

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ**

Centro de Ciências da Natureza

Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Química



**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS  
ESPECTROFOTOMÉTRICOS PARA DETERMINAÇÃO DE  
OLANZAPINA EM FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS**

Jardes Figuerêdo do Rêgo  
Dissertação de Mestrado

Profa. Dra. Graziella Ciaramella Moita  
Orientadora

Teresina – PI  
2009

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ**

Centro de Ciências da Natureza

Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Química

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS  
ESPECTROFOTOMÉTRICOS PARA DETERMINAÇÃO DE  
OLANZAPINA EM FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS**

Dissertação apresentada como parte dos  
requisitos necessários à obtenção do grau de  
MESTRE EM QUÍMICA – Área: Química  
Analítica

Jardes Figuerêdo do Rêgo  
Dissertação de Mestrado

Profa. Dra. Graziella Ciaramella Moita  
Orientadora

Teresina – PI  
2009

R343d Rêgo, Jardes Figuerêdo do.  
Desenvolvimento e validação de métodos  
espectrofotométricos para determinação de olanzapina  
em formulações farmacêuticas [manuscrito] / Jardes  
Figuerêdo do Rêgo. – 2009.  
xvi, 105 f.

Cópia de computador (printout).  
Dissertação (Mestrado) – Pós-Graduação em Química  
da Universidade Federal do Piauí, 2009.  
Orientadora: Profa. Dra. Graziella Ciaramella Moita.

1. Espectroscopia Ultravioleta. 2. Análise Química  
Quantitativa. I. Título.

CDD: 543.085

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS  
ESPECTROFOTOMÉTRICOS PARA DETERMINAÇÃO DE OLANZAPINA  
EM FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS**

JARDES FIGUERÊDO DO RÊGO

Dissertação de Mestrado submetida a Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Química - Centro de Ciências da Natureza da Universidade Federal do Piauí como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Química – Área: Química Analítica.

Aprovada por:



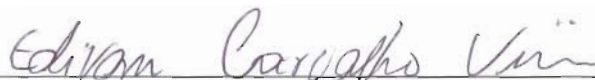
---

Profa. Dra. Graziella Ciaramella Moita  
Universidade Federal do Piauí  
(Orientador e Presidente)



---

Profa. Dra. Noemi Nagata  
Universidade Federal do Paraná



---

Prof. Dr. Edivan Carvalho Vieira  
Universidade Federal do Piauí

Teresina, 22 de julho de 2009

*Aos meus pais, José e Francisca...*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pelas bênçãos e força de cada dia.

Aos meus pais, José Nascimento do Rêgo e Francisca Medeiros de Figuerêdo, por tudo que sempre fizeram por mim, e aos meus irmãos, grande parte desta conquista é deles também.

À Profa. Dra. Graziella Ciaramella Moita pela orientação, e pela grande amizade e respeito que cultivamos desde a época de graduação.

À aluna de iniciação científica Jacira Izidório de Moura pela colaboração no trabalho.

À aluna de mestrado Jeanne Freire de Medeiros pela colaboração nos ensaios de precisão interlaboratorial.

Aos Professores Edivan Carvalho Vieira e Antônia Maria das Graças Lopes Citó pelas sugestões e contribuições dadas no exame de qualificação.

À Farmácia Escola (NTF/UFPI), em nome dos Professores Lívio César Cunha Nunes e Maria das Graças Freire de Medeiros e do farmacêutico Márcio dos Santos Rocha, pela aquisição da matéria prima e das amostras.

Ao funcionário da pós-graduação Isaac Diego Melo da Silva, por ter sempre ajudado nas horas precisas.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro e CAPES pela bolsa concedida.

Aos Professores Cleide Maria Leite Souza, Sebastião Barros Araújo, Luiz Alves Marinho, Mariana Helena Chaves, Edmilson Miranda de Moura, Alexandre Araújo de Souza, José de Arimatéia Dantas Lopes por terem contribuído na minha formação acadêmica.

Ao Prof. Francisco Cardoso Figueiredo pela amizade incentivo e apoio.

Aos amigos que cultivei durante a graduação e mestrado em especial: Daniel, Laurentino, Lázaro, Carlos, Ionara, Juliana, Marcos Vinícios, Ronaldo, Anderson, Tetisuelma, Vicente, Jocélia, Sérgio, Roberto, Lee, Izabele, Cleidiane, Rafael, Iranildo, Reginaldo, Adriano, Gilvan, Wilsilene, Socorro, Elidiane, Elcilene, Antônia.

A todos participaram, mesmo indiretamente, o meu muito obrigado!

# SUMÁRIO

<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	viii
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	ix
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	xi
<b>RESUMO</b> .....	xv
<b>ABSTRACT</b> .....	xvi
<b>1 – INTRODUÇÃO</b> .....	1
1.1 – Antipsicóticos.....	1
1.2 – Olanzapina.....	2
1.2.1– Métodos para quantificação de olanzapina.....	5
1.3 – Espectrofotometria de absorção molecular UV-Vis.....	11
1.4 – Espectrofotometria derivativa.....	14
1.5 – Espectrofotometria de duplo comprimento de onda.....	18
1.6 – Validação analítica.....	20
1.6.1 – Seletividade.....	21
1.6.2 – Linearidade.....	22
1.6.3 – Intervalo.....	22
1.6.4 – Limite de detecção.....	23
1.6.5 – Limite de quantificação.....	23
1.6.6 – Robustez.....	24
1.6.7 – Exatidão.....	24
1.6.8 – Precisão.....	25
1.6.8.1 – Repetibilidade.....	25
1.6.8.2 – Precisão intermediária ou inter-análise.....	26
1.6.8.3 – Reprodutibilidade ou precisão inter-laboratorial.....	26
<b>2 – OBJETIVOS</b> .....	27
2.1 – Geral.....	27
2.2 – Específicos.....	27
<b>3 – PARTE EXPERIMENTAL</b> .....	28
3.1 – Equipamentos.....	28
3.2 – Reagentes.....	28
3.3 – Matéria Prima.....	29

3.4 – Excipientes.....	29
3.5 – Amostras.....	29
3.6 – Soluções.....	29
3.6.1 – Soluções estoque de olanzapina.....	29
3.6.2 – Solução ácida e solução básica.....	30
3.6.3 – Suspensões dos excipientes.....	30
3.7 – Preparo das amostras.....	31
3.7.1 – Olanzapina produzida na planta piloto.....	31
3.7.2 – Comprimido Zyprexa <sup>®</sup> .....	32
3.7.2.1 – Procedimento 1.....	32
3.7.2.2 – Procedimento 2.....	32
3.7.2.3 – Procedimento 3.....	32
3.7.2.4 – Procedimento 4.....	32
3.8 – Otimização do método.....	33
3.8.1 – Parâmetros do equipamento.....	33
3.8.2 – Estudo do solvente.....	34
3.8.3 – Efeito da adição água no espectro de absorção .....	34
3.8.4 – Estabilidade das soluções.....	34
3.8.5 – Efeito do pH sobre o espectro de absorção.....	35
3.8.6 – Efeito da marca do solvente.....	35
3.8.7 – Estudo dos excipientes.....	36
3.8.8 – Seleção do comprimento de onda.....	36
3.8.8.1 – Ordem zero.....	36
3.8.8.2 – Espectros derivados.....	37
3.8.8.3 – Método de duplo comprimento de onda.....	37
3.8.9 – Linearidade.....	37
3.8.10 – Limites de Detecção e Quantificação.....	38
3.8.11 – Exatidão.....	38
3.8.12 – Precisão.....	39
<b>4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>40</b>
4.1 – Escolha do solvente.....	40
4.2 – Escolha do comprimento de onda para análise quantitativa.....	42
4.3 – Efeito da adição água no espectro de absorção .....	46



4.4 – Estabilidade da solução estoque.....	48
4.5 – Efeito do pH.....	51
4.6 – Efeito da mudança de marca do solvente.....	56
4.7 – Estudo dos excipientes.....	58
4.8 – Aplicação da espectrofotometria derivativa.....	61
4.8.1 – Efeito do $\Delta\lambda$ e da ordem da derivada no espectro.....	62
4.8.2 – Escolha do $\lambda_{\max}$ nos espectros derivados.....	68
4.9 – Método de duplo comprimento de onda.....	73
4.10 – Linearidade, limite de detecção e quantificação.....	74
4.11 – Análise quantitativa.....	78
4.11.1 – Preparo da amostra.....	78
4.11.2 – Exatidão.....	79
4.11.3 – Precisão.....	85
4.11.4 – Teor de olanzapina.....	90
4.12 – Considerações sobre os métodos propostos.....	92
4.13 – Comparação do método mais adequado e a literatura.....	93
<b>5 – CONCLUSÃO.....</b>	<b>97</b>
<b>6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>98</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
Dn	Derivada de ordem n
DPR	Desvio padrão relativo
FDA	Food and Drug Administration
HPLC	High performance liquid chromatography
ICH	International Conference on Harmonisation
LOD	Limit of detection
LOL	Limit of linearity
LOQ	Limit of quantification
NTF	Núcleo de Tecnologia Farmacêutica
USP	United States Pharmacopeia
UV	Ultravioleta
UV-Vis	Ultravioleta-Visível

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1.1 –	Antipsicóticos típicos e atípicos .....	02
TABELA 4.1 –	Parâmetros de calibração para os métodos analíticos propostos para quantificar olanzapina utilizado etanol como solvente.....	76
TABELA 4.2 –	Parâmetros de calibração para os métodos analíticos propostos para quantificar olanzapina utilizado isopropanol como solvente.....	77
TABELA 4.3 –	Teste de adição e recuperação de padrão para os métodos propostos para a amostra na planta piloto utilizando o sobrenadante.....	81
TABELA 4.4 –	Teste de adição e recuperação de padrão para os métodos propostos para o comprimido Zyprexa <sup>®</sup> utilizando o sobrenadante.....	82
TABELA 4.5 –	Teste de adição e recuperação de padrão para os métodos propostos para o comprimido Zyprexa <sup>®</sup> utilizando o sobrenadante após centrifugação.....	84
TABELA 4.6 –	Precisão inter-dia e entre analista para os métodos utilizando etanol como solvente.....	86
TABELA 4.7 –	Precisão inter-laboratorial para os métodos utilizando etanol como solvente.....	87
TABELA 4.8 –	Precisão inter-dia e entre analista para os métodos utilizando isopropanol como solvente.....	88
TABELA 4.9 –	Precisão inter-laboratorial para os métodos utilizando isopropanol como solvente.....	89
TABELA 4.10 –	Teor médio de olanzapina encontrada pelos métodos propostos nas amostras estudadas em etanol.....	90
TABELA 4.11 –	Teor médio de olanzapina encontrada pelos métodos propostos nas amostras estudadas em isopropanol.....	91

TABELA 4.12 –	Comparativo do método mais adequado e alguns métodos da literata.....	95
TABELA 4.13 –	Comparativo do método mais adequado e alguns métodos espectrofotométricos da literatura.....	96

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.1 –	Estrutura da molécula de olanzapina.....	3
FIGURA 1.2 –	Tangente de uma curva em pontos definidos.....	15
FIGURA 1.3 –	a) Espectro de ordem zero; b) Espectro derivado de primeira ordem.....	16
FIGURA 1.4 –	Ilustração do método de duplo comprimento de onda em uma mistura binária de componetes <i>a</i> e <i>b</i> .....	18
FIGURA 1.5 –	Ilustração do método de duplo comprimento de onda em soluções que apresentam interferência por partículas suspensas.....	20
FIGURA 4.1 –	Espectro de olanzapina a 10 mg L <sup>-1</sup> em diversos solventes.....	41
FIGURA 4.2 –	Espectro de olanzapina em etanol em concentrações crescentes.....	43
FIGURA 4.3 –	Linearidade da olanzapina em etanol com o aumento da concentração.....	44
FIGURA 4.4 –	Espectro de olanzapina em isopropanol em concentrações crescentes.....	45
FIGURA 4.5 –	Linearidade da olanzapina em isopropanol com o aumento da concentração.....	45
FIGURA 4.6 –	Espectros de olanzapina a 10 mg L <sup>-1</sup> em diferentes proporções de etanol e água.....	47
FIGURA 4.7 –	Espectros de olanzapina a 10 mg L <sup>-1</sup> em diferentes proporções de isopropanol e água.....	48
FIGURA 4.8 –	Espectro de olanzapina a 10 mg L <sup>-1</sup> em etanol na presença de luz.....	50
FIGURA 4.9 –	Espectro de olanzapina a 10 mg L <sup>-1</sup> em isopropanol na presença de luz.....	50
FIGURA 4.10 –	FIGURA 4.10 - Estabilidade das soluções de olanzapina a 10 mg L <sup>-1</sup> em presença de luz: em etanol 272,5 nm (1);	

	em etanol 226,5 nm (2); em isopropanol 273,0 nm (3) e em isopropanol 226,5 nm (4).....	51
FIGURA 4.11 –	FIGURA 4.11 - Absorbâncias das soluções de olanzapina a 10 mg L <sup>-1</sup> variando o pH: em etanol 272,5 nm (1); em etanol 226,5 nm (2); em isopropanol 273,0 nm (3) e em isopropanol 226,5 nm (4).....	52
FIGURA 4.12 –	Espectro de olanzapina a 10 mg L <sup>-1</sup> em etanol em meio básico.....	53
FIGURA 4.13 –	Espectro de olanzapina a 10 mg L <sup>-1</sup> em isopropanol em meio básico.....	54
FIGURA 4.14 –	Espectro de olanzapina a 10 mg L <sup>-1</sup> em etanol em meio ácido.....	55
FIGURA 4.15 –	Espectro de olanzapina a 10 mg L <sup>-1</sup> em isopropanol em meio ácido.....	55
FIGURA 4.16 –	Reação da olanzapina em meio ácido.....	56
FIGURA 4.17 –	Espectro de olanzapina a 10 mg L <sup>-1</sup> em etanol de diferentes marcas de solventes.....	57
FIGURA 4.18 –	Espectro de olanzapina a 10 mg L <sup>-1</sup> em isopropanol de diferentes marcas de solvente.....	57
FIGURA 4.19 –	Espectro de olanzapina a 10 mg L <sup>-1</sup> em etanol comparado com de seus principais excipientes.....	59
FIGURA 4.20 –	Espectro de olanzapina a 10 mg L <sup>-1</sup> em isopropanol comparado com de seus principais excipientes.....	59
FIGURA 4.21 –	Espectro de olanzapina a 10 mg L <sup>-1</sup> em etanol comparado com de seus principais excipientes em concentrações mais elevadas.....	60
FIGURA 4.22 –	Espectro de olanzapina a 10 mg L <sup>-1</sup> em isopropanol comparado com de seus principais excipientes em concentrações mais elevadas.....	61
FIGURA 4.23 –	Espectro derivado de 1ª ordem de olanzapina a 10 mg L <sup>-1</sup>	

	em etanol variando o valor de $\Delta\lambda$ .....	63
FIGURA 4.24 –	Espectro derivado de 1ª ordem de olanzapina a 10 mg L <sup>-1</sup> em isopropanol variando o valor de $\Delta\lambda$ .....	63
FIGURA 4.25 –	Espectro derivado de 2ª ordem de olanzapina a 10 mg L <sup>-1</sup> em etanol variando o valor de $\Delta\lambda$ .....	64
FIGURA 4.26 –	Espectro derivado de 2ª ordem de olanzapina a 10 mg L <sup>-1</sup> em isopropanol variando o valor de $\Delta\lambda$ .....	64
FIGURA 4.27 –	Espectro derivado de 3ª ordem de olanzapina a 10 mg L <sup>-1</sup> em etanol variando o valor de $\Delta\lambda$ .....	65
FIGURA 4.28 –	Espectro derivado de 3ª ordem de olanzapina a 10 mg L <sup>-1</sup> em isopropanol variando o valor de $\Delta\lambda$	65
FIGURA 4.29 –	Espectro derivado 4ª ordem de olanzapina a 10 mg L <sup>-1</sup> em etanol variando o valor de $\Delta\lambda$ .....	66
FIGURA 4.30 –	Espectro derivado 4ª ordem de olanzapina a 10 mg L <sup>-1</sup> em isopropanol variando o valor de $\Delta\lambda$ .....	66
FIGURA 4.31 –	Espectro de ordem zero de olanzapina a 10 mg L <sup>-1</sup> em etanol e espectros derivados ( $\Delta\lambda = 10$ ).....	67
FIGURA 4.32 –	Espectro de ordem zero de olanzapina a 10 mg L <sup>-1</sup> em isopropanol e espectros derivados ( $\Delta\lambda = 10$ ).....	67
FIGURA 4.33 –	Espectros derivados de 1ª ordem de olanzapina em etanol ( $\Delta\lambda = 10$ ) variando a concentração.....	69
FIGURA 4.34 –	Espectros derivados de 1ª ordem de olanzapina em isopropanol ( $\Delta\lambda = 10$ ) variando a concentração.....	70
FIGURA 4.35 –	Espectros derivados de 2ª ordem de olanzapina em etanol ( $\Delta\lambda = 10$ ) variando a concentração.....	70
FIGURA 4.36 –	Espectros derivados de 2ª ordem de olanzapina em isopropanol ( $\Delta\lambda = 10$ ) variando a concentração.....	71
FIGURA 4.37 –	Espectros derivados de 3ª ordem de olanzapina em etanol ( $\Delta\lambda = 10$ ) variando a concentração.....	71
FIGURA 4.38 –	Espectros derivados de 3ª ordem de olanzapina em isopropanol ( $\Delta\lambda = 10$ ) variando a concentração.....	72

FIGURA 4.39 – Espectros derivados de 4ª ordem de olanzapina em etanol ( $\Delta\lambda = 10$ ) variando a concentração.....	72
FIGURA 4.40 – Espectros derivados de 4ª ordem de olanzapina em isopropanol ( $\Delta\lambda = 10$ ) variando a concentração.....	73
FIGURA 4.41 – Ilustração da aplicação do método dos dois comprimentos de onda.....	74
FIGURA 4.42 – Espectro de olanzapina a 10 mg L <sup>-1</sup> em etanol comparado com os espectros das amostras comerciais na mesma concentração.....	80
FIGURA 4.43 – Espectro de olanzapina a 10 mg L <sup>-1</sup> em isopropanol comparado com os espectros das amostras comerciais na mesma concentração.....	60



## RESUMO

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ESPECTROFOTOMÉTRICOS PARA DETERMINAÇÃO DE OLANZAPINA EM FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS. A olanzapina é um novo antipsicótico atípico utilizado no tratamento de sintomas positivos e negativos da esquizofrenia e transtorno bipolar. A substância ainda não faz parte de nenhuma farmacopéia e não possui método oficial de quantificação nas especialidades farmacêuticas existentes. Neste trabalho, foram desenvolvidos métodos analíticos utilizando espectrofotometria de ordem zero, derivativa e de duplo comprimento de onda, os quais foram validados segundo o guia da ANVISA (RE nº 899, 29/05/2003). Foram testados alguns solventes e os resultados mostraram que etanol e isopropanol foram os mais adequados. A robustez dos métodos foi avaliada quanto à estabilidade, pH e marca do solvente, verificou-se que a solução de olanzapina foi estável, quando protegida da luz, à temperatura ambiente ( $25,0 \pm 5,0$  °C) ou sob refrigeração ( $4,0 \pm 3,0$  °C). O espectro Uv da olanzapina não sofreu alteração significativa em pH acima de 8,0 ou com a variação de marca do solvente em 272,5 nm (etanol) e 273,0 nm (isopropanol). Para o preparo das amostras, os comprimidos foram congelados e posteriormente triturados para garantir a homogeneização e representatividade. Os sólidos suspensos foram separados da solução por centrifugação. A seletividade foi avaliada para alguns dos excipientes do comprimido de olanzapina, os quais não interferiram na análise. A linearidade foi observada até  $50 \text{ mg L}^{-1}$ , com coeficiente de correlação maior que 0,9998. Os limites de detecção variaram de  $0,7 \cdot 10^{-1}$  a  $2,5 \cdot 10^{-1} \text{ mg L}^{-1}$ , em etanol, e de  $0,3 \cdot 10^{-1}$  a  $2,1 \cdot 10^{-1} \text{ mg L}^{-1}$ , em isopropanol. Os limites de quantificação variaram de  $2,1 \cdot 10^{-1}$  a  $7,6 \cdot 10^{-1}$ , em etanol, e de  $0,8 \cdot 10^{-1}$  a  $6,2 \cdot 10^{-1}$ ,  $\text{mg L}^{-1}$ , em isopropanol. As recuperações ficaram entre 97 e 105%, em etanol e entre 97 e 104%, em isopropanol. A precisão foi avaliada usando o desvio padrão relativo, através de ensaios de repetibilidade (0,1 a 1,1%, em etanol, e 0,8 a 2,1%, em isopropanol), precisão intermediária (0,4 a 1,5%, em etanol e 0,8 a 2,3%, em isopropanol) e reprodutibilidade (2,6 a 4,8%, em etanol, e 2,1 a 45,7%, em isopropanol). Após a otimização dos parâmetros, o método mais adequado foi espectrofotometria de ordem zero, em 272,5 nm usando o solvente etanol.

## ABSTRACT

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF SPECTROPHOTOMETRIC METHODS FOR DETERMINATION OF OLANZAPINE IN PHARMACEUTICAL FORMULATIONS. Olanzapine is a new atypical antipsychotic drug used in the treatment of positive and negative symptoms of the schizophrenia and bipolar disorder. The substance also is not part of any pharmacopoeia and has no official method of quantification in pharmaceutical products available. In this work, analytical methods were developed using of zero order, derivative and double wavelength spectrophotometry, were validated according to the guide of ANVISA (RE n. 899, May 29, 2003). Some solvents were tested and the results showed that ethanol and isopropanol were appropriate. The robustness of the methods was evaluated on the stability, pH and marks of the solvent, it was found that the solution of olanzapine was stable when protected from light at room temperature ( $25.0 \pm 5.0$  °C) or under refrigeration ( $4.0 \pm 3.0$  °C). The UV spectra of olanzapine showed no significant change in pH greater than 8.0 or with the change of brand of the solvent in 272.5 nm (ethanol) and 273.0 nm (isopropanol). For the sample, the tablets were frozen and later ground to ensure homogeneity and representativeness. The suspended solids were separated of the solution by centrifugation. The selectivity was evaluated for various compounds usually associated with olanzapine in pharmaceutical preparations, which did not interfere in the analysis. The linearity was observed up to  $50 \text{ mg L}^{-1}$  and the correlation coefficient were greater than 0.9998. The limits of detection ranged from  $0.7 \cdot 10^{-1}$  to  $2.5 \cdot 10^{-1} \text{ mg L}^{-1}$ , in ethanol, and  $0.3 \cdot 10^{-1}$  to  $2.1 \cdot 10^{-1} \text{ mg L}^{-1}$ , in isopropanol. The limits of quantification ranged from  $2.1 \cdot 10^{-1}$  to  $7.6 \cdot 10^{-1} \text{ mg L}^{-1}$  ethanol, and  $0.8 \cdot 10^{-1}$  to  $6.2 \cdot 10^{-1} \text{ mg L}^{-1}$ , in isopropanol. The recoveries were between 97 and 105%, in ethanol, and between 97 and 104%, in isopropanol. The precision was evaluated using the relative standard deviation by tests of repeatability (0.1 to 1.1%, in ethanol, and 0.8 to 2.1%, in isopropanol), intermediate precision (0.4 to 1.5%, in ethanol and 0.8 to 2.3%, in isopropanol), and reproductibility (2.6 to 4.8%, in ethanol, and 2.1 a 45.7%, in isopropanol). After optimization of the parameters, the most appropriate method was the order zero spectrophotometry, in 272.5 nm, using the solvent ethanol.

# 1- INTRODUÇÃO

## 1.1 - Antipsicóticos

Até a metade do século XX, os recursos terapêuticos disponíveis para o tratamento de pacientes com estados psicóticos agudos limitavam-se ao uso de técnicas rudimentares e evasivas como o choque cardiopático, lobotomia frontal, eletro e insulinoconvulsioterapia, malarioterapia e também ao emprego de alguns medicamentos sedativos e hipnóticos (Frota, 2003).

Entretanto, no início da década de 50, um fato bastante importante mudou definitivamente a vida das pessoas que sofriam de problemas psíquicos, a introdução das chamadas substâncias líticas ou neurolíticas, neurolépticas, atarácicas, tranquilizantes maiores ou simplesmente antipsicóticos (Frota, 2003; Elkis et al., 2007).

Um antipsicótico é definido como uma substância química sintética que atenua os distúrbios neuro-psíquicos (psicóticos), tais como delírios e alucinações. São também inibidores das funções psicomotoras que podem ocorrer em estado de excitação e agitação (Marangel, 2004). Os antipsicóticos têm a capacidade de atuar seletivamente nas células nervosas que regulam os processos psíquicos no ser humano e a conduta em animais (Schatzberg et al., 2004; Meltzer, 2004).

Os antipsicóticos são classificadas de duas formas. A primeira está relacionada com a sua estrutura química, e a segunda está relacionada com a época em que foram descobertos, os mais antigos são denominados de convencionais ou típicos, enquanto que os mais novos são chamados de atípicos ou de segunda geração (Marangel, 2004).

As drogas típicas são ainda classificados de duas formas: como sedativos, cujo principal efeito provocado é a sedação, e incisivos, que têm a finalidade de tratar delírios e alucinações (Frota, 2003). A Tabela 1.1 mostra alguns dos principais antipsicóticos encontrados no mercado.

TABELA 1.1 – Antipsicóticos típicos e atípicos

Antipsicóticos típicos		Antipsicóticos atípicos
Sedativos	Incisivos	
Clorpromazina	Haloperidol	Amisulpiridina
Levomepromazina	Penfluridol	Clozapina
Sulpiridina	Flufenzina	Quetiapina
Tioridazina	Fenotiazina	Risperidona
Trifluoperazina		Zuclopentixiol
Amisulpirida		Olanzapina

Os antipsicóticos típicos possuem a mesma eficiência quando aplicados em doses equivalentes, diferenciando-se apenas com respeito aos efeitos colaterais (doença de Parkinson, hiperprolactinemia, boca seca, visão borrada, constipação e sedação) (Marangel, 2004). Já os antipsicóticos atípicos são mais eficientes e por esta razão são aplicados em doses menores, resultando em menor número de efeitos colaterais extrapiramidais (reações distônicas agudas, síndrome parkinsoniana, actisia, síndrome neuroléptica maligna e discinesia tardia) (Oliveira, 2000; Joffe et al., 2008; Lacerda et al., 2002).

Outra vantagem dos antipsicóticos atípicos com relação aos típicos é o fato de terem uma melhor eficácia com relação aos sintomas negativos da esquizofrenia (Joffe et al., 2008). No entanto, os antipsicóticos típicos possuem a vantagem do baixo custo, já que todos estão disponíveis como genéricos, diferentemente dos atípicos (Schatzberg et al., 2004).

## 1.2 - Olanzapina

A olanzapina, 2-metil-4-(4-metil-1-piperazinil)-10H-tieno(2,3-b)(1,5) benzodiazepina (Figura 1.1), é um agente psicotrópico atípico pertencente à classe das tienobenzodiazepinas (Jasińska et al., 2004, Song et al., 2008). É utilizada para

tratamento de sintomas positivos e negativos da esquizofrenia (Joffe et al., 2008) e transtorno bipolar do tipo I e II (Kapczinski et al., 2005; Lacerda et al., 2002).

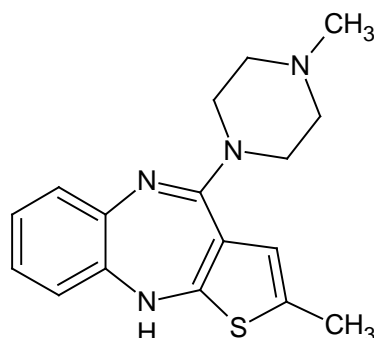


FIGURA 1.1 - Estrutura da molécula de olanzapina

A droga se apresenta sob forma de um sólido cristalino amarelo de fórmula molecular  $C_{17}H_{20}N_4S$  e massa molecular  $312,43 \text{ g mol}^{-1}$ . Estruturalmente, sua molécula encontra-se disposta na forma de um dímero centrossimétrico formado por meio de interações do tipo  $C-H \cdots \pi$ . Ela é insolúvel em água, mais pode ser solubilizada em alguns solventes por meio de interações de hidrogênio do tipo  $O-H \cdots N$ ,  $N-H \cdots O$ , nos nitrogênios do anel diazepínico, e  $C-H \cdots O$  (Wawrzycka-Gorczyca et al., 2007, Reutzel-Edens et al., 2003).

A olanzapina é oxidada por substâncias como:  $HClO$  (Gardner et al., 1998),  $Fe(CN)_6^{3-}$ ,  $Ce(SO_4)_2$  (Jasińska et al., 2003),  $KIO_3$  (Mohamed, 2008),  $ICl$  (Revanassidappa et al., 2008) em meio ácido, formando produtos coloridos que apresentam absorção na região do visível. Possui em sua estrutura dois nitrogênios ionizáveis no anel piperazínico, com  $pK_a$  4,7 e 7,4 que atuam em alguns processos biológicos (Steinkopf et al., 2008).

A olanzapina foi obtida no ano de 1982, na Inglaterra, por um grupo de pesquisadores da companhia Eli Lilly and Company a partir de modificações estruturais da clozapina (Cavalla, 2000). Devido a sua similaridade com a clozapina (estrutura química e farmacologia) (Flórez, 1997) e ao menor risco à agranulocitose

(Iverson, et al., 2002, Gardner et al., 1998), a olanzapina é tida como boa alternativa para substituição da clozapina (Frota, 2003).

Outro processo de obtenção da olanzapina envolve a reação do cloridrato de 2-metil-4H-3-tia-4,9-diazabeno[f]azulen-10-ilamina com o anel piperazina, seguido de metilação com dimetil, formando a olanzapina (Thatipalli et al., 2008).

A olanzapina cristaliza-se em 25 formas sólidas, incluindo polimorfos, solvatos, hidratos (três monohidratados, três dihidratados, etc), sendo que algumas destas formas apresentam boa estabilidade térmica, característica relevante para indústria farmacêutica (monohidratados) (Polla et al., 2005; Ayala, 2007). Algumas das formas sólidas são altamente tóxicas e podem causar sérios danos à saúde (Reutzel-Edens, et al., 2003; Ayala et al., 2006).

A droga é comercializada na Europa desde o ano de 1996, quando teve sua aprovação pela Agência Européia para Avaliação de Medicamentos (Frota, 2003). No mesmo ano ela foi liberada para uso nos Estados Unidos pela U.S. Food and Drug Administration (FDA) (FDA, 2000; Capuano et al. 2003). No Brasil, somente no ano de 1999 foi incluída na lista de medicamentos excepcionais do Ministério da Saúde (Frota, 2003).

No mercado mundial, a olanzapina é encontrada com os seguintes nomes: Zyprexa, Zyprexa Zydis, Zalasta, Zolafren e Olzapin, e também sob duas formas de administração, oral e intramuscular. Cada uma delas apresenta diferentes teores de olanzapina, cujo uso depende da dose diária prescrita pelo médico (Frota et al, 2003, Marangel, 2004).

- Comprimido: 2,5; 5,0; 7,5; 10,0; 15,0 e 20,0 mg
- Comprimidos mastigáveis: 5,0; 10,0; 15,0 e 20,0 mg
- Intramuscular: 10 mg

Estes medicamentos são produzidos exclusivamente pela empresa Eli Lilly and Company, que possui patente sobre a substância até o ano de 2011 (Frota, 2003).

A olanzapina quando administrada por via oral, sem influência de alimentos antiácidos a base de alumínio ou magnésio ou cimetidina, alcança picos de

concentração em torno de 7 h com a meia-vida plasmática variando de 21 e 54 h, podendo ser utilizada em doses únicas diárias (Flórez, 1997, Frota, 2003).

Ela é metabolizada principalmente pela enzima do citocromo P450 1A2 e, em menor escala 2D6. Pelo fato do seu metabolismo ocorrer por diversas rotas, ele normalmente não é afetado pelo uso simultâneo de outros medicamentos (Marangel, 2004, Schatzberg et al., 2004). No organismo a substância tem alta afinidade por receptores D<sub>1</sub>-D<sub>4</sub>, serotoninérgicos 5-HT<sub>2,3,6</sub> e receptores muscarínicos (sub-tipos 1-5), adrenérgicos alfa<sub>1</sub> e histaminérgicos H<sub>1</sub> (Oliveira, 2000; Medeiros et al., 2008; Meltzer et al., 1989; Kassahum et al., 1997). Por ser fortemente metabolizada pelo organismo, apenas cerca de 7% da substância é excretada inalterada por via renal (Frota, 2003).

O uso de olanzapina pode provocar uma série de efeitos colaterais indesejáveis, sendo que os mais comuns são o aumento de peso (Monda et al., 2008; Fleischhaker et al., 2008), sonolência e ou sedação (lentidão psicomotora). Causa também efeitos colaterais anticolinérgicos, boca seca e efeitos hepáticos com um aumento dos níveis de transaminase (2%). Outros efeitos como convulsões, constipação, acatisia, hipotensão ortostática e tonteados também são observados em menor escala (Flórez, 1997; Frota, 2003; Duval et al., 2008).

A dosagem clinicamente eficaz de olanzapina é de 7,5 a 20 mg/dia com uma única dose administrada à noite, mas doses superiores podem ser recomendadas dependendo do paciente. Em doses elevadas pode haver a ocorrência de alguns efeitos colaterais extrapiramidais e até óbito (Frota, 2003).

### **1.2.1 – Métodos para quantificação de olanzapina**

A olanzapina não é oficialmente registrada em nenhuma farmacopéia, portanto não possui nenhum método oficial de análise. Vários métodos são descritos na literatura para quantificação do fármaco em matérias primas, fórmulas farmacêuticas ou fluídos biológicos.

Catlow et al. (1995), determinaram olanzapina em plasma sanguíneo humano por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção eletroquímica. A

análise foi realizada com extração em fase sólida reversa com taxa de fluxo  $1,2 \text{ mL min}^{-1}$  e a detecção foi baseada no potencial de oxidação da olanzapina. O limite de quantificação encontrado foi de  $0,25 \cdot 10^{-3} \text{ mg L}^{-1}$ , com a lei de Beer sendo obedecida até  $0,1 \text{ mg L}^{-1}$  e coeficiente de correlação 0,997. O método apresentou exatidão média de 96,6 %, com eficiência média da extração de 75% e precisão de 3,22%.

Kasper et al. (1998) utilizaram cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa com detecção eletroquímica para determinação de olanzapina em leite materno. O método envolveu extração em fase sólida com padrão interno, sendo que o extrato foi injetado em uma coluna YMC básica com taxa de fluxo  $1 \text{ mL min}^{-1}$ . Como fase móvel foi utilizado uma mistura do tampão fosfato,  $\text{pH} = 7,0$ , acetonitrila e metanol (48:26:26, v/v/v). Ele obteve limite de quantificação de  $0,25 \cdot 10^{-3} \text{ mg L}^{-1}$  e linearidade até  $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ , com coeficiente de correlação 0,9992. A precisão foi de 6,64% com exatidão média de 99%. O método foi validado e considerado satisfatório para medir concentrações de olanzapina em leite materno.

Boguz et al. (1999), fizeram monitoramento de olanzapina em amostras biológicas (soro, sangue, urina) utilizando cromatografia líquida com ionização química, à pressão atmosférica, acoplada a espectrômetro de massa. O procedimento envolveu extração em fase sólida com padrão interno. A separação foi feita com coluna ODS, com tampão acetonitrila/amônio (25:75,  $\text{pH}=3,0$ ), com taxa de fluxo  $0,3 \text{ mL/min}$ . O limite de quantificação foi de  $1,0 \cdot 10^{-3} \text{ mg L}^{-1}$ , com linearidade até  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  e coeficiente de correlação 0,9997. A precisão foi de 18% com recuperação absoluta acima de 80%. O sinal obtido pela olanzapina nas amostras foi estável por pelo menos 4 semanas. O método foi considerado sensível, seletivo e simples para o monitoramento da droga.

