



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**MIGUEL WILSON REGUEIRA RIBEIRO**

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA**  
**QUANTIFICAÇÃO DO TEOR DISSOLVIDO DE OLANZAPINA**  
**COMPRIMIDO REVESTIDO POR ESPECTROFOTOMETRIA DE ABSORÇÃO**  
**ULTRAVIOLETA/VISÍVEL (UV/VIS)**

**Recife**

**2022**

MIGUEL WILSON REGUEIRA RIBEIRO

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO  
PARA QUANTIFICAÇÃO DO TEOR DISSOLVIDO DE OLANZAPINA  
COMPRIMIDO REVESTIDO POR ESPECTROFOTOMETRIA DE  
ABSORÇÃO ULTRAVIOLETA/VISÍVEL (UV/VIS)**

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em ciências farmacêuticas do centro de ciências da saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêutica.

**Área de concentração:** Fármacos e Medicamentos

**Orientadora:** Prof.<sup>a</sup> Dra. Monica Felts de La Roca Soares

**Recife**

**2022**



MIGUEL WILSON REGUEIRA RIBEIRO

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA  
QUANTIFICAÇÃO DO TEOR DISSOLVIDO DE OLANZAPINA COMPRIMIDO  
REVESTIDO POR ESPECTROFOTOMETRIA DE ABSORÇÃO  
ULTRAVIOLETA/VISÍVEL (UV/VIS)**

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em ciências farmacêuticas do centro de ciências da saúde da universidade federal de pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêutica.

**Área de concentração:** Fármacos e Medicamentos

Aprovada em: 24 / 02 / 2022

\_\_\_\_\_  
Prof. Dra. Monica Felts de La Roca Soares (Examinadora Interna)

Universidade Federal de Pernambuco

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. José Lamartine Soares Sobrinho (Examinador Interno)

Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Caio Cesar de Andrade Rodrigues Silva (Examinador Externo)

\_\_\_\_\_  
Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco - LAFEPE

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus e a todos os espíritos de luz que acompanham meus passos e direcionam meu caminho;

Agradeço a minha Mãe, Roberta Cristina Soares Regueira Ribeiro por ter proporcionado um ambiente saldável para o desenvolvimento intelectual e moral;

Agradeço a meu Pai, Miguel Wilson Ribeiro Costa da Silva, por ser exemplo de organização e de trato com as pessoas o que me fez tornar-se um homem de bem;

Agradeço a minha esposa, Mayara Milleny da Cunha Siqueira Regueira, por ter paciência, dar apoio, consolar-me nos momentos de angústia, bem como dar à luz a fonte de amor, meu filho, Lucas da Cunha Regueira que com o sorriso ilumina e esquentava meu coração nos momentos de tristeza.

Agradeço ao Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco Governador Miguel Arraes - LAFEPE, por disponibilizar o ambiente profissional para execução da dissertação;

Agradeço a todos os funcionários do LAFEPE, em especial a Manuela Paz e Bruno Ayres, técnica em qualidade industrial e farmacêutico industrial, respectivamente, por ter depositado tempo e conhecimento na execução da dissertação;

Agradeço a minha orientadora, Mônica Felts de La Roca Soares, pelo tempo disponibilizado e pelo conhecimento depositado para execução da dissertação.

## RESUMO

A biossegurança de um medicamento é controlada na rotina industrial, majoritariamente, por meio do ensaio de dissolução. A Farmacopeia Brasileira descreve que o teste de dissolução possibilita determinar a quantidade de substância ativa dissolvida no meio de dissolução quando o produto é submetido à ação de aparelhagem específica, sob condições experimentais. O ativo deve ser quantificado por técnicas analíticas específicas que permita identificar a porcentagem declarada no rótulo. A espectroscopia uma técnica alternativa para demonstrar se o produto atende às exigências constantes na monografia. O Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco Governador Miguel Arraes (LAFEPE) fornece medicamentos ao Sistema Único de Saúde (SUS) por meio do Ministério da Saúde (MS). Dentre os medicamentos que o LAFEPE produz a olanzapina é um importante antipsicótico atípico de segunda geração que apresentar poucos efeitos extrapiramidais, o que a torna como primeira escolha no tratamento da esquizofrenia, assim como em transtorno bipolar. A importância do controle da dissolução do comprimido de olanzapina torna-se ainda mais crítico devido a sua baixa dosagem, 5 mg e 10 mg, sua classificação conforme sistema Biofarmacêutica (BCS) com medicamento classe II (baixa solubilidade e alta permeabilidade). Este trabalho teve como objetivo desenvolver e validar um método alternativo para a quantificação do teor de olanzapina dissolvida no meio de dissolução por meio da técnica de espectroscopia ultravioleta/visível (UV/VIS). No desenvolvimento foi realizada análise espectral, confirmando o comprimento de 260 nm onde a olanzapina apresenta absorção máxima, também, foi avaliado o atendimento a lei de Lambert-Beer estando a absorção na faixa de 0.200 à 0.800, bem como, a robustez do método em suportar pequenas e deliberadas variação. O método foi validado apresentando seletividade, linearidade, precisão, exatidão atendendo aos requisitos estabelecidos na resolução RDC nº 166/2017 que dispõe sobre validação de métodos analíticos, sendo avaliado através de teste estatísticos, tais como: Test F, Teste t, ANOVA, teste de Cochran e regressão linear que o método atende a os parâmetros descritos no Guia nº 10/2017 que trata sobre o tratamento estatístico da validação analítica. Este trabalho faz parte de um acordo de Termo de Cooperação Técnica e Transferência de Tecnologia celebrado entre o LAFEPE e o laboratório NCQMC da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), na qual o produto desta dissertação foi uma tecnologia analítica, transferida e internalizada ao LAFEPE.

**Palavras chaves:** desenvolvimento analítico; espectrofotometria; validação.

## ABSTRACT

The biosafety of a drug is controlled in the industrial routine, mostly through the dissolution test. The Brazilian Pharmacopoeia describes that the dissolution test makes it possible to determine the amount of active substance dissolved in the dissolution medium when the product is subjected to the action of specific equipment, under experimental conditions. The asset must be quantified by specific analytical techniques that allow identifying the percentage declared on the label. Spectroscopy is an alternative technique to demonstrate whether the product meets the requirements contained in the monograph. The Pharmaceutical Laboratory of the State of Pernambuco Governador Miguel Arraes (LAFEPE) supplies medicines to the Unified Health System (SUS) through the Ministry of Health (MS). Among the drugs that LAFEPE produces, olanzapine is an important atypical second-generation antipsychotic that has few extrapyramidal effects, which makes it the first choice in the treatment of schizophrenia, as well as in bipolar disorder. The importance of controlling the dissolution of the olanzapine tablet becomes even more critical due to its low dosage, 5 mg and 10 mg, its classification according to the Biopharmaceutical System (BCS) with class II drug (low solubility and high permeability). This work aimed to develop and validate an alternative method for quantifying the content of olanzapine dissolved in the dissolution medium using the ultraviolet/visible (UV/VIS) spectroscopy technique. In the development, spectral analysis was carried out, confirming the length of 260 nm where olanzapine presents maximum absorption, also, the compliance with the Lambert-Beer law was evaluated, with the absorption in the range of 0.200 to 0.800, as well as the robustness of the method in withstand small and deliberate variation. The method was validated, presenting selectivity, linearity, precision, accuracy, meeting the requirements established in resolution RDC No. 166/2017, which provides for the validation of analytical methods, being evaluated through statistical tests, such as: Test F, Test t, ANOVA, Cochran test and linear regression that the method meets the parameters described in Guide No. 10/2017 which deals with the statistical treatment of analytical validation. This work is part of a Technical Cooperation and Technology Transfer Agreement between LAFEPE and the NCQMC laboratory of the Federal University of Pernambuco (UFPE), in which the product of this dissertation was an analytical technology, transferred and internalized to LAFEPE.

**Keywords:** analytical development; spectrophotometry; validation.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Estrutura Química da Olanzapina .....	21
<b>Figura 2</b> – Aparelhagem do método 2 (pás) .....	26
<b>Figura 3</b> – Aparato alternativo.....	26
<b>Figura 4</b> – Esquema ilustrativo da travessia da radiação monocromática.....	28
<b>Figura 5</b> – Ilustração da limitação da lei de Beer .....	29
<b>Figura 6</b> – Esquema ilustrativo do funcionamento do espectrofotômetro UV-VS.....	30
<b>Figura 7</b> – Fluxo referente ao parâmetro de linearidade.....	40
<b>Figura 8</b> – Espectro do padrão de Olanzapina 5 mg.....	62
<b>Figura 9</b> – Espectro do placebo .....	62
<b>Figura 10</b> – Espectro do branco.....	63
<b>Figura 11</b> – Gráfico resposta x concentração - olanzapina 5 mg .....	63
<b>Figura 12</b> – Gráfico resposta x concentração - olanzapina 10 mg .....	64
<b>Figura 13</b> – Gráfico de dispersão dos resíduos – olanzapina 5 mg .....	67
<b>Figura 14</b> – Gráfico de dispersão dos resíduos – olanzapina 10 mg .....	68
<b>Figura 15</b> – Varredura espectral da Olanzapina .....	75

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1</b> - Critérios de aceitação para teste de dissolução.....	24
<b>Quadro 2</b> - Tipos de radiação eletromagnética e faixa de comprimento de onda.....	27
<b>Quadro 3</b> - Condições para a avaliação da robustez do método.....	31
<b>Quadro 4</b> – Parâmetros avaliados na validação de metodologia analítica .....	32
<b>Quadro 5</b> – Lista de equipamentos.....	46
<b>Quadro 6</b> – Lista de substância química de referência, amostras e reagentes.....	46
<b>Quadro 7</b> - Lista de vidrarias.....	47
<b>Quadro 8</b> - Lista de membranas .....	47
<b>Quadro 9</b> – Avaliação da linearidade e cálculos estatísticos.....	59
<b>Quadro 10</b> - Descrição dos resultados do desenvolvimento analítico.....	75

