no teste de adequabilidade do sistema

Tabela 35. Resultados estatísticos obtidos no ensaio de precisão para determinação da abamectina H_2B_{1a} e H_2B_{1b} por CLAE

Tabela 36. Resultados estatísticos obtidos no teste de recuperação após adição das soluções padrão de abamectina ao placebo da amostra e analisadas por CLAE

Tabela 37. Resultados obtidos nos ensaios de robustez após modificações no comprimento de onda da detecção no UV e na composição da fase móvel em relação às condições iniciais

Tabela 38. Valores obtidos nos ensaios de seletividade para a nadolol por CLAE

Tabela 39. Regressão linear dos dados e limites de detecção e de quantificação obtidos na determinação dos enantiômeros do nadolol por CLAE

Tabela 40. Resultados estatísticos obtidos no teste de adequabilidade do sistema

Tabela 41. Resultados estatísticos obtidos no ensaio de precisão intermediária para determinação dos enantiômeros do nadolol por CLAE

Tabela 42. Resultados estatísticos obtidos no ensaio de repetibilidade para determinação enantiômeros do nadolol por CLAE

Tabela 43. Resultados estatísticos obtidos no teste de recuperação após adição das soluções padrão de nadolol ao placebo e analisadas por CLAE

Tabela 44. Resultados obtidos utilizando o proposto método CLAE após o teste de estresse

Tabela 45. Resultados obtidos nos ensaios de robustez após modificações no comprimento de onda e na vazão em relação a condição inicial

Tabela 46. Resultados obtidos nos ensaios de avaliação da estabilidade após 24 hs em relação a condição inicial

Tabela 47. Descrição das condições de análise por eletroforese capilar para determinação da ivermectina

Tabela 48. Descrição das condições de análise por eletroforese capilar para determinação do nadolol

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química do nadolol (*UNITED STATES PHARMACOPEIA*, 2016)

Figura 2. Estrutura química dos enantiômeros do nadolol (SUNG, 2010)

Figura 3. Estrutura química da ivermectina (*UNITED STATES PHARMACOPEIA*, 2016)

Figura 4. Estrutura química da abamectina (XIE, 2011)

Figura 5. Representação geral de uma molécula com seu centro quiral e os enatiômeros (Burke, 2002).

Figura 6. Representação gráfica do pKa do nadolol (CHEMICALAZE, 2016)

Figura 7. Representação gráfica do pKa da ivermectina (CHEMICALAZE, 2016)

Figura 8. Representação gráfica do pKa da abamectina (CHEMICALAZE, 2016)

Figura 9. Critérios para classificação do tipo de risco para o sistema computadorizado do equipamento de EC

Figura 10. Critérios para avaliação da probabilidade de ocorrência do risco para o sistema computadorizado do equipamento de EC

Figura 11. Critérios para classificação do tipo de risco para o sistema computadorizado do equipamento de CLAE

Figura 12. Critérios para avaliação da probabilidade de ocorrência do risco para o sistema computadorizado do equipamento de CLAE

Figure 13. Cromatogramas das soluções do padrão (a), da amostra (b), fase móvel (c) e placebo (d). Concentração: 190,12 µg mL^{-1} para H_2B1_a e 5,72 µg mL^{-1} para H_2B1_b. Condições: Fase móvel: acetonitrila e água (95:5, v/v) com 1 % ácido acético, coluna Lichrocart® 100 RP-18 (125 x 4 mm, 5 µm), vazão 1.0 mL min^{-1}, detecção no UV a 245 nm, volume de injeção: 20 µL e temperatura do forno 25ºC

Figura 14. Curva analítica da ivermectina H_2B_{1a} obtida pelo método cromatográfico. Condições: mesmas descritas na Figura 13

Figura 15. Curva analítica da ivermectina H_2B_{1b} obtida pelo método cromatográfico. Concentração: 5,72 µg mL^{-1} de ivermectina H_2B_{1b}. Condições: mesmas descritas na Figura 13

Figura 16. Cromatogramas após teste de estresse. Concentração: 190,12 µg mL^{-1} de H_2B_{1a} e 5,72 µg mL^{-1} de H_2B_{1b}. Cromatogramas: hidrólise neutra (A), meio oxidante (B), hidrólise ácida (C) e hidrólise alcalina (D). Condições: mesmas descritas na Figura 13

Figura 17. Cromatograma da ivermectina. Condições: Concentração: 190,12 µg mL^{-1} para H_2B1_a e 5,72 µg mL^{-1} para H_2B1_b. Condições: Coluna: LiChroCART ® 100 RP-18 (125 x 4 mm, 5 mm), fase móvel: acetonitrila e água (95:5, v/v) com ácido acético a 1 %, vazão: 1,0 mL min^{-1}, *split* do MS de 1:5. Detecção no UV a 245 nm e temperatura de 25 ± 1 º C

Figura 18. Espectros de massa dos homólogos da solução padrão de ivermectina H_2B1_a. Condições: mesmas descritas na Figura 13.

Figura 19 Espectros de massa dos homólogos da solução da amostra de ivermectina H_2B1_a. Condições: mesmas descritas na Figura 13

Figura 20. Espectros de massa dos homólogos da solução padrão de ivermectina H_2B1_b. Condições: mesmas descritas na Figura 13

Figura 21. Espectros de massa dos homólogos da solução da amostra de ivermectina H_2B1_b. Condições: mesmas descritas na Figura 13

Figure 22. Cromatogramas das soluções do padrão (a), da amostra (b), da fase móvel (c) e do placebo (d). Concentração: 187,64 µg mL^{-1} de H_2B_{1a} e 9,76 µg mL^{-1} de H_2B_{1b}. Condições: Fase móvel: acetonitrila e água (95:5, v/v) com 1 % ácido acético, coluna Lichrocart® 100 RP-18 (125 x 4 mm, 5 µm), vazão 1.0 mL min^{-1}, detecção no UV a 245 nm, volume de injeção: 20 µL e temperatura do forno 25ºC

Figura 23. Curva analítica da abamectina H_2B_{1a} obtida pelo método cromatográfico. Concentração: 187,64 µg mL^{-1} de abamectina H_2B_{1a}. Condições: mesmas descritas na Figura 22

Figura 24. Curva analítica da abamectina H_2B_{1b} obtida pelo método cromatográfico. Concentração: 9,76 µg mL^{-1} de abamectina H_2B_{1b}. Condições: mesmas descritas na Figura 22

Figura 25. Cromatogramas após teste de estresse. Concentração: 187,64 µg mL^{-1} de H_2B_{1a} e 9,76 µg mL^{-1} de H_2B_{1b}. Cromatogramas: hidrólise neutra (A), meio oxidante (B), hidrólise ácida (C) e hidrólise alcalina (D). Condições cromatográficas: mesmas descritas na Figura 22

Figure 26. Cromatogramas da solução do padrão, da amostra, do placebo e da fase móvel. Concentração: 200 µg/mL de nadolol. Condições: Fase móvel: hexano: álcool etílico: dietilamina: ácido acético (86:14:0,3:0,3 v/v/v/v) , coluna Chiralcel OD® (250 x 4,6 mm, 10 µm), vazão 0,7 mL min^{-1}, detecção na UV a 220 nm, volume de injeção: 20 µL e temperatura do forno 25ºC

Figura 27. Curva analítica do nadolol 1 obtida pelo método cromatográfico. Concentração: Intervalo de concentração do nadolol racêmico antes da separação cromatográfica: 160- 240 µg/mL. Condições: mesmas descritas na Figura 26.

Figura 28. Curva analítica do nadolol 2 obtida pelo método cromatográfico. Concentração: Intervalo de concentração do nadolol racêmico antes da separação cromatográfica: 160- 240 µg/mL. Condições: mesmas descritas na Figura 26.

Figura 29. Curva analítica do nadolol 3 obtida pelo método cromatográfico Concentração: Intervalo de concentração do nadolol racêmico antes da separação cromatográfica: 160- 240 µg/mL. Condições: mesmas descritas na Figura 26.

Figura 30. Curva analítica do nadolol 3 obtida pelo método cromatográfico Concentração: Intervalo de concentração do nadolol racêmico antes da separação cromatográfica: 160- 240 µg/mL. Condições: mesmas descritas na Figura 26.

Figura 31. Especto de dicroísmo circular dos enantiômeros do nadolol

Figura 32. Difratograma do nadolol racêmico

Figura 33. Difratograma do nadolol analisado conforme Amorin, 2012 (AMORIN,2012)

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ANVISA	Agência nacional de vigilância sanitária
CLAE	Cromatografia em fase líquida de alta eficiência
° C	Graus Celsius
DPR	Desvio padrão relativo
EC	Eletroforese capilar
pH	Potencial hidrogeniônico
pka	Constante de dissociação ácida
UHPLC	*Ultra high performance liquid chromatography*
USP	*United States Pharmacopeia*

RESUMO

ALEXANDRE, G.P. **Validação dos sistemas computadorizados empregados na determinação dos enantiômeros do nadolol e dos homólogos da ivermectina e da abamectina.** 2016. 190f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

O nadolol é um agente bloqueador de receptores β-adrenérgicos empregado principalmente, na "angina pectoris", hipertensão, certas arritmias cardíacas e no tratamento do glaucoma (SING, 2006).

A ivermectina e a abamectina são fármacos que apresentam ação antiparasitária (SHOOP, 1995).

Na presente pesquisa, a cromatografia em fase líquida de alta eficiência foi uma das técnicas estudadas para a quantificação dos enantiômeros do nadolol e dos homólogos presentes na abamectina e ivermectina. A versatilidade desta técnica reside no grande número de fases estacionárias existentes, as quais possibilitam análises, separações e determinações quantitativas de uma ampla gama de compostos com alta eficiência (Aquino Neto e Nunes, 2003). Para identificação dos enantiômeros do nadolol foi utilizado o dicroísmo circular que permite a determinação da configuração absoluta de enantiômeros (LIMA, 1997).

Para os enantiômeros do nadolol e dos homólogos presentes na abamectina e na ivermectina também foram realizados testes para desenvolvimento de uma metodologia de quantificação por meio de uma técnica relativamente recente chamada de eletroforese capilar (EC), a qual tem alcançado desde sua introdução um rápido desenvolvimento e ampla aplicação na análise de fármacos em medicamentos (SANTORO, 2000).

Para a comprovação da qualidade e segurança dos sistemas computadorizados dos equipamentos de cromatografia em fase líquida de alta eficiência (CLAE) e de eletroforese capilar (EC) foram efetuadas, neste trabalho, as respectivas validações. Após esta validação,

pode-se confirmar o correto funcionamento de um *software*, e suas interações com o *hardware*, onde devem ser levados em consideração, dentre outros, os aspectos relacionados à infra-estrutura, segurança e manutenção de dados (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNIA SANITÁRIA, 2010).

As metodologias analíticas desenvolvidas a para quantificação do nadolol, abamectina e ivermectina por cromatografia em fase líquida de alta eficiência foram validadas. A validação analítica deve garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados. Para tanto, o método deve apresentar especificidade, linearidade, intervalo, precisão, sensibilidade, limite de quantificação e detecção, exatidão, adequados à análise (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNIA SANITÁRIA, 2003).

Portanto, o objetivo proposto nesta pesquisa é primeiramente a validação dos sistemas computadorizados dos equipamentos de cromatografia em fase líquida de alta eficiência (CLAE) e de eletroforese capilar (EC). Para isto, serão desenvolvidos e validados os métodos analíticos de separação, identificação e quantificação dos enantiômeros do nadolol e dos homólogos presentes na abamectina e na ivermectina, em medicamentos, empregando as técnicas analíticas selecionadas.

Palavras chaves: Validação, métodos analíticos, cromatografia em fase líquida de alta eficiência, dicroísmo circular, eletroforese capilar, abamectina, ivermectina, nadolol, preparações farmacêuticas.

ABSTRACT

ALEXANDRE, G.P. **Validation of the computer systems used in the determination of nadolol enantiomers and homologous of ivermectin and abamectin.** 2016. 190f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Nadolol is a blocking agent with activity in the β -adrenergic receptors. It is mainly used in angina, hypertension, certain heart arrhythmias and in the treatment of glaucoma (SING, 2006).

Ivermectin and abamectin are drugs with antiparasitic activity (SHOOP, 1995).

In the present research, high performance liquid chromatography is one of the techniques used in the quantification of the enantiomers of nadolol and homologues present in abamectin and ivermectin. The versatility of this technique and the large number of existing stationary phases, enables the separation and quantitative determination of a wide range of compounds with high efficiency (Aquino Neto e Nunes, 2003). For identification of the nadolol enantiomers, circular dichroism was used which allows the determination of the absolute configuration of the enantiomers (LIMA, 1997).

Nadolol enantiomers and the homologues present in abamectin and ivermectin will be also quantified by capillary zone electrophoresis (CE), a separation technique relatively recent, which has achieved, since its introduction, a wide application in the analysis of drugs in pharmaceutical preparations (SANTORO, 2000).

In order to assure the quality of the analytical results, the computer systems of the liquid chromatograph and capillary electrophoresis equipments, must be validated prior to the analytical methods validation. Computer systems validation is used to verify and confirm the proper operation of *softwares*, and their interactions with the *hardwares*, besides the

infrastructure, safety and storage of data (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNIA SANITÁRIA, 2010).

The analytical methodologies developed for quantification of nadolol, abamectin, ivermectin by using high efficiency liquid chromatography and capillary electrophoresis were validated. The analytical methods validation should ensure, through experimental studies, that the method meets the requirements for analytical applications, ensuring the reliability of the results. Parameters like, specificity, linearity, range, accuracy, sensitivity, limits of detection and quantification and accuracy, must be determined (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNIA SANITÁRIA, 2003).

The objective of this study is to validate the computer systems of the high performance liquid chromatograph and capillary electrophoresis equipments and then to develop and validate analytical methods for separation, identification and quantification of nadolol enantiomers and the homologues of abamectin and ivermectin.

Keywords: Validation, analytical methods, high performance liquid chromatography, circular dichroism, capillary electrophoresis, abamectin, ivermectin, nadolol, pharmaceutical preparations.

1. INTRODUÇÃO

O nadolol (Figuras 1 e 2), cujo nome químico é (2R,3S)-5-(3-tert-butylamino-2-hydroxypropoxy)-1,2,3,4-tetrahydronaphthalene-2,3-diol, é constituído pelos racematos A e B, apresentando, portanto, uma mistura de quatro isômeros, isto é, dois pares de enantiômeros. O nadolol, apesar de possuir três carbonos quirais, apresenta apenas dois centros quirais, pois as hidroxilas do carbono 2-3 são fixas na configuração *cis*, permitindo um total de quatro estereoisômeros. É um β-bloqueador empregado em casos de angina, hipertensão, arritmias cardíacas e glaucoma (*BRITISH PHARMACOPEIA*, 2010; MERCK INDEX, 2006; SING, 2006).

Figura 1. Estrutura química do nadolol (*UNITED STATES PHARMACOPEIA*, 2016)

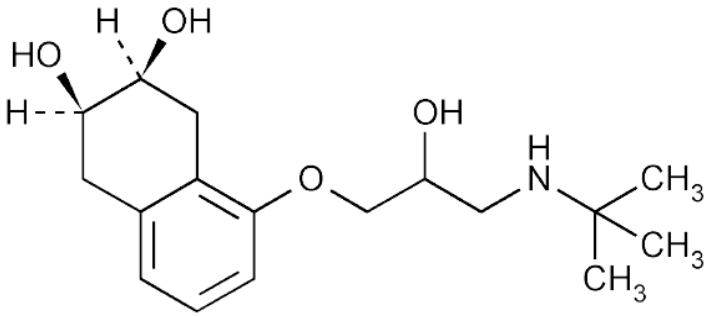
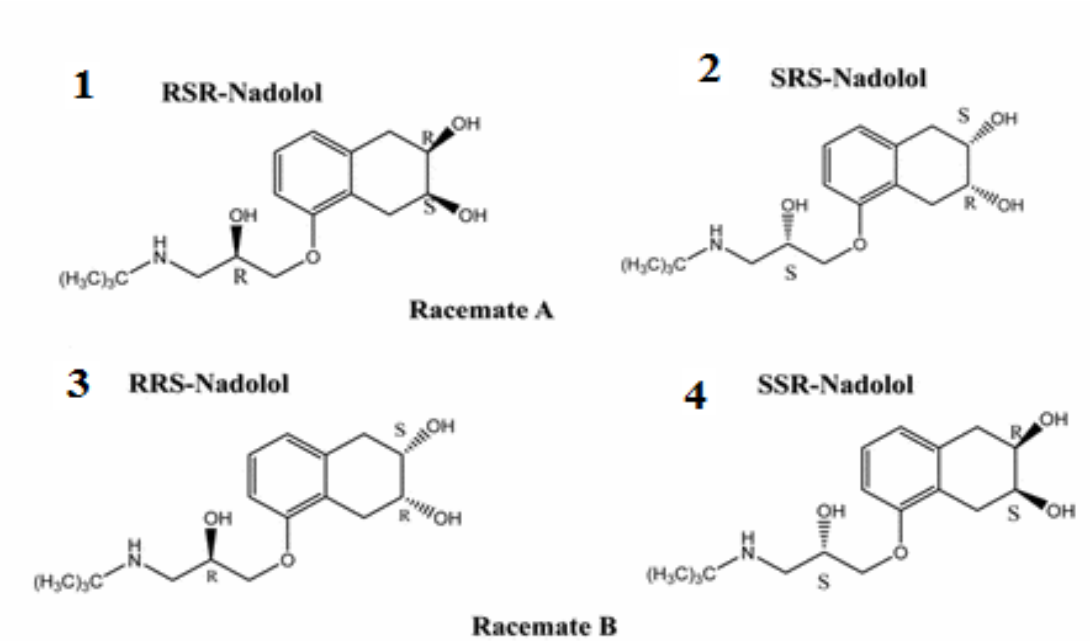


Figura 2. Estrutura química dos enantiômeros do nadolol (SUNG, 2010)

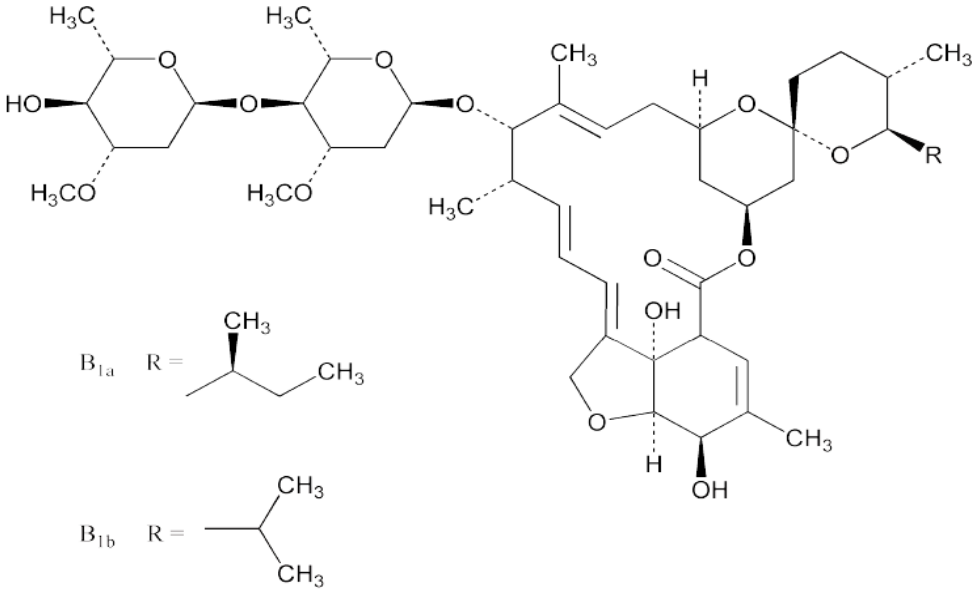


Atualmente, a quiralidade dos compostos orgânicos tem sido muito estudada, já que está diretamente ligada a ação farmacológica. Devido à quiralidade, os seres vivos normalmente apresentam respostas biológicas diferentes a um ou outro par de enantiômeros. Um exemplo bem estudado é o caso da teratogenicidade da talidomida, exclusiva do enantiômero (S). Os dois enantiômeros já foram separados, quantificados e foram reconhecidos como dois produtos quimicamente diferentes (FRANCOTTE, 2001 e NAGAMATSU, 1999).

A ivermectina, (Figura 3), que apresenta nome químico 22,23-diidroavermectina B_1a mais a 22,23- dihidroavermectina B_1b, é composta de uma mistura de avermectina B1a (pelo menos 80 %) e avermectina B1b (não mais do que 20 %) (MARKUS, 1992).

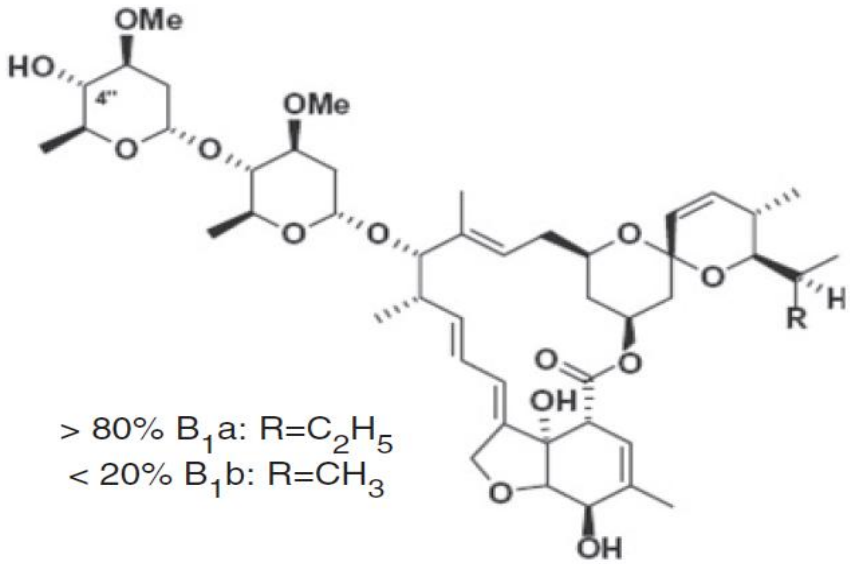
A ivermectina é utilizada como principio ativo, de ampla ação medicamentosa, na área humana e veterinária nos tratamentos de escabiose, vermes e piolhos. É um dos compostos produzidos pela bactéria *Streptomyces avermitili* que atua no sistema nervoso e na função muscular, resultando em paralisia e morte dos parasitas (CIONE, 2008).

Figura 3. Estrutura química da ivermectina (*UNITED STATES PHARMACOPEIA*, 2016)



A abamectina (Figura 4) é um composto da classe das avermectinas, formada por uma mistura de avermectina B1a (pelo menos 80 %) e avermectina B1b (não mais do que 20 %) (Shoop, 1995). É utilizada em medicina veterinária como antiparasitário, e na agricultura como inseticida (Lankas, 1989).

Figura 4. Estrutura química da abamectina (Xie, 2011)



A justificativa para o estudo dos homólogos da ivermectina e abamectina é evidente, visto que temos uma especificação que consta que as avermectinas, H_2B_{1a} (deve apresentar pelo menos 80 %) e a H_2B_{1b} (não mais do que 20 %) observa-se assim, a necessidade de quantificar cada homólogo separadamente visto que a especificação faz parte da caracterização do fármaco (MARKUS, 1992).

Sabe-se que os enatiômeros podem apresentar atividades biológicas completamente diferentes. Para os ß- bloqueadores, como é o caso do nadolol o responsável pelo efeito farmacológico principal é o isômero S (-), sendo assim o presente estudo faz-se necessário devido a importância na eficácia do efeito farmacológico do fármaco, justificando assim a necessidade de separação e quantificação dos quatro estereoisômeros separadamente (MEHVAR, 2001, PEARSON, 1989).

A Bristol Myers Squibb era a única fabricante do nadolol no Brasil, com nome comercial de Corgard®. No entanto, desde 2009 o medicamento deixou de ser comercializado pela empresa, ficando como alternativa o produto preparado nas farmácias de manipulação.

É parte da pesquisa, além da quantificação dos enantiômeros do nadolol e dos homólogos da ivermectina e abamectina, além da validação dos sistemas computadorizados dos equipamentos de cromatografia em fase líquida de alta eficiência e de eletroforese capilar.

A validação de sistemas computadorizados pode ser definida como uma evidência documentada que atesta, com alto grau de segurança, que análises do sistema, controles e registros, estão sendo realizados corretamente e que o processamento dos dados cumpre com as especificações pré-determinadas (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂCIA SANITÁRIA, 2010).

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 ESTEREOQUÍMICA

Isômeros são compostos que possuem os mesmos constituintes atômicos, porém com diferentes disposições na molécula (LIMA, 1997, BURKE, 2002).

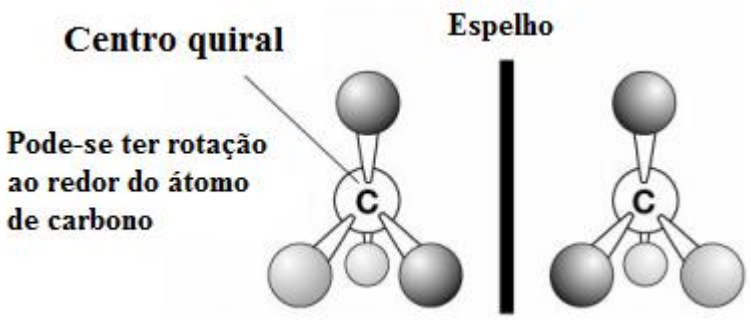
Os esteroisômeros são isômeros que diferem somente pela posição do seu átomo no espaço. Podem ser dividos em duas categorias: enantiômeros e diastereômeros (SOLOMONS, 1996).

Diastereômeros são esteroisômeros cujas moléculas não são imagem especulares uma da outra. Suas propriedades físicas e químicas podem diferir podendo possuir diferentes pontos de fusão, ebulição, índices de refração e solubilidade. É normalmente observado em moléculas com mais de um centro quiral (SOLOMONS, 1996).

Um enantiômero existe sob forma de dois pares de isômeros, não superponíveis, mas simétricos em relação a um plano. A mistura de dois enatiômeros é denominada racemato (LIMA, 1997, BURKE, 2002).

Os enantiômeros possuem ponto de fusão e ebulição idênticos, bem como mesmos índices de refração e espectros de absorção no infravermelho, mas comportamento diferente em relação a passagem de um feixe de luz polarizada, sendo ativos quando separados (SOLOMONS, 1996).

Figura 5. Representação geral de uma molécula com seu centro quiral e os enantiômeros (BURKE, 2002).



Misturas contendo igual quantidade de enantiômeros (50:50) são chamadas de misturas racêmicas (ou racematos) e são opticamente inativas. Neste caso, a falta de atividade óptica, é decorrente do fato que, enquanto um dos enantiômeros desvia o plano da luz para um determinado valor, o seu par o desvia, na mesma proporção, na direção exatamente oposta, anulando o resultado final. Este é o caso em que uma substância quiral é inativa opticamente.

Estes isômeros apresentam as mesmas propriedades químicas e físicas, exceto quanto à rotação específica. Entretanto, eles podem apresentar diferenças extraordinárias naqueles fatores que dependem de seu rearranjo no espaço, mostrando seguidamente diferentes propriedades farmacodinâmicas e farmacocinéticas.

A existência de enzimas e receptores estereoespecíficos no organismo conduz às caraterísticas biológicas diferentes para as estruturas quirais. O resultado desta ação estereosseletiva pelos receptores protéicos é devido a uma ocupação preferencial de um sítio receptor por um dos enantiômeros. Como consequências diretas o organismo poderá apresentar diversas respostas biológicas para os diferentes estereoisômeros (LIMA, 1997).

Sabe-se que os enantiômeros podem apresentar ações diferenciadas quando interagem com seres vivos. Um bom exemplo é o composto denominado limoneno; uma de suas formas

enantioméricas é a principal responsável pelo odor de laranja, enquanto a outra é responsável pelo odor de limão (SOLOMONS, 1996).

O fármaco quiral pode ter mais do que um centro quiral, em tais casos, é necessário atribuir uma configuração absoluta para cada centro quiral (LIMA, 1997).

Embora o cenário atual favoreça o desenvolvimento de fármacos enantiopuros, cabe ao laboratório responsável a decisão final quanto à forma estereoisomérica do fármaco a ser desenvolvido (forma enantiopura ou racêmica, por exemplo). No entanto, qualquer que seja a decisão tomada, as agências reguladoras irão exigir, para o registro, justificativas científicas baseadas em parâmetros como qualidade, segurança e eficácia, bem como na relação risco-benefício atribuído ao emprego da forma escolhida. Por outro lado, as agências se mostram dispostas a analisar as decisões em conjunto com as indústrias e a discuti-las caso a caso (HUTT, 2003).

Durante a pesquisa por novos fármacos, quando uma molécula quiral é identificada como a mais promissora, as questões estereoquímicas, como a seleção do isômero desejado ou a opção pelo racemato, são consideradas durante o desenvolvimento, preferencialmente, em seu estágio inicial.

No presente cenário, a menos que os dois enantiômeros ofereçam benefícios terapêuticos sinérgicos ou complementares e não estejam associados a nenhuma toxicidade aparente, o desenvolvimento de um racemato pode não ser uma opção viável economicamente. As atuais políticas das agências reguladoras sugerem que, para a aprovação de um racemato, ele e cada um dos enantiômeros individualmente, devem ser avaliados pré-clínica e clinicamente. Em outras palavras, caso se decida pelo uso do racemato, este fato irá significar um custo muito mais elevado com pesquisas, quando comparados aos custos e benefícios decorrentes ao desenvolvimento de um fármaco enantiopuro. Razões ainda existem que podem justificar o registro de um racemato, como:

- Os enantiômeros sofrem pronunciada racemização *in vivo* ou são desprovidos de estabilidade configuracional *in vitro*;
- Os enantiômeros possuem perfis farmacocinéticos, farmacodinâmicos e toxicológicos semelhantes, entre outras razões. No entanto, é possível afirmar que o desenvolvimento de racematos é cada vez menos a opção escolhida pelas indústrias farmacêuticas inovadoras (SRINIVAS, 2001).

Algumas das vantagens do desenvolvimento e emprego de fármacos enantiopuros na terapêutica são: a diminuição da dose total de fármaco administrada, a simplificação da relação dose-resposta, a exclusão de uma fonte de variabilidade na resposta interindividual, bem como a eliminação da toxicidade devida ao enantiômero menos ativo (distômero) (AGRANAT, 2002).

No Brasil desde 2003, através da Resolução nº 135, de 29 de maio de 2003, para o registro de medicamentos genéricos é necessário fornecer dados sobre os teores dos estereoisômeros, no caso de fármacos que apresentam quiralidade, cuja proporção de estereoisômeros possa comprometer a eficácia e a segurança do medicamento (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2003). Na RDC 57 de 18 de novembro de 2009 é exigida a caracterização e a quantificação dos isômeros para registro de insumos (SÃO PAULO, 2009). Percebe-se assim, a necessidade de se ter a disposição métodos analíticos capazes de separar e identificar cada enantiômero.

Atualmente, a importância e as implicações da quiralidade no desenvolvimento de novos fármacos são bem reconhecidas, seja no meio acadêmico, industrial ou regulatório. Há alguns anos, o desenvolvimento de medicamentos contendo apenas o enantiômero mais ativo não era considerado viável. Contudo, após décadas de farmacologia e terapêutica essencialmente bidimensionais, nas quais o arsenal terapêutico era dominado por racematos,

uma redescoberta da estereoquímica ocorreu no início da década de 80. Essa redescoberta foi motivada pelo surgimento de novas tecnologias que possibilitaram a preparação de enantiômeros puros em quantidade, levando a um interesse renovado pelo papel da estereoquímica na ação dos fármacos (SRINIVAS, 2001; AGRANAT, 2002)

Para identificação dos enantiômeros de um fármaco quiral pode-se proceder a análise com base na sua configuração absoluta ou a sua rotação óptica.

- **Classificação pela rotação óptica**

A forma mais comum de representar a quiralidade de uma molécula está baseada no efeito da rotação óptica da luz, com a descrição de (+) quanto este é no sentido horário ou (-) no sentido anti-horário (BURKE, 2002, CALDWELL, 2001, MCCONATHY, 2003).

Outras designações, tais como D e L são usados para os açúcares e aminoácidos, mas são específicos para estas moléculas e não são geralmente aplicáveis para outros compostos. Os termos d (dextro), e l (levo), são consideradas obsoletas e devem ser evitados (MCCONATHY, 2003).

- **Classificação pela configuração estrutural**

Outra forma de representar a quiralidade é pela configuração estrutural absoluta do centro quiral, sendo designado S (para direita) e R (para esquerda). Há regras precisas com base no número atômico para determinar se um determinado centro quiral possui configuração R ou S. Os substituintes do centro quiral são ordenados de acordo com seu número atômico, sendo organizados do maior para o menor. A molécula então é orientada de modo a que o menor dos quatro substituintes seja direcionado para longe do observador. A configuração então é determinada conforme o sentido em que os substituintes maior, médio e menor são rotacionados (sentido horário e anti-horário). Caso a molécula gire no sentido

horário, ela será designada de R e, caso ela gire no sentido ani-horário, será denominada S (CALDWELL, 2001, MCCONATHY, 2003).

2.1.1 Quiralidade e farmacodinâmica

A maioria dos fármacos tem sua ação explicada com base na teoria dos receptores. As moléculas receptoras no organismo são proteínas que exibem alta afinidade por ligantes de certa estrutura molecular, de modo análogo à ligação enzima-substrato. A ligação de um substrato a um receptor aciona um mecanismo que se manifesta como uma resposta biológica. Esse mecanismo pode ser uma modificação na atividade de uma enzima ou no transporte de íons, etc. Qualquer que seja sua função fisiológica, os receptores têm algo em comum: são moléculas quirais e podem, portanto, ser enantiosseletivos em suas ligações com moléculas mensageiras. Sabe-se que quanto melhor é o encaixe ou a ligação do fármaco com o receptor, melhor é o fármaco. Além disso, se ambos os enantiômeros conseguem se encaixar no sítio ativo, então é provável que nenhum dos dois tenha um bom encaixe. Temos ainda uma relação entre a afinidade de um fármaco por seu receptor e a dose efetiva necessária para que sua ação farmacológica seja observada. Pela regra de Pfeiffer sabe-se que quanto menor a dose efetiva de um fármaco, maior a diferença na ação farmacológica entre os isômeros ópticos do qual o fármaco faz parte (ABOUL-ENEIN, 1997).

À razão entre a atividade do enantiômero mais ativo (também chamado eutômero) e aquela do enantiômero menos ativo (também chamado distômero), dá-se o nome de razão eudísmica. Há uma relação direta entre a razão eudísmica e a potência de um fármaco, ou seja, quanto maior a razão eudísmica, mais potente é o fármaco ou menor é sua dose efetiva. O desenvolvimento desse conceito demonstrou que a enantiosseletividade na ação biológica é a regra e não a exceção.

Embora boa parte da diferença observada nas atividades farmacológicas dos enantiômeros possa ser atribuída às diferentes afinidades pelos receptores, pode também ser devida à estereosseletividade presente nas diversas etapas farmacocinéticas (ABOUL-ENEIN, 1997).

2.1.2 Quiralidade e farmacocinética

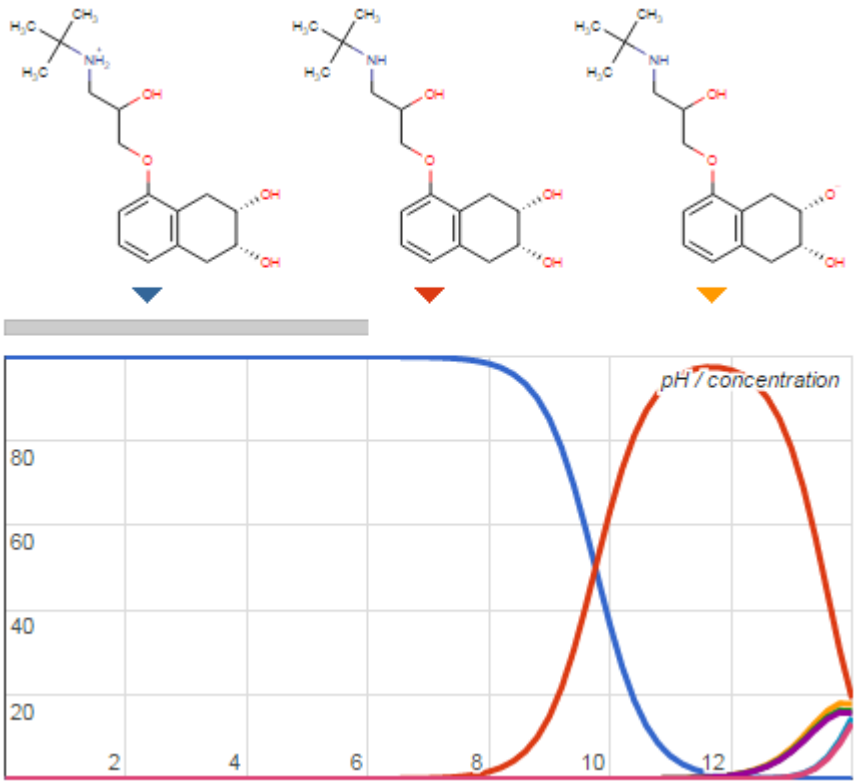
A farmacocinética é a parte da farmacologia que estuda os processos de absorção, distribuição, metabolização e eliminação dos fármacos. Os processos de absorção, distribuição e eliminação são fenômenos que geralmente não se diferenciam entre os enantiômeros. No entanto, se o fármaco interage com uma enzima ou sistema de transporte, então pode haver discriminação quiral e, com isso, diferenças farmacocinéticas entre os enantiômeros podem ser observadas (OTT, 1993).