Raggi et al. (2000), desenvolveram quatro metodologias para controle de qualidade de fórmulas farmacêuticas de olanzapina. Inicialmente, para todos os procedimentos, realizou-se a extração das amostras com coluna  $\text{C}_8$ , tendo a fase móvel constituída de acetonitrila e perclorato de trimetilamônio. O primeiro método foi baseado em cromatografia líquida de alta eficiência com detecção no UV em 260 nm. O método apresentou limite de quantificação de  $10 \cdot 10^{-3} \text{ mg L}^{-1}$  e linearidade até  $50 \cdot 10^{-3} \text{ mg L}^{-1}$ , com coeficiente de correlação 0,9997. A precisão obtida foi considerada



boa (intra-dia: 1,4% e inter-dia: 1,8%) e os ensaios de recuperação variaram de 100 a 101%. A segunda proposta de trabalho utilizou eletroforese capilar e foi realizada com capilar sem revestimento e tampão fosfato (pH=3,0) como eletrólito de fundo e detecção no UV em 214 nm. O limite de quantificação foi  $0,9 \text{ mg L}^{-1}$  e a linearidade até  $50 \text{ mg L}^{-1}$ , com coeficiente de correlação 0,9994. A precisão foi menor que 2% (intra-dia: 0,7% e inter-dia: 1,4%) com recuperação variando de 99 a 101%. O terceiro método utilizou a espectrofotometria derivativa, com o espectro derivado na primeira ordem, com análise sendo realizada a partir da banda em 298 nm. O limite de quantificação foi  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ , com a lei de Beer sendo obedecida até  $100 \text{ mg L}^{-1}$  e coeficiente de correlação 0,9998. A precisão foi menor que 2,5 % (intra-dia: 1,6% e inter-dia: 2,3%) com recuperação variando de 101 a 103%. O último método proposto foi utilizando voltametria linear com intensidade de corrente de pico de oxidação +495 mV. O método apresentou limite de quantificação de  $5 \text{ mg L}^{-1}$  e linearidade até  $50 \text{ mg L}^{-1}$ , com coeficiente de correlação 0,9990. A precisão foi menor que 3% (intra-dia: 2,3% e inter-dia: 2,9%) e exatidão de 97 a 98%. Todos os métodos foram validados e os resultados obtidos mostraram que os métodos são seletivos e bastante similares em termos de precisão e exatidão.

Berna et al. (2001) determinaram olanzapina em amostras de sangue humano por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um espectrômetro de massas com ionização Tandem. A extração da matriz biológica foi feita utilizando padrão interno na mistura n-butanol e ciclo hexano (3:47, v/v). O método apresentou limite de quantificação de  $5,0 \cdot 10^{-3} \text{ mg L}^{-1}$  e linearidade até  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ , com coeficiente de correlação 0,9983. A precisão apresentou intervalo de 4 a 11% com exatidão entre 98 e 103%. O método foi validado e apresentou bons resultados para quantificar olanzapina em amostras de sangue.

Jasińska et al. (2003) desenvolveram três métodos espectrofotométricos para determinar olanzapina em comprimido. O primeiro foi baseado na oxidação da substância com excesso de  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ , em meio ácido ( $\text{H}_2\text{SO}_4 + \text{H}_3\text{PO}_4$ , 1:1 v/v). O produto da oxidação apresentou uma banda em 425 nm que foi utilizada para análise quantitativa. Os limites de detecção e quantificação foram iguais a  $2,17 \text{ mg L}^{-1}$  e  $2,50 \text{ mg L}^{-1}$ , respectivamente, com linearidade até  $40 \text{ mg L}^{-1}$  e coeficiente de correlação

0,9983. A precisão foi de 2,27% e a exatidão variou de 97,6 a 101,8%. O segundo método envolveu análise por injeção em fluxo, com o produto da oxidação direta da olanzapina com  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$  ou  $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ , em meio ácido, com uma banda em 540 nm. Utilizando  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$  como oxidante, os limites de detecção e quantificação obtidos foram de  $0,07 \text{ mg L}^{-1}$  e  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ , respectivamente, com linearidade até  $250 \text{ mg L}^{-1}$  e coeficiente de correlação 0,9999. A precisão foi de 0,42% e o intervalo de exatidão foi de 97,75 a 100,18%. Com  $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$  como oxidante, os limites de detecção e quantificação foram de  $0,01 \text{ mg L}^{-1}$  e  $0,05 \text{ mg L}^{-1}$ , com linearidade até  $300 \text{ mg L}^{-1}$  e coeficiente de correlação 0,9999. A precisão foi de 0,84% e o intervalo de exatidão foi de 100,08 a 101,08%. Os métodos envolvendo análise de injeção em fluxo foram considerados os mais precisos e com uma maior faixa de aplicabilidade para determinação de olanzapina em comprimidos.

Firdous et al. (2005), desenvolveram dois métodos para determinação de olanzapina em fórmulas farmacêuticas. O primeiro foi baseado na técnica de espectrofotometria de absorção molecular no ultravioleta em 226,5 nm. O limite de quantificação obtido foi  $0,1 \text{ mg L}^{-1}$  com a lei de Beer sendo estabelecida até  $50 \text{ mg L}^{-1}$  e coeficiente de correlação 0,999. A precisão foi de 0,97% com recuperação variando de 98 a 99%. Para o outro método, a olanzapina foi titulada com  $\text{HClO}_4$  em meio ácido ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ) utilizando como indicador naftobenzeno. O limite de quantificação foi de 0,3 mg. A precisão foi de 0,35%, com exatidão de 99 a 100%. Ambos apresentaram boa precisão e exatidão nos resultados.

Saracino et al. (2006) determinaram olanzapina em amostras de cérebro de rato utilizando cromatografia líquida de alta eficiência com detecção amperométrica. As análises foram realizadas utilizando coluna  $\text{C}_8$  em fase reversa com fase móvel constituída de metanol, tampão fosfato (pH = 3,5) contendo trietilamina e taxa de fluxo  $1,2 \text{ mL min}^{-1}$ . A amostra analisada era constituída de partes inteiras do cérebro do animal e de áreas específicas. O rendimento da extração foi elevado, com recuperações de 90,0%. O método apresentou limite de quantificação de  $0,2 \cdot 10^{-3} \text{ mg L}^{-1}$ , com resposta linear do detector até  $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ . A precisão inter-dia foi de 4,6%, com exatidão satisfatória. O método foi considerado adequado para os estudos de teor de olanzapina nos tecidos de cérebro de rato.

Nirogi et al. (2006) propuseram um método para determinação de olanzapina em amostras de plasma utilizando cromatografia líquida acoplada a um espectrômetro de massas com sistema de iniozação Tandem e Eletrospray. A extração foi realizada com padrão interno e após a extração líquido-líquido, os analitos foram separados utilizando uma coluna C<sub>18</sub> em fase reversa e fase móvel isocrática sendo em seguida analisadas por espectrometria de massa. O ensaio apresentou limite de quantificação de  $0,1 \cdot 10^{-3} \text{ mg L}^{-1}$  e linearidade até  $30 \cdot 10^{-3} \text{ mg L}^{-1}$ , com coeficiente de correlação igual a 0,998. A precisão foi abaixo de 10%, com recuperações médias de  $85,5 \pm 1,9\%$ . O método foi considerado rápido, foi possível analisar até 400 amostras por um dia. A metodologia foi validada e considerada adequada para estudos farmacocinéticos e bioanalíticos em amostras de plasma contendo olanzapina.

Krebs et al. (2006) desenvolveram três métodos espectrofotométricos para determinar olanzapina pura e em formulações farmacêuticas. O primeiro foi baseado na oxidação da olanzapina com excesso de N-bromosuccinimida em meio ácido (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Os dois outros foram baseados também na oxidação da olanzapina com N-bromosuccinimida (método 2) ou Ce(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> (método 3), em presença de azul celestina. O método 1 apresentou uma banda em 532 nm, que foi utilizada para as análises quantitativas. O limite de quantificação foi de  $6,99 \text{ mg L}^{-1}$ , com a lei de Beer sendo obedecida até  $120 \text{ mg L}^{-1}$  e coeficiente de correlação 0,9998. A precisão foi considerada boa (intra-dia: 0,62% e inter-dia: 1,57%) e a exatidão foi de 100 a 101%. O segundo método resultou em uma banda em 538 nm que foi utilizada para as análises quantitativas. O limite de quantificação foi de  $0,30 \text{ mg L}^{-1}$ , com a lei de Beer sendo obedecida até  $6 \text{ mg L}^{-1}$  e coeficiente de correlação 0,9998. A precisão foi menor que 4% (intra-dia: 1,63% e inter-dia: 3,88%) com exatidão média de 96%. O terceiro método apresentou uma banda em 538 nm que foi utilizada nas análises quantitativas. O limite de quantificação foi de  $0,37 \text{ mg L}^{-1}$ , com linearidade até  $3 \text{ mg L}^{-1}$  e coeficiente de correlação 0,9993. A precisão foi menor que 5% (intra-dia: 2,83% e inter-dia: 4,07%) e exatidão variando de 94 a 96%. Os métodos foram validados e utilizados com sucesso para determinação de olanzapina em amostras farmacêuticas. Entre os resultados obtidos, os autores destacam a precisão,

sensibilidade e seletividade obtida em todos os ensaios, além da simplicidade dos procedimentos.

Mohamed (2008) determinou olanzapina em comprimidos, por dois métodos, através da cinética de oxidação da substância com  $\text{KIO}_3$  em meio ácido. O produto da oxidação da substância apresentava coloração violeta intenso, e apresenta uma banda em 537 nm. O intermediário produzido apresentou coloração instável e foi monitorado por espectrofotometria UV-Vis. O primeiro método apresentou limite de detecção de  $0,1 \text{ mg L}^{-1}$  e linearidade até  $4,0 \text{ mg L}^{-1}$ , com coeficiente de correlação de 0,998. O segundo método apresentou limite de detecção de  $0,15 \text{ mg L}^{-1}$  e linearidade até  $7,0 \text{ mg L}^{-1}$ , com coeficiente de correlação de 0,996. Ambos os métodos apresentaram boa precisão (intra-dia:  $\leq 1,3\%$  e inter-dia  $\leq 1,7\%$ ) e recuperações ( $< 99,3\%$ ). Os métodos foram validados e comparados com um método cromatográfico descrito na literatura. Segundo os autores, os métodos propostos são sensíveis, com boa precisão e exatidão, podendo ser aplicados para análise de comprimidos de olanzapina.

Revanassidappa et al. (2008) desenvolveram dois métodos espectrofotométricos para determinação de micro quantidades de olanzapina em amostras farmacêuticas. No primeiro método a olanzapina foi oxidada com excesso de ICl em meio ácido ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ), em presença de azul de timol. O produto da reação apresentou uma banda de absorção em 536 nm, que foi utilizada para análise. O método apresentou limite de quantificação de  $0,0661 \text{ mg L}^{-1}$ , com a lei de Beer sendo obedecida até  $1,6 \text{ mg L}^{-1}$  e coeficiente de correlação 0,9999. O outro método é indireto e envolve a oxidação da olanzapina com  $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$  em meio ácido em presença de leuco cristal violeta. O limite de quantificação foi de  $0,0454 \text{ mg L}^{-1}$  e lei de beer foi obedecida até  $1,4 \text{ mg L}^{-1}$ , com coeficiente de correlação 0,9999. Os dois métodos apresentaram recuperações entre 99 e 101% sendo considerados com boa exatidão. Os métodos foram bastante sensíveis e considerados eficientes na determinação de olanzapina em fórmulas farmacêuticas.

Basavaiah et al. (2008), utilizaram cromatografia líquida de alta eficiência com detecção UV em 271 nm para determinação de olanzapina em fórmulas farmacêuticas. Foi utilizado uma coluna em fase reversa, tendo como fase móvel

acetato de amônia (pH=4,5) com razão de fluxo 0,5 mL min<sup>-1</sup>. O limite de quantificação do método foi de 8 mg L<sup>-1</sup>, com linearidade até 200 mg L<sup>-1</sup> e coeficiente de correlação igual a 0,99998. A precisão foi menor que 2% (intra-dia: 0,75% e inter-dia: 1,95%), com recuperações médias de 99%. O método foi comparado com método descrito na literatura e validado. Os autores destacaram sua rapidez, seletividade, precisão e exatidão para determinação de olanzapina nas amostras em que foram testadas.

Basavaiah et al. (2009), propuseram dois métodos baseados em titulação em meio não aquoso para determinar olanzapina em amostras farmacêuticas. O processo ocorreu titulando a olanzapina com HClO<sub>4</sub> em meio ácido (CH<sub>3</sub>COOH). No primeiro método o ponto final foi indicado por detecção potenciométrica e o segundo foi utilizado o indicador cristal violeta. O limite de quantificação encontrado, nos dois casos, foi de 1 mg, sendo aplicável até 15 mg. A precisão encontrada para os dois métodos foi menor que 2% com exatidão variando entre 98 e 104%. Os métodos, além de simples, precisos e exatos, foram considerados mais rápidos quando comparado aos métodos instrumentais descritos na literatura.

Basavaiah et al. (2009), determinaram olanzapina em formulações farmacêuticas, utilizando a técnica de espectrofotometria UV-Vis. O método foi baseado na reação da olanzapina com excesso de KIO<sub>3</sub> em meio ácido (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), seguido pela formação de iodo que reage com azul anil, apresentando uma banda em 400 nm. O limite de quantificação obtido foi de 12 mg L<sup>-1</sup>, com a lei de Beer sendo obedecida até 120 mg L<sup>-1</sup>. A precisão foi de 3% com exatidão média de 97 a 103%. O método foi validado segundo as normas do ICH, sendo posteriormente comparado com métodos descritos na literatura, através do teste *t* e teste *F*, que comprovaram que os resultados são estatisticamente iguais.

### 1.3 - Espectrofotometria de absorção molecular UV-Vis

A técnica de espectrofotometria de absorção molecular no UV-Vis é talvez uma das mais aplicadas em todo o mundo para análises quantitativas em laboratórios químicos, clínicos e farmacêuticos (Cardoso et al., 2006, Américo et al.,

2008). Ela envolve a medida da quantidade de radiação ultravioleta ou visível absorvida pela substância em solução (Skoog et al., 2002).

Uma dada molécula em solução, ao absorver radiação, tem seus elétrons excitados do seu estado fundamental a um estado mais energético ou excitado, fenômeno conhecido como transição eletrônica. As transições que ocorrem dependem da molécula e envolvem elétrons do tipo  $\pi$ ,  $\sigma$ ,  $n$  (moléculas orgânicas),  $d$ ,  $f$  (compostos de coordenação) e transferência de carga (complexos). Além das transições eletrônicas, as moléculas sofrem ainda transições rotacionais e vibracionais (Skoog et al 2006; Harris, 2008).

A absorção da radiação por uma dada substância pode ser visualizada por um gráfico que mostra uma relação de absorbância *versus* comprimento de onda, denominado espectro de absorção. Um espectro de absorção de uma molécula na região do UV-Vis é resultado de transições eletrônicas, rotações e vibrações e representa a energia absorvida da radiação nos diversos comprimentos de onda (Skoog et al 2006; Harris, 2008).

O espectro de uma dada molécula depende de alguns fatores como os grupos presentes e os tipos de transições envolvidas. Por esta razão, é muito comum a utilização do espectro para identificação de grupos presentes em uma molécula (Silverstein et al., 1994). Outros fatores que influenciam a forma do espectro obtido são: o pH da solução, a temperatura, a natureza do solvente empregado, a concentração dos eletrólitos e dos componentes da amostra (Skoog et al., 2002)..

O princípio da técnica, para análise quantitativa, envolve a medida de transmitância de um feixe de radiação monocromática de potência  $P_0$  que atravessa uma solução contendo uma espécie absorvente de espessura  $b$  e de concentração  $c$ . O feixe, ao passar pela solução, tem sua potência reduzida a  $P$  devido à absorção parcial pelas partículas do meio. A fração da potência do feixe de radiação emergente  $P$  com relação ao feixe de radiação incidente  $P_0$  é denominada de transmitância (Skoog et al., 2002).

$$T = P/P_0$$

A transmitância normalmente é dada em termos de percentual e o valor de  $T$  está sempre entre 0 e 1 (Harris, 2008). Esta relação pode ser também representada em termos de quantidade de radiação monocromática absorvida por uma dada substância que é chamada de absorbância e tem uma relação logarítmica inversa com a transmitância.

$$A = \log (P/P_0) = - \log T$$

A absorbância possui uma relação linear com a concentração  $c$  e com o caminho ótico  $b$ , percorrido pela radiação e é dada pela lei de Beer (Harris, 2008).

$$A = abc$$

O termo  $a$  da equação é uma constante de proporcionalidade, chamada absortividade, que é independente dos valores de  $b$  e  $c$  e da intensidade da radiação emitida, ela é característica de uma dada combinação de soluto e solvente, em um dado comprimento de onda, em uma determinada temperatura (Erwing, 1972).

A lei de Beer é bastante útil para na análise quantitativa, ela pode ser usada para determinar a concentração a partir das absorbâncias se a absortividade e o caminho ótico são conhecidos (Harris, 2008). Como a absorbância de uma substância de interesse é proporcional à concentração, então é possível utilizar soluções padrão de concentrações conhecidas, dentro de uma faixa, para obter a absortividade (Skoog et al., 2006).

A partir daí, se constrói uma curva de calibração de  $A$  versus  $c$ , através do método dos mínimos quadrados (Custódio, et al., 1997), e obtêm-se uma equação linear que pode ser utilizada para determinar a concentração de uma espécie em uma dada amostra (Skoog et al., 2006).

$$A = a + bc$$

onde  $a$  e  $b$  representam o intercepto e a inclinação respectivamente. A inclinação da reta, segundo a IUPAC, representa a capacidade de discriminar entre as pequenas quantidades do analito, ou seja, sua sensibilidade (Skoog et al., 2002).

Entretanto, a lei de Beer possui apresenta limitações. Em soluções concentradas ( $\geq 0,01 \text{ mol L}^{-1}$ ), devido à proximidade dos íons e moléculas, algumas propriedades se alteram, como a absorvidade, e portanto, a absorbância pode não apresentar relação linear com a concentração (Harris, 2008). No caso em que a espécie absorvente sofre dissociação no solvente, pode haver produtos que absorvam de forma diferente do analito. Esta lei é limitada somente a medidas feitas com radiação monocromática (Skoog et al., 2002).

Uma maneira de se estimar a qualidade da curva de calibração é calcular o valor do coeficiente de correlação  $r$  (Ribani et al., 2004). Este parâmetro representa até que ponto a absorbância possui relação linear com a concentração e permite estimar a qualidade da curva obtida. Quanto mais próximo este valor for de 1, maior é a precisão do conjunto de pontos experimentais e menor é a incerteza dos coeficientes de regressão  $a$  e  $b$  (Ribani et al., 2004).

O comprimento de onda utilizado para construção da curva de calibração deve ser o que corresponda à banda de maior absorção, ou seja, o de maior sensibilidade. Neste ponto, em virtude da sua forma “achatada”, as medidas são menos sensíveis às pequenas variações de leitura do instrumento de medida e, portanto, menos sujeitas a incertezas que possam levar a desvios da lei de Beer (Skoog et al., 2002; Gonçalves, 2001).

Esta técnica apresenta várias vantagens dentre as quais se destacam: facilidade no manuseio do equipamento, a boa sensibilidade ( $10^{-4}$  a  $10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ ), boa exatidão, baixo custo, rapidez, ampla aplicabilidade e seletividade de moderada a alta (Skoog et al., 2006; Gil, 2007).

#### **1.4 - Espectrofotometria derivativa**

A análise de amostras contendo mais de um princípio ativo, ou de matrizes complexas, muitas vezes não pode ser feita por espectrofotometria direta



devido à sobreposição de bandas, que podem interferir na análise de um componente de interesse. Nestes casos uma boa alternativa é a utilização de uma técnica denominada espectrofotometria derivativa.

Quando se deriva um espectro obtêm-se na verdade a inclinação da reta tangente (Figura 1.2) em cada ponto da curva (Talsky, 1994). Os espectros obtidos de cada derivação são então utilizados para análise quantitativa.

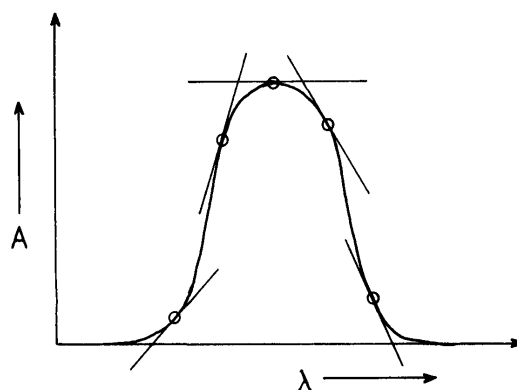


FIGURA 1.2 – Tangente de uma curva em pontos definidos

FONTE - Talsky, 1994, p.12.

O espectro derivado é obtido se a diferença de absorbância for calculada em vários pontos para um intervalo de comprimento de onda. Os máximos de absorbância do espectro de ordem zero correspondem à zero no espectro derivado de 1ª ordem (Figura 1.3) (Talsky, 1994).

Em uma banda de absorção de forma gaussiana (Figura 1.3) no espectro de ordem zero, a primeira derivada se anula no ponto referente ao máximo de absorção. Ela é positiva onde a absorção cresce e negativa onde ela diminui. Se uma dada medida for realizada em uma banda, em um comprimento de onda no qual o espectro dos outros componentes cruza o zero, então a medida será proporcional apenas a substância analisada (Karpinska, 2004).

No espectro derivado os pontos máximos e mínimos são referentes aos comprimentos de onda dos pontos de inflexão no espectro de ordem zero (Figura 1.3). A distância vertical entre estes pontos é proporcional à concentração da substância que originou o espectro de ordem zero (Talsky, 1994; Rojas et al., 2009).

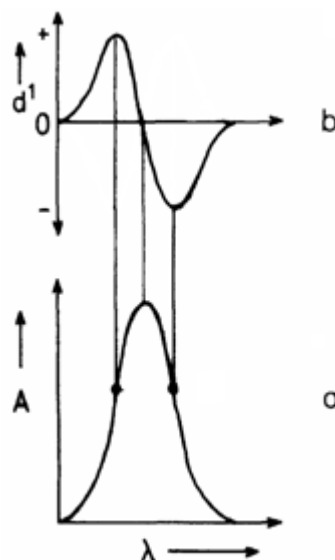


FIGURA 1.3– a) Espectro de ordem zero; b) Espectro derivado de primeira ordem  
FONTE - Talsky, 1994, p. 19.

A derivação do espectro de ordem zero produz  $(n + 1)$  novas bandas de absorção no espectro da primeira derivada e a cada nova derivação efetuada ocorre o aumento de mais uma banda (Karpinska, 2004).

Esta técnica oferece várias vantagens sobre os métodos convencionais, tais como o aparecimento de alguns detalhes espectrais que normalmente não são observados em um espectro de ordem zero, permitindo uma melhor interpretação dos dados (Talsky, 1994).

A aplicação da espectrofotometria derivativa pode provocar o aumento da seletividade do método uma vez que é possível eliminar sinais de interferentes (Mendham et al., 2002; Rojas et al., 2009). Isto é bastante útil para análise de substâncias como fármacos, em que os interferentes podem ser seus próprios excipientes (Görög, 1995).

Outra grande vantagem na aplicação deste método é o aumento da sensibilidade que quase sempre é acompanhado de uma melhoria no limite de detecção. Isto ocorre porque a diferenciação das bandas largas atua enfatizando traçados finos, de maneira que a amplitude aumenta com o aumento da ordem da derivada (Rojas et al., 2009; Rocha et al., 2004).

Em bandas do tipo gaussianas, a amplitude  $D_n$  é ( $D_n = d^n A/d\lambda$ ) é inversamente proporcional à largura de banda do espectro ( $W$ ) (Rocha et al., 2004).

$$D_n \propto 1/W^n$$

A sensibilidade em métodos derivativos não depende somente dos parâmetros instrumentais e da forma da medida do sinal, mas também das características do espectro de absorção (Rocha et al., 2004).

A principal desvantagem da técnica é que o sinal do ruído aumenta progressivamente com o aumento da ordem da derivada e  $\Delta\lambda$  (intervalo onde o cálculo da derivada é realizado), por causa do aumento da relação sinal/ruído (Sanchez et al., 1988, Aberásturi et al., 2001). Entretanto utilizando técnicas de suavização espectral é possível diminuir estes ruídos e melhorar a qualidade do espectro obtido (Savitzky et al., 1964).

O princípio pelo qual é possível a análise quantitativa está na derivação da lei de Beer, pois se deriva a absorbância em relação ao comprimento de onda ( $dA/d\lambda$ ), em função do comprimento de onda, conservando as leis da espectrofotometria clássica (Perkampus, 1992, Rojas et al., 2009). A lei de Beer na sua forma derivativa pode ser representada pela seguinte fórmula:

$$D_n = \frac{d^n A}{d\lambda^n} = \frac{d^n a}{d\lambda^n} cb$$

onde  $D$  representa a derivada,  $n$  ordem da derivada no comprimento de onda  $\lambda$ ,  $a$  a absorvidade e  $b$  o caminho ótico. A sua utilização em análise quantitativa se dá porque o sinal obtido é proporcional à concentração do analito.

A espectrofotometria derivativa é bastante utilizada para análise quantitativa, caracterização e controle de qualidade nos setores alimentício (Vidotti et al., 2004) agroindustriais, farmacêuticos (Américo et al., 2006), construção civil (Idriss, et al., 1999) e biomédico (Ansari et al., 2004).

## 1.5 - Espectrofotometria de duplo comprimento de onda

A espectrofotometria de duplo comprimento de onda é bastante útil na análise de misturas binárias em que os espectros dos componentes se sobrepõem. Nesta técnica, o sinal obtido pela espécie de interesse, na mistura, é igual à diferença de sinal obtido nos comprimentos de onda  $\lambda_2$  (com interferência) e  $\lambda_1$  (livre de interferência), de mesma absorvidade (Perkampus, 1992).

$$\Delta A = A_{\lambda_2} - A_{\lambda_1}$$

No exemplo de uma mistura de dois componentes *A* e *B* a diferença de absorvância  $\Delta A$  é proporcional à absorvância de apenas um dos componentes em um dado comprimento de onda (Figura 1.4) (Porro, 1972).

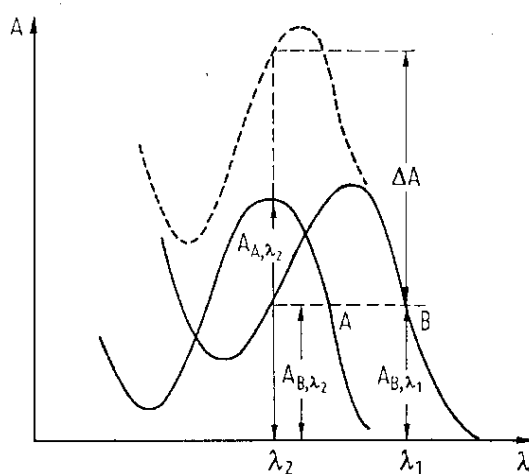


FIGURA 1.4 – Ilustração do método de duplo comprimento de onda em uma mistura binária de componentes *A* e *B*

FONTE - Perkampus, 1992, p. 82.

Para uma mistura binária, a absorvância ( $A_I$ ) no comprimento de onda  $\lambda_I$  é a absorvância do componente *A* ( $A_{I,A}$ ) somada à absorvância do componente *B* ( $A_{I,B}$ ). No comprimento de onda  $\lambda_2$  tem-se a mesma aditividade das absorvâncias dos componentes (Perkampus, 1992, Honda et al., 1984).

$$A_1 = A_{1,B} + A_{1,A}$$

$$A_2 = A_{2,A} + A_{2,B}$$

Aplicando a lei de Beer considerando o caminho óptico como sendo 1 cm têm-se:

$$A_1 = a_{1A}c_A + a_{1B}c_B$$

$$A_2 = a_{2A}c_A + a_{2B}c_B$$

onde  $a_A$  e  $a_B$  representam as absorptividades e  $c_A$  e  $c_B$  as concentrações de ambos os componentes na mistura. Utilizando o princípio do método de duplo comprimento de onda obtêm-se:

$$\Delta A = A_{\lambda_2} - A_{\lambda_1} = (a_{2A} - a_{1A})c_A + (a_{2B} - a_{1B})c_B$$

A absorptividades nos comprimentos de onda  $\lambda_2$  e  $\lambda_1$  para o componente  $B$  são iguais (Figura 1.4), então o segundo termo da equação é igual a zero e a equação ficará:

$$\Delta A = (a_{2A} - a_{1A})c_A$$

Como o componente  $A$  não absorve no comprimento de onda  $\lambda_1$  (Figura 1.4),  $\Delta A$  estará somente em função do componente  $A$  em  $\lambda_2$ , e a interferência do componente  $B$  será eliminada.

$$\Delta A = a_{2A} c_A = A_{2,A}$$

Esta técnica também pode ser aplicada no caso de soluções que apresentem turbidez referente a partículas em suspensão (Figura 1.5). Estas partículas causam um aumento do sinal do analito, uma absorção aparente, em função do espalhamento da radiação. No exemplo da Figura 1.5, no comprimento de onda  $\lambda_1$ , o sinal observado ( $A_{\lambda_1}$ ) é referente apenas ao espalhamento das partículas em suspensão

e no comprimento de onda  $\lambda_2$  o sinal observado ( $A_{\lambda_2}$ ) é referente ao sinal do analito ( $A_{W,\lambda_2}$ ) mais o sinal do espalhamento da radiação ( $A_{S,\lambda_2}$ ) (Perkampus, 1992, Honda et al., 1984). Aplicando o princípio do método de duplo comprimento de onda, têm-se:

$$\Delta A = (A_{S,\lambda_2} + A_{W,\lambda_2}) - A_{\lambda_1}$$

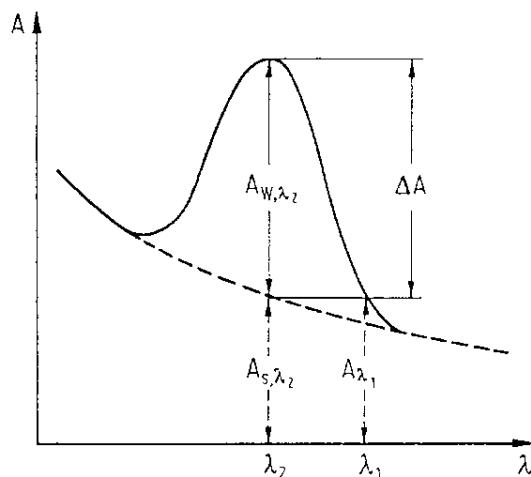


FIGURA 1.5 – Ilustração do método de duplo comprimento de onda em soluções que apresentam interferência por partículas suspensas

FONTE - Perkampus, 1992, p. 85.

Como as absorvidades do analito e do material espalhado nos comprimentos de onda  $\lambda_2$  ( $A_{S,\lambda_2}$ ) e  $\lambda_1$  ( $A_{\lambda_1}$ ) são iguais (Figura 1.5) equação é reduzida a  $\Delta A = A_{W,\lambda_2}$  que representa apenas o sinal da substância de interesse.

## 1.6 - Validação analítica

Uma dada metodologia analítica proposta deve estar adequada ao propósito estabelecido e, dentro de certos limites, deve fornecer resultados confiáveis, mesmo quando utilizada por diferentes analistas, equipamentos e/ou laboratórios (Sharp, 2000; Leite, 2002). O processo que garante que uma dada metodologia forneça resultados verdadeiros, de acordo com os fins desejados, é denominado de validação analítica (ANVISA, 2003).

A validação de uma metodologia analítica representa uma prova documentada de resultados que indicam que o método é seguro dentro dos limites estabelecidos para uma dada aplicação (Gil, 2007; USP, 2002). O emprego da validação analítica é bastante útil para controle de qualidade e essencial para a indústria farmacêutica (Gil, 2007).

O processo de validação é contínuo e envolve várias etapas que vão desde o planejamento da estratégia analítica e segue durante todo o seu desenvolvimento e transferência (Ribani et al., 2004). Segundo Leite (2002), “*não validar é ter apenas um número e não um resultado*”.

Para a validação de uma metodologia a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2003) recomenda a utilização de substâncias de referência oficializadas pela Farmacopéia Brasileira ou, na ausência destas, por outros códigos autorizados pela legislação vigente. Caso não exista nenhuma dessas substâncias, admite-se o uso de padrões de trabalho, que tenham identidade e o teor devidamente comprovados.

Segundo as normas da ANVISA (2003) a validação deve garantir, através de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas assegurando a confiabilidade dos resultados. Para isso, deve apresentar especificidade, linearidade, intervalo, precisão, sensibilidade, limite de quantificação e exatidão adequados à análise.

### **1.6.1 - Seletividade**

A seletividade é o primeiro passo no desenvolvimento e validação de um método instrumental e é definida como a capacidade que um método tem de avaliar inequivocamente um determinado composto em uma mistura complexa (Gil, 2007).

A seletividade avalia o quanto o método é indiferente à presença de espécies (outro principio ativo, impurezas, produtos de degradação, excipientes) contidas na matriz da amostra e que podem interferir na determinação do analito (Leite, 2002). Se o método for pouco seletivo, a linearidade, a precisão e a exatidão estarão comprometidas (Ribani et al., 2004; Gil, 2007).

Muitas vezes o termo seletividade é utilizado como sinônimo de especificidade o que é um grande erro. Um método é específico quando produz resposta para uma única substância de interesse e é seletivo quando produz resposta para vários compostos químicos com características em comum (Ribani et al., 2004).

### 1.6.2 - Linearidade

A linearidade é a capacidade de uma metodologia analítica de demonstrar que os resultados obtidos ( $y$ ) são diretamente proporcionais à concentração do analito ( $x$ ) na amostra (ANVISA, 2003) em uma dada faixa de exame (Ribani et al., 2004).

A linearidade de um método pode ser avaliada pela construção de curvas de calibração obtidas por regressão linear através do método dos mínimos quadrados que fornece uma equação no formato  $y = a + bx$ , (Custódio, et al., 1997). Os coeficientes  $a$  e  $b$  representam o intercepto e a inclinação, respectivamente, e além deles, a partir dos pontos experimentais, é possível se obter o coeficiente de correlação,  $r$ . Através deste coeficiente estimar-se a qualidade da curva obtida, que será melhor quanto mais próximo este valor for de 1,0 (Ribani et al., 2004) . A ANVISA (2003) estabelece que o valor mínimo para este coeficiente deve ser igual a 0,99 .

Segundo o ICH (International Conference on Harmonisation, 2005), deve-se utilizar o mínimo de 5 concentrações para o ensaio de linearidade, e todos os ensaios feitos em triplicata.

### 1.6.3 - Intervalo

O intervalo compreende a faixa entre os limites de quantificação e linearidade em um método. Esta região é onde o método se mostra satisfatório do ponto de vista da exatidão, precisão e, principalmente, da linearidade e depende da aplicação pretendida do método (ANVISA, 2003). Para testes de quantificação a USP



(2002) e a ANVISA (2003) recomendam que seja avaliado entre 80 e 120% da concentração de teste.

#### 1.6.4 - Limite de detecção

O limite de detecção (LOD) é a menor quantidade de analito presente em uma amostra que pode ser detectado, mas não necessariamente quantificada, sob as mais diversas condições experimentais estabelecidas (Leite, 2002). Uma das formas mais simples e eficazes de se calcular o limite de detecção é baseado nos parâmetros da curva de calibração através da equação:

$$LOD = 3,3 \times \frac{s}{b},$$

onde  $s$  é a estimativa do desvio padrão do sinal do branco e  $b$  é a inclinação ou coeficiente angular da curva de calibração.