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – C crítico com nível de significância de 5% .....	37
<b>Tabela 2</b> – Valores de referência para (r).....	39
<b>Tabela 3</b> – Critério de aceitação para repetibilidade.....	41
<b>Tabela 4</b> – Critério de aceitação para reprodutibilidade .....	42
<b>Tabela 5</b> – Valor de t, segundo grau de liberdade e o valor de $\alpha$ .....	43
<b>Tabela 6</b> – Limites de recuperação em função da concentração do analito.....	45
<b>Tabela 7</b> – Critério de aceitação repetibilidade .....	51
<b>Tabela 8</b> – Diluições da exatidão Olanzapina 5 mg.....	53
<b>Tabela 9</b> – Diluições da exatidão Olanzapina 10 mg.....	54
<b>Tabela 10</b> – Critério de aceitação – Exatidão .....	54
<b>Tabela 11</b> – Diluições da linearidade Olanzapina 5 mg .....	57
<b>Tabela 12</b> – Diluições da linearidade Olanzapina 10 mg .....	57
<b>Tabela 13</b> – Robustez -Tempo de extração.....	60
<b>Tabela 14</b> – Robustez - Variação de marca do reagente .....	60
<b>Tabela 15</b> – Robustez - Tempo de preparo das soluções .....	61
<b>Tabela 16</b> – Dados da concentração das apresentações Olanzapina 5 mg.....	65
<b>Tabela 17</b> – Dados da concentração das apresentações Olanzapina 10 mg.....	66
<b>Tabela 18</b> – Dados estatísticos da linearidade – Olanzapina 5 mg e 10 mg .....	67
<b>Tabela 19</b> – Resultados da repetibilidade Olanzapina 5 mg .....	68
<b>Tabela 20</b> – Resultados da repetibilidade Olanzapina 10 mg .....	69
<b>Tabela 21</b> – Resultados da precisão intermediária Olanzapina 5 mg .....	70
<b>Tabela 22</b> – Resultados da precisão intermediária Olanzapina 10 mg .....	70
<b>Tabela 23</b> – Resultados do Teste t Student. Olanzapina 5mg e 10 mg .....	71
<b>Tabela 24</b> – Resultados da exatidão Olanzapina 5 mg .....	72
<b>Tabela 25</b> – Resultados da exatidão Olanzapina 10 mg .....	72
<b>Tabela 26</b> – Resultados da exatidão comparativa Olanzapina 5 mg.....	73
<b>Tabela 27</b> – Resultados da exatidão comparativa Olanzapina 10 mg.....	73
<b>Tabela 28</b> – Resultados do Teste t Student. Olanzapina 5mg e 10 mg .....	73
<b>Tabela 29</b> – Concentração das leituras em diferentes tempos de extração Olanzapina 5mg...75	
<b>Tabela 30</b> – Concentração das leituras em diferentes tempos de extração Olanzapina 10mg. 76	

<b>Tabela 31</b> – ANOVA Olanzapina 5 mg e 10 mg .....	76
<b>Tabela 32</b> – Resultados da mudança de filtro Olanzapina 5 mg.....	77
<b>Tabela 33</b> – Resultados da mudança de filtro Olanzapina 10 mg.....	77
<b>Tabela 34</b> – Teste F e Teste t - Olanzapina 5 mg e 10 mg.....	77
<b>Tabela 35</b> - Resultados da mudança da marca do reagente Olanzapina 5 mg .....	78
<b>Tabela 36</b> – Resultados da mudança da marca do reagente Olanzapina 10 mg .....	78
<b>Tabela 37</b> – Teste F e Teste t - Olanzapina 5 mg e 10 mg.....	79
<b>Tabela 38</b> – Resultados da estabilidade da amostra - Olanzapina 5 mg .....	79
<b>Tabela 39</b> – Resultados da estabilidade da amostra - Olanzapina 10 mg .....	80
<b>Tabela 40</b> – ANOVA Olanzapina 5 mg e 10 mg .....	80

## LISTA DE ABREVIATURAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BCS	Sistema de Classificação Biofarmacêutica
BPF	Boas Práticas de Fabricação
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CV	Coeficiente de Variação
DPR	Desvio Padrão Relativo
FB	Farmacopeia brasileira
FDA	Food and Drug Administration
HPLC	High Performace Liquid Chomatography
ICH	Conselho Internacional de Harmonização
IFA	Insumo Farmacêutico Ativo
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
LAFEPE	Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco
MMQO	Método dos Mínimos Quadrados Ordinários
MMQP	Método dos Mínimos Quadrados Ponderados
TAB	Transtorno Afetivo Bipola
UV	Ultravioleta
VIS	Visível

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>15</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>17</b>
<b>2.1</b>	<b>Objetivo geral.....</b>	<b>17</b>
<b>2.2</b>	<b>Objetivos específicos.....</b>	<b>17</b>
<b>3</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>18</b>
3.1	HISTÓRICO DAS DOENÇAS PSICÓTICAS .....	18
3.2	DEFINIÇÃO E CLASSIFICAÇÃO DO TRANSTORNO BIPOLAR .....	18
<b>3.2.1</b>	<b>Definição .....</b>	<b>18</b>
<b>3.2.2</b>	<b>Classificação .....</b>	<b>19</b>
3.3	HISTÓRICO DOS MEDICAMENTOS ANTIPSICÓTICOS .....	19
3.4	CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DA OLANZAPINA .....	20
3.5	FARMACODINÂMICA E FARMACOCINÉTICA DA OLANZAPINA.....	21
3.6	EFEITOS ADVERSOS DA OLANZAPINA .....	22
3.7	FUNDAMENTOS DA TÉCNICA DE PERFORMANCE (DISSOLUÇÃO).....	23
3.8	FUNDAMENTOS DA TÉCNICA DE QUANTIFICAÇÃO (ESPECTROFOTOMETRIA) .....	27
3.9	DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA ANALÍTICA .....	30
3.10	VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA .....	31
3.11	PARÂMETROS DA VALIDAÇÃO ANALÍTICA E TRATAMENTO ESTATÍSTICOS APLICADOS.....	33
<b>3.11.1</b>	<b>Seletividade.....</b>	<b>33</b>
<b>3.11.2</b>	<b>Linearidade.....</b>	<b>33</b>
<b>3.11.3</b>	<b>Precisão .....</b>	<b>40</b>
<b>3.11.4</b>	<b>Repetibilidade.....</b>	<b>41</b>
<b>3.11.5</b>	<b>Precisão intermediária/reprodutibilidade .....</b>	<b>42</b>
<b>3.11.6</b>	<b>Exatidão .....</b>	<b>42</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>46</b>
4.1	MATERIAL.....	46
<b>4.1.1</b>	<b>Equipamentos .....</b>	<b>46</b>
<b>4.1.2</b>	<b>Reagentes .....</b>	<b>46</b>
<b>4.1.3</b>	<b>Vidrarias .....</b>	<b>47</b>

<b>4.1.4</b>	<b>Membranas</b> .....	<b>47</b>
4.2	MÉTODOS .....	47
<b>4.2.1</b>	<b>Condição de Análise para validação dos medicamentos Olanzapina 5/10 mg</b>	<b>47</b>
<b>4.2.2</b>	<b>Preparo das soluções para o medicamento Olanzapina 5 mg</b> .....	<b>48</b>
4.2.2.1	Solução para o meio de dissolução .....	48
4.2.2.2	Solução Padrão (Olanzapina 5 mg).....	48
4.2.2.3	Solução Padrão (Olanzapina 10 mg).....	48
4.2.2.4	Solução amostra (Olanzapina 5 mg) .....	49
4.2.2.5	Solução amostra (Olanzapina 10 mg) .....	49
<b>4.2.3</b>	<b>Procedimento para quantificação do teor dissolvido dos medicamentos Olanzapina 5/10 mg</b> .....	<b>49</b>
4.3	PREPARO DAS AMOSTRAS DE VALIDAÇÃO.....	50
<b>4.3.1</b>	<b>Repetibilidade</b> .....	<b>50</b>
4.3.1.1	Critério de aceitação – repetibilidade.....	50
<b>4.3.2</b>	<b>Precisão intermediária</b> .....	<b>51</b>
4.3.2.1	Critério de aceitação – precisão intermediária .....	51
<b>4.3.3</b>	<b>Seletividade</b> .....	<b>51</b>
4.3.3.1	Solução placebo para os medicamentos Olanzapina 5/10 mg .....	51
4.3.3.2	Critério de aceitação - Seletividade.....	52
<b>4.3.4</b>	<b>Exatidão</b> .....	<b>52</b>
4.3.4.1	Preparo das soluções estoque para exatidão para Olanzapina 5 mg .....	52
4.3.4.2	Preparo das soluções estoque para exatidão para Olanzapina 10 mg .....	53
4.4	COMPARAÇÃO DO MÉTODO DESENVOLVIDO COM O MÉTODO VALIDADO .....	54
<b>4.4.1</b>	<b>Critério de aceitação - Exatidão</b> .....	<b>54</b>
<b>4.4.2</b>	<b>Condições de análise</b> .....	<b>54</b>
4.4.2.1	Solução Padrão Olanzapina 5 mg .....	55
4.4.2.2	Solução Amostra Olanzapina 5 mg.....	55
4.4.2.3	Solução padrão e amostra Olanzapina 10 mg .....	56
4.4.2.4	Adequabilidade do Sistema.....	56
4.4.2.5	Procedimento cromatográfico para Olanzapina 5/10 mg.....	56
<b>4.4.3</b>	<b>Linearidade</b> .....	<b>56</b>
4.4.3.1	Solução Estoque para a linearidade Olanzapina 5 e 10 mg.....	57
<b>4.4.4</b>	<b>Desenvolvimento analítico e Robustez</b> .....	<b>58</b>

4.4.4.1	Desenvolvimento analítico.....	58
<b>4.4.4.2</b>	<b>Robustez – Tempo de extração .....</b>	<b>59</b>
4.4.4.3	Robustez - Compatibilidade de filtros.....	60
3.4.4.4	Robustez - Diferentes fabricantes de solventes .....	60
3.4.4.5	Robustez - Estabilidade das soluções analíticas.....	60
3.4.4.6	Critério de aceitação – robustez .....	61
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>62</b>
5.1	VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO .....	62
<b>5.1.1</b>	<b>Especificidade .....</b>	<b>62</b>
<b>5.1.2</b>	<b>Linearidade.....</b>	<b>63</b>
<b>5.1.3</b>	<b>Precisão .....</b>	<b>68</b>
5.1.3.1	Repetibilidade .....	68
5.1.3.2	Precisão intermediária.....	69
<b>5.1.4</b>	<b>Exatidão .....</b>	<b>71</b>
<b>5.1.5</b>	<b>Desenvolvimento analítico e Robustez .....</b>	<b>74</b>
5.1.5.1	Desenvolvimento analítico.....	74
5.1.5.2	Robustez - Tempo de extração.....	75
5.1.5.3	Robustez – Compatibilidade dos filtros .....	76
5.1.5.4	Robustez – Mudança da marca de reagente .....	78
5.1.5.5	Robustez – Estabilidade das soluções .....	79
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>81</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>82</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Os distúrbios emocionais provocados pela esquizofrenia vêm impactando a vida de pacientes e suas relações interpessoais (RODRÍGUEZ; GONZÁLEZ; MENESES, 2012). Por ser uma doença mental crônica, qualificada por comportamentos positivos e negativos, tais como: delírio, alucinações auditivas, ilusões, agitação extrema, crises agressivas e desagregação do pensamento, onde os primeiros sintomas aparecem no início da vida adulta, o tratamento eficaz e com poucos efeitos colaterais deve ser iniciado para que a paciente viva com qualidade (WANNMACHER, 2004). Como os pacientes estão convivendo com a doença até a idade avançada, devido à diminuição da mortalidade, o distúrbio deverá ser uma preocupação de saúde pública nos próximos anos (SUZUKI et al., 2011).