2.2 NADOLOL

2.2.1 Característica do fármaco

O nadolol apresenta peso molecular de 309,40, (CAS 42200-33-9) e sua fórmula estrutural é $C_{17}H_{27}NO_4$. É um pó branco ou quase branco, cristalino, praticamente inodoro, facilmente solúvel em etanol e em metanol, levemente solúvel em clorofórmio, cloreto de metileno, álcool isopropílico, insolúvel em acetona, benzeno, éter, hexano e tricloroetano. Apresenta ponto de fusão entre 124.0-136.0 ºC, pKa de 9,68 e log P 0,87. (MERCK INDEX, 2006, *UNITED STATES PHARMACOPEIA*, 2016, CHEMICALAZE, 2016).

Figura 6. Representação gráfica do pKa do nadolol (CHEMICALAZE, 2016)



O nadolol constituído pelos racematos A e B, apresenta, portanto, uma mistura de quatro isômeros, isto é, dois pares de enantiômeros. O nadolol, apesar de possuir três carbonos quirais, apresenta apenas dois centros quirais, pois as hidroxilas do carbono 2-3 são fixas na configuração *cis*, permitindo um total de quatro estereoisômeros (SINGH, 2006 e *BRITISH PHARMACOPEIA*, 2010).

A maioria dos agentes β-bloqueadores frequentemente prescritos é formulada e comercializada na forma racêmica, embora, para alguns deles, já tenha sido demonstrado que o enantiômero S (-) é o responsável pelo efeito farmacológico principal (MEHVAR, 2001 e PEARSON, 1989).

A quiralidade dos compostos químicos, principalmente os compostos terapêuticos é um tema muito importante principalmente do ponto de vista farmacológico, farmacocinético,

toxicológico, e preocupação dos órgãos fiscalizadores quanto ao controle de qualidade de medicamentos. É importante o controle da composição esteroquímica desde a síntese até o consumo, envolvendo estudos farmacológiccos, de fabricação e de controle de qualidade (SANTORO, 2001).

Srivinas e coladoradores (1996) descreveram em estudo sobre a bioequivalência em formulações contendo nadolol que o emprego do método não-enantioseletivo levava a conclusão de que os fármacos em análise eram bioequivalentes. No entanto, quando foi realizada a análise a partir de um método analítico enantiosseletivo, foi provado que os fármacos não apresentavam bioequivalência. Ficou justificada assim, a necessidade de quantificação separadamente dos quatro isômeros presentes.

Hoje em dia, apesar da legislação internacional cada vez mais restrita para a comercialização de produtos farmacêuticos, com base em enantiomeros individuais, o nadolol ainda é disponível comercialmente como uma mistura em partes iguais dos quatro esteroisomeros. Existem alguns fatores envolvidos para justificar esta apresentação, pois são muitas as dificuldades para a síntese dos enantiômeros puros, que muitas vezes envolve várias etapas, tornando o produto inviável sob ponto de vista econômico (ARAFAT, 2016 e LIMA, 1997).

2.3 COMPOSTOS HOMÓLOGOS

Os compostos formadores por uma série homóloga são denominados homólogos entre si. Suas propriedades químicas são semelhantes, pois pertencem à mesma função química, e suas propriedades físicas vão variando gradativamente, à medida que aumenta o tamanho da cadeia carbônica (FELTRE, 2004).

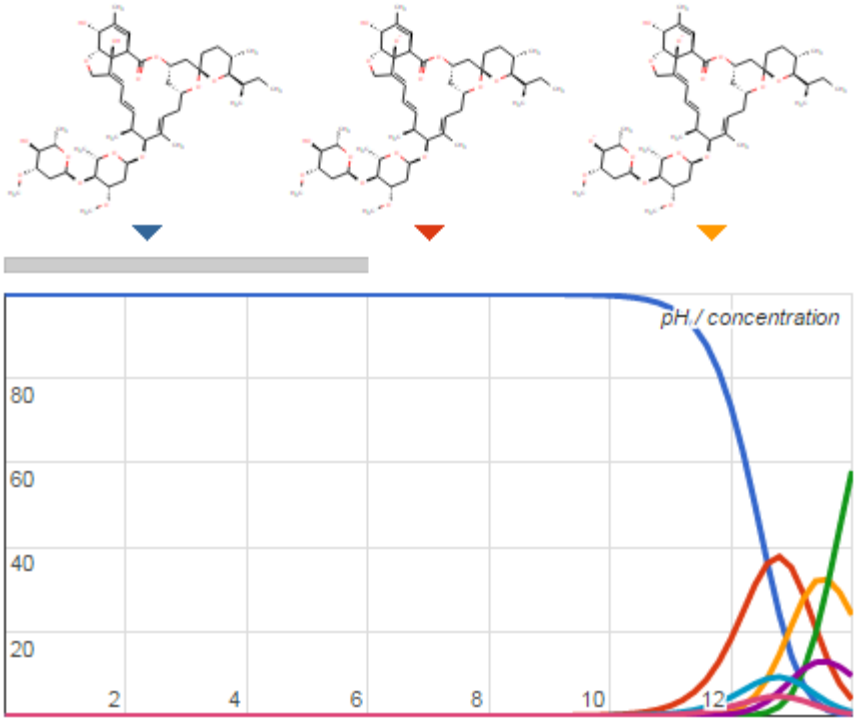
Estão neste caso a ivermectina e a abamectina.

2.4 IVERMECTINA

2.4.1 Característica do fármaco

Seu peso molecular é de 875,10 (ivermectina H_2B_{1a}) e de 861,07 (ivermectina H_2B_{1b}), CAS 70288-86-7. A fórmula estrutural é $C_{48}H_{74}O_{14}$ (ivermectina B_{1a}) e $C_{47}H_{72}O_{14}$ (ivermectina B_{1b}). Apresenta-se na forma de pó cristalino branco ou quase branco, insolúvel em água, facilmente solúvel em metanol e etanol 95 % (*UNITED STATES PHARMACOPEIA*, 2016 e MERCK INDEX, 2006).

Figura 7. Representação gráfica do pKa da ivermectina (CHEMICALAZE, 2016)



É utilizada como principio ativo com ampla ação medicamentosa para o tratamento de escabiose, vermes e piolhos (CIONE, 2008). Tem aplicação tanto em medicamentos de uso humano quanto veterinário.

A ivermectina é composta de uma mistura de avermectina B_{1a} (pelo menos 80 %) e avermectina B_{1b} (não mais do que 20 %). Com base nos estudos sobre o metabolismo do fármaco, foi demonstrado que o composto H_2B_{1b} é geralmente metabolizado mais rapidamente do que o homólogo H_2B_{1a} e, portanto o H_2B_{1a} constitui o principal resíduo encontrado em tecidos e fluidos biológicos, justificando assim a necessidade de se quantificar, separadamente, os dois homólogos (MARKUS, 1992).

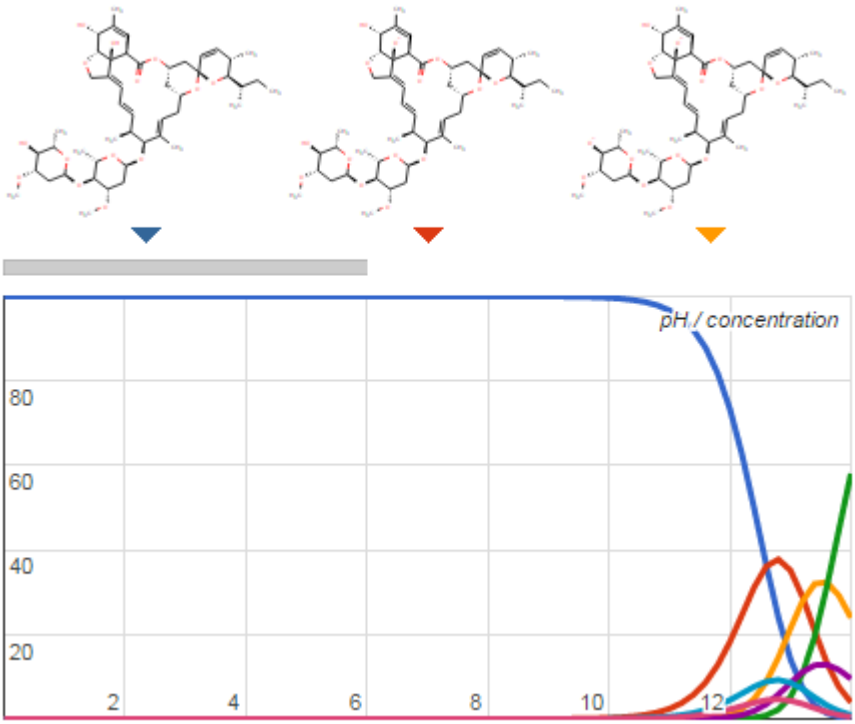
A partir da descoberta da abamectina, inúmeras modificações químicas na estrutura dos compostos do grupo das avermectinas foram realizadas no intuito de reduzir a toxicidade destes compostos em animais. A saturação da dupla ligação entre os carbonos 22 e 23 deu origem ao fármaco revolucionário, a 22-23-diidro avermectina B_1 (majoritariamente B_{1a}), denominada de ivermectina. A redução da dupla ligação deu origem a um composto com eficácia e segurança maior do que a do composto original. Foi introduzido comercialmente em 1981 para o controle de nematóideos endoparasíticos e artrópodes ectoparasíticos em animais. A ivermectina é altamente efetiva contra carrapatos. No entanto, não teve sucesso somente na medicina veterinária. Em 1988, foi empregada pela primeira vez para tratar a oncocercoiasis em humanos. Atualmente é prescrita para o tratamento de diversas infecções internas causadas por nematódeos e outras ectoparasitoses (SCHRODER, 2016).

2.5 ABAMECTINA

2.5.1 Característica do fármaco

Seu peso molecular é de 873,08 (abamectina B_{1a}) e de 859,05 (abamectina B_{1b}), CAS 71751-41-2. Sua fórmula estrutural é $C_{48}H_{72}O_{14}$ (abamectina B_{1a}) e $C_{47}H_{70}O_{14}$ (abamectina B_{1b}). Apresenta-se na forma de pó cristalino branco ou quase branco, inolúvel em água, facilmente solúvel em metanol (MERCK INDEX, 2006).

Figura 8. Representação gráfica do pKa da abamectina (CHEMICALAZE, 2016)



A abamectina é formada por uma mistura de avermectina B_{1a} (pelo menos 80 %) e avermectina B_{1b} (não mais do que 20 %) (SHOOP, 1995). Os dois homólogos, B_{1a} e B_{1b}, são muito semelhantes quanto às propriedades biológicas e toxicológicas, formando um composto com alta massa molar, que apresenta baixa solubilidade em água e é solúvel em solventes orgânicos (BORGES, 2008).

A abamectina é utilizada na medicina veterinária como antiparasitário e na agricultura como inseticida (LANKAS, 1989).

Em 1985, o laboratório Merck Sharpe e Dohme® lançou no mercado a primeira forma farmacêutica contendo abamectina (PITTERNA, 2009).

A abamectina é a mais importante das oito avermectinas, devido à sua alta potência contra um amplo espectro de parasitas em mamíferos. A avermectina B_{1a} é a mais ativa contra pestes na agricultura. A partir desta descoberta, inúmeras modificações químicas na estrutura

dos compostos do grupo das avermectinas foram realizadas no intuito de reduzir a toxicidade destes compostos em animais (SCHRODER, 2016).

Na comunidade Européia, a abamectina é apontada como suspeita de provocar efeitos adversos ao ambiente aquático, mesmo quando presente em baixas concentrações, devido à sua alta toxicidade aos organismos que nele vivem, tais como, peixes e microcrustáceos (TISLER, 2006).

Os produtos farmacêuticos veterinários e agrotóxicos podem entrar no ambiente a partir de resíduos animais e do escoamento de chuvas, agindo como poluentes de fontes difusas. Também podem causar contaminação na forma de poluição pontual, devido ao descarte de efluente das indústrias produtoras e/ou por meio do descarte inadequado da água resultante da lavagem de embalagens de agrotóxicos contendo resíduos destes princípios ativos.

A relação entre o uso de produtos veterinários e a presença de seus resíduos no ambiente tem sido investigada por diversos autores, como SAMMARTINO (2008), TERNES (2003), e, DAUGTHON e TERNES (1999).

2.6 Metodologia analítica

Foi realizada uma revisão bibliográfica para verificar o que já existe na literatura para a determinação quantitativa do nadolol,ivermectina e abamectina.

Na **Tabela 1** estão apresentados os métodos descritos na literatura para análise do nadolol.

Tabela 1. Métodos analíticos descritos na literatura para a determinação do nadolol

Referência	Método	Condições experimentais
ARAFAH, 2016	CLAE (Nadolol – separação dos enantiômeros)	Fase móvel: etanol: hexano: dietilamina (20: 80:0,1 v/v/v), coluna: Chiralpack IA (250 × 4.6 mm), tempo de retenção de 5 a 30min.
RIBEIRO, 2013	CLAE (Nadolol – separação dos enantiômeros)	Fase móvel: hexano: etanol: dietilamina (80: 20:0,3 v/v/v), coluna: Chiralpack AD (250 × 4.6 mm), tempo de retenção de 8 a 32 min.
SUNG, 2010	CLAE (Nadolol – separação dos enantiômeros)	Fase móvel: hexano: etanol: dietilamina: THF (85: 15: 0,6:0,1 v/v/v), coluna: Chiralpack AD-H (5 µm, 25 × 500 mm), 230 nm, tempo de retenção de 10 a 60 min. .
SINGH, 2006	CLAE (Nadolol – separação dos enantiômeros)	Fase móvel: hexano: etanol: dietilamina: ácido acético (87: 13: 0,2: 0,2 v/v/v/v);, coluna: Chiralcel OD®; (250 x 4.6 mm, 10 µm), 276 nm, tempo de retenção de 15 a 33 min.
MCCARTHY, 1994	CLAE (Nadolol – separação dos enantiômeros)	Fase móvel: etanol: hexano: dietilamina (80: 20:0,3 v/v/v), coluna: Chiralpack AD (250 × 4.6 mm), tempo de retenção de 6 a 32 min.
HOSHINO, 1994	CLAE (Nadolol – separação parcial dos enantiômeros)	Fase móvel: hexano: propanol (80: 20 v/v) com 0,1 % dietilamina, coluna: Chiralpack AD (250 × 4.6 mm), detecção 239 nm, tempo de retenção de 15 a 30 min.

cont.

cont.

Referência	Método	Condições experimentais
DYAS, 1991	CLAE (Nadolol – separação dos enantiômeros)	Fase móvel: hexano: etanol: acetonitrila (45:5:1 v/v/v), coluna: CHI:L:LEU® (250 × 4.6 mm), tempo de retenção de 25 a 40 min. .
UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2016	CLAE (Nadolol total)	Fase móvel reversa: metanol: água (700: 1300 v/v) + 5,84 g de cloreto de sódio e 1 mL de ácido clorídrico 1 N, coluna: dimethylsilano quimicamente ligado a silica porosa (250 × 4.6 mm), detecção a 220 nm.
CALATAYUD-PASCUAL, 2011	CLAE (Nadolol total)	Fase móvel: hexano: fosfato dihidrogenado de amônio: acetonitrila pH 4,8 (80: 20 v/v), coluna: C18 (250 x 4.0 mm, 5 mm), detecção a 269 nm, tempo de retenção de 3,6 min. .
GALERA, 2010	CLAE (Nadolol total)	Fase móvel: metanol: tampão fosfato 0,025 mol/L^{-1}, pH 3: metanol: acetonitrila (Gradiente), coluna: **:** C18 (4,6 x 150 mm), detector de DAD no intervalo de 200-350 nm, tempo de retenção: ± 28 minutos.
FLIEGER, 2010	CLAE (Nadolol total)	Fase móvel: (A) ácido pentafluoropropiônico 20 mM em acetonitrola: água (9:1) e (B) ácido pentafluoropropiônico 20 mM em água (Gradiente), coluna: Zorbax Extend-C18®; (150 x 4.6 mm), detecção a 220 nm, tempo de retenção 2,72 min.

cont.

cont.

Referência	Método	Condições experimentais
FRANCESCO, 2009	CLAE (Nadolol total)	Fase móvel: tampão fosfato 0,01 M pH 7,0: metanol (90:10) v/v, coluna: Chiral-AGP® (100 x 4,0 mm).
VÁSQUEZ, 2010	CLAE (Nadolol total)	Fase móvel: tampão fosfato 25 mM, pH 3 : metanol (90:10) v/v, coluna: C18 (150 x 4,6 mm), detecção por fluorescência: excitação entre 227-232 nm e emissão em 300-302 nm, tempo de retenção: ± 7 minutos.
TSUBONE, 2008	CLAE (Nadolol total)	Fase móvel: **:** acetonitrila: água (15:85 v/v) com 0,1 % de trietilamina, pH 4,6 ajustado com ácido fórmico; coluna: LiChrospher C18® (125 x 4.0 mm, 5 µm), detecção por fluorescência: excitação 230 nm e emissão em 300 nm, tempo de retenção ± 4 min.
WANG, 2003	CLAE (Nadolol total)	Fase móvel: tampão trietilamina 1 %, pH 5,5 : metanol (80:20) v/v, coluna: sílica-gel ß-CD® (250 x 4,6 mm, 15 µm), detecção a 280 nm.
GUPTA, 1983	CLAE (Nadolol total)	Fase móvel: acetonitrila: água: ácido perclórico solução 70g/L: hidróxido de tetrametilamônio solução 160 g/L (175:825:0,5: 0,5) v/v/v/v, coluna: PRP-1 (150 x 4,1 mm, 10 µm), detecção por fluorescência: excitação entre 265 nm e emissão em 305 nm.
BUSZEWKI, 2009	CLAE/MS (Nadolol total)	Fase móvel: acetonitrila com acetato de amônio 0,05 M (Gradiente); coluna: Zorbax SB® C18 (150 mm x 2,1 mm, 3,5 µm), detecção a 255-340 nm, tempo de retenção: ± 6 min.

cont.

cont.

Referência	Método	Condições experimentais
LEE, 2007	CLAE/MS (Nadolol total)	Fase móvel: água: acetonitrila: ácido fórmico (94,5:5:0,5) v/v/v gradiente, coluna: Zorbax SB-C8 (150 x 4,6 mm), 220 nm, tempo de retenção: ± 13.60 minutos.
FONTELA, 2010	UHPLC (Nadolol total)	Fase móvel reversa: acetonitrila com 0,1 % de ácido fórmico: tampão composto de ácido fórmico 10 mM e formiato de amônio (pH 3,5); coluna: Acquity® C18 (100 mm x 2,1 mm, 1,7 µm), detecção a 310 nm, tempo de retenção: ± 3,22 min.
TAMISIER-KAROLAC, 1999	EC (Nadolol – separação dos enantiômeros)	Fase móvel: tampão fosfato 10 mM/ 10 g/L β-ciclodextrina (25:75) v/v, 15 Kv, 30 °C, capilar: sílica 47 cm 50 µm (diâmetro interno), detecção a 200 nm, tempo de retenção: 14-27 minutos.

Na **Tabela 2** estão apresentados os métodos descritos na literatura para a determinação quantitativa da ivermectina.

Tabela 2. Métodos analíticos descritos na literatura para a determinação da ivermectina

Referência	Método	Condições experimentais
UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2016	CLAE (Ivermectina H_2B_{1a} e H_2B_{1b})	Fase móvel: acetonitrila: metanol: água (53:27,5:19,5) v/v/v, coluna: C18 (4,6 x 250 mm), detecção a 254 nm.
KULIK, 2011	CLAE (Ivermectina H_2B_{1a} e H_2B_{1b})	Fase móvel: A: acetonitrila: água (40:60) v/v e B: acetonitrila, coluna: Supelcosil LC-ABZ® (4,6 x 250 mm), detecção a 245 nm, tempo de retenção: ± 24 minutos.
CHIU, 1985	CLAE (Ivermectina H_2B_{1a} e H_2B_{1b})	Fase móvel reversa: (A) acetonitrila: metanol: água (49,2:32,8:18) v/v/v e (B) Acetonitrila: Metanol: Água (56,4:37,6:6) v/v/v, coluna: Zorbax ODS® (4,6 x 250 mm), detecção a 245 nm, tempo de retenção: ± 30 minutos.
DAHIYA, 2010	CLAE/ MS (Ivermectina H_2B_{1a} e H_2B_{1b})	Fase móvel: formato de amônio 5 mM: ácido fórmico 0,1 % em metanol (10:90) v/v, coluna: Waters X Terra MS C-18® 5µm (2,1 x 150 mm), tempo de retenção: ± 2 minutos.
YOSHII, 2004	CLAE/ MS (Ivermectina H_2B_{1a})	Fase móvel: A: acetato de amônio 0,2 % em metanol e B: acetato de amônio 0,2% em água (Gradiente), coluna: Sep-Pak® C18 5µm (2,0 x 150 mm), tempo de retenção: ± 14,0 minutos.
CROUBELS, 2002	CLAE/ MS (Ivermectina H_2B_{1a})	Fase móvel: ácido acético 0,2 % em água e ácido acético 0,2 % em acetonitrila: (Gradiente) v/v, coluna: Nucleosil C18® 5µm (3,0 x 100 mm), detecção a 280 nm.
PRABHU, 1991	CLAE (Ivermectina H_2B_{1a})	Fase móvel: metanol: água (97:3) v/v, coluna: C18 5µm (4,6 x 150 mm), detecção por fluorescência: 365 nm (excitação) e 418 emissão, tempo de retenção: ± 13 minutos.

cont.

cont.

Referência	Método	Condições experimentais
COSTA, 2012	CLAE (Ivermectina total)	Fase móvel: metanol: água -gradiente (50:50 até 100:0) v/v, coluna: Zorbax Eclipse XDB C8® 5µm (4,6 x 150 mm), detecção a 246 nm, tempo de retenção: ± 10 minutos.
SANYAY, 2012	CLAE (Ivermectina total)	Fase móvel: acetonitrila: metanol: água (75:15:10) v/v/v, coluna: Insertil C18® 5µm (4,6 x 250 mm), detecção a 254 nm, tempo de retenção: ± 9,6 minutos.
CEBALOS, 2010	CLAE (Ivermectina total)	Fase móvel: acetonitrila: tampão acetato de amônio 0,025 M pH 6,6 (97:3) v/v, coluna: Selectosil® C18 5µm (4,6 x 250 mm), detecção a 300 nm, tempo de retenção: ± 13 minutos.
CIONE, 2007	CLAE (Ivermectina total)	Fase móvel: metanol: acetonitrila: acido acético 0,2 % (260: 640:100) v/v/v, coluna: ACE- C18® 5µm (4,6 x 250 mm), detecção a 254 nm, tempo de retenção: ± 10 minutos.
NA-BANGCHANG, 2006	CLAE (Ivermectina total)	Fase móvel: acetonitrila: metanol:água (50:45:5) v/v/v, coluna: Hypersil Gold® C18 5µm (4,6 x 150 mm), detecção por fluorescência: 365 nm (excitação) e 475 emissão, tempo de retenção: ± 7,0 minutos.
FOX, 1985	CLAE (Ivermectina total)	Fase móvel: acetonitrila: metanol: água (53:35:7) v/v/v, coluna: Zorbax ODS (DuPont)® 5µm (4,6 x 250 mm), detecção a 245 nm, tempo de retenção: ± 11 minutos.
PIMENTEL-TRAPERO, 2016	CLAE (Ivermectina total)	Fase móvel: metanol: água (85:15) v/v gradiente, coluna: C18 3µm (4,6 x 50 mm), detecção por fluorescência: 365 nm (excitação) e 470 emissão, tempo de retenção: ± 17 minutos.
MACEDO, 2015	CLAE (Ivermectina total)	Fase móvel: acetonitrila: água (85:15) v/v gradiente, coluna: C18 5µm (4,6 x 150 mm), 365 nm (excitação) e 470 emissão, tempo de retenção: ± 11 minutos.

cont.

cont.

Referência	Método	Condições experimentais
XIE, 2011	CLAE (Ivermectina total)	Fase móvel: acetonitrila: metanol: água (1:2) v/v gradiente, coluna: C18 5µm (4,6 x 250 mm), detecção por fluorescência: 254 nm (excitação) e 400 emissão, tempo de retenção: ± 15 minutos.
CERKVENIK-FLAJSA, 2010	CLAE (Ivermectina total)	Fase móvel: acetonitrila: metanol: água (47:47:6) v/v/v, coluna: Supelcosil LC-8 5µm (4,6 x 150 mm), detecção por fluorescência: 364 nm (excitação) e 470 emissão, tempo de retenção: ± 6 minutos.
LOBATO, 2006	CLAE (Ivermectina total)	Fase móvel: metanol: água (96:4) v/v, coluna: RP-18 LiChroCart® 5µm (4,0 x 125 mm), detecção por fluorescência: 246 nm, tempo de retenção: ± 11 minutos.
SOUZA, 2003	CLAE (Ivermectina total)	Fase móvel: metanol, coluna: Lichrosorb RP 18, 7µm (4,0 x 250 mm), detecção por fluorescência: 364 nm (excitação) e 426 emissão, tempo de retenção: ± 12 minutos.
KNOLD, 2002	CLAE (Ivermectina total)	Fase móvel: acetonitrila: água: (94:6) v/v, coluna: Hypersil ODS® 3µm (4,0 x 100 mm), detecção por fluorescência: 365 nm (excitação) e 475 emissão, tempo de retenção: ± 8,5 minutos.
COUTO, 2000	CLAE (Ivermectina total)	Fase móvel: metanol: água: (95:5) v/v, coluna: Varian C18® 5µm (4,6 x 250 mm), detecção por fluorescência: 364 nm (excitação) e 440 emissão.
FINK, 1996	CLAE (Ivermectina total)	Fase móvel: acetonitrila:THF:água (6:2:1) v/v/v, coluna: Zorbax C18 5µm (4,6 x 250 mm), detecção por fluorescência: 365 nm (excitação) e 475 emissão, tempo de retenção: ± 18 minutos.
IOSIFIDOU, 1994	CLAE (Ivermectina total)	Fase móvel: metanol: água (97:3) v/v, coluna: C18 5µm (3,9 x 150 mm), detecção a 254 nm, tempo de retenção: ± 10 minutos.

cont.

cont.

Referência	Método	Condições experimentais
PRABHU, 1991	CLAE (Ivermectina H_2B_{1a})	Fase móvel: metanol: água (97:3) v/v, coluna: C18 5µm (4,6 x 150 mm), 365 nm (excitação) e 418 emissão, tempo de retenção: ± 13 minutos.
TWAY, 1981	CLAE (Ivermectina total)	Fase móvel: metanol: água (95:5) v/v, coluna: Zorbax ODS (DuPont)® (4,6 x 150 mm), detecção por fluorescência: 364 nm (excitação) e 440 emissão, tempo de retenção: ± 14 minutos.
TAO, 2012	CLAE/ MS (Ivermectina total)	Fase móvel: A: metanol e B: tampão formiato de amônio, contendo 5 mM de formato de amônio e 0,1 % de ácido fórmico (30:70) v/v gradiente, coluna: Thermo Hypersil Gold® C18 5µm (2,1 x 100 mm), tempo de retenção: ± 14 min.
THOMPSON, 2009	CLAE/ MS (Ivermectina total)	Fase móvel: Acetonitrila com 0,1 % ácido fórmico: metanol com 0,1 % ácido fórmico:água com 0,1 % ácido fórmico: acetato de etileno (Gradiente), coluna: WatersXterra MS C18 3,5µm (2,1 x 20 mm), , tempo de retenção: ± 23 minutos.
MONTIU, 2008	CLAE/ MS (Ivermectina total)	Fase móvel: A: acetonitrila: metanol: tampão formiato de amônio 10 mM pH 4,0 (43:34:23) v/v/v e B: acetonitrila (gradiente), coluna: Xterra® MS C8(4,6 x 250 mm), detecção a 254 nm, tempo de retenção: ± 18 minutos.
LIU, 2011	UHPLC (Ivermectina total)	Fase móvel: acetonitrila: água: (95:5) v/v, coluna: BEH Phenyl® 1,7µm (2,1 x 50 mm), detecção por fluorescência: 365 nm (excitação) e 470 emissão.
ROMERO-GONZÁLES, 2011	UHPLC (Ivermectina total)	Fase móvel: A: ácido fórmico 0,05 % em água e B: metanol (gradiente), coluna: Acquity UPLC BEH® 1,7µm (2,1 x 100 mm), detecção por fluorescência: 365 nm (excitação) e 470 emissão, tempo de retenção: ± 3,85.
KOWALSKI, 2004	EC (Ivermectina total)	Fase móvel: tampão tetraborato de sódio decahidratado em metanol 0,01 M (25:75) v/v, 30 Kv, 25 °C, capilar: sílica 47 cm 50 µm (diâmetro interno), detcção a 254 nm, tempo de retenção: ± 4,0 minutos.

cont.

cont.

Referência	Método	Condições experimentais
SANBONSUGE, 2011	CG (Ivermectina total)	Coluna: InertCap_-5MS-Sil capilar de sílica fundida GC® 0,25µm (30 m x 0,25 mm d.i), temperatura inicial de 100 °C chegando a temperartura final de 300 °C, tempo de retenção: ± 14 minutos.

Na **Tabela 3** estão apresentados os métodos descritos na literatura para a determinação de abamectina.

Tabela 3. Métodos analíticos descritos na literatura para a determinação da abamectina

Referência	Método	Condições experimentais
KULIK, 2011	CLAE (Abamectina H_2B_{1a} e H_2B_{1b})	Fase móvel: A: acetonitrila: água (40:60) v/v e B: acetonitrila v/v, coluna: Supelcosil LC-ABZ® (4,6 x 250 mm), detecção a 245 nm, tempo de retenção: ± 21 minutos.
RAHMAN, 2013	CLAE (Abamectina H_2B_{1a} e H_2B_{1b})	Fase móvel: metanol:água (94:6) v/v, coluna: C18 5µm (4,6 x 250 mm), detecção por fluorescência: 365 nm (excitação) e 470 emissão, tempo de retenção: ± 9 minutos.
BORGES, 2007	CLAE (Abamectina H_2B_{1a} e H_2B_{1b})	Fase móvel: acetonitrila: metanol: água (5: 47,5: 47,5) v/v/v, coluna: C18 4µm (3,9 x 150 mm), detecção por fluorescência: 365 nm (excitação) e 470 emissão, tempo de retenção: ± 5 minutos.
KOLAR, 2003	CLAE/ Fluorescência (Abamectina H_2B_{1a})	Fase móvel: acetonitrila: metanol: água (47,5: 47,5: 6) v/v/v, coluna: C-18 4µm (3,9 x 150 mm), detecção por fluorescência: 365 nm (excitação) e 470 emissão, tempo de retenção: ± 19 minutos.

cont.

cont.

Referência	Método	Condições experimentais
DISERENS, 1999	CLAE (Abamectina H_2B_{1a} e H_2B_{1b})	Fase móvel: A: acetonitrila: água (40:60) v/v e B: acetonitrila, coluna: LiChrocart® C18 5µm (4,0 x 125 mm), detecção por fluorescência 365 nm (excitação) e 470 emissão, tempo de retenção: ± 10 minutos.
PIMENTEL-TRAPERO, 2016	CLAE (Abamectina total)	Fase móvel: metanol: água (85:15) v/v gradiente, coluna: C18 3µm (4,6 x 50 mm), detecção por fluorescência: 365 nm (excitação) e 470 emissão, tempo de retenção: ± 16 minutos.
YOSHII, 2004	CLAE/ MS (Abamectina H_2B_{1a})	Fase móvel: A: acetato de amônio 0,2 % em metanol e B: acetato de amônio 0,2 % em água (30:70) v/v (gradiente), coluna: Sep-Pak® C18 5µm (2,0 x 150 mm), tempo de retenção: ± 13,0 minutos.
XIE, 2011	CLAE (Abamectina total)	Fase móvel: acetonitrila: metanol: água (Gradiente), coluna: C18 5µm (4,6 x 250 mm), detecção por fluorescência: 254 nm (excitação) e 400 emissão, tempo de retenção: ± 10 minutos.
SOUZA, 2003	CLAE (Abamectina total)	Fase móvel: metanol, coluna: Lichrosorb RP 18, 7µm (4,0 x 250 mm), detecção por fluorescência: 364 nm (excitação) e 426 emissão, tempo de retenção: ± 7 minutos.
TAO, 2012	CLAE/ MS (Abamectina total)	Fase móvel: A: metanol e B: tampão formiato de amônio, contendo 5 mM de formato de amônio e 0,1 % de ácido fórmico (30:70) v/v gradiente, coluna: Thermo Hypersil Gold® C18 5µm (2,1 x 100 mm), tempo de retenção: ± 12 min.
RÜBENSAM, 2011	CLAE/ MS (Abamectina total)	Fase móvel: : tampão acetato de amônio 50 mM: acetonitrila (5:95) v/v, coluna: Luna® C18 5µm (2,1 x 150 mm), detecção por fluorescência: 365 nm (excitação) e 470 emissão tempo de retenção: ± 19 minutos.

cont.

cont.

Referência	Método	Condições experimentais
THOMPSON, 2009	CLAE/ MS (Abamectina total)	Fase móvel: acetonitrila com 0,1 % ácido fórmico: metanol com 0,1 % ácido fórmico: água com 0,1 % ácido fórmico: acetato de etileno com 0,1 % ácido fórmico (50:0:50) (gradiente), coluna: WatersXterra MS C18 3,5µm (2,1 x 20 mm), , tempo de retenção: ± 21 minutos.
VALENZUELA, 2000	CLAE/ MS (Abamectina total)	Fase móvel: metanol : água (90:10) v/v, coluna: C18 5µm (2,1 x 150 mm), tempo de retenção: ± 13 minutos.
ROMERO-GONZÁLES, 2011	UHPLC/ Fluorescência (Abamectina total)	Fase móvel:. A: ácido fórmico 0,05 % em água e B: metanol (50:50) v/v (gradiente), coluna: Acquity UPLC BEH® 1,7µm (2,1 x 100 mm), detecção por fluorescência: 365 nm (excitação) e 470 emissão, tempo de retenção: ± 3,8.
LIU, 2011	UHPLC/ Fluorescência (Abamectina total)	Fase móvel: acetonitrila: água: (95:5) v/v, coluna: BEH Phenyl® 1,7µm (2,1 x 50 mm), detecção por fluorescência: 365 nm (excitação) e 470 emissão.

2.7 TÉCNICAS ANALÍTICAS

2.7.1 Cromatografia em fase líquida de alta eficiência (CLAE)

A cromatografia é um método físico-químico de separação. Está fundamentada na migração diferencial dos componentes de uma mistura, que ocorre devido a diferentes interações, entre duas fases imiscíveis, a fase móvel e a fase estacionária. A grande variedade de combinações entre fases móveis e estacionárias torna-a uma técnica extremamente versátil e de grande aplicação.

A separação das substâncias solubilizadas em fase móvel ocorre de acordo com suas diferentes velocidades de migração em razão da afinidade relativa entre a fase móvel (líquido) e a fase fixa ou estacionária (sólido) (FERREIRA, 2008).

O método cromatográfico possibilita a separação de várias substâncias presentes em uma mesma amostra desde que os componentes presentes sejam solubilizados em um meio líquido chamado de fase móvel. Esse líquido mantido em movimento faz com que todos os componentes nele solubilizados caminhem em uma mesma direção. Durante seu percurso as substâncias entram em contato com uma outra fase, sendo esta imiscível na fase móvel, chamada de fase estacionária (GIL, 2007).

A cromatografia pode ser utilizada para a identificação de compostos, por comparação com padrões previamente existentes, para a purificação de compostos, separando-se as substâncias indesejáveis e para a separação dos componentes de uma mistura.

O papel do solvente neste tipo de cromatografia é fundamental, pois as moléculas da fase móvel competem pelos sítios de adsorção polar, com as moléculas do soluto.

Entre as vantagens do emprego da CLAE, podem ser citadas:

- Procedimento simples e razoavelmente rápido; exige conhecimento das variáveis cromatográficas sobre as interações intermoleculares, que conduzem à separação.

- A análise instrumental permite maior resolução, automação de operações, registro e processamento da informação obtida.

- São requeridas apenas pequenas quantidades de amostra, podendo-se fazer uso de quantidades menores de material (AQUINO NETO, 2003).

- Entre os métodos analíticos mais empregados para a separação, identificação e quantificação de enantiômeros estão a cromatografia em fase líquida de alta eficiência com fase estacionária quiral (CLAE-FEQ), e pode ser empregada para um grande número de substâncias (LIMA, 1997, SING, 2006).

2.7.1.1 Cromatografia em fase líquida de alta eficiência (CLAE) aplicada a análise de enantiômeros

Temos dois tipos de métodos cromatográficos para análise de enantiômeros: os métodos indiretos e os métodos diretos.

- **Métodos cromatográficos indiretos:** consistem na transformação de enantiômeros em diastereômeros, e com isso permite a utilização de métodos não quirais de cromatografia. No entanto, tais transformações demandam tempo e nem sempre são reversíveis (LINDNER, 1985). O método recebe esse nome, pois, através dele, são separados solutos que se comportam como diastereômeros e não como enantiômeros (GAL, 1993). Usa-se um reagente de derivatização quiral para converter os enantiômeros em diastereômeros. As reações mais comuns envolvendo os reagente de derivatização quiral são aquelas que levam à formação de amidas, carbamatos e uréias quirais, entre outras. Além disso, usualmente se obtém a separação dos diastereômeros formados empregando-se uma fase estacionária aquiral, embora uma fase estacionária quiral também possa ser utilizada. A utilização da técnica fica limitada a moléculas enantioméricas que possuam grupos funcionais facilmente derivatizáveis, o que é um inconveniente (SNYDER, 1997; GAL, 1993).

- **Métodos cromatográficos diretos:** fundamentam-se na formação de complexos moleculares diastereoméricos transitórios entre os enantiômeros a serem separados e um seletor quiral. Um método de separação enantiomérica por CLAE é considerado direto se ele realmente envolve a separação de moléculas que se relacionam entre si como enantiômeros, ou seja, moléculas não convertidas, através de ligações covalentes com um reagente quiral (RQ), em seus derivados diastereomericamente relacionados. No entanto, mesmo em um método direto, os enantiômeros originais podem ou não ser derivatizados através da reação com um reagente aquiral. São mais rápidos e não geram transformações irreversíveis dos enantiômeros (LINDNER, 1985; SNYDER, 1997). Podem ser utilizados com o emprego de aditivos quirais na fase móvel ou de uma fase estacionária quiral. Os aditivos quirais são menos freqüentemente utilizados devido aos problemas que lhes são inerentes, como a necessidade de seu fornecimento contínuo que, aliada aos preços geralmente elevados, torna essa abordagem menos atraente. Desde 1980 a utilização de fase estacionária quiral tem sido predominante nas separações enantioméricas por CLAE, pois podem ser empregadas para um grande número de substâncias (LIMA, 1997, SING, 2006 LINDNER, 1985).