#### 1.6.5 - Limite de quantificação

Segundo a ANVISA (2003), o limite de quantificação (LOQ) é a menor quantidade de analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis, sob as condições experimentais estabelecidas. Este parâmetro é bastante utilizado em ensaios quantitativos de impurezas, produtos de degradação em fármacos e produtos de degradação em fórmulas farmacêuticas e é expresso em termos de concentração do analito na amostra (ANVISA, 2003).

Semelhantemente ao LOQ, o LOD pode ser calculado baseado nos parâmetros da curva de calibração através da equação:

$$LOD = 10 \times \frac{s}{b},$$

onde  $s$  é a estimativa do desvio padrão do sinal do branco e  $b$  é a inclinação ou coeficiente angular da curva de calibração.

### 1.6.6 – Robustez

É a capacidade que um método tem de não sofrer alteração em decorrência de pequenas variações do sistema. A robustez de um método é um indicativo de sua confiança durante o uso em rotina (ANVISA, 2003).

No caso de métodos espectrofotométricos a robustez é avaliada quanto a variação do pH, temperatura e diferentes marcas de solventes (ANVISA, 2003). Em trabalhos onde ocorre mudança de fornecedores, marcas ou equipamentos durante o processo de validação dos métodos, sem que haja alteração significativa nos resultados, pode se afirmar que o método possui robustez intrínseca, porque manteve sua resposta em meio a mudanças no ambiente de análise (Ribani et al., 2004).

### 1.6.7 – Exatidão

A exatidão de um dado método analítico representa o grau de concordância entre resultados individuais encontrados e um valor aceito como referência (ANVISA, 2003). Um método com boa exatidão sugere que não há erros sistemáticos inerentes ao processo (Mendhan et al., 2002).

Ela pode ser determinada pelo teste de adição e recuperação de padrão e é expressa como porcentagem de recuperação da quantidade do analito adicionado à amostra, ou como a diferença percentual entre as médias e o valor verdadeiro aceito, acrescida dos intervalos de confiança (Ribani et al., 2004).

A exatidão do método deve ser determinada após estabelecida a linearidade, do intervalo e da especificidade. O teste é feito com no mínimo nove determinações contemplando o intervalo linear do procedimento, ou seja, três concentrações, baixa, média e alta, com três réplicas cada. A exatidão é expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente:

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

### 1.6.8 - Precisão

A precisão de um método representa o grau de repetitividade entre resultados das análises individuais, quando o procedimento é aplicado numa mesma amostra homogênea, diversas vezes e nas mesmas condições de ensaio (ANVISA, 2003). A precisão mostra o grau de dispersão dos resultados individuais obtidos sob determinadas condições de análise (Mendhan et al., 2002).

A precisão pode ser avaliada de diversas formas, entretanto a ANVISA (2003) recomenda que seja feita em termos de desvio padrão relativo, sendo que o maior valor aceitável é de 5,0 %.

$$DPR = \frac{\text{Desvio Padrão}}{\text{Concentração média determinada}} \times 100$$

A precisão em validação analítica é dada em três níveis: repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade.

#### 1.6.8.1 - Repetibilidade

Também conhecida por precisão intra-dia ou intra-análise. Ela representa a diferença máxima aceitável entre duas repetições e representa a concordância entre os resultados independentes dentro de um curto período de tempo, com o mesmo analista, mesmo método e mesma instrumentação (ANVISA, 2003).

A ICH (2005) e a ANVISA (2003) recomendam um mínimo de nove determinações, cobrindo todo o intervalo especificado (em três níveis de concentrações diferentes, em triplicata) ou no mínimo seis determinações a 100% da concentração de trabalho.

### **1.6.8.2 - Precisão intermediária ou inter-análise**

É a concordância entre os resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes, com analistas diferentes e/ou instrumentos diferentes (ANVISA, 2003).

Este ensaio é tido como o mais representativo da variabilidade dos resultados em um único laboratório, e tem como objetivo verificar se no mesmo laboratório o método fornecerá os mesmos resultados (Ribani et al., 2004).

As variáveis estudadas, conforme as circunstâncias em que o método será utilizado, podem ser dias, analista, ou equipamento, não sendo necessária a avaliação destas variáveis de forma independente (ICH, 2005). A ANVISA (2003) recomenda um mínimo de dois dias diferentes com analistas diferentes.

O número mínimo de ensaios recomendados para precisão intermediária é igual ao da repetibilidade (ANVISA, 2003).

### **1.6.8.3 - Reprodutibilidade ou precisão inter-laboratorial**

Representa a concordância entre os resultados obtidos em laboratórios diferentes, como em estudos colaborativos, geralmente aplicados à padronização de metodologia analítica. Este tipo de ensaio deve ser feito quando, por exemplo, se pretende fazer a inclusão de uma dada metodologia em uma farmacopéia (ANVISA, 2003).

É muito comum encontrar desacordo entre as metodologias quando se faz precisão inter-laboratorial, entretanto a IUPAC não recomenda tirar conclusões com menos de 5 laboratórios e recomenda que o ensaio seja realizado em pelo menos 8 laboratórios (Ribani et al., 2004).

O número mínimo de ensaios recomendados para precisão inter-laboratorial é igual ao da repetibilidade.

## **2 - OBJETIVOS**

### **2.1 - Geral**

Desenvolver métodos espectrofotométricos para quantificar olanzapina em formulações farmacêuticas e validá-los de acordo com as normas do guia da ANVISA da resolução RE nº 899 de 29 de maio de 2003.

### **2.2 - Específicos**

- ✓ Realizar o estudo do solvente;
- ✓ Verificar a robustez quanto à estabilidade, pH e marca de solvente;
- ✓ Observar o grau de interferência dos principais excipientes;
- ✓ Preparar a amostra e separar os excipientes;
- ✓ Aplicar métodos alternativos, como a espectrofotometria derivativa, método de duplo comprimento de onda;
- ✓ Determinar a linearidade dos métodos obtidos;
- ✓ Determinar LOQ e LOD;
- ✓ Verificar a exatidão pelo método de adição e recuperação de padrão;
- ✓ Verificar a precisão dos métodos, tendo como variáveis, dias, analista e laboratório;
- ✓ Aplicar métodos em amostras reais e determinar o teor médio encontrado;
- ✓ Comparar os métodos com alguns já obtidos na literatura.

## 3 – PARTE EXPERIMENTAL

### 3.1 – Materiais e equipamentos

- ✓ Balança analítica (Denver Instrument, APX-200)
- ✓ Centrifuga (Sigma, 6-15)
- ✓ Espectrofotômetro de absorção molecular duplo feixe (Hitachi, U-3000)
- ✓ Espectrofotômetro de absorção molecular duplo feixe (Techcomp, UV-8500)
- ✓ Geladeira (Brastemp)
- ✓ Micropipetas de 0,5-10  $\mu$ L, 10-100  $\mu$ L e 100-1000  $\mu$ L (Brand)
- ✓ pH-metro (Tecnal, Tec-3MP)
- ✓ Banho Ultrassom (Cleanner Thournton, Marconi)
- ✓ Balões volumétricos (10, 25, 50, 100, 200 e 1000 mL)
- ✓ Bureta de 10 mL (precisão 0,025 mL)
- ✓ Pipeta graduada de 1 mL (precisão 0,05 mL)

### 3.2 – Reagentes

- ✓ Ácido clorídrico P. A. (Vetec)
- ✓ Álcool butílico terciário P. A. 99,0% (Dinâmica)
- ✓ Butanol P. A. 99,0% (Reagen)
- ✓ Etanol P. A. 95,0% (Vetec), 99,5% (Nuclear e Synth)
- ✓ Hidróxido de sódio P. A. (Vetec)
- ✓ Isopropanol P. A. 99,5% (Synth, Vetec e Reagen)
- ✓ Metanol P. A. 99,8% (Vetec)
- ✓ Propanol P. A. 99,0% (Vetec)
- ✓ Tampões pH 4,0 e 7,0 (Synth)

### 3.3 – Matéria prima

- ✓ Olanzapina de grau farmacêutico 100,7% (Gamma<sup>®</sup>, Lote: 050201, validade: 02/2008)

### 3.4 – Excipientes

- ✓ Dióxido de silício coloidal (Pharma<sup>®</sup>, Lote: 3157011614, validade: 16/01/2009)
- ✓ Croscarmelose sódica (Mingai<sup>®</sup>, Lote: 60617, validade: 23/06/2009)
- ✓ Celulose microcristalina 102 (Mingai<sup>®</sup>, Lote: 60938, validade: 24/09/2009)
- ✓ Estearato de magnésio (Facispa<sup>®</sup>, Lote: MGU560309, validade: 24/07/2008)
- ✓ Lactose anidra (Pharma<sup>®</sup>, Lote: 15065, validade: 10/08)

### 3.5 – Amostras

- ✓ Olanzapina na forma de comprimido revestido, Zyprexa<sup>®</sup>, a 10 mg (Eli Lilly and Company, Lote: A498769, validade: 03/2011)
- ✓ Olanzapina, a 10 mg, na forma de comprimido não revestido, produzida em uma planta piloto pelo Núcleo de Tecnologia Farmacêutica da Universidade Federal do Piauí (NTF/UFPI).

### 3.6 – Soluções

#### 3.6.1 – Soluções estoque de olanzapina

- ✓ **Soluções estoque de olanzapina a 100 mg L<sup>-1</sup>:** dissolveu-se 0,0100 g de olanzapina em metanol, etanol, propanol, isopropanol, butanol ou álcool butílico terciário e transferiu-se quantitativamente para um balão volumétrico de 100 mL, completando-se em seguida o volume.
- ✓ **Soluções estoque de olanzapina a 200 mg L<sup>-1</sup>:** dissolveu-se 0,0100 g de olanzapina em etanol ou isopropanol e transferiu-se quantitativamente para um

balão volumétrico de 50 mL, completando-se em seguida o volume com os respectivos solventes.

- ✓ **Soluções estoque de olanzapina a 250 mg L<sup>-1</sup>:** dissolveu-se 0,0125 g de olanzapina em etanol ou isopropanol e transferiu-se quantitativamente para um balão volumétrico de 50 mL, completando-se em seguida o volume com os respectivos solventes.
- ✓ **Soluções estoque de olanzapina a 500 mg L<sup>-1</sup>:** dissolveu-se 0,0250 g de olanzapina em etanol ou isopropanol e transferiu-se quantitativamente para um balão volumétrico de 50 mL, completando-se em seguida o volume com os respectivos solventes.

### 3.6.2 – Solução ácida e solução básica

- ✓ **Solução de ácido clorídrico (0,01 mol L<sup>-1</sup>):** mediu-se 0,8 mL de ácido clorídrico concentrado, em pipeta graduada, e transferiu-se para um balão volumétrico de 1000 mL contendo aproximadamente 500 mL de água, em banho de gelo, após resfriamento completou-se o volume até a marca de 1000 mL.
- ✓ **Solução de hidróxido de sódio (0,01 mol L<sup>-1</sup>):** dissolveu-se 0,4 g de hidróxido de sódio em um béquer em banho de gelo e transferiu-se quantitativamente para um balão volumétricos de 1000 mL completando-se em seguida o volume com água.

### 3.6.3 – Suspensões dos excipientes

- ✓ **Suspensão de croscarmelose sódica a 375,0 mg L<sup>-1</sup>:** pesou-se, em um béquer, 0,0375 g de croscarmelose sódica e adicionou-se etanol ou isopropanol e transferiu-se quantitativamente para um balão volumétrico de 100 mL, completando-se em seguida o volume com os respectivos solventes.
- ✓ **Suspensão de celulose microcristalina 102 a 231,5 mg L<sup>-1</sup>:** pesou-se, em um béquer, 0,0463 g de celulose microcristalina em etanol ou isopropanol e transferiu-se quantitativamente para um balão volumétrico de 200 mL, completando-se em seguida o volume com os respectivos solventes.



- ✓ **Suspensão de estearato de magnésio a 250,0 mg L<sup>-1</sup>:** pesou-se, em um béquer, 0,0250 g de estearato de magnésio em etanol ou isopropanol e transferiu-se quantitativamente para um balão volumétrico de 100 mL, completando-se em seguida o volume com os respectivos solventes.
- ✓ **Suspensão de dióxido de silício coloidal a 250 mg L<sup>-1</sup>:** pesou-se, em um béquer, 250 mg de dióxido de silício coloidal em etanol ou isopropanol e transferiu-se quantitativamente para um balão volumétrico de 100 mL, completando-se em seguida o volume com os respectivos solventes.
- ✓ **Suspensão de lactose anidra a 312,0 mg L<sup>-1</sup>:** pesou-se, em um béquer, 0,0312 g de lactose anidra em etanol ou isopropanol e transferiu-se quantitativamente para um balão volumétrico de 100 mL, completando-se em seguida o volume com os respectivos solventes.

### 3.7– Preparo das amostras

#### 3.7.1 – Olanzapina produzida na planta piloto

Pesou-se de 5 a 7 comprimidos, triturou-se e homogeneizou-se. Em seguida, do material triturado, pesou-se cerca de 0,1235 g de amostra e dissolveu-se em etanol ou isopropanol, sendo posteriormente transferido quantitativamente para um balão de 50 mL obtendo uma concentração final de olanzapina a 100 mg L<sup>-1</sup>. A solução preparada foi mantida protegida da luz, à temperatura ambiente, por 30 minutos até decantação de todos os excipientes, sendo em seguida o sobrenadante separado do material precipitado e reservado para análise. Todos os espectros foram obtidos a partir das soluções preparadas à temperatura ambiente.

### **3.7.2 – Comprimido Zyprexa®**

#### **3.7.2.1 - Procedimento 1**

Pesou-se de 5 a 7 comprimidos, triturou-se e homogeneizou-se. Do material triturado, pesou-se cerca de 0,2121 g de amostra e dissolveu-se em etanol ou isopropanol, sendo posteriormente transferido quantitativamente para um balão de 50 mL obtendo uma concentração final de olanzapina a 100 mg L<sup>-1</sup>. A solução preparada foi mantida protegida da luz, à temperatura ambiente, por 30 minutos até decantação de todos os excipientes, sendo em seguida o sobrenadante separado do material precipitado e reservado para análise.

#### **3.7.2.2 - Procedimento 2**

A solução preparada no procedimento 1 foi imersa em banho ultrasom por cerca de 15 a 20 minutos e em seguida mantida protegida da luz, à temperatura ambiente, por 30 minutos até decantação de todos os excipientes. Por fim separou-se o sobrenadante do material precipitado para análise.

#### **3.7.2.3 - Procedimento 3**

A solução preparada no procedimento 1 foi filtrada com papel de filtro e/ou lã de vidro sendo em seguida mantida protegida da luz, à temperatura ambiente. O filtrado separado foi utilizado para análise.

#### **3.7.2.4 - Procedimento 4**

Pesou-se de 5 a 7 comprimidos e colocou-se em um tubo de ensaio, os quais foram imersos em nitrogênio líquido por um período de 20 a 30 minutos, sendo em seguida triturados em almofariz e homogeneizados. Do material triturado pesou-se cerca de 0,2121 g, dissolveu-se em etanol ou isopropanol e transferiu-se

quantitativamente para um balão volumétrico de 50 mL obtendo uma concentração final de olanzapina a  $100 \text{ mg L}^{-1}$ . Esta solução foi então centrifugada por um período de 30 minutos a 2.500 rpm e o sobrenadante foi separado e mantido em frasco âmbar sob temperatura aproximada de  $4,0 \text{ }^{\circ}\text{C}$ . Todos os espectros foram obtidos a partir das soluções preparadas à temperatura ambiente.

### **3.8 – Otimização do método**

#### **3.8.1 – Parâmetros do equipamento**

##### **Espectrofotômetro feixe duplo HITACHI-U3000**

- ✓ Intervalo de varredura: 190 a 400 nm
- ✓ Velocidade de varredura:  $300 \text{ nm min}^{-1}$
- ✓ Intervalo de leitura: 0,5 nm
- ✓ Abertura de fenda: 2,0 nm
- ✓ Lâmpada: deutério
- ✓ Linha de base: system
- ✓ Cubetas de quartzo com 1,0 cm de caminho ótico

##### **Espectrofotômetro feixe duplo Techcomp-UV8500**

- ✓ Intervalo de varredura: 190 a 400 nm
- ✓ Velocidade de varredura: 60 a  $3.200 \text{ nm min}^{-1}$  (variável durante a obtenção do espectro)
- ✓ Abertura de fenda:  $<2,0 \text{ nm}$
- ✓ Lâmpada: deutério
- ✓ Cubetas de quartzo com 1,0 cm de caminho ótico

### 3.8.2 – Estudo do solvente

De cada solução estoque de olanzapina preparada com metanol, etanol, propanol, isopropanol, butanol ou álcool butílico terciário, a  $100 \text{ mg L}^{-1}$ , mediu-se com bureta uma alíquota de 1 mL e colocou-se em um balão volumétrico de 10 mL completando-se em seguida o volume, obtendo uma concentração final de  $10 \text{ mg L}^{-1}$ . Para o branco foi utilizado apenas o solvente.

Os melhores resultados foram obtidos quando se utilizou como solvente, etanol ou isopropanol portanto os demais experimentos foram realizados utilizando apenas estes dois solventes.

### 3.8.3 – Efeito da adição água no espectro de absorção

Da cada solução estoque de olanzapina preparada em etanol ou isopropanol a  $100 \text{ mg L}^{-1}$ , mediu-se com bureta alíquotas de 2,5 mL e colocou-se em três balões volumétricos de 25 mL. Em seguida adicionou-se em cada balão volumes de solvente e água obtendo as seguintes concentrações: 75%, 50% e 25% (v/v). Os espectros obtidos foram comparados com o espectro de uma solução de olanzapina de concentração igual, porém sem adição de água.

### 3.8.4 – Estabilidade das soluções

Soluções estoque de olanzapina a  $100 \text{ mg L}^{-1}$  em etanol ou isopropanol foram distribuídas em três frascos de mesmo volume, sendo que um dos frascos era incolor e os demais âmbar. A solução colocada no frasco incolor foi deixada exposta à luz e as demais foram envolvidas em papel alumínio. Destas duas soluções protegidas da luz, uma foi mantida à temperatura ambiente de  $25,0 \pm 5,0 \text{ }^\circ\text{C}$  e a outra refrigerada a temperatura de  $4,0 \pm 3,0 \text{ }^\circ\text{C}$ . Destas soluções estoque, mediu-se com bureta alíquotas de 1 mL e colocou-se em balões de 10 mL completando-se em seguida o volume com solvente.

Os espectros foram obtidos diariamente por um período de 10 dias e depois a cada 5 dias, até completar 30 dias. Os resultados obtidos foram avaliados pela análise de variância (ANOVA,  $p=0,05$ ) no comprimento de onda de máxima absorção ( $\lambda_{\max}$ ) da banda estudada e de mais 20 pontos experimentais localizados ao redor do  $\lambda_{\max}$ .

### 3.8.5 – Efeito do pH sobre o espectro de absorção

Para os dois solventes, mediu-se com bureta 1 mL de soluções de olanzapina a  $250 \text{ mg L}^{-1}$  e colocou-se em 10 balões de 25 mL. Em seguida, para obtenção do pH ácido, adicionou-se em 5 balões, utilizando a micropipeta, volumes que variaram de 10 a  $1000 \text{ }\mu\text{L}$  de soluções de HCl a  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$  e 10 mL de água destilada medidos com bureta, completando-se em seguida o volume com solvente. Para ajuste do pH básico, realizou-se o mesmo processo substituindo HCl por NaOH.

Calibrou-se o pH-metro com tampões de pH 4,0 e 7,0. Antes de cada varredura mediu-se o pH das soluções. Os resultados obtidos foram avaliados pela análise de variância (ANOVA,  $p=0,05$ ) no comprimento de onda de máxima absorção da banda estudada e de mais 20 pontos experimentais localizados ao redor do  $\lambda_{\max}$ .

### 3.8.6 – Efeito da marca do solvente

Retirou-se uma alíquota de 1 mL da solução de olanzapina a  $100 \text{ mg L}^{-1}$  preparadas com três diferentes marcas para etanol (Vetec, Nuclear e Synth) ou isopropanol (Vetec, Reagen e Synth) e colocou-se em balões de 10 mL, obtendo concentrações finais de  $10 \text{ mg L}^{-1}$ . As leituras foram realizadas à temperatura ambiente e os resultados obtidos foram avaliados pela análise de variância (ANOVA,  $p=0,05$ ) no comprimento de onda de máxima absorção da banda estudada e de mais 20 pontos experimentais localizados ao redor do  $\lambda_{\max}$ .

### 3.8.7 – Estudo dos excipientes (seletividade)

As concentrações das suspensões dos excipientes estudados foram proporcionais às quantidades contida em um comprimido de olanzapina a 10 mg. Para o estudo da seletividade, mediu-se com bureta alíquotas de 1 mL das suspensões de croscarmelose sódica ( $375,0 \text{ mg L}^{-1}$ ), estearato de magnésio ( $250,0 \text{ mg L}^{-1}$ ) ou dióxido de silício coloidal a ( $250,0 \text{ mg L}^{-1}$ ) em etanol ou isopropanol, e colocou-se em balões de 10 mL e completou-se o volume obtendo concentrações de  $3,75 \text{ mg L}^{-1}$ ,  $2,5 \text{ mg L}^{-1}$  e a  $2,5 \text{ mg L}^{-1}$  das respectivas suspensões e realizou-se a leitura à temperatura ambiente. Realizou-se também a leitura com as suspensões de lactose anidra a  $312,0 \text{ mg L}^{-1}$  e celulose microcristalina 102 a  $231,5 \text{ mg L}^{-1}$ . A seletividade foi avaliada por comparação do perfil dos espectros dos excipientes com o espectro de uma solução de olanzapina a  $10,0 \text{ mg L}^{-1}$ .

### 3.8.8 – Seleção do comprimento de onda

#### 3.8.8.1 – Ordem zero

Alíquotas de 0,25 a 2,50 mL da solução de olanzapina a  $200 \text{ mg L}^{-1}$  medidas em bureta foram diluídas em balões de 10 mL obtendo concentrações que variaram de 5,0 a  $50,0 \text{ mg L}^{-1}$ . A leitura foi realizada na região de 190 a 400 nm e os espectros obtidos foram suavizados em 15 pontos experimentais.

Para a escolha dos comprimentos de adequado para análise quantitativa para os espectros de ordem zero levou em conta dois fatores: a obediência da lei de Beer e a região de transparência do solvente. Utilizando etanol como solvente as melhores bandas foram em 272,5 nm e 226,5 nm. Em isopropanol foram as bandas em 273,0 nm e 226,5 nm.

### 3.8.8.2 – Espectros derivados

Os espectros de ordem zero foram derivados com o software do próprio aparelho (UV00) para 1ª, 2ª, 3ª e 4ª ordens, sendo que para cada ordem variou-se o valor de  $\Delta\lambda$  de 1 a 10 nm. Os espectros derivados tiveram uma melhor resolução (menos ruído) e maior intensidade quando o valor de  $\Delta\lambda$  foi igual a 10.

Para a escolha do comprimento de onda nos espectros derivados levou-se em conta os seguintes fatores: a obediência da lei de Beer e aumento da sensibilidade. Para a 1ª ordem em  $\Delta\lambda = 10$  utilizou-se a banda em 296,5 nm, em etanol, e em 297,0 nm, em isopropanol. Para a 2ª derivada escolheu-se os comprimentos de onda 310,0 nm e 275,0 nm, em etanol e 310 nm e 275,5 nm, em isopropanol. No caso da 3ª ordem de derivada foram selecionados 290,5 nm e 260,5 nm, em etanol, e em 290,5 nm e 267,0, nm em isopropanol. Na 4ª ordem os comprimentos de onda utilizados foram 301,0 nm e 278,5 para etanol e 300,5 nm e 278,5 nm para isopropanol.

### 3.8.8.3 – Método de duplo comprimento de onda

Para este método foram usados dois comprimentos de onda, o de máxima absorção da olanzapina,  $\lambda_2$  (272,5 nm em etanol e 273,0 nm em isopropanol) e outro de mesma absorvidade a do comprimento de máxima absorção da olanzapina que apenas os interferentes absorviam,  $\lambda_1$  (320 nm).

A absorbância da olanzapina, livre de interferência dos excipientes foi calculada da seguinte forma:

$$\Delta A = A_{\lambda_2} - A_{\lambda_1}$$

onde:  $\Delta A$  é a absorbância da olanzapina,  $A_{\lambda_2}$  é a absorbância total (olanzapina + excipiente) e  $A_{\lambda_1}$  é a absorbância do excipiente.

### 3.8.9 – Linearidade

O estudo da linearidade foi realizado, para os dois solventes, na faixa de concentração de 5,0 a 50,0 mg L<sup>-1</sup>. A linearidade, tanto para ordem zero como para os

métodos derivados, foi avaliada nos comprimentos de onda escolhidos para análise quantitativa construindo-se uma curva de calibração utilizando o método dos mínimos quadrados, plotando-se os valores do sinal obtido no comprimento de onda adequado dos espectros em função da concentração.

No caso do método de duplo comprimento de onda, para os dois solventes, foi realizado o procedimento descrito no item 3.8.8.3 na faixa de 5,0 a 50,0 mg L<sup>-1</sup> nos espectros de ordem zero. A linearidade foi avaliada construindo-se uma curva de calibração utilizando o método dos mínimos quadrados, plotando-se os valores de  $\Delta A$  obtidos em função da concentração.

### 3.8.10 – Limites de Detecção e Quantificação

Os limites de detecção e quantificação, em ambos os solventes, foram calculados, respectivamente, pelas expressões:  $LOD = 3,3 \cdot \frac{s}{b}$ , e  $LOQ = 10 \cdot \frac{s}{b}$ , onde  $s$  é a estimativa do desvio padrão do sinal do branco e  $b$  é a inclinação ou coeficiente angular da curva de calibração. Para obtenção destes limites foram obtidos 21 espectros do branco (Ribani et al., 2004).

Para os métodos empregando as derivadas os 21 espectros do branco foram derivados para 1ª, 2ª, 3ª e 4ª derivada utilizando  $\Delta\lambda = 10$ . Para o método duplo comprimento de onda foi realizado o procedimento descrito no item 3.8.8.3 nos 21 espectros obtidos do branco.

### 3.8.11 – Exatidão

A exatidão dos métodos em etanol e isopropanol foi avaliada segundo o teste de adição e recuperação de padrão em três níveis de concentração (ANVISA, 2003). Para o comprimido Zyprexa<sup>®</sup>, transferiu-se quantitativamente cerca de 0,1061 g de comprimido para três balões volumétricos de 25 mL. Adicionou-se utilizando a bureta volumes de 2,5; 5,0 e 7,5 mL da solução padrão estoque de concentração 500 mg L<sup>-1</sup>. Após o volume completado a solução foi centrifugada por um período de 30 minutos a 2.500 rpm. Por fim, alíquotas de 1,0 mL das três soluções sobrenadantes



medidas com bureta foram transferidas para três balões de 10 mL, obtendo-se no final concentrações de 5,0; 10,0; 15,0 mg L<sup>-1</sup> do padrão e 10,0 mg L<sup>-1</sup> de olanzapina na amostra.

Para os comprimidos produzidos na planta piloto adicionou-se em três balões de 10 mL, volumes de 0,5 mL de solução sobrenadante da amostra decantada a 200 mg L<sup>-1</sup> e volumes de 0,5; 1,0 e 1,5 mL de solução padrão a 100 mg L<sup>-1</sup> utilizando a bureta, obtendo no final concentrações de 5,0; 10,0; 15,0 mg L<sup>-1</sup> do padrão e 10,0 mg L<sup>-1</sup> de olanzapina na amostra. Estes processos foram realizados em triplicata e a exatidão dos métodos foi dada em termos de porcentagem de recuperação.

### 3.8.12 – Precisão

Os ensaios de precisão, em etanol e isopropanol, foram realizados com amostras do comprimido Zyprexa<sup>®</sup> em três níveis de concentração e em triplicata, através do valor do desvio padrão relativo (DPR). As soluções estoque foram preparadas conforme o procedimento do item 3.7.2.4.

Para a precisão intra-dia, 0,5; 1,0 e 1,5 mL da solução estoque da amostra a 100 mg L<sup>-1</sup> medidos com bureta foram diluídas a 10,0 mL obtendo concentrações finais de 5,0; 10,0; 15,0 mgL<sup>-1</sup> de olanzapina.

A precisão inter-dia foi realizada em outro dia no mesmo laboratório. A precisão inter-analista foi realizada por um outro analista, em outro dia, no mesmo laboratório. Os ensaios inter-laboratoriais foram feitos no laboratório da Farmácia Escola da UFPI por um terceiro analista. Para todos os experimentos adotou-se a mesma metodologia e a concordância entre os resultados foi avaliada comparando-se os valores de DPR obtidos entre cada ensaio, em cada nível, através do teste *t* pareado e teste *F* (p=0,05).

## 4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

Atualmente a olanzapina não está descrita em nenhum compêndio oficial e, portanto, não possui nenhum método oficial para identificá-la e quantificá-la nas especialidades farmacêuticas comercializadas no mercado.

A maioria dos métodos descritos na literatura empregam equipamentos caros, reagentes tóxicos e procedimentos demasiadamente complexos e demorados que tornam os métodos pouco acessíveis e em alguns casos pouco viáveis.

A proposta deste trabalho é de desenvolver e validar métodos que sejam mais simples, baratos e acessíveis para quantificar a olanzapina em amostras comerciais na forma de comprimidos.

### 4.1 - Escolha do solvente

A escolha do solvente é um passo importante na análise espectrofotométrica, pois as características principais da banda obtida, tais como posição e intensidade, dependem intimamente do meio em que a espécie absorvente se encontra (Rouessac et al., 2007; Pavia et al., 2001). O solvente utilizado deve ter, entre outras características, a capacidade de solubilizar o analito de maneira apreciável, não oferecer risco à saúde do analista e apresentar transparência na região espectral onde a análise está sendo realizada (Owen, 2000).

A molécula de olanzapina é insolúvel em água, mas em meio ácido apresenta boa solubilidade devido à uma reação ácido-base entre a molécula e o meio (Firdous et al., 2005; Krebs et al. 2006). Ela também é solúvel em alcoóis através da formação de ligações de hidrogênio do tipo O-H...N, N-H...O e C-H...O (Wawrzycka-Gorczyca et al., 2004; Wawrzycka-Gorczyca et al., 2007).

Firdous et al. (2005) testou diferentes tipos de solventes para solubilizar a olanzapina, tais como: benzeno, hexano, acetona, clorofórmio, metanol, etanol e isopropanol. Segundo ele, os solventes que melhor solubilizaram a olanzapina foram metanol e etanol, utilizando posteriormente apenas o metanol devido sua maior estabilidade na região do UV. A grande maioria dos trabalhos descritos na literatura

para análise de olanzapina utiliza metanol como solvente (Firdous et al., 2005; Saracino et al., 2006; Raggi et al., 2000; Nirogui, et al., 2006, Rao et al., 2008; Sabionni et al., 2004). Alguns autores, no entanto, utilizam soluções diluídas de  $H_2SO_4$  para solubilizar a substância e auxiliar a ação de agentes oxidantes sobre a molécula (Krebs et al. 2006; Jasińska et al., 2003; Mohamed et al., 2008).

Neste trabalho optou-se por estudar, como solventes, os seguintes alcoóis: metanol, etanol, propanol, isopropanol, butanol e álcool butílico terciário, levando em conta aspectos como solubilidade, toxicidade e absorção na região do UV.

Dos solventes testados, todos se mostraram eficientes para solubilizar a olanzapina, porém, observou-se que, metanol, etanol, propanol, isopropanol solubilizaram a molécula com maior facilidade do que butanol e álcool butílico terciário. A Figura 4.1 mostra o espectros das soluções diluídas  $10\text{ mg L}^{-1}$  em cada solvente estudado, nota-se, que nos solventes metanol, etanol e propanol aparecem três bandas de absorção enquanto que em isopropanol, butanol e álcool butílico terciário aparecem apenas duas.

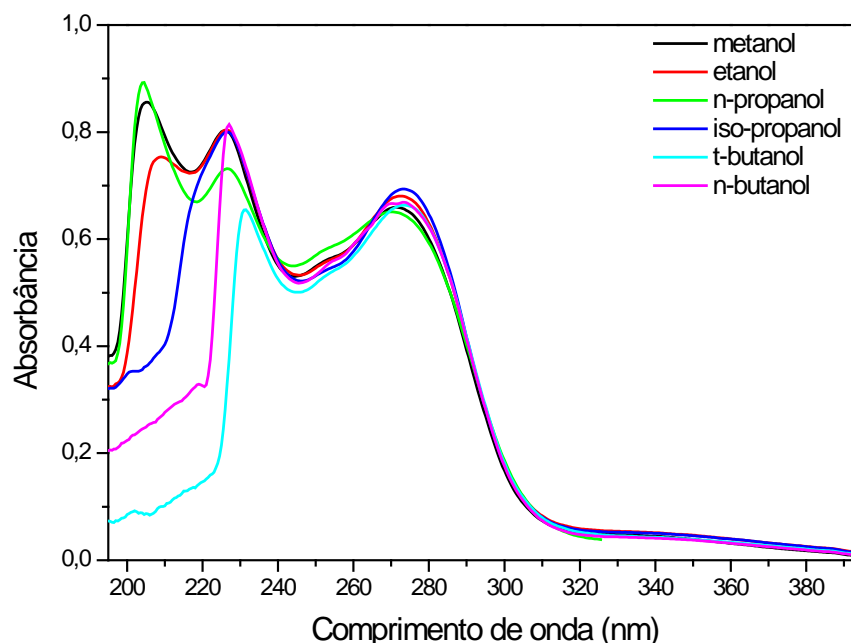


FIGURA 4.1 – Espectro de olanzapina a  $10\text{ mg L}^{-1}$  em diversos solventes

Os espectros de olanzapina mostram bandas de absorção nas regiões entre 270 e 280 nm, 220 e 230 nm e abaixo de 210 nm. Estas bandas são resultados de

transições do tipo  $n \rightarrow \pi^*$  e  $\pi \rightarrow \pi^*$  que ocorrem na região de 200 a 700 nm e são características de moléculas orgânicas (Kemp, 1991).

O solvente metanol foi utilizado para um teste comparativo, uma vez que Firdous et al. (2005) e Raggi et al. (2000) obtiveram bons resultados na análise de olanzapina na região do UV utilizando o mesmo como solvente. Entretanto este solvente foi descartado de uso devido a sua toxicidade.

Utilizando os solventes de quatro átomos de carbono (butanol e álcool butílico terciário) observou-se que as soluções obtidas apresentavam certa viscosidade o que prejudicava as etapas de diluição e, portanto, posteriormente foram descartados para uso.

As bandas produzidas pelo espectro de olanzapina em isopropanol foram as que tiveram maior intensidade nas regiões citadas. O espectro de olanzapina em propanol apresentou-se bastante similar ao espectro de olanzapina em etanol, no entanto com bandas de menor intensidade, portanto optou-se não utilizar propanol para análise espectrofotométrica.

Em função destes aspectos, os solventes escolhidos para o estudo quantitativo de olanzapina foram etanol e isopropanol por apresentarem as melhores características para uso como solvente espectrofotométrico e menor toxicidade.

#### **4.2 - Escolha do comprimento de onda para análise quantitativa**

O comprimento de onda escolhido para análise quantitativa deve ser o que corresponda à banda de maior absorção, ou seja, o de maior sensibilidade. Neste ponto, em virtude da sua forma “achatada”, as medidas são menos sensíveis às pequenas variações de leitura do instrumento de medida e, portanto, menos sujeitas a incertezas que possam levar a desvios da lei de Beer (Skoog et al., 2002).

Para escolha dos comprimentos de onda a serem estudados levou-se em conta dois fatores importantes: a obediência da lei de Beer, ou seja, a maior concentração em que o referido analito tem uma relação linear com a absorbância e a região de transparência do solvente (Skoog et al., 2002; Owen, 2000). Este estudo foi realizado na faixa de concentração de 5,0 a 50,0 mg L<sup>-1</sup>.