No cenário dos antipsicóticos atípicos disponíveis para tratamento de paciente com transtorno bipolar, a Olanzapina é a primeira droga utilizada por apresentar poucos efeitos extrapiramidais, bem como é usada para tratar de pacientes refratários aos tratamentos convencionais e prevenir recidivas pela descontinuação do tratamento (OLIVEIRA, 2000; RODRÍGUEZ; GONZÁLEZ; MENESES, 2012; SUZUKI et al., 2011)

A Olanzapina (2-metil-4-(4-metil-1-piperazinil)-10H-tieno(2,3-b) (1,5) benzodiazepina) é um agente psicotrópico pertencente à classe das tienobenzodiazepinas. Apresenta afinidade pelos sítios de ligação dopaminérgicos (D1-D4) e receptores da serotonina, muscarínicos e histamina (MOURA; MOITA, 2012; MOURA, 2009; RÊGO; MOURA; MOITA, 2010).

Foi sintetizada na Inglaterra a partir da modificação da clozapina e despertou interesse da indústria farmacêutica por apresentar mais segurança e eficácia quando comparada com outros antipsicóticos convencionais e atípicos (RÊGO; MOURA; MOITA, 2010). Foi incluída em 1999 na lista de medicamentos excepcionais do Ministério da Saúde e hoje é o antipsicótico mais utilizado no tratamento de transtorno positivo e negativos das síndromes relacionadas ao transtorno bipolar (MOURA, 2009; RÊGO; MOURA; MOITA, 2010).

Ensaio *in vitro* são aplicados na indústria farmacêutica para garantir a segurança e eficácia do medicamento, dentre os testes, o de performance da dissolução avalia a quantidade de fármaco dissolvido em determinado tempo. A metodologia da última versão da farmacopeia americana (USP 44) descreve o ensaio utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) como instrumento analítico para quantificação do fármaco dissolvido, esse equipamento também é descrito no relatório da validação do LAFEPE e artigos técnico

científicos (MOURA, 2009; USP 44). Porém, a cromatografia, apesar da alta sensibilidade do método, apresenta como desvantagens a utilização de solventes orgânicos tóxicos, equipamentos de alto custo e complexidade (MOURA, 2009).

A disponibilidade de métodos alternativos visando a quantificação das amostras em formulações utilizando espectrofotômetro no ultravioleta/visível (UV/VIS), aliado a métodos derivados não foram executados em ensaios de dissolução (BASAVIAH; RANGACHAR; THARPA, 2008; RÊGO; MOURA; MOITA, 2010). Outro método proposto por Basavaiah (2009) utilizando permanganato de potássio como reagente oximétrico demonstrou sensibilidade, mas não foi aplicado a ensaios de dissolução (RAJENDRAPRASAD; BASAVIAH, 2009).

Então, considerando a inexistência de técnica rápida propõem-se a utilização da técnica analítica de espectroscopia (UV/VIS). A técnica permite análise qualitativa e quantitativa na aplicação em sistemas orgânicos e inorgânicos com boa sensibilidade, baixo custo e simplicidade na geração e processamento dos dados (MOURA, 2009). É fundamentada em energia eletromagnética, forma de energia que se propaga como ondas, que é absorvida pelas moléculas e depende tanto da concentração quanto da estrutura química (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2019).

A absorção de energia provoca na molécula uma transição de estado de maior energia onde na região UV/VIS ocorre na porção da molécula chamadas de cromóforos que, dependendo concentração da solução, ocorre proporcionalmente a absorção de luz, sendo, assim, uma relação linear (MOURA, 2009; FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2019). O modo de transmissão é o principal na espectroscopia UV/VIS e consiste na medida da intensidade da radiação após atravessar a amostra, a Equação entre a radiação incidente pela radiação transmitida é identificada pelo detector, convertida e processada pelo software em dados de absorvância (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2019).

Assim, o uso da espectroscopia UV/VIS, é de fundamental importância para desenvolvimento do método para quantificação do teor dissolvido de olazapina, pois apresenta boa sensibilidade, baixo custo e simplicidade na geração e processamento dos dados. Desse modo, para quantificar o fármaco dissolvido em formulações do medicamento Olanzapina 5 e 10 mg comprimidos revestidos fabricados pelo Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco Governador Miguel Arraes (LAFEPE), o método deve proporcionar resposta imediata, baixo custo na aquisição do equipamento e baixa complexidade na operação e geração dos dados, devendo demonstrar que produz resultados confiáveis e adequados à finalidade a que se destina mediante a validação analítica (BRASIL, 2017).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver um método por espectroscopia para quantificação do teor dissolvido do fármaco olanzapina em formulações de comprimido revestido olanzapina 5 e 10 mg dos medicamentos fabricadas pelo LAFEPE.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos deste projeto são:

- a) Realizar varredura espectral do fármaco e do medicamento olanzapina 5 e 10 mg para identificar a onda onde se obtém as maiores absorvâncias;
- b) Validar a metodologia analítica, avaliando os parâmetros de robustez, exatidão, precisão, seletividade, linearidade;
- c) Aplicar o Teste F e teste T de Student comparando o método desenvolvido com o método validado no LAFEPE.

### **3 REFERENCIAL TEÓRICO**

#### **3.1 HISTÓRICO DAS DOENÇAS PSICÓTICAS**

O termo grego *μανία* que tem origem no conceito de mania e significa loucura, conhecida atualmente como doença mental e já era qualificada por Hipócrates, médico grego considerando pai da medicina, durante a segunda metade do século V, que caracterizava a *μανία* como excitação febril do encéfalo (BARNETT, 2018). Porém, apenas na metade do século XIX, que os movimentos no campo da psiquiatria com Jacques-Joseph Moreau e Wilhelm Griesinger presumiram que uma alteração estrutural no cérebro estava correlacionada com a origem e a causa descrita na Grécia por Hipócrates. Muito do atraso nas pesquisas para o tratamento do transtorno mental deve-se ao médico Benedict Agustín Morel que considerava incurável por vincular o transtorno a uma herança genética hereditária (LÓPEZ-MUÑOZ et al., 2018)

No século XX, durante a década de 1950, à psicose maníaco-depressiva foi descrita por Emil Kraepelin como um transtorno efetivo o que introduziu o conceito de polaridade, onde, no mesmo ano, foi iniciado o primeiro tratamento pelo cirurgião francês Henri Laboriq que utilizou o anti-histamínico Clorpromazina como sedativo em pacientes psicóticos, sendo o primeiro antipsicótico utilizado na clínica médica (RODRÍGUEZ; GONZÁLEZ; MENESES, 2012).

#### **3.2 DEFINIÇÃO E CLASSIFICAÇÃO DO TRANSTORNO BIPOLAR**

##### **3.2.1 Definição**

Segundo à portaria nº 315/2016 o Transtorno Afetivo Bipolar (TAB) é um transtorno de humor caracterizado pela alternância de episódios de depressão, mania ou hipomania. O TAB é classificado em tipo I e II, sendo diferenciados pela frequência dos episódios maníaco, depressivo e hipomania (LÓPEZ-MUÑOZ et al., 2018).

### 3.2.2 Classificação

López-Muñoz et al. (2018) traz à diferença entre o transtorno bipolar do tipo I, que se caracteriza pela presença de, pelo menos, um episódio maníaco ou misto em combinação com depressão; e transtorno bipolar tipo II, caracterizado por um ou mais episódios depressivos com pelo menos um episódio de hipomania com duração superior a quatro dias, sendo o transtorno bipolar tipo II mais frequente que o tipo I. O episódio maníaco é caracterizado por humor anormal, aumento da energia, autoestima inflada, grandiosidade, redução da necessidade de sono, envolvimento excessivo em atividades, surtos desenfreados, indiscrições sexuais sendo contrário ao episódio de depressão maior que é caracterizado quando o paciente apresenta humor deprimido na maior parte do dia, diminuição do interesse das atividades, perda ou ganho significativo de peso, fadiga, sentimento de inutilidade e pensamento recorrente de morte (BRASIL, 2016).

Para o tratamento do TAB é necessária a utilização de drogas que controlem os episódios maníacos e depressivo, não apenas na fase aguda, mas previnam a recaídas e evitem principalmente o suicídio (YATHAM et al., 2018). Inicialmente os antipsicóticos de segunda geração eram usados principalmente para tratamento da esquizofrenia, porém vem crescendo a utilização dos medicamentos para transtorno de humor, como exemplo o TAB (DEBATTISTA; DEBATTISTA, 2010). Em comparação aos antipsicóticos de primeira geração, os atípicos apresentam como vantagens a capacidade de promover poucos efeitos extrapiramidais, tais como: ganho de peso, agitação, constipação, sonolência, hipersalivação, hipotensão, lipídios séricos elevados e disfunção sexual (MCDONAGH et al., 2010; OLIVEIRA, 2000).