Pode-se, ainda, empregar a CLAE em fase reversa ou normal. No entanto, a última é preferida, devido à sua melhor seletividade para isômeros (SNYDER, 1997).

Na prática, mais de 95 % de compostos racêmicos podem ser resolvidos com sucesso por meio de cromatografia utilizando uma das fases estacionárias quirais a base de polissacarídio disponíveis atualmente. Especificamente, cerca de 90 % de racematos podem ser separados analiticamente em apenas quatro fases quirais estacionárias, isto é, tris (3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose (Chiralpak® AD), tris (3,5- dimetilfenilcarbamato) de

celulose (Chiracel® OD) , tris (S)-methylbenzylcarbamate de amilose (Chiralpak® AS) , e tris (p - metilbenzoato) de celulose (Chiracel® OJ) . Todas estas fases estacionárias quirais são produzidas por revestimento físico dos polímeros quiral numa matriz (ZANG, 2005) .

2.7.2 Eletroforese capilar

Como quase todas as boas idéias, a eletroforese capilar (EC) é fácil e eficiente. O equipamento é constituído por componentes simples e perfeitamente controlados, proporcionando a reprodutibilidade e a confiabilidade requeridas para a validação dos métodos analíticos empregados no controle de qualidade de medicamentos.

Para a separação de alguns compostos com estruturas muito complexas, tais como princípios ativos altamente polares, enantiômeros e compostos básicos, a EC oferece vantagens muito significativas em relação a CLAE. A EC permite, ainda, fácil validação de ensaios quantitativos para determinação de traços de impurezas, assim como para a determinação quantitativa de vários compostos em fluídos biológicos (SANTORO, 2000).

A EC pode ser definida como o transporte de partículas eletricamente carregadas, em meio líquido, sob a influência de um campo elétrico. A separação eletroforética em capilares foi relatada na literatura na década de 70.

A EC é utilizada na análise de compostos polares iônicos e não-iônicos, biomoléculas de elevada massa molecular e compostos quirais. O mesmo capilar pode ser utilizado para separação e análise de compostos polares, não-polares, substâncias quirais e biomoléculas volumosas, como proteínas, peptídeos e carboidratos. (SANTORO, 2000).

A maioria dos métodos de EC emprega detectores baseados em absorções nas regiões UV e UV-VIS (SANTORO, 2000).

Os módulos que compõe o sistema de EC são muito similares aos de um cromatógrafo líquido. A principal diferença é a utilização de uma fonte de alta voltagem para impulsionar o tampão através do capilar, em vez da bomba empregada em cromatografia em fase líquida (LANÇAS, 2004).

Compostos polares e não polares podem ser analisados por EC e por CLAE. As duas técnicas podem ser utilizadas para análises de compostos ionizados, incluindo cátions e ânions inorgânicos. Em EC o eletrólito é normalmente uma solução tampão aquosa. É possível injetar diretamente a amostra, sem nenhum tratamento prévio.

Na EC, algumas vezes, adiciona-se pequena quantidade de solvente orgânico à solução tampão com o objetivo de solubilizar as substâncias que apresentem baixa solubilidade em água. A solução tampão empregada na EC pode abranger ampla faixa de pH. Nas colunas utilizadas em CLAE, a maioria, não devem ser empregadas fases móveis com pH acima de 8,0.

A técnica pode ser aplicada na determinação quantitativa de fármacos em formulações farmacêuticas. Nestes casos, o fármaco se encontra misturado com diversos excipientes que asseguram a reprodutibilidade de absorção pelo organismo (SANTORO, 2000).

2.5.3 Dicroísmo circular para identificação dos enantiômeros do nadolol

Como os enantiômeros não apresentam diferenças físicas e nem químicas, não podem ser analisados pelos métodos comuns. Estes estereoisômeros necessitam ser analisados por técnicas analíticas especiais, tanto do ponto de vista quali quanto quantitativos (LIMA, 1997).

A origem da palavra dicroísmo vem do grego dikhroos, cor-de-dois, e refere-se a qualquer dispositivo ótico que possa dividir um feixe de luz em dois feixes com diferentes comprimentos de onda (BEROVA, 2000).

O dicroísmo circular faz parte das técnicas ditas quirópticas, que são as técnicas ópticas capazes de diferenciar entre dois enantiômeros. As técnicas quirópticas incluem a polarimetria, a dispersão rotatória óptica e o dicroísmo circular. Nessas técnicas, a detecção de moléculas quirais é baseada na interação entre um centro quiral do analito e a onda eletromagnética polarizada incidente (PURDIE, 1989).

A técnica de dicroísmo circular permite a determinação da configuração absoluta de enantiômeros e se baseia na medida da diferença de intensidade de absorção entre a luz polarizada *dextro* e *levo*. Para execução desta metodologia, a substância a analisar deve absorver na região do ultravioleta e ser comparada com uma substância de configuração conhecida que tenha os substituintes semelhantes (ou próximos) ao redor do centro estereogênico (LIMA, 1997).

É a técnica mais sofisticada e seletiva dentre as técnicas quirotrópicas, pois para que um analito apresente dicroísmo circular é necessário ter além do centro quiral um grupo cromóforo e ambos devem estar localizados a formar um quiróforo (arranjo formado por um centro quiral e um grupo cromóforo quando se encontram adjacentes um ao outro) (ZHANG, 2004; PURDIE, 1989).

Os enantiômeros possuem a propriedade de absorver de formas diferenciadas a luz circularmente polarizada à esquerda e a luz circularmente polarizada à direita (ZHANG, 2004).

2.5.4 Difração de Raios X para avaliação do nadolol matéria-prima

Esta técnica física é baseada na propriedade intrínseca que cada cristal possui em difratar os raios X incidentes num ângulo específico, permitindo sua caracterização. A equação matemática que descreve este fenômeno é dada pela Lei de Bragg (SKOOG, 2002). Sólidos cristalinos possuem arranjos, regulares e repetidos, de moléculas ou íons, em uma estrutura chamada rede cristalina (FLORENCE, 2011).

Os cristais de uma determinada substância podem variar de tamanho no desenvolvimento relativo de uma determinada face, bem como no número e tipos de faces ou formas presentes apresentando diferentes hábitos cristalinos. O hábito descreve a forma de um cristal, em termos gerais e inclui, por exemplo, os tipos acicular (em forma de agulha), prismático, piramidal, tabular, equidimensional (equant), colunar e lamelar. O hábito cristalino pode influenciar a facilidade de compressão de um comprimido, bem como as propriedades de um fármaco no estado sólido. Tem sua importância também na administração dos medicamentos. A facilidade para injetar uma suspensão contendo um fármaco na forma cristalina será influenciada pelo hábito cristais placóides que são mais fáceis de injetar do que cristais aciculares (FLORENCE, 2011).

3. OBJETIVOS

- **Objetivo geral**

O objetivo da presente pesquisa foi primeiramente a realização da validação dos sistemas computadorizados dos equipamentos de cromatografia em fase líquida de alta eficiência (CLAE) e de eletroforese capilar (EC) de forma a assegurar a confiabilidade dos sistemas a serem utilizados.

- **Objetivo específico**

Desenvolver e validar métodos analíticos para a separação e quantificação dos enantiômeros do nadolol e dos homólogos presentes na abamectina e na ivermectina, em medicamentos, utilizando as técnicas de CLAE e EC.

Identificar as espécies enantioméricas do nadolol utilizando a técnica de dicroísmo circular, visto que as técnicas de CLAE e EC separam os enantiômeros, mas não os identifica.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

4.1.1 Reagentes

- Água purificada pelo sistema MilliQ®
- Acetonitrila grau cromatográfico (Marca: J.T.Baker®)
- Metanol grau cromatográfico (Marca: J.T.Baker®)
- Hexano grau cromatográfico (Marca: Merck®)
- Etanol absoluto grau cromatográfico (Marca: J.T.Baker®)
- Ácido acético p.a (Marca: J.T.Baker ®)
- Dietilamina p.a (Marca: Merck ®)
- Ácido fosfórico p.a (Marca: Synth®)
- Ácido clorídrico p.a (Marca: Synth®)
- Hidróxido de sódio p.a (Marca: Synth®)
- Peróxido de hidrogênio p.a (Marca: Synth®)

4.1.2 Padrões analíticos

- Ivermectina padrão secundário 97,92 % de pureza, sendo 95,06 % de ivermectina H_2B_{1a} e 2,86 % de ivermectina H_2B_{1b} foi doado por uma indústria farmacêutica.
- Abamectina (Marca: Sigma Aldrich®) 98,70 % de pureza, sendo 93,82 % de abamectina H_2B_{1a} e 4,88 % de abamectina $H_2B_{1b.}$
- Nadolol (Marca: Sigma Aldrich®) 99,10 % de pureza.

4.1.3 Amostras

4.1.3.1 Ivermectina

- Ivermectina comprimidos (6 mg/comprimido).
- Placebo ivermectina: celulose microcristalina (15 g), dióxido de silício (10 g), ácido cítrico (2 g), lauril sulfato de sódio (2 g), estearato de magnésio (5 g), butil-hidroxitolueno (BHT) (0,50 g), lactose (qsp 100 g).

4.1.3.2 Abamectina

- Abamectina gel a 1 %.
- Placebo abamectina: hidroxietilcelulose (1 g), água destilada (qsp 100 g), EDTA (0,10 g), solução conservante de parabenos (3,30 g), solução conservante de imidazolinidilureia 50 % (0,60 g).

4.1.3.3 Nadolol

- Nadolol cápsulas (40 mg/ cápsula). Fornecido por uma farmácia de manipulação.
- Placebo nadolol: aerosil (1 g), estearato de magnésio (1 g), amidoglicolato de sódio (10 g), celulose microcristalina (1 g).

4.1.4 Equipamentos

- Sistema cromatográfico HPLC 10 vp, marca Shimadzu®: degaseificador DGU-14A; bomba binária LC-10ADvp; injetor automático com “loop” de 50 µL Sil-10ADvp; compartimento de coluna CTO-10ACvp; detector de arranjo de diodos UV-Vis SPD-M10Avp; controlador do sistema SCL-10Avp; software Class-VP®.

- Sistema cromatográfico HPLC, marca Agilent® 1290 Infinity: G7117A 1290 DAD, G7116B 1290- MCJ, G7167 B-1290 Multisample, G7104 A-1290 Flexible PUMP, software ChemStation®.
- Sistema cromatográfico HPLC, marca Waters 2695®: com "loop" de 200 µL; detector de arranjo de diodos UV-Vis 2489; software Empower ®.
- Mass Q-TOF LC/MS 6530, marca Agilent® acoplado ao cromatógrafo à líquido Agilent® 1290 com detector DAD 1290
- Difratômetro marca Bruker modelo D8 Advance®, configurado segundo a geometria Bragg-Brentano, com motor de passo
- Dicroismo circular marca Jasco J-720 (Tokyo, Japan).
- Aparelho de eletroforese capilar marca Beckman Coulter Capillary Eletrophoresis System P/ACE MDQ
- Cubeta quartzo 350 µL de 0,05 cm
- pHmetro marca Quimis
- Balança analítica marca OHAUS
- Banho de ultrasom marca Thorton
- Coluna cromatográfica C18 LichroCart® 100 RP-18 (125 x 4 mm, 5 µm)
- Coluna cromatográfica Chiralcel OD® (250 x 4,6 mm, 10 µm)
- Capilar de sílica fundida de 40,2 cm sendo 30 cm efetivos até a coluna, 75 µm de diâmetro interno, marca Polymicro Technologies®.

4.2 MÉTODOS ANALÍTICOS

4.2.1 CROMATOGRAFIA EM FASE LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE) PARA QUANTIFICAÇÃO DA IVERMECTINA H_2B1_a e H_2B1_b

4.2.1.2 Metodologia

- **Preparação do padrão:** Pesar cerca de 5,00 mg de padrão de ivermectina e transferir para balão volumétrico de 25 mL. Adicionar cerca de 20 mL de fase móvel e levar ao ultrassom por 5 minutos. Completar o volume com fase móvel e homogeneizar. Filtrar em uma unidade filtrante de PTFE 0,45 µm, marca Millex® e transferir para um "vial".

- **Preparação da amostra:** Pesar cerca de 125,00 mg do pó do comprimido de ivermectina (correspondente a 5,00 mg de ivermectina) e transferir para balão volumétrico de 25 mL. Adicionar cerca de 20 mL de fase móvel e levar ao ultrassom por 5 minutos. Completar o volume para balão volumétrico de 25 mL com fase móvel e homogeneizar. Filtrar em uma unidade filtrante de PTFE 0,45 µm, marca Millex®e transferir para um "vial".

4.2.1.3 Condições analíticas

- **Fase móvel:** Acetonitrila e água (95:5, v/v) com 1 % ácido acético
- **Vazão:** 1,0 mL/min
- **Coluna:** Lichrocart® 100 RP-18 (125 x 4 mm, 5 µm)
- **Detecção:** UV 245 nm
- **Volume de injeção:** 20 µL
- **Temperatura:** 25 °C.

4.2.1.4 Validação do método analítico para determinação da ivermectina H_2B1_a e H_2B1_b por cromatografia em fase líquida de alta eficiência (CLAE)

A validação do método analítico para determinação da ivermectina H_2B1_a e H_2B1_b por cromatografia em fase líquida de alta eficiência (CLAE) foi realizada nas mesmas condições descritas no item 4.2.1.3.

4.2.1.4.1 Seletividade

A determinação da seletividade do método analítico foi realizada preparando-se soluções do padrão, amostras e fase móvel conforme descrito abaixo. As amostras foram preparadas em triplicata.

- **Preparação do padrão:** Pesar cerca de 5,00 mg de padrão de ivermectina e transferir para balão volumétrico de 25 mL. Adicionar cerca de 20 mL de fase móvel e levar ao ultrassom por 5 minutos. Completar o volume com fase móvel e homogeneizar. Filtrar em uma unidade filtrante de PTFE 0,45 µm, marca Millex® e transferir para um "vial".

- **Preparação da amostra:** Pesar cerca de 125,00 mg do pó do comprimido de ivermectina (correspondente a 5,00 mg de ivermectina) e transferir para balão volumétrico de 25 mL. Adicionar cerca de 20 mL de fase móvel e levar ao ultrassom por 5 minutos. Completar o volume para balão volumétrico de 25 mL com fase móvel e homogeneizar. Filtrar em uma unidade filtrante de PTFE 0,45 µm, marca Millex®e transferir para um "vial".

4.2.1.4.2 Linearidade

A linearidade de um método determina a proporcionalidade entre a concentração e a resposta obtida. É determinada através da construção da curva analítica (MARTIN-SMITH, 1990).

Na linearidade busca-se a obtenção de resultados que apresentem proporção direta às concentrações da substância em estudo. Para o estudo da linearidade, faz-se necessária a confecção de uma curva de resposta, sendo o eixo **x** o da concentração e o eixo **y** o da resposta obtida.

EQUAÇÃO 1 $y = ax + b$

Onde: a = coeficiente angular (expressa a inclinação da reta)

b = coeficiente linear (expressa a intersecção da curva aos eixos).

As amostras foram preparadas em triplicata.

- **Preparação da solução mãe de padrão:** Pesar exatamente cerca de 25,00 mg de padrão de ivermectina e transferir para balão volumétrico de 25 mL. Adicionar cerca de 20 mL de fase móvel e levar ao ultrassom por 5 minutos. Completar o volume com fase móvel e homogeneizar. Pipetar a quantidade correspondente para balão volumétrico de 5 mL (conforme **Tabela 4)**, para preparação das amostras nas cinco concentrações analisadas, completar o volume com fase móvel e homogeneizar. Filtrar em uma unidade filtrante de PTFE 0,45 µm, marca Millex®e transferir para um "vial"

Tabela 4. Preparação das amostras para a determinação da linearidade da ivermectina

H_2B_{1a} (µg/mL)	Volume da solução padrão (mL)	Balão volumétrico (mL)
152,10	0,8	5
171,11	0,9	5
190,12	1,0	5
209,13	1,1	5
228,14	1,2	5
H_2B_{1b} (µg/mL)	**Volume da solução padrão (mL)**	**Balão volumétrico (mL)**
4,57	0,8	5
5,15	0,9	5
5,72	1,0	5
6,29	1,1	5
6,86	1,2	5

4.2.1.4.3 Limite de detecção (LD)

É a concentração mínima detectada com precisão e exatidão especificada pelo método, porém não necessariamente quantificada (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNIA SANITÁRIA, 2003).

EQUAÇÃO 2 $$LD = \frac{\text{Desvio padrão médio x 3,3}}{\text{Inclinação da curva}}$$

O limite de detecção é calculado a partir de três curvas analíticas construídas contendo concentrações do fármaco próximas ao suposto limite de quantificação.

4.2.1.4.4 Limite de quantificação (LQ)

É a concentração mínima mensurada com precisão e exatidão especificada pelo método e dentro de valores aceitáveis (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNIA SANITÁRIA, 2003).

EQUAÇÃO 3

$$LQ = \frac{\text{Desvio padrão médio x 10}}{\text{Inclinação da curva}}$$

O limite de quantificação é calculado a partir de três curvas analíticas construídas contendo concentrações do fármaco próximas ao suposto limite de quantificação.

4.2.1.4.5 Repetibilidade

A determinação da repetibilidade do método analítico foi realizada preparando-se as soluções do padrão e da amostra conforme descrito abaixo. As amostras foram preparadas em 6 replicatas.

- **Preparação do padrão:** Pesar cerca de 5,00 mg de padrão de ivermectina e transferir para balão volumétrico de 25 mL. Adicionar cerca de 20 mL de fase móvel e levar ao ultrassom por 5 minutos. Completar o volume com fase móvel e homogeneizar. Filtrar em uma unidade filtrante de PTFE 0,45 µm, marca Millex® e transferir para um "vial".

- **Preparação da amostra:** Pesar cerca de 125,00 mg do pó do comprimido de ivermectina (correspondente a 5,00 mg de ivermectina) e transferir para balão volumétrico de 25 mL. Adicionar cerca de 20 mL de fase móvel e levar ao ultrassom por 5 minutos. Completar o volume para balão volumétrico de 25 mL com fase móvel

e homogeneizar. Filtrar em uma unidade filtrante de PTFE 0,45 µm, marca Millex®e transferir para um “vial”.

4.2.1.4.6 Precisão intermediária

A determinação da precisão intermediária do método analítico foi realizada preparando-se as soluções do padrão e da amostra conforme descrito a seguir. As amostras foram preparadas em triplicata e analisadas por dois dias consecutivos pelo mesmo analista.

- **Preparação do padrão:** Pesar cerca de 5,00 mg de padrão de ivermectina e transferir para balão volumétrico de 25 mL. Adicionar cerca de 20 mL de fase móvel e levar ao ultrassom por 5 minutos. Completar o volume com fase móvel e homogeneizar. Filtrar em uma unidade filtrante de PTFE 0,45 µm, marca Millex® e transferir para um “vial”.

- **Preparação da amostra:** Pesar cerca de 125,00 mg do pó do comprimido de ivermectina (correspondente a 5,00 mg de ivermectina) e transferir para balão volumétrico de 25 mL. Adicionar cerca de 20 mL de fase móvel e levar ao ultrassom por 5 minutos. Completar o volume para balão volumétrico de 25 mL com fase móvel e homogeneizar. Filtrar em uma unidade filtrante de PTFE 0,45 µm, marca Millex®e transferir para um “vial”.

4.2.1.4.7 Exatidão

É a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro.

A exatidão de um método deve ser determinada após o estabelecimento da linearidade, do intervalo linear e da especificidade, sendo verificada a partir de, no mínimo, 9 determinações

contemplando o intervalo linear do procedimento ou seja, em 3 concentrações, baixa, média e alta, com 3 réplicas de cada (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNIA SANITÁRIA, 2003).

- **Preparação da solução mãe de padrão:** Pesar exatamente cerca de 25,00 mg de padrão de ivermectina e transferir para balão volumétrico de 25 mL. Adicionar cerca de 20 mL de fase móvel e levar ao ultrassom por 5 minutos. Completar o volume com fase móvel e homogeneizar.

- **Preparação da solução mãe de amostra:** Pesar exatamente cerca de 625,00 mg de amostra do pó de comprimidos pulverizados de ivermectina (correspondente a 25 mg de ivermectina) e transferir para balão volumétrico de 25 mL. Adicionar cerca de 20 mL de fase móvel e levar ao ultrassom por 5 minutos. Completar o volume com fase móvel e homogeneizar.

- **Preparação das amostras adicionadas ao padrão:** Pipetar a quantidade correspondente de solução mãe padrão para balão volumétrico de 5 mL conforme **Tabela 5**. Acrescentar no mesmo balão a quantidade correspondente de solução amostra conforme descrito na **Tabela 5**. Completar com o volume com fase móvel e homogeneizar. Filtrar em uma unidade filtrante de PTFE 0,45 µm, marca Millex®e transferir para um “vial”.

As soluções do padrão e da amostra foram preparadas sem contaminação, para proceder aos cálculos de recuperação.

Tabela 5. Preparação de amostras para determinação da exatidão do método por CLAE para determinação da ivermectina

H_2B_{1a} (µg/mL)	Volume da soluçao do padrão (mL)	Volume da soluçao do amostra (mL)	Balão volumétrico (mL)
152,10	0,8	1,0	5
190,12	1,0	1,0	5
228,14	1,2	1,0	5

H_2B_{1b} (µg/mL)	Volume da soluçao do padrão (mL)	Volume da soluçao do amostra (mL)	Balão volumétrico (mL)
4,57	0,8	1,0	5
5,72	1,0	1,0	5
6,86	1,2	1,0	5

EQUAÇÃO 4 **Cálculos:** $\frac{\text{\% amostra padrão sem contaminação}}{\text{\% amostra contaminada}} \times 100$

4.2.1.4.8 Teste de estresse

As condições empregadas para realização do teste de estresse estão apresentadas na **Tabela 6.**

Tabela 6. Condições empregadas nos testes de estresse (KLICK, 2005)

Meio de reação	Temperatura (°C)	Tempo (horas)	Diluente
Ácido	80	2	HCL 1 mol/L
Alcalino	80	2	NaOH 1 mol/L
Oxidante	80	2	H_2O_2 3 %
Neutro	80	2	Água ultrapura

4.2.1.4.8.1 Teste de estresse em meio ácido

A determinação do teste de estresse em meio ácido foi realizada preparando-se as soluções do padrão e da amostra conforme descrito abaixo. As amostras foram preparadas em triplicata.

- **Preparação do padrão:** Pesar exatamente cerca de 25,00 mg de padrão de ivermectina, transferindo para balão volumétrico de 25 mL. Adicionar cerca de 20 mL de fase móvel e levar ao ultrassom por 5 minutos. Completar o volume com fase móvel e homogeneizar. Transferir 1,0 mL para erlemeyer de 100 mL e adicionar exatamente 1,0 mL de HCL 1 mol/L. Levar ao banho-maria a 80 °C por 2h. Após aquecimento e resfriamento à temperatura ambiente transferir para balão volumétrico de 5 mL lavando o erlemeyer com 3 mL de fase móvel. Completar o volume com fase móvel e homogeneizar. Filtrar em uma unidade filtrante de PTFE 0,45 µm, marca Millex®e transferir para um "vial".

- **Preparação da amostra:** Pesar exatamente cerca de 625,00 mg de comprimidos pulverizados de ivermectina (correspondente a 25 mg de ivermectina) e transferir para balão volumétrico de 25 mL. Adicionar cerca de 20 mL de fase móvel e levar ao ultrassom por 5 minutos. Completar o volume com fase móvel e homogeneizar. Transferir 1,0 mL para erlemeyer de 100 mL e adicionar exatamente 1,0 mL de HCL 1 mol/L. Levar ao banho-maria a 80 °C por 2 h. Após aquecimento e resfriamento à temperatura ambiente transferir para balão volumétrico de 5 mL lavando o erlemeyer com 3 mL de fase móvel. Completar o volume com fase móvel e homogeneizar. Filtrar em uma unidade filtrante de PTFE 0,45 µm, marca Millex®e transferir para um "vial"

4.2.1.4.8.2 Teste de estresse em meio alcalino

A determinação do teste de estresse em meio alcalino foi realizada preparando-se as soluções do padrão e da amostra conforme descrito abaixo. As amostras foram preparadas em triplicata.

- **Preparação do padrão:** Pesar exatamente cerca de 25,00 mg de padrão de ivermectina, transferindo para balão volumétrico de 25 mL. Adicionar cerca de 20 mL de fase móvel e levar ao ultrassom por 5 minutos. Completar o volume com fase móvel e homogeneizar. Transferir 1,0 mL para erlemeyer de 100 mL e adicionar exatamente 1,0 mL de NAOH 1 mol/L. Levar ao banho-maria a 80 °C por 2 h. Após aquecimento e resfriamento à temperatura ambiente transferir para balão volumétrico de 5 mL lavando o erlemeyer com 3 mL de fase móvel. Completar o volume com fase móvel e homogeneizar. Filtrar em uma unidade filtrante de PTFE 0,45 µm, marca Millex® e transferir para um "vial".

- **Preparação da amostra:** Pesar exatamente cerca de 625,00 mg de comprimidos pulverizados de ivermectina (correspondente a 25 mg de ivermectina) e transferir para balão volumétrico de 25 mL. Adicionar cerca de 20 mL de fase móvel e levar ao ultrassom por 5 minutos. Completar o volume para balão volumétrico de 25 mL com fase móvel e homogeneizar. Transferir 1,0 mL para erlemeyer de 100 mL e adicionar exatamente 1,0 mL de NAOH 1 mol/L. Levar ao banho-maria a 80 °C por 2 h. Após aquecimento e resfriamento à temperatura ambiente transferir para balão volumétrico de 5 mL lavando o erlemeyer com 3 mL de fase móvel. Completar o volume para

balão volumétrico de 5 mL com fase móvel e homogeneizar. Filtrar em uma unidade filtrante de PTFE 0,45 µm, marca Millex® e transferir para um "vial".

4.2.1.4.8.3 Teste de estresse em meio oxidante

A determinação do teste de estresse em meio oxidante foi realizada preparando-se as soluções do padrão e da amostra conforme descrito abaixo. As amostras foram preparadas em triplicata.

- **Preparação do padrão:** Pesar exatamente cerca de 25,00 mg de padrão de ivermectina, transferindo para balão volumétrico de 25 mL. Adicionar cerca de 20 mL de fase móvel e levar ao ultrassom por 5 minutos. Completar o volume com fase móvel e homogeneizar. Transferir 1,0 mL para erlemeyer de 100 mL e adicionar exatamente 1,0 mL de peróxido de hidrogênio 3 %. Levar ao banho-maria a 80 °C por 2 h. Após aquecimento e resfriamento à temperatura ambiente transferir para balão volumétrico de 5 mL lavando o erlemeyer com 3 mL de fase móvel. Completar o volume para balão volumétrico de 5 mL com fase móvel e homogeneizar. Filtrar em uma unidade filtrante de PTFE 0,45 µm, marca Millex® e transferir para um "vial".

- **Preparação da amostra:** Pesar exatamente cerca de 625,00 mg de comprimidos pulverizados de ivermectina (correspondente a 25 mg de ivermectina), transferir para balão volumétrico de 25 mL. Adicionar cerca de 20 mL de fase móvel e levar ao ultrassom por 5 minutos. Completar o volume com fase móvel e homogeneizar. Transferir 1,0 mL para erlemeyer de 100 mL e adicionar exatamente 1,0 mL de peróxido de hidrogênio 3 %. Levar ao banho-maria a 80 °C por 2 h. Após aquecimento e resfriamento à temperatura ambiente transferir para balão volumétrico de 5 mL

lavando o erlemeyer com 3 mL de fase móvel. Completar o volume com fase móvel e homogeneizar. Filtrar em uma unidade filtrante de PTFE 0,45 µm, marca Millex® e transferir para um "vial".

4.2.1.4.8.4 Teste de estresse em meio neutro

A determinação do teste de estresse em meio neutro foi realizada preparando-se as soluções do padrão e da amostra conforme descrito abaixo. As amostras foram preparadas em triplicata.

- **Preparação do padrão:** Pesar exatamente cerca de 25,00 mg de padrão de ivermectina, transferindo para balão volumétrico de 25 mL. Adicionar cerca de 20 mL de fase móvel e levar ao ultrassom por 5 minutos. Completar o volume com fase móvel e homogeneizar. Transferir 1,0 mL para erlemeyer de 100 mL e adicionar exatamente 1,0 mL de água ultrapura. Levar ao banho-maria a 80 °C por 2 h. Após aquecimento e resfriamento à temperatura ambiente transferir para balão volumétrico de 5 mL lavando o erlemeyer com 3 mL de fase móvel. Completar o volume com fase móvel e homogeneizar. Filtrar em uma unidade filtrante de PTFE 0,45 µm, marca Millex® e transferir para um "vial".

- **Preparação da amostra:** Pesar exatamente cerca de 625,00 mg de comprimidos pulverizados de ivermectina (correspondente a 25 mg de ivermectina) e transferir para balão volumétrico de 25 mL. Adicionar cerca de 20 mL de fase móvel e levar ao ultrassom por 5 minutos. Completar o volume com fase móvel e homogeneizar. Transferir 1,0 mL para erlemeyer de 100 mL e adicionar exatamente 1,0 mL de água ultrapura. Levar ao banho-maria a 80 °C por 2 h. Após aquecimento e resfriamento à temperatura ambiente transferir para balão volumétrico de 5 mL lavando o erlemeyer

com 3 mL de fase móvel. Completar o volume com fase móvel e homogeneizar. Filtrar em uma unidade filtrante de PTFE 0,45 µm, marca Millex® e transferir para um "vial".

4.2.1.4.8 Robustez

Para os ensaios de robustez as amostras foram preparadas conforme o item 4.2.1.2. Os testes foram realizados conforme "Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos", RE 899/2003 (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNIA SANITÁRIA, 2003). Foram empregadas as seguintes condições: alteração do comprimento de onda para 243 e 247 nm e da composição da fase móvel para: acetonitrila: água (96:4) com 1 % de ácido acético, e acetonitrila: água (94:6) com 1 % de ácido acético.

4.2.1.4.9 Estabilidade

Na avaliação da estabilidade das soluções do padrão e da amostra, estas soluções foram armazenadas a 25 °C durante 4 horas, e, a seguir analisadas e os resultados obtidos comparados com os das soluções preparadas inicialmente. O tempo de estabilidade proposto de 4 horas é justificado por ser o tempo, normalmente gasto, entre o preparo da amostra e a conclusão do ensaio.

4.2.1.5 Identificação das espécies moleculares da ivermectina H_2B1_a e H_2B1_b

Foi preparada uma solução padrão pesando-se exatamente cerca de 5,00 mg de ivermectina que foi transferida para balão volumétrico de 25 mL. Após a adição de 20 mL de fase móvel, a mistura foi sonicada durante 5 min. O volume foi completado com a fase móvel

e a solução final, filtrada num filtro Millex® PTFE 0,45 µm, antes de injecção na Q-TOF LC-MS.

A solução de amostra foi preparada pesando-se exatamente cerca de 125,00 mg do pó de comprimidos pulverizados de ivermectina (correspondente a 5,0 mg de ivermectina) e transferidos para balão volumétrico de 25 mL. Após a adição de 20 mL de fase móvel, a mistura foi sonicada durante 5 min. O volume foi completado com fase móvel e a solução final, filtrada em uma unidade filtrante de PTFE 0,45 µm, da marca Millex® , antes de injecção na massa Q-TOF LC / MS.

Para a identificação das espécies moleculares da ivermectina H_2B1_a e H_2B1_b através da técnica de LC-MS Q-TOF foi usada uma coluna LiChroCART® 100 RP-18 (125 x 4 mm, 5 mm), fase móvel constituída por acetonitrila e água a 95:5 (v/v) com ácido acético a 1%, vazão de 1 mL min^{-1} e detecção no UV a 245 nm. As mesmas condições foram usadas para ambas análises, quantitativas e qualitativas. Modo de ionização positivo e *split* do MS de 1:5.

4.2.2 CROMATOGRAFIA EM FASE LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE) PARA QUANTIFICAÇÃO DA ABAMECTINA H_2B_{1a} e H_2B_{1b}

4.2.2.1 Metodologia

- **Preparação do padrão:** Pesar exatamente cerca de 5,00 mg de padrão de abamectina e transferir para balão volumétrico de 25 mL. Adicionar cerca de 20 mL de fase móvel e levar ao ultrassom por 5 minutos. Completar o volume com fase móvel e homogeneizar. Filtrar em uma unidade filtrante de PTFE 0,45 µm, marca Millex® e transferir para um “vial”.

- **Preparação da amostra:** Pesar exatamente cerca de 500,00 mg do gel de abamectina (correspondente a 5,00 mg de abamectina) e transferir para balão volumétrico de 25 mL. Adicionar cerca de 20 mL de fase móvel e levar ao ultrassom por 5 minutos. Completar o volume com fase móvel e homogeneizar. Filtrar em uma unidade filtrante de PTFE 0,45 µm, marca Millex® e transferir para um "vial".

4.2.2.2 Condições analíticas

- **Fase móvel:** Acetonitrila e água (95:5, v/v) com 1 % ácido acético
- **Vazão:** 1,0 mL/min
- **Coluna:** Lichrocart® 100 RP-18 (125 x 4 mm, 5 µm)
- **Detecção:** UV 245 nm
- **Volume de injeção:** 20 µL
- **Temperatura:** 25 °C.

4.2.2.3 Validação do método analítico para determinação da abamectina H_2B_{1a} e H_2B_{1b} por cromatografia em fase líquida de alta eficiência (CLAE)

A validação do método analítico para determinação da abamectina H_2B1_a e H_2B1_b por cromatografia em fase líquida de alta eficiência (CLAE) foi realizada nas mesmas condições do item 4.2.2.2.

4.2.2.3.1 Seletividade

A determinação da seletividade do método analítico foi realizada preparando-se soluções do padrão, amostras e fase móvel conforme descrito abaixo. As amostras foram preparadas em triplicata.

- **Preparação do padrão:** Pesar exatamente cerca de 5,00 mg de padrão de abamectina e transferir para balão volumétrico de 25 mL. Adicionar cerca de 20 mL de fase móvel e levar ao ultrassom por 5 minutos. Completar o volume com fase móvel e homogeneizar. Filtrar em uma unidade filtrante de PTFE 0,45 µm, marca Millex® e transferir para um "vial".

- **Preparação da amostra:** Pesar exatamente cerca de 500,00 mg do gel de abamectina (correspondente a 5,00 mg de abamectina) e transferir para balão volumétrico de 25 mL. Adicionar cerca de 20 mL de fase móvel e levar ao ultrassom por 5 minutos. Completar o volume com fase móvel e homogeneizar. Filtrar em uma unidade filtrante de PTFE 0,45 µm, marca Millex® e transferir para um "vial".

4.2.2.3.2 Linearidade

A linearidade de um método determina a proporcionalidade entre a concentração e a resposta. É determinada através da construção da curva analítica (MARTIN-SMITH, 1990).

Na linearidade busca-se a obtenção de resultados que apresentem proporção direta às concentrações da substância em estudo. Para o estudo da linearidade, faz-se necessária a construção de uma curva de resposta, sendo o eixo **x** o da concentração e o eixo **y** o da resposta obtida.

EQUAÇÃO 5 $$y = ax + b$$

Onde: a = coeficiente angular (expressa a inclinação da reta)

b = coeficiente linear (expressa a intersecção da curva aos eixos).

As amostras foram preparadas em triplicata.

- **Preparação da solução mãe de padrão:** Pesar exatamente cerca de 25,00 mg de padrão de abamectina e transferir para balão volumétrico de 25 mL. Adicionar cerca de 20 mL de fase móvel e levar ao ultrassom por 5 minutos. Completar o volume com fase móvel e homogeneizar. Pipetar a quantidade correspondente para balão volumétrico de 5 mL, conforme **Tabela 7**, para preparação das amostras nas cinco concentrações analisadas. Completar o volume com fase móvel. Filtrar em uma unidade filtrante de PTFE 0,45 µm, marca Millex® e transferir para um "vial".

Tabela 7. Preparação das amostras para a determinação da linearidade da abamectina

H_2B_{1a} (µg/mL)	**Volume da solução padrão (mL)**	**Balão volumétrico (mL)**
150,11	0,8	5
168,87	0,9	5
187,64	1,0	5
206,40	1,1	5
225,17	1,2	5
H_2B_{1b} (µg/mL)	**Volume da solução padrão (mL)**	**Balão volumétrico (mL)**
7,81	0,8	5
8,78	0,9	5
9,76	1,0	5
10,73	1,1	5
11,71	1,2	5

4.2.2.3.3 Limite de detecção (LD)

É a concentração mínima detectada com precisão e exatidão especificada pelo método, porém não necessariamente quantificada (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNIA SANITÁRIA, 2003).

EQUAÇÃO 6

$$LD = \frac{\text{Desvio padrão médio x 3,3}}{\text{Inclinação da curva}}$$

O limite de detecção será calculado a partir de três curvas analíticas construídas contendo concentrações do fármaco próximas ao suposto limite de quantificação.

4.2.2.3.4 Limite de quantificação (LQ)

É a concentração mínima mensurada com precisão e exatidão especificada pelo método e dentro de valores aceitáveis (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNIA SANITÁRIA, 2003).

EQUAÇÃO 7

$$LQ = \frac{\text{Desvio padrão médio x 10}}{\text{Inclinação da curva}}$$

O limite de quantificação será calculado a partir de três curvas analíticas construídas contendo concentrações do fármaco próximas ao suposto limite de quantificação.