Em etanol, nas menores concentrações, o espectro de absorção no UV (Figura 4.2) possui três bandas bem definidas (272,5 nm; 226,5 nm; 208,5 nm) que em princípio podem ser usadas para análise quantitativa. No entanto, com o aumento da concentração, a banda a 208,5 nm sobrepõe à banda em 226,5 nm resultando na junção das duas bandas.

Na Figura 4.3 é possível se observar que em 208,5 nm a absorvância possui uma relação linear com a concentração somente até a concentração de cerca de 30,0 mg L<sup>-1</sup>, perdendo a linearidade em concentrações maiores que este valor, caracterizando um desvio real da lei de Beer (Skoog et al., 2002).

Outro fator a ser destacado é que o comprimento de onda mínimo recomendado para se trabalhar com etanol como solvente na região do UV é 210,0 nm, pois abaixo deste o solvente pode apresentar absorção e interferir no sinal da espécie absorvente. Portanto, em função destes fatores, optou-se por não estudar esta banda (Silverstein et al., 1994; Gonçalves, 2001).

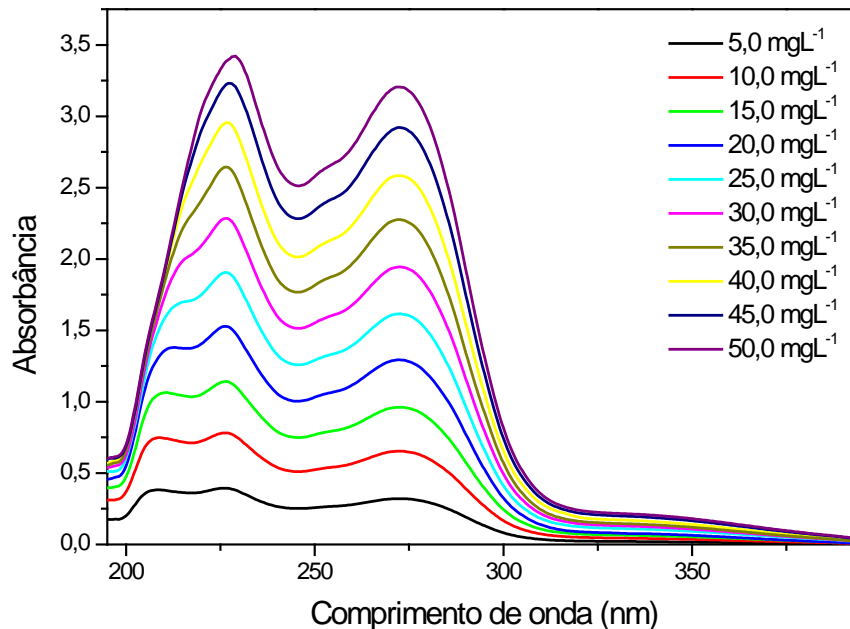


FIGURA 4.2 – Espectro de olanzapina em etanol em concentrações crescentes

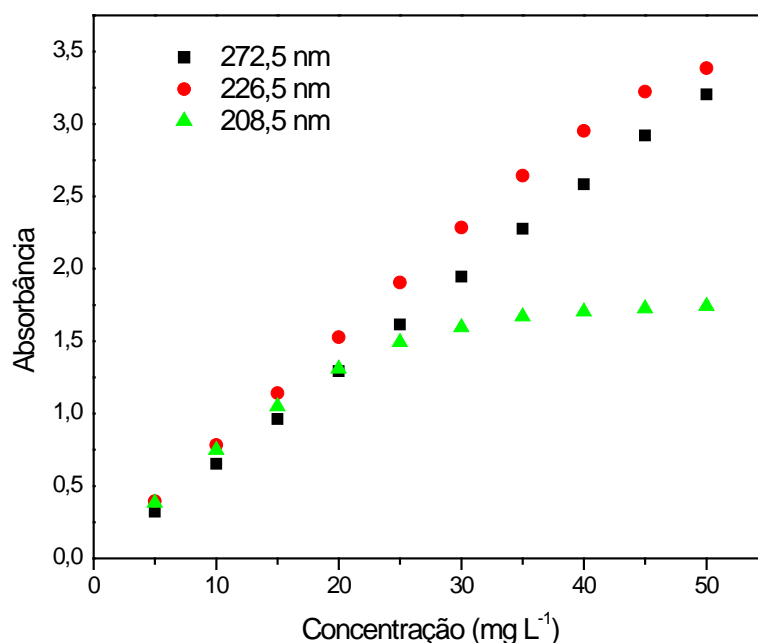


FIGURA 4.3 – Linearidade da olanzapina em etanol com o aumento da concentração

Para as demais bandas do espectro de olanzapina em etanol, foi observado a obediência a lei de Beer (Figura 4.3) até 50,0 mg L<sup>-1</sup> em 272,5 nm e até 45 mg L<sup>-1</sup> para a banda em 226,5 nm. Estas duas bandas foram escolhidas para as análises quantitativas.

Utilizando isopropanol como solvente (Figura 4.4) apenas duas bandas são observadas, uma em 273,0 nm e outra em 226,5 nm. Nota-se que ambas as bandas, apresentam uma boa relação linear entre absorbância e concentração, o que é melhor visualizado através do gráfico da Figura 4.5.

Os espectros de olanzapina na concentração de 50,0 mg L<sup>-1</sup> em ambos os solventes começaram a apresentar um leve ruído nos seus picos máximos de absorção devido à limitação do aparelho. Porém, este problema foi contornado através da suavização de 15 pontos espectrais (Owen, 2000; Savitzky et al., 1964) com o software do próprio aparelho melhorando a qualidade dos espectros obtidos.

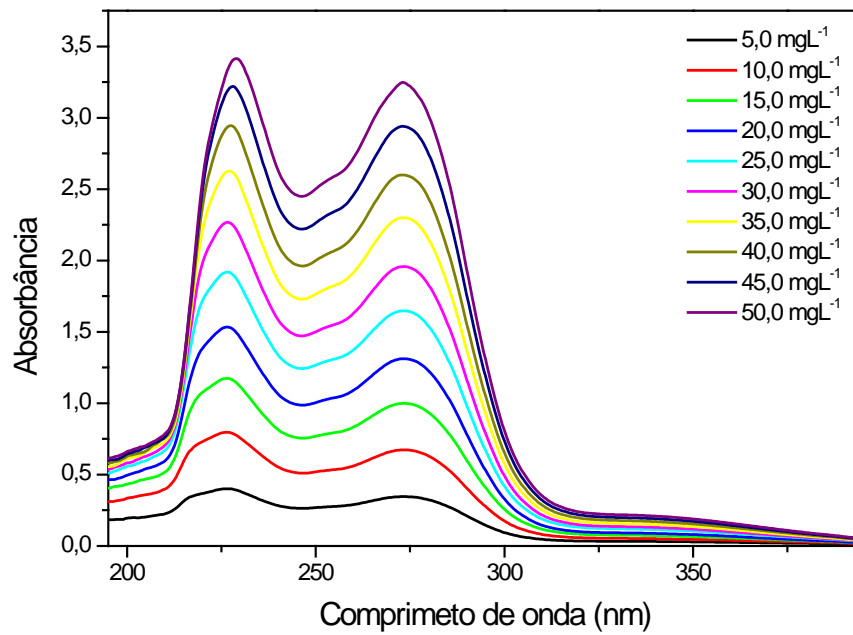


FIGURA 4.4 – Espectro de olanzapina em isopropanol em concentrações crescentes

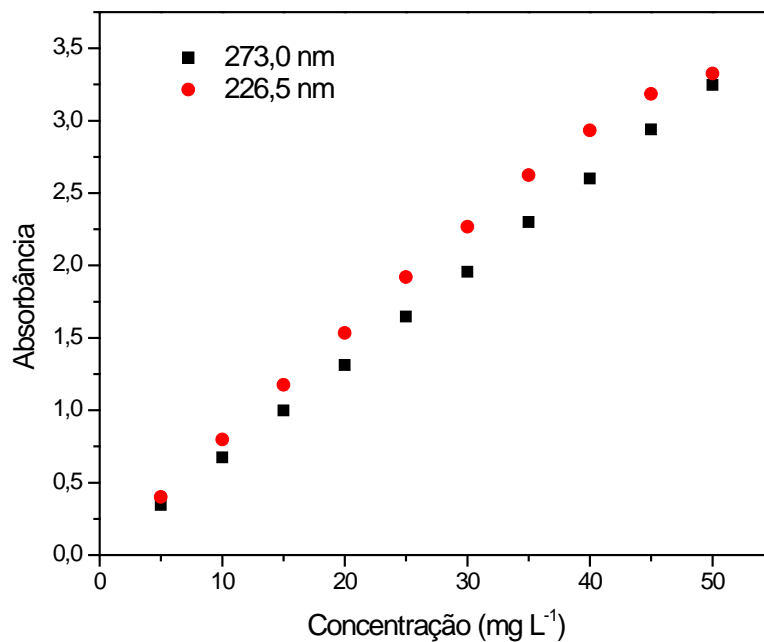


FIGURA 4.5 – Linearidade da olanzapina em isopropanol com o aumento da concentração.

### 4.3 – Efeito da água no espectro de absorção

A água destilada teoricamente é o solvente ideal para análise espectrofotométrica, pois é bastante acessível, representa baixo custo para análise, não é tóxica e é transparente até cerca de 190,0 nm. Porém, seu uso é limitado devido ao fato de não solubilizar alguns compostos orgânicos como, por exemplo, a própria olanzapina (Owen, 2000).

A interação entre a molécula de olanzapina álcool e água foi descrita por Wawrzycka-Gorczyca et al. (2004 e 2007) como sendo a formação de um solvato através de ligações de hidrogênio. Nirogi et al. (2006) diluiu metanol em água destilada obtendo uma concentração de 50% v/v para solubilizar amostras de plasma que continham olanzapina para análise em HPLC. Rao et al. (2008) recentemente utilizou metanol diluído em água destilada a 30 % v/v para solubilizar olanzapina para detectar impurezas na mesma por HPLC.

O solvente diluído em água pode ser utilizado como alternativa para minimizar os custos da análise, pois teria um menor gasto com solvente. Neste trabalho optou-se por diluir os solventes em água destilada obtendo concentrações de 75%, 50% e 25% v/v.

Observa-se na Figura 4.6 que, tanto na banda em 272,5 nm quanto na banda em 226,5 nm, ocorre uma diminuição na intensidade da absorção (efeito hipocrômico) com a adição de água. Nota-se também que em 272,5 nm há um deslocamento da banda para comprimentos de ondas menores (hipsocrômico) que está relacionado com o aumento da polaridade do meio (Kemp, 1991; Silverstein et al., 1994).

O aumento da polaridade do meio afeta as transições do tipo  $n \rightarrow \pi^*$  em função do aumento do grau de solvatação dos elétrons não ligantes  $n$ . Isso causa uma diminuição de energia do orbital  $n$ , ficando mais afastado do orbital  $\pi^*$ , necessitando de maior energia para que ocorra a transição, que passa a ocorrer em regiões mais energéticas (Skoog et al, 2002; Gonçalves, 2001).



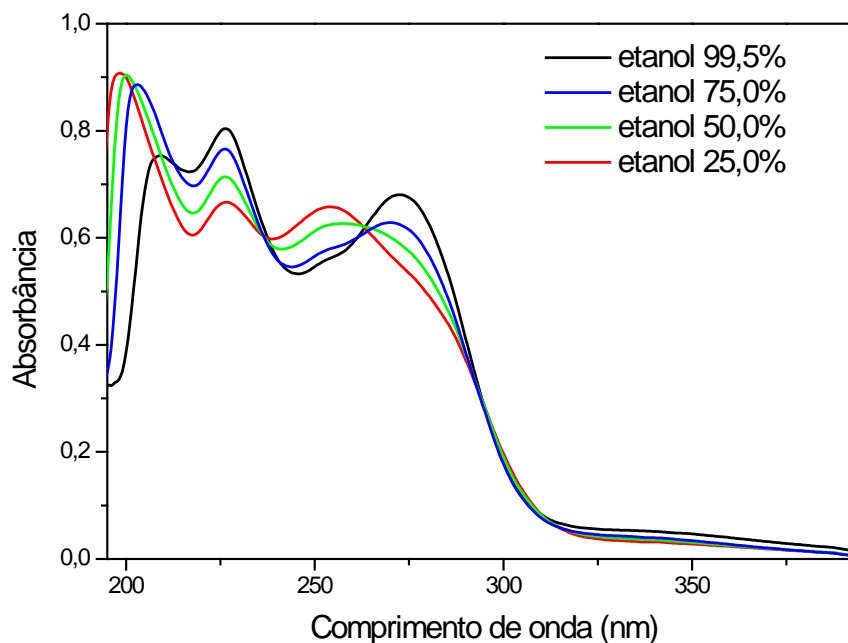


FIGURA 4.6 – Espectros de olanzapina a  $10 \text{ mg L}^{-1}$  em diferentes proporções de etanol e água

Na banda em 226,5 nm há um deslocamento para comprimentos de onda maiores (batocrômico) com o aumento da polaridade, o que é bastante comum em transições do tipo  $\pi \rightarrow \pi^*$  (Skoog et al, 2002). Isto ocorre porque as forças de atração entre solvente e espécie absorvente diminuem os níveis de energia dos orbitais  $\pi$  e  $\pi^*$ , sendo para este último de maneira mais acentuada (Kemp, 1991). Isto causa uma diminuição entre seus níveis de energia e, com isso, a transição passa a ocorrer em regiões menos energéticas (Silverstein et al., 1994).

Utilizando isopropanol como solvente (Figura 4.7), foi observado o mesmo comportamento que em etanol. Isto já era esperado uma vez que, em ambos os casos, estão envolvidos os mesmos tipos de transições eletrônicas nos comprimentos de ondas citados nos dois solventes.

Com adição de água, foi observado uma diminuição da solubilidade da olanzapina em ambos os meios, principalmente ao se adicionar quantidades maiores que 50%, levando a turbidez da solução etanólica e a precipitação no caso do isopropanol.

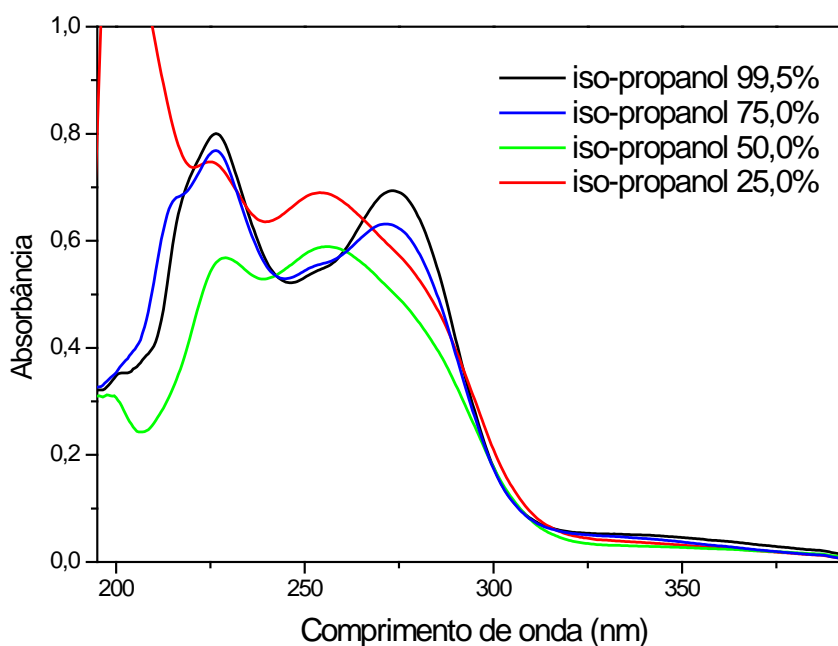


FIGURA 4.7 – Espectros de olanzapina a  $10 \text{ mg L}^{-1}$  em diferentes proporções de isopropanol e água

Na Figura 4.7 é possível notar que o espectro de olanzapina dissolvida em isopropanol a 25 % v/v é o que possui maior intensidade do sinal. Este aumento aparente da intensidade foi provocado em função do aumento da polaridade do meio.

Em função destes fatores, optou-se por não adicionar água ao solvente para o estudo quantitativo da olanzapina.

#### 4.4 – Estabilidade da solução estoque

As soluções utilizadas para análise devem apresentar boa estabilidade, pelo menos durante todo o processo analítico, para que não ocorram erros provenientes da degradação da substância analisada. Muitas vezes, em análises quantitativas de rotina, por questão de praticidade e até mesmo de economia, é importante se dispor de uma solução estoque que apresente estabilidade durante um longo período de tempo, um dia, uma semana ou um mês, dependendo da necessidade (Ribani et al., 2004).

Os trabalhos existentes na literatura mostram o estudo da estabilidade das soluções padrão de olanzapina apenas com relação à temperatura de estocagem. Dusci

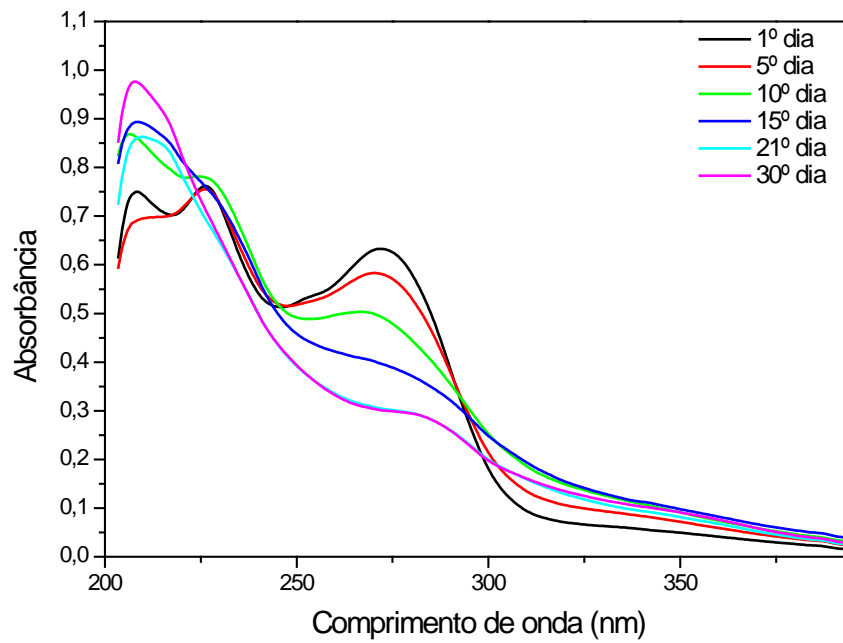
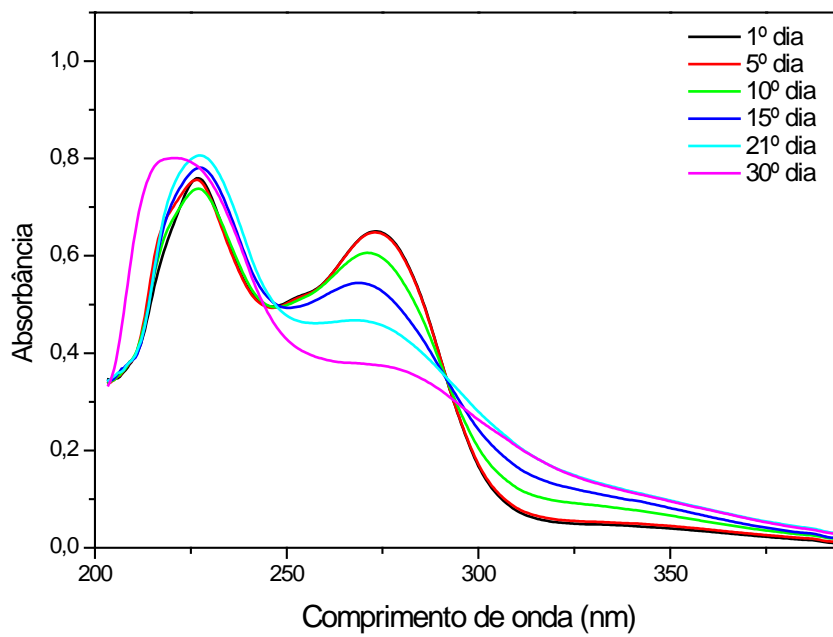
et al. (2002) relatou em seus estudos que uma solução padrão de olanzapina em etanol pode ser estável até 7 dias uma temperatura de cerca 4 °C e até por 3 meses quando estocadas a -20 °C. Recentemente, Saracino et al. (2006) descreveu que uma solução estoque de olanzapina em metanol pode apresentar estabilidade por mais de um ano quando estocada a -80 °C.

A estabilidade das soluções de olanzapina, tanto em etanol como em isopropanol, foram avaliadas durante um período de 30 dias levando em conta a exposição à luz e temperatura de estocagem. O estudo foi realizado a partir do espectro de ordem zero e os resultados obtidos foram analisados através do teste estatístico ANOVA ( $p=0,05$ ) (Miller et al, 2002).

O teste mostrou que, para os dois solventes, do 1° ao 30° dia as soluções estocadas em locais onde permaneciam protegidas da luz, à temperatura ambiente ( $25,0 \pm 5,0$  °C) ou sob refrigeração ( $4,0 \pm 3,0$  °C), permanecem com o sinal das absorvâncias sem nenhuma alteração significativa.

Comparando os resultados obtidos entre os dois solventes através do teste estatístico ANOVA ( $p=0,05$ ) (Miller et al, 2002), foi observado também não haver nenhuma diferença significativa e, portanto, tanto em etanol como em isopropanol as soluções estoque de olanzapina podem ser estocadas durante 30 dias sob refrigeração ou a temperatura ambiente, quando protegidas da luz.

Os espectros das soluções estoque de olanzapina que foram deixadas expostas à luz e a temperatura ambiente encontram-se nas figuras 4.8 (etanol) e 4.9 (isopropanol), que apresentaram uma diminuição progressiva do sinal a partir do 4° dia quando em etanol (272,5 nm) e do 10° dia com o solvente isopropanol (273,0 nm) (Figura 4.10).

FIGURA 4.8 – Espectro de olanzapina a 10 mg L<sup>-1</sup> em etanol na presença de luzFIGURA 4.9 – Espectro de olanzapina a 10 mg L<sup>-1</sup> em isopropanol na presença de luz

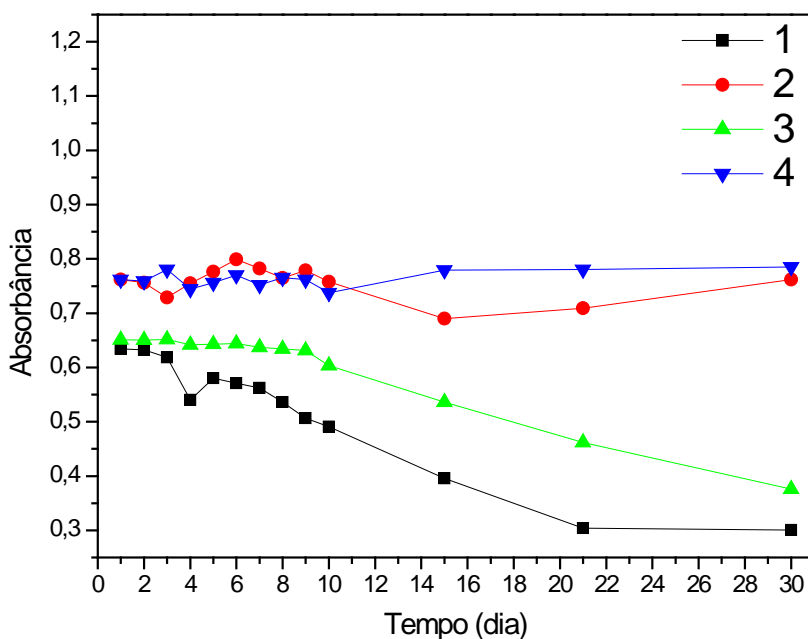


FIGURA 4.10 - Estabilidade das soluções de olanzapina a  $10 \text{ mg L}^{-1}$  em presença de luz: em etanol 272,5 nm (1); em etanol 226,5 nm (2); em isopropanol 273,0 nm (3) e em isopropanol 226,5 nm (4)

A Figura 4.10 mostra o comportamento do sinal analítico da olanzapina, nos dois solventes, em presença de luz. Nota-se que as bandas localizadas em 226,5 nm possuem sinal instável quando expostas à luz. No decorrer do estudo, as soluções de olanzapina, em ambos os solventes, adquiriram coloração amarelo mais intenso identificando a decomposição fotoquímica da substância. Portanto, as soluções de olanzapina, quando estocadas, devem ser guardadas protegidas da luz, à temperatura ambiente, para evitar fotodecomposição da substância.

#### 4.5 – Efeito do pH

Uma dada metodologia deve ser capaz de resistir às pequenas variações existentes no sistema estudado. Para métodos espectrofotométricos, a variação de pH do meio (ANVISA, 2003) é um dos parâmetros utilizados para medir a sensibilidade que o sistema possui a pequenas modificações das condições de análise (Ribani et al., 2004).

Este estudo foi realizado medindo-se a variação do sinal em diferentes pH para os dois solventes. Inicialmente mediu-se o pH de duas soluções de olanzapina a  $10 \text{ mg L}^{-1}$  dissolvida apenas nos dois solventes, e verificou-se que em etanol o pH é cerca de 7,33 e em isopropanol 7,66.

A Figura 4.11 mostra que o comportamento do sinal analítico da olanzapina é bastante similar nos dois solventes. Através do teste estatístico ANOVA ( $p=0,05$ ) (Miller et al., 2002) observou-se que em pH acima de 8,0 não há nenhuma diferença significativa na intensidade das absorvâncias, nos comprimentos de onda estudados, o que mostra que o método possui uma boa tolerância ao aumento do pH.

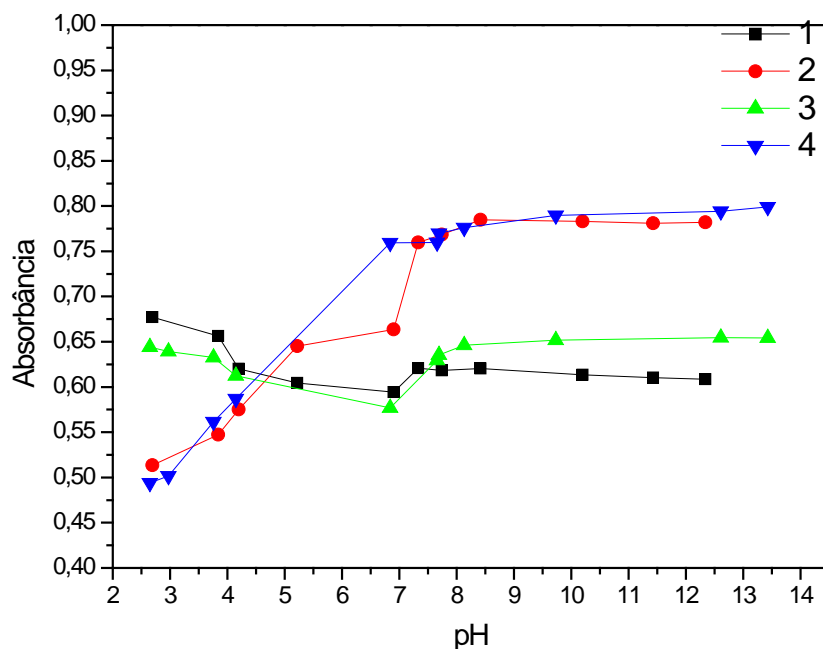


FIGURA 4.11 - Absorbâncias das soluções de olanzapina a  $10 \text{ mg L}^{-1}$  variando o pH: em etanol 272,5 nm (1); em etanol 226,5 nm (2); em isopropanol 273,0 nm (3) e em isopropanol 226,5 nm (4)

Em meio ácido o sinal sofre alteração nas bandas estudadas, em ambos os solventes. Em pH abaixo de 7,2 nas bandas em 272,5 nm (etanol) e 273,0 nm (isopropanol) é observado um aumento gradual nas absorvâncias das soluções estudadas, e em pH abaixo de 7,3 nas bandas em 226,5 nm em ambos os solventes ocorre diminuição do sinal.

Com a adição da solução de NaOH  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$  não foi observado nenhuma modificação significativa no espectro de olanzapina nos dois solventes (Figuras 4.12 e 4.13), indicando que não houve nenhuma modificação estrutural da molécula. Ocorreu apenas um pequeno deslocamento hipsocrômico das bandas em  $272,5 \text{ nm}$  (etanol) e  $273,0 \text{ nm}$  (isopropanol) e um deslocamento batocrômico nas bandas em  $226,5 \text{ nm}$ , nos dois solventes, devido ao aumento da polaridade com a adição do eletrólito (Silverstein et al., 1994).

Apesar de se observar que em pH acima de 8,0 há uma estabilidade no sinal do espectro de olanzapina nas bandas estudadas, em ambos os solventes (Figura 4.11), optou-se por não se realizar o ajuste do pH, pois com adição de solução aquosa de NaOH foi verificado uma pequena diminuição na solubilidade da olanzapina resultando, em alguns casos, numa leve turbidez. O pH de uma solução de olanzapina a  $10 \text{ mg L}^{-1}$  é  $7,33$  em etanol e  $7,66$  em isopropanol, muito próximo da região onde o sinal é estável.

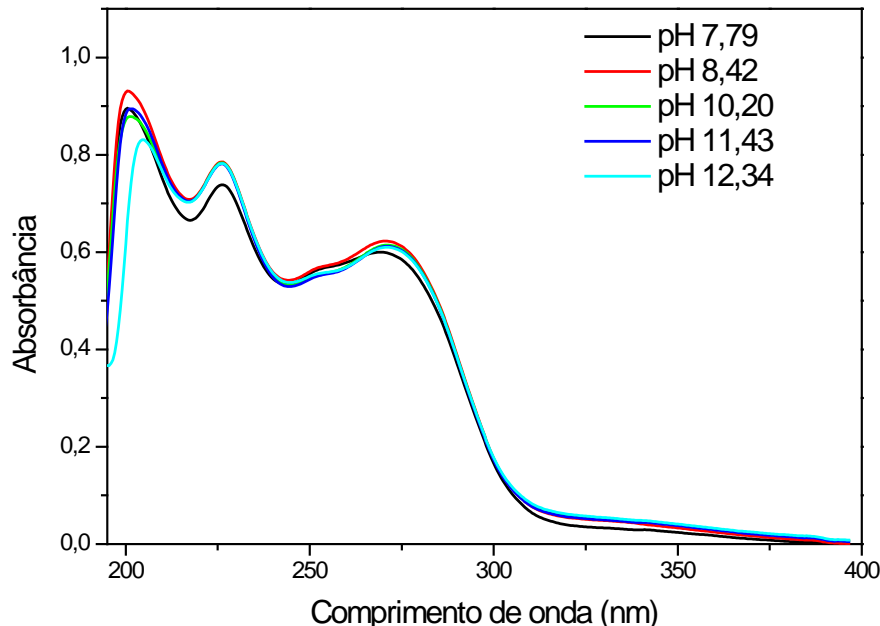


FIGURA 4.12– Espectro de olanzapina a  $10 \text{ mg L}^{-1}$  em etanol em meio básico

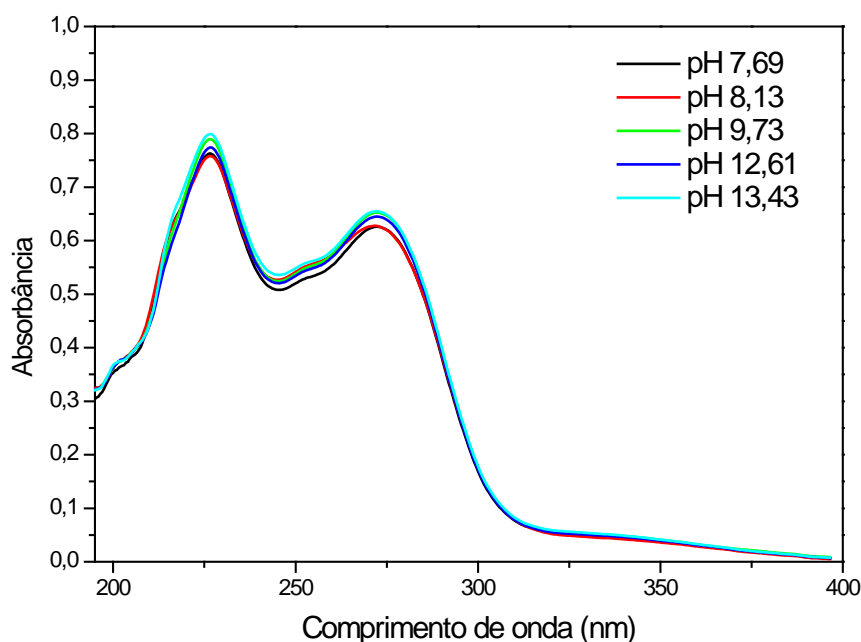
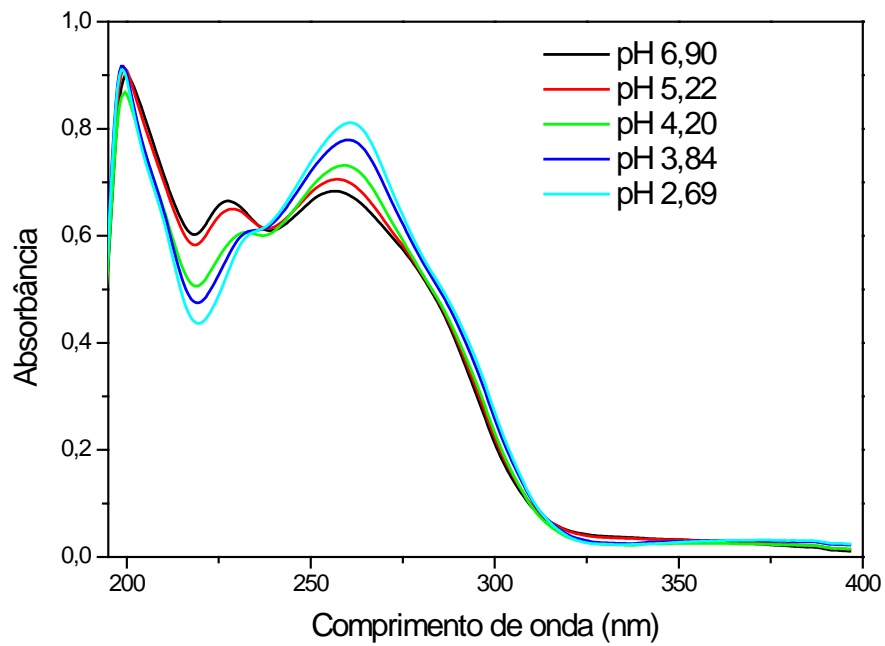
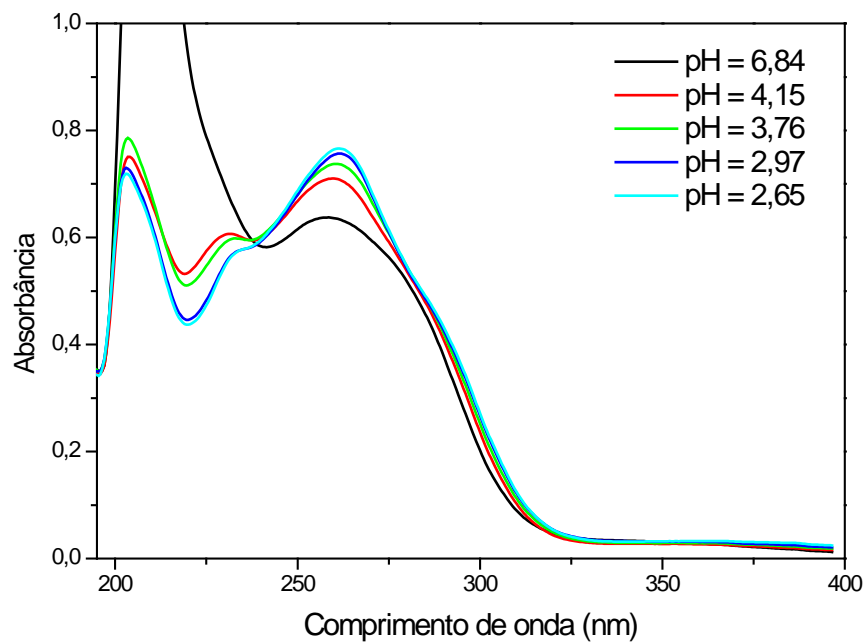


FIGURA 4.13 – Espectro de olanzapina a  $10 \text{ mg L}^{-1}$  em isopropanol em meio básico

Em meio ácido os espectros de olanzapina, nos dois solventes (Figuras 4.14 e 4.15), sofreram modificações consideráveis. Além dos deslocamentos já esperados com o aumento da polaridade, nota-se um leve deslocamento batocrômico à medida que o pH diminuí (Siverstein et al., 1994).