### 3.3 HISTÓRICO DOS MEDICAMENTOS ANTIPSICÓTICOS

O medicamento Clorpromazina foi aprovado em 1973 pela agência federal do Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos Estados Unidos (*Food and Drug Administration* - FDA) responsável pelo controle medicamentos e alimentos nos Estados Unidos da América (DEBATTISTA; DEBATTISTA, 2010). Antes da aprovação da Clopromazina ocorreu à discussão sobre o tratamento maníaco-depressivo com o uso de sais de lítio em 1960, sendo registrado para tratamento do sintoma maníaco em 1970 pela FDA (BARNETT, 2018). O uso de sais de lítio para o tratamento maníaco-depressivo foi aprovado

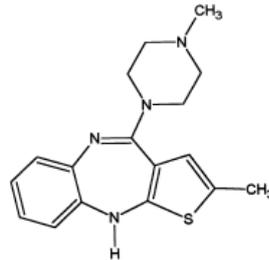
pela FDA em 1978, perdurando como única alternativa para o transtorno maníaco-depressivo até 1990 quando o Ácido Valpórico, um medicamento da classe dos anticonvulsivantes, foi aprovado pela FDA para indicação antimaníaca (BARNETT, 2018; LÓPEZ-MUÑOZ et al., 2018). A aprovação em 1990 pela FDA do primeiro medicamento antipsicótico (clozapina) de segunda geração (atípico) trouxe uma nova perspectiva para o tratamento, pois, em doses terapêuticas, apresenta ação antipsicótica sem apresentar efeito extrapiramidal. Outros atípicos foram registrados em 1994 risperidona, em 1996 a olanzapina, em 1997 quetiapina e a ziprasidona no ano 2000 (ANDRADE, 2015).

No Brasil, o uso do medicamento Ácido Valpórico foi aprovado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) em 1998 para utilização clínica como anticonvulsivante, sendo a sua classificação como “outros produtos que atuam no sistema nervoso” aprovado em 2003, um ano depois da aprovação do carbonato de lítio pela ANVISA como antidepressivo (BRASIL, 2021). O primeiro antipsicótico atípico clozapina foi registrado em 1992 no Brasil, outros atípicos foram registrados em seguida após avaliação da agência (ANDRADE, 2015)

Entre os medicamentos antipsicóticos atípicos aprovados na Anvisa e FDA que apresentam alta taxa de aceitação, bem como baixo índice de descontinuação pelos pacientes pode-se destacar a Olanzapina, sendo um dos mais recentes atípicos comercializados, estando entre o primeiro antipsicótico atípico aprovado pelo FDA para utilização da mania aguda do TAB e medicamento de primeira linha para o tratamento, pois permite o bloqueio dos receptores responsáveis por transmitir o estímulo entre as células nervosa (LÓPEZ-MUÑOZ et al., 2018; MCDONAGH et al., 2010; RAGGI et al., 2000).

### 3.4 CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DA OLANZAPINA

A Olanzapina representada pela estrutura química (Figura 1), tem fórmula estrutural (2-metil-4-(4-metil-1piperazinil)-10H-tieno[2,3b][1,5] benzodiazepina) e apresenta fórmula molecular  $C_{17}H_{20}N_4$  com peso molecular 312,43 g/mol, sendo apresentada como sólido amarelo cristalino em três formas polimórficas anidras (I, II e III) é praticamente insolúvel em água, solúvel em soluções ácidas e pouco solúvel em meio básico (LIMA, 2013; RAGGI et al., 2000; TESTA et al., 2019). As apresentações comerciais, em forma farmacêutica comprimidos revestidos, apresentam classificação conforme sistema Biofarmacêutica (BCS) com medicamento classe II.

**Figura 1** – Estrutura Química da Olanzapina.

Fonte: USP 44

### 3.5 FARMACODINÂMICA E FARMACOCINÉTICA DA OLANZAPINA

A Olanzapina diminui a atividade excessiva do cérebro bloqueando os receptores responsáveis por receber informações químicas e transmiti-las através das células nervosas, assim, atua como antagonista impedindo o acoplamento de neurotransmissores receptores dopaminérgico D2 pós-sináptico, esse bloqueio diminui os episódios maníacos característicos da fase positiva do TAB, nos receptores serotoninérgicos atua, também, como antagonista reduzindo os efeitos depressivos característicos dos episódios negativos do TAB, porém se liga fracamente aos receptores e se dissocia facilmente permitindo a neurotransmissão normal (LÓPEZ-MUÑOZ et al., 2018; OLIVEIRA, 2000; RENKOLLU; ÇELEBIER; ARICAYEGIN, 2015).

A droga é considerada um benzodiazepínico, especificamente um antagonista benzodiazepínico (OLIVEIRA, 2000; RODRÍGUEZ; GONZÁLEZ; MENESES, 2012). Além das atividades nos receptores descritas por Thomas et al. (2021) a olanzapina segundo Rodríguez, González e Meneses (2012) apresenta ação sobre os sítios de ligação D1-D4, serotoninérgicos (5-HT<sub>2,3,6</sub>), muscarínicos (subtipos 1-5), adrenérgicos (alfa 1) e histaminérgicos (H<sub>1</sub>). Especificamente Oliveira (2002) descreve à ação da olanzapina sobre os receptores da serotonina 5-HT<sub>2A</sub>, 5-HT<sub>2C</sub>, 5-HT<sub>3</sub>, 5-HT<sub>6</sub>.

A descontinuidade com o uso do antipsicótico olanzapina, quando utilizados por longos períodos, deve-se pela afinidade pelo bloqueio dos receptores dopaminérgicos D2 (MCDONAGH et al., 2008). A prevenção de recaídas, em estudos realizados por Rodríguez, González e Meneses (2012) é determinada pela afinidade por receptores de serotonina 5HT<sub>2</sub> quando comparado com os receptores dopaminérgicos D2 ou maior afinidade por receptores dopaminérgicos D4.

A olanzapina apresenta tempo de meia vida de 21 à 54 horas, dependendo do estado de saúde, idade e sexo, com concentração máxima de 5-8 horas e indicação de 5-20 mg uma

vez ao dia independente da alimentação (OLIVEIRA 2000; RAGGI et al., 2000). A faixa de distribuição é linear e apresenta 93% da droga ligadas a proteínas plasmáticas, sendo metabolizadas no fígado por glucoronidação pela enzima glucoronosiltransferase (UGT) e citocromo P450 (CYP) e posterior excretada com 7% de forma inalterada sem a metabolização, 53 % pela urina e 30% pelas fezes na forma dos metabólitos 10-N-glicuronídeo e N-desmetil e 2-hidroximetil (THOMAS et. al., 2021; OLIVEIRA, 2002).

Há controvérsia nos estudos apresentados por Oliveira (2000) frente ao descrito na bula, disponibilizada no site Anvisa, em relação ao volume de distribuição, segundo Oliveira (2002) o volume varia na faixa de 1000 à 1150 L em contraste ao apresentado na bula do medicamento que descreve uma variação de 7000 à 1000 L.

### 3.6 EFEITOS ADVERSOS DA OLANZAPINA

Apesar de apresentar poucos efeitos extrapiramidais, quando comparados aos antipsicóticos de primeira geração, bem como, entre os antipsicóticos de segunda geração (risperidona e clozapina) a olanzapina exibe como principal efeito adverso o ganho de peso devido ao aumento do apetite estando associado ao maior índice de diabetes e doenças cardiovasculares principalmente em paciente obesos, com disfunção alimentar e não praticante de exercício físico regular (DEBATTISTA, DEBATTISTA 2010; MCDONAGH et al., 2008).

Outro efeito adverso que está ligado à diabetes deve-se pelos efeitos metabólicos ainda não totalmente compreendidos, mas que podem estar associados a resistência à insulina provocada pelo antagonismo aos receptores de histamina (H1) e serotonina 5HT<sub>2c</sub> (DEBATTISTA, DEBATTISTA, 2010).

Pelo mecanismo de ação proporcionar principalmente o bloqueio do receptor dopaminérgico (D<sub>2</sub>) os pacientes que fazem uso de olanzapina apresentam reação adversa ligado ao antagonismo, tais como: acatisia, discinesia tardia, síndrome neurológica maligna e reações distônicas sendo consideradas mais baixas do que os medicamentos de primeira geração devido à ligação fraca e dissociação rápida nos receptores D<sub>2</sub> (DEBATTISTA; DEBATTISTA, 2010; RODRÍGUEZ; GONZÁLEZ; MENESES, 2012).

### 3.7 FUNDAMENTOS DA TÉCNICA DE PERFORMANCE (DISSOLUÇÃO)

A dissolução consiste em uma técnica disponível nos métodos gerais da Farmacopeia Brasileira 6ª edição (FB6) que objetiva comprovar que um percentual do princípio ativo do medicamento foi dissolvido quando o produto é exposto às condições experimentais descritas na monografia individual do medicamento (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2019).

O teste pode ser classificado em dissolução rápida e muito rápida dependendo do percentual dissolvido em determinado tempo, conforme a resolução RDC nº 31, de 11 de agosto de 2010 que dispõe sobre a realização dos Estudos de Equivalência Farmacêutica e de Perfil de Dissolução Comparativo (ANVISA, 2010).

A dissolução deve apresentar média de substância ativa dissolvido de no mínimo 85% em até 15 minutos para ser considerada muito rápida e média de substância ativa dissolvido de no mínimo 85% em até 30 minutos para ser considerada rápida (ANVISA, 2010).

A FB6 não traz no compêndio a monografia do medicamento olanzapina comprimido, necessitando, por tanto, a utilização de outro compêndio oficial aprovado pela resolução RDC nº 511 de 27 de maio de 2021 que dispõe sobre a admissibilidade de códigos farmacêuticos estrangeiros (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2019).

A farmacopeia USP admitida pela RDC N ° 511/2021 dispõe de monografia individual do medicamento Olanzapina comprimido, sendo utilizada como referência para execução do teste de dissolução (USP 44).

Conforme descrito na USP 44 o medicamento Olanzapina comprimido apresenta especificação de tolerância mínima de 80% (Q) da quantidade declarada de C17H20N4 que dissolvem em 30 minutos devendo utilizar como condição de ensaio meio de dissolução ácido clorídrico 0,1 N, aparelhagem do método 2 (pás) com rotação 50 rpm por 30 minutos.