4.2.2.3.5 Repetibilidade

A determinação da repetibilidade do método analítico foi realizada preparando-se as soluções do padrão e da amostra conforme descrito abaixo. As amostras foram preparadas em 6 replicatas.

- **Preparação do padrão:** Pesar exatamente cerca de 5,00 mg de padrão de abamectina e transferir para balão volumétrico de 25 mL. Adicionar cerca de 20 mL de fase móvel e levar ao ultrassom por 5 minutos. Completar o volume com fase móvel e homogeneizar. Filtrar em uma unidade filtrante de PTFE 0,45 µm, marca Millex® e transferir para um "vial".
- **Preparação da amostra:** Pesar exatamente cerca de 500,00 mg do gel de abamectina (correspondente a 5,00 mg de abamectina) e transferir para balão volumétrico de 25 mL. Adicionar cerca de 20 mL de fase móvel e levar ao ultrassom por 5 minutos. Completar o volume com fase móvel e homogeneizar. Filtrar em filtro Millex® PTFE 0,45 µm e transferir para um "vial".

4.2.2.3.6 Precisão intermediária

A determinação da precisão intermediária do método analítico foi realizada preparando-se as soluções do padrão e da amostra conforme descrito a seguir. As amostras foram preparadas em triplicata e analisadas por dois dias alternados por analistas diferentes.

- **Preparação do padrão:** Pesar exatamente cerca de 5,00 mg de padrão de abamectina, transferir para balão volumétrico de 25 mL. Adicionar cerca de 20 mL de fase móvel e levar ao ultrassom por 5 minutos. Completar o volume com fase móvel e homogeneizar. Filtrar em uma unidade filtrante de PTFE 0,45 µm, marca Millex® e transferir para um "vial".

- **Preparação da amostra:** Pesar exatamente cerca de 500,00 mg do gel de abamectina (correspondente a 5,00 mg de abamectina) e transferir para balão volumétrico de 25 mL. Adicionar cerca de 20 mL de fase móvel e levar ao ultrassom por 5 minutos.

Completar o volume com fase móvel e homogeneizar. Filtrar em uma unidade filtrante de PTFE 0,45 µm, marca Millex® e transferir para um “vial”.

4.2.2.3.7 Exatidão

É a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro.

A exatidão de um método deve ser determinada após o estabelecimento da linearidade, do intervalo linear e da especificidade, sendo verificada a partir de, no mínimo, 9 determinações contemplando o intervalo linear do procedimento ou seja, em 3 concentrações, baixa, média e alta, com 3 réplicas de cada (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNIA SANITÁRIA, 2003).

- **Preparação da solução mãe de padrão:** Pesar exatamente cerca de 25,00 mg de padrão de abamectina e transferir para balão volumétrico de 25 mL. Adicionar cerca de 20 mL de fase móvel e levar ao ultrassom por 5 minutos. Completar o volume com fase móvel e homogeneizar.

- **Preparação da solução mãe de amostra (placebo):** Pesar exatamente cerca de 2500,00 mg de placebo de abamectina gel e transferir para balão volumétrico de 25 mL. Adicionar cerca de 20 mL de fase móvel e levar ao ultrassom por 5 minutos. Completar o volume com fase móvel e homogeneizar.

- **Preparação das amostras adicionadas ao padrão:** Pipetar a quantidade correspondente de solução mãe padrão para balão volumétrico de 5 mL conforme **Tabela 8**. Acrescentar no mesmo balão a quantidade correspondente de solução mãe

amostra (placebo) conforme descrito na **Tabela 8**. Completar o volume com fase móvel e homogeneizar. Filtrar em uma unidade filtrante de PTFE 0,45 µm, marca Millex® e transferir para um "vial".

As soluções de padrão e das amostras de placebo foram preparadas sem adição de padrão, para realização dos cálculos de recuperação.

Tabela 8. Preparação de amostras para determinação da exatidão do método por CLAE para determinação da abamectina

H_2B_{1a} (µg/mL)	Volume da solução padrão (mL)	Volume da solução amostra (mL)	Balão volumétrico (mL)
150,11	0,8	1,0	5
187,64	1,0	1,0	5
225,17	1,2	1,0	5

H_2B_{1b} (µg/mL)	Volume da solução padrão (mL)	Volume da solução amostra (mL)	Balão volumétrico (mL)
7,81	0,8	1,0	5
9,76	1,0	1,0	5
11,71	1,2	1,0	5

Cálculos: $\frac{\text{\% amostra padrão sem contaminação}}{\text{\% amostra contaminada}} \times 100$

4.2.2.3.8 Teste de estresse

As condições empregadas para realização do teste de estresse estão apresentadas na **Tabela 9**.

Tabela 9. Condições empregadas nos testes de estresse (KLICK, 2005)

Meio de reação	Temperatura (°C)	Tempo (horas)	Diluente
Ácido	80	2	HCL 1 mol/L
Alcalino	80	2	NaOH 1 mol/L
Oxidante	80	2	H_2O_2 3 %
Neutro	80	2	Água ultrapura

4.2.2.3.8.1 Teste de estresse em meio ácido

A determinação do teste de estresse em meio ácido foi realizada preparando-se as soluções do padrão e da amostra conforme descrito abaixo. As amostras foram preparadas em triplicata.

- **Preparação do padrão:** Pesar exatamente cerca de 25,00 mg de padrão de abamectina e transferir para balão volumétrico de 25 mL. Adicionar cerca de 20 mL de fase móvel e levar ao ultrasson por 5 minutos. Completar o volume com fase móvel e homogeneizar. Transferir 1,0 mL para erlemeyer de 100 mL e adicionar exatamente 1,0 mL de HCL 1 mol/L. Levar ao banho-maria a 80 °C por 2 h. Após aquecimento e resfriamento à temperatura ambiente transferir para balão volumétrico de 5 mL lavando o erlemeyer com 3 mL de fase móvel. Completar o volume com fase móvel e homogeneizar. Filtrar em uma unidade filtrante de PTFE 0,45 µm, marca Millex® e transferir para um “vial”.

- **Preparação da amostra:** Pesar exatamente cerca de 2500,00 mg de amostra de abamectina gel (correspondente a 25 mg de abamectina) e transferir para balão volumétrico de 25 mL. Adicionar cerca de 20 mL de fase móvel e levar ao ultrasson por 5 minutos. Completar o volume com fase móvel e homogeneizar. Transferir 1,0 mL para erlemeyer de 100 mL e adicionar exatamente 1,0 mL de HCL 1 mol/L. Levar ao banho-maria a 80 °C por 2 h. Após aquecimento e resfriamento à temperatura ambiente transferir para balão volumétrico de 5 mL lavando o erlemeyer com 3 mL de fase móvel. Completar o volume com fase móvel e homogeneizar. Filtrar em uma unidade filtrante de PTFE 0,45 µm, marca Millex® e transferir para um "vial".

4.2.2.3.8.2 Teste de estresse em meio alcalino

A determinação do teste de estresse em meio alcalino foi realizada preparando-se as soluções do padrão e da amostra conforme descrito abaixo. As amostras foram preparadas em triplicata.

- **Preparação do padrão:** Pesar exatamente cerca de 25,00 mg de padrão de abamectina, transferir para balão volumétrico de 25 mL e adicionar cerca de 20 mL de fase móvel e levar ao ultrassom por 5 minutos. Completar o volume com fase móvel e homogeneizar. Transferir 1,0 mL para erlemeyer de 100 mL e adicionar exatamente 1,0 mL de NAOH 1 mol/L. Levar ao banho-maria a 80 °C por 2 h. Após aquecimento e resfriamento à temperatura ambiente transferir para balão volumétrico de 5 mL lavando o erlemeyer com 3 mL de fase móvel. Completar o volume com fase móvel e homogeneizar. Filtrar em uma unidade filtrante de PTFE 0,45 µm, marca Millex® e transferir para um "vial".

- **Preparação da amostra:** Pesar exatamente cerca de 2500,00 mg de amostra de abamectina gel (correspondente a 25 mg de abamectina) e transferir para balão volumétrico de 25 mL. Adicionar cerca de 20 mL de fase móvel e levar ao ultrassom por 5 minutos. Completar o volume com fase móvel e homogeneizar. Transferir 1,0 mL para erlemeyer de 100 mL e adicionar exatamente 1,0 mL de NAOH 1 mol/L. Levar ao banho-maria a 80 °C por 2 h. Após aquecimento e resfriamento à temperatura ambiente transferir para balão volumétrico de 5 mL lavando o erlemeyer com 3 mL de fase móvel. Completar o volume com fase móvel e homogeneizar. Filtrar em uma unidade filtrante de PTFE 0,45 µm, marca Millex® e transferir para um "vial".

4.2.2.3.8.3 Teste de estresse em meio oxidante

A determinação do teste de estresse em meio oxidante foi realizada preparando-se as soluções do padrão e da amostra conforme descrito abaixo. As amostras foram preparadas em triplicata.

- **Preparação do padrão:** Pesar exatamente cerca de 25,00 mg de padrão de abamectina e transferir para balão volumétrico de 25 mL. Adicionar cerca de 20 mL de fase móvel e levar ao ultrassom por 5 minutos. Completar o volume com fase móvel e homogeneizar. Transferir 1,0 mL para erlemeyer de 100 mL e adicionar exatamente 1,0 mL de peróxido de hidrogênio 3 %. Levar ao banho-maria a 80 °C por 2 h. Após aquecimento e resfriamento à temperatura ambiente transferir para balão volumétrico de 5 mL lavando o erlemeyer com 3 mL de fase móvel. Completar o volume com fase móvel e homogeneizar. Filtrar em uma unidade filtrante de PTFE 0,45 µm, marca Millex® e transferir para um "vial".

- **Preparação da amostra:** Pesar exatamente cerca de 2500,00 mg de amostra de abamectina gel (correspondente a 25 mg de abamectina) e transferir para balão volumétrico de 25 mL. Adicionar cerca de 20 mL de fase móvel e levar ao ultrassom por 5 minutos. Completar o volume com fase móvel e homogeneizar. Transferir 1,0 mL para erlemeyer de 100 mL e adicionar exatamente 1,0 mL de peróxido de hidrogênio 3 %. Levar ao banho-maria a 80 °C por 2 h. Após aquecimento e resfriamento à temperatura ambiente transferir para balão volumétrico de 5 mL lavando o erlemeyer com 3 mL de fase móvel. Completar o volume com fase móvel e homogeneizar. Filtrar em uma unidade filtrante de PTFE 0,45 µm, marca Millex® e transferir para um "vial".

4.2.2.3.8.4 Teste de estresse em meio neutro

A determinação do teste de estresse em meio neutro foi realizada preparando-se as soluções do padrão e da amostra conforme descrito abaixo. As amostras foram preparadas em triplicata.

- **Preparação do padrão:** Pesar exatamente cerca de 25,00 mg de padrão de abamectina, transferir para balão volumétrico de 25 mL e adicionar cerca de 20 mL de fase móvel e levar ao ultrassom por 5 minutos. Completar o volume com fase móvel e homogeneizar. Transferir 1,0 mL para erlemeyer de 100 mL e adicionar exatamente 1,0 mL de água ultrapura. Levar ao banho-maria a 80 °C por 2 h. Após aquecimento e resfriamento à temperatura ambiente transferir para balão volumétrico de 5 mL lavando o erlemeyer com 3 mL de fase móvel. Completar o volume com fase móvel e homogeneizar. Filtrar em uma unidade filtrante de PTFE 0,45 µm, marca Millex® e transferir para um "vial".

- **Preparação da amostra:** Pesar exatamente cerca de 2500,00 mg de amostra de abamectina gel (correspondente a 25 mg de abamectina) e transferir para balão volumétrico de 25 mL. Adicionar cerca de 20 mL de fase móvel e levar ao ultrassom por 5 minutos. Completar o volume com fase móvel e homogeneizar. Transferir 1,0 mL para erlemeyer de 100 mL e adicionar exatamente 1,0 mL de água ultrapura. Levar ao banho-maria a 80 °C por 2 h. Após aquecimento e resfriamento à temperatura ambiente transferir para balão volumétrico de 5 mL lavando o erlemeyer com 3 mL de fase móvel. Completar o volume com fase móvel e homogeneizar. Filtrar em uma unidade filtrante de PTFE 0,45 µm, marca Millex® e transferir para um "vial".

4.2.2.3.9 Robustez

Para os ensaios de robustez as amostras foram preparadas conforme o item 4.2.2.1. Os testes foram realizados conforme "Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos", RE 899/2003 (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNIA SANITÁRIA, 2003). Foram empregadas as seguintes condições: alteração do comprimento de onda para 243 e 247 nm e da composição da fase móvel para: acetonitrila: água (96:4) com 1 % de ácido acético e, acetonitrila: água (94:6) com 1 % de ácido acético.

4.2.2.3.10 Estabilidade

Na avaliação da estabilidade das soluções padrão e da amostra, as soluções foram armazenadas a 25 ° C durante 4 horas, e, a seguir analisadas. Os resultados obtidos foram comparados com os das soluções preparadas inicialmente. O tempo de estabilidade proposto,

de 4 horas, é justificado por ser o tempo normalmente gasto entre a preparção da amostra e a conclusão da análise.

4.2.3 CROMATOGRAFIA EM FASE LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE) PARA QUANTIFICAÇÃO DOS ENANTIÔMEROS DO NADOLOL

4.2.3.1 Metodologia

- **Preparação do padrão:** Pesar cerca de 5,00 mg de padrão de nadolol e transferir para balão volumétrico de 25 mL. Adicionar cerca de 20 mL de álcool etílico e levar ao ultrassom por 5 minutos. Completar o volume com álcool etílico e homogeneizar. Filtrar em uma unidade filtrante de PTFE 0,45 µm, marca Millex® e transferir para um "vial".

- **Preparação da amostra:** Pesar cerca de 21,26 mg do pó da cápsula de nadolol (correspondente a 5,00 mg de nadolol) e transferir para balão volumétrico de 25 mL. Adicionar cerca de 20 mL de álcool etílico e levar ao ultrassom por 5 minutos. Completar o volume com álcool etílico e homogeneizar. Filtrar em uma unidade filtrante de PTFE 0,45 µm, marca Millex® e transferir para um "vial".

4.2.3.2 Condições cromatográficas

- **Fase móvel:** hexano: álcool etílico: dietilamina: ácido acético (86:14:0,3:0,3 v/v/v/v)
- **Vazão:** 0,7 mL/min
- **Coluna:** Chiralcel OD® (250 x 4,6 mm, 10 µm)
- **Detecção:** UV 220 nm
- **Volume de injeção:** 20 µL
- **Temperatura:** 25 °C.

4.2.3.3 Validação do método analítico para determinação dos enantiômeros do nadolol por cromatografia em fase líquida de alta eficiência (CLAE)

4.2.3.3.1 Seletividade

A determinação da seletividade do método analítico foi realizada preparando-se soluções do padrão, da amostra e do placebo, a fase móvel e os solventes conforme descrito abaixo. As amostras foram preparadas em triplicata.

- **Preparação do padrão:** Pesar cerca de 5,00 mg de padrão de nadolol e transferir para balão volumétrico de 25 mL. Adicionar cerca de 20 mL de álcool etílico e levar ao ultrassom por 5 minutos. Completar o volume com álcool etílico e homogeneizar. Filtrar em uma unidade filtrante de PTFE 0,45 µm, marca Millex® e transferir para um "vial".

- **Preparação da amostra:** Pesar cerca de 21,26 mg do pó da cápsula de nadolol (correspondente a 5,00 mg de nadolol) e transferir para balão volumétrico de 25 mL. Adicionar cerca de 20 mL de álcool etílico e levar ao ultrassom por 5 minutos. Completar o volume com álcool etílico e homogeneizar. Filtrar em uma unidade filtrante de PTFE 0,45 µm, marca Millex® e transferir para um "vial".

- **Preparação do placebo:** Pesar cerca de 21,26 mg do placebo, adicionar cerca de 20 mL de álcool etílico e levar ao ultrassom por 5 minutos. Completar o volume com álcool etílico e homogeneizar. Filtrar em uma unidade filtrante de PTFE 0,45 µm, marca Millex® e transferir para um "vial".

4.2.3.3.2 Linearidade

A linearidade de um método determina a proporcionalidade entre a concentração e a resposta obtida. É determinada através da construção da curva analítica (MARTIN-SMITH, 1990).

Na linearidade busca-se a obtenção de resultados que apresentem proporção direta às concentrações da substância em estudo. Para o estudo da linearidade, faz-se necessária a confecção de uma curva de resposta, sendo o eixo **x** o da concentração e o eixo **y** o da resposta obtida.

EQUAÇÃO 8 $y = ax + b$

Onde: a = coeficiente angular (expressa a inclinação da reta)
b = coeficiente linear (expressa a intersecção da curva aos eixos).

As amostras foram preparadas em triplicata.

- **Preparação da solução mãe padrão:** Pesar exatamente 25,00 mg de padrão de nadolol e transferir para balão volumétrico de 25 mL. Adicionar cerca de 20 mL de álcool etílico e levar ao ultrassom por 5 minutos. Completar o volume com álcool etílico e homogeneizar. Pipetar a quantidade correspondente para balão volumétrico de 5 mL (conforme **Tabela 10**) para preparação das amostras de concentração 80 %, 90 %, 100 %, 110 % e 120 %. Filtrar em uma unidade filtrante de PTFE 0,45 µm, marca Millex® e transferir para um "vial".

Tabela 10. Preparação das amostras para a determinação da linearidade do nadolol.

Concentração da solução padrão (%)	Volume solução mãe padrão (mL)	Balão volumétrico (mL)
80	0,8	5
90	0,9	5
100	1,0	5
110	1,1	5
120	1,2	5

4.2.3.3.3 Limite de detecção (LD)

É a concentração mínima detectada com precisão e exatidão especificada pelo método, porém não necessariamente quantificada (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNIA SANITÁRIA, 2003).

EQUAÇÃO 9

$$LD = \frac{\text{Desvio padrão médio}}{\text{Inclinação da curva}} \times 3{,}3$$

O limite de detecção será feito a partir de três curvas de calibração construídas contendo concentrações do fármaco próximas ao suposto limite de quantificação.

4.2.3.3.4 Limite de quantificação (LQ)

É a concentração mínima mensurada com precisão e exatidão especificada pelo método e dentro de valores aceitáveis (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNIA SANITÁRIA, 2003).

EQUAÇÃO 10

$$LQ = \frac{\text{Desvio padrão médio}}{\text{Inclinação da curva}} \times 10$$

O limite de quantificação será feito a partir de três curvas de calibração construídas contendo concentrações do fármaco próximas ao suposto limite de quantificação.

4.2.3.3.5 Repetibilidade

A determinação da repetibilidade do método analítico foi realizada preparando-se as soluções do padrão e da amostra conforme descrito abaixo. As amostras foram preparadas em 6 replicatas.

- **Preparação do padrão:** Pesar cerca de 5,00 mg de padrão de nadolol e transferir para balão volumétrico de 25 mL. Adicionar cerca de 20 mL de álcool etílico e levar ao ultrassom por 5 minutos. Completar o volume com álcool etílico e homogeneizar. Filtrar em uma unidade filtrante de PTFE 0,45 µm, marca Millex® e transferir para um "vial".

- **Preparação da amostra:** Pesar cerca de 21,26 mg do pó da cápsula de nadolol (correspondente a 5,00 mg de nadolol) e transferir para balão volumétrico de 25 mL. Adicionar cerca de 20 mL de álcool etílico e levar ao ultrassom por 5 minutos. Completar o volume com álcool etílico e homogeneizar. Filtrar em uma unidade filtrante de PTFE 0,45 µm, marca Millex® e transferir para um "vial".

4.2.3.3.6 Precisão intermediária

A determinação da precisão intermediária do método analítico foi realizada preparando-se as soluções do padrão e da amostra conforme descrito a seguir. As amostras foram preparadas em triplicata e analisadas por três dias consecutivos

- **Preparação do padrão:** Pesar cerca de 5,00 mg de padrão de nadolol e transferir para balão volumétrico de 25 mL. Adicionar cerca de 20 mL de álcool etílico e levar ao ultrassom por 5 minutos. Completar o volume com álcool etílico e homogeneizar. Filtrar em uma unidade filtrante de PTFE 0,45 µm, marca Millex® e transferir para um "vial".

- **Preparação da amostra:** Pesar cerca de 21,26 mg do pó da cápsula de nadolol (correspondente a 5,00 mg de nadolol) e transferir para balão volumétrico de 25 mL. Adicionar cerca de 20 mL de álcool etílico e levar ao ultrassom por 5 minutos. Completar o volume com álcool etílico e homogeneizar. Filtrar em uma unidade filtrante de PTFE 0,45 µm, marca Millex® e transferir para um "vial".

4.2.3.3.7 Exatidão

É a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro.

A exatidão de um método deve ser determinada após o estabelecimento da linearidade, do intervalo linear e da especificidade, sendo verificada a partir de, no mínimo, 9 determinações contemplando o intervalo linear do procedimento ou seja, em 3 concentrações, baixa, média e alta, com 3 réplicas de cada (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNIA SANITÁRIA, 2003).

- **Preparação da solução mãe padrão:** Pesar exatamente 25,00 mg de padrão de nadolol e transferir para balão volumétrico de 25 mL. Adicionar cerca de 20 mL álcool etílico e levar ao ultrassom por 5 minutos. Completar o volume com álcool etílico e homogeneizar.

- **Preparação da solução mãe placebo:** Pesar exatamente 106,29 mg de placebo e transferir para balão volumétrico de 25 mL. Adicionar cerca de 20 mL álcool etílico e levar ao ultrassom por 5 minutos. Completar o volume com álcool etílico e homogeneizar.

- **Preparação das amostras adicionadas ao placebo:** Pipetar a quantidade correspondente de solução mãe padrão para balão volumétrico de 5 mL (conforme **Tabela 11),** para preparação das amostras com concentrações de 80 %, 100 % e 120 %. Acrescentar no mesmo balão a quantidade correspondente de placebo conforme descrito na **Tabela 11**. Completar o volume álcool etílico e homogeneizar. Filtrar em uma unidade filtrante de PTFE 0,45 µm, marca Millex® e transferir para um "vial".

Preparar amostras de padrão na concentração de 80 %, 100 % e 120 % e placebo sem contaminação para proceder aos cálculos de recuperação.

Tabela 11. Preparação de amostras para determinação da exatidão do método para determinação do nadolol por CLAE

Concentração da solução padrão (%)	Volume da solução mãe padrão (mL)	Volume da solução mãe do placebo (mL)	Balão volumétrico (mL)
80	0,8	1,0	5
100	1,0	1,0	5
120	1,2	1,0	5

EQUAÇÃO 11 **Cálculos:** $\frac{\text{\% amostra padrão sem contaminação}}{\text{\% amostra contaminada}} \times 100$

4.2.3.3.8 Teste de estresse

O teste de estresse foi realizado nas condições apresentadas na **Tabela 12.**

Tabela 12. Condições empregadas nos testes de estresse (KLICK, 2005)

Meio de reação	Temperatura (°C)	Tempo (horas)	Diluente
Ácido	80	2	HCL 1 mol/L
Alcalino	80	2	NaOH 1 mol/L
Oxidante	80	2	H_2O_2 3 %
Neutro	80	2	Água ultrapura

4.2.3.3.8.1 Estabilidade em meio ácido

A determinação da estabilidade em meio ácido foi realizada preparando-se as soluções do padrão e da amostra conforme descrito abaixo. As amostras foram preparadas em triplicata.

- **Preparação do padrão:** Pesar cerca de 25,00 mg de padrão de nadolol e transferir para balão volumétrico de 25 mL. Adicionar cerca de 20 mL de álcool etílico e levar ao ultrasson por 5 minutos. Completar o volume com álcool etílico e homogeneizar. Transferir 1,0 mL para becker de 50 mL e adicionar exatamente 1,0 mL de HCL 1 mol/L. Conservar em estufa a 80 °C por 2 h. Após aquecimento e resfriamento à temperatura ambiente transferir para balão volumétrico de 5 mL lavando o becker com 3 mL de álcool etílico. Completar o volume com álcool etílico e homogeneizar. Filtrar em uma unidade filtrante de PTFE 0,45 µm, marca Millex® e transferir para um "vial".

- **Preparação da amostra:** Pesar cerca de 106,29 mg de pó da cápsula de nadolol (correspondente a 25 mg de nadolol) e transferir para balão volumétrico de 25 mL. Adicionar cerca de 20 mL de álcool etílico e levar ao ultrasson por 5 minutos. Completar o volume com álcool etílico e homogeneizar. Transferir 1,0 mL para becker de 50 mL e adicionar exatamente 1,0 mL de HCL 1 mol/L. Conservar em estufa a 80 °C por 2 h. Após aquecimento e resfriamento à temperatura ambiente transferir para balão volumétrico de 5 mL lavando o becker com 3 mL de álcool etílico. Completar o volume com álcool etílico e homogeneizar. Filtrar em uma unidade filtrante de PTFE 0,45 µm, marca Millex® e transferir para um "vial".

4.2.3.3.8.2 Estabilidade em meio alcalino

A determinação da estabilidade em meio alcalino foi realizada preparando-se as soluções do padrão e da amostra conforme descrito abaixo. As amostras foram preparadas em triplicata.

- **Preparação do padrão:** Pesar cerca de 25,00 mg de padrão de nadolol e transferir para balão volumétrico de 25 mL. Adicionar cerca de 20 mL de álcool etílico e levar ao ultrassom por 5 minutos. Completar o volume com álcool etílico e homogeneizar. Transferir 1,0 mL para becker de 50 mL e adicionar exatamente 1,0 mL de NAOH 1 mol/L. Conservar em estufa a 80 °C por 2 h. Após aquecimento e resfriamento à temperatura ambiente transferir para balão volumétrico de 5 mL lavando o becker com 3 mL de álcool etílico, completar o volume com álcool etílico e homogeneizar. Filtrar em uma unidade filtrante de PTFE 0,45 µm, marca Millex® e transferir para um "vial".

- **Preparação da amostra:** Pesar cerca de 106,29 mg de pó da cápsula de nadolol (correspondente a 25 mg de nadolol) e transferir para balão volumétrico de 25 mL. Adicionar cerca de 20 mL de álcool etílico e levar ao ultrassom por 5 minutos. Completar o volume com álcool etílico e homogeneizar. Transferir 1,0 mL para becker de 50 mL e adicionar exatamente 1,0 mL de NAOH 1 mol/L. Conservar em estufa a 80 °C por 2 h. Após aquecimento e resfriamento à temperatura ambiente transferir para balão volumétrico de 5 mL lavando o becker com 3 mL de álcool etílico. Completar o volume com álcool etílico e homogeneizar. Filtrar em uma unidade filtrante de PTFE 0,45 µm, marca Millex® e transferir para um "vial".

4.2.3.3.8.3 Estabilidade em meio oxidante

A determinação da estabilidade em meio oxidante foi realizada preparando-se as soluções do padrão e da amostra conforme descrito abaixo. As amostras foram preparadas em triplicata.

- **Preparação do padrão:** Pesar cerca de 25,00 mg de padrão de nadolol e transferir para balão volumétrico de 25 mL, adicionar cerca de 20 mL de álcool etílico e levar ao ultrassom por 5 minutos. Completar o volume com álcool etílico e homogeneizar. Transferir 1,0 mL para becker de 50 mL e adicionar exatamente 1,0 mL de peróxido de hidrogênio 3 %. Levar a estufa a 80 °C por 2 h. Após aquecimento e resfriamento à temperatura ambiente transferir para balão volumétrico de 5 mL lavando o becker com 3 mL de álcool etílico, completar o volume com álcool etílico e homogeneizar. Filtrar em uma unidade filtrante de PTFE 0,45 µm, marca Millex® e transferir para um "vial".

- **Preparação da amostra:** Pesar cerca de 106,29 mg pó da cápsula de nadolol (correspondente a 25 mg de nadolol) e transferir para balão volumétrico de 25 mL. Adicionar cerca de 20 mL de álcool etílico e levar ao ultrassom por 5 minutos. Completar o volume com álcool etílico e homogeneizar. Transferir 1,0 mL para becker de 50 mL e adicionar exatamente 1,0 mL de peróxido de hidrogênio 3 %. Conservar em 80 °C por 2 h. Após aquecimento e resfriamento à temperatura ambiente transferir para balão volumétrico de 5 mL lavando o becker com 3 mL de álcool etílico. Completar o volume com álcool etílico e homogeneizar. Filtrar em uma unidade filtrante de PTFE 0,45 µm, marca Millex® e transferir para um "vial".

4.2.3.3.8.4 Estabilidade em meio neutro

A determinação da estabilidade em meio neutro foi realizada preparando-se as soluções do padrão e da amostra conforme descrito abaixo. As amostras foram preparadas em triplicata.

- **Preparação do padrão:** Pesar cerca de 25,00 mg de padrão de nadolol e transferir para balão volumétrico de 25 mL. Adicionar cerca de 20 mL de álcool etílico e levar

ao ultrassom por 5 minutos. Completar o volume com álcool etílico e homogeneizar. Transferir 1,0 mL para becker de 50 mL e adicionar exatamente 1,0 mL de água ultrapura. Conservar em a 80 °C por 2 h. Após aquecimento e resfriamento à temperatura ambiente transferir para balão volumétrico de 5 mL lavando o becker com 3 mL de álcool etílico. Completar o volume com álcool etílico e homogeneizar. Filtrar em uma unidade filtrante de PTFE 0,45 µm, marca Millex® e transferir para um "vial".

- **Preparação da amostra:** Pesar cerca de 106,29 mg de pó da cápsula de nadolol (correspondente a 25 mg de nadolol) e transferir para balão volumétrico de 25 mL. Adicionar cerca de 20 mL de álcool etílico e levar ao ultrassom por 5 minutos. Completar o volume com álcool etílico e homogeneizar. Transferir 1,0 mL para becker de 50 mL e adicionar exatamente 1,0 mL de água ultrapura. Conservar em a 80 °C por 2 h. Após aquecimento e resfriamento à temperatura ambiente transferir para balão volumétrico de 5 mL lavando o becker com 3 mL de álcool etílico. Completar o volume com álcool etílico e homogeneizar. Filtrar em uma unidade filtrante de PTFE 0,45 µm, marca Millex® e transferir para um "vial".

4.2.3.3.9 Robustez

Para os ensaios de robustez as amostras foram preparadas conforme o item 4.2.3.1. Foram empregadas as seguintes condições: alteração do comprimento para 215 nm e variação da vazão para 0,8 mL $mL^{-1.}$

4.2.3.3.10 Estabilidade

Na avaliação da estabilidade das soluções padrão e amostra, as soluções foram armazenadas a 25 ° C durante 24 horas, e, a seguir analisadas. Os resultados obtidos foram

comparados com os das soluções preparadas inicialmente. O tempo de estabilidade proposto de 24 horas é justificado por ser o tempo normalmente gasto entre a preparação da amostra e a conclusão da análise, uma vez que a corrida do nadolol é de 40 minutos.

4.2.4 IDENTIFICAÇÃO DOS ENANTIÔMEROS DO NADOLOL UTILIZANDO DICROISMO CIRCULAR

Para leitura no dicroísmo circular dos quatro isômeros separadamente uma amostra foi preparada da seguinte maneira: pesou-se cerca de 20,00 mg de padrão de nadolol e transferiu-se para um balão volumétrico de 25 mL. Adicionou-se cerca de 20 mL de álcool etílico e foi levado ao ultrassom por 5 minutos. O volume foi completado com álcool etílico e homogeneizado. Filtrou-se a solução através de unidade filtrante de PTFE ,45 µm marca Millipore® antes de injecção no sistema de HPLC.

Para coleta das frações dos enantiômeros do nadolol a solução da amostra foi injetada no cromatógrafo em fase líquido nas condições descritas para o método no item 4.2.3.2

Cada pico foi coletado separadamente, na saída do detector.

Os quatro isômeros do nadolol coletadas separadamente foram levadas para leitura no dicroísmo circular. Uma quantidade de cerca de 350 µL foi transferida para uma cubeta de quartzo de 0,2 mm de comprimento e a amostra foi recolhida para a leitura no equipamento de dicroísmo circular visando a determinação da configuração absoluta dos enantiômeros.

4.2.5. DIFRAÇÃO DE RAIOS X DA MATÉRIA-PRIMA NADOLOL

As amostras analisadas foram o nadolol matéria-prima utilizado pela farmácia de manipulação para o preparo das cápsulas de nadolol 40 mg/cápsula.

A análise por difração de raios X foi realizada no Instituto de Geociências, Departamento de Mineralogia e Petrologia da USP. Utilizou-se um difratômetro configurado segundo a geometria Bragg-Brentano com um motor de passo. Este motor permite a aquisição de dados na forma digital (leitura por computador) ou na forma analógica (registrador gráfico). A técnica digital consiste na leitura dos dados em espaçamentos fixos de ângulos 2q por um certo tempo, isto é, o detector permanece estacionado, contando a radiação recebida em um tempo determinado (usualmente 0,05 a 20 segundos), e enviando o resultado da contagem para o computador, conjuntamente com a leitura do ângulo. No final desta operação, o detector move-se com um passo, normalmente de 0,01 a 0,05 a 2Θ, repetindo-se a operação de leitura deste ponto até o ângulo final.

Cada análise foi realizada inserindo-se separadamente o material no porta-amostras até perfeito enchimento, que em seguida foi colocado no equipamento.

5. RESULTADOS

5.1 VALIDAÇÃO DO SISTEMA COMPUTADORIZADO DO EQUIPAMENTO DE ELETROFORESE CAPILAR

O método de análise para validação do sistema computadorizado do equipamento de eletroforese capilar baseia-se no **Guia de Validação de Sistemas Computadorizados da ANVISA** (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNIA SANITÁRIA, 2010) que propõe uma série de itens a serem verificados. Caso a resposta seja satisfatória, considera-se que o sistema foi validado.

Conforme descrito no **Guia de Validação de Sistemas Computadorizados da ANVISA,** caso a resposta à questão abaixo seja "SIM", o sistema deve ser validado.

- O sistema gerencia:
  - ✓ Operação automatizada de equipamentos produtivos críticos ou de laboratórios individualmente (ex. compressoras, secadores de leito fluidizado, CLAE, dissolutores, etc.)?

Como no caso, a resposta foi “SIM”, existe a exigência de validação do sistema de eletroforese capilar.

O equipamento de EC é um sistema classificado como **Tipo 3 - Produtos Configuráveis ou Customizados,** constituído por *software*s com funções que são configuráveis, desenvolvidos e/ou customizados para usos específicos. Esta classificação geralmente envolve a abordagem de ciclo de vida e avaliação de fornecedores (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNIA SANITÁRIA, 2010).

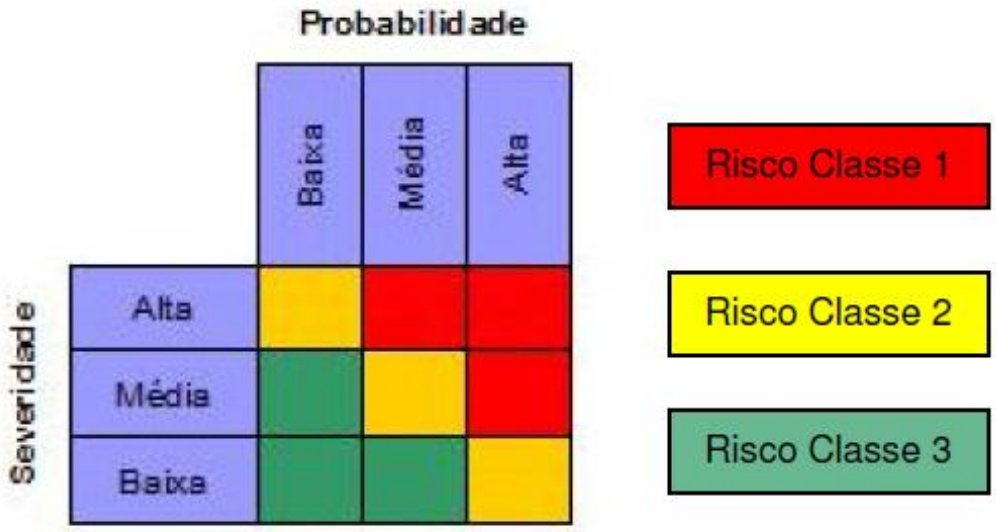
Os seguintes requisitos foram verificados para assegurar se o sistema pode ser considerado como validável:

5.1.1 Análise de risco

Para a análise de risco foram avaliados os seguintes parâmetros (**Figura 9):**

- Severidade: Qualidade do produto e integridade dos dados;
- Probabilidade de ocorrência: Probabilidade da falha (risco) ocorrer;
- Detectabilidade de falhas: com o objetivo de reduzí-las a um nível aceitável.

Figura 9. Critérios para classificação do tipo de risco para o sistema computadorizado do equipamento de EC (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNIA SANITÁRIA, 2010)

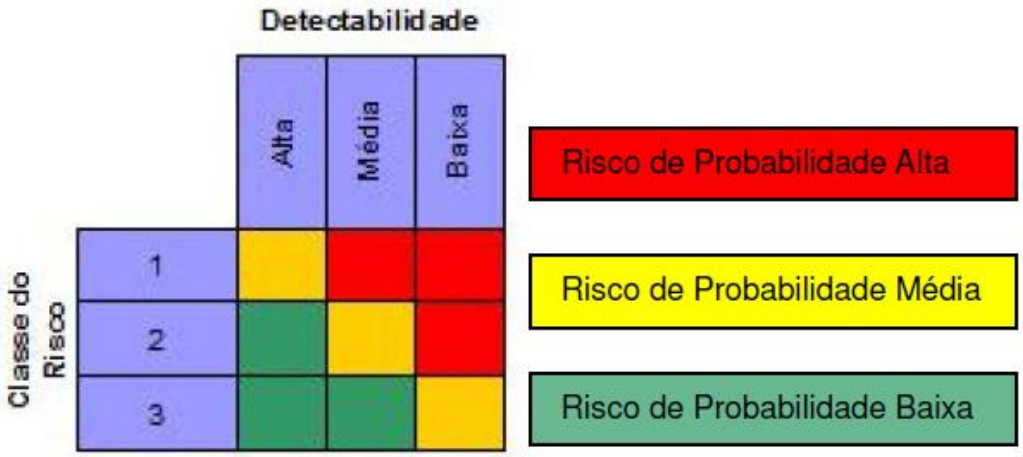


O sistema (classificado como Tipo 3) processa e armazenada dados, podendo assim gerar impacto direto e alto na qualidade e segurança dos resultados, aumentando a probabilidade de ocorrência de erros. Por esta razão, o equipamento foi classificado como de **RISCO DE CLASSE 1.**

Classe do Risco = Severidade x Probabilidade.