Um dos motivos para a ocorrência desses fatores está relacionado à reação ácido-base da molécula de olanzapina com o HCl do meio através da protonação dos nitrogênios do anel diazépínico (Figura 4.16). Esta reação faz com que ocorra uma deslocalização de elétrons do sistema diazépínico da molécula diminuindo a energia dos estados fundamental e excitado, deslocando a banda para comprimentos de onda menos energéticos (Siverstein et al., 1994).



FIGURA 4.14 – Espectro de olanzapina a 10 mg L<sup>-1</sup> em etanol em meio ácidoFIGURA 4.15 – Espectro de olanzapina a 10 mg L<sup>-1</sup> em isopropanol em meio ácido

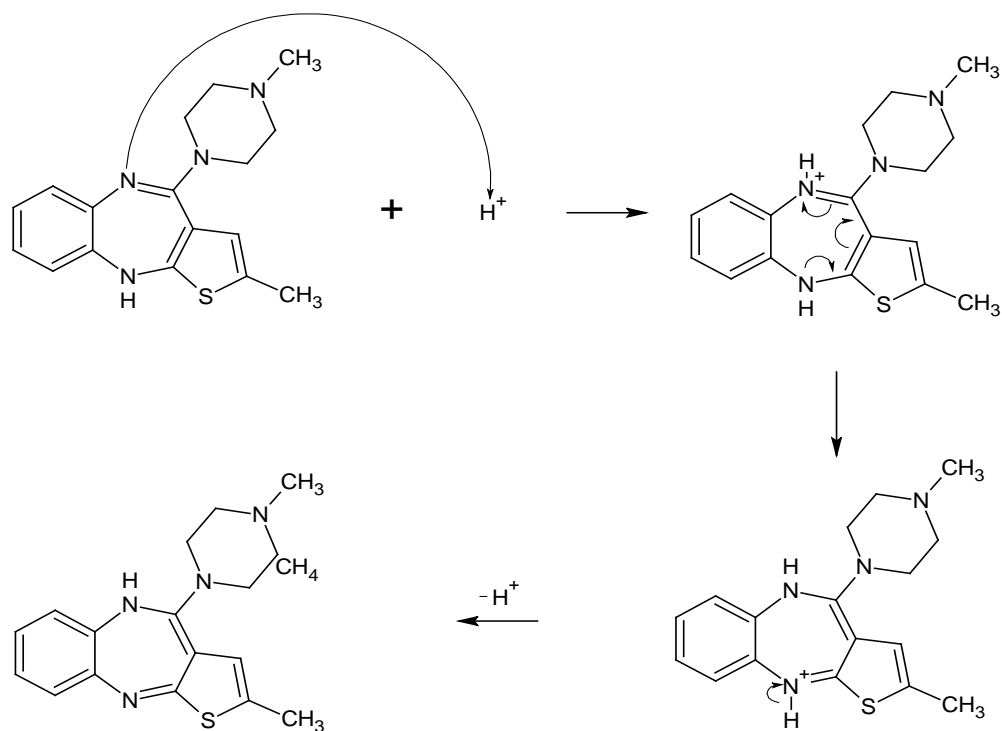


FIGURA 4.16 – Reação da olanzapina em meio ácido

#### 4.6 - Efeito da mudança de marca do solvente

Outro parâmetro estudado para medir a sensibilidade do método às pequenas variações das condições do sistema é a mudança de fabricante do solvente (ANVISA, 2003). Embora no rótulo dos reagentes indique que seja o mesmo produto, pode haver pequenas diferenças no grau de pureza em função da mudança de fabricante.

Nos ensaios em que houve modificação da marca dos solventes (Figuras 4.17 e 4.18) foi verificado, através do teste estatístico ANOVA ( $p=0,05$ ) (Miller et al., 2002), que não há nenhuma mudança significativa nas bandas em 272,5 nm, (etanol) e 273,0 nm (isopropanol).

Na banda em 226,5 nm, em ambos os solventes foi observado que, com a mudança de marca do solvente, há uma variação na intensidade do sinal analítico nesta região que pode ser atribuída ao grau de pureza.

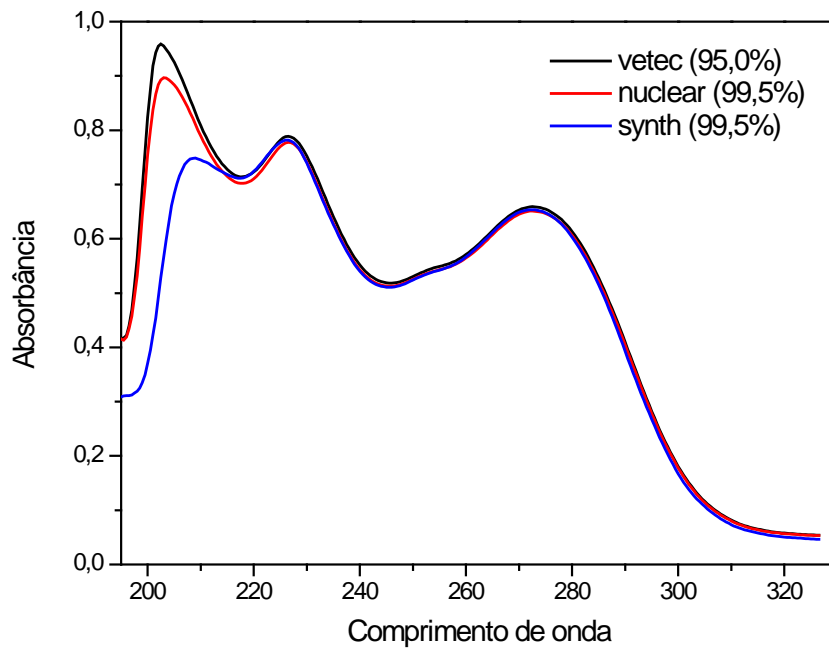


FIGURA 4.17 – Espectro de olanzapina a 10 mg L<sup>-1</sup> em etanol de diferentes marcas de solvente

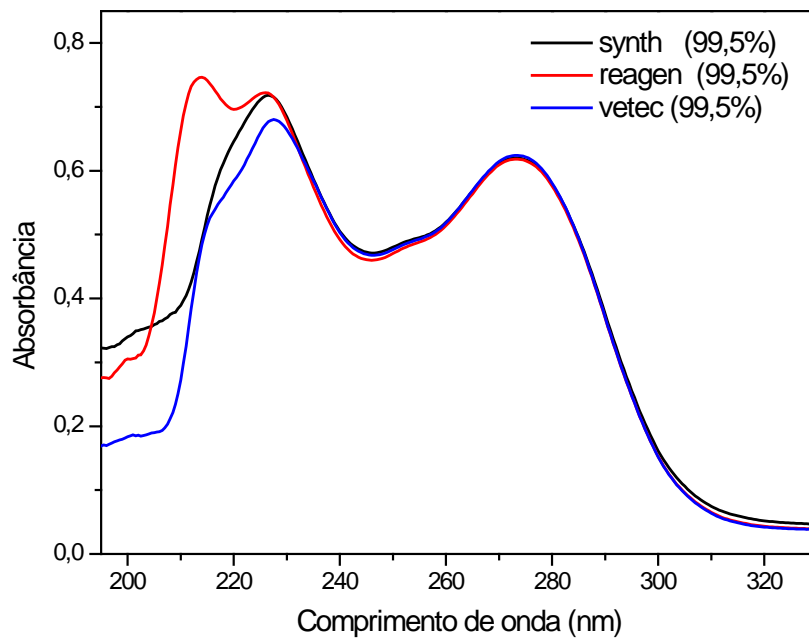


FIGURA 4.18 – Espectro de olanzapina a 10 mg L<sup>-1</sup> em isopropanol de diferentes marcas de solvente

Em meio etanólico (Figura 4.17) foi verificado que com a mudança de marca há uma diferença na intensidade da banda em 208,5 nm, principalmente entre as marcas Vetec e Synth, que pode ser atribuído a pureza e a diferença de polaridade (Kemp, 1991) do meio. Em isopropanol (Figura 4.18) foi observado o aparecimento de uma terceira banda quando se utilizou a marca Reagem que pode estar relacionada com as mesmas causas.

#### **4.7 - Estudo dos excipientes (seletividade)**

Segundo a ANVISA (2003), a seletividade de um método avalia o grau de interferência de outras substâncias que estão presentes na matriz da amostra. Um método é seletivo quando é capaz de medir exatamente a composição do analito em presença de outros componentes (Leite, 2002).

A olanzapina apresenta vários excipientes em sua composição, sendo necessário se verificar se os mesmos podem causar interferência na análise quantitativa da substância. O estudo da seletividade foi feito utilizando alguns dos principais excipientes empregados na fabricação do comprimido de olanzapina. As concentrações estudadas de cada excipiente foram baseadas na formulação de comprimidos de olanzapina produzidos em uma planta piloto pelo NTF/UFPI, a 10 mg.

Os estudos com os excipientes mostraram que nenhum deles apresenta solubilidade apreciável nos solventes utilizados, foi observado que a maioria precipitou, exceto o estearato de magnésio que permaneceu suspenso causando leve turbidez.

A análise visual dos espectros das soluções dos excipientes nos solventes estudados (Figuras 4.19 e 4.20) mostra que nenhum deles apresenta bandas de absorção nos comprimentos de onda nos quais a olanzapina absorve, portanto não causam interferência nestes sinais.

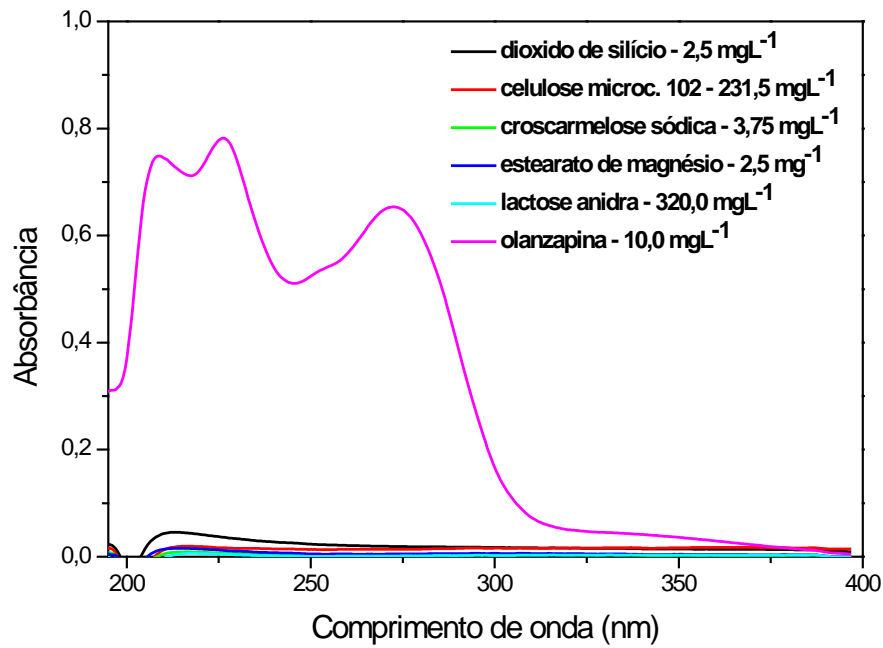


FIGURA 4.19 – Espectro de olanzapina a 10 mg L<sup>-1</sup> em etanol comparado com de seus principais excipientes

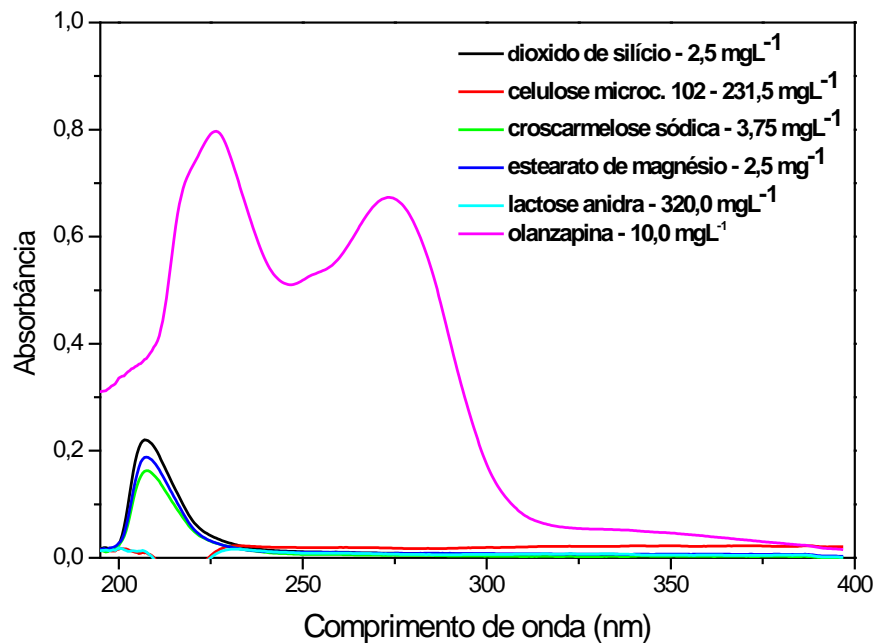


FIGURA 4.20 – Espectro de olanzapina a 10 mg L<sup>-1</sup> em isopropanol comparado com de seus principais excipientes

As informações técnicas fornecidas pela bula do comprimido Zyprexa<sup>®</sup> não revelam a quantidade de todos os excipientes contidos em cada comprimido, apenas de matéria prima e lactose, por isso um novo estudo foi realizado aumentando a concentração dos excipientes.

Em concentrações mais elevadas (Figuras 4.21 e 4.22) foi observado que a suspensão de estearato de magnésio torna-se mais turva levando a um aumento do sinal analítico em toda a região espectral, devido ao espalhamento da radiação pelas partículas suspensas, o que pode provocar erros e afetar a exatidão dos resultados obtidos (Mendham et al., 2003).

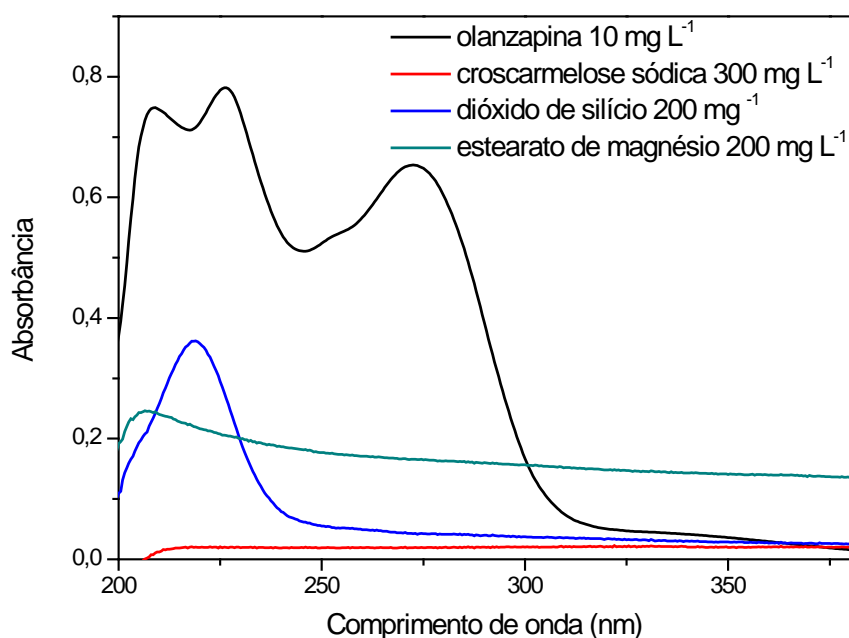


FIGURA 4.21 – Espectro de olanzapina a 10 mg L<sup>-1</sup> em etanol comparado com de seus principais excipientes em concentrações mais elevadas

A interferência causada pelos excipientes do comprimido de olanzapina é relatada em muitos trabalhos da literatura. A maioria dos autores que analisa a substância por espectrofotometria utiliza processos mecânicos, como filtração, centrifugação e banho ultrassom afim de minimizar os possíveis erros causados pela presença destes (Jasińska et al., 2003; Firdous et al, 2005; Krebs et al., 2006; Raggi et al, 2000; Revanasiddappa et al., 2008).

Em razão disto, boa parte dos trabalhos para quantificação de olanzapina, seja em fórmulas farmacêuticas ou em amostras biológicas, fazem uso de métodos cromatográficos aliados a outras técnicas para quantificar a substância (Catlow et al, 1995; Chiu et al, 1996; Kasper et al, 1999; Raggi et al., 2001; Berna et al., 2001; Dusci et al., 2002; Saracino et al., 2006; Nirogui et al; 2006; Basavaiah et al., 2008, Rao et al., 2008).

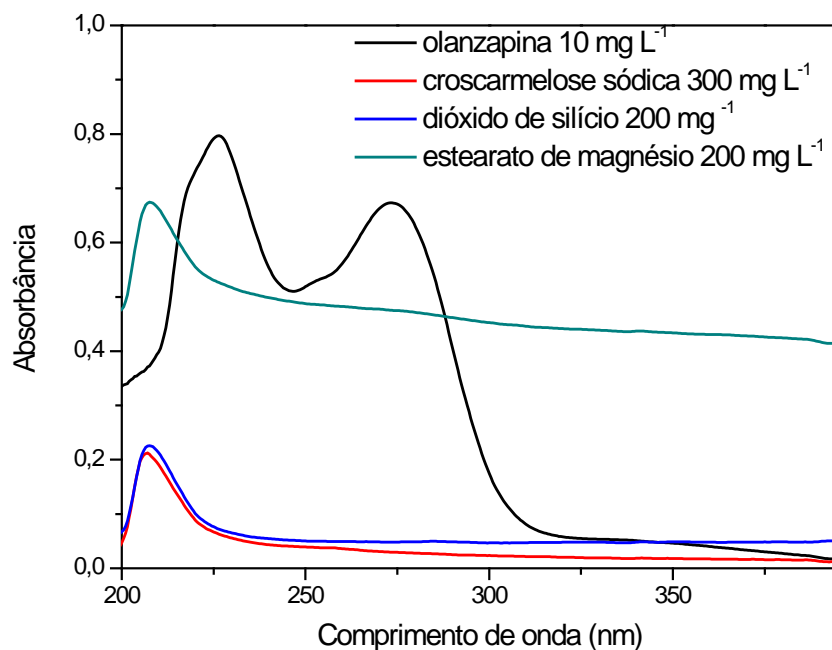


FIGURA 4.22 – Espectro de olanzapina a  $10 \text{ mg L}^{-1}$  em isopropanol comparado com de seus principais excipientes em concentrações mais elevadas

#### 4.8 – Aplicação da espectrofotometria derivativa

A aplicação da espectrofotometria derivativa até os dias atuais é uma prática bastante útil na análise de fármacos (Rojas et al., 2009) uma vez que através dela é possível eliminar os sinais de possíveis interferentes, como excipientes, aumentando a seletividade do método (Görög, 1995).

Neste trabalho foram estudadas a derivação dos espectros de ordem zero de olanzapina a  $10 \text{ mg L}^{-1}$  para 1ª, 2ª, 3 e 4ª derivadas, variando o  $\Delta\lambda$  de 1 a 10.

#### 4.8.1 – Efeito do $\Delta\lambda$ e da ordem da derivada no espectro

O estudo da variação do  $\Delta\lambda$  mostrou, para ambos os solventes, que quando  $\Delta\lambda$  varia de 1 a 10 nm ocorre uma diminuição dos detalhes do espectro obtido com a derivação. Observou-se que quanto maior o valor do  $\Delta\lambda$ , como visto nos espectros de 1ª ordem de derivada (Figuras 4.23 e 4.24), a banda se torna larga, intensa, resultando em aumento da sensibilidade (Rocha et al., 2004). Há também a eliminação do sinal do interferente, pois a inclinação do sinal do excipiente possui valor igual a zero, aumentando a seletividade.

A partir da 2ª ordem (Figuras 4.25 e 4.26) e 3ª ordem (Figuras 4.27 e 4.28) de derivada, o aumento do  $\Delta\lambda$  faz com que algumas bandas se fundam formando uma nova banda de maior intensidade (Tsai et al., 1998). Entretanto, a partir dos espectros de 3ª ordem (Figuras 4.27 e 4.28) observou-se a presença de ruídos abaixo de 230 nm em valores de  $\Delta\lambda$  menores que 5. Estes ruídos apareceram de forma ainda mais pronunciada nos espectros de 4ª ordem (Figuras 4.29 e 4.30) e quando o solvente utilizado foi etanol (Figura 4.29). No entanto, com o aumento do  $\Delta\lambda$ , os ruídos diminuíram e o espectro ficou com aparência mais suavizada (Tsai et al., 1998).

Nas Figuras 4.31 e 4.32, em etanol e isopropanol respectivamente, é possível notar que, com a derivação do espectro em  $\Delta\lambda$  10, há um aumento bastante significativo do sinal com relação ao espectro de ordem zero, e que este aumento se torna ainda mais evidente com o aumento da ordem da derivada levando a ganho na sensibilidade, principalmente para 3ª e 4ª ordem de derivada.

Em virtude deste e de outros fatores citados anteriormente, escolheu-se realizar o estudo quantitativo da olanzapina derivando os espectros com  $\Delta\lambda=10$  a fim de se melhorar a seletividade, uma vez que com derivação dos espectros surgem bandas em regiões onde não há interferência por parte dos excipientes (Görög, 1995).



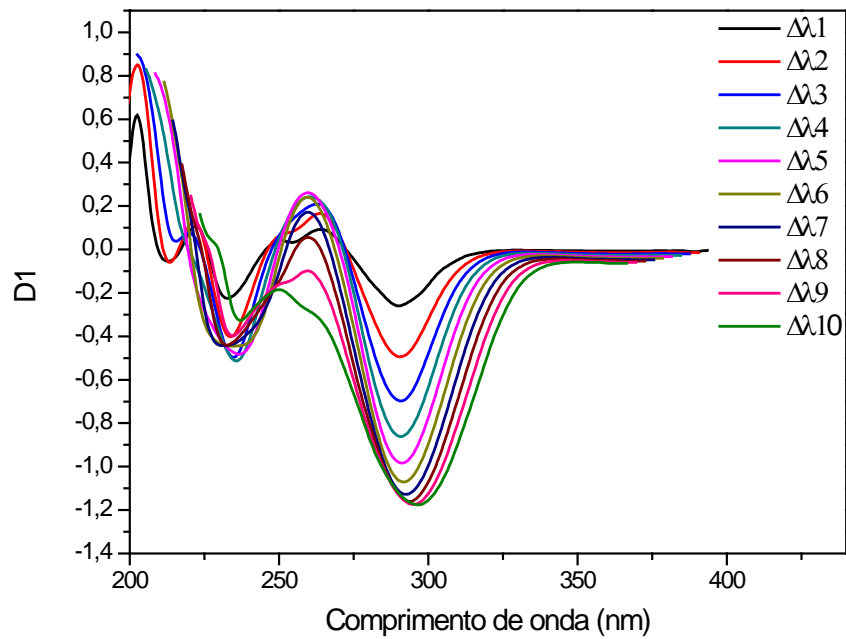


FIGURA 4.23 – Espectro derivado de 1ª ordem de olanzapina a 10 mg L<sup>-1</sup> em etanol variando o valor de  $\Delta\lambda$

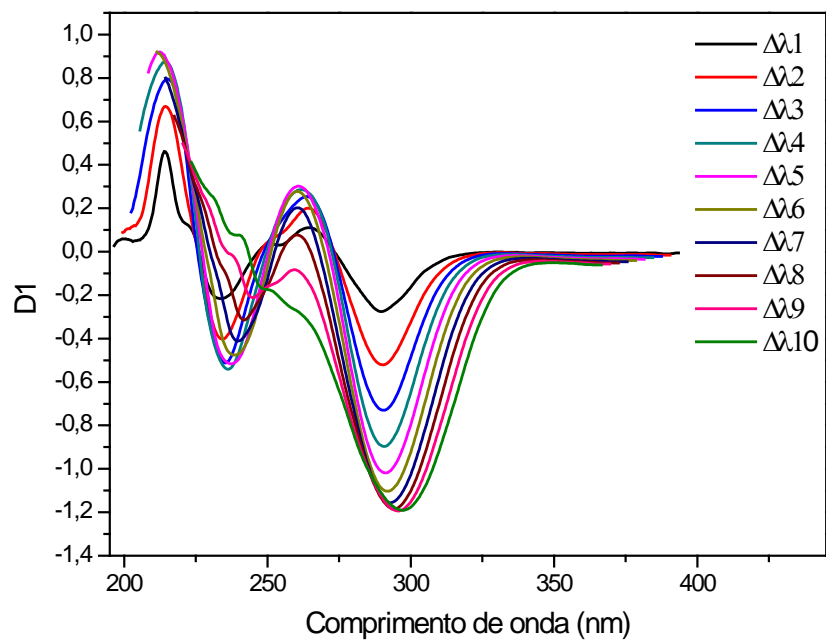


FIGURA 4.24 – Espectro derivado de 1ª ordem de olanzapina a 10 mg L<sup>-1</sup> em isopropanol variando o valor de  $\Delta\lambda$

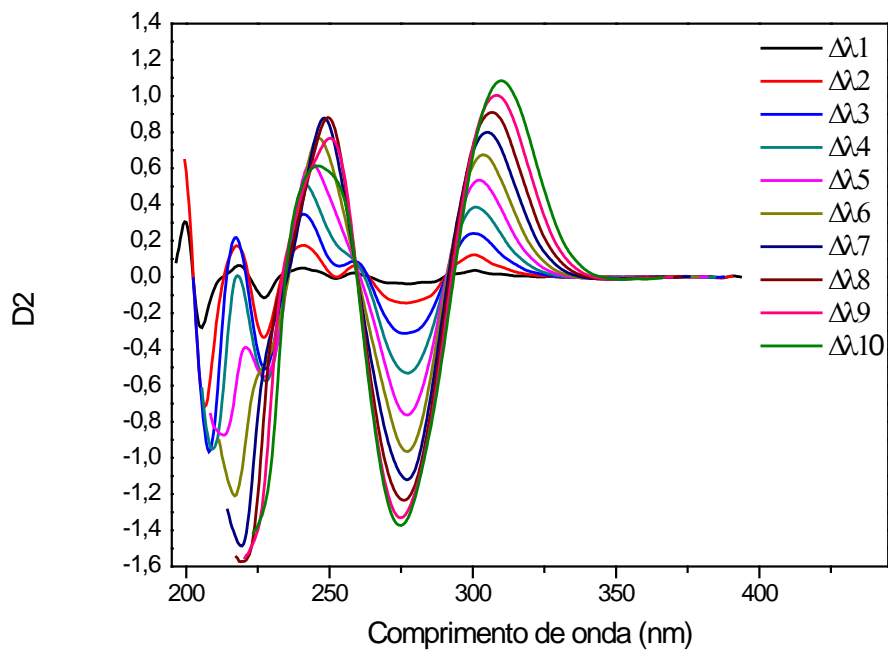


FIGURA 4.25 – Espectro derivado de 2ª ordem de olanzapina a  $10 \text{ mg L}^{-1}$  em etanol variando o valor de  $\Delta\lambda$

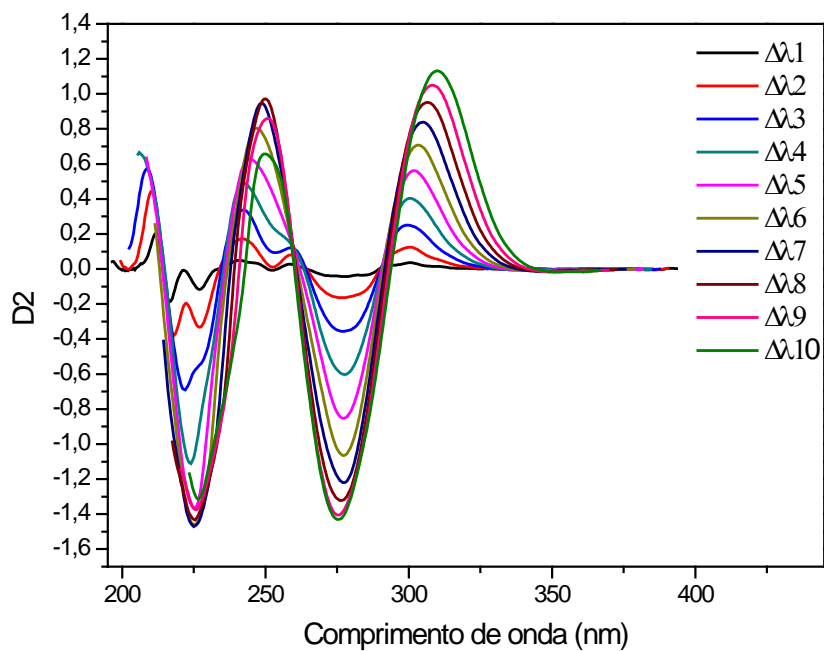


FIGURA 4.26 – Espectro derivado de 2ª ordem de olanzapina a  $10 \text{ mg L}^{-1}$  em isopropanol variando o valor de  $\Delta\lambda$

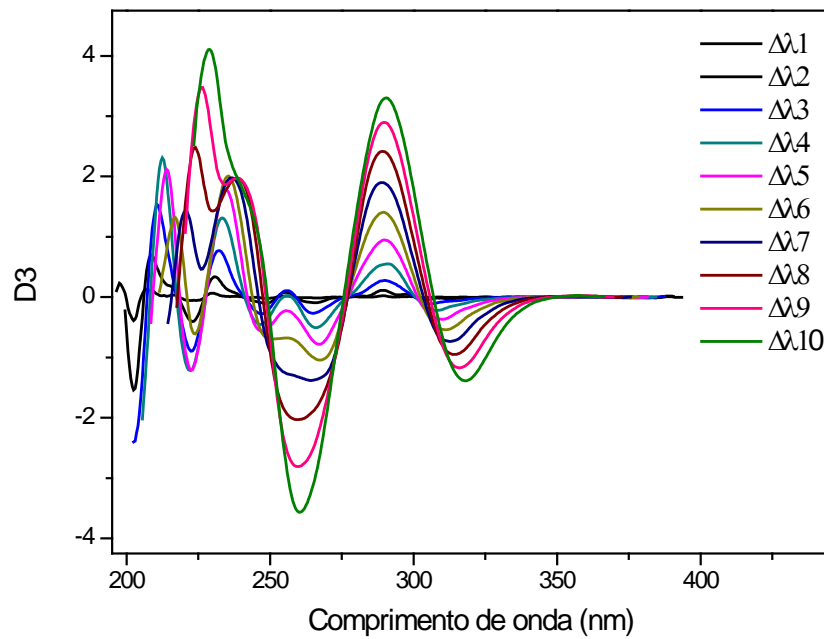


FIGURA 4.27 – Espectro derivado de 3ª ordem de olanzapina a  $10 \text{ mg L}^{-1}$  em etanol variando o valor de  $\Delta\lambda$

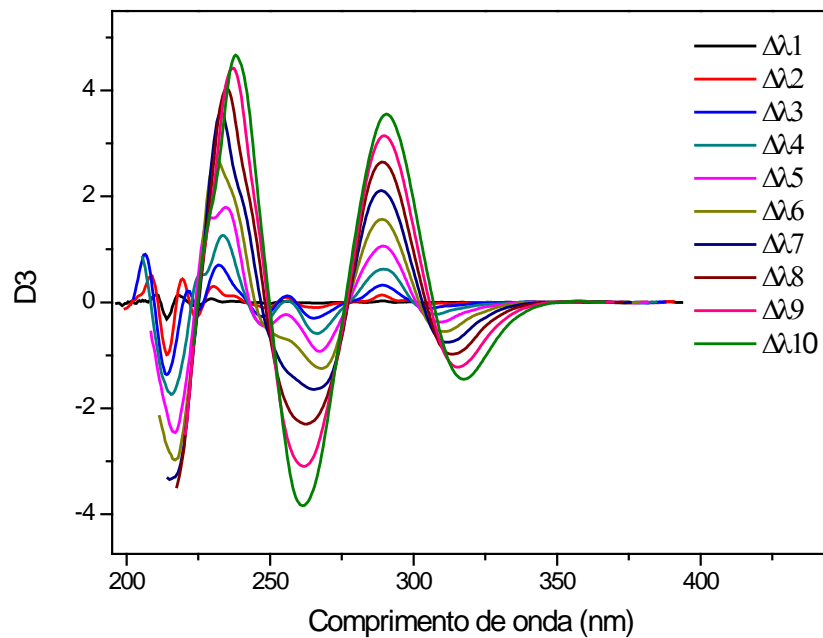


FIGURA 4.28 – Espectro derivado de 3ª ordem de olanzapina a  $10 \text{ mg L}^{-1}$  em isopropanol variando o valor de  $\Delta\lambda$

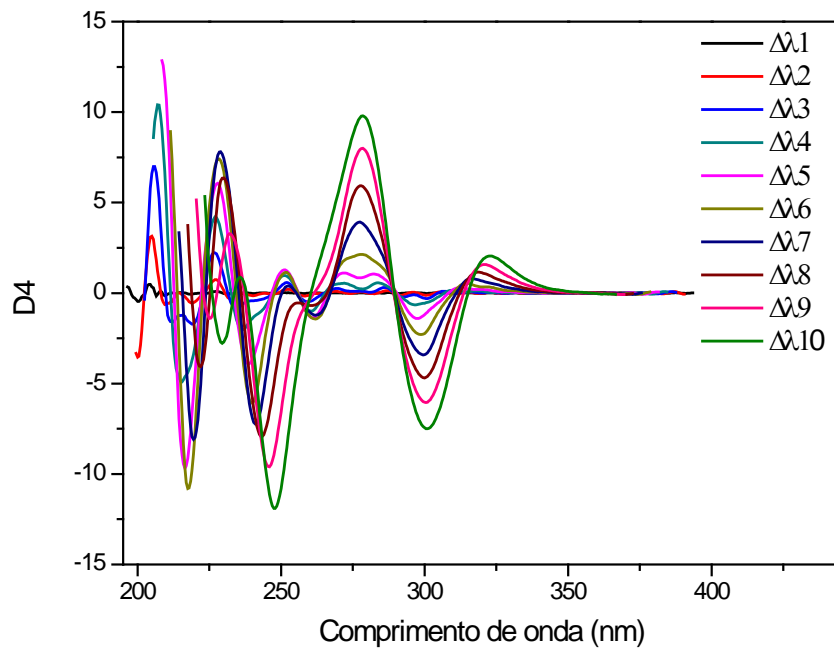


FIGURA 4.29 – Espectro derivado 4<sup>a</sup> ordem de olanzapina a 10 mg L<sup>-1</sup> em etanol variando o valor de  $\Delta\lambda$