Após a execução do teste deverá ser retirada uma alíquota da zona intermediária, entre a superfície do meio de dissolução e o topo da pá. Em seguida, é necessária filtragem em membrana de 0,45µm e posterior quantificação por cromatografia líquida de alta eficiência do inglês High Performance Liquid Chromatography – HPLC (USP 44);

Os critérios de aceitação determinados pela FB6 estão disponibilizados na Quadro 1, sendo necessária para aprovação do medicamento o atendimento do estágio 1 (E1) que determina a execução do teste com 6 (seis) unidades, sendo aprovada individualmente quando Q, quantidade dissolvida do fármaco, apresentar igual ou maior do que  $Q + 5\%$  (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2019). Caso a quantidade dissolvida da substância ativa

não atenda aos critérios de aceitação determinados no Estágio E1 será necessário repetir com mais 6 (seis) unidades, sendo das doze unidades testadas (Estágios E1 e E2) é maior ou igual a Q e, se nenhuma das unidades testadas apresentar resultado inferior a  $Q - 15\%$  (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2019).

**Quadro 1-** Critérios de aceitação para teste de dissolução

Estágio	Número de amostras	Critérios de aceitação
<b>E1</b>	6	Cada unidade apresenta resultado maior ou igual a $Q + 5\%$
<b>E2</b>	6	Média de 12 unidades ( $E_1 + E_2$ ) é igual ao maior do que Q, no máximo duas unidades apresentam resultados inferiores a $Q - 15\%$
<b>E3</b>	12	Média de 24 unidades ( $E_1 + E_2 + E_3$ ) é igual ao maior do que Q, no máximo duas unidades apresentam resultados inferiores a $Q - 15\%$ e nenhuma unidade apresenta resultado inferior a $Q - 25\%$ .

Fonte: Farmacopéia brasileira, 2019

Ainda insatisfatório no Estágio E2 deverá ser testado mais 12 unidades, sendo critério de aceitação média das 24 unidades testadas (Estágios E1, E2 e E3) é maior ou igual a Q, no máximo duas unidades apresentam resultados inferiores a  $Q - 15\%$  e nenhuma unidade apresentar resultado inferior a  $Q - 25\%$  (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2019).

Para executar as condições experimentais descritas na monografia individual faz-se necessária aparelhagem que permita à execução dos ensaios, para tanto, a FB6 reporta à aparelhagem para os dois métodos 1 e 2, sendo descrita conforme disposição da monografia (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2019)

O aparelho de dissolução conforme FB6 consiste de um sistema de três componentes:

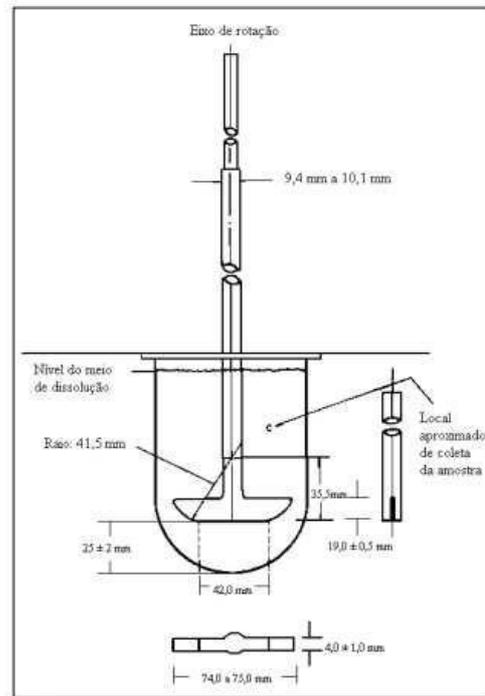
- a) Recipientes abertos de forma cilíndrica e fundo hemisférico (cubas), feitos em vidro boro silicato, plástico ou outro material transparente e inerte, aos quais pode ser adaptada tampa de material inerte, com aberturas adequadas para o agitador, coleta de amostras e inserção de termômetro. As cubas podem apresentar as seguintes dimensões e capacidades:  $(185 \pm 25)$  mm de altura e  $(102 \pm 4)$  mm de diâmetro interno para uma capacidade nominal de um litro;  $(290 \pm 10)$  mm de altura e  $(102 \pm 4)$  mm de diâmetro interno para uma capacidade nominal de dois litros;  $(290 \pm 10)$  mm de altura e  $(150 \pm 5)$  mm de diâmetro interno para uma capacidade nominal de quatro litros.

- b) Hastes em aço inoxidável para prover agitação do meio, que podem apresentar sob duas formas: cestas (Método 1) ou pás (Método 2). A haste deve ser centralizada de tal forma que, ao ser acionada, seu eixo de rotação não se afastemais de 2 mm em relação ao eixo vertical do recipiente contendo o meio de dissolução.
- c) Um motor que possibilita ajustar a velocidade de rotação da haste àquelaespecificada na monografia individual, mantendo-a nos limites de  $\pm 4\%$ . A rotação não deve produzir efeitos indesejáveis na hidrodinâmica do sistema.

A temperatura de  $(37 \pm 0,5)$  °C do banho da água deverá ser mantida durante toda a execução dos testes e as cubas deverão ser imersas no banho em material que possibilite a visualização, transparente, que apresente dimensões adequadas (FARMACOPÉIA BRASILEIRA , 2019) .

A aparelhagem necessária para execução do teste para dissolução descrita na USP 44 para o medicamento olanzanpina comprimido é composta de haste de aço inoxidável cuja extremidade apresenta a forma de pá (Figura 2), capaz de girar suavemente sem oscilação significativa que impactem no resultado e que permaneça a uma distância de  $(25 \pm 2)$  mm do fundo interno do recipiente que contém o meio de dissolução (USP 44, FB6). A haste deverá ser revestida ou não de material inerte ou descartável desde que seja inerte e regido devendo permanecer sem desvio de eixo durante o tempo e velocidade especificados na monografia correspondente (FARMACOPÉIA BRASILEIRA , 2019; USP 44).

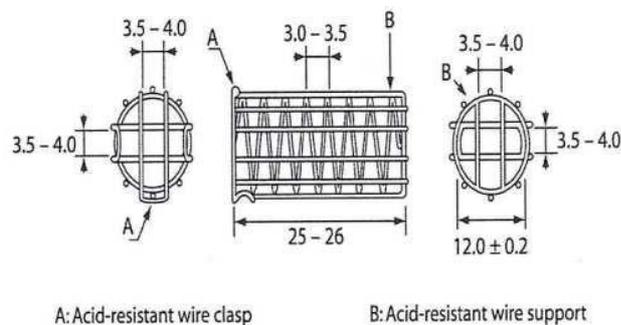
**Figura 2** – Aparelhagem do método 2 (pás).



**Fonte:** Farmacopéia brasileira , 2019.

A amostra deve ser adicionada, sempre que possível, antes do início do teste e pode afundar até o fundo da cuba antes do início do teste e caso flutuem pode ser acoplado um material inerte com ilustrado na Figura 3 (USP 44, (FARMACOPÉIA BRASILEIRA , 2019) .

**Figura 3** – Aparato alternativo.



A: Acid-resistant wire clasp

B: Acid-resistant wire support

**Fonte:** USP 44.

### 3.8 FUNDAMENTOS DA TÉCNICA DE QUANTIFICAÇÃO (ESPECTROFOTOMETRIA)

A análise quantitativa deve ser realizada por técnica capaz de determinar à espécie orgânica (fármacos, fenóis e gordura) ou inorgânica (fosfatos, nitratos, amônia e sulfatos) dependendo das suas características químicas, bem como da concentração. O material quando submetido a radiação eletromagnética deve absorver luz dissipando a radiação emitida onde é medida a transmitância que utilizando equipamento de espectrofotometria será convertida em absorbância. Cada espécie apresenta um espectro de absorção que permite a identificação, porém segundo USP 44 como as bandas espectrais na região do visível e ultravioleta não apresentam grande especificidade é indicado como técnica quantitativa (BARROS, 2014).

A espectrofotometria é uma técnica utilizada para quantificar substâncias que está fundamentada relação direta entre concentração e quantidade de luz absorvida pelo grupo cromóforo, onde ocorre a transição para o estágio excitado ou de maior energia. A absorção deve-se a mudança no momento dipolo elétrico das moléculas e ocorre pela interação energia – matéria no grupo cromóforo que pode ser vibracional devido ao movimento relativo aos átomos consistentes na molécula ou rotacional devido à rotação da molécula em torno do eixo eletrônica, gerada pela configuração de elétrons na molécula (BARROS, 2014; (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2019) .

Para ocorrer a interação se faz necessária a emissão de energia eletromagnética monocromática que consiste em ondas de radiação que se propagam e são divididas em regiões ultravioleta distante, ultravioleta, visível e infravermelho próximo conforme descrito na Quadro 2.

**Quadro 2** – Tipos de radiação eletromagnética e faixa de comprimento de onda.

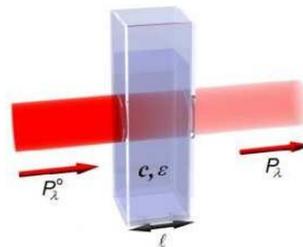
<b>Radiação eletromagnética</b>	<b>Faixa de comprimento de onda</b>
Ultravioleta distante	100 – 200 nm
Ultravioleta	200 – 380 nm
Visível	380 – 780 nm
Infravermelho próximo	780 – 3000nm

Fonte: Farmacopeia Brasileira, 2019.

O princípio está fundamentado na relação diretamente proporcional entre a concentração da substância e quantidade de luz eletromagnética monocromática absorvida

obedecendo a lei de Lambert -Beer. A lei é fundamenta na quantidade de luz absorvida pela amostra onde a transmitância é o quociente entre a potência radiante de saída e a de entrada representada pela Equação (1) e ilustrada pela Figura 4. A medida de absorbância é o simétrico do logaritmo da transmitância (T) sendo representada pela Equação (2). Quando a radiação percorre um caminho óptico (l) para medição da absorbância onde ( $\epsilon$ ) é a constante e representa o coeficiente de absorção molar da espécie em estudo e (C) é a concentração da amostra representada pela Equação (1) (LIMA, 2013).