Resultado= RISCO DE CLASSE 1

Figura 10. Critérios para avaliação da probabilidade de ocorrência do risco para o sistema computadorizado do equipamento de EC (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNIA SANITÁRIA, 2010)



Complementando a análise de risco, a detectabilidade foi também avaliada em relação à classificação do risco. Neste caso, considerado como **CLASSE DE RISCO 1**. Como o risco pertence à CLASSE DE RISCO 1 (conforme **Figura 10)**, o risco em relação a detectabilidade pode ser considerado como **RISCO DE PROBABILIDADE MÉDIA** (visto que a detectabilidade e a possibilidade de redução do risco a um nível aceitável é alta), o que justifica a necessidade de validação do sistema computadorizado do equipamento de EC.

Após a análise de risco foram realizados outros testes para a validação do sistema computadorizado.

5.1.2 Qualificação de instalação

Os testes a seguir foram realizados para assegurar a qualificação de instalação do equipamento de EC.

5.1.2.1 Qualificação de instalação do *hardware*

Os testes de qualificação de instalação do *hardware* do sistema computadorizado de EC estão apresentados na **Tabela 13.**

Tabela 13. Testes de qualificação de instalação do *hardware* do sistema computadorizado de EC

Item	Requerimento	Encontrado	Satisfatório
Processador	Intel Pentium 4 HT Inside ™	Intel Pentium 4 HT Inside ™	SIM
Memória RAM	3,00 GB	3,00 GB	SIM
Disco rígido	CONFORME	CONFORME	SIM
Portas de comunicação	USB	USB	SIM
Periféricos	Teclado lenovo (preto), Mouse lenovo (preto), Monitor lenovo (preto)	Teclado lenovo (preto), Mouse lenovo (preto), Monitor lenovo (preto)	SIM
Placa mãe	CONFORME	CONFORME	SIM

5.1.2.2 Qualificação de instalação do *software*

Os testes de qualificação de instalação do *software* do sistema computadorizado de EC estão apresentados na **Tabela 14.**

Tabela 14. Testes de qualificação de instalação do *software* do sistema computadorizado de EC

Item	Requerimento	Encontrado	Satisfatório
Sistema Operacional	Microsoft Windows XP Professional	Microsoft Windows XP Professional	SIM
Antivírus	Avira Antivir Personal	Avira Antivir Personal	SIM
Pacote Office	Microsoft Office 2003	Microsoft Office 2003	SIM
Banco de dados	Local disk (C:)	Local disk (C:)	SIM
Navegador	Não há	Não há	SIM
Leitor de PDF	Adobe Reader 7.0	Adobe Reader 7.0	SIM
Acesso remoto	Não há	Não há	SIM
Sistema Operacional para comando do sistema de eletroforese capilar	32 Karat 8.0 Properties	32 Karat 8.0 Properties	SIM

Outros parâmetros avaliados para o sistema computadorizado de EC foram avaliados conforme apresentado na **Tabela 15.**

Tabela 15. Outros testes de qualificação de instalação do sistema computadorizado de EC

Item	Requerimento	Encontrado	Satisfatório
Voltagem	110 V	110 V	SIM
Temperatura	Controlada por meio do ar condicionado	Controlada por meio do ar condicionado	SIM
No-Break	*No-Break* Sinus Double MSS 8000 TI 60 HZ	*No-Break* Sinus Double MSS 8000 TI 60 HZ	SIM
4 Tomadas 110 V	4 TOMADAS 110 V	4 TOMADAS 110 V	SIM

5.1.3 Qualificação de operação

Outros itens verificados para assegurar a qualificação operacional do sistema computadorizado do equipamento de EC estão apresentados na **Tabela 16.**

Tabela 16. Testes realizados para assegurar a qualificação operacional do sistema computadorizado do equipamento de EC

Item	SIM	NÃO	Qualificação OK
Está disponível o Procedimento Operacional Padrão (POP) para descrever como utilizar o sistema.	X		X
Ligar o CPU do computador na tomada 110 V e ligá-lo. Ligou?	X		X
Ligar o monitor do computador na tomada 110 V e ligá-lo. Ligou?	X		X
Ligar o equipamento de eletroforese capilar. Ligou?	X		X
Digitar a senha conforme solicitado para abrir o programa no computador. OK?	X		X
Clicar no ícone do programa 32 Karat 8.0 no Desktop deve abrir o programa. Abriu?	X		X
Após abrir tela 32 Karat 8.0 clique em MDQ e assim o *software* deverá abrir.	X		X
Após clicar em *LOAD* você poderá abrir o compartimento para colocar o capilar e as amostras no carrossel.	X		X
Ao colocar o capilar no equipamento deverá sinalizar na tela MDQ a presença do capilar.	X		X
Clicar em *Pressure* e tela *Presssure Settings* deverá abrir.	X		X

cont.

cont.

Item	SIM	NÃO	Qualificação OK
Após clicar em *Pressure, Duration e Tray Positions* dar um OK. O equipamento deverá proceder a ação solicitada.	X		X
Ao clicar em *Single Run* a tela *Single Run Aquisition* deverá abrir	X		X
Após preencher os campos: *Sample ID, Method, Data Path, Data File, Number of reps, Inject vial e Outlet vial* clicar em *Start.* O sistema deverá correr a análise programada.	X		X
Após clicar em *File, Method, Open* e selecionar o método escolhido, o método deverá abrir.	X		X
Clicar em *File, Sequence, New* e uma tela para preencher com a sequência da corrida a ser programada deverá ser aberta.	X		X
Após programar a sequência clicar em *File Sequence, File As.* A sequência deverá ser salva.	X		X
Após clicar em *Sequence Run*, selecionar em *Sequence Name* a sequencia a correr. Clicar em *start* e o equipamento deverá correr a sequência selecionada.	X		X

cont.

cont.

Item	SIM	NÃO	Qualificação OK
Após abrir a tela 32 *Karat software, File, Open Offline* a tela *MDQ Offline* deverá abrir.	X		X
Em *MDQ Offline*, clicar em *File, Data, Open,* a tela *Open Data File* deverá ser aberta.	X		X
Em *Open Data File* em *Look in*, abrir o arquivo e após selecionar um arquivo clicar em Open e assim a tela com o eletroferograma deverá ser aberta.	X		X

5.1.4 Qualificação de desempenho

Para avaliar o desempenho do *software* do sistema computadorizado do equipamento de EC foram avaliados os itens conforme apresentados na **Tabela 17.**

Tabela 16. Testes realizados para assegurar a qualificação de desempenho do sistema computadorizado do equipamento de EC

Item	SIM	NÃO	Qualificação OK
O sistema está operando de acordo com o Procedimento?	X		X
Os dados armazenados poderão ser impressos ou salvos em outros arquivos para segurança?	X		X
Somente os analistas que utilizam o sistema tem acesso ao equipamento?	X		X
O sistema apresenta documentação detalhada e atualizada?	X		X
Possui procedimento para gerenciamento de acesso?	X		X
Existe um *backup* de segurança dos dados.	X		X

Outros critérios, também avaliados para considerar o sistema computadorizado validado, estão apresentados na **Tabela 17.**

Tabela 17. Critérios para considerar o sistema computadorizado do equipamento de EC validável

Exigência	Critério de aceitação	Status
Possuir documentação que descreva as necessidades do usuário em relação ao negócio – fornece informações dos requisitos do usuário para avaliação dos riscos	Atende a exigência	Atende a exigência
Possuir Especificação Técnica/ Funcional – fornece informações da funcionalidade do sistema para avaliação dos riscos atendendo aos requisitos do usuário	Atende a exigência	Atende a exigência
Descrição do sistema	Atende a exigência	Atende a exigência
Análise de riscos e avaliação de criticidade do sistema	Atende a exigência	Atende a exigência
Avaliação documentada do histórico do sistema	Atende a exigência	Atende a exigência

cont.

cont.

Exigência	Critério de aceitação	Status
Controle para que entradas e modificações de dados sejam realizadas apenas por pessoas autorizadas (devem ser utilizadas medidas de segurança, tais como utilização de senhas, código pessoal, chaves ou acesso restrito aos terminais)	Atende a exigência	Atende a exigência
Capacidade de registrar tentativas de acesso por pessoas não autorizadas	Atende a exigência	Atende a exigência
Capacidade de registrar os acessos autorizados, incluindo usuário, hora e data	Atende a exigência	Atende a exigência
Manutenção dos registros de todas as entradas e alterações quando houver alteração de dados	Atende a exigência	Atende a exigência
Possibilidade de impressão dos dados armazenados eletronicamente	Atende a exigência	Atende a exigência

cont.

cont.

Exigência	Critério de aceitação	Status
Inviolabilidade e proteção dos dados históricos, tanto de processo ou operações, quanto de rastreabilidade de modificações feitas pelo operador do sistema (por meios eletrônicos contra danos acidentais ou intencionais)	Atende a exigência	Atende a exigência
Possibilidade de realização de *backup* em intervalos regulares. Os dados de *backup* devem ser armazenados por um tempo definido e em local separado e seguro	Atende a exigência	Atende a exigência
Inviolabilidade e proteção dos dados históricos, tanto de processo ou operações, quanto de rastreabilidade de modificações feitas pelo operador do sistema (por meios eletrônicos contra danos acidentais ou intencionais)	Atende a exigência	Atende a exigência

5.2 VALIDAÇÃO DO SISTEMA COMPUTADORIZADO DO EQUIPAMENTO DE CROMATOGRAFIA EM FASE LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

O método de análise para validação do sistema computadorizado do equipamento de cromatografia em fase líquida de alta eficiência baseia-se no **Guia de Validação de Sistemas Computadorizados da ANVISA** (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNIA SANITÁRIA, 2010) que propõe uma série de itens a serem verificados e caso a resposta seja satisfatória considera-se que o sistema foi validado.

Conforme descrito no **Guia de Validação de Sistemas Computadorizados da ANVISA**, caso a resposta às questões abaixo seja "SIM", o sistema deve ser validado.

- O sistema gerencia:
    - ✓ Operação automatizada de equipamentos produtivos críticos ou de laboratórios individualmente (ex. compressoras, secadores de leito fluidizado, CLAE, dissolutores, etc.)?

Se a resposta for “SIM”, existe a exigência de validação do sistema de cromatografia líquida de alta eficiência.

O equipamento de CLAE é um sistema classificado como **Tipo 3 - Produtos Configuráveis ou Customizados,** constituído por *software*s com funções que são configuráveis, desenvolvidos e/ou customizados para usos específicos. Esta classificação geralmente envolve a abordagem de ciclo de vida e avaliação de fornecedores (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNIA SANITÁRIA, 2010).

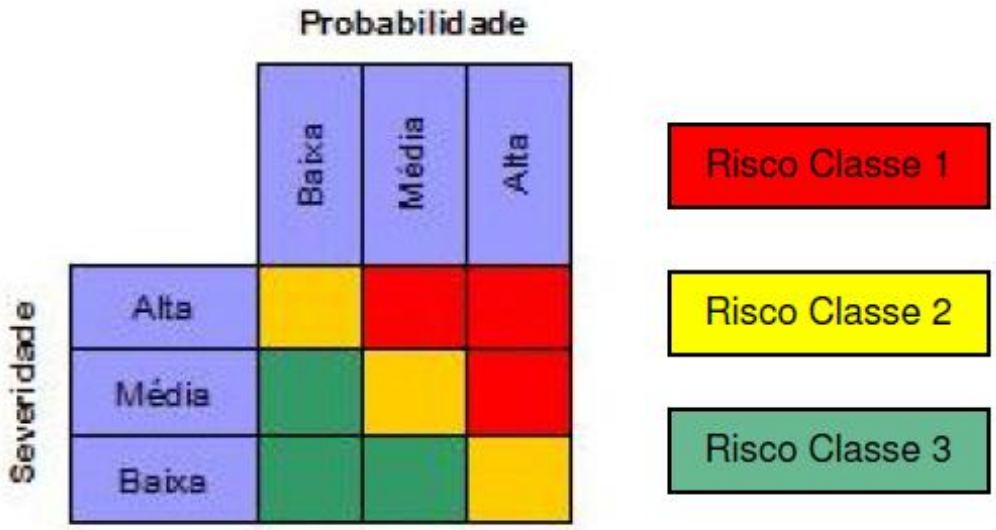
Os requisitos descritos a seguir foram verificados para assegurar que o sistema pode ser considerado como validável.

5.2.1 Análise de risco

Para a análise de risco do sistema computadorizado do equipamento de CLAE foram avaliados os parâmetros apresentados na **Figura 11:**

- Severidade: Qualidade do produto e integridade dos dados;
- Probabilidade de ocorrência: Probabilidade da falha (risco) ocorrer;
- Detectabilidade de falhas: Com o objetivo de reduzi-las estas a um nível aceitável.

Figura 11. Critérios para classificação do tipo de risco para o sistema computadorizado do equipamento de CLAE (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNIA SANITÁRIA, 2010)

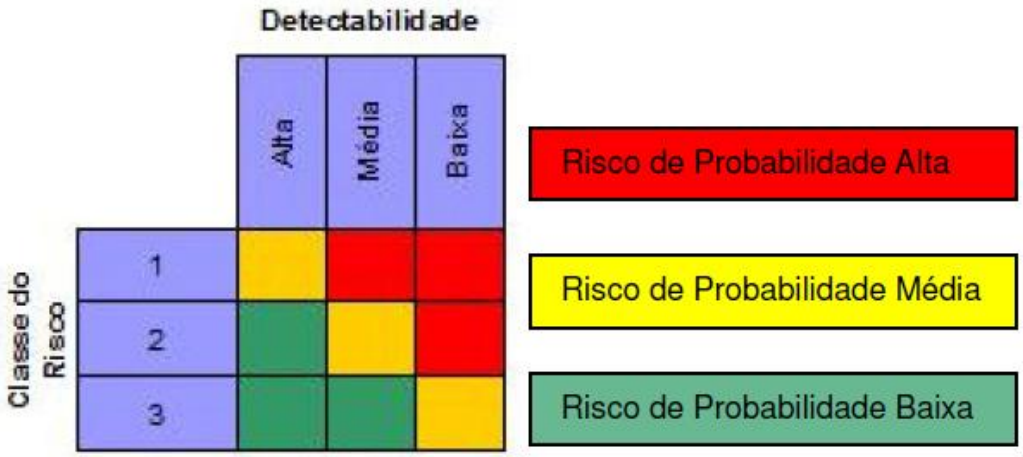


O sistema (classificado como Tipo 3) processa e armazenada dados, podendo assim gerar impacto direto e alto na qualidade e segurança dos resultados, aumentando a probabilidade de ocorrência de erros. Por esta razão, o equipamento foi classificado como de **RISCO DE CLASSE 1.**

Classe do Risco = Severidade x Probabilidade.

Resultado= RISCO DE CLASSE 1

Figura 12. Critérios para avaliação da probabilidade de ocorrência do risco para o sistema computadorizado do equipamento de CLAE (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNIA SANITÁRIA, 2010)



Complementando a análise de risco, a detectabilidade foi também avaliada em relação à classificação do risco, classificado neste caso como **CLASSE DE RISCO 1.** Como o risco pertence à **CLASSE DE RISCO 1** (conforme **Figura 12)**, o risco em relação a detectabilidade pode ser considerado como **RISCO DE PROBABILIDADE MÉDIA** (visto que a detectabilidade e a possibilidade de redução do risco a um nível aceitável é alta), o que justifica a necessidade de validação do sistema computadorizado do equipamento de CLAE.

Após a análise de risco foram realizados outros testes para a validação do sistema computadorizado.

5.2.2 Qualificação de instalação

Os testes foram realizados, conforme **Tabela 18**, de modo a assegurar a qualificação de instalação do equipamento de CLAE.

5.2.2.1 Qualificação de instalação do *hardware*

Os testes de qualificação de instalação do *hardware* do sistema computadorizado do equipamento de CLAE foram realizados de acordo com o apresentado na **Tabela 18**.

Tabela 18. Testes de qualificação de instalação do *hardware* do sistema computadorizado do equipamento de CLAE

Item	Requerimento	Encontrado	Satisfatório
Processador	Intel Pentium (R)	Intel Pentium (R)	SIM
Memória RAM	508 MB	508 MB	SIM
Disco rígido	CONFORME	CONFORME	SIM
Portas de comunicação	USB	USB	SIM
Periféricos	Teclado FC (branco), Mouse HP (branco), Monitor HP (branco)	Teclado FC (branco), mouse HP (branco), monitor HP (branco)	SIM
Placa mãe	CONFORME	CONFORME	SIM

5.2.2.2 Qualificação de instalação do *software*

Os testes de qualificação de instalação do *software* do sistema computadorizado do equipamento de CLAE foram realizados de acordo com o apresentado na **Tabela 19.**

Tabela 19. Testes de qualificação de instalação do *software* do sistema computadorizado do equipamento de CLAE

Item	Requerimento	Encontrado	Satisfatório
Sistema Operacional	Microsoft Windows XP Professional	Microsoft Windows XP Professional	SIM
Antivírus	Avira Antivir Personal	Avira Antivir Personal	SIM
Pacote Office	Microsoft Office 2003	Microsoft Office 2003	SIM
Banco de dados	Local disk (C:)	Local disk (C:)	SIM
Navegador	Não há	Não há	SIM
Leitor de PDF	Adobe Reader 9.0	Adobe Reader 9.0	SIM
Acesso remoto	Não há	Não há	SIM
Sistema Operacional para comando do sistema de CLAE	Class-VP	Class-VP	SIM

Os outros parâmetros avaliados para o sistema computadorizado do equipamento de CLAE estão apresentados na **Tabela 20.**

Tabela 20. Outros testes de qualificação de instalação do sistema computadorizado do equipamento de CLAE

Item	Requerimento	Encontrado	Satisfatório
Voltagem	110 V	110 V	SIM
Temperatura	Controlada por meio do ar condicionado	Controlada por meio do ar condicionado	SIM
No-Break	*No-Break* Dominion CM 3750- 60 HZ	*No-Break* Dominion CM 3750- 60 HZ	SIM
4 Tomadas 110 V	4 TOMADAS 110 V	4 TOMADAS 110 V	SIM

5.2.3 Qualificação de operação

Os outros itens avaliados para assegurar a qualificação operacional do sistema computadorizado do equipamento de CLAE estão apresentados na **Tabela 21.**

Tabela 21. Testes realizados para assegurar a qualificação operacional do sistema computadorizado do equipamento de CLAE

Item	SIM	NÃO	Qualificação OK
Está disponível o Procedimento Operacional Padrão (POP) para descrever como utilizar o sistema.	X		X
Ligar a tomada do CLAE da Shimadzu® na tomada e a seguir ligar os módulos do CLAE: RF 10 AXL, LC 10 AD-VP, DGU 14A-VP, SPDM 10A-VP, SIL-10A-VP, SCL 10A-VP e CTO 10A-VP. Ligou?	X		X
Ligar o CPU do computador na tomada 110 V e ligá-lo. Ligou?	X		X
Ligar o monitor do computador e digitar a senha conforme solicitado para abrir o programa no computador. OK?	X		X
Clicar no ícone do programa Class-VP no *Desktop* deve abrir o programa. Abriu?	X		X
Após abrir tela Class-VP selecione uma das opções, por exemplo, HPLC-UV e assim um sinal sonoro será emitido e o *software* deverá abrir.	X		X
Maximizar a tela *LC Step Assistent*. Abriu a tela?	X		X

cont.

cont.

Item	SIM	NÃO	Qualificação OK
Após clicar em *Instrument ON/OFF* do equipamento deverá acender a luz da bomba, PUMP no módulo LC 10 AD-VP.	X		X
No ícone *File* selecionar Sistema (C:), clicar na pasta *Method* e selecionar o método desejado. Abriu o método?	X		X
Após clicar em *Instrument Step*, selecionar Modo, por exemplo: *Binary gradient* colocar a vazão de 0,2 mL/min, dar *Dowload*, a bomba deverá ligar.	X		X
Após estabilizar a linha de base, clicar em *Control*, *Preview Run* e dar um OK. O equipamento deverá proceder a ação solicitada.	X		X
Ao clicar em *Single Run* a tela *Single Run* deverá abrir.	X		X
Após preencher os campos: *Sample ID*, *Method*, *Data Path*, *Data File*, *Vial*, *Inject volume* e clicar em *Start*. O sistema deverá correr a análise programada.	X		X
Após terminar a análise clicar em *Instrument Step*, diminuir a vazão até 0 mL/min. O sistema obedeceu a ação solicitada?	X		X

cont.

cont.

Item	SIM	NÃO
Para desligar o equipamento, clicar *Instrument ON/OFF*. No módulo LC 10 AD-VP a lâmpada PUMP deverá desligar.	X	X
Clicar em *File*, *Exit*, selecionar a opção desejada para assim fechar a comunicação do *software* do sistema Class-VP com os módulos. O sistema operou conforme solicitado?	X	X
Desligar os módulos do CLAE: RF 10 AXL, LC 10 AD-VP, DGU 14A-VP, SPDM 10A-VP, SIL-10A-VP, SCL 10A-VP e CTO 10A-VP. Desligou?	X	X

5.2.4 Qualificação de desempenho

Para testar o desempenho do *software* foram avaliados os itens apresentados na **Tabela 22**.

Tabela 22. Testes realizados para assegurar a qualificação de desempenho do sistema computadorizado do equipamento de CLAE

Item	SIM	NÃO	Qualificação OK
O sistema está operando de acordo com o Procedimento?	X		X
Os dados armazenados poderão ser impressos ou salvos em outros arquivos para segurança?	X		X
Somente os analistas que utilizam o sistema tema acesso ao equipamento?	X		X
O sistema apresenta documentação detalhada e atualizada?	X		X
Possui procedimento para gerenciamento de acesso?	X		X
Existe um backp de segurança dos dados.	X		X

Foram também avaliados outros critérios para que se considere o sistema computadorizado validado (**Tabela 23).**

Tabela 23. Critérios para considerar o sistema computadorizado do equipamento de CLAE validável

Exigência	Critério de aceitação	Status
Possuir documentação que descreva as necessidades do usuário em relação ao negócio – fornece informações dos requisitos do usuário para avaliação dos riscos	Atende a exigência	Atende a exigência
Possuir Especificação Técnica/ Funcional – fornece informações da funcionalidade do sistema para avaliação dos riscos atendendo aos requisitos do usuário	Atende a exigência	Atende a exigência
Descrição do sistema	Atende a exigência	Atende a exigência
Análise de riscos e avaliação de criticidade do sistema	Atende a exigência	Atende a exigência
Avaliação documentada do histórico do sistema	Atende a exigência	Atende a exigência

cont.

cont.

Exigência	Critério de aceitação	Status
Controle para que entradas e modificações de dados sejam realizadas apenas por pessoas autorizadas (devem ser utilizadas medidas de segurança, tais como utilização de senhas, código pessoal, chaves ou acesso restrito aos terminais)	Atende a exigência	Atende a exigência
Capacidade de registrar tentativas de acesso por pessoas não autorizadas	Atende a exigência	Atende a exigência
Capacidade de registrar os acessos autorizados, incluindo usuário, hora e data	Atende a exigência	Atende a exigência
Manutenção dos registros de todas as entradas e alterações quando houver alteração de dados	Atende a exigência	Atende a exigência
Possibilidade de impressão dos dados armazenados eletronicamente	Atende a exigência	Atende a exigência

cont.

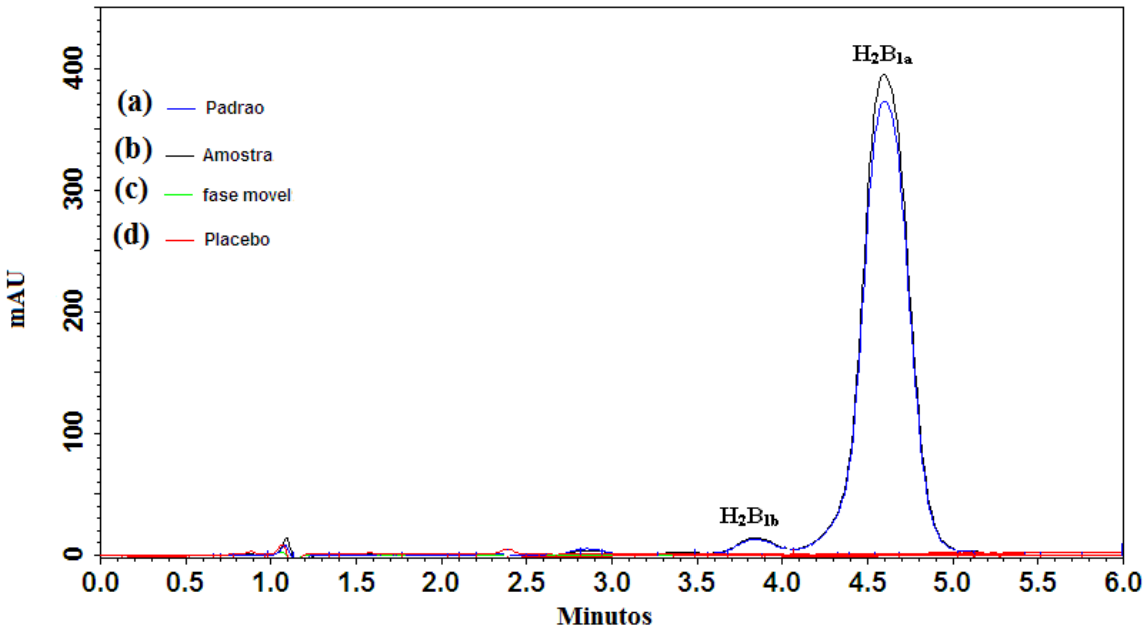
cont.

Exigência	Critério de aceitação	Status
Inviolabilidade e proteção dos dados históricos, tanto de processo ou operações, quanto de rastreabilidade de modificações feitas pelo operador do sistema (por meios eletrônicos contra danos acidentais ou intencionais)	Atende a exigência	Atende a exigência
Possibilidade de realização de *backup* em intervalos regulares. Os dados de *backup* devem ser armazenados por um tempo definido e em local separado e seguro	Atende a exigência	Atende a exigência
Inviolabilidade e proteção dos dados históricos, tanto de processo ou operações, quanto de rastreabilidade de modificações feitas pelo operador do sistema (por meios eletrônicos contra danos acidentais ou intencionais)	Atende a exigência	Atende a exigência

5.3 CROMATOGRAFIA EM FASE LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE) PARA QUANTIFICAÇÃO DA IVERMECTINA H_2B1_a e H_2B1_b

Pelo método proposto para determinação dos homólogos da ivermectina (H_2B_{1a} e H_2B_{1b}) em comprimidos por CLAE obteve-se tempo de retenção para a ivermectina $H_2B_{1b,}$ de 4,03 min e de 4,87 min para a ivermectina $H_2B_{1a.}$ Os cromatogramas obtidos podem ser observados na **Figura 13.**

Figure 13. Cromatogramas das soluções do padrão (a), da amostra (b), da fase móvel (c) e do placebo (d). Concentração: 190,12 µg mL^{-1} para H_2B1_a e 5,72 µg mL^{-1} para H_2B1_b. Condições: Fase móvel: acetonitrila e água (95:5, v/v) com 1 % ácido acético, coluna Lichrocart® 100 RP-18 (125 x 4 mm, 5 µm), vazão 1.0 mL min^{-1}, detecção no UV a 245 nm, volume de injeção: 20 µL e temperatura do forno 25ºC.



5.3.1 Seletividade

Os resultados encontrados na determinação da seletividade empregando-se o método por CLAE podem ser observados na **Tabela 24.**

Tabela 24. Valores obtidos nos ensaios de seletividade para a ivermectina por CLAE

Ivermectina	H_2B_{1a}			H_2B_{1b}		
	1	**2**	**3**	**1**	**2**	**3**
(%)	97,61	97,86	97,74	3,00	3,00	3,02
Média (%)		97,74			3,01	
DPR (%)		0,13			0,38	

5.3.2 Linearidade

Os resultados da determinação da curva analítica empregando-se o método por CLAE podem ser observados nas **Figuras 14 e 15.**

Figura 14. Curva analítica da ivermectina H_2B_{1a} obtida pelo método cromatográfico. Condições: Concentração: 190,12 µg mL^{-1} de ivermectina H_2B_{1a}. Fase móvel: acetonitrila e água (95:5, v/v) com 1 % ácido acético, coluna Lichrocart® 100 RP-18 (125 x 4 mm, 5 µm), vazão 1.0 mL min^{-1}, detecção no UV a 245 nm, volume de injeção: 20 µL e temperatura do forno 25ºC.

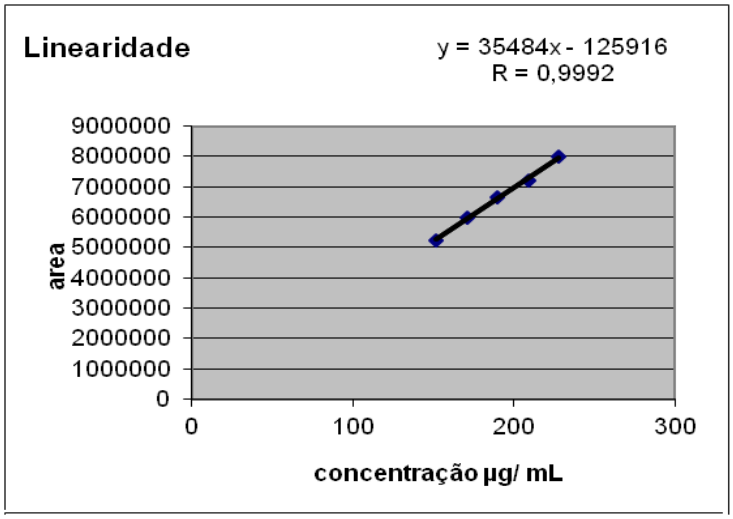
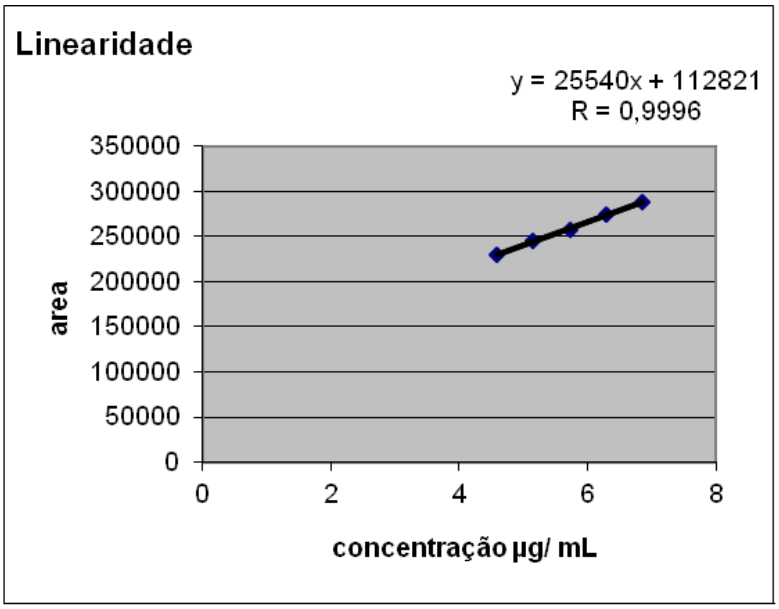


Figura 15. Curva analítica da ivermectina H_2B_{1b} obtida pelo método cromatográfico. Condições: 5,72 µg mL^{-1} de ivermectina H_2B_{1b}. Fase móvel: acetonitrila e água (95:5, v/v) com 1 % ácido acético, coluna Lichrocart® 100 RP-18 (125 x 4 mm, 5 µm), vazão 1.0 mL min^{-1}, detecção no UV a 245 nm, volume de injeção: 20 µL e temperatura do forno 25ºC.



Os resultados obtidos na determinação da curva analítica e os limites de detecção e de quantificação, empregando-se o método por CLAE, podem ser observados na **Tabela 25**.

Tabela 25. Regressão linear dos dados e limites de detecção e de quantificação obtidos na determinação da ivermectina H_2B_{1a} e H_2B_{1b} por CLAE

Parâmetro estatístico	H_2B_{1a}	H_2B_{1b}
Intervalo de concentração (µg mL^{-1}) [a]	152,10 – 228,14	4,57– 6,86
Equação da reta	y = 35484x - 125916	y = 25540x + 112821
Coeficiente de correlação (r)	0,9992	0,9996
Limite de detecção (µg mL^{-1})	6,30	0,54
Limite de quantificação (µg mL^{-1})	19,11	1,64
Teste F [b]	627,66	196,01

[a] n= 5

[b] Valor de confiança de 95 %, 6,39.

5.3.3 Teste de adequabilidade do sistema

Os resultados obtidos no teste de adequabilidade do sistema podem ser observados na **Tabela 26**.

Tabela 26. Resultados estatísticos obtidos no teste de adequabilidade do sistema

Parâmetro [a]	**H_2B_{1a}**	**H_2B_{1b}**
Tempo de retenção	4,87	4,03
Área	6444976	181400
Altura dos picos	339588	1192
Pratos teóricos	3464	4624
Fator de capacidade	2,90	2,22
Assimetria	1,24	0.97

[a] Média 10 determinações padrão

5.3.4 Precisão

Os resultados da determinação da precisão obtidos podem ser observados na **Tabela 27.**

Tabela 27. Resultados estatísticos obtidos no ensaio de precisão para determinação da ivermectina H_2B_{1a} e H_2B_{1b} por CLAE

Precisão	**H_2B_{1a}(%)**	**H_2B_{1b} (%)**
Repetibilidade [a]	97,99 ± 0,37	3,01 ± 0,01
DPR (%)	0,48	0,25
Precisão intermediária [b]	96,95 ± 1,09	3,02 ± 0,01
DPR (%)	0,99	0,33

[a] valor média aritmética (n = 6)
[b] valor média aritmética (n = 3)
DPR= Desvio padrão relativo

5.3.5 Exatidão

Os resultados do teste de recuperação obtidos, empregando-se o método de determinação por CLAE, podem ser observados na **Tabela 28.**

Tabela 28. Resultados estatísticos obtidos no teste de recuperação após adição da solução padrão da ivermectina à solução da amostra do comprimido analisadas por CLAE

Amostra	**Adicionado (µg mL^{-1})**	**Encontrado (µg mL^{-1})**	**Recuperado* (%)**
H_2B_{1a}	151,90	152,10 ± 1,13	100,13
	193,70	190,12 ± 0,18	98,15
	230,68	228,14 ± 0,12	98,90

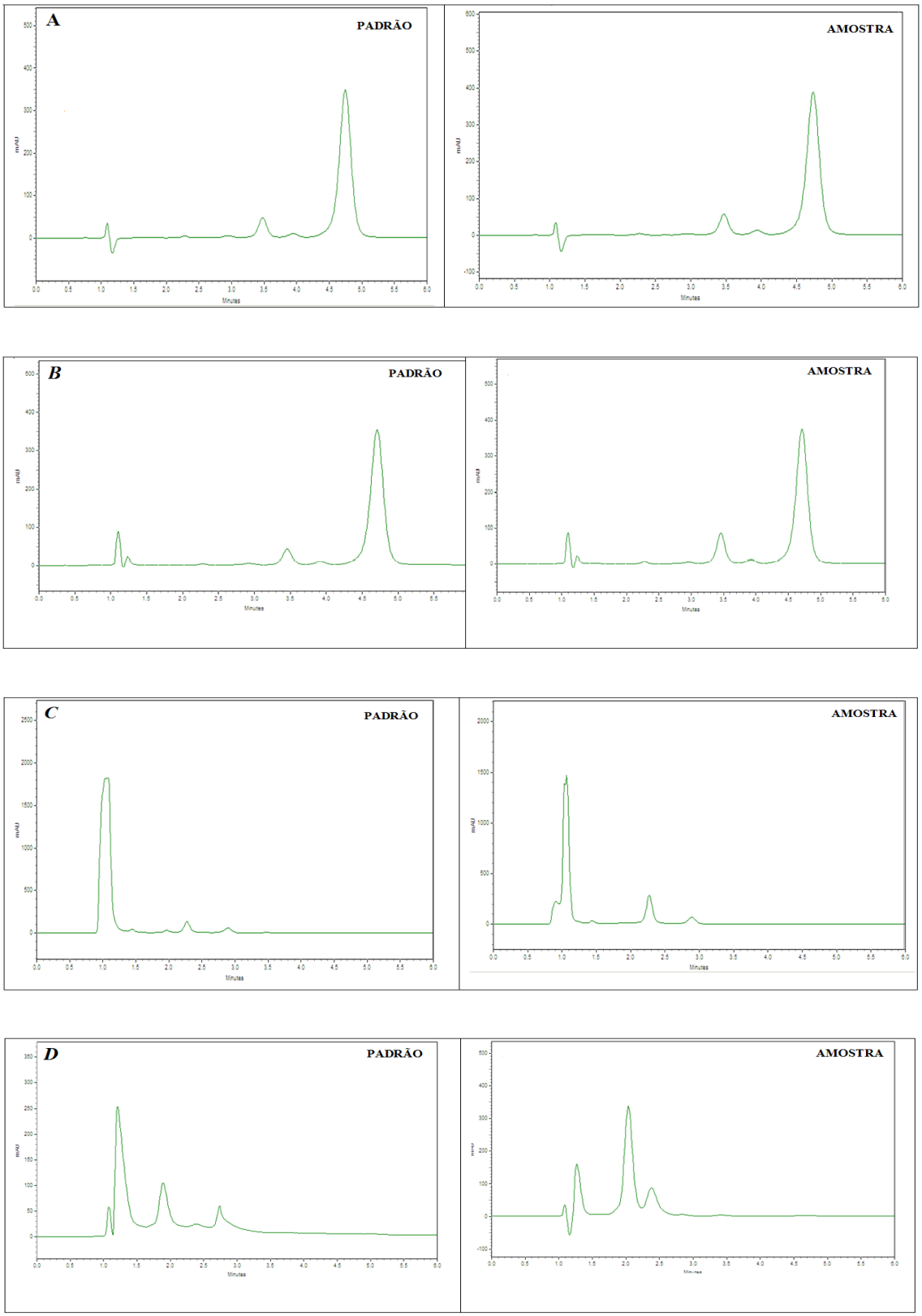
Amostra	**Adicionado (µg mL^{-1})**	**Encontrado (µg mL^{-1})**	**Recuperado* (%)**
H_2B_{1b}	4,58	4,57 ± 1,21	99,78
	5,67	5,72 ± 0,48	100,88
	6,81	6,86 ± 0,54	100,73

*n=3

5.3.6 Teste de estresse

Os resultados obtidos nos testes de estresse, empregando-se o método por CLAE, podem ser observados nas **Figuras 16.**

Figura 16. Cromatogramas após teste de estresse. Concentração: 190,12 µg mL^{-1} de H_2B_{1a} e 5,72 µg mL^{-1} de H_2B_{1b}. Cromatogramas: hidrólise neutra (A), meio oxidante (B), hidrólise ácida (C) e hidrólise alcalina (D). Condições cromatográficas: mesmas descritas na Figura 13.