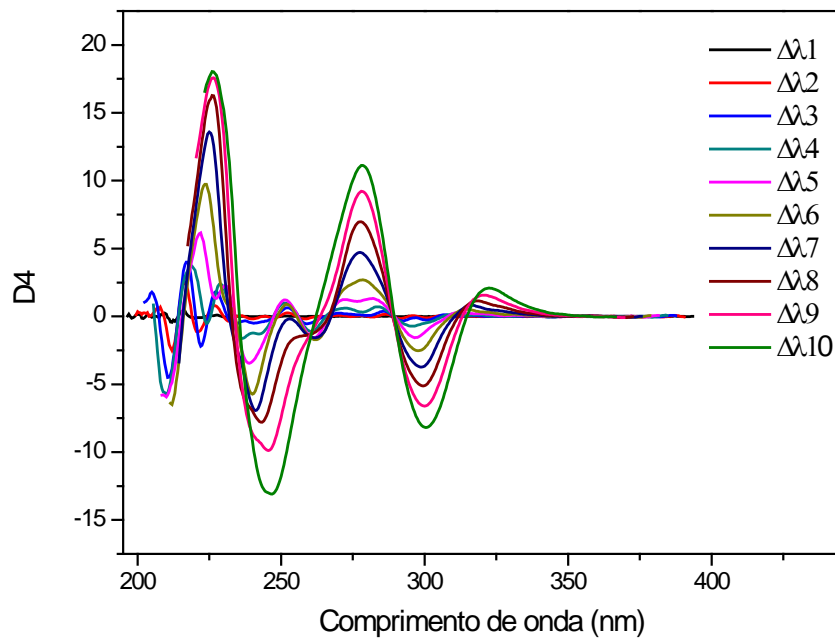


FIGURA 4.30 – Espectro derivado 4<sup>a</sup> ordem de olanzapina a 10 mg L<sup>-1</sup> em isopropanol variando o valor de  $\Delta\lambda$

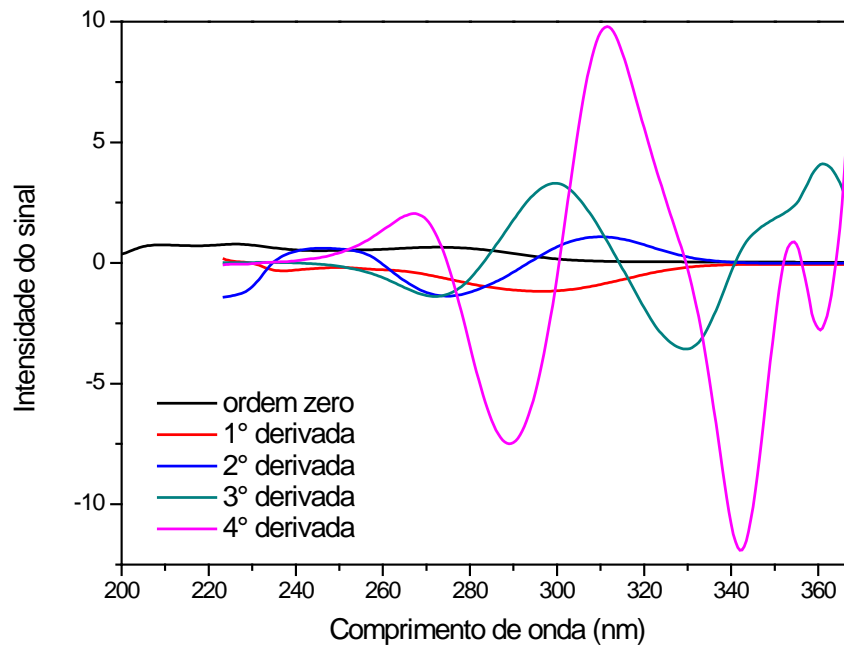


FIGURA 4.31 – Espectro de ordem zero de olanzapina a  $10 \text{ mg L}^{-1}$  em etanol e espectros derivados ( $\Delta\lambda = 10$ )

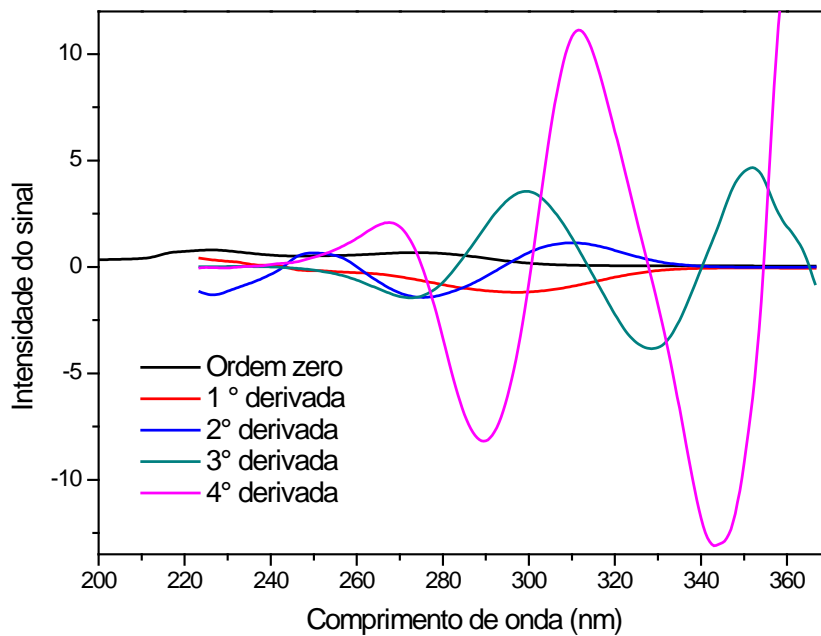


FIGURA 4.32 – Espectro de ordem zero de olanzapina a  $10 \text{ mg L}^{-1}$  em isopropanol e espectros derivados ( $\Delta\lambda = 10$ )

#### 4.8.2 – Escolha do $\lambda$ nos espectros derivados

A derivação do espectro de ordem zero produz  $(n + 1)$  bandas de absorção na primeira derivada e a cada nova derivação efetuada ocorre o aumento de mais uma banda (Karpinska, 2004). Em virtude disso, muitos picos podem aparecer em derivadas de ordem maiores, sendo necessário então que se escolha aquele mais adequado para análise.

Como não há sobreposição espectral entre os excipientes contidos no comprimido e a olanzapina, a escolha do comprimento de onda levará em conta apenas dois fatores: a obediência a lei de Beer (Skoog et al, 2002) e o aumento da sensibilidade (Rocha et al., 2004).

Raggi et al. (2000) testou da 1ª a 4ª ordem de derivada para quantificar olanzapina tendo como solvente metanol. Segundo ele, os melhores resultados obtidos foram com a 1ª ordem de derivada em 298,0 nm.

O espectro derivado de olanzapina para 1ª ordem em  $\Delta\lambda = 10$  apresenta apenas uma banda bem definida em 296,5 nm em etanol (Figura 4.33) e em 297,0 nm em isopropanol (Figura 4.34). Estas bandas foram estudadas para análise quantitativa de olanzapina nos dois solventes.

O espectro derivado de 2ª ordem de olanzapina possui 3 bandas bem definidas nos dois solventes (Figuras 4.35 e 4.36). Percebe-se, em ambos os casos, que a banda localizada abaixo de 260,0 nm desloca-se para comprimentos de ondas maiores com o aumento da concentração, caracterizando um desvio da lei de Beer (Skoog et al., 2002). Além do mais, ela tem menor intensidade quando comparado às outras duas bandas, e portanto é menos sensível. O estudo quantitativo de olanzapina utilizando a 2ª ordem de derivada foi realizado nos comprimentos de onda 310,0 nm e 275,0 nm em etanol (Figura 4.35) e 310 nm e 275,5 nm em isopropanol (Figura 4.36).

No estudo com a 3ª ordem de derivada obteve-se 4 bandas (Figuras 4.37 e 4.38) em ambos os solventes. Destas bandas, observa-se que as localizadas abaixo de 250,0 nm apresentam maior intensidade, porém se deslocam para comprimentos de ondas maiores com o aumento da concentração, que é característico de desvios da lei de Beer (Skoog et al., 2002). A análise quantitativa da olanzapina com a 3ª ordem de

derivada foi realizada em 290,5 nm e 260,5 nm em etanol (Figura 4.37) e em 290,5 nm e 267,0 nm em isopropanol (Figura 4.38).

Nos espectros derivados na 4ª ordem, 5 bandas foram observadas nos dois solventes (Figuras 4.39 e 4.40). As duas bandas situadas abaixo de 260,0 nm deslocam para comprimentos de ondas maiores com o aumento da concentração, o que condiz um desvio da lei de Beer (Skoog et al., 2002). As bandas localizadas acima de 315,0 nm não sofrem nenhum desvio da lei de Beer, porém tem menor intensidade quando comparadas às outras, tendo menor sensibilidade. As bandas escolhidas na 4ª ordem para o estudo quantitativo de olanzapina foram 301,0 nm e 278,5 para etanol (Figura 4.39) e 300,5 nm e 278,5 nm para isopropanol (Figura 4.40).

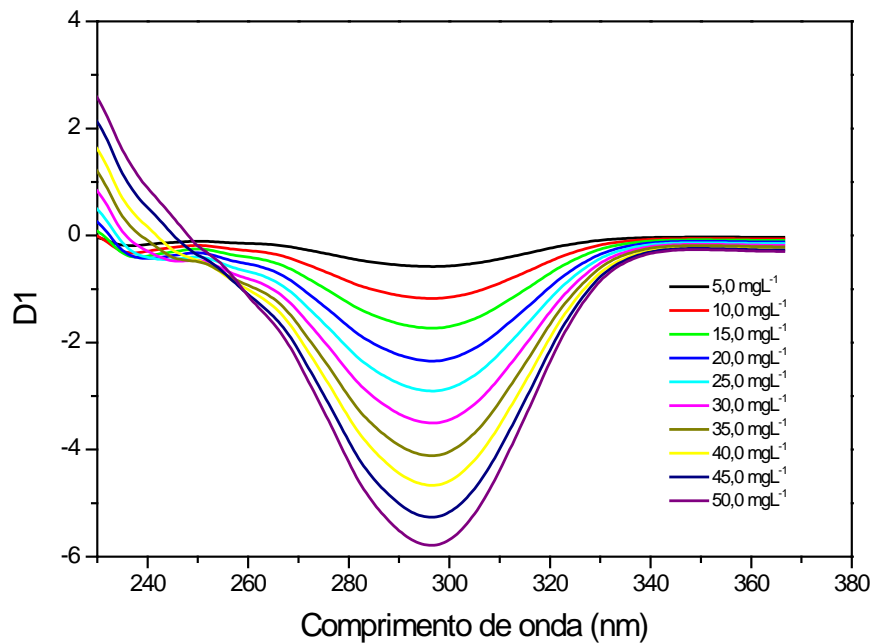


FIGURA 4.33 – Espectros derivados de 1ª ordem de olanzapina em etanol ( $\Delta\lambda = 10$ ) variando a concentração

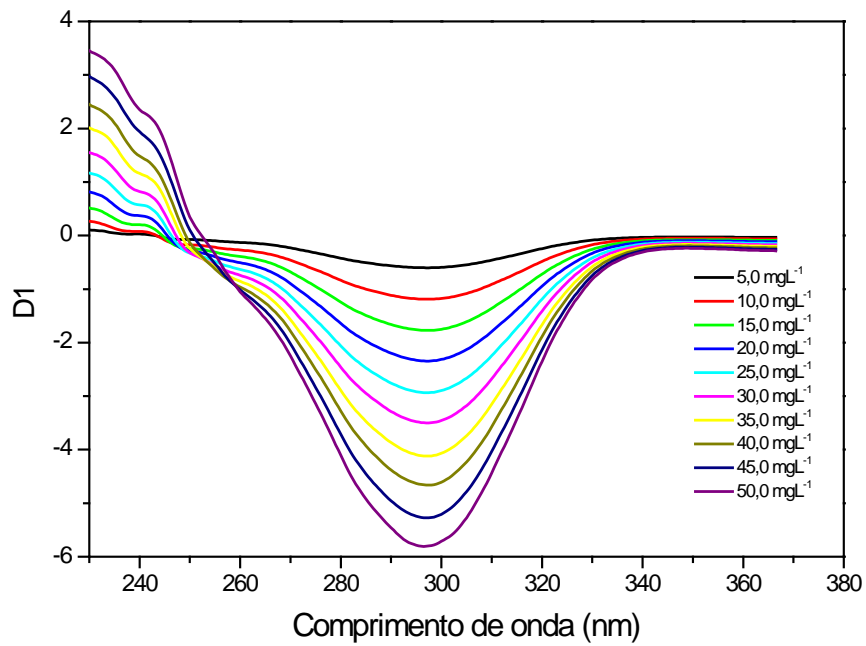


FIGURA 4.34 – Espectros derivados de 1ª ordem de olanzapina em isopropanol ( $\Delta\lambda = 10$ ) variando a concentração

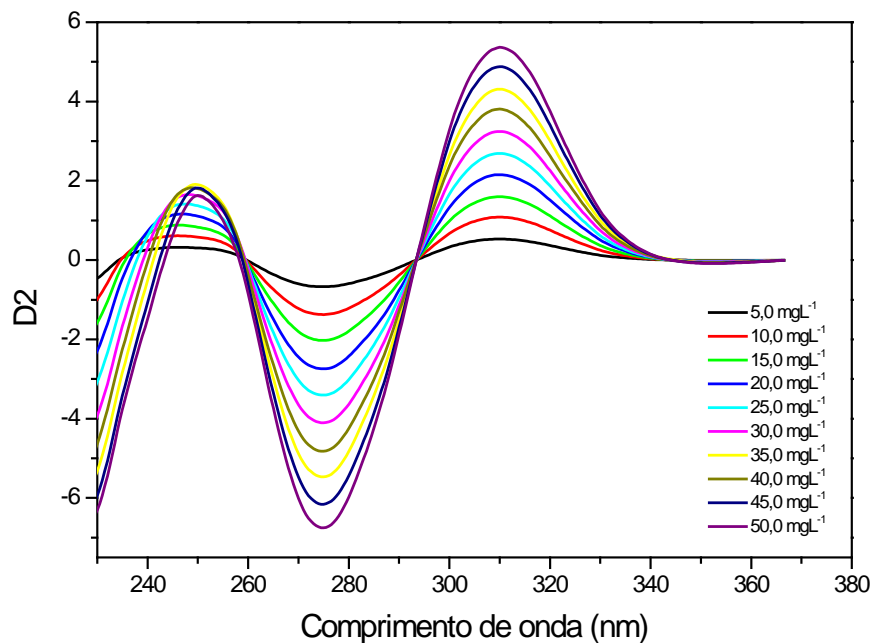


FIGURA 4.35 – Espectros derivados de 2ª ordem de olanzapina em etanol ( $\Delta\lambda = 10$ ) variando a concentração



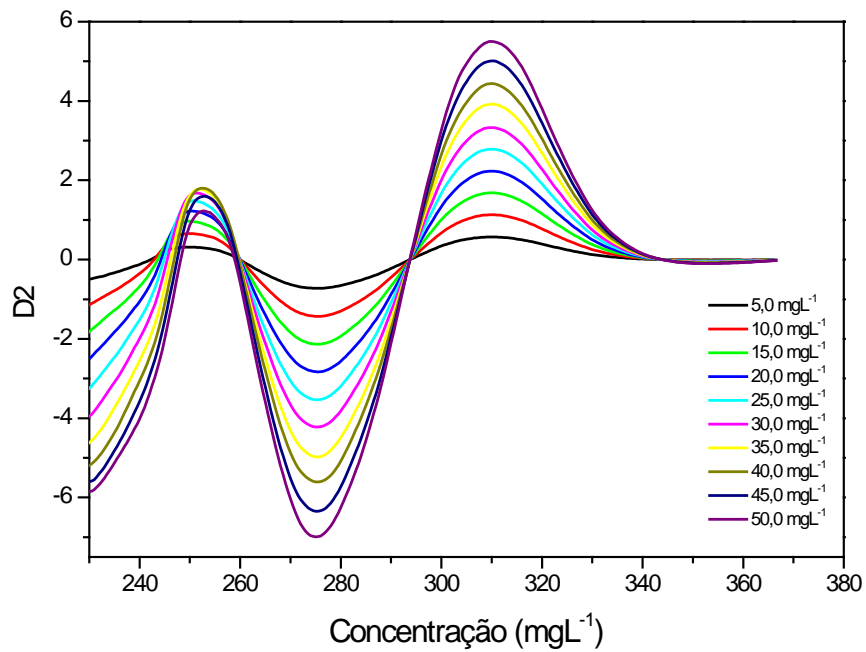


FIGURA 4.36 – Espectros derivados de 2<sup>a</sup> ordem de olanzapina em isopropanol ( $\Delta\lambda = 10$ ) variando a concentração

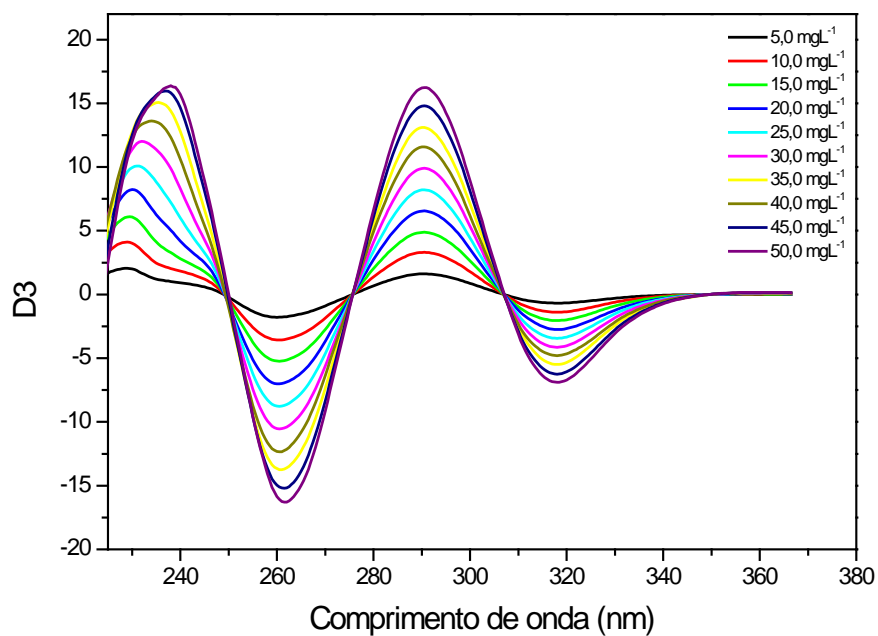


FIGURA 4.37 – Espectros derivados de 3<sup>a</sup> ordem de olanzapina em etanol ( $\Delta\lambda = 10$ ) variando a concentração

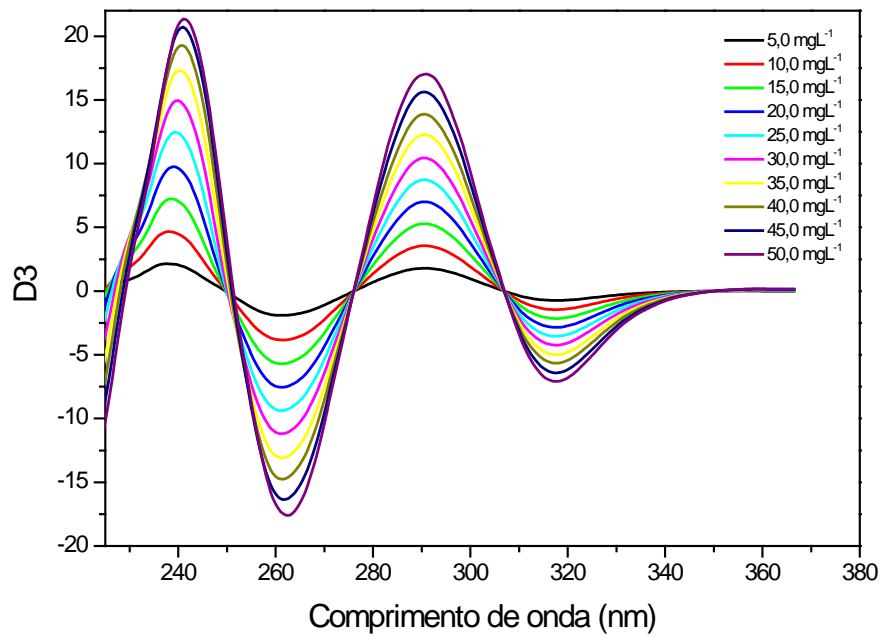


FIGURA 4.38 – Espectros derivados de 3ª ordem de olanzapina em isopropanol ( $\Delta\lambda = 10$ ) variando a concentração

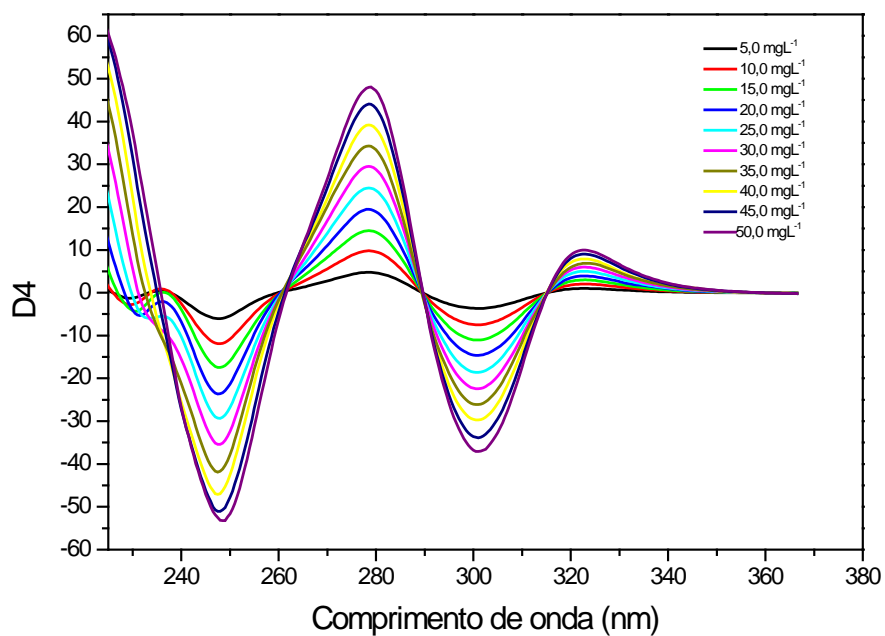


FIGURA 4.39 – Espectros derivados de 4ª ordem de olanzapina em etanol ( $\Delta\lambda = 10$ ) variando a concentração

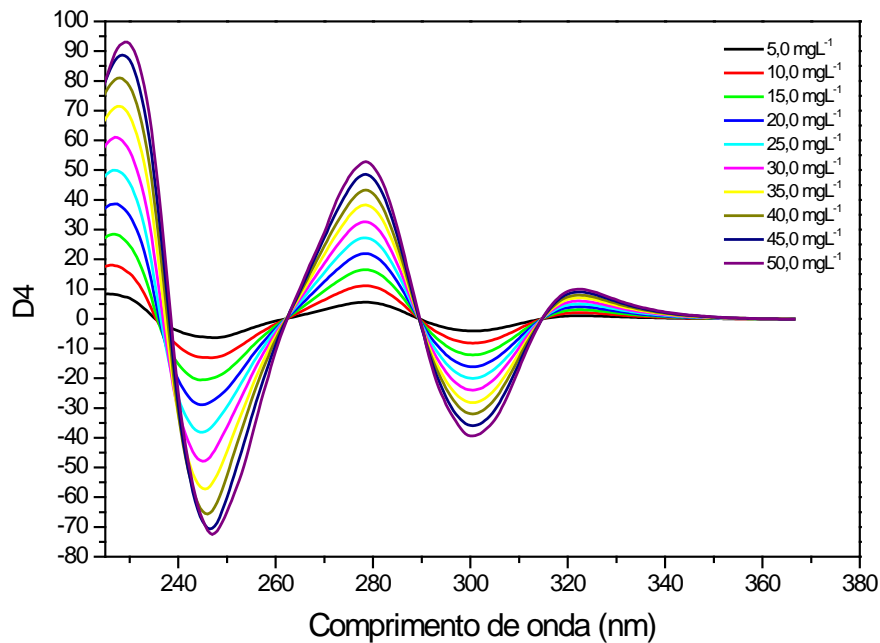


FIGURA 4.40 – Espectros derivados de 4ª ordem de olanzapina em isopropanol ( $\Delta\lambda = 10$ ) variando a concentração

#### 4.9 – Método de duplo comprimento de onda

Outro método aplicado para eliminar interferências causadas por excipientes na análise de olanzapina foi o de duplo comprimentos de onda. Ele está baseado no fato de que, o sinal obtido por uma solução que contenha leve turbidez referente a partículas em suspensão é devido ao somatório da absorbância do componente de interesse mais o sinal provocado pelo espalhamento da radiação. Baseado nisto o sinal obtido pelo componente de interesse passa a ser a diferença entre o sinal total obtido e o sinal do interferente (Perkampus, 1992).

A Figura 4.41 mostra um espectro de olanzapina em etanol a  $10 \text{ mg L}^{-1}$ . Na amostra o aumento da absorbância a partir de 320 nm não mostra a absorção do composto, mas sim causada pelo espalhamento provocado por algum interferente. Como foi observado anteriormente, o excipiente estearato de magnésio forma uma suspensão em ambos os solventes que causa um aumento do sinal em toda a região espectral estudada.

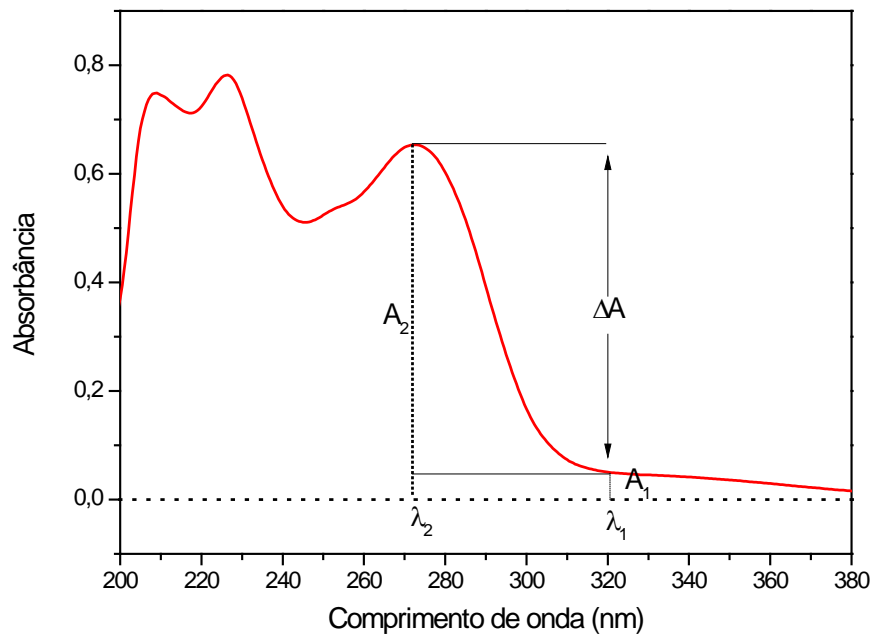


FIGURA 4.41 – Ilustração da aplicação do método dos dois comprimentos de onda

Este método foi aplicado considerando que o sinal obtido em 272,5 nm para etanol é igual à soma da absorbância da olanzapina mais o sinal provocado pelo excipiente em suspensão. O sinal referente a olanzapina ( $\Delta A$ ) foi calculado como sendo o sinal obtido em 272,5 nm para etanol ( $\lambda_1$ ) menos o sinal em 320,0 nm ( $\lambda_2$ ).

$$\Delta A = A_{272,5} - A_{320,0}$$

Em isopropanol o método foi aplicado de forma semelhante utilizando o comprimento de onda de 273,0 nm ao invés de 272,5 como o referente à soma do sinal da olanzapina mais o sinal provocado pelo excipiente em suspensão.

#### 4. 10 - Linearidade, limite de detecção e quantificação

A linearidade de um método é sua capacidade de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra dentro de um intervalo especificado (Ribeiro et al., 2008). A linearidade do método foi avaliada pela construção de curvas de calibração obtidas por regressão linear, através

do método dos mínimos quadrados, que fornece uma equação no formato  $y = a + bx$  (Custódio, et al., 1997; Pimentel et al., 1996).

As Tabelas 4.1 e 4.2 apresentam os parâmetros das curvas de calibração obtidas usando como solvente etanol e isopropanol, respectivamente. Observa-se que as curvas de calibração obtiveram todos os coeficientes de correlação maiores que 0,9998, valor que é melhor do que o do método proposto por Jasińska (2003) utilizando a oxidação da olanzapina ( $r = 0,9983$ ) o qual utiliza reações paralelas e requer o uso de muitos reagentes. O valor que a ANVISA (2003) estabelece é  $r > 0,99$ , portanto os métodos desenvolvidos apresentam linearidade satisfatória.

Observa-se que, em ambos os solventes, a maioria dos métodos apresentam linearidade até  $50,0 \text{ mg L}^{-1}$ , com exceção dos métodos OZ em 226,5 nm e 3D em 260,5 nm em etanol (Tabela 4.1) e OZ em 226,5 nm e 3D em 361,0 nm em isopropanol (Tabela 4.2), que apresentaram desvios da lei de Beer (Skoog et al., 2002) abaixo desta concentração.

Através das equações de reta (Tabelas 4.1 e 4.2), observa-se que tanto em etanol como em isopropanol a aplicação dos métodos derivados levou um aumento da sensibilidade, pois em todos os casos houve um aumento no valor da inclinação da reta da curva de calibração com o aumento da ordem da derivada (Rocha et al., 2004).

O limite de detecção é a menor quantidade de analito presente em uma amostra que pode ser detectado, mas não necessariamente quantificado sob as mais diversas condições experimentais estabelecidas. O limite de quantificação difere do limite de detecção porque exige um determinado nível de precisão e exatidão aceitável (Leite, 2002; Skoog et al. 2002).

TABELA 4.1 - Parâmetros de calibração para os métodos analíticos propostos para quantificar olanzapina utilizado etanol como solvente

Método	$\lambda$ (nm)	Equação <sup>1</sup>	r	LOD (mg L <sup>-1</sup> )	LOQ (mg L <sup>-1</sup> )	LOL (mg L <sup>-1</sup> )
OZ	272,5	A = 0,003 + 0,064C	0,9999	0,7 10 <sup>-1</sup>	2,1 10 <sup>-1</sup>	50,0
OZ	226,5	A = 0,018 + 0,076C	0,9999	1,9 10 <sup>-1</sup>	5,8 10 <sup>-1</sup>	45,0
1D	296,5	D1= -0,004 - 0,116C	-0,9999	0,9 10 <sup>-1</sup>	2,3 10 <sup>-1</sup>	50,0
2D	310,0	D2= 0,004 + 0,108C	0,9999	1,6 10 <sup>-1</sup>	4,8 10 <sup>-1</sup>	50,0
2D	275,0	D2= -0,007 - 0,136C	-0,9998	1,7 10 <sup>-1</sup>	5,1 10 <sup>-1</sup>	50,0
3D	290,5	D3= 0,202 + 0,327C	0,9999	1,6 10 <sup>-1</sup>	4,7 10 <sup>-1</sup>	50,0
3D	260,5	D3=-0,432 - 0,327C	-0,9999	2,5 10 <sup>-1</sup>	7,6 10 <sup>-1</sup>	40,0
4D	301,0	D4= 0,086 - 0,747C	-0,9999	1,6 10 <sup>-1</sup>	4,9 10 <sup>-1</sup>	50,0
4D	278,5	D4= 0,077 + 0,972C	0,9998	1,7 10 <sup>-1</sup>	5,0 10 <sup>-1</sup>	50,0
$\Delta A$	$\lambda_2 - \lambda_1$	$\Delta A= 0,002 + 0,059C$	0,9999	0,9 10 <sup>-1</sup>	2,8 10 <sup>-1</sup>	50,0

<sup>1</sup>y = a + bx onde: a – intercepto de x com o eixo y e b – inclinação da reta.

OZ : ordem zero, 1D: primeira ordem, 2D: segunda ordem, 3D: terceira ordem, 4D: quarta ordem,  $\Delta A$ : método de duplo comprimento de onda.

LOD: limite de detecção, LOQ: limite de quantificação, LOL: limite de linearidade

r: coeficiente de correlação da reta

$\lambda_2$ : 272,5 nm,  $\lambda_1$ : 320,0 nm

No estudo em etanol (Tabela 4.1) o método OZ em 272,5 nm apresentou menores limites de detecção e quantificação 0,7 10<sup>-1</sup> e 2,1 10<sup>-1</sup> mg L<sup>-1</sup>, respectivamente, este de fato é decorrente do aumento da relação sinal/ruído do branco com a aplicação da espectrofotometria derivativa, que por consequência, aumentou o valor do DPR das medidas individuais. No estudo com isopropanol (Tabela 4.2) os menores limites de detecção e quantificação observados foram 0,3 10<sup>-1</sup> e 0,8 10<sup>-1</sup> mg L<sup>-1</sup> para o método 2D em 275,5 nm. Vale ressaltar que a relação sinal/ruído do branco aumentou a partir da 3ª ordem de derivada.

Na aplicação do método de duplo comprimento de onda, observa-se que houve uma pequena diminuição da sensibilidade com relação ao espectro de ordem zero devido à diminuição do sinal analítico após eliminação do interferente.

TABELA 4.2 - Parâmetros de calibração para os métodos analíticos propostos para quantificar olanzapina utilizado isopropanol como solvente

Método	$\lambda$ (nm)	Equação <sup>1</sup>	r	LOD (mg L <sup>-1</sup> )	LOQ (mg L <sup>-1</sup> )	LOL (mg L <sup>-1</sup> )
OZ	273,0	A = 0,026 + 0,064C	0,9999	1,7 10 <sup>-1</sup>	5,1 10 <sup>-1</sup>	50,0
OZ	226,5	A = 0,043 + 0,075C	0,9998	2,1 10 <sup>-1</sup>	6,2 10 <sup>-1</sup>	45,0
1D	297,0	D1= -0,029 - 0,116C	-0,9999	1,1 10 <sup>-1</sup>	3,2 10 <sup>-1</sup>	50,0
2D	310,0	D2= 0,029 + 0,110C	0,9999	0,4 10 <sup>-1</sup>	1,2 10 <sup>-1</sup>	50,0
2D	275,5	D2= -0,036 - 0,140C	-0,9999	0,3 10 <sup>-1</sup>	0,8 10 <sup>-1</sup>	50,0
3D	290,5	D3= 0,079 + 0,346C	0,9999	0,3 10 <sup>-1</sup>	0,9 10 <sup>-1</sup>	50,0
3D	261,0	D3=-0,558 - 0,341C	-0,9999	0,5 10 <sup>-1</sup>	1,6 10 <sup>-1</sup>	45,0
4D	300,5	D4=-0,281 - 0,790C	-0,9999	0,5 10 <sup>-1</sup>	1,5 10 <sup>-1</sup>	50,0
4D	278,5	D4= 0,599 + 1,062C	0,9998	0,3 10 <sup>-1</sup>	1,0 10 <sup>-1</sup>	50,0
$\Delta A$	$\lambda_2 - \lambda_1$	$\Delta A= 0,013 + 0,060C$	0,9999	1,0 10 <sup>-1</sup>	2,9 10 <sup>-1</sup>	50,0

<sup>1</sup>y = a + bx onde: a – intercepto de x com o eixo y e b – inclinação da reta.

OZ : ordem zero, 1D: primeira ordem, 2D: segunda ordem, 3D: terceira ordem, 4D: quarta ordem,  $\Delta A$ : método duplo comprimento de onda.

LOD: limite de detecção, LOQ: limite de quantificação, LOL: limite de linearidade

r: coeficiente de correlação da reta

$\lambda_2$ : 273,0 nm,  $\lambda_1$ : 320,0 nm

Comparado os resultados obtidos com alguns métodos existentes na literatura, os valores de LOQ são menores que os dos métodos espectrofotométricos, que utilizam reagentes tóxicos e reações paralelas ( $> 0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) (Raggi et al. 2000; Krebs et al. 2006), eletroforéticos ( $> 0,3 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) e voltamétricos ( $> 3,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) (Raggi et al. 2000), porém um pouco maiores quando comparados aos métodos cromatográficos (HPLC) que apresentam valores inferiores a  $10 \text{ ng mL}^{-1}$ , entretanto os métodos cromatográficos são mais caros do que os espectrofotométricos (Saracino et al., 2006; Nirogi et al., 2006).