**Figura 4** – Esquema ilustrativo da travessia da radiação monocromática.



**Fonte:** Lima, 2013.

**Equações:**

$$T = \frac{P_{\lambda}}{P_{\lambda}^0} \quad (1)$$

$$A = \log \left( \frac{P_{\lambda}^0}{P_{\lambda}} \right) = -\log T = \log \left( \frac{1}{T} \right) \quad (2)$$

$$A = \epsilon l C \quad (3)$$

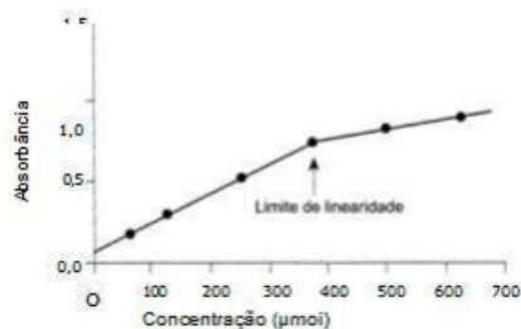
A Lei de Beer pode apresentar algumas limitações, tais como às descritas por Lima (2011):

- a) As partículas (átomos, moléculas ou iões) presentes em solução devem absorver luz de forma independente entre si;
- b) O meio absorvente deve ser homogêneo (solução) e não dispersar a radiação;

- c) A radiação incidente deve estar colimada (raios paralelos entre si) e deve atravessar a mesma distância durante a qual interage com as partículas existentes em solução;
- d) A radiação deve ser monocromática, isto é, ser composta por apenas um comprimento de onda selecionado (normalmente, correspondente ao comprimento de onda para o qual a absorbância da espécie em estudo é máxima);
- e) O fluxo da radiação incidente não pode induzir processos que impliquem a desestabilização dos átomos, moléculas ou iões, como por exemplo excitação eletrônica que dê origem a fenómenos de fluorescência ou fosforescência.

Outra limitação da lei é a concentração do analito, onde em altas concentrações,  $> 0,01 \text{ M}$ , a proximidade entre as moléculas, associações, podem alterar a capacidade da molécula absorver radiação eletromagnética em um determinado comprimento de onda ocorrendo o processo de dispersão de luz surgindo o fenómeno de desvio de proporcionalidade entre a concentração e absorbância ilustrado na Figura 5 (LIMA, 2011). Amostras com absorbância inferiores a 0,2 U.A estão em desacordo com a lei de Lambert, apresentando-se como uma limitação da técnica de espectrofotometria (SOARES et al., 2003).

**Figura 5** – Ilustração da limitação da lei de Beer

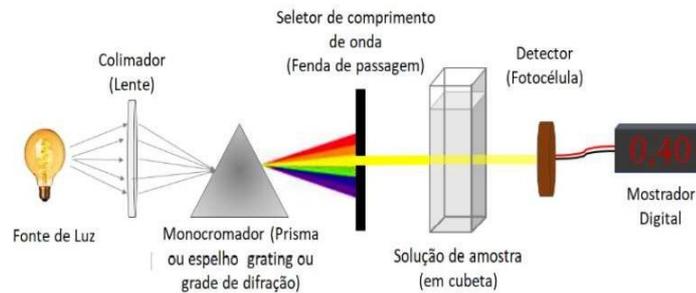


**Fonte:** Barros, 2014.

A técnica de espectrofotometria é executada em equipamentos denominados de espectrofotômetros, que emitem radiação em determinado comprimento de onda, sendo classificado em espectrofotômetro na região do UV-VIS ou espectrofotômetro na região do infravermelho próximo (NIR). Para realizar a identificação e quantificação do analito pode ser utilizado o espectrofotômetro UV-VIS que é um equipamento dotado de fonte de radiação

(lâmpada), seletor de comprimento de onda, colimador (lente), monocromador (prisma), seletor de comprimento de onda (fenda de passagem), insersor da amostra (cubeta), detector de radiação (fotocélula) e uma unidade de processamento de sinal (software) conforme ilustrado na Figura 6 (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2019; ROSA et al., 2019).

**Figura 6** – Esquema ilustrativo do funcionamento do espectrofotômetro UV-VS.



**Fonte:** Rosa et al., (2019).

A quantificação deve ser realizada no comprimento de onda que a substância apresenta o pico de absorção, caso não indicado na monografia individual, os espectrofotômetros atuais permitem a realização de varredura espectral da substância analisada possibilitando a identificação do comprimento de onda adequando. Para que as boas práticas analíticas sejam executadas, se faz necessária a utilização de solventes que apresentem 40 % de transmitância no comprimento de onda de interesse (USP 44).

Outra boa prática é a utilização de cubetas apropriadas para o comprimento de onda analisado, sendo indicada cubetas de quartzo para análises na região UV e cubetas de acrílico ou vidro para análise na região do visível (SKOOK, 2002).

### 3.9 DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA ANALÍTICA

A pesquisa bibliográfica, nas mais diversas fontes, é parte integrante do desenvolvimento do método analítico possibilitando à identificação de equipamentos analíticos, comprimento de onda, preparo de amostra, reagentes, bem como a avaliação de facilidade de execução e rapidez no fornecimento do resultado do método proposto (MOURA, 2009).

Estudos realizados por Basavaiah, Rangachar, Tharpa (2008); Moura e Moita (2012) Rêgo, Moura e Moita (2010) nos quais utilizaram a técnica de espectrofotometria para

quantificação da olanzapina não contemplaram o teste de quantificação da dissolução na metodologia. Assim é indisponível na literatura atual, bem como nos compêndios oficiais uma metodologia para quantificação de olanzapina em ensaios de dissolução (USP 44, FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2019).

O desenvolvimento deve contemplar a avaliação dos parâmetros críticos do ensaio analítico estabelecidos pela RDC 166/2017 como teste de robustez verificando a influência de cada parâmetro promovendo maior confiança no resultado de precisão. O teste de robustez consiste em realizar mínimas e decididas variações estabelecido pela RDC 166/2017, tais como: preparo da amostra e na técnica de espectrofotometria disponíveis no Quadro 3. Devem ser analisadas com os mesmos critérios utilizados no ensaio exatidão descrito a seguir (ANVISA, 2017).

**Quadro 3** – Condições para a avaliação da robustez do método.

Preparo das Amostras	Estabilidade das soluções analíticas
	Tempo de extração
	Compatibilidade de filtros
Espectrofotometria	Variação do pH da solução
	Diferentes lotes ou fabricantes de Solventes

**Fonte:** Adaptado de ANVISA, 2019.

### 3.10 VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA

As normas de Boas Práticas de Fabricação (BPF) vigentes exigem que os métodos de controle de qualidade devam ser validados antes de serem implementados na rotina, levando-se em consideração às instalações e os equipamentos disponíveis. Bem como, que regulamento específico deve ser utilizado para comprovar a conformidade dos resultados obtidos (ANVISA, 2019). Segundo Associação Brasileira De Normas Técnicas (2017) a validação do método deve avaliar a tendência e a precisão utilizando padrões de referência ou materiais de referência, fatores que influenciam o resultado, variação de parâmetros, comparação com resultados obtidos por outros métodos validados, comparações interlaboratoriais e avaliação da incerteza de medição dos resultados.

O regulamento específico aprovado pela Anvisa para execução de validação de metodologia analítica é a Resolução RDC nº166, de 24 de julho de 2017 que dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. A RDC nº 166/ 2017 descreve que validação analítica é uma avaliação sistemática que deve demonstrar que o método analítico

produz resultados confiáveis e é adequado à finalidade a que se destina, de forma documentada e mediante critérios objetivos. Ou seja, o laboratório deve comprovar, por meio de validação, que o método apresenta qualidade pretendida dentro das suas instalações, com os equipamentos e instrumentos dentro das especificações, funcionando corretamente e calibrados (ICH, 2017). O planejamento dos estudos de validação é um aspecto fundamental para garantir que os resultados obtidos reflitam a operação dos procedimentos analíticos e que o método forneça informações confiáveis. Para demonstração da confiabilidade dos resultados a metodologia analítica de quantificação da dissolução deve comprovar efetividade dos parâmetros de robustez, seletividade, linearidade, precisão, exatidão e intervalo, conforme disponibilizada no Quadro 2 (ANVISA, 2017).

Nota-se que o parâmetro robustez não está contemplado no Quadro 4, porém, conforme RDC nº 166/2017 e Guia Q2 R1 estabelecido pelo ICH, Conselho Internacional sobre Harmonização de Requisitos Técnicos, do qual a Anvisa é membro integrante, o parâmetro deverá ser contemplado no estágio do desenvolvimento analítico e deverá compor o relatório de validação (ICH, 2017).

**Quadro 4** – Parâmetros avaliados na validação de metodologia analítica.

Parâmetro Avaliado	Doseamento - Dissolução (quantificação) - Uniformidade de conteúdo - Potência
Exatidão	Sim
Precisão Repetibilidade	Sim
Precisão Intermediária	Sim
Seletividade	Sim
Limite de Detecção	Não
Limite de quantificação	Não
Linearidade	Sim
Intervalo	Sim

**Fonte:** Adaptado da ANVISA, 2017

A revalidação deve ser realizada, conforme proposta pela RDC 166/2017 nos seguintes casos:

- I - alterações na síntese ou obtenção do IFA;
- II - alterações na composição do produto;
- III - alterações no método analítico;

IV - outras alterações que possam impactar significativamente no método validado.

### 3.11 PARÂMETROS DA VALIDAÇÃO ANALÍTICA E TRATAMENTO ESTATÍSTICOS APLICADOS

Os parâmetros devem ser testados conforme preconizado da RDC 166/2017 e os resultados necessitam, em alguns casos, tratamento estatístico que precisa ser investigados devem seguir o preconizado no Guia nº 10, versão 1, de agosto de 2017. Qualquer outro modelo proposto será aceito mediante justificativa técnica com embasamento científico (ANVISA, 2017).

#### 3.11.1 Seletividade

Capacidade do método analítico quantificar com exatidão o analito pesquisado na presença de interferentes presentes na amostra, tais como: impurezas, produtos de degradação, componentes da matriz e diluentes. Ou seja, habilidade do método em distinguir a substância analisada de outras substâncias devendo demonstrar resultados positivos para a amostra contendo o analito e negativo para outras substâncias presentes na amostra (ANVISA, 2017; ICH, 2005). Para métodos quantitativos, não cromatográficos, não se faz necessária a demonstração da interferência dos produtos de impurezas ou produto de degradação (ANVISA, 2017).