5.3.7 Robustez e estabilidade

Após efetuadas pequenas e deliberadas modificações nos parâmetros analíticos, não foram observadas alterações significativas nas respostas instrumentais. Os valores de DPR foram inferiores a 2 %, em todos os casos, como pode ser observado na **Tabela 29.**

Tabela 29. Resultados obtidos nos ensaios de estabilidade e robustez (após modificações no comprimento de onda para detecção no UV e na composição da fase móvel) em relação às condições iniciais

Robustez	H_2B_{1a}	H_2B_{1b}
Detecção UV (243 nm)*	0,03	0,70
Detecção UV (247 nm) *	0,12	0,70
Acetonitrila: água (96:4 v/v) com 1 % ácido acético *	1,14	0,47
Acetonitrila: água (94:6 v/v) com 1 % ácido acético *	0,40	1,39
Estabilidade 4 horas *	0,26	0,71

* Desvio padrão relativo (%)

5.3.8 Identificação das espécies moleculares de ivermectina H_2B1_a e H_2B1_b

Conforme **Figuras 17, 18, 19, 20 e 21** e **Tabelas 30 e 31** pode ser observada a identificação das espécies moleculares de ivermectina H_2B1_a e H_2B1_b obtida pela técnica de em fase líquida acoplada ao espectrometro de massa.

Figura 17. Cromatograma da ivermectina. Condições: Concentração: 190,12 µg mL^{-1} para H_2B1_a e 5,72 µg mL^{-1} para H_2B1_b. Condições cromatográficas: Coluna: LiChroCART ® 100 RP-18 (125 x 4 mm, 5 mm), fase móvel: acetonitrila e água (95:5, v/v) com 1 % de ácido acético, vazão: 1,0 mL min^{-1} , *split* do MS de 1:5. Detecção no UV a 245 nm e temperatura de 25 ± 1 º C.

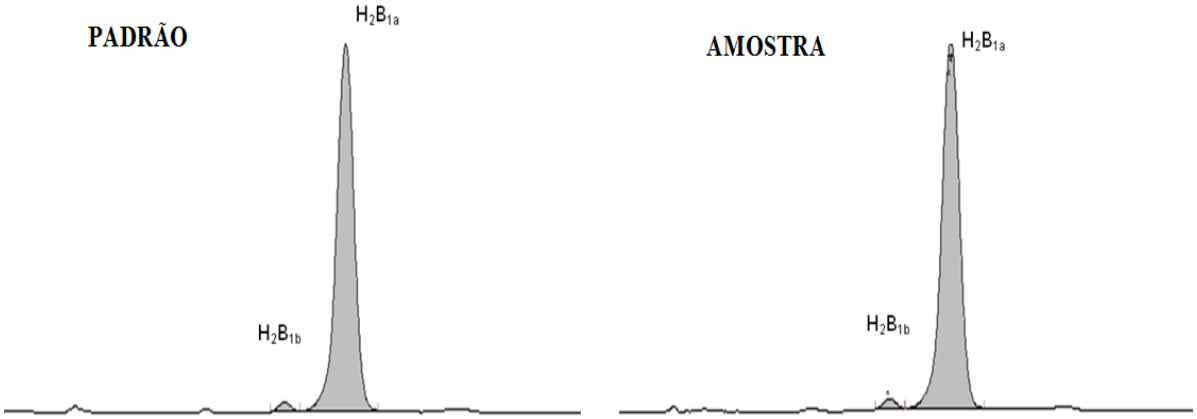


Figura 18. Espectros de massa dos homólogos da solução padrão de ivermectina H_2B1_a. Condições: mesmas descritas na Figura 17.

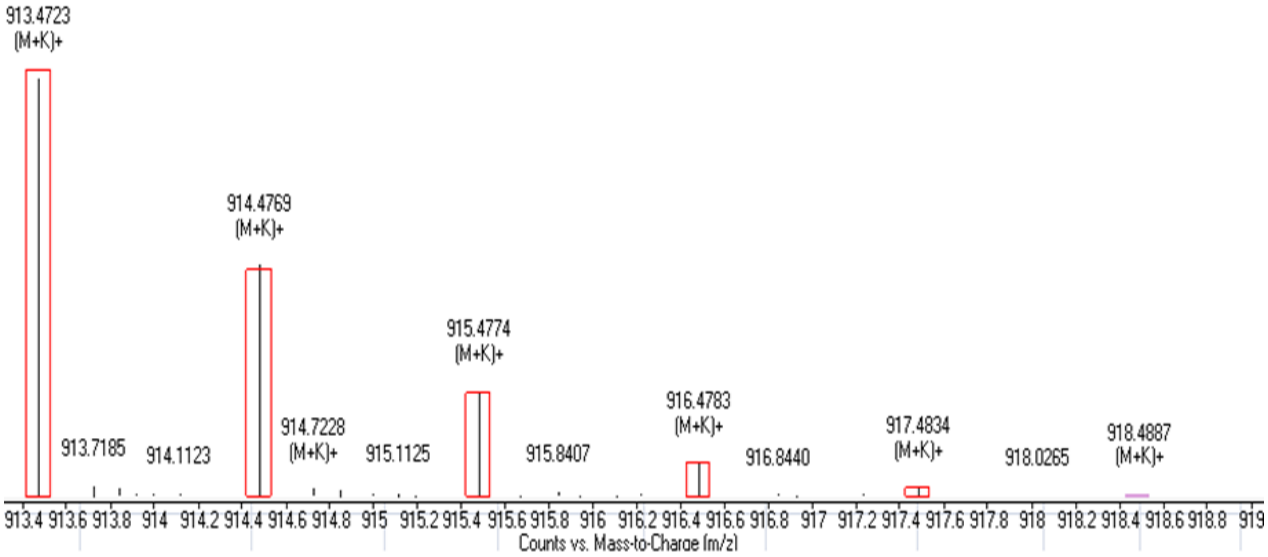


Figura 19. Espectros de massa dos homólogos da solução da amostra de ivermectina H_2B1_a. Condições: mesmas descritas na Figura 17.

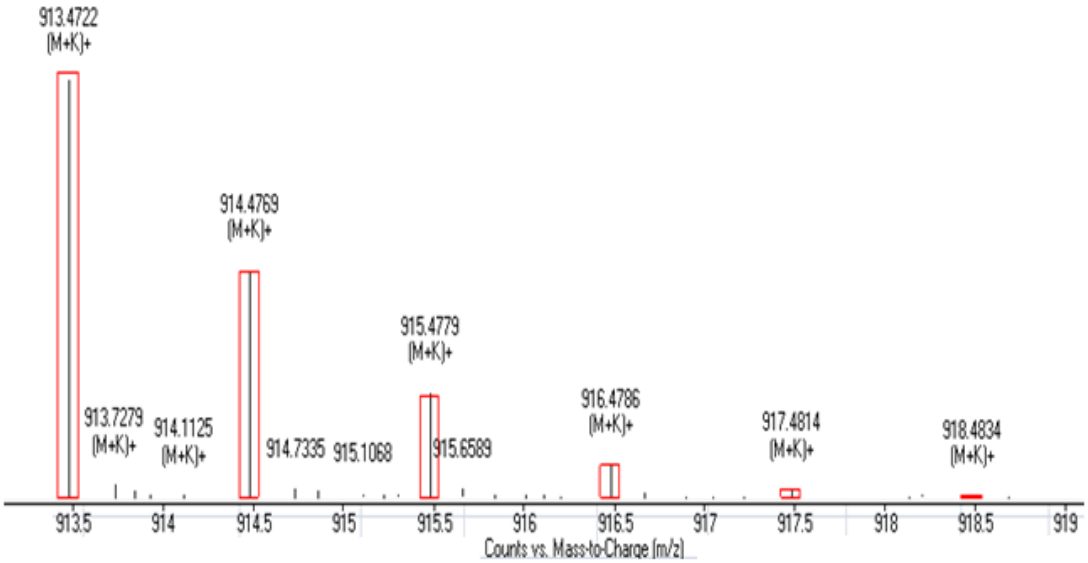


Figura 20. Espectros de massa dos homólogos da solução padrão de ivermectina H_2B1_b. Condições: mesmas descritas na Figura 17.

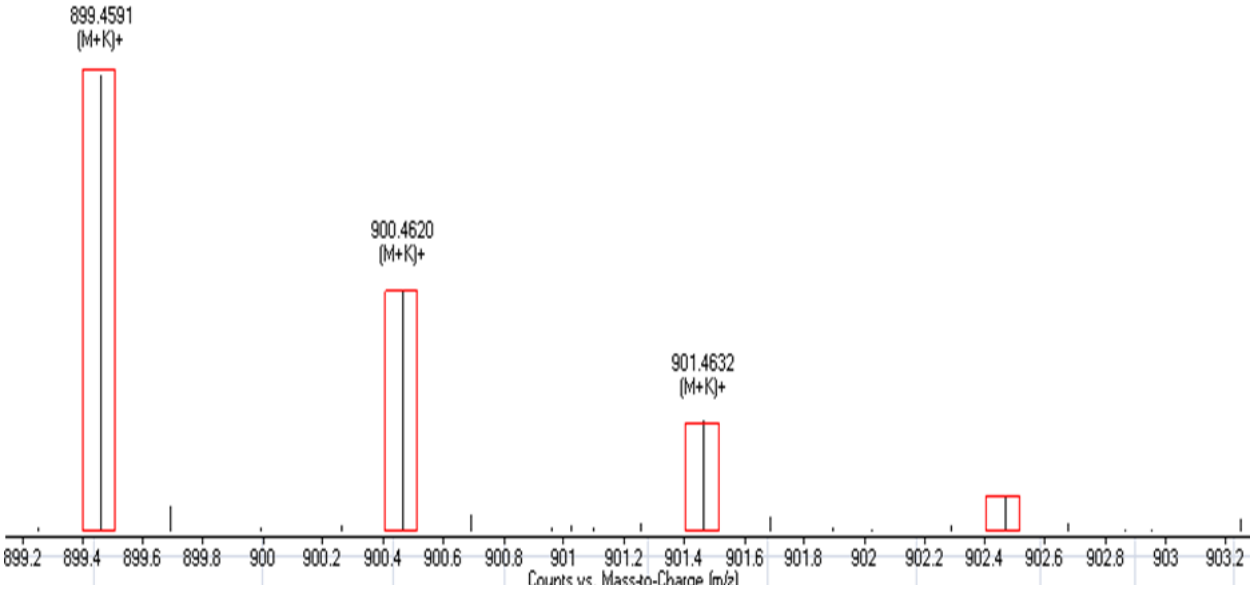


Figura 21. Espectros de massa dos homólogos da solução da amostra de ivermectina H_2B1_b. Condições: mesmas descritas na Figura 17.

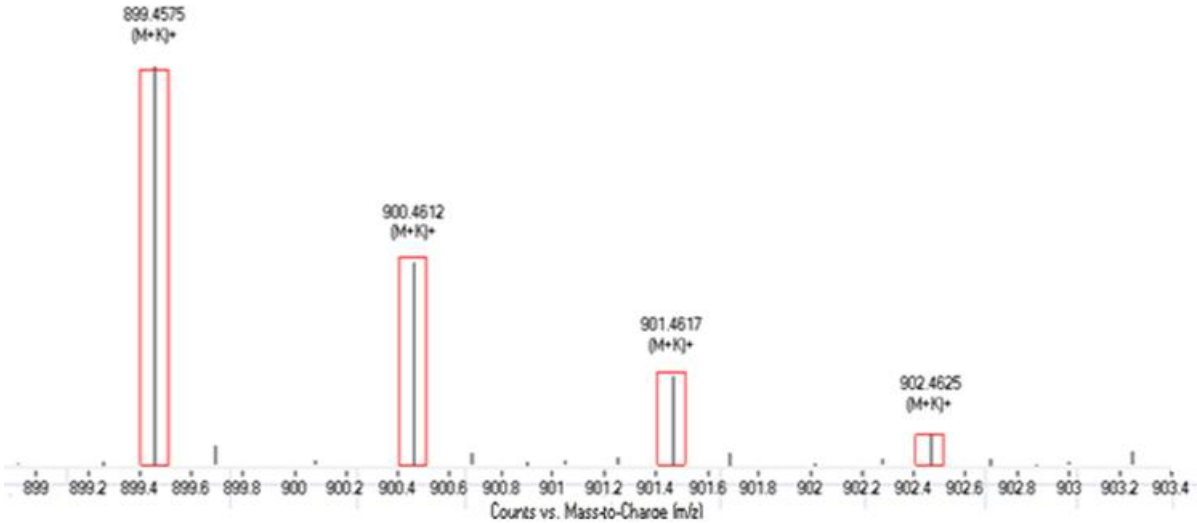


Tabela 30. Resultados obtidos a partir do cromatograma da solução do padrão

Pico	Modo do Ionização (Melhor resposta)	m/z +ESI	Espécie	Fórmula molecular proposta	Nome do componente
1	Positiva	899,4591	[M+K]+	$C_{47}H_{72}O_{14}$	Ivermectina H_2B_{1b}
2	Positiva	913,4723	[M+K]+	$C_{48}H_{74}O_{14}$	Ivermectina H_2B_{1a}

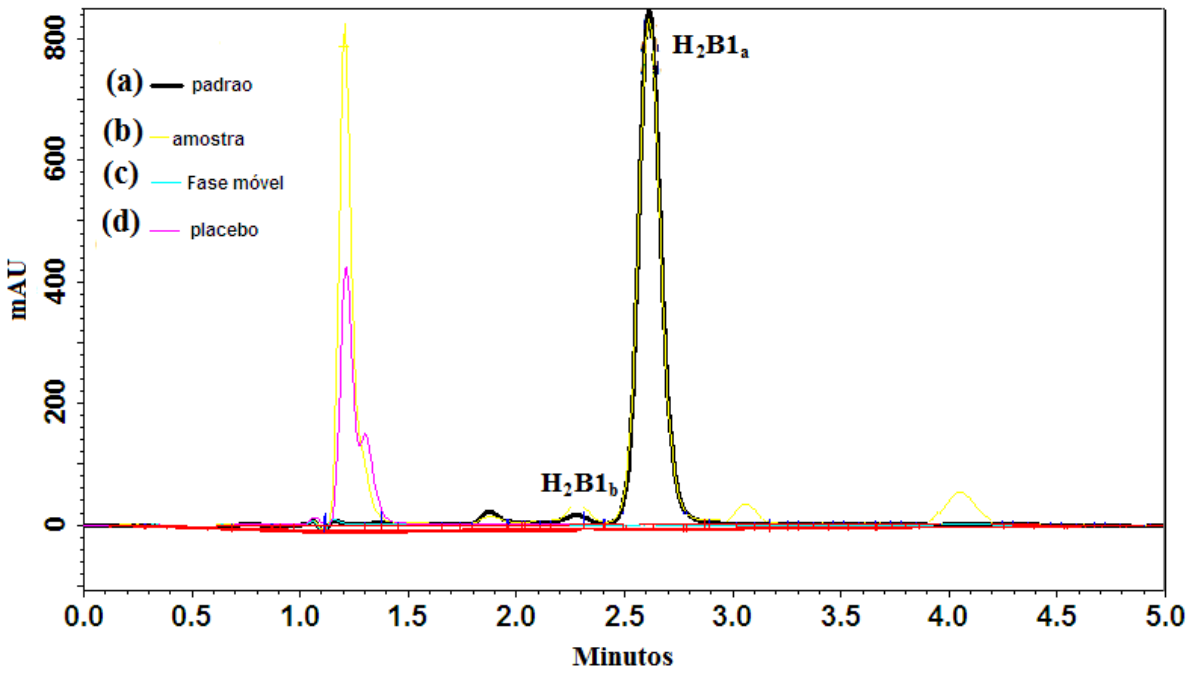
Tabela 31. Resultados obtidos a partir do cromatograma da solução da amostra

Pico	Modo de Ionização (Melhor resposta)	m/z +ESI	Espécie	Fórmula molecular proposta	Nome do componente
1	Positiva	899,4575	[M+K]+	$C_{47}H_{72}O_{14}$	Ivermectina H_2B_{1b}
2	Positiva	913,4722	[M+K]+	$C_{48}H_{74}O_{14}$	Ivermectina H_2B_{1a}

5.4 CROMATOGRAFIA EM FASE LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE) PARA QUANTIFICAÇÃO DE ABAMECTINA H_2B1_a e H_2B1_b

Pelo método proposto para determinação dos homólogos da abamectina (H_2B_{1a} e H_2B_{1b}) em gel por CLAE foram obtidos um tempo de retenção de 2,28 min para a H_2B_{1b} e de 2,61 min para a $H_2B_{1a.}$ Os cromatogramas s podem ser observados na **Figura 22.**

Figure 22. Cromatogramas das soluções do padrão (a), da amostra (b), da fase móvel (c) e do placebo (d). Concentração: 187,64 µg mL^{-1} de H_2B_{1a} e 9,76 µg mL^{-1} de H_2B_{1b}. Condições: Fase móvel: acetonitrila e água (95:5, v/v) com 1 % de ácido acético, coluna Lichrocart® 100 RP-18 (125 x 4 mm, 5 µm), vazão 1.0 mL min^{-1}, detecção no UV a 245 nm, volume de injeção: 20 µL e temperatura do forno 25ºC.



5.4.1 Seletividade

Os resultados encontrados na determinação da seletividade empregando-se o método por CLAE podem ser observados na **Tabela 32.**

Tabela 32. Valores obtidos nos ensaios de seletividade para a abamectina por CLAE

Abamectina	H_2B_{1a}			H_2B_{1b}		
	1	**2**	**3**	**1**	**2**	**3**
(%)	92,34	92,01	91,85	6,46	6,46	6,41
Média (%)		92,07			6,43	
DPR (%)		0,002			0,47	

5.4.2 Linearidade

Os resultados da determinação da curva analítica empregando-se o método por CLAE podem ser observados nas **Figuras 23 e 24.**

Figura 23. Curva analítica da abamectina H_2B_{1a} obtida pelo método cromatográfico. Condições: Concentração: 187,64 µg mL^{-1} de abamectina H_2B_{1a}. Fase móvel: acetonitrila e água (95:5, v/v) com 1 % de ácido acético, coluna Lichrocart® 100 RP-18 (125 x 4 mm, 5 µm), vazão 1.0 mL min^{-1}, detecção no UV a 245 nm, volume de injeção: 20 µL e temperatura do forno 25ºC.

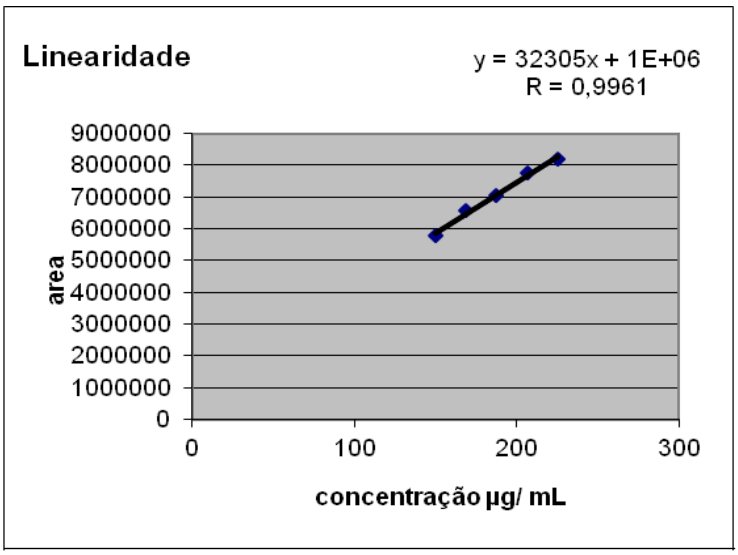
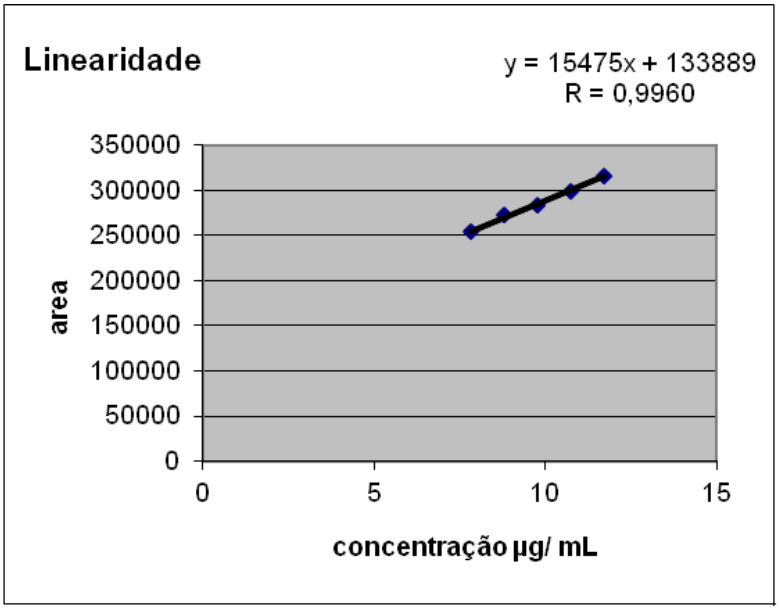


Figura 24. Curva analítica da abamectina H_2B_{1b} obtida pelo método cromatográfico. Condições: 9,76 µg mL^{-1} de abamectina H_2B_{1b}. Fase móvel: acetonitrila e água (95:5, v/v) com 1 % de ácido acético, coluna Lichrocart® 100 RP-18 (125 x 4 mm, 5 µm), vazão 1.0 mL min^{-1}, detecção no UV a 245 nm, volume de injeção: 20 µL e temperatura do forno 25ºC.



Os resultados obtidos na determinação da curva analítica e os limites de detecção e de quantificação, empregando-se o método por CLAE, podem ser observados na **Tabela 33**.

Tabela 33. Regressão linear dos dados e limites de detecção e de quantificação obtidos na determinação da abamectina H_2B_{1a} e H_2B_{1b} por CLAE

Parâmetros estatísticos	H_2B_{1a}	H_2B_{1b}
Intervalo de concentração (µg mL^{-1}) [a]	150,11 – 225,17	7,81 – 11,71
Equação da reta	y = 32305x + 1x 10^6	y = 15475x+133889
Coeficiente de correlação (r)	0,9961	0,9960
Limite de detecção (µg mL^{-1})	2,83	1,25
Limite de quantificação (µg mL^{-1})	8,57	3,80
Teste F [b]	705,73	270,12

[a] n= 5

[b] Valor de confiança de 95 %, 6,39.

5.4.3 Teste de adequabilidade do sistema

Os resultados obtidos no teste de adequabilidade do sistema podem ser observados na **Tabela 34**.

Tabela 34. Resultados estatísticos obtidos no teste de adequabilidade do sistema

Parâmetro [a]	**H_2B_{1a}**	**H_2B_{1b}**
Tempo de retenção	2,61	2,28
Área	6602238	465191
Altura dos picos	854701	24642
Pratos teóricos	4646	4692
Fator de capacidade	1,44	1,13
Assimetria	1,25	1,33

[a] Média 10 determinações padrão

5.4.4 Precisão

Os resultados da determinação da precisão obtidos podem ser observados na **Tabela 35.**

Tabela 35. Resultados estatísticos obtidos no ensaio de precisão para determinação da abamectina H_2B_{1a} e H_2B_{1b} por CLAE

Precisão	**H_2B_{1a}(%)**	**H_2B_{1b} (%)**
Repetibilidade [a]	92,29 ± 0,65	6,37 ± 0,06
DPR (%)	0,88	1,16
Precisão intermediária [b]	92,80 ± 1,41	6,50 ± 0,14
DPR (%)	1,10	1,52

[a] valor média aritmética (n = 6)
[b] valor média aritmética (n = 2)
DPR= Desvio padrão relativo

5.4.5 Exatidão

Os resultados do teste de recuperação obtidos, empregando-se o método de determinação por CLAE, podem ser observados na **Tabela 36.**

Tabela 36. Resultados estatísticos obtidos no teste de recuperação após adição das soluções padrão de abamectina ao placebo da amostra e analisadas por CLAE

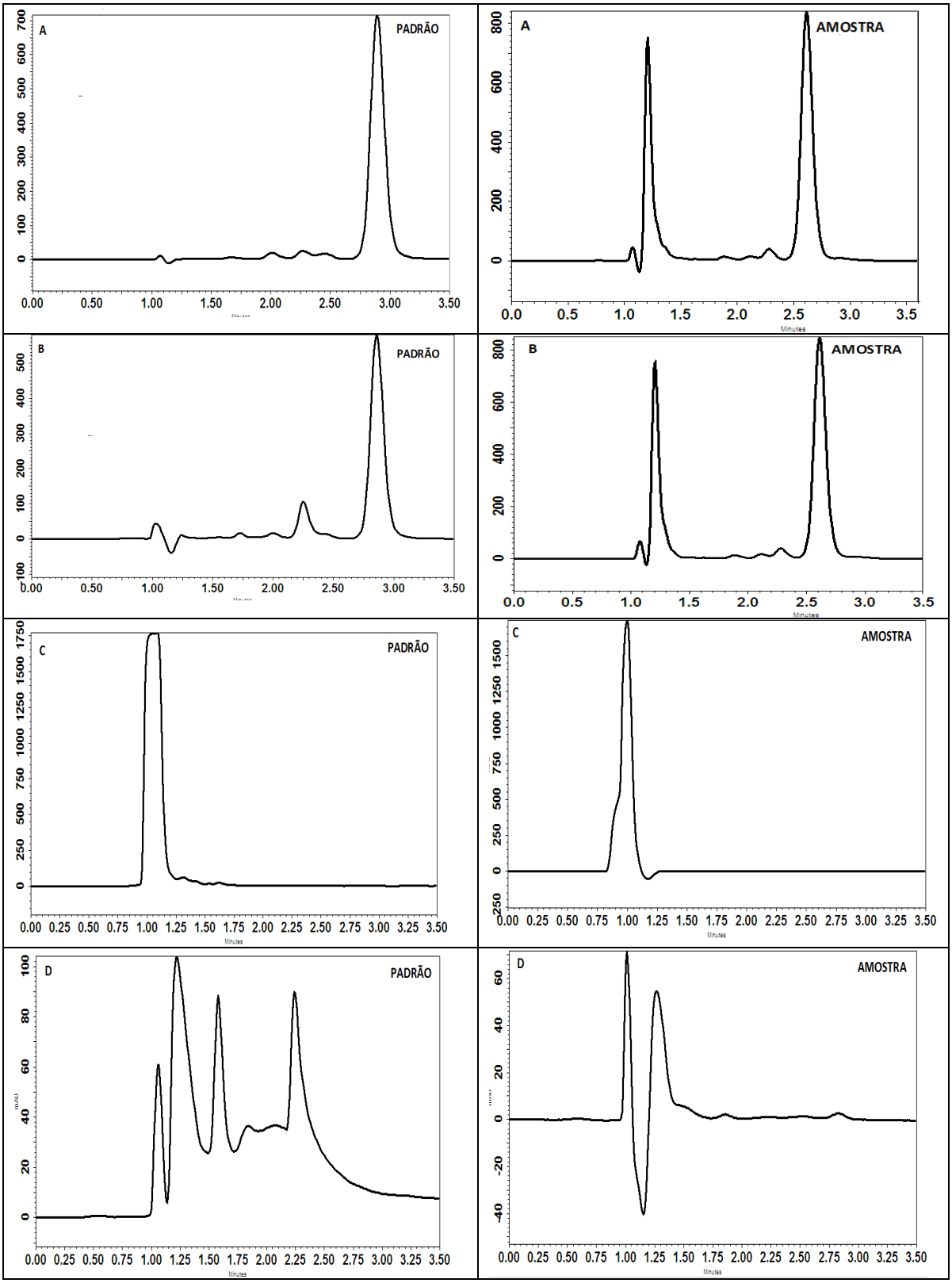
Amostra	**Adicionado (μg mL^{-1})**	**Encontrado (μg mL^{-1})**	**Recuperado (%)**
H_2B_{1a}	152,61	150,11 ± 0,77	98,36
	190,03	187,64 ± 0,01	98,74
	228,12	225,17 ± 1,04	98,70

Amostra	**Adicionado (μg mL^{-1})**	**Encontrado (μg mL^{-1})**	**Recuperado (%)**
H_2B_{1b}	7,82	7,81 ± 0,07	99,87
	9,72	9,76 ± 0,01	100,41
	11,85	11,71 ± 0,01	98,82

5.4.6 Teste de estresse

Os resultados obtidos nos testes de estresse, empregando-se o método por CLAE, podem ser observados nas **Figuras 25.**

Figura 25. Cromatogramas após teste de estresse. Concentração: 187,64 µg mL^{-1} de H_2B_{1a} e 9,76 µg mL^{-1} de H_2B_{1b}. Cromatogramas: hidrólise neutra (A), meio oxidante (B), hidrólise ácida (C) e hidrólise alcalina (D). Condições cromatográficas: mesmas descritas na Figura 22.



5.4.7 Robustez e estabilidade

Após efetuadas pequenas e deliberadas modificações nos parâmetros analíticos, não foram observadas alterações significativas nas respostas instrumentais. Os valores de DPR foram inferiores a 2 %, em todos os casos, como pode ser observado na **Tabela 37.**

Tabela 37. Resultados obtidos nos ensaios de estabilidade e robustez após modificações no comprimento de onda da detecção no UV e na composição da fase móvel em relação às condições iniciais

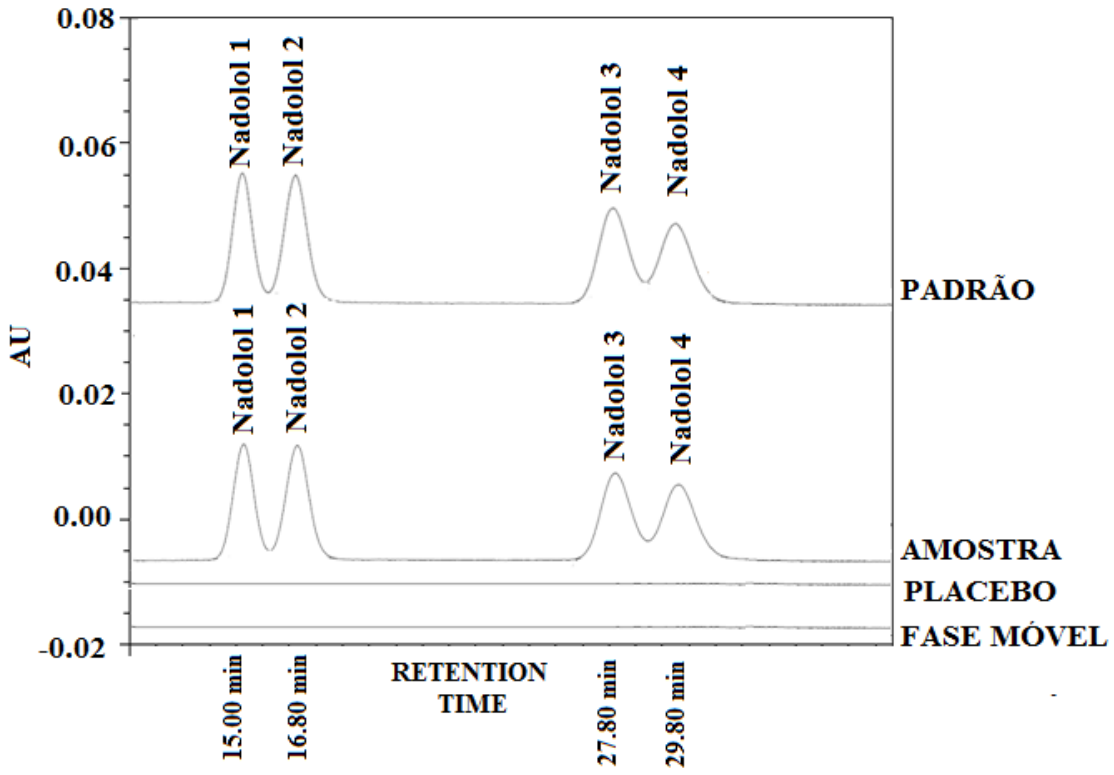
Robustez	**H_2B_{1a}**	**H_2B_{1b}**
Detecção UV (243 nm)*	0,86	0,99
Detecção UV (247 nm) *	0,47	1,74
Acetonitrila: água (96:4 v/v) com 1 % ácido acético *	0,10	0,44
Acetonitrila: água (94:6 v/v) com 1 % ácido acético *	0,62	0,88
Estabilidade 4 horas *	1,19	0,22

* Desvio padrão relativo (%)

5.5 CROMATOGRAFIA EM FASE LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE) PARA QUANTIFICAÇÃO DOS ENANTIÔMEROS DO NADOLOL EM CÁPSULAS

Para desenvolvimento do método para determinação de nadolol em cápsulas por CLAE, diferentes fases móveis e colunas foram testadas para alcançar uma separação e resolução eficiente dos quatro isômeros do nadolol. O tempo de retenção dos enantiômeros foi de 14,85 min, 16,69 min, 27,58 min e 29,76 min. Os cromatogramas obtidos podem ser observados na **Figura 26.**

Figure 26. Cromatogramas da solução do padrão de nadolol, da amostra, do placebo e da fase móvel. Concentração: 200 µg/mL de nadolol. Condições: Fase móvel: hexano: álcool etílico: dietilamina: ácido acético (86:14:0,3:0,3 v/v/v/v) , coluna Chiralcel OD® (250 x 4,6 mm, 10 µm), vazão 0,7 mL min^{-1}, detecção UV a 220 nm, volume de injeção: 20 µL e temperatura do forno 25ºC.



5.5.1 Seletividade

Os resultados encontrados na determinação da seletividade empregando-se o método por CLAE podem ser observados na **Tabela 38.**

Tabela 38. Valores obtidos nos ensaios de seletividade para o nadolol por CLAE

	Nadolol 1	**Nadolol 2**	**Nadolol 3**	**Nadolol 4**
Média* (%)	94,49	92,04	91,40	95,70
DPR (%)	0,19	1,82	0,8	1,36

* n=3

5.5.2 Linearidade

Os resultados da determinação da curva analítica empregando-se o método por CLAE podem ser observados nas **Figuras 27, 28, 29 e 30.**

Figura 27. Curva analítica do nadolol 1 obtida pelo método cromatográfico. Concentração: Intervalo de concentração do nadolol racêmico antes da separação cromatográfica: 160- 240 µg/mL. Condições: mesmas descritas na Figura 26.

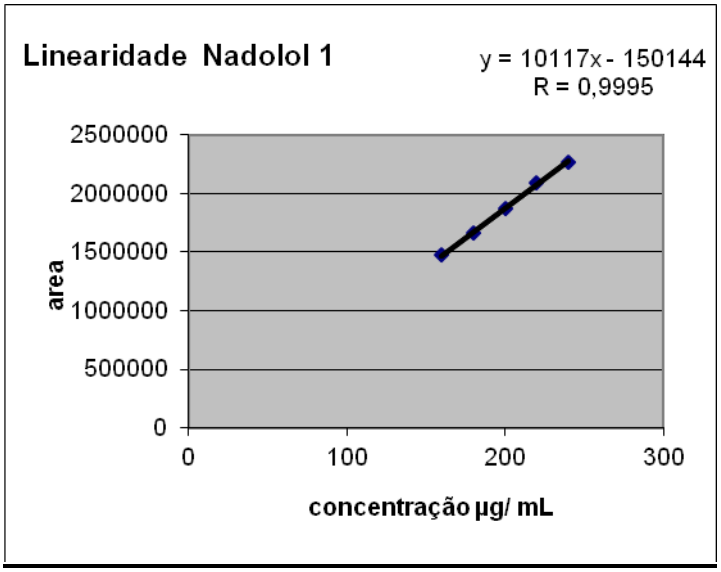


Figura 28. Curva analítica do nadolol 2 obtida pelo método cromatográfico. Concentração: Intervalo de concentração do nadolol racêmico antes da separação cromatográfica: 160- 240 µg/mL. Condições: mesmas descritas na Figura 26.