A linearidade foi avaliada apenas até  $50,0 \text{ mg L}^{-1}$  devido às limitações do espectrofotômetro utilizado. As soluções utilizadas em todos os estudos tiveram concentrações superiores a  $5,0 \text{ mg L}^{-1}$ , bem maiores que os limites de quantificação e detecção encontrados.

## 4. 11 – Análise quantitativa

### 4.11.1- Preparo da amostra

A amostra produzida na planta piloto do NTF/UFPI não possui revestimento, assim ela foi facilmente triturada e homogeneizada. Logo após a sua solubilização observou-se um pouco de material suspenso e o restante precipitado. Após cerca de 30 minutos a solução tornou-se límpida, devido a decantação dos excipientes.

A amostra de comprimido Zyprexa<sup>®</sup> possui um revestimento, que durante o processo de trituração deixa partículas de tamanhos variáveis, tornando a amostra pouco homogênea o que pode afetar diretamente na reprodutibilidade das réplicas amostrais. Outro problema observado foi que, ao serem dissolvidas em ambos os solventes, formaram suspensões com forte turbidez, que podem estar relacionadas às partículas em suspensão do excipiente estearato de magnésio.

Uma alternativa encontrada para obter uma melhor trituração do comprimido Zyprexa<sup>®</sup> e resolver o problema da baixa homogeneidade da amostra foi congelar os comprimidos em nitrogênio líquido por cerca de 20 a 30 minutos. Após este período, o revestimento tornou-se quebradiço possibilitando sua trituração e melhor homogeneização.

Em relação ao efeito dos excipientes, alguns autores que utilizaram esta amostra realizaram técnicas como extração, ajuste do pH, agitação em banho ultrassom (Raggi et al., 2000), filtração (Krebs et al., 2006; Revanasiddappa et al., 2008) e centrifugação (Jasińska et al., 2003; Firdous et al., 2005) afim de se eliminar os sinais dos excipientes.

Neste trabalho foi testado o uso do banho ultrassom para tentar dissolver os excipientes e a filtração em papel de filtro e lã de vidro para a separação. Utilizando o banho ultrassom observou-se não haver nenhuma melhora no espectro de olanzapina, inclusive em alguns casos houve uma diminuição drástica do sinal obtido, provavelmente causada pela degradação da substância em virtude do aumento da temperatura causado pelo ultrassom. O processo de filtração com papel filtro foi



bastante demorado (cerca de 2 horas) e pouco eficiente na separação. Utilizando a lã de vidro a filtração foi mais rápida, no entanto menos eficiente que em papel filtro.

Por fim, centrifugou-se a suspensão da amostra, com isso os excipientes precipitaram de forma eficiente e a solução sobrenadante obtida apresentou aspecto amarelo transparente.

#### 4.11.2 – Exatidão

A exatidão de um dado método analítico representa o grau de concordância entre resultados individuais encontrados e um valor aceito como referência (ANVISA, 2003). Um método com boa exatidão sugere que não há erros sistemáticos inerentes ao processo (Mendhan et al., 2002).

Os primeiros ensaios com as duas amostras foram realizados preparando as soluções estoque e deixando em repouso por um período de 30 minutos protegida da luz. Após este período, de cada solução, foi retirado apenas o sobrenadante para as etapas de diluição das soluções para análise. As Figuras 4.42 e 4.43 ilustram a interferência causada pelos excipientes na amostras de comprimido Zyprexa<sup>®</sup> comparado a amostra produzida na planta piloto NTF e uma solução de olanzapina.

Para o Zyprexa<sup>®</sup> observa-se que a ação dos excipientes ocorre durante toda a faixa espectral (Figuras 4.42 e 4.43) aumentando a linha de base e conseqüentemente o sinal da referida amostra nos comprimentos de onda estudados. O grau de interferência das substâncias presentes foi analisado através do método de adição e recuperação de padrão (Ribani et al, 2004) em três níveis diferentes e os resultados encontram-se nas Tabelas 4.3 e 4. 4.

Na amostra produzida em planta piloto pelo NTF/UFPI, não foi observado interferência significativa pelos excipientes do comprimido, pois as recuperações ficaram entre 99 e 105 % em etanol e entre 98 e 104 % em isopropanol. Percebe-se também que esta amostra é mais homogênea, e, portanto a amostragem é mais reprodutível, pois os valores de DPR foram menores que 5,0% (Tabela 4.3).

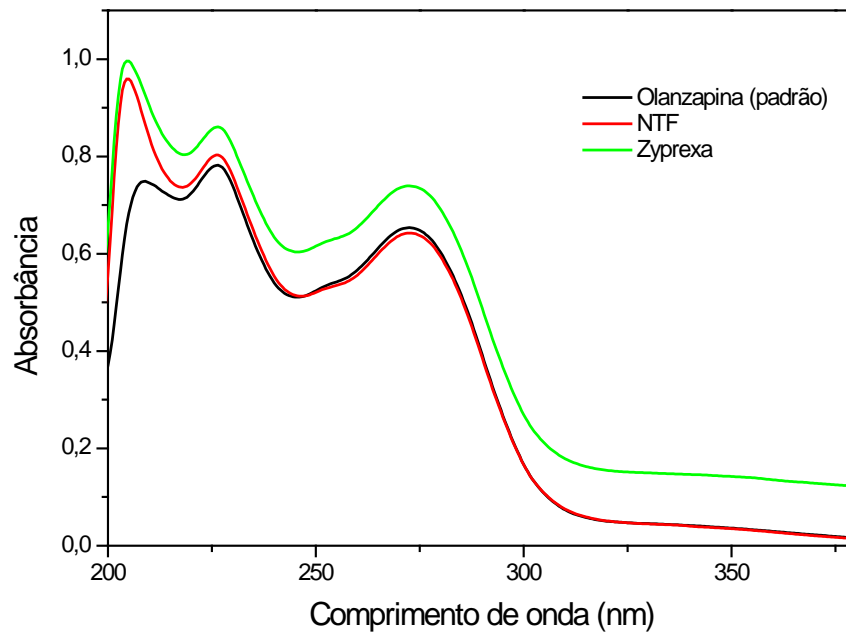


FIGURA 4.42– Espectro de olanzapina a  $10 \text{ mg L}^{-1}$  em etanol comparado com os espectros das amostras comerciais na mesma concentração

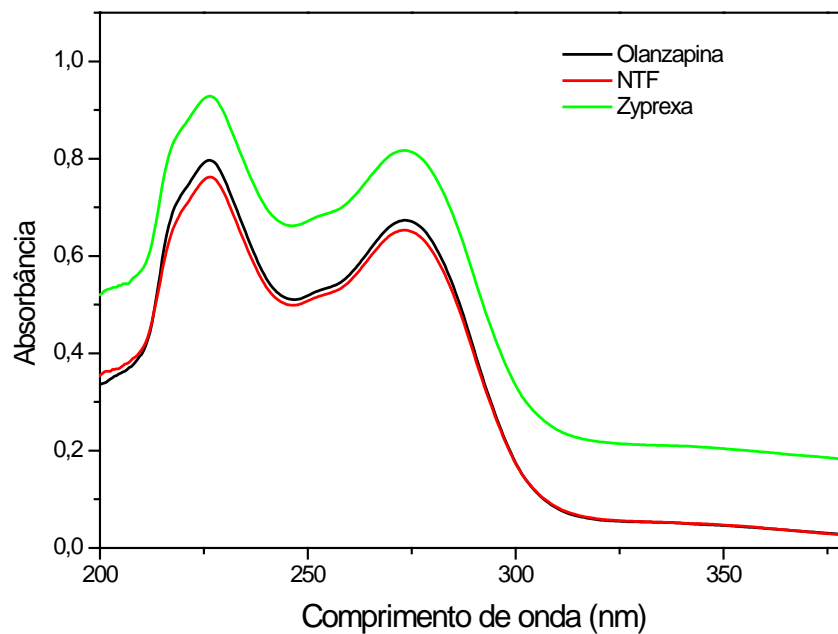


FIGURA 4.43– Espectro de olanzapina a  $10 \text{ mg L}^{-1}$  em isopropanol comparado com os espectros das amostras comerciais na mesma concentração

TABELA 4.3 - Teste de adição e recuperação de padrão para os métodos propostos para a amostra na planta piloto utilizando o sobrenadante

Etanol					Isopropanol				
Método ( $\lambda$ , nm)	Adicionado (mgL <sup>-1</sup> )	Rec. (mgL <sup>-1</sup> )	Rec. (%)	DPR (%)	Método ( $\lambda$ , nm)	Adicionado (mgL <sup>-1</sup> )	Rec. (mgL <sup>-1</sup> )	Rec. (%)	DPR (%)
OZ (272,5)	5,1	5,3	104	1,3	OZ (273,0)	5,1	5,2	101	3,2
	10,2	10,1	100	2,1		10,2	10,1	99	2,2
	15,3	15,3	101	0,1		15,3	15,4	101	1,7
OZ (226,5)	5,1	5,1	100	2,8	OZ (226,5)	5,1	5,1	99	4,9
	10,2	10,1	100	1,2		10,2	10,0	98	1,9
	15,3	15,4	101	1,9		15,3	15,3	99	1,1
1D (296,5)	5,1	5,1	100	0,5	1D (297,0)	5,1	5,1	99	3,3
	10,2	10,3	100	0,3		10,2	10,0	99	1,0
	15,3	15,4	100	0,9		15,3	15,4	101	1,0
2D (310,0)	5,1	5,3	103	2,3	2D (310,0)	5,1	5,2	103	2,8
	10,2	10,3	100	1,6		10,2	10,1	99	1,4
	15,3	15,4	100	0,6		15,3	15,1	99	1,9
2D (275,0)	5,1	5,2	101	2,9	OZ (275,5)	5,1	5,0	99	1,7
	10,2	10,3	101	1,6		10,2	10,1	100	0,4
	15,3	15,3	100	0,8		15,3	15,1	99	0,7
3D (290,5)	5,1	5,3	103	1,7	3D (290,5)	5,1	5,2	102	1,7
	10,2	10,3	101	1,6		10,2	10,1	99	1,6
	15,3	15,2	100	1,3		15,3	15,1	98	1,5
3D (260,5)	5,1	5,3	105	3,3	3D (261,0)	5,1	5,2	102	3,0
	10,2	10,2	100	1,6		10,2	10,3	100	1,9
	15,3	15,3	100	0,8		15,3	15,5	101	1,2
4D (301,0)	5,1	5,2	101	1,7	4D (300,5)	5,1	5,3	104	2,9
	10,2	10,2	100	1,6		10,2	10,4	102	0,7
	15,3	15,1	99	1,1		15,3	15,0	98	1,1
4D (278,5)	5,1	5,2	102	2,7	4D (278,5)	5,1	5,0	97	4,1
	10,2	10,4	101	1,1		10,2	10,0	98	1,9
	15,3	15,2	100	0,9		15,3	15,0	98	1,3
$\Delta A$ ( $\lambda_2 - \lambda_1$ )	5,1	5,3	103	4,3	$\Delta A$ ( $\lambda_2 - \lambda_1$ )	5,1	5,2	103	4,0
	10,2	10,1	99	2,1		10,2	10,1	99	1,6
	15,3	15,4	100	0,2		15,3	15,5	101	0,7

OZ : ordem zero, 1D: primeira ordem, 2D: segunda ordem, 3D: terceira ordem, 4D: quarta ordem,  $\Delta A$ : método de duplo comprimento de onda.

DPR: Desvio padrão relativo

$\lambda_2$ : 272,5 nm (etanol),  $\lambda_2$ : 273,0 nm (isopropanol)  $\lambda_1$ : 320,0 nm

As partículas em suspensão causam grande interferência na análise do comprimido Zyprexa<sup>®</sup>, pois as recuperações obtidas (Tabela 4.4) para os métodos, em ambos os solventes, para ordem zero tiveram valores que variaram de 110 a 115 % em função do espalhamento da radiação. Observa-se que nem mesmo empregando o método de duplo comprimento de onda foram eliminados o efeito dos interferentes, o

que provocou um significativo aumento no sinal, que é característico de um erro sistemático (Mendhan et al., 2002).

TABELA 4.4 - Teste de adição e recuperação de padrão para os métodos propostos para o comprimido Zyprexa<sup>®</sup> utilizando o sobrenadante

Etanol					Isopropanol				
Método ( $\lambda$ , nm)	Adicionado (mgL <sup>-1</sup> )	Rec. (mgL <sup>-1</sup> )	Rec. (%)	DPR (%)	Método ( $\lambda$ , nm)	Adicionado (mgL <sup>-1</sup> )	Rec. (mgL <sup>-1</sup> )	Rec. (%)	DPR (%)
OZ (272,5)	5,0	5,6	113	5,4	OZ (273,0)	5,0	5,7	113	9,2
	10,0	11,5	115	8,0		10,0	11,4	114	10,4
	15,0	17,0	113	3,9		15,0	16,9	113	7,4
OZ (226,5)	5,0	5,7	114	6,1	OZ (226,5)	5,0	5,5	110	6,4
	10,0	11,1	111	5,0		10,0	11,1	111	8,0
	15,0	16,6	111	8,7		15,0	17,0	113	5,8
1D (296,5)	5,0	5,5	110	4,4	1D (297,0)	5,0	5,4	108	4,7
	10,0	10,7	107	5,9		10,0	10,9	108	6,6
	15,0	16,4	109	5,4		15,0	16,1	107	7,1
2D (310,0)	5,0	5,4	108	4,0	2D (310,0)	5,0	5,4	107	5,8
	10,0	10,9	109	6,0		10,0	10,9	109	9,1
	15,0	16,5	110	4,8		15,0	16,3	108	7,8
2D (275,0)	5,0	5,5	109	7,4	2D (275,5)	5,0	5,5	110	4,9
	10,0	11,0	110	5,4		10,0	10,8	108	6,7
	15,0	16,3	108	9,0		15,0	16,5	110	4,0
3D (290,5)	5,0	5,8	115	8,4	3D (290,5)	5,0	5,7	115	9,1
	10,0	11,0	110	4,8		10,0	11,4	114	5,5
	15,0	16,5	110	6,6		15,0	16,4	109	3,9
3D (260,5)	5,0	5,7	114	6,4	3D (261,0)	5,0	5,6	112	10,1
	10,0	11,1	111	9,5		10,0	11,7	117	7,4
	15,0	16,9	112	5,9		15,0	16,8	112	5,8
4D (301,0)	5,0	5,6	113	8,6	4D (300,5)	5,0	5,6	112	6,7
	10,0	11,1	111	7,1		10,0	11,6	116	7,3
	15,0	16,9	113	8,3		15,0	17,0	113	6,0
4D (278,5)	5,0	5,8	116	6,7	4D (278,5)	5,0	5,8	115	7,3
	10,0	11,7	118	9,3		10,0	11,7	117	9,0
	15,0	17,0	113	5,6		15,0	17,2	114	5,1
$\Delta A$ ( $\lambda_2 - \lambda_1$ )	5,0	5,7	113	7,9	$\Delta A$ ( $\lambda_2 - \lambda_1$ )	5,0	5,7	115	4,3
	10,0	11,3	113	6,9		10,0	11,0	110	7,2
	15,0	17,2	115	6,4		15,0	17,1	114	5,6

OZ : ordem zero, 1D: primeira ordem, 2D: segunda ordem, 3D: terceira ordem, 4D: quarta ordem,  $\Delta A$ : método de duplo comprimento de onda.

DPR: Desvio padrão relativo

$\lambda_2$ : 272,5 nm (etanol),  $\lambda_2$ : 273,0 nm (isopropanol)  $\lambda_1$ : 320,0 nm

É possível perceber também na Tabela 4.4 o quanto a heterogeneidade da amostra de Zyprexa<sup>®</sup> afeta na sua análise. O valor de DPR referente às replicatas, em

cada nível, ficou entre 3,9 e 10,4%, mostrando o baixo grau de reprodutibilidade. Mesmo aplicando métodos derivativos, houve apenas uma pequena diminuição no sinal dos interferentes apresentando recuperações entre 107 e 117 %, porém, ainda com um elevado valor de DPR.

Após os processo de congelamento e centrifugação das amostras de comprimido Zyprexa<sup>®</sup>, as recuperações (Tabela 4.5) com o solvente etanol, nos três níveis de concentração, variaram de 97 % a 103 % e com isopropanol tiveram uma variação de recuperação entre 97 % e 105 %.

Isto mostra que, durante o processo de separação dos excipientes não houve perdas de padrão adicionado e as diferenças obtidas nos valores de recuperação podem estar relacionadas a erros de caráter aleatório (Mendham et al., 2002). Observa-se também uma diminuição no valor do DPR (< 5%) mostrando que a amostra ficou mais homogênea (Tabela 4.5).

Foi observado, em todos os casos, que a partir da 3<sup>a</sup> ordem de derivada, os espectros apresentaram ruído, mesmo quando suavizados antes da derivação. Todos os métodos apresentaram exatidão satisfatória, e, segundo o teste estatístico ANOVA ( $p=0,05$ ) (Miller et al., 2002), não apresentam diferenças significativas.

Os métodos apresentam exatidão equivalente aos métodos espectrofotométricos propostos por Firdous et al. (2005), Revanassidappa et al. (2008), Jasińska (2003), Mohamed (2008), e Raggi et al. (2000), entretanto, são mais rápidos, pois envolvem menos etapas no preparo da amostra. As recuperações obtidas foram melhores que o método proposto por Krebs et al. (2006) para quantificar olanzapina em amostras farmacêuticas que tem um intervalo de recuperação entre 94 a 96 %.

TABELA 4.5 - Teste de adição e recuperação de padrão para os métodos propostos para o comprimido Zyprexa<sup>®</sup> utilizando o sobrenadante após centrifugação

Etanol					Isopropanol				
Método ( $\lambda$ , nm)	Adicionado (mgL <sup>-1</sup> )	Rec. (mgL <sup>-1</sup> )	Rec. (%)	DPR (%)	Método ( $\lambda$ , nm)	Adicionado (mgL <sup>-1</sup> )	Rec. (mgL <sup>-1</sup> )	Rec. (%)	DPR (%)
OZ (272,5)	5,0	5,0	100	1,9	OZ (273,0)	5,0	4,9	99	4,0
	10,0	10,1	101	0,6		10,0	10,0	99	2,9
	15,0	15,1	101	0,9		15,0	15,2	101	1,1
OZ (226,5)	5,0	5,1	101	3,4	OZ (226,5)	5,0	5,1	103	1,8
	10,0	10,1	101	0,9		10,0	9,9	99	2,9
	15,0	15,3	101	1,0		15,0	15,1	101	2,0
1D (296,5)	5,0	5,0	99	1,1	1D (297,0)	5,0	4,9	99	2,3
	10,0	10,0	100	0,9		10,0	9,9	99	0,9
	15,0	15,1	101	0,9		15,0	14,9	99	1,2
2D (310,0)	5,0	4,9	98	1,1	2D (310,0)	5,0	5,2	103	2,8
	10,0	10,0	100	2,2		10,0	10,6	102	1,0
	15,0	15,0	100	0,8		15,0	15,3	102	0,4
2D (275,0)	5,0	5,2	101	2,2	OZ (275,5)	5,0	5,0	99	3,4
	10,0	10,3	101	2,7		10,0	10,1	101	1,8
	15,0	15,3	100	1,3		15,0	15,2	101	1,4
3D (290,5)	5,0	4,9	98	1,4	3D (290,5)	5,0	5,1	102	4,7
	10,0	10,0	100	1,7		10,0	10,1	101	2,0
	15,0	14,9	99	0,2		15,0	15,2	101	2,0
3D (260,5)	5,0	5,1	101	1,4	3D (261,0)	5,0	5,2	105	2,6
	10,0	10,3	103	1,2		10,0	10,0	100	2,0
	15,0	15,2	101	0,6		15,0	15,4	103	0,7
4D (301,0)	5,0	4,9	98	1,8	4D (300,5)	5,0	5,2	104	2,4
	10,0	9,9	99	2,2		10,0	10,2	102	1,3
	15,0	14,7	98	0,4		15,0	15,4	102	1,0
4D (278,5)	5,0	4,9	97	1,3	4D (278,5)	5,0	4,9	97	4,4
	10,0	10,2	102	1,1		10,0	9,8	98	2,3
	15,0	15,3	102	0,3		15,0	14,6	98	1,2
$\Delta A$ ( $\lambda_1 - \lambda_2$ )	5,0	5,0	100	2,5	$\Delta A$ ( $\lambda_1 - \lambda_2$ )	5,0	5,1	102	1,7
	10,0	10,1	101	2,6		10,0	10,1	101	1,2
	15,0	14,9	100	1,5		15,0	15,2	101	1,0

OZ : ordem zero, 1D: primeira ordem, 2D: segunda ordem, 3D: terceira ordem, 4D: quarta ordem,  $\Delta A$ : método de duplo comprimento de onda.

DPR: Desvio padrão relativo

$\lambda_2$ : 272,5 nm (etanol),  $\lambda_2$ : 273,0 nm (isso-propanol)  $\lambda_1$ : 320,0 nm

### 4.11.3 - Precisão

A precisão de um método representa o grau de repetitividade entre resultados das análises individuais, quando o procedimento é aplicado numa mesma amostra homogênea diversas vezes nas mesmas condições de ensaio (ANVISA, 2003). A precisão mostra o grau de dispersão dos resultados individuais obtidos sob determinadas condições de análise (Mendhan et al. 2002).

O estudo de precisão foi realizado somente com as soluções de comprimido Zyprexa<sup>®</sup>, pois esta amostra é mais complexa e envolve um processo de separação no seu preparo. A precisão foi realizada em termos de diferentes dias, analistas e laboratórios, em três níveis diferentes de concentração.

A precisão intermediária dos métodos foi avaliada comparando-se os resultados obtidos com o mesmo analista em dias distintos, no mesmo laboratório. Já a precisão entre analistas foi realizada por dois analistas diferentes, em dias distintos, no mesmo laboratório. Este ensaio foi realizado a fim de verificar se no mesmo laboratório o método fornece os mesmos resultados (Leite, 2002).

A Tabela 4.6 mostra os resultados da precisão variando dia e analista tendo etanol como solvente. Observa-se que para todos os métodos, os desvios padrão relativo (DPR) encontrados foram menores que o máximo estabelecido pela ANVISA, 5,0 %, sendo, portanto os métodos considerados precisos.

A comparação através do teste  $F$  para comparação das variâncias e teste  $t$  pareado para comparação das médias com limite de 95% de confiança (Skoog et al, 2006), mostrou não haver diferença significativa nas precisões e médias com a mudança de dia e de analista.

Para avaliar o grau de reprodutibilidade das metodologias propostas foi realizado um ensaio interlaboratorial no laboratório da Farmácia Escola da UFPI. Este teste foi desenvolvido por um analista que nunca havia trabalhado com o método e o executou em todas as etapas, desde o preparo da amostra, obtenção dos espectros, construção da curva de calibração, até os ensaios de precisão.

TABELA 4.6 - Precisão inter-dia e entre analista para os métodos utilizando etanol como solvente

Método ( $\lambda$ , nm)	Nível Concentração (mgL <sup>-1</sup> )	Analista 1		Analista 2
		1º dia DPR(%)	2º dia DPR(%)	3º dia DPR(%)
OZ (272,5)	5,0	0,6	1,0	1,1
	10,0	0,9	0,9	0,9
	15,0	0,7	1,0	0,7
OZ (226,5)	5,0	0,9	1,1	1,1
	10,0	0,7	0,7	1,3
	15,0	1,1	0,9	1,1
1D (296,5)	5,0	0,4	0,5	0,7
	10,0	0,1	0,8	0,4
	15,0	0,7	0,7	0,9
2D (310,0)	5,0	0,6	0,8	0,6
	10,0	0,5	0,4	0,7
	15,0	0,9	0,6	1,0
2D (275,0)	5,0	0,7	0,5	0,4
	10,0	1,0	0,7	0,7
	15,0	0,8	1,1	0,9
3D (290,5)	5,0	0,6	0,5	0,6
	10,0	0,5	0,6	1,0
	15,0	0,6	0,9	0,6
3D (260,5)	5,0	0,8	0,5	1,2
	10,0	0,6	0,9	1,0
	15,0	0,7	0,5	0,8
4D (301,0)	5,0	0,8	0,6	0,9
	10,0	0,6	0,6	1,0
	15,0	0,7	1,0	1,2
4D (278,5)	5,0	1,0	0,7	1,5
	10,0	0,8	0,9	1,2
	15,0	0,7	0,9	1,0
$\Delta A$ ( $\lambda_2 - \lambda_1$ )	5,0	0,6	0,4	0,4
	10,0	0,4	0,5	0,5
	15,0	0,6	0,7	0,8

OZ : ordem zero, 1D: primeira ordem, 2D: segunda ordem, 3D: terceira ordem, 4D: quarta ordem,  $\Delta A$ : método de duplo comprimento de onda.

DPR: Desvio padrão relativo

$\lambda_2$ : 272,5 nm  $\lambda_1$ : 320,0 nm

Observa-se na Tabela 4.7 que os valores de desvio padrão relativo (DPR) foram maiores quando comparados aos dos ensaios intra dia, o que já era esperado uma vez que o espectrofotômetro utilizado pelo analista 3 era mais simples e não dispunha de todos os recursos (suavização, escolha de velocidade de varredura e



abertura de fenda) que o aparelho utilizado nos estudos anteriores. Outro motivo para o desvio observado é representado pelo fato de o analista 3 jamais ter trabalhado com o método, diferentemente dos analistas 1 e 2 que desenvolveram os métodos.

TABELA 4.7 - Precisão inter-laboratorial para os métodos utilizando etanol como solvente

Método ( $\lambda$ , nm)	Nível Concentração (mgL <sup>-1</sup> )	Analista	
		1 DPR(%)	3 DPR(%)
OZ (272,5)	5,0	0,6	4,8
	10,0	0,9	3,8
	15,0	0,7	2,6
OZ (226,5)	5,0	0,9	4,4
	10,0	0,7	4,0
	15,0	1,1	2,6
$\Delta A$ ( $\lambda_2 - \lambda_1$ )	5,0	0,6	3,9
	10,0	0,4	2,7
	15,0	0,6	5,0

OZ : ordem zero, 1D: primeira ordem, 2D: segunda ordem, 3D: terceira ordem, 4D: quarta ordem,  $\Delta A$ : método de duplo comprimento de onda.

DPR: Desvio padrão relativo

$\lambda_2$ : 272,5 nm  $\lambda_1$ : 320,0 nm

Comparando os valores encontrados neste ensaio com o teste de repetitividade (inter-dia) através da aplicação do teste *F* e teste *t* com limite de 95% de confiança (Skoog et al, 2006), observou-se haver uma diferença significativa entre as precisões e as médias. Entretanto os valores de DPR ficaram abaixo do limite máximo estabelecido pela ANVISA (2003), utilizando um equipamento simples e analista não treinado, e a precisão ainda é considerada boa.

A Tabela 4.8 mostra os resultados de precisão utilizando isopropanol como solvente variando o dia e o analista. Os DPR mostram que os métodos possuem uma boa precisão (DPR < 5,0%) nos três níveis de concentrações estudados. Verificou-se pelos ensaios inter-dia e entre analistas que todos os métodos são precisos com a mudança de dia e de analista e produzem resultados que não se diferenciam significativamente (Teste *t* e teste *F*, com 95% de confiança).

TABELA 4.8 - Precisão inter-dia e entre analista para os métodos utilizando isopropanol como solvente

Método ( $\lambda$ , nm)	Nível Concentração (mgL <sup>-1</sup> )	Analista 1		Analista 2
		1º dia DPR(%)	2º dia DPR(%)	3º dia DPR(%)
OZ (273,0)	5,0	0,8	1,1	1,8
	10,0	1,2	1,4	1,1
	15,0	1,6	1,0	1,3
OZ (226,5)	5,0	1,0	0,9	1,5
	10,0	1,1	1,4	2,0
	15,0	1,6	1,3	1,8
1D (297,0)	5,0	0,9	0,7	1,0
	10,0	1,4	1,1	1,4
	15,0	1,1	1,3	2,0
2D (310,0)	5,0	1,3	1,3	1,1
	10,0	0,9	0,8	2,2
	15,0	1,6	1,4	1,6
2D (275,5)	5,0	1,6	1,7	1,9
	10,0	1,9	1,5	1,4
	15,0	1,2	1,2	2,1
3D (290,5)	5,0	1,4	1,0	2,3
	10,0	2,0	1,5	1,1
	15,0	0,8	1,1	1,8
3D (261,0)	5,0	1,0	1,4	1,9
	10,0	1,6	1,2	1,4
	15,0	2,1	1,7	1,6
4D (300,5)	5,0	1,0	1,3	2,1
	10,0	1,9	1,0	1,9
	15,0	1,4	1,5	2,1
4D (278,5)	5,0	1,3	1,2	2,2
	10,0	2,0	1,8	2,0
	15,0	2,0	1,7	1,4
$\Delta A$ ( $\lambda_2 - \lambda_1$ )	5,0	1,1	1,1	1,9
	10,0	0,9	1,8	1,3
	15,0	1,5	1,6	1,0

OZ : ordem zero, 1D: primeira ordem, 2D: segunda ordem, 3D: terceira ordem, 4D: quarta ordem,  $\Delta A$ : método de duplo comprimento de onda.

DPR: Desvio padrão relativo

$\lambda_2$ : 273,0 nm (isso-propanol)  $\lambda_1$ : 320,0 nm

No caso da precisão inter-laboratorial (Tabela 4.9) observa-se que somente a banda em 273,0 nm apresentou resultado satisfatório (DPR < 5,0%), a banda em 226,5 nm mostrou não ter boa reprodutibilidade com valores de DPR bastante altos, devido a fortes ruídos que apareceram nesta região, dessa forma esse  $\lambda$  não é adequado para análise com isopropanol como solvente.

Comparando os resultados da banda em 273,0 no ensaio de repetitividade (inter-dia) e observa-se que, assim como ocorreu utilizando etanol, houve diferença significativa entre as precisões (Teste *t* e teste *F*,  $p=0,05$ ), no entanto a precisão ainda é aceita por apresentar resultado inferior ao que a ANVISA (2003) recomenda.

Baseado nesses resultados acredita-se que um analista que faça um treinamento prévio possa conseguir desvios menores.

TABELA 4.9 - Precisão inter-laboratorial para os métodos utilizando isopropanol como solvente

Método ( $\lambda$ , nm)	Nível Concentração (mgL <sup>-1</sup> )	Analista	
		1 DPR(%)	3 DPR(%)
OZ (273,0)	5,0	0,8	2,4
	10,0	1,2	2,1
	15,0	1,6	2,6
OZ (226,5)	5,0	1,0	45,7
	10,0	1,1	23,9
	15,0	1,6	21,9
$\Delta A$ ( $\lambda_2 - \lambda_1$ )	5,0	1,2	2,2
	10,0	0,9	2,1
	15,0	1,5	2,5

OZ : ordem zero, 1D: primeira ordem, 2D: segunda ordem, 3D: terceira ordem, 4D: quarta ordem,  $\Delta A$ : método de duplo comprimento de onda.

DPR: Desvio padrão relativo  
 $\lambda_2$ : 272,5 nm  $\lambda_1$ : 320,0 nm

Os métodos utilizando etanol como solvente apresentam menor DPR, porém todos os métodos propostos são similares em termos de precisão aos métodos espectrofotométricos que utilizam reações paralelas (precisão intra-dia DPR = 0,62% e precisão inter-dia DPR = 1,57%) propostos por Krebs et al. (2006) e mais precisos que os métodos por difração de raio-X que são métodos mais caros (precisão intra-dia DPR = 2,1% e precisão inter-dia DPR = 7,8%) propostos por Twari et al. (2006).

Nota-se que este estudo foi realizado apenas para ordem zero, pois o *software* do aparelho em que foi realizado o ensaio inter-laboratorial não permitia a variação do valor de  $\Delta\lambda$  na aplicação da derivada, o que de certa forma, acaba sendo uma limitação dos métodos derivativos.

#### 4.11.4- Teor de olanzapina

Para confirmar a aplicabilidade dos métodos propostos foi determinado olanzapina na amostra produzida na planta piloto do NTF e na amostra comercial Zyprexa<sup>®</sup>, ambas contendo 10 mg de olanzapina. O estudo foi realizado em triplicata e os resultados encontram-se nas Tabelas 4.10 e 4.11.

A Tabela 4.10 apresenta os resultados para as duas amostras em etanol nos métodos estudados onde se observa que o teor médio encontrado para a amostra produzida pelo NTF variou de 9,6 a 10,4 mg com DPR de 0,5 a 1,7 %. Para o comprimido Zyprexa<sup>®</sup> o teor encontrado foi de 9,9 a 10,1 mg com DPR de 0,5 a 2,5%.

TABELA 4.10 – Teor médio de olanzapina encontrada pelos métodos propostos nas amostras estudadas em etanol

Método ( $\lambda$ , nm)	Amostra NTF		Amostra Zyprexa <sup>®</sup>	
	Teor (mg)	DPR (%)	Teor (mg)	DPR (%)
OZ (272,5)	10,0	1,7	10,0	1,1
OZ (226,5)	10,5	0,7	9,9	1,5
1D (296,5)	10,0	0,7	10,0	0,8
2D (310,0)	9,8	1,5	10,0	1,9
2D (275,0)	9,6	1,1	9,9	0,5
3D (290,5)	10,0	0,6	10,1	2,1
3D (260,5)	10,2	0,5	10,1	2,5
4D (301,0)	10,0	1,7	10,1	1,4
4D (278,5)	10,0	1,5	9,9	1,0
$\Delta A$ ( $\lambda_2 - \lambda_1$ )	9,9	1,6	9,9	1,7

OZ : ordem zero, 1D: primeira ordem, 2D: segunda ordem, 3D: terceira ordem, 4D: quarta ordem,  $\Delta A$ : método de duplo comprimento de onda.

DPR: Desvio padrão relativo

$\lambda_2$ : 272,5 nm  $\lambda_1$ : 320,0 nm

Através do test  $t$  (Skoog et al., 2006) com limite de confiança de 95% foi verificado que os métodos OZ em 226,5 nm, 2D em 275,0 nm e 3D em 260,5 nm em etanol produzem resultados estatisticamente diferentes aos demais métodos apresentados quando se utilizou as amostras em planta piloto. Para o comprimido de Zyprexa<sup>®</sup> todos os métodos fornecem resultados que são considerados estatisticamente iguais.

Estes resultados devem ser decorrentes da diferença da forma farmacêutica do comprimido produzido em planta piloto pelo NTF, que não possuem revestimento e parte do comprimido fica aderido na embalagem.

Utilizando isopropanol como solvente (Tabela 4.11) em todos os métodos o teor encontrado no comprimido produzido em planta piloto variou de 9,9 a 10,2 mg com DPR variando de 0,8 a 3,3%. No comprimido Zyprexa<sup>®</sup> o teor médio encontrado variou de 9,9 a 10,1 mg com DPR de 1,2 a 2,9%.

TABELA 11 – Teor médio de olanzapina encontrada pelos métodos propostos nas amostras estudadas em isopropanol

Método ( $\lambda$ , nm)	Amostra NTF		Amostra Zyprexa	
	Teor (mg)	DPR (%)	Teor (mg)	DPR (%)
OZ (273,0)	9,9	1,5	10,1	1,6
OZ (226,5)	9,9	2,2	10,1	2,3
1D (297,0)	9,9	1,1	9,9	1,4
2D (310,0)	10,0	1,9	10,1	1,5
2D (275,5)	10,1	3,3	10,1	2,9
3D (290,5)	9,9	1,5	10,2	2,6
3D (261,0)	10,1	0,8	9,9	1,5
4D (300,5)	9,9	2,2	9,9	1,6
4D (278,5)	9,9	2,0	9,9	1,2
$\Delta A$ ( $\lambda_2 - \lambda_1$ )	9,9	2,9	10,0	2,0

OZ : ordem zero, 1D: primeira ordem, 2D: segunda ordem, 3D: terceira ordem, 4D: quarta ordem,  $\Delta A$ : método de duplo comprimento de onda.