Caso na seletividade não seja comprovada a linearidade, a tendência e a precisão estarão comprometidas. Assim, os ensaios para avaliação de que um método é seletivo deve contemplar: avaliação por diferentes métodos, técnicas ou modificações das condições dos equipamentos que comprove, principalmente, que a matriz da amostra não interfere na leitura do analito. Porém, para matrizes simples, a avaliação dá-se comparando amostras obtidas com o analito frente às obtidas sem o analito verificando que os resultados permanecem inalterados (INMETRO; 2020).

#### 3.11.2 Linearidade

Capacidade de um método, em dada faixa de concentração, intervalo, apresentar resultado analíticos diretamente proporcionais à concentração da amostra analisada. Devendo aplicar-se em triplicata e, no mínimo, com 5 (cinco) concentrações diferentes preparadas de

formas independente, porém podendo utilizar-se de diluição de uma solução mãe concentrada (ICH, 2005; ANVISA, 2017). Caso a resposta analítica não apresente modificação com a variação da concentração, o método é considerado não adequado para aplicação (ANVISA, 2017).

A proporcionalidade deverá ser, inicialmente, avaliada visivelmente através da plotagem dos resultados em plano cartesiano utilizando a variável independente (concentração) no eixo das abcissas (x) e a variável dependente (resposta analítica no eixo das ordenadas) (y) para identificar uma relação linear antes da aplicabilidade de qualquer modelo estatístico (ANVISA, 2017). Após comprovação visual da linearidade deverá ser aplicada análise estatística utilizando um nível de significância de 5% (cinco por cento), sendo necessária a avaliação da homocedasticidade para determinação do modelo adequado (ANVISA, 2017). Conforme RDC 166/2017 o resultado da linearidade deverá ser representado conforme descrito abaixo:

- I - representação gráfica das respostas em função da concentração do analito;
- II gráfico de dispersão dos resíduos, acompanhado de sua avaliação estatística;
- III equação da reta de regressão de y em x, estimada pelo método dos mínimos quadrados;
- IV avaliação da associação linear entre as variáveis por meio do coeficiente de correlação (r) e de determinação ( $r^2$ ) com valor de (r) superior à 0,990 e ;
- V avaliação da significância do coeficiente angular que deverá ser significativamente diferente de zero.

O nível de significância, representado pela letra grega  $\alpha$ , permite avaliar a probabilidade de cálculo estatístico apresentar erro, rejeitando que as afirmativas não são verdadeiras. Ou seja, permite verificar a probabilidade de ocorrer erros estatísticos que pode apresentar valor de 1 (um) erro em 20 (vinte) - (5%) ou 1 (um) erro em 100 (cem) (1%) (AYRES et al., 2007; VIEIRA, 2008).

A representação gráfica poderá ser apresentada através de diagrama de dispersão sendo uma relação gráfica entre duas variáveis entorno de uma linha reta, ou seja, traz a luz a relação entre a variação da resposta analítica frente à mudança da concentração. Essa variação da resposta analítica deve ser proporcional a mudança da concentração (VIEIRA, 2008; ANVISA, 2019) Esses resultados devem ser apresentados por meio de uma Equação de primeiro grau (4), representada abaixo, onde “a” é definido como coeficiente linear ou intercepto e b é definido como coeficiente angular ou inclinação da reta e  $\epsilon$  como o erro do modelo (ANVISA, 2017).

$$y = a + bx + \varepsilon \quad (4)$$

Para determinar a equação pode-se utilizar dois modelos, dependendo da variação de (y) em cada valor de (X), o método dos mínimos quadrados ordinários (MMQO) quando a variação de (y) é constante (homocedasticidade) ou o método dos mínimos quadrados ponderados (MMQP) quando observadas alterações de variância de (y) denominada de heterocedasticidade e deverá ser utilizado como método visto que a utilização do MMQO pode apresentar resultados com tendências. A escolha do método dependerá da avaliação calculada através da equação da variância do valor de (y) conforme descrito na Equação (5) (ANVISA, 2017)

$$s_{yi}^2 = \frac{1}{m-1} \sum_{j=1}^m (y_{ij} - \bar{y}_i)^2 \quad (5)$$

Onde:

“j” representa o j-ésimo resultado para o conjunto de réplicas “i”

“m” representa o número de medidas (réplicas) para a resposta analítica

“y” em cada ponto.

A homocedasticidade dos dados, também denominada de homogeneidade das variâncias, revela se as variações dos subconjuntos são iguais e deve ser avaliado na regressão linear (AYRES et al., 2007). Deve ser avaliada a utilização do modelo adequado que, conforme o guia 10/2017, pode ser utilizado o teste de Cochran destinando três amostras do mesmo tamanho sendo esclarecida por meio das hipóteses ( $H_0$  e  $H_1$ ) descrita na equações 6 e 7:

$$H_0 \sigma_{y_1}^2 = \sigma_{y_2}^2 = \sigma_{y_i}^2 \dots \sigma_{y_n}^2 \quad (6)$$

$$H_1 \neq \sigma_{y_i}^2 \quad i = 1, 2 \dots n \quad (7)$$

Onde: “ $\sigma_{y_i}^2$ ” representa a variância dos valores de y para um determinado nível de concentração.

Hipótese da nula ( $H_0$ ) é denominada de nulidade pois diz que o efeito que as variâncias sejam todas iguais, ou seja, considera que não há diferença entre os resultados apresentados no eixo ( $y$ ). Hipótese alternativa ( $H_1$ ) está em sentido contrário a ( $H_0$ ), visto que apresenta diferença entre os resultados de, no mínimo, uma variância (35). Deverá, segundo Guia nº 10/2017, utilizar a seguinte Equação estatística (6) onde “C” é a razão entre a maior variância observada para os conjuntos de dados de  $y$  e a soma das variâncias de  $y$  observadas para todos os níveis de concentração descrita na Equação 8:

$$C = \frac{s_y^2 \text{MAX}}{\sum_i^n s_{yi}^2} \quad (8)$$

O cálculo do valor de “C” possibilita comparação com “Ccrítico” apresentado na Tabela 1, estabelecendo, em um nível de significância de 5%, e a confirmação se os dados são homocedásticos, se  $C < C_{\text{crítico}}$ , ou heterocedásticos, Se  $C \geq C_{\text{crítico}}$  determinando a aceitação ou rejeição da hipótese nula respectivamente (ANVISA, 2017).

Com a determinação da homocedasticidade dos resultados é possível utilizar o modelo estatístico adequado para calcular a Equação da reta utilizando o método dos mínimos quadrados ordinários, calculado pela Equação ou o método dos mínimos quadrados ponderados utilizando um fator de ponderação calculado a partir do inverso da variância de “y”,  $s_i^2$  representado pelas equações (9 e 10) utilizando os pesos individuais e possibilitando o cálculo da Equação da reta (ANVISA, 2017).

$$a = \bar{y} - b\bar{x} \quad (9)$$

$$b = \frac{\sum_{i=1}^n [(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})]}{[\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2]} \quad (10)$$

$$w_i = \frac{s_i^{-2}}{\sum_{i=1}^n s_i^{-2}} / n \quad (11)$$

$$b_w = \frac{\sum_{i=1}^n w_i x_i y_i - n \bar{x}_w \bar{y}_w}{\sum_{i=1}^n w_i x_i^2 - n \bar{x}_w^2} \quad (12)$$

$$a_w = \bar{y}_w - b\bar{x}_w \quad (13)$$

**Tabela 1** – C crítico com nível de significância de 5%.

Número de Pontos	Nº de medidas (réplicas) para a variável y			
	2	3	4	5
5	0,841	0,684	0,598	0,544
6	0,781	0,616	0,532	0,48
7	0,727	0,561	0,48	0,431
8	0,68	0,516	0,438	0,391
9	0,638	0,478	0,403	0,358
10	0,602	0,445	0,373	0,331
11	0,57	0,417	0,348	0,308
12	0,541	0,392	0,326	0,288
13	0,515	0,371	0,307	0,271
14	0,492	0,352	0,291	0,255
15	0,471	0,335	0,276	0,242
16	0,452	0,319	0,262	0,23
17	0,434	0,305	0,25	0,219
18	0,418	0,293	0,24	0,209
19	0,403	0,281	0,23	0,2
20	0,389	0,27	0,22	0,192

**Fonte:** Vieira (2008).

No MMQO a reta de regressão linear deve, obrigatoriamente, passar pelo centroide e no MMQP deve passar através do centroide ponderado, sendo este definido como a posição  $(\bar{x}; \bar{y})$ , onde  $\bar{x}$  é a média aritmética dos valores de x e  $\bar{y}$  é a média aritmética dos valores de y cuja coordenadas são descritas abaixo (ANVISA, 2017).

$$\bar{x}_w = \sum_{i=1}^n w_i x_i / n \text{ e } \bar{y}_w = \sum_{i=1}^n w_i y_i / n \quad (14)$$

O coeficiente angular segundo Vieira (2008) representa a letra “b” na Equação da reta indica a inclinação da reta. Sendo positiva, a reta é ascendente. Sendo negativa, a reta é descendente. Sendo zero a reta é paralela ao eixo das abcissas. O coeficiente angular deve ser calculado utilizando teste F da Anova para verificar a linearidade do método, ou seja, que existe

uma relação entre a concentração e a resposta analítica com a hipótese ( $H_0: b = 0$  e  $H_1: b \neq 0$ ) (ANVISA, 2019).