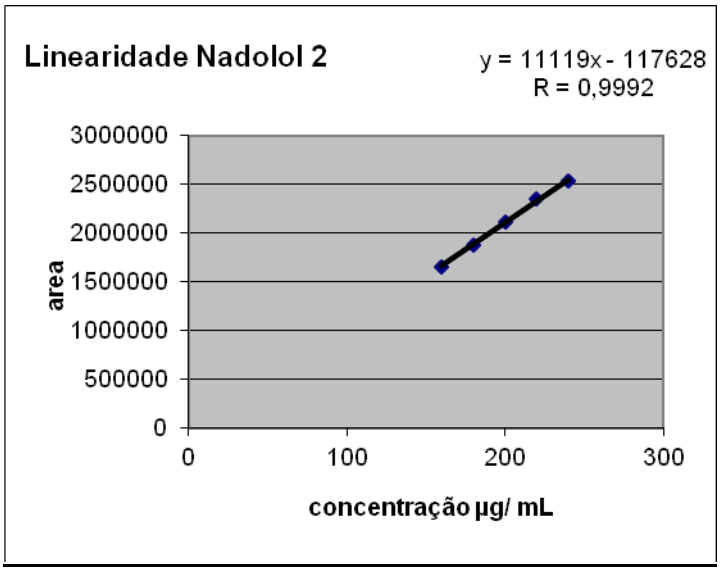


Figura 29. Curva analítica do nadolol 3 obtida pelo método cromatográfico Concentração: Intervalo de concentração do nadolol racêmico antes da separação cromatográfica: 160- 240 µg/mL. Condições: mesmas descritas na Figura 26.

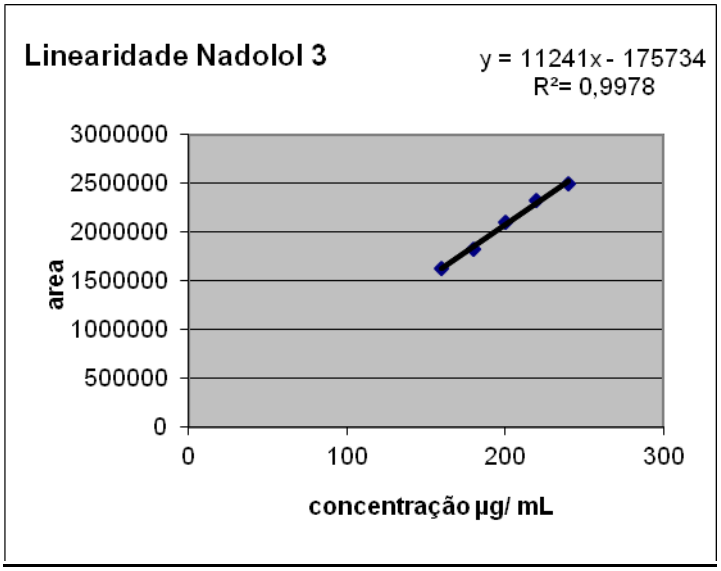
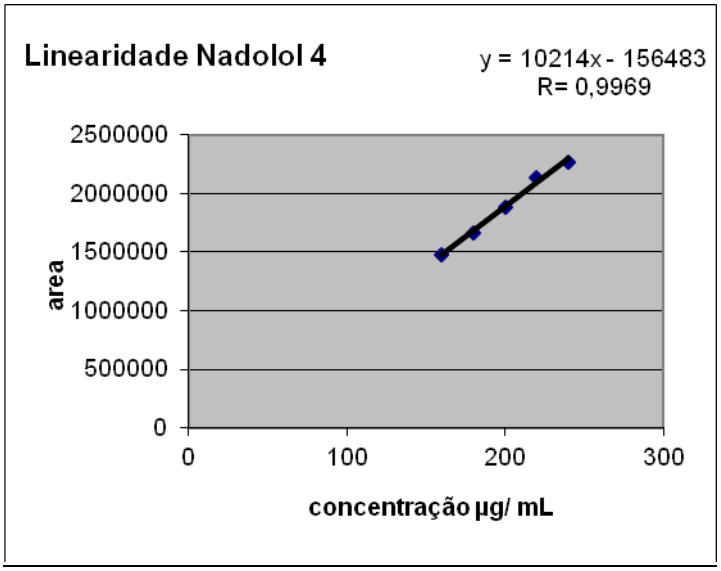


Figura 30. Curva analítica do nadolol 4 obtida pelo método cromatográfico. Concentração: Intervalo de concentração do nadolol racêmico antes da separação cromatográfica: 160- 240 µg/mL. Condições: mesmas descritas na Figura 26.



Os resultados obtidos na determinação da curva analítica e os limites de detecção e de quantificação, empregando-se o método por CLAE, podem ser observados na **Tabela 39**.

Tabela 39. Regressão linear dos dados e limites de detecção e de quantificação obtidos na determinação dos enatiômeros do nadolol por CLAE

Parâmetros estatísticos *	**Nadolol 1**	**Nadolol 2**	**Nadolol 3**	**Nadolol 4**
Equação da reta**	y = 10117x - 150144	y = 11119x - 117628	y = 11241x - 175734	y = 10214x - 156483
Coeficiente de correlação (r)	0,9995	0,9992	0,9978	0,9969
Limite de detecção (µg/mL)	11,58	18,48	17,46	0,53
Limite de quantificação (µ/mL)	35,10	56,00	52,90	1,60
Teste F ***	171,23	179,10	169,19	169,45

* n= 5

** Intervalo de concentração do nadolol racêmico antes da separação cromatográfica: 160- 240 µg/mL (Nadolol 1,2,3, e 4)

*** Valor de confiança de 95 %, 6,39.

5.5.3 Teste de adequabilidade do sistema

Os resultados obtidos no teste de adequabilidade do sistema podem ser observados na **Tabela 40**.

Tabela 40. Resultados estatísticos obtidos no teste de adequabilidade do sistema

Parâmetros [a]	**Nadolol 1**	**Nadolol 2**	**Nadolol 3**	**Nadolol 4**
Tempo de retenção (min)	15,00	16,80	27,80	29,80
Área	1740327	1944834	1443782	1201570
Altura dos picos	33492	34741	24460	20153
Pratos teóricos	2408	2195	4360	4285
Fator de capacidade	4,06	4,66	8,37	9,03
Assimetria	0,97	1,13	0,92	1,28

[a] Média 10 determinações padrão

5.5.4 Precisão

Os resultados da determinação da precisão obtidos podem ser observados nas **Tabelas 41 e 42.**

Tabela 41. Resultados estatísticos obtidos no ensaio de precisão intermediária para determinação dos enantiômeros do nadolol por CLAE

	Nadolol 1*	**Nadolol 2***	**Nadolol 3***	**Nadolol 4***
Média (%)	94,17	92,81	92,36	94,80
DPR (%)	0,48	1,17	1,46	1,34

* valor média aritmética (n = 2)
DPR= Desvio padrão relativo

Tabela 42. Resultados estatísticos obtidos no ensaio de repetibilidade para determinação dos enantiômeros do nadolol por CLAE

	Nadolol 1*	**Nadolol 2***	**Nadolol 3***	**Nadolol 4***
Média (%)	94,49	92,04	91,40	95,18
DPR (%)	0,19	1,82	0,80	1,58

* valor média aritmética (n = 6)
DPR= Desvio padrão relativo

5.5.5 Exatidão

Os resultados do teste de recuperação obtidos, empregando-se o método de determinação por CLAE, podem ser observados na **Tabela 43.**

Tabela 43. Resultados estatísticos obtidos no teste de recuperação após adição das soluções padrão de nadolol ao placebo e analisadas por CLAE

Nadolol	**80 %**	**100 %**	**120 %**
Nadolol 1 (% recuperada)*	100,40	100,24	99,62
Nadolol 2 (% recuperada)*	101,79	100,60	101,32
Nadolol 3 (% recuperada)*	101,15	101,29	100,34
Nadolol 4 (% recuperada)*	101,6	101,64	100,49

* Média 3 determinações

5.5.6 Teste de estresse

Os resultados obtidos nos testes de estresse, empregando-se o método por CLAE, podem ser observados nas **Tabela 44**.

Tabela 44. Resultados obtidos utilizando o método proposto por CLAE após o teste de estresse

Meio	**Nadolol 1 (%)**	**Nadolol 2 (%)**	**Nadolol 3 (%)**	**Nadolol 4 (%)**
Neutro	10.32	22.81	12.02	9.97
Oxidativo	36.12	21.34	42.59	67.89
Ácido	11.44	25.50	37.49	89.50
Alcalino	16.66	63.26	63.07	93.33

5.5.7 Robustez

Após efetuadas pequenas e deliberadas modificações nos parâmetros analíticos como variações no comprimento de onda e na vazão, não foram observadas alterações significativas nas respostas instrumentais. Os valores de DPR foram inferiores a 2 % em todos os casos como pode ser observado na **Tabela 45.**

Tabela 45. Resultados obtidos nos ensaios de robustez após modificações no comprimento de onda e na vazão em relação a condição inicial

Robustez	**Nadolol 1***	**Nadolol 2***	**Nadolol 3***	**Nadolol 4***
215 nm*	1,22	0,60	0,91	1,62
0,8 mL min^{-1}*	1,09	0,84	1,03	0,53

* Desvio padrão relativo (%)

5.5.8 Estabilidade

Não foram observadas alterações significativas após avaliação da estabilidade da solução do nadolol. Os valores de DPR foram inferiores a 2 % em todos os casos como pode ser observado na **Tabela 46.**

Tabela 46. Resultados obtidos nos ensaios de avaliação da estabilidade após 24 h em relação a condição inicial

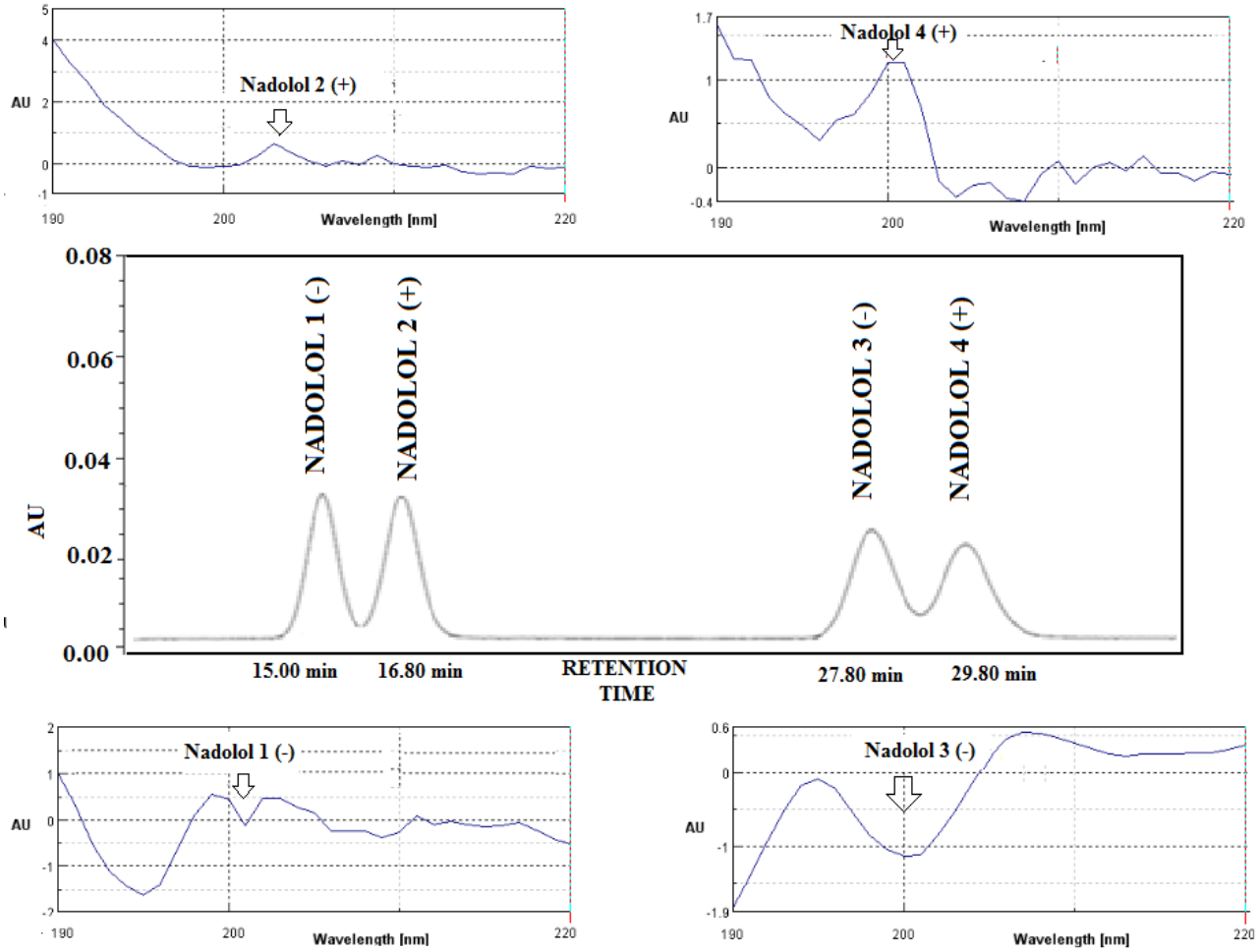
Estabilidade 24h *	**Nadolol 1***	**Nadolol 2***	**Nadolol 3***	**Nadolol 4***
Média (%)	94,50	92,08	90,95	93,41
DPR (%)	0,01	0,01	0,35	1,71

* Desvio padrão relativo (%)

5.6 DICROISMO CIRCULAR DOS ENANTIÔMEROS DO NADOLOL

Os resultados obtidos nos ensaios de dicroísmo circular para os quatro isômeros isolados do nadolol podem ser vistos na **Figura 31.**

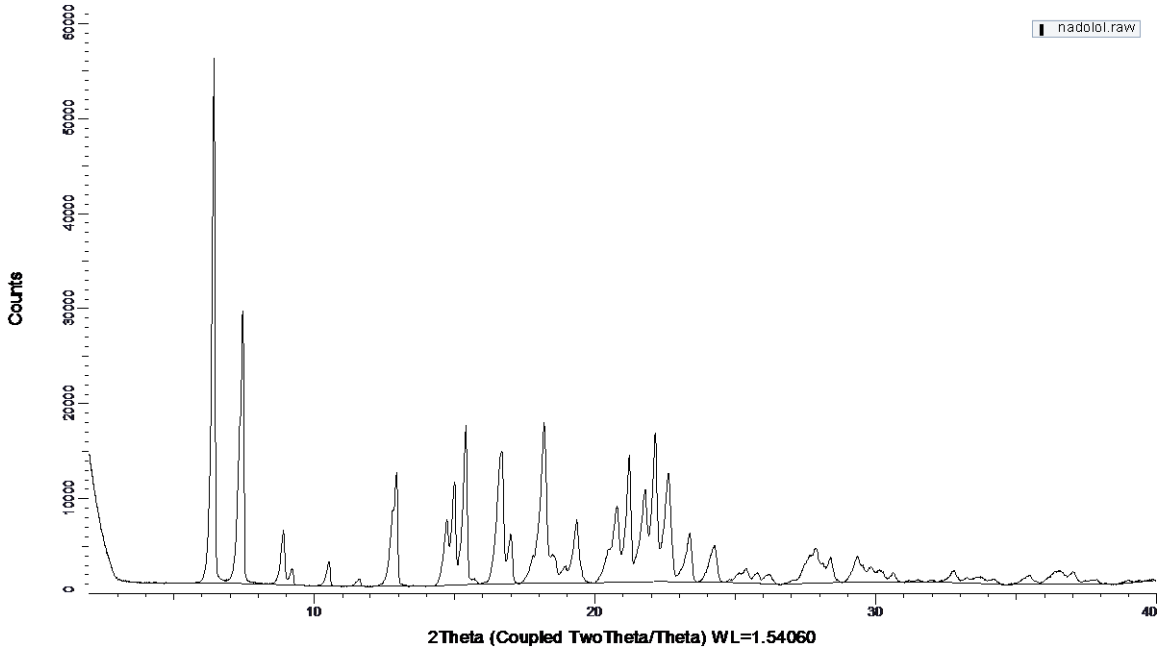
Figura 31. Espectro de dicroísmo circular dos enantiômeros do nadolol.



5.7 DIFRAÇÃO DE RAIOS X DO NADOLOL

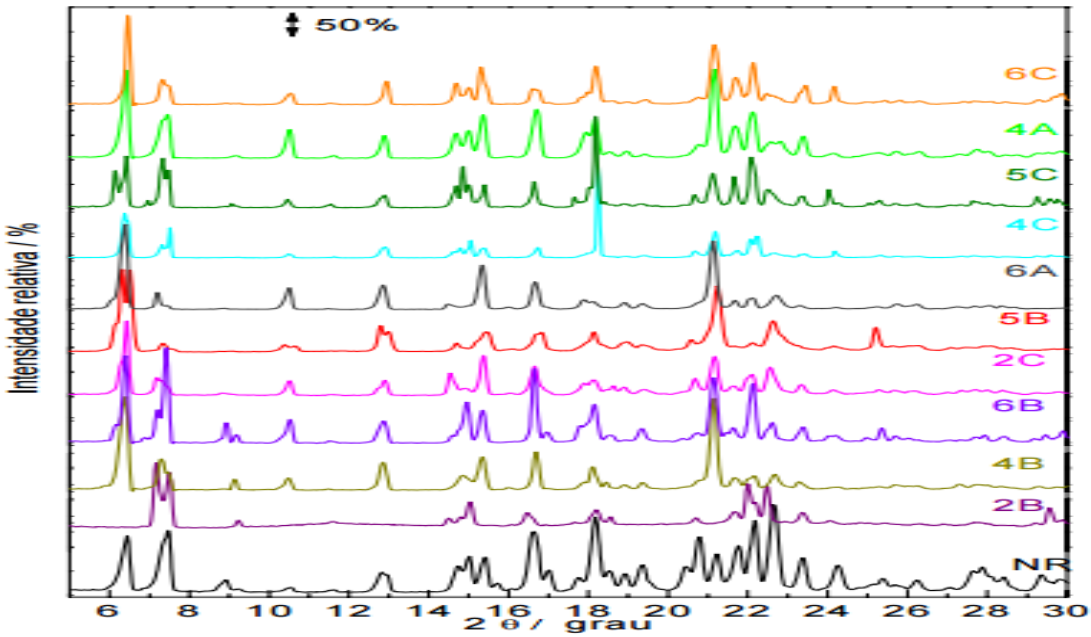
Na **Figura 32** pode ser observado o difratograma da matéria-prima nadolol utilizada no preparo, pela farmácia de manipulação, das cápsulas de nadolol 40 mg/ cápsula, que foram utilizadas no desenvolvimento e na validação dos métodos analíticos estudados na pesquisa.

Figura 32. Difratograma do nadolol racêmico.



Para comparação com o difratograma obtido **(Figura 32)** foi utilizado o difratograma do trabalho realizado por Amorin, 2012 (**Figura 33).**

Figura 33. Difratograma do nadolol analisado conforme indicado por Amorin, 2012 (Amorin, 2012).



5.8 ELETROFORESE CAPILAR

Foram testados as seguintes condições para desenvolvimento de uma metodologia para quantificação da abamectina, ivermectina e nadolol por eletroforese capilar.

Tabela 47. Descrição das condições de análise por eletroforese capilar para ivermectina

Ensaio	Concentração mg/mL	Temperatura (°C)	Eletrólito	Voltagem (kv)
1	0,3	25	Butanol ----------200 µL Dodecil sulfato de sódio-- 0,05 g Acetato de etila---------200 µL Imidazol 5 mM---------0,003 g Tetraborato de sódio --- 0,16 g β-Ciclodextrina----------0,04 g qsp----------10 mL / pH: 8,50	15
2	0,5	25	β-Ciclodextrina 1 % + metanol (30:70)	30
3	0,5	25	β-Ciclodextrina 5mM + metanol (30:70)	30
4	0,3	25	β-Ciclodextrina 5mM + metanol (30:70) + trieltilamina 0,05 %:	30
5	0,3	25	β-Ciclodextrina 3mM + metanol (50:50) + dietilamina 0,07 %, pH 5,1	30
6	0,5	25	β-Ciclodextrina 10mM + metanol (80:20) + dietilamina 0,07 %	30
7	0,3	25	Tetraborato de sódio 10 mM + acetonitrila (40:60), pH 8,0	30

cont.

cont.

Ensaio	Concentração mg/mL	Temperatura (°C)	Eletrólito	Voltagem (kv)
8	0,6	25	Tetraborato de sódio 10 mM + β-Ciclodextrina 10 mM + metanol (10:60:30)	30
9	0,3	25	Tetraborato de sódio 10 mM + metanol (25:75) com β-ciclodextrina 1 %	30
10	0,3	25	Tetraborato de sódio 40 mM + metanol + β-ciclodextrina 1 % (10:30:60) + dietilamina 0,07%	30
11	0,5	25	Tetraborato de sódio 12 mM (9,16 g 10 mL) + dodecil sulfato de sódio (0,1g/10 mL) + β-ciclodextrina 1% (0,09g/10 mL) + 4 mL Metanol qsp para 10 mL água.	30
12	0,3	25	CAPS 20 mM + β-ciclodextrina sulfatada 10 mM + metanol (20:20:60) pH 7,5	30
13	0,5	25	CAPS 20 mM+ β-ciclodextrina 10 mM + metanol (5:25:75) pH 6,27	30
14	0,3	25	CAPS 20 mM+ metanol (30:70)	30

cont.

cont.

Ensaio	Concentração mg/mL	Temperatura (°C)	Eletrólito	Voltagem (kv)
15	0,3	25	Imidazol 20 mM+ β-ciclodextrina sulfatada+ ácido acético 50 mM qsp 10 mL	30
16	0,3	25	Fosfato de sódio dibásico + β-ciclodextrina 5 mM (50:50)	30
17	0,3	18	NaOH 50 mM+ ácido acético 50 mM+ $CuSO_4$ 1,25 mM qsp 10 mL água	15
18	0,3	25	Norfloxacino 50 mM + metanol qsp 10 mL	30

Também foram realizados testes para análise dos quatro isômeros do nadolol por eletroforese capilar (Tabela 48).

Tabela 48. Descrição das condições de análise por eletroforese capilar para nadolol

Ensaio	Concentração mg/mL	Temperatura (°C)	Eletrólito	Voltagem (kv)
1	0,6	25	Fosfato potássio monobásico (0,136 g), Fosfato sódio monobásico (0,119 g), β-ciclodextrina sulfatada (0,04 g), butanol 1 mL/qsp 10 mL qsp----------10 mL / pH: 2,5	30

cont.

cont.

Ensaio	Concentração mg/mL	Temperatura (°C)	Eletrólito	Voltagem (kv)
2	0,3	25	Butanol ----------200 µL Dodecil sulfato de sódio-- 0,05 g Acetato de etila---------200 µL Imidazol 5 mM---------0,003 g Tetraborato de sódio --- 0,16 g β-Ciclodextrina----------0,04 g qsp----------10 mL / pH: 8,50	15
3	0,4	25	Tampão fosfato de sódio dibásico 25 mM	15
4	0,3	25	Tampão fosfato de sódio dibásico 25 mM + β-ciclodextrina 20 mM (50:50) pH 8,0	15
5	0,5	25	Dodecil sulfato de sódio 50 mM + β-ciclodextrina 20 mM (50:50)	30
6	0,3	25	Dodecilsulfato de sódio (0,10 g), fosfato potássio monobásico (0,136 g), Fosfato sódio monobásico (0,119 g), dodecilsulfato de sódio (0,10 g), β-ciclodextrina sulfatada (0,04 g), butanol 1 mL/qsp 10 mLqsp----10 mL / pH: 2,5	30

cont.

cont.

Ensaio	Concentração mg/mL	Temperatura (°C)	Eletrólito	Voltagem (kv)
7	0,3	25	Tetraborato de sódio 40 mM + metanol + dodecilsulfato de sódio 30 mM + β-ciclodextrina 0,4 g/10 mL + 3 metanol + qsp 10 mL água.	30
8	0,4	25	Tetraborato de sódio 10 mM + metanol (25:75) com β-ciclodextrina 1 %	15
9	0,3	25	Tetraborato de sódio 12 mM (9,16 g 10 mL) + dodecil sulfato de sódio (0,1g/10 mL) + β-ciclodextrina 1 % (0,09g/10 mL) + 4 mL metanol qsp para 10 mL água.	30
10	0,3	25	Imidazol 20 mM+ β-ciclodextrina sulfatada+ ácido acético 50 mM qsp 10 mL	30
11	0,3	25	Fosfato de sódio dibásico + β-Ciclodextrina 5 mM (50:50)	30
12	0,3	25	Acetato de amônio 10 mM + metanol (30:70)	30
13	0,3	25	Norfloxacino 50 mM + metanol qsp 10 mL	30
14	0,3	18	NaOH 50 mM+ ácido acético 50 mM+ $CuSO_4$ 1,25 mM qsp 10 mL água	15

6. DISCUSSÃO

A qualidade de um produto farmacêutico é algo imprescindível para a segurança e a eficácia do usuário do medicamento. Visando aprimorar o controle de qualidade de medicamentos, faz se necessário o constante desenvolvimento e validação de novos métodos de análise empregando técnicas modernas.

Para que se obtenha confiabilidade em um método analítico, a validação é essencial. Assim, foram propostos nesta pesquisa o estudo e a validação de métodos para análise dos fármacos nadolol, ivermectina e abamectina, em medicamentos.

6.1 VALIDAÇÃO DO SISTEMA COMPUTADORIZADO DO SISTEMA DE ELETROFORESE CAPILAR

Após realização do teste de validação do sistema computadorizado do equipamento de eletroforese capilar foi possível comprovar a qualidade e segurança do sistema visto que o resultado foi favorável para todos os itens analisados **(Tabelas 13, 14, 15, 16 e 17)**. Assim sendo, após a validação, pode-se confirmar o correto funcionamento do *software,* e suas interações com o *hardware.* Devem também ser levados em consideração, dentre outros aspectos, os relacionados à infra-estrutura, segurança e manutenção de dados, visto que o equipamento, conforme **Figuras 9 e 10,** apresenta risco alto, tornando-se assim necessária a sua validação.

6.2 VALIDAÇÃO DO SISTEMA COMPUTADORIZADO DO SISTEMA DE CROMATOGRAFIA EM FASE LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

Realizou-se o teste de validação do sistema computadorizado do equipamento de cromatografia em fase líquida de alta eficiência (CLAE) (**Tabelas 18, 19, 20, 21, 22 e 23)** e foi possível verificar a qualidade e segurança do sistema. Foi constatado o correto funcionamento do *software* e suas interações com o *hardware*, onde devem ser levados em consideração, dentre outros fatores, os aspectos relacionados à infra-estrutura, segurança e manutenção de dados, visto que o equipamento, conforme **Figuras 11 e 12,** apresenta risco alto, tornando-se assim necessária a sua validação.

6.3 CROMATOGRAFIA EM FASE LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA PARA QUANTIFICAÇÃO DA IVERMECTINA H_2B1_a e H_2B1_b

Com base na técnica de cromatografia em fase líquida de alta eficiência (CLAE) verificou-se uma ótima separação dos homólogos utilizando a coluna LichroCart® 100 RP-18 (125 x 4 mm, 5 µm).

Com o propósito de desenvolver uma metodologia simples e rápida em relação às técnicas descritas na literatura, foi utilizada uma fase móvel constituída de acetonitrila e água (95:5, v/v) com 1 % de ácido acético. O comprimento de onda foi de 245 nm, a vazão foi de 1,0 mL min^{-1}, o volume de injeção de 20 µL e a temperatura, de 25 °C.

Este comprimento de onda de 245 nm foi o que proporcionou os melhores resultados, permitindo quantificar satisfatoriamente os homólogos da ivermectina.

As condições foram escolhidas pois os tempos de retenção 4,87 min e 4,03 min, respectivamente para ivermectina H_2B1_a e H_2B1_b, foram adequados para análises de rotina.

Os tempos de retenção obtidos para os dois compostos representam uma vantagem do método proposto nesta pesquisa em relação aos descritos na literatura.

As soluções foram preparadas na concentração de 190,12 µg mL^{-1} para H_2B_{1a} e 5,72 µg mL^{-1} para H_2B_{1b}. Nestas concentrações os compostos apresentam-se dentro da faixa de linearidade obedecendo à lei de Lambert-Beer e estão acima do limite de detecção de 6,30 µg mL^{-1} e 0,54 µg mL^{-1}, respectivamente, para a ivermectina H_2B1_a e H_2B1_b, e do limite de quantificação de 19,11 µg mL^{-1} e 1,64 µg mL^{-1}, respectivamente, para a ivermectina H_2B1_a e H_2B1_b. Para o cálculo dos limites de quantificação e de detecção foram utilizados os parâmetros da curva analítica, que são estatisticamente confiáveis.

A diluição das soluções analisadas foram feitas na fase móvel selecionada.

Para a validação do método analítico foi realizado o ensaio de seletividade, que garante que o pico de resposta seja exclusivamente devido ao composto de interesse. Conforme pode ser visto na **Figura 13** e na **Tabela 24,** os excipientes não interferem na quantificação dos homólogos da ivermectina H_2B1_a e H_2B1_b.

A curva analítica foi construída traçando-se a área do pico versus a concentração. Foi encontrado um coeficiente de correlação de 0,9992 e 0,9996, respectivamente, para a ivermectina H_2B1_a e H_2B1_b. Para o método proposto a curva foi traçada na concentração de 152,10 – 228,14 µg mL^{-1} e 4,57 – 6,86 µg mL^{-1}, respectivamente, para a ivermectina H_2B_{1a} e H_2B_{1b} **(Tabela 25).**

Os resultados do teste de adequabilidade do sistema podem ser observados na **Tabela 26**. Por este teste pode-se verificar que a resolução e a reprodutibilidade do sistema cromatográfico estão adequadas. Os resultados destes testes garantem que o equipamento utilizado está apto a gerar resultados confiáveis (*UNITED STATES PHARMACOPEIA*, 2016). Pode-se assegurar pelos resultados obtidos para o desvio padrão relativo (DPR), que foram inferiores a 2 %, que o sistema está adequado para a realização dos testes de validação.

Outro teste que confirma a proporcionalidade é o teste F para a regressão linear, resultante da análise da variância. O valor experimental deve ser pelo menos 10 vezes maior do que o valor tabelado para um nível de confiança de 95 % (PIMENTEL, 1996). O valor obtido foi muito maior que 10 vezes do valor tabelado (6,39). Conclui-se, assim que existe proporção linear e validade da regressão linear para o nível de confiança selecionado (**Tabela 26)**.

Foi realizado o ensaio de repetibilidade, expresso pelo DPR (**Tabela 27)** e observou-se que o DPR foi inferior a 2 %, conforme RE 899 (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNIA SANITÁRIA, 2003).

Os dados obtidos na determinação da precisão intermediária **(Tabela 27)**, apresentam um DPR inferior a 2 %, assegurando assim, a precisão do método proposto.

A exatidão foi avaliada em três níveis de concentração. Os valores encontrados demonstram que o método é exato, pois a recuperação obtida está dentro da intervalo de 98-102 % conforme **Tabela 28**.

Para o método por CLAE, os resultados dos testes de hidrólise podem ser observado na **Figura 16**. Percebe-se que após a oxidação química em meio neutro, os resultados mostraram que não houve alteração significativa no tempo de retenção. Após a hidrólise alcalina observou-se a degradação do padrão e da amostra, no entanto, com diferentes respostas, o que pode ser devido à interferência dos excipientes presentes nos comprimidos. Após hidrólise ácida, a degradação também foi observada, no padrão e na amostra, com coeluição de picos no cromatograma da amostra.

Todos os resultados obtidos no teste de robustez foram semelhantes aos da condição inicial, sendo os DPRs abaixo de 2 %, tanto para a variação da composição da fase móvel quanto para o comprimento de onda **(Tabela 29)**. Na avaliação da estabilidade **(Tabela 29)**, após repouso de 4 horas das soluções padrão e amostra, os resultados indicaram que não

foram constatadas diferenças nas respostas instrumentais nas condições descritas. Assim, o método proposto pode ser considerado confiável e robusto.

Para identificação das espécies moleculares da ivermectina H_2B1_a e H_2B1_b utilizou-se o Q-TOF LC/MS para confirmar a presença dos dois compostos homólogos de ivermectina **(Figura 17).**

O método confirmou a presença de ivermectina (H_2B1_a e H_2B1_b) em comprimidos. Ambos os compostos tiveram suas identidades confirmadas por detecção de íons com m/z 913,4723 e 899,4591, respectivamente para H_2B1_a e H_2B1_b, utilizando moléculas com aduto de potássio. Devido a massa exata e a distribuição isotópica obtidas, concluiu-se que o *software* foi capaz de sugerir as fórmulas moleculares propostas, que são: $C_{48}H_{74}O_{14}$ e $C_{47}H_{72}O_{14}$ que correspondem, respectivamente, à H_2B1_a e H_2B1_b **(Figuras 17, 18, 19, 20 e 21** e **Tabelas 30 e 31).**

6.4 CROMATOGRAFIA EM FASE LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA PARA QUANTIFICAÇÃO DA ABAMECTINA H_2B1_a e H_2B1_b

A técnica de cromatografia em fase líquida de alta eficiência (CLAE) permitiu a quantifiação dos homólogos da abamectina. Para tal foi utilizada uma coluna LichroCart® 100 RP-18 (125 x 4 mm, 5 µm) e fase móvel constituída de acetonitrila e água (95:5, v/v) com 1 % de ácido acético. O comprimento de onda escolhido foi de 245 nm, vazão de 1,0 mL min^{-1}, volume de injeção de 20 µL e temperatura de 25 °C. O método é rápido, simples e de baixo custo, podendo ser facilmente utilizado na rotina dos laboratórios de controle de qualidade.

Foi estabelecido o comprimento de onda de 245 nm em virtude dos resultados obtidos nos estudos preliminares. Os tempos de retenção, 2,61 min e 2,28 min, respectivamente, para

abamectina H_2B1_a e H_2B1_b, foram adequados para análises de rotina, o que foi uma vantagem do métdos proposto com relação aos descritos na literatura.

As soluções foram preparadas na concentração de 187,64 µg mL^{-1} para a H_2B_{1a} e 9,76 µg mL^{-1} para a H_2B_{1b}. Os compostos apresentam-se dentro da faixa de linearidade obedecendo à lei de Lambert-Beer e estão acima do limite de detecção 2,83 µg mL^{-1} e 1,25 µg mL^{-1}, respectivamente, para a abamectina $H_2B^1_a$ e $H_2B^1_b$ e do limite de quantificação 8,57 µg mL^{-1} e 3,80 µg mL^{-1}, para a abamectina H_2B_{1a} e H_2B_{1b}, respectivamente. Foram utilizados os parâmetros da curva analítica, que são estatisticamente confiáveis, para o cálculo dos limites de quantificação e de detecção para o método proposto.

As soluções foram preparadas utilizando-se a fase móvel como solvente.

Para a validação do método analítico foi realizado o ensaio de seletividade, que garante que o pico de resposta é exclusivamente devido ao composto de interesse. Conforme pode ser visto na **Figura 22** e na **Tabela 32,** os excipientes não interferem na quantificação dos homólogos da abamectina H_2B_{1a} e H_2B_{1b}

A curva analítica foi construída traçando-se a área do pico versus a concentração. Foi encontrado um coeficiente de correlação de 0,9961 e 0,9960, respectivamente, para a abamectina H_2B_{1a} e H_2B_{1b}. A curva foi traçada na concentração de 150,11 – 225,17 µg mL^{-1} e 7,81 – 11,71 µg mL^{-1}, respectivamente, para a abamectina H_2B_{1a} e H_2B_{1b} **(Tabela 33).**

Os resultados do teste de adequabilidade do sistema podem ser observados na **Tabela 34**. Pode-se verificar que a resolução e a reprodutibilidade do sistema cromatográfico proposto estão adequadas. Os resultados garantem que o equipamento utilizado está apto a gerar resultados confiáveis (*UNITED STATES PHARMACOPEIA*, 2016). Os resultados obtidos para o desvio padrão relativo (DPR), foram inferiores a 2 %. Nestas condições, pode-se afirmar que o sistema está adequado para a realização dos testes de validação.

A proporcionalidade foi percebida também pelo teste F para a regressão linear, resultante da análise da variância. O valor experimental deve ser pelo menos 10 vezes maior do que o valor tabelado para um nível de confiança de 95 % (PIMENTEL, 1996). O valor obtido foi muito maior do que 10 vezes o valor tabelado (6,39). Conclui-se, assim que existe proporção linear e validade da regressão linear para o nível de confiança selecionado (**Tabela 34)**.

Para o ensaio de repetibilidade, expresso pelo DPR **(Tabela 34),** observa-se que o DPR foi inferior a 2 %, conforme regulamentanda pela RE 899 (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNIA SANITÁRIA, 2003).

Com base na precisão intermediária pode-se verificar que o DPR foi inferior a 2 %, assegurando a precisão do método proposto (**Tabela 35)**.

A exatidão foi avaliada em três níveis de concentração. Os valores encontrados demonstram que o método é exato, pois a recuperação obtida está dentro do intervalo de 98-102 % (**Tabela 36)**.

Para o método proposto por CLAE, os resultados dos testes de hidrólise podem ser observados na **Figura 25**. Observa-se que, após a oxidação química e em meio neutro, os resultados demonstraram que não houve alteração significativa no tempo de retenção. Quando realizada a hidrólise alcalina observou-se a degradação do padrão e da amostra, no entanto, com diferentes respostas, o que pode ser devido à interferência dos excipientes presentes no gel. Após hidrólise ácida, a degradação também foi observada, tanto no padrão quanto na amostra.

Todos os resultados obtidos no teste de robustez foram semelhantes aos da condição inicial, sendo os DPRs encontrados abaixo de 2 %, tanto para a variação da composição química da fase móvel quanto para o comprimento de onda (**Tabela 37)**. Na avaliação da estabilidade das soluções padrão e da amostra, após 4 horas, não foram observadas diferenças

nas respostas instrumentais nas condições descritas. Nesse caso, o método proposto pode ser considerado confiável e robusto, visto que, apresentou resposta satisfatória em todos os parâmetros analisados para a validação do método proposto.

6.5 CROMATOGRAFIA EM FASE LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA PARA QUANTIFICAÇÃO DOS ENANTIÔMEROS DO NADOLOL

A técnica de cromatografia em fase líquida de alta eficiência (CLAE) permitiu a quantifiação dos quatro isômeros do nadolol. Para tal foi utilizado uma coluna Chiralcel OD® (250 x 4,6 mm, 10 µm), e fase móvel constituída de hexano: álcool etílico: dietilamina: ácido acético (86:14:0,3:0,3 v/v/v/v). O comprimento de onda escolhido foi de 220 nm, vazão de 0,7 mL min^{-1}, volume de injeção de 20 µL e temperatura de 25 °C. O método é rápido, simples e de baixo custo, podendo ser facilmente utilizado na rotina de laboratórios de controle de qualidade.