DPR: Desvio padrão relativo

$\lambda_2$ : 272,5 nm  $\lambda_1$ : 320,0 nm

A aplicação do test  $t$  (Skoog et al., 2006) com limite de confiança de 95% mostrou que ambos os métodos produzem resultados estatisticamente iguais para as duas amostras testadas.

#### 4.12 - Considerações sobre os métodos propostos

Os métodos propostos aparecem como novas alternativas para quantificação da olanzapina em fórmulas farmacêuticas. Eles foram desenvolvidos objetivando maior acessibilidade e segurança, uma vez que utilizam técnicas mais simples e reagentes que apresentam um baixo custo e pouca toxicidade.

Na etapa do preparo da amostra, o congelamento em nitrogênio líquido com posterior trituração, tornou a amostra triturada mais homogênea e possibilitou medidas mais precisas, evitando o uso de equipamentos caros como moinho criogênico. O uso da centrifugação, para separação dos excipientes, garantiu uma boa seletividade sem perdas consideráveis do analito durante o processo, não sendo necessário o uso de etapas mais demoradas como filtração e extração em coluna.

A análise foi realizada diretamente a partir do sinal do espectro obtido, sem requerer nenhum tipo de reação secundária e, portanto, emprega menos reagentes e minimiza-se a contaminação.

O emprego da espectrofotometria derivativa mostrou ser uma boa alternativa para o aumento da sensibilidade do método, entretanto está limitada ao uso de equipamentos mais sofisticados. Em função disto o método de ordem zero é considerado o mais adequado nesse aspecto, pois apresenta maior aplicabilidade devido à sua simplicidade.

De forma geral, o uso de etanol como solvente leva a precisão melhor, além disso este solvente é mais barato (R\$ 11,35/L) que o isopropanol (R\$ 20,00/L).

Comparando as bandas estudadas em etanol para o espectro de ordem zero, observou-se que a curva de calibração em 272,5 nm apresenta maior faixa linear e, portanto, possui maior intervalo de aplicabilidade.

Em função disso, o método mais adequado para análise é a espectrofotometria de ordem zero, em 272,5 utilizando etanol como solvente.

#### 4.13 - Comparação do método mais adequado e a literatura

Grande parte das metodologias descritas na literatura são baseadas em métodos cromatográficos (HPLC) e voltadas principalmente para ensaios com amostras biológicas (Tabela 4.12). Métodos cromatográficos costumam ser mais caros e muitas vezes apresentam uma série de etapas de preparo da amostra e, portanto, são pouco acessíveis, dispendiosos e demorados.

Os métodos eletroforéticos e eletroquímicos propostos por Raggi et al. (2000) (Tabela 4.12), têm um custo um pouco menor, no entanto são necessárias várias etapas de preparo da amostra (extração, filtração, centrifugação, etc.), que tornam as análises demoradas e mais sujeitas a erros.

As propostas utilizando métodos titulométricos (Firdous et al., 2005; Basavaiah et al., 2009) (Tabela 4.12), apresentam bons resultados na determinação do comprimido e de matéria prima, mas utilizam regentes tóxicos (Firdous et al., 2005) e são um pouco demorados.

Os métodos por injeção em fluxo com detecção espectrofotométrica (Jasińska et al., 2003) (Tabela 4.13), são mais dispendiosos e utilizam normalmente uma série de etapas reacionais, com maior número de reagentes tornando os ensaios mais sujeitos a erros.

A análise espectrofotométrica através da oxidação da olanzapina (Krebs et al., 2006; Basavaiah et al., 2009) (Tabela 4.13), apresenta uma série de etapas para determinação indireta da substância sendo, portanto, demoradas e sujeitas a erros. O método baseado na cinética da reação de oxidação da olanzapina (Mohamed, 2008) (Tabela 4.13), também segue o mesmo princípio, entretanto possui ainda a desvantagem do produto obtido da reação de oxidação ser pouco estável.

Alguns métodos utilizam espectrofotometria com o espectro de ordem zero (Firdous et al., 2005) e derivado na primeira ordem (Raggi et al., 2000). Ambos apresentam bons resultados, porém, utilizam reagente metanol, que é tóxico e pode trazer riscos a saúde do analista (Tabela 4.13).

A maioria das metodologias descritas na literatura utiliza equipamentos caros, reagentes tóxicos e procedimentos demasiadamente complexos e por envolver mais etapas está mais susceptíveis a erros.

O método proposto mais indicado emprega etanol como solvente (de baixa toxicidade) e as etapas de preparo da amostra são mais rápidas e seguras (congelamento da amostra e separação após centrifugação), o que garante um bom nível de precisão e exatidão. Ele é seletivo com relação aos excipientes do medicamento e apresenta limites de detecção e quantificação melhores que as metodologias espectrofotométricas baseadas na oxidação (Krebs et al., 2006; Basavaiah et al., 2009) e na utilização de espectros derivados (Raggi et al., 2000) (Tabela 4.13).

A faixa de trabalho é similar a do método espectrofotométricos proposto por Firdous et al. (2005), com a vantagem de não utilizar reagentes tóxicos, e melhor do que os baseados na reação de oxidação da olanzapina (Krebs et al., 2006; Mohamed, 2008) (Tabela 4.13).

O método mostrou boa precisão e exatidão quando comparado ao de alguns aos métodos espectrofotométricos existentes na literatura (Tabela 4.13), podendo ser utilizados como alternativa para controle de qualidade da indústria farmacêutica.



TABELA 4.12 – Comparativo do método mais adequado e alguns métodos da literatura

Equação <sup>1</sup>	r	LOD (mg L <sup>-1</sup> )	LOQ (mg L <sup>-1</sup> )	LOL (mg L <sup>-1</sup> )	Prec. Intra-dia DPR (%)	Prec. Inter-dia DPR (%)	Prec. Interlab. DPR (%)	Exatidão (%)	Referência
A = 0,026 + 0,0640C	0,9999	1,7 10 <sup>-1</sup>	5,1 10 <sup>-1</sup>	50,0	0,6- 0,9	0,9-1,0	2,6 - 4,8	100-101	Método proposto
-	-	0,3		100	-	0,4		99-101	Firdous et al. (2005)
Y = 0,013 + 0,0224X	0,9983	-	5,0 10 <sup>-3</sup>	5,0 10 <sup>-1</sup>	3,7-10,6	-	-	98-103	Berna et al. (2001)
-	0,9990	1,0 10 <sup>-3</sup>	1,5 10 <sup>-3</sup>	1,5 10 <sup>-1</sup>	-	0,7-3,5		97-100	Dusci et al. (2002)
Y = 0,1226 + 0,0484X	0,9999	0,1 10 <sup>-3</sup>	0,2 10 <sup>-3</sup>	1,0 10 <sup>-1</sup>	2,9	4,6	-	87	Saracino et al. (2006)
Y = 31,374 + 21,070X	0,9999	3,0 10 <sup>-3</sup>	8,0 10 <sup>-3</sup>	2,0 10 <sup>-1</sup>	1,0	0,8-2,0	-	99	Basavaiah et al. (2008)
-	-	1,0 10 <sup>-3</sup>	1,4 10 <sup>-3</sup>	1,0 10 <sup>-1</sup>	1,4	1,9	-	89-92	Raggi et al. (2001)
-	-	4,1 10 <sup>-3</sup>	6,3 10 <sup>-3</sup>	1,5 10 <sup>-1</sup>	1,3	1,4	-	89-92	Raggi et al. (2001)
Y = 0,0057 + 0,1070X	0,9980	-	-	0,3 10 <sup>-1</sup>	3,2-9,8	3,0-10,1	-	84-87	Nirogi et al. (2006)
Y = 8,5708 + 2,7219X	0,9986	-	-	-	2,1	7,8	-	97-102	Tiwari et al. (2006)
Y = 0,0241 + 0,0330X	0,9997	1,0 10 <sup>-4</sup>	6,0 10 <sup>-3</sup>	1,5 10 <sup>-1</sup>	1,4	1,8	-	100-101	Raggi et al. (2000)
Y = 0,0164 + 0,3622X	0,9994	0,3 10 <sup>-3</sup>	0,9 10 <sup>-3</sup>	0,5 10 <sup>-1</sup>	0,7	1,3		100-101	Raggi et al. (2000)
Y = 0,0400 + 0,0390X	0,9990	3,0 10 <sup>-3</sup>	5,0 10 <sup>-3</sup>	0,5 10 <sup>-1</sup>	2,3	2,9	-	98	Raggi et al. (2000)
-	0,9970	2,5 10 <sup>-4</sup>	-	1,0 10 <sup>-1</sup>	-	1,3-6,5	-	94-100	Catlow et al. (1995)
Y = 0,0895 + 0,0895X	0,9992	-	-	1,0 10 <sup>-2</sup>	1,1-12,6	-	-	96 - 108	Kasper et al. (1999)
Y = -1,1370 + 0,0190X	0,9997	-	1,0 10 <sup>-3</sup>	1,0	18,0	-	-	-	Boguz et al. (1999)
-	-	-	1,0	15,0	0,6-09	1,2-1,4	-	98-103	Basavaiah et al. (2009)
-	-	-	1,0	15,0	0,7-0,6	1,3-1,9	-	97-103	Basavaiah et al. (2009)

<sup>1</sup>y = a + bx onde: a – intercepto de x com o eixo y e b – inclinação da reta. r: coeficiente de correlação da reta.

LOD: limite de detecção, LOQ: limite de quantificação, LOL: limite de linearidade.

DPR: Desvio padrão relativo.

TABELA 4.13 – Comparativo do método mais adequado e alguns métodos espectrofotométricos da literatura

Equação	r	LOD (mg L <sup>-1</sup> )	LOQ (mg L <sup>-1</sup> )	LOL (mg L <sup>-1</sup> )	Prec. Intra-dia DPR (%)	Prec. Inter-dia DPR (%)	Prec. Interlab. DPR (%)	Exatidão (%)	Referência
A = 0,026 + 0,0640C	0,9999	1,7 10 <sup>-1</sup>	5,1 10 <sup>-1</sup>	50,0	0,6 - 0,9	0,9 - 1,0	2,6 - 4,8	100-101	Método proposto
A = 0,001 + 0,0740C	0,9990	1,0 10 <sup>-1</sup>	-	50,0	-	1,0	-	100	Firdous et al. (2005)
A = 0,016 + 0,4219C	0,9999	2,2 10 <sup>-2</sup>	6,6 10 <sup>-2</sup>	1,6	-	-	-	99-100	Revanasiddappa (2008)
A = 0,020 + 0,4052C	0,9999	1,5 10 <sup>-2</sup>	4,5 10 <sup>-2</sup>	1,4	-	-	-	98-100	Revanasiddappa (2008)
A = 0,005 + 0,0083C	0,9983	2,2	-	40,0	2,3	-	-	98-102	Jasińska (2003)
A = 0,009 + 0,0088C	0,9999	0,7	-	250,0	0,4	-	-	98 -101	Jasińska (2003)
A = 0,009 + 0,0003C	0,9999	0,1	-	300,0	0,8	-	-	100-101	Jasińska (2003)
A = 0,001 + 0,0017C	0,9960	1,5 10 <sup>-1</sup>	-	7,0	1,3	1,7	-	99	Mohamed (2008)
A = 0,010 + 0,8500C	0,9980	1,0 10 <sup>-1</sup>	-	4,0	1,3	1,7	-	99	Mohamed (2008)
A = 0,013 + 0,0079C	0,9998	2,1	7,0	120,0	0,6	1,6	-	100-101	Krebs et al. (2006)
A = 0,205 + 0,0213C	0,9998	0,1	0,3	6,0	1,6	3,9	-	96	Krebs et al. (2006)
A = 0,475 + 0,0555C	0,9993	1,6 10 <sup>-1</sup>	3,7 10 <sup>-1</sup>	3,0	2,8	4,1	-	94-96	Krebs et al. (2006)
D1= 0,001 + 0,0229C	0,9998	0,5	1,0	100,0	1,6	2,3	-	101-103	Raggi et al. (2000)
A = 0,005 + 0,0020C	0,9970	3,9	11,9	120,0	1,3-1,7	2,0-2,3	-	97-103	Basavaiah et al. (2009)

<sup>1</sup>y = a + bx onde: a – intercepto de x com o eixo y e b – inclinação da reta. r: coeficiente de correlação da reta.

LOD: limite de detecção, LOQ: limite de quantificação, LOL: limite de linearidade

DPR: Desvio padrão relativo.

## 5 – CONCLUSÕES

Os solventes etanol e isopropanol mostraram-se os mais adequados para análise de olanzapina por melhor solubilizá-la e pelo baixo grau de toxicidade sendo que o uso de etanol representa menor custo para análise.

A adição de água provocou alteração no espectro de olanzapina e levou à diminuição da solubilidade da substância em função do aumento da polaridade do meio.

As soluções de olanzapina são sensíveis à luz, resultando em diminuição do sinal analítico, devido à fotodecomposição.

Em ambos os solventes, o sinal da olanzapina foi estável em pH acima de 8,0.

O espectro de olanzapina foi robusto quanto à mudança de marca do solvente nas bandas 272,5 nm (etanol) e 273,0 nm (isopropanol).

A seletividade dos métodos foram boas frente aos principais excipientes.

A aplicação da espectrofotometria derivativa se mostrou limitada ao tipo de equipamento, porém é uma boa alternativa para o aumento da sensibilidade dos métodos.

O congelamento dos comprimidos Zyprexa<sup>®</sup>, em nitrogênio líquido, antes da trituração mostrou ser uma boa alternativa para obtenção da amostra pulverizada mais homogênea.

Os métodos tiveram boa sensibilidade, com baixos limites de detecção e quantificação e boa linearidade.

O teste de adição e recuperação de padrão mostrou que todos os métodos apresentam exatidão satisfatória, com pequenos desvios padrão relativo na análise das amostras.

As precisões obtidas estiveram dentro do limite aceitável (<5%) com relação à mudança de dia analista e laboratório (exceto isopropanol em 226,5 nm).

Os métodos desenvolvidos são rápidos, simples, seguros e de baixo custo, podendo ser utilizados para análise de rotina de olanzapina em fórmulas farmacêuticas.

## 6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABERÁSTURI, A.; JIMÉNEZ, A. I.; JIMÉNEZ, F.; ARIAS, J. J.; UV–Visible first-derivative spectrophotometry applied to an analysis of a vitamin mixture. **J. Chem. Educ.**, v. 78, n. 6, p. 793-795, 2001.

AMÉRICO, M. A.; MOSSIN, S. A. G.; NISHIYAMA, P. Perfil de fármacos por espectrofotometria no ultravioleta. **RBAC**, v. 40, n. 4, p. 257-259, 2008.

ANSARI, M.; KAZEMIPOUR M.; BARADARAN, M.; JALALIZADEH, J. Derivative spectrophotometric method for determination of losartan in pharmaceutical formulations. **IJPT**, v. 3, n. 1, p. 21-25 2004.

ANVISA. Resolução-RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Brasília, mai. de 2003. Disponível em <<http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=15132&word=>> . Acesso em: 08 fev. 2009.

AYALA, A. P. Polymorphism in drugs investigated by low wavenumber Raman scattering. **Vib. Spectrosc.**, v. 45, p.112-116, 2007.

AYALA, A. P.; SIESLER, H. W.; BOESE, R.; HOFFMANN, G. G.; POLLA, G. I.; VEGA, D. R. Solid state characterization of olanzapine polymorphs using vibrational spectroscopy. **Int. J. Pharm.**, v. 326, p. 69-79, 2006.

BASAVAIHAH, K.; RANGACHAR, A. U.; THARPA, K. Quantitative determination of olanzapine in pharmaceutical preparations by HPLC. **J. Mex. Chem. Soc.**, v. 52, n. 2, p. 120-124, 2008.

BASAVAIHAH, K.; RAJENDRAPRASAD, N.; VINAY, K. B. Microtitrimetric determination of a drug containing olanzapine in non-aqueous medium. **Chemical Industry & Chemical Engineering**, 2009.

BASAVAIHAH, K.; ZENITA, O.; THARPA, K.; RAJENDRAPRASAD, N.; ANILKUMAR, U. R.; HIRIYANA, S. G.; VINAY, K. B. Iodimetric assay of olanzapine in pharmaceuticals using iodate and nil blue as reagents. **Chemical Industry & Chemical Engineering**, 2009.

BERNA, M.; ACKERMANN, B.; RUTERBORIES, K.; GLASS, S. Determination of olanzapine in human blood by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **J. Chromatogr., B.** n. 767, p. 163-168, 2002.

BOGUSZ, M. J.; KRÜGER, K. D.; MAIER, R. D.; ERKWOH, R.; TUCHTENHAGEN, F. Monitoring of olanzapine in serum by liquid chromatography–atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. **J. Chromatogr., B.**, v. 732, p. 257-269, 1999.

CARDOSO, S. G.; ROLIM, C. M. B.; ESCARRONE, A. L.; IEGGLI, C. V. S.; CAVALETT, C.; OLIVEIRA, D. C.; LORETO, E. S.; SCHMITT, G. C.; CARLOSSO, I. P.; CÂMERA, K.; BAJERSKI, L.; MALESUIK, M. D.; BÖER, T. M. Determinação quantitativa de tenoxicam em comprimidos por espectrofotometria no ultravioleta. **Acta Farm. Bonaerense**, v. 25, n. 2, p. 262-266, 2006

CAPUANO, B.; CROSBY, I. T.; FALLON, G. D.; LLOYD, E. J.; YURIEVA, E.; EGANA; S. J. 2-Methyl-4-(4-methylpiperazin-1-yl)-10H-thieno[2,3 b][1,5] benzodiazepine methanol solvate monohydrate. **Acta Cryst.** v. 59, p.1367-1369, 2003.

CATLOW, J. T.; BARTON, R. D.; CLEMENS, M.; GILLESPIE, T. A.; GOODWIN, M.; SWANSON, S. P. Analysis of olanzapine in human plasma utilizing reversed phase high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. **J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.**, v. 668, p. 85-90, 1995.

CAVALLA, D. Case histories of drug discovery and SMR award meeting. **The Newsletter for Society for Medicines Research.** v. 6, n. 1, p. 6-9, january 2000.

CHIU, J. A.; FRANKLIN, R. B. Analysis and pharmacokinetics of olanzapine (LY170053) and two metabolites in rat plasma using reversed-phase HPLC with electrochemical detection. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 14, p. 609-615, 1996.

CUSTÓDIO, R.; ANDRADE, J. C.; AUGUSTO, F. O ajuste de funções matemáticas a dados experimentais. **Quim. Nova.**, v. 20, n. 2, p. 219-225, 1997.

DUSCI, L. J.; L.; HACKETT, L. P.; FELLOWS, L. M.; ILETT, K. F. Determination of olanzapine in plasma by high-performance liquid chromatography using ultraviolet absorbance detection. **J. Chromatogr., B.**, v. 773, p. 191-197, 2002.

DUVAL, F.; GUILLON, M. S.; MOKRANI, M. C.; CROCQ, M. A. Elevation of Prolactin Levels by Risperidone and Olanzapine in Adolescents with Schizophreniform Disorders: Correlations with Drug Plasma Concentrations. **Society of Biological Psychiatry 2008 Annual Meeting.** p. 30, 2008.

ELKIS, H.; LOUZÃ, M. R. Novos antipsicóticos para o tratamento da esquizofrenia. **Rev. Psiq. Clín.**, v. 34, p. 193-197, 2007.

ERMER, J. Validation in pharmaceutical analysis. Part I: An integrated approach. **J. Pharm. Biom. Anal.**, v. 24, p. 755-767, 2001.

EWING, G. W. **Métodos instrumentais de análise química.** Sao Paulo: Edgard Blucher, 1972. 296 p.

FDA Approves Zyprexa (Olanzapine) For Long-Term Treatment Of Schizophrenia. **Doctor Guide News.** Indianapolis, 13 de nov. 2000. Disponível em: <http://www.pslgroup.com/dg/1ea5da.htm>. Acesso em: 06/12/2008.

FIRDOUS, S; AMAN, T; NISA, A. Determination of olanzapine by UV spectrophotometry and non-aqueous titration. **J. Chem. Soc. Pak.**, v. 27, n. 2, p. 163-167, 2005.

FLEISCHHAKER, C.; HEISER, P.; HENNIGHAUSEN, K.; HERPERTZ-DAHLMANN, B.; HOLTKAMP, K.; MEHLER-WEX, C.; RAUH, R.; REMSCHMIDT, H.; SCHULZ, E.; WARNKE, A. Weight gain in children and adolescents during 45 weeks treatment with clozapine, olanzapine and risperidone. **J Neural Transm.**, v.115, p. 1599-1608, 2008.

FLÓREZ, J. **Farmacología humana**. 3. ed. Barcelona: Masson S. A., 1997. 1355 p.

FROTA, L. H. **Cinqüenta anos de medicamentos antipsicóticos em psiquiatria**. 1ª ed. Rio de Janeiro: Dilem Informática, 2003. 486 p. 1CD ROM.

GARDNER, I.; ZAHID, N.; MACCRIMMON, D.; UETRECHT, J. P. A comparison of the oxidation of clozapine and olanzapine to reactive metabolites and the toxicity of these metabolites to human leukocytes. **Mol. Pharmaceutics**, v. 53, p. 991-998, 1998.

GIL, E. S. **Controle físico-químico de qualidade de medicamentos**. 2. ed. São Paulo: Pharmabooks, 2007. 485 p.

GONÇALVES, M. L. S. S. **Métodos instrumentais para análise de soluções: análise quantitativa**. 4. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2001. 1050 p.

GÖRÖG, S. **Ultraviolet-visible spectrophotometry in pharmaceutical analysis**. Boca Raton: CRC Press, 1995. 391 p.

HARRIS, D. C. **Análise química quantitativa**. 7. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2008. 868 p.

HONDA, S.; KONISHI, T.; CHIBA, H. Evaluation of dual wavelength spectrophotometry for drug level monitoring. **Anal. Chem.**, v. 56, n. 13, p. 2352-2354, 1984.

ICH. Text on Validation of Analytical Procedures Q2(R1). Disponível em< <http://www.ich.org/cache/compo/276-254-1.html>>. Acesso em: 27 de fev. de 2009.

IDRISS, K. A; SEDAIRA, H.; ABDEL-AZIZ, M. S.; AHMAD, H. M. Rapid test methods for minor components analysis of hydraulic cement. Spectrophotometric determination of manganese oxide content of Portland cement and cement raw meal. **Talanta**, n. 50, p. 913-919, 1999.

IVERSON, S.; ZAHID, N.; UETRECHT, J. P. Predicting drug-induced agranulocytosis: characterizing neutrophil-generated metabolites of a model compound, DMP 406, and assessing the relevance of an in vitro apoptosis assay for identifying drugs that may cause agranulocytosis. **Chemico-Biological Interactions**, v. 142, p. 175- 199, 2000.

IUPAC. International Union of Pure and Applied Chemistry. Disponível em <http://www.iupac.org/publications/compendium/S.html>. Acesso em: 26 fev. de 2009.

JASIŃSKA, A.; NALEWAJKO, E. Batch and flow-injection methods for the spectrophotometric determination of olanzapine. **Anal. Chim. Acta.**, v. 508, p. 165-170, 2004.

JOFFE, G.; SINTONEN, H.; APPELBERG, B. Shift from first generation antipsychotics to olanzapine may improve health-related quality of life of stable but residually symptomatic schizophrenic outpatients: A prospective, randomized study. **Intl. J. of Technology Assessment in Health Care.**, v. 24, n. 4, p. 399-402, 2008.

KAPCZINSKI, F.; GAZALLE, F. K.; FREY, B.; KAUER-SANT'ANNA, M.; TRAMONTINA, J. Tratamento farmacológico do transtorno bipolar: as evidências de ensaios clínicos randomizados. **Rev. Psiq. Clín.** n. 32, p. 34-38, 2005.

KARPINSKA, J.; Derivative spectrophotometry - recent applications and directions de development. **Talanta**, v. 64, p. 801-822, 2004.

KASPER, S. C.; MATTIUZ, E. L.; SWANSON, S. P.; CHIU, J. A.; JOHNSON, J. T.; GARNER, C. O. Determination of olanzapine in human breast milk by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. **J. Chromatogr., B.**, v. 726, p. 203-209, 1999.

KASSAHUN, K.; MATTIUZ, E.; NYHART JR., E.; OBERMEYER, B.; GILLESPIE, T.; MURPHY, A.; GOODWIN, R. M.; TUPPER, D.; CALLAGHAN, J. T.; LEMBERGER, L. Disposition and biotransformation of the antipsychotic agent olanzapine in humans. **Drug Metab. Dispos.**, v. 25, n. 1, p. 81 -93, 1997.

KEMP, W. **Organic Spectroscopy**. 3. ed. London: Mcmillan press LTD, 1991. 393 p.

KOHARA, T.; KOYAMA, T.; FUJIMURA, M.; TANAKA, A.; MAEDA, J.; FUJIMOTO, T.; YAMAMOTO, I.; ARITA, M. Y. A novel atypical antipsychotic drug, is less Sensitive to oxidative phenomena. **Chem. Pharm. Bull.** v. 50, n. 6, p. 818-821, 2002.

KREBS, A.; STARCZEWSKA, B.; PUZANOWSKA-TARASIEWICZ, H.; SLEDZ, J. Spectrophotometric Determination of Olanzapine by Its Oxidation with *N*-Bromosuccinimide and Cerium(IV)sulfate. **Anal. Sci.**, v. 22, p. 829-833, 2006.

LACERDA, A. L. T.; SOARES, J. C.; TOHEN, M. O papel dos antipsicóticos atípicos no tratamento do transtorno bipolar: revisão da literatura. **Rev. Bras. Psiquiatr.**, v. 24, n. 1, p. 34-43, 2002.

LEITE, F. **Validação em análise química**. 4. ed. Campinas: Editora Átomo, 2002. 278 p.

MARANGELL, L. B. **Psicofarmacologia**. Porto Alegre: Artmed, 2004. 220p.

MEDEIROS, F. L.; ANDRADE1, A. G.; HIROCE, V. Y.; ALVES, T. C. T. F. Síndrome neuroléptica maligna de paciente em uso de olanzapina. **J. Bras. Psiquiatr.**, v. 57, n. 2, p. 145-147, 2008.

MELTZER, H. I. What's atypical about atypical antipsychotic drugs? **Current Opinion in Pharmacology**, v. 4, p. 53-57, 2004.

MELTZER H. Y.; MATSUBARA S.; LEE J. C.; The ratios of serotonin<sub>2</sub> and dopamine<sub>2</sub> affinities differentiate atypical and typical antipsychotic drugs. **Psychopharmacology Bulletin**, v. 25, n. 3, p. 390-2, 1989.

MENDHAM, J.; DENNEY, R. C.; BAERNES, J. D.; THOMAS, M. J. K. **Vogel: análise química quantitativa**. 6. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2002. 462 p.

MOHAMED, A. A. Kinetic and maximum-absorbance spectrophotometric methods for the determination of olanzapine. **Monatsh. Chem.**, v. 139, p. 1005-1010, 2008.

MONDA, M.; VIGGIANO, A.; VIGGIANO, A.; MONDOLA, R.; VIGGIANO, R.; MESSINA, G.; TAFURI, D.; DE LUCA, V. Olanzapine blocks the sympathetic and hyperthermic reactions due to cerebral injection of orexin A. **Peptides**, v. 29, p. 120-126, 2008.

MILLER, J. N.; MILLER, J. C.; **Estadística y Quimiometría para Química Analítica**, 4. ed. Madrid: Prentice Hall, 2002. 278 p.

NIROGI, R. V. S.; KANDIKERE, V. N.; SHUKLA, M.; MUDIGONDA, K.; MAURYA, S.; BOOSI, R.; YERRAMILLI, A. Development and validation of a sensitive liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry assay for the quantification of olanzapine in human plasma. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 41, p. 935-942, 2006.

OLIVEIRA, I. R. Antipsicóticos atípicos: farmacologia e uso clínico. **Rev. Bras. Psiquiatr.** v. 22, p. 38-40, 2000.

OWEN, T. **Fundamental of modern UV-visible spectroscopy: Primer**. Germany: Agilent Technologies, 2000. 136 p.



PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S. **Introduction to spectroscopy**. 3. ed. Washington: Thonson Learning, 2001. 680 p.

PERKAMPUS, H.-H. **UV-VIS spectroscopy and its applications**. Berlin: Springer-Verlag, 1992. 244 p.

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

POLLA, G. I.; VEGA, D. R.; LANZA, H.; TOMBARI, D. G.; BAGGIO, R.; AYALA, A. P.; MENDES FILHO, J.; FERNÁNDEZ, D.; LEYVA, G.; DARTAYET, G. Thermal behaviour and stability in olanzapine. **Int. J. Pharm.**, n. 301, p. 33-40.

PORRO, T. J. Double-wavelength spectroscopy. **Anal. Chem.**, v. 44, n. 4, p. 93-103, 1972.

RAGGI, M. A.; CASAMENTI, G.; MANDRIOLI, R.; FANALI, S.; DE RONCHI, D.; VOLTERRA, V. Determination of the novel antipsychotic drug olanzapine in human plasma using HPLC with amperometric detection. **Chromatographia**., v. 51, n. 9/10, p. 562-566, 2000.

RAGGI, M. A.; CASAMENTI, G.; MANDRIOLI, R.; IZZO, G.; KENNDLER, E. Quantitation of olanzapine in tablets by HPLC, CZE, derivative spectrometry and linear voltammetry. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 23, p. 973-981, 2000.

RAGGI, M. A.; MANDRIOLI, R.; SABBIONI, C.; GHEDINI, N.; FANALI, S.; VOLTERRA, V. Determination of olanzapine and desmethylolanzapine in the plasma of schizophrenic patients by means of an improved HPLC method with amperometric detection. **Chromatographia**.,v. 54, n. 3/14, p. 203-207, 2001.

RAO, R. N.; RAJU, A. N.; NARSIMHA, R.; BABU, G. R. Isolation and characterization of process related impurities of olanzapine using HPLC and ESI-MS/MS. **J. Sep. Sci.**, v. 31, p. 107-118, 2008.

REUTZEL-EDENS, S. M.; BUSH, J. K; MAGEE, P. A. STEPHENSON, G. A.; BYRN, S. R. Anhydrates and Hydrates of Olanzapine: Crystallization, Solid-State Characterization, and Structural Relationships. **Cryst. Growth Des.**, v. 3, n. 6, p. 897-907, 2003.

REVANASIDDAPPA, H. D.; VEENA, M. A. Highly sensitive spectrophotometric methods for the determination of olanzapine. **Ecl. Quím.**, v. 33, n. 3, p. 47-52, 2008.

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

- RIBEIRO, F. A. L.; FERREIRA, M. M. C.; MORANO, S. C.; SILVA, L. R.; SHNEIDER, R. P. Planilha de validação: uma nova maneira de estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos. **Quim. Nova.**, v. 31, n. 1, p. 164-171, 2008.
- ROCHA, F. P. R.; TEIXEIRA, L. S. G. Estratégias para o aumento de sensibilidade em espectrofotometria UV-Vis. **Quim. Nova.**, v. 27, n. 5, p. 807-812, 2004.
- ROJAS, F. S.; OJEDA, C. B. Recent development in derivative ultraviolet /visible absorption spectrophotometry: 2004–2008. **Anal. Chim. Acta.**, v. 635, p. 22–44, 2009.
- ROJAS, F. S.; OJEDA, C. B.; PAVON, J. M. C. Derivative ultraviolet-visible region absorption spectrophotometry and its analytical applications. **Talanta**, v. 35, n. 10, p. 753-761, 1988.
- ROUESSAC, F.; ROUESSAC, A. **Chemical analysis: Modern instrumentation methods and techniques**. 2. ed. France:Wiley, 2007. 574 p.
- SABBIONI, C.; SARACINO, M. A.; MANDRIOLI, R.; ALBERS, L.; BONCOMPAGNI, G.; RAGGI, M. A. Rapid analysis of olanzapine and desmethylolanzapine in human plasma using high-performance liquid chromatography with coulometric detection. **Anal. Chim. Acta.**, v. 516, p. 111-117, 2004.
- SARACINO, M. A.; GANDOLFI, O.; DALL'OLIO, R.; ALBERS, L.; KENNDLER, E.; RAGGI, M. A. Determination of olanzapine in rat brain using liquid chromatography with coulometric detection and a rapid solid-phase extraction procedure. **J. Chromatogr., A.**, v. 1122, p. 21-27, 2006.
- SAVITZKY, A.; GOLAY, M. J. E. Smoothing and differentiation of data by simplified least squares procedures. **Anal. Chem.**, v. 36, n. 8, p. 1627-1639, 1964.
- SCHATZBERG, A. F.; DEBATTISTA, C.; COLE, J. O. **Manual de psicofarmacologia clinica**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 254p.
- SHARP, J. **Quality in the manufacture of medicines and other healthcare products**. London: Pharmaceutical, 2000. 516 p.
- SILVERSTAIN, R. M.; BASSLER, G. C.; MORRIL, T. C. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 5. ed. Rio de Janeiro: LTC, 1994. 387 p.
- SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. **Fundamentos de química analítica**. 8. ed. São Paulo: Alegre: Cengage Learning, 2006. 999 p.
- SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Princípios de análise instrumental**. 5. ed. Porto Alegre: Bookman, 2002. 836 p.

SONG, C.; NERDAL, W. Olanzapine interaction with dipalmitoyl phosphatidylcholine (DPPC) and 1-palmitoyl-2-oleoyl phosphatidylserine (POPS) bilayer: A <sup>13</sup>C and <sup>31</sup>P solid-state NMR study. **Biophys. Chem.**, v. 134, p. 47-55, 2008.

STEINKOPF, S.; SCHELDERUP, A. K.; GJERDE, H. L.; PFEIFFER, J.; THORESEN, S.; GJERDE, A. U.; HOLMSEN, H. The psychotropic drug olanzapine (Zyprexa<sup>®</sup>) increases the area of acid glycerophospholipid monolayers. **Biophys. Chem.**, v. 134, p. 39-46, 2008.

TALSKY, G. **Derivative spectrophotometry**. Weinheim: VCH, 1994. 228 p.

THATIPALLI, P.; KUMAR, R. BULUSU, C.; CHAKKA, R. PADI, P. R.; YERRA, A.; BOLLIKONDA, S. Synthesis and characterization of impurities of an anti-psychotic drug substance, olanzapine. **ARKIVOC**. p. 195-201, 2008.

TIWARI, M.; CHAWLA, G.; BANSAL, A. K. Quantification of olanzapine polymorphs using powder X-ray diffraction technique. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 43, p. 865-872, 2007.

TSAI, F.; PHILPOT, W. Derivative analysis of hyperspectral data. **Remote Sens. Environ**, v. 66, p. 41-51, 1998.

**U. S. Pharmacopeia**. Rockville, MD, USA: The United States Pharmacopeia Convention, 2000. 2569 p.

VESSMAN, J. Selectivity or specificity? Validation of analytical methods from the perspective of an analytical chemist in the pharmaceutical industry. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 14, p. 867 – 869, 1996.

VIDOTTI, E. C.; ROLLEMBERG, M. C. E. Espectrofotometria derivativa: Uma estratégia simples para determinação simultânea de corantes em alimentos. **Quim. Nova**, v. 29, n. 2, p. 230-233, 2006

WAWRZYCKA-GORCZYCA, I.; BOROWSKI, P.; OSYPIUK-TOMASIK, J.; MAZUR, L.; KOZIOL, A. E. Crystal structure of olanzapine and its solvates. Part 3. Two and three-component solvates with water, ethanol, butan-2-ol and dichloromethane. **J. Mol. Struct.**, v. 830, p. 188-197, 2007.

WAWRZYCKA-GORCZYCA, I.; MAZUR, L.; KOZIOL, A. E. 2-Methyl-4-(4-methyl-1-piperazinyl)-10H-thieno[2,3-b][1,5]benzodiazepine methanol solvate. **Acta Crystallogr., Sect. E: Struct. Rep. Online**, v. 60, p. 67-70, 2004.