A coluna utilizada foi a Chiralcel OD®, que é constituída por um derivado de tris-3,5- dimetilfenil carbamato de celulose. Para a separação enantiomérica dos β-bloqueadores, a ligação entre o hidrogênio do grupo –OH da parte aminoálcool do composto e o grupo carbonila do derivado de fenilcarbamato parecem ser essenciais para o reconhecimento quiral. As interações entre as duplas ligações e os enantiômeros de inclusão parcial da fase estacionária quiral, também, são fatores importantes para a separação enantiomérica (SINGH, 2006).

Foi estabelecida a detecção em 220 nm, devido a melhor absorção apresentada pelos quatro isômeros neste comprimento de onda. Os tempos de retenção foram adequados para a análise de rotina, sendo 15,00 min, 16,80 min, 27,89 min e 29,80 min, respectivamente, para

nadolol 1, nadolol 2, nadolol 3 e nadolol 4, o que demostra uma vantagem com relação aos métodos descritos na literatura.

Aditivos ácidos e básicos adicionados à fase móvel são amplamente utilizados em fases estacionárias quirais à base de polissacárideos, visando minimizar a interacção com silanóis residuais proporcionando assim, uma melhor forma ao pico e aumentando a resolução dos compostos quirais.

A dietilamina, que é um modificador com carater básico, deve estar presente na fase móvel numa proporção de pelo menos 0,1 %, e nunca superior a 0,5 %. A quantidade de 0,3 % de dietilamina foi necessária para que se obtivesse a separação dos enantiômeros do nadolol. A presença do modificador básico é muito importante a fim de se conseguirem boas separações dos enantiômeros do nadolol (STRINGHAM, 2006).

O ácido acético (0,3%) foi utilizado devido ao fato deste reagente melhorar a separação enantiomêrica de substâncias com propriedades básicas. No caso do nadolol, a adição de ácido aumenta a resolução dos picos correspondentes aos quatro isômeros do nadolol. O ácido orgânico, quando presente na fase móvel, favorece a formação de pares iônicos com os analitos básicos de β – bloqueadores (SINGH, 2006).

As soluções foram preparadas na concentração de 200 µg mL^{-1} de nadolol. Os compostos apresentam-se dentro da faixa de linearidade obedecendo à lei de Lambert-Beer e estão acima do limite de detecção 11,58 µg mL^{-1}, 18,48 µg mL^{-1}, 17,46 µg mL^{-1}, e 0,53 µg mL^{-1}, respectivamente para nadolol 1, nadolol 2, nadolol 3 e nadolol 4 e do limite de quantificação 35, 10 µg mL^{-1}, 56,00 µg mL^{-1}, 52,90 µg mL^{-1}, e 1,60 µg mL^{-1}, respectivamente para nadolol 1, nadolol 2, nadolol 3 e nadolol 4. Foram utilizados os parâmetros da curva analítica, que são estatisticamente confiáveis, para o cálculo dos limites de quantificação e de detecção para o método proposto.

As soluções foram preparadas utilizando-se etanol absoluto como solvente.

Para a validação do método analítico foi realizado o ensaio de seletividade, que garante que o pico de resposta seja exclusivamente devido ao composto de interesse. Conforme pode ser visto na **Figura 26** e na **Tabela 38,** os excipientes não interferem na quantificação do nadolol 1, nadolol 2, nadolol 3 e nadolol 4.

A curva analítica foi construída traçando-se a área do pico versus a concentração. Foi encontrado um coeficiente de correlação de 0,9995, 0,9992, 0,9973 e 0,9969, respectivamente, para nadolol 1, nadolol 2, nadolol 3 e nadolol 4. A curva foi traçada no intervalo de concentração do nadolol racêmico antes da separação cromatográfica: 160- 240 µg/mL **(Tabela 39).**

Os resultados do teste de adequabilidade do sistema podem ser observados na **Tabela 40**. Pode-se verificar que, a resolução e a reprodutibilidade do sistema cromatográfico proposto estão adequadas. Os resultados garantem que o equipamento utilizado está apto a gerar resultados confiáveis (*UNITED STATES PHARMACOPEIA*, 2016). Os resultados obtidos para o desvio padrão relativo (DPR), foram inferiores a 2 %. Pode-se assim, assegurar-se que o sistema está adequado para a realização dos testes de validação.

Observou-se, pelo teste F para a regressão linear (**Tabela 40)**, resultante da análise da variância, que o valor obtido foi muito maior do que 10 vezes o valor tabelado (6,39). Conclui-se, assim que existe proporção linear e validade da regressão linear para o nível de confiança selecionado, uma vez que o valor experimental dever ser pelo menos 10 vezes maior do que o tabelado para um nível de confiança de 95 % (PIMENTEL, 1996).

Com base na precisão intermediária (**Tabela 41)**, pode-se verificar que o DPR foi inferior a 2 %, assegurando a precisão do método proposto.

Para o ensaio de repetibilidade, expresso pelo DPR **(Tabela 42),** observa-se que o DPR foi inferior a 2 %, conforme a RE 899 (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNIA SANITÁRIA, 2003). O resultado foi portanto, satisfatório em relação ao ensaio realizado.

A exatidão foi avaliada em três níveis de concentração. Os valores encontrados demonstram que o método é exato, pois a recuperação obtida está dentro do intervalo de 98-102 % (**Tabela 43)**.

Para o método proposto por CLAE, os resultados dos testes de estresse podem ser observados na **Tabela 44**. Pelos resultados apresentados após hidrólise em meio neutro, hidrólise ácida oxidação e hidrólise alcalina, verificou-se que houve degradação significativa acima de 2 %.

No teste de robustez **(Tabela 45)** observa-se que o método proposto é robusto, frente às pequenas e deliberadas variações nas condições iniciais do método proposto.

Na avaliação da estabilidade das soluções padrão e da amostra, após 24 horas, não foram observadas diferenças nas respostas instrumentais (**Tabela 46)**.

O método proposto pode ser considerado confiável e robusto, visto que, apresentou resposta satisfatória em todos os parâmetros analisados para a validação.

6.6 DICROISMO CIRCULAR DOS ENANTIÔMEROS DO NADOLOL

A técnica de dicroísmo circular permite a determinação da configuração absoluta dos enantiômeros.

Empregando-se a CLAE foi possível separar os quatro isômeros na amostra racêmica mas não foi possível identificar as suas espécies enantioméricas.

Sabe-se que as misturas contendo quantidades iguais de enantiômeros (50:50) são chamadas misturas racêmicas (ou racematos), que são opticamente inativos. Neste caso, a falta de atividade óptica, deve-se ao fato que, enquanto um dos enantiômeros desvia o plano de luz, o seu par desvia em igual intensidade, mas no sentido oposto, anulando o resultado final (LIMA, 1997). Por isso, foi necessário recolher amostras dos quatro isômeros

previamente separados por CLAE e, em seguida, executar a identificação por dicroísmo circular.

Com base na análise dos quatro isômeros, pode-se estabelecer com segurança, que o nadolol 1 e 3 apresentam-se na forma CIS (-) e o nadolol 2 e 4 apresentam-se na forma TRANS (+) **(Figura 31)**. Sabe-se que a forma mais comum de representar a quiralidade de uma molécula está baseada no efeito da rotação óptica da luz (BURKE, 2002, CALDWELL, 2001, MCCONATHY, 2003). Assim sendo, pode-se experimentalmente, por meio do dicroísmo circular, determinar as espécies enantioméricas do nadolol.

6.7 DIFRAÇÃO DE RAIOS-X DO NADOLOL

Comparando-se a amostra de nadolol **(Figura 32)** com a referência **(Figura 33)** verifica-se que existem semelhanças entre os difratogramas, principalmente a forma NR (Nadolol referência) da **Figura 33**.

Segundo AMORIN 2012, o nadolol apresenta uma mistura de quatro isômeros, isto é, dois pares de enantiômeros, que formam os racematos A e B. Pode-se assim, justificar algumas formas diferentes que foram observadas nos difratogramas, pois estes compostos podem apresentar-se com mais de uma forma cristalina, o que pode ter gerado os sinais apresentados.

6.8 DETERMINAÇÃO POR ELETROFORESE CAPILAR

Diversos ensaios foram realizados para a separação dos homólogos da ivermectina e para os enatiômeros do nadolol.

Nos testes para determinação da ivermectina foram obtidas separações utilizando as condições descritas em 2, 5, 6, 9, 11, 13 e 14, como mostra a Tabela 47**.** No entanto, as respostas não foram reprodutíveis.

Para a determinação dos enatiômeros do nadolol, dentre as condições testadas, foram obtidas separações em 2 e 4 **(Tabela 48)**. Também neste caso, as respostas não foram reprodutíveis. Assim sendo, o estudo, para o desenvolvimento e a validação de métodos empregando-se esta técnica são projetos a serem desenvolvidos em pesquisas futuras.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base na revisão da literatura e nos resultados experimentais obtidos, pode-se considerar que:

- Pela validação dos sistemas computadorizados dos equipamentos de eletroforese capilar (EC) e de cromatografia em fase líquida de alta eficiência (CLAE) foi possível assegurar a qualidade e a segurança dos sistemas computadorizados analisados.
- Os métodos propostos por CLAE para determinação quantitativa dos homólogos da ivermectina comprimido e da abamectina gel e os enantiômeros do nadolol em cápsulas são simples, rápidos, eficientes e econômicos.
- Por meio do dicroísmo circular pode-se efetuar a identificação das espécies enatioméricas do nadolol.
- Os excipientes das amostras comerciais não interferem nas análises, o que demonstra que os métodos são seletivos.
- Os métodos propostos apresentam vantagens quando comparados com os descritos na literatura, visto que utilizam reagentes de baixo custo, são simples e rápidos.
- A técnica de difração de raios-x possibilitou observar semelhanças nos espectros gerados com a referência.
- Os métodos podem ser utilizados em laboratórios de controle de qualidade para análise de rotina de ivermectina comprimido e da abamectina gel, disponíveis comercialmente.

8. REFERÊNCIAS[1]

ABOUL-ENEIN, H.Y.; BASHA, L.I.A Chirality and drug hazards. In: ABOULENEIN, H.Y.; WAINER, I.W. **The impact of stereochemistry on drug development and use**. New York: John Wiley, 1997. p.1-19.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Guia de validação de sistemas computadorizados**. Brasília: ANVISA, 2010. 86p. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/documents/33836/2501339/Guia+de+valida%C3%A7%C3%A3o+de+sistemas+computadorizados/034889a7-6b3f-439d-b8e5-32a0061ab395. Acesso em: 16 jan. 2016.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Resolução RDC n. 17, de 16 de abril de 2010.** Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2010/res0017_16_04_2010.html. Acesso em: 16 jan. 2016.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Resolução RE n.899, de 29 de maio de 2003**. Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos. Disponível em: http://redsang.ial.sp.gov.br/site/docs_leis/vm/vm1.pdf. Acesso em: 16 jan. 2016.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Resolução RDC n. 135, de 29 de maio de 2003.** Aprova o Regulamento Técnico para Medicamentos Genéricos. Disponível em: www.anvisa.gov.br/hotsite/genericos/legis/resolucoes/2003/135_03rdc.htm. Acesso em: 20 jun. 2016.

AGRANAT, I.; CANER, H.; CALDWELL, J. Putting chirality to work: the strategy of chiral switches. **Nature Reviews: Drug Discovery**, v.1, n.10, p.753-768, 2002.

ARAFAH, R.S.; RIBEIRO, A.E.; RODRIGUES, A.E.; PAIS, L.S. Separation of nadolol stereoisomers using chiralpak IA chiral stationary phase. **Chirality**, v.28, p.399–408, 2016.

AMORIN, P.H.O. **Caracterização térmica e estudo de polimorfismo de fármacos anti-hipertensivos da classe dos β-bloqueadores**: nadolol e atenolol. São Carlos, 2012. 95p. Dissertação de Mestrado - Instituto de Química de São Carlos – Universidade de São Paulo.

AQUINO NETO, F.R.; NUNES, D.S.S. **Cromatografia**: princípios básicos e técnicas afins. Rio de Janeiro: Interciência, 2003. 187p.

BORGES, J.H.; RAVELO-PÉREZ, L.M.; HERNÁNDEZ-SUÁREZ, E.M.; CARNEIRO, A.; RODRÍGUEZ-DELGADO, M.A. Determination of abamectin residues in avocados by microwave-assisted extraction and HPLC with fluorescence detection. **Chromatographia**, v.67, n.1/2, p.69-75, 2008.

BORGES, F.A.; SILVA, H.C.; BUZZULINI, C.; SOARES, V.E.; SANTOS, E.; OLIVEIRA, G.P.; COSTA, A.J. Endectocide activity of a new long-action formulation containing 2.25% ivermectin + 1.25% abamectin in cattle. **Veterinary Parasitology**, v.155, p.299-307, 2008.

[1] De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas.

BURKE, D.; HENDERSON, D.J. Chirality: a blueprint for the future. **British Journal of Anaesthesia**, v.88, n.44, p.563-576, 2002.

BUSZEWSKI, B.; WELWROWICZ, T.; TEGOWSKA, E.; KRZEMINSKI, T.F. Determination of selected β-receptor antagonists in biological samples by solid-phase extraction with cholesterolic phase and LC/MS. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v.393, p.263–272, 2009.

BRITISH Pharmacopoeia. London: Stationary Office, 2010, v.2, p.1470-1471.

CABAN, M.; STEPNOWSKI, P.; KWIATKOWSHI, M.; MIGOWSKA, N.; KUMIRSK, J. Determination of β-blockers and β-agonists using gas chromatography and gas chromatography–mass spectrometry: a comparative study of the derivatization step. **Journal of Chromatography A**, v.1218, p.8110–8122, 2011.

CALDWELL, J.; WAINER, I.W. Sterochemistry: definitions and a note on nomenclature**.** **Human Psychopharmacology**, v.16, suppl.2, p.S105-S107, 2001.

CALATAYUD-PASCUAL, M.A., BALAGUER-FERNANDES, C., SERNA-JIMENEZ, C.E., RIO-SANCHO, C., FEMENIA-FONT, A., LOPEZ-CASTELLANO, A., MERINO, V. Validation of two high-performance liquid chromatographic methods for the analysis of nadolol and propranolol hydrochloride following *in vitro* transdermal diffusion studies. **Current Pharmaceutical Analysis**, v.7, p.79-87, 2011.

CEBALLOS, L.; MORENO,L.; ALVARES, L.; SHAW, L.; FAIRWEATHER, I.; LANUSSE, C. Unchanged triclabendazole kinetics after coadministration with ivermectin and methimazole: failure of its therapeutic activity against triclabendazole-resistant liver flukes. **BMC Veterinary Research**, v.6, n.8, p.1-8, 2010.

CERKVENIK-FLAJSA, V.; MILCINSKIA, L.; SUSSINGERA, A.; HODOSCEKA, L.; DANAHERB, M.; ANTONÍC, J. Trace analysis of endectocides in milk by high performance liquid chromatography with fluorescence detection. **Analalytica Chimica Acta**, v.663, p.165–171, 2010.

CHIU, S.H.L.; BUHS R.P.; SESTOKA E.; TAUB, R.; JACOB T.A. Determination of ivermectin residue in animal tissues by high-performance liquid chromatography-reverse isotope dilution assay. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.33, p.99-102, 1985.

CIONE, A.P.P.; SILVA, P.M. Validação de metodologia para análise de ivermectina e indicativos da estabilidade da molécula sob diferentes condições de degradação forçada. **Analytica**, v.32, p.84-92, 2008.

COSTA, F.M.; NETTO A.D.P. Desenvolvimento e aplicação de métodos para a determinação de ivermectina em medicamentos de uso veterinário. **Quimica Nova**, v.35, p.616-622, 2012.

CROUBELS, S.; BAERE, S., CHERLET, M., BACKER, P. Determination of ivermectin B_{1a} in animal plasma by liquid chromatography combined with electrospray ionization mass spectrometry. **Journal of Mass Spectrometry**, v.37, p.840–847, 2002.

COUTO, LB.; BARBOSA R.G.; PEREIRA, L.R.L.; REZENDE, P.C.B.; COSTA, A.J. Determination of ivermectin bovine plasma for bioequivalency studies. **Ars Veterinaria**, v.16, n.2, p.112-117, 2000.

DAHIYA, M.; SEN, S.; LAMA, K., AGGARWAL, M.; KHANDAL, R.K. Quantitative determination of ivermectin in raw milk using positive ESI LC-MS/MS. **E-Journal of Chemistry**, v.7, p.267-277, 2010.

DAUGHTON, C.G.; TERNES, T.A. Pharmaceuticals and personal care products in the environment: agents of subtle change. **Environmental Health Perspectives**, v.107, p.907–938, 1999.

DYAS, A.M.; ROBINSON, M.L. Direct separation of nadolol enantiomers on a Pirkle-type chiral stationary phase. **Journal of Chromatography A**, v.586, p.351-355, 1991.

FELTRE, R. **Química orgânica**. 6.ed. São Paulo: Moderna, 2004. v.3.

FERREIRA, O.A.; BRANDÃO, M. **Guia prático da farmácia magistral**. 3.ed. São Paulo: Pharmabooks, 2008. p.466-467.

FINK, D.W.; MONTIGNY, P.; SHIM, J.S.K. Evolution of a specific fluorogenic derivatization of ivermectin for bioanalytical applications. **Analyst**, v.121, p.1533-1537, 1996.

FLIERGER, J. Application of perfluorinated acids as ion-pairing reagents for reversed-phase chromatography and retention-hydrophobicity relationships studies of selected-blockers. **Journal of Chromatography A**, v.1217, p.540–549, 2010.

FLORENCE, A.T.; ATTWOOD, D. **Princípios físico-químicos em farmácia**. 2.ed. São Paulo: Pharmabooks, 2011. p.5-11.

FONTELA, M.H.; GALCERAN, M.T.; VENTURA, F**.** Fast liquid chromatograph-quadrupole-linear ion trap mass spectrometry for the analysis of pharmaceuticals and hormones in water resources. **Journal of Chromatograph A**, v.1217, p.4212-4222, 2010.

FOX, A.; FINK, D.W. Determination of ivermectin in feeds by high-performance liquid chromatography. **Analyst**, v.110, p.259-261, 1985.

FRANCESCO, B.; CARMEM, C.; LUCIA, G.; IMMACOLATA, L.R.M. Enantioselective retention of β-blocking agents on human serum albumin and α-acid glicoprotein HPLC column: relationships with different scales of lipophilicty. **European Journal of Pharmaceuticals Sciences**, v.38, p.472-478, 2009.

FRANCOTE, E.R. Enantioselective chromatography as a powerful alternative for the preparation of the enatiomers. **Journal of Chromatography A**, v.906, p.379-397, 2001.

GAL, J. Indirect methods for the chromatographic resolution of drug enantiomers. In: WAINER, I.W., ed. **Drug stereochemistry**: analytical methods and pharmacology. 2.ed. New York: Marcel Dekker, 1993. p.65-106. (Clinical Pharmacology, v.18).

GALERA, M.M.; GÁRCIA, M.D.G.; CULZONI, M.J.; GOICOECHEA, H.C. Determination of pharmaceuticals in river water by column switching of large sample volumes and liquid chromatography-diode array detection, assisted by chemometrics: and integrated approach to green analytical methodologies. **Journal of Chromatography A**, v.1217, p.2042-2049, 2010.

GIL, E.S., org. **Controle físico-químico de qualidade de medicamentos**. 2.ed. São Paulo: Pharmabooks, 2007. p.380.

GUPTA, R.N.; RYNES, R.B.; LOGAN, A.G.; MACDONALD, L.A.; PICKERSGIL, R.; ACHBER, C. Liquid-chromatographic determination of nadolol in plasma. **Clinical Chemistry**, v.29, n.6, p.1085-1087, 1983.

HOSHINO, M.; MATSUE, E.; YAJIMA, K.; OKAHIRA, A. Direct high-performance liquid chromatographic separation of the racemates and diastereomers of nadolol. **Journal of Chromatography A**, v.664, n.1, p.104-110, 1994.

ICH. International Conference on Harmonisation of Techinical Requeriments for Registration of Pharmaceutical for Human Use. Work Products. Quality Guidelines. Q2 - Analytical Validation. **Q2(R1)**: valitation of analytical procedure: text and methodology. 2005. Disponível em: http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1__Guideline.pdf. Acesso em: Acesso em: 16 jan. 2016.

IOSIFIDOU, E.; SHEARAN, P.; O'KEEFFE, M. Application of the matrix solid phase dispersion technique for the determination of ivermectin residues in fish muscle tissue. **Analyst**, v.119, p.2227-2229, 1994.

KLICK, S.; MUIJSELAAR, P.G.; WATERVAL, J.; EICHINGER, T.; KORN, C.; GERDING, T.K.; DEBETS, A.J.; GRIEND, C.S.; BELD, C.V.D.; SOMSEN, G.W.; DE JONG, G.J. Stress testing of drug substances and drug products. **Pharmaceutical Technology**, p.48–66, 2005. Disponível em: http://images.alfresco.advanstar.com/alfresco_images/pharma/2014/08/22/5cd50f8c-cc0e-425a-b94b-66091196f691/article-146294.pdf. Acesso em: Acesso em: 16 jan. 2016.

KOLAR, L.; KUZNER, J.; ERZEN, N.K. Determination of abamectin and doramectin in sheep faeces using HPLC with fluorescence detection. **Biomedical Chromatograph**, v.18, p.117–124, 2004.

KOWALSK, P.; BIENIECKI, M.; OLEDZKA, I.; LAMPARCZYK, H. Validated capillary electrophoretic method for the analysis of ivermectin in plasma after intragastric administration in pigs and horses. **Biomedical Chromatography**, v.18, p.302–310, 2004.

KNOLD, L.; REITOV, M.; BIRTHEMORTESEN, A.; MOOLER J.H. Validation of a simple liquid chromatographic method for determination and quantitation of residual ivermectin and doramectin in pig liver. **Journal of AOAC International**, v.85, n.2, p.365-368, 2002.

KULIK, A.; SZCZOTKOWSKA, A.; BIALECKA, W.; PODOLKA, M.; KWIATKOWSKA-PUCHNIARZ, B.; MAZUREK, A. Determination of active substances in binary mixture antiparasitc veterinary by HPLC. **Acta Poloniai Pharmaceutica**, v.68, n.4, p.467-472, 2011.

LANÇAS, F.M. **Validação em métodos cromatográficos de análise**. São Carlos: RiMa, 2004. 62p.

LANKAS, G.R.; GORDON, L.R. Toxicology. In: CAMPBELL, W.C., ed. **Ivermectin and abamectin**. New York: Spring-Verlag, 1989. p.82-112.

LEE, H.B.; SARAFIN, K.; PEART, T.E. Determination of β-blockers and 2-agonists in sewage by solid-phase extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v.1148, p.158–167, 2007.

LIMA, V.L.E. Drugs and chirality: a brief overview. **Química Nova**, v.20, n.6, p.657-663, 1997.

LIU, H.; ZHANGH, Y.; LIU, L.; LI, Q.; SHAO, J.; ZOU, Y. Fast separation ultra-performance liquid chromatography for determination of pre-column derivative abamectin and ivermectin residues in vegetable. **Journal of Fluorescence**, v.2, p.825–829, 2011.

LOBATO, V.; RATH, S.; REYES, R.G.S. Occurrence of ivermectin in bovine milk from the Brazilian retail market**. Food Additives and Contaminants**, v.23, n.7, p.668–673, 2006.

MACEDO, F.; MARSICO, E.T.; CONTE-JUNIOR, C.A.; RESENDE, M.F.; BRASIL, T.F.; NETTO, A.D.P. Development and validation of a method for the determination of low-ppb levels of macrocyclic lactones in butter, using HPLC-fluorescence. **Food Chemistry**, v.179, p.239-245, 2015.

McCONATH, J.; OWENS, M.J. Stereochemistry in drug action. **Journal Clinical Psychiatry**, v.5, n.2, p.70-73, 2003.

MARTIN-SHIMITH, M.; RUDD, D.R. The importance of proper validation of the analytical methods employed in the quality control of pharmaceuticals. **Acta Pharmaceutica Jugoslavica**, v.40, n.1/2, p.7-19, 1990.

MEHVAR, R.; BROCKS, D.R. Steriospecific pharmacokinetics and pharmacodynamics of beta-adrenergic blockers in humans. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.4, p.185-200, 2001.

MONTIU, J.R.; KROGH, K.A.; GRANADOS, M.; JONSSON, J.A.; HALLING-SORENSEN, 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**, v.1187, p.275–280, 2008.

MERCK Index: an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals. 14.ed. Withehouse Station: Merck, 2006. p.1098.

NA-BANGCHANG, K.; BANMAIRUROI, V.; CHOEMUNG, A. High-perfomance liquid chromatographic method for the determination of ivermectin in plasma. **Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, v.37, n.5, p.848-858, 2006.

NAMAGATSU, S.; MURAZUMI, K.; MAKINO, S. Quiral separation of a pharmaceutical intermediate by a simulated moving bed process. **Journal of Cromatography A**, v.832, p.55-65, 1999.

OTT, R.J.; GIACOMINI, K.M. Stereoselective transport of drugs across epithelia. In: WAINER, I.W., ed. **Drug stereochemistry**: analytical methods and pharmacology. 2.ed. New York: Marcel Dekker, 1993. p.281-314. (Clinical Pharmacology, v.18).

PEARSON, A.A.; GAFFNEY, T.E.; WALLE, T.; PRIVITERA, P.J. A stereoselective hypotensive action of atenolol. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapy**, v.250, p.759-763, 1989.

PIMENTEL, M.F.; NETO, B.B. Calibração: uma revisão para químicos analíticos. **Química Nova**, v.19, n.3, p.268-277, 1996.

PITTERNA, T.; CASSAYRE, J.; HUTER, O.F.; JUNG, P.M.J.; MAIENFISH, P.; KESSABI, F.M.; QUARANTA, L.; TOBLER, H. New ventures in the chemistry of avermectins. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.17, p.4085–4095, 2009.

PRABHU, S.V.; WEHNER, T.A.; TWAY, P.C. Determination of ivermectin levels in swine tissues at the parts per billion level by liquid chromatography with fluorescence detection. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.39, p.1468-1471, 1991.

PURDIE, N.; SWALLOWS, K.A. Analytical applications of polarimetry, optical rotatory dispersion, and circular dichroism. **Analytical Chemistry**, v.61, n.2, p.77A-89A, 1989.

SCHRODER, C.H.K.; RATH, S.; SILVA, C.R.; FERREIRA, F.O.; DIONISIO, A.C.; DAL BOSCO, S.M. Avermectinas no agronegócio brasileiro: uma solução ou um problema. **Veterinária e Zootecnia**, v.23, n.1, p.8-24, 2016.

RIBANI, M.; BOTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F.; MELO, L.F.C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Quimica Nova**, v.27, n.5, p.771-780, 2004.

ROMERO-GONZÁLEZ, R.; AGUILERA-LUIZ, M.M.; PLAZA-BOLAÑOS, P.; FRENICH, A.G.; VIDAL, J.L.M. Food contaminant analysis at high resolution mass spectrometry: application for the determination of veterinary drugs in milk. **Journal of Chromatography A**, v.1218, p.9353–9365, 2011.

RUBENSAM, G.; BARRETO, F.; HOOF, R.B.; KIST, T.L.; PIZZOLATO, T.M. A liquid–liquid extraction procedure followed by a low temperature purification step for the analysis of macrocyclic lactones in milk by liquid chromatography–tandem mass spectrometry and fluorescence detection**. Analytica Chimica Acta**, v.705, p.24–29, 2011.

SAMMARTINO, M.P.; BELLANTI, F.; CASTRUCCI, M.; RUIU, D.; VISCO, G.; ZOCCARATO, T. Ecopharmacology: deliberated or casual dispersion of pharmaceutical principles, phytosanitary, personal health care and veterinary products in environment needs a multivariate analysis or expert systems for the control, the measure and the remediation. **Microchemical Journal**, v.88, p.201– 209, 2008.

SANYAY, H.S.; NIMITA, M.; ASHWIN, H.; DUBEY, P.K. Development and validation of analytical method for fluconazole and ivermectin in tablets by using RP-HPLC. **International Research Journal of Pharmacy**, v.3, n.8, p.257-270, 2012.

SANTORO, M.I.R.M.; SING, A.K. Development and regulation of quiral drug substances: an overview on worldwide pharmaceutical guidelines. **Revista de Farmácia Bioquímica da Universidade de São Paulo**, v.37, p.259-268, 2001.

SANTORO, M.I.R.M.; PRADO, M.S.A.; STEPPE, M.; KEDOR-HACKMANN, E.R.M. Eletroforese capilar: teoria e aplicações na análise de medicamentos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.36, p.97-110, 2000.

SANTORO, M.I.R.M. Cromatografia líquida em fase quiral: novos rumos no controle de qualidade de medicamentos. **Revista de Farmácia Bioquímica da Universidade de São Paulo**, v.28, n.1, p.1-29, 1992.

SANBONSUGE, A.; TAKASE, T.; SHIHO, D.I.; TAKAGAI, Y. Gas chromatography-mass spectrometric determination of ivermectin following trimethylsilylation with application to residue analysis in biological meat tissue samples. **Analytical Methods**, v.3, 2160–2164, 2011.

SÃO PAULO (Estado). Conselho Regional de Farmáia. **Resolução RDC n. 57, de 18 de novembro de 2009.** Aprova o Regulamento Técnico para Medicamentos Genéricos. Disponível em: http://portal.crfsp.org.br/index.php/juridico/113-juridico/legislacao/1804-resolucao-rdc-no-57-de-18-de-novembro-de-2009.html. Acesso em: 20 jun. 2016.

SINGH, A.K.; KEDOR-HACKMANN, E.R.M.; SANTORO, M.I.R.M.; Cromatografia líquida com fase quiral aplicada na separação enantiomérica de fármacos cardiovasculares. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.42, n.4, p.553-566, 2006.

SHOOP, W.L.; MROZIK, H.; FISHER, M.H. Structure and activity of avermectins and milbemycins in animal health. **Veterinary and Parasitology**, v.59, n.2, p.139-156, 1995.

SKOOG, D.A.; HOLLER, F.J.; NIEMAN, T.A. **Princípios de análise instrumental**. 5.ed. Porto Alegre: Bookman, 2002. p.599, 687.

SNYDER, L.R.; KIRKLAND, J.J.; GLAJCH, J.L.; KERN, J.; KIRKLAND, K. Chiral separations. In: SNYDER, L.R.; KIRKLAND, J.J.; GLAJCH, J.L. **Practical HPLC method development**. 2.ed. New York: John Wiley, 1997. p.537-615.

SRINIVIVAS, N.R.; BARR, W.H.; SHYU, W.C.; MOHANDOSS, E.; CHOW, S.; STAGGERS, J.; BALAN, G.; BELAS, F.J.; BLAIR, I.A.; BARBHAIYA, R.H. Bioequivalence of two tablet formulations of nadolol using single and multiple dose data: assessment using stereospecific and nonstereospecific assays. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.85, n.3, p.299-303, 1996.

SOLOMONS, T.W.G. Estereoquímica: moléculas quirais. In: _____. **Química orgânica**. 6.ed. Rio de Janeiro: LTC, 1996. v.1, p.184-230.

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**, v.23, n.1, p.54-58, 2003.

STRINGHAM, R.W.; YE, W.K. Chiral separation of amines by high-performance liquid chromatography using polysaccharide stationary phases and acidic additives. **Journal of Chromatography A**, v.1101, p.86–93, 2006.

SUÁREZ, G.; ALVAREZ, L.; CASTELL, D., CORREA, O.; FAGIOLINO, P.; LANUSSE, C. Relative bioavailability and comparative clinical efficacy of different ivermectin oral formulations in lambs. **Veterinary Research** v.9, p.27, 2013.

SUNG, J.; NGUYEN, N.V.; PARK, M.J.; LEE, S.B.; LEE, Y.J.; CHOI, S.H.; KIM, K.H. Preparation of 2R, 3S, 2′R-nadolol enantiomer using S-(-)-menthyl chloroformate as a chiral derivatizing reagent. **Archives of Pharmaceutical Research**, v.33, n.9, p.1301-1306, 2010.

TAMISIER-KAROLAC, S.L.; STENGER, M.A.; BOMMART, A. Enationseparation of β-blockers with two chiral centers by capillary electrophoresis used sulfated β – cyclodextrins. **Electrophoresis**, v.20, p.2656-2663, 1999.

TAO Y.; YU, G.; CHEN, D.; PAN, Y.; LIU, Z.; WEI, H.; PENG, D.; HUANG, L.; WANG, Y.; YUAN, G. Determination of 17 macrolide antibiotics and avermectins residues in meat with accelerated solvent extraction by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography, B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v.897, p.64-71, 2012.

TERNES, T.A. Analytical methods for determination of pharmaceuticals in aqueous environmental samples. **Trends in Analytical Chemistry**, v.20, n.8, p.419-434, 2001.

THOMPSON, T.S.; NOOT, D.K.; FORREST, F.; HEEVER, J.P.V.D.; KENDALL, J.; KEENLISIDE, J. Large volume injection for the direct analysis of ionophores and avermectins in surface water by liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v.633, p.127–135, 2009.

TISLER, T.; ERZEN, N.K. Abamectin in the aquatic environment. **Ecotoxicology**, v.15, p.495–502, 2006.

PIMENTEL-TRAPERO, D.; SONSECA-YEPES, A.; MOREIRA-ROMERO, S.; HERNANDEZ-CARRASQUILLA, M. Determination of macrocyclic lactones in bovine liver using QuEChERS and HPLC with fluorescence detection. **Journal of Chromatography, B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v.1015/10016, p.166-172, 2016.

PURDIE, N.; SWALLOWS, K.A. Analytical applications of polarimetry, optical rotatory dispersion, and circular dichroism. **Analitycal Chemistry**, v.61, n.2, p.77A–89A, 1989.

RAHMAN, M.M.; NA, T.W.; EL-ATY.; PARK, J.H.; MAHMUD, M.N.U.; YANG, A.; PARK, K.H.; SHIM, J.H. Dissipation pattern and pre-harvest residue limit of abamectin in perilla leaves. **Environmental Monitoring Assessment**, v.185, p.9461–9469, 2013.

TSUBONE, C.; GARCÍA, P.L.; GOMES, F.P.; KEDOR-HACKMANN, E.R.M.; SANTORO, M.I.R.M. Quantitative determination of nadolol in tablets by high-performance liquid chromatography and UV-derivative spectrophotometry. **Analytical Letters**, v.41, p.424-436, 2008.

TWAY, P.C.; WOOD, J.S.; DOWNING, G.V. Determination of ivermectin in cattle and sheep tissues using high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.29, p.1059-1063, 1981.

UNITED STATES PHARMACOPEIA. 39.ed. Rockville: *United States Pharmacopeia*l Convention, 2016. p.4972-4975.

VALENZUELA, A.I.; REDONDO, M.J.; PICO, Y.; FONT, G. Determination of abamectin in citrus fruits by liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v.871, p.57–65, 2000.

VÁZQUEZ, P.P.; GALERA, M.M.; GUIRADO, A.S.; VÁZQUEZ, M.M.P. Determination of five beta-blockers in wastewaters by couple column liquid chromatograph and fluorescence detection. **Analytica Chimica Acta,** v.666, p.38-44, 2010.

ZHANG, T.; KIENTZY, C.; FRANCO, P.; OHNISI, A.; KAGAMIHARA,Y.; KUROSAWA, H. Solvent versatility of immobilized 3,5-dimethylphenylcarbamate of amylose in enantiomeric separations by HPLC **Journal of Chromatography A**, v.1075, p.65–75, 2005.

WANG, X.; CHING, C.B. Determination of the competitive adsorption isotherms of nadolol enantiomers by an improved *h*-root method. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v.42, p.6171-6180, 2003.

YOSHII, K.; ISHIMITZU, S.; TONOGAI, Y.; ARAKAWA, K.; MURATA, H.; MIKAMI, H. Simultaneous determination of emamectin, its metabolites, mibemectin, ivermectin and abamectin, japonese radish and tea by LC/MS. **Journal of the Health Sciences**, v.50, n.1, p.17-24, 2004.

XIE X., GONG S.; WANG X.; WU Y., ZHAO, L. Simplified RP-HPLC method for multi-residue analysis of abamectin, emamectin benzoate and ivermectin in rice. **Food Additives Contaminats**, v.28, n.1, p.19–25, 2011.

ANEXOS

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

Grazielle Prado Alexandre

Curso:	Doutorado
Programa:	Fármaco e Medicamentos
Área:	Produção e Controle Farmacêuticos
Data de Matrícula:	
Início da Contagem de Prazo:	
Data Limite para o Depósito:	
Orientador:	Prof(a). Dr(a). Maria Ines Rocha Miritello Santoro - Email: ines@usp.br
Proficiência em Línguas:	Inglês, Aprovado

Grazielle Prado Alexandre

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
MPT5795-1/3	Bases Éticas, Metodológicas e Gerenciais em Pesquisa (Faculdade de Medicina – Universidade de São Paulo)			225	15	100	A	N	Concluída
FBF5794-2/3	Tópicos Gerais de Fármaco e Medicamentos II			30	2	100	A	N	Concluída
Atividade do Programa	Publicação do trabalho no Latin American Journal of Pharmacy, com o trabalho intitulado: "Determination of Homologous of Ivermectin H2b1a and H2b1b in Tablets y High Performance Liquid Chromatography Coupled to High Resolution Mass Analyzer Detector (Q-TOF)", v, 33, p, 717 - 724, Buenos Aires, Argentina - 2014 (1)			-	2	-	-	-	-
PSE5894-2/1	Técnicas de Preparação de Trabalhos Científicos (Instituto de Psicologia – Universidade de São Paulo)			30	2	100	A	N	Concluída

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito de tese	
Disciplinas:	0	20	21
Estágios:			
Total:	0	20	21

Créditos Atribuídos à Tese: 167