O teste F em homenagem a R. A. Fisher é realizado analisando a variância dos fatores de regressão, resíduos ou total, sendo está o somatório dos dois primeiros fatores. As variações são calculadas através das diferenças entre as médias e, dependendo, a homocedasticidade pode ser calculada para obter o valor de F sendo quadrado médio da regressão dividido pelo quadrado médio dos resíduos representado pela Equação (15) e caso apresente heterocedasticidade deve utilizar os fatores de ponderação representado na Equação (16) (ANVISA 2019; AYRES et al., 2007).

$$F = \frac{\sum_{j=1}^n (\hat{y}_i - \bar{y})^2}{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y})^2}{n-p}} \quad (15)$$

$$F = \frac{\sum_{j=1}^n w_i (\hat{y}_i - \bar{y})^2}{\frac{\sum_{i=1}^n w_i (y_i - \hat{y})^2}{n-p}} \quad (16)$$

O valor de “F” determina a rejeição da hipótese nula, onde  $H_0$  é igual a zero, sendo condicionada à nulidade se o  $F_{calculado} \geq F_{(\alpha,1,n-2)}$ , onde o  $F_{Tabelado}$  apresenta 1 grau de liberdade no numerador e  $n-2$  graus de liberdade no denominador ao nível de significância de 5% (ANVISA, 2019)

O coeficiente linear que conforme Vieira (2008) representa a letra “a” na Equação da reta e indica a altura em que a reta corta o eixo das coordenadas. Sendo positiva, a reta corta o eixo das ordenadas acima da origem. Sendo negativa, a reta corta o eixo das ordenadas abaixo da origem. Sendo zero a reta, a reta passa na origem do sistema de eixos cartesianos. O coeficiente linear deve ser calculado utilizando o teste t para verificar que é ou não estatisticamente diferente de zero, sendo esperado que não seja diferente de zero (ANVISA, 2019).

O coeficiente de correlação, representada pela letra “r”, denominado de coeficiente de correlação de *Pearson*, indica a relação linear entre as variáveis medidas ao acaso, medidas independentemente e deve ser calculado se o diagrama de dispersão apresentar relação linear. O coeficiente de determinação ( $r^2$ ) representa a variação de variável disposta no eixo “Y”

explicada pela variável preditora disposta no eixo “X” (AYRES et al., 2007; VIEIRA, 2008). Dependendo da homocedasticidade utiliza-se para calcular o MMQO a Equação (17) e para calcular o MMQP a Equação (18).

$$r = \frac{\sum_{i=1}^n [(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})]}{\sqrt{[\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2][\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2]}} \quad (17)$$

$$r_w = \frac{\sum w_i \cdot \sum w_i x_i y_i - (\sum w_i x_i)(\sum w_i y_i)}{\sqrt{[\sum w_i \cdot \sum w_i x_i^2 - (\sum w_i x_i)^2][\sum w_i \cdot \sum w_i y_i^2 - (\sum w_i y_i)^2]}} \quad (18)$$

Os valores, estabelecidos por Vieira (2008) como referência, estão descritos na Tabela 2, devendo, segundo RDC 166/2017, apresentar valor superior a 0,990:

**Tabela 2 – Valores de referência para (r)**

<b>Relação numérica</b>	<b>Tipo de correlação</b>
<b>0 &lt; r &lt; 0,25 ou - 0,25 &lt; r &lt; 0</b>	correlação pequena ou nula
<b>0,25 &lt; r &lt; 0,50 ou -0,50 &lt; r &lt; -0,25</b>	correlação fraca
<b>0,50 &lt; r &lt; 0,75 ou -0,75 &lt; r &lt; -0,50</b>	correlação moderada
<b>0,75 &lt; r &lt; 1,00 ou -1 &lt; r &lt; -0,75</b>	correlação forte ou perfeita

**Fonte:** Vieira (2008).

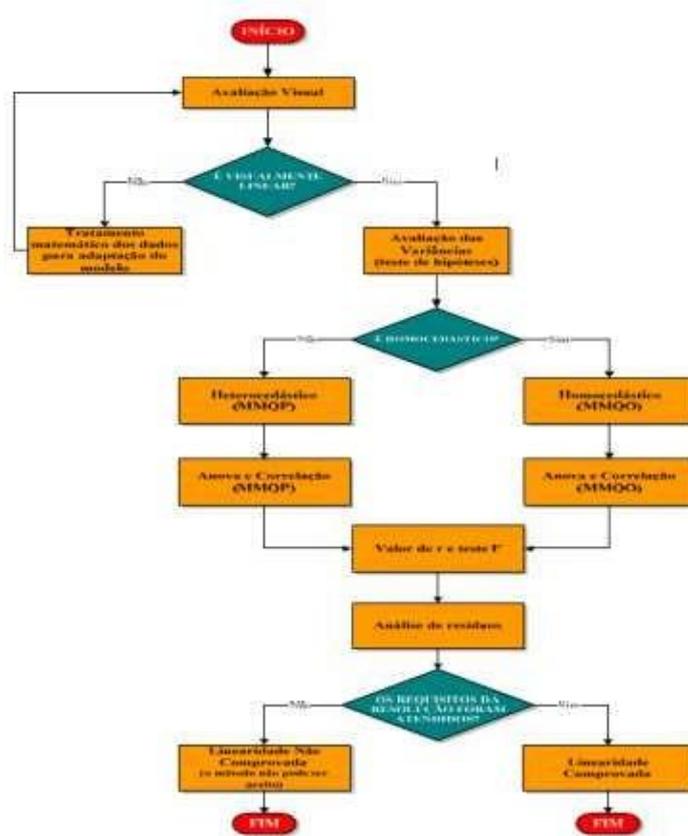
A RDC 166/2017 estabelece com a avaliação de dados a análise de resíduo que consiste na diferença entre o valor estimado e o valor real, auxiliando na interpretação dos dados, sendo calculado através de gráficos estabelecidos por uma reta central média e outras duas retas nos eixos “x” e “y” delimitando os valores, também é indicada a realização de teste da normalidade sugerida pelo Guia nº 10/2017 os testes de Shapiro Wilk ou Lilliefors. Para facilitar o entendimento do fluxo de análises estatísticas para determinação da linearidade o Guia nº 10/2017 traz um esquema em formato de fluxograma representado na Figura 7 (ANVISA 2019).

### 3.11.3 Precisão

A precisão tem como objetivo avaliar se os resultados analíticos, preparados de forma independente, apresentam proximidade quando repetidos do preparo da amostra original sendo expressa por meio três maneiras mais comuns: os testes de repetibilidade, precisão intermediária ou da reprodutibilidade (AYRES et. al 2007). A determinação dos resultados deve ser expressa após cálculo do desvio padrão relativo (DPR), expresso em porcentagem e, também, conhecido por coeficiente de variação (CV%) determinado pela equação 19 (INMETRO 2020; ANVISA 2017).

$$cv = DPR = (DP/CMD)X100 \quad (19)$$

**Figura 7** – Fluxo referente ao parâmetro de linearidade.



Fonte: ANVISA, 2017.

### 3.11.4 Repetibilidade

A repetibilidade é determinada através de um conjunto de medições, sendo 6 (seis) réplicas a 100 % da concentração do método ou 9 (nove) determinações, contemplando o intervalo linear do método analítico, ou seja, 3 (três) concentrações: baixa, média e alta, com 3 (três) réplicas com os mesmos operadores, equipamentos e local no menor tempo possível (ICH, 2017; INMETRO, 2020).

Segundo à RDC 166/2017 o critério de aceitação deve considerar o objetivo do método, variabilidade intrínseca do método, concentração de trabalho e concentração do analito na amostra. Então, considerando o nível de concentração INMETRO, 2020 sugere a utilização da Tabela 3 disponibilizada por AOAC internacional que é uma associação científica sem fins lucrativos com foco em segurança e integridade de alimentos e outros produtos que afetam a saúde pública em todo o mundo (INMETRO, 2020; AOAC, 2016).

**Tabela 3** – Critério de aceitação para repetibilidade.

<b>Analito %</b>	<b>Fração Mássica (C)</b>	<b>Unidade</b>	<b>DPR (%)</b>
<b>100</b>	1	100%	1,3
<b>10</b>	10-1	10%	1,9
<b>1</b>	10-2	1%	2,7
<b>0,1</b>	10-3	0,1%	3,7
<b>0,01</b>	10-4	100 ppm (mg/kg)	5,3
<b>0,001</b>	10-5	10 ppm (mg/kg)	7,3
<b>0,0001</b>	10-6	1 ppm (mg/kg)	11
<b>0,00001</b>	10-7	100 ppb (µg/kg)	15
<b>0,000001</b>	10-8	10 ppb (µg/kg)	21
<b>0,0000001</b>	10-9	1 ppb (µg/kg)	30

**Fonte:** AOAC – 2016.

Os valores de DPR % calculados pela Equação (20) devem ser comparados com o DPR % aceitável pela Tabela 4 levando em consideração a concentração final do analito observando que a imprecisão do método aumenta à medida que a concentração do analito diminui (INMETRO, AOAC, 2016). Caso a concentração do ensaio não esteja disponível pode-se calcular utilizando a Equação de Horwitz destacada por Castex e Abrantes (2017) para determinação do coeficiente de variação aceitável disponível na Equação (17) fornecida

pela AOAC no guia de diretrizes para método padrão requisitos de desempenho (Guidelines for Standard Method Performance Requirements) (AOAC, 2016).

$$CVac = 2^{(1-0,5 \log C)} * 2/3 \quad (20)$$

### 3.11.5 Precisão intermediária/reprodutibilidade

A precisão intermediária, também denominada de precisão interlaboratorial, consiste em um teste de precisão para determinar a proximidade dos resultados analíticos no mesmo laboratório em dias diferentes, ao menos dois dias, e realizada com operadores diferentes com replicatas das amostras nas mesmas condições da precisão. Porém, quando executada a reprodutibilidade está dispensada a execução do teste. A reprodutibilidade, também denomina de precisão intralaboratorial, consiste na determinação da precisão em laboratórios diferentes efetuadas nas mesmas condições do ensaio da precisão (ANVISA,2017). Segundo a RDC 166/2017, o critério de aceitação para reprodutibilidade deve considerar os mesmos da repetibilidade. Então, considerando o nível de concentração INMETRO (2020) sugere a utilização da Tabela 4 disponibilizada por AOAC internacional (AYRES et al., 2007; AOAC, 2016).

**Tabela 4** – Critério de aceitação para reprodutibilidade.

<b>Analito %</b>	<b>Fração Mássica (C)</b>	<b>Unidade</b>	<b>DPR, %</b>
<b>100</b>	1	100%	2
<b>10</b>	10-1	10%	3
<b>1</b>	10-2	1%	4
<b>0,1</b>	10-3	0,1%	6
<b>0,01</b>	10-4	100 ppm (mg/kg)	8
<b>0,001</b>	10-5	10 ppm (mg/kg)	11
<b>0,0001</b>	10-6	1 ppm (mg/kg)	16
<b>0,00001</b>	10-7	100 ppb (µg/kg)	22
<b>0,000001</b>	10-8	10 ppb (µg/kg)	32
<b>0,0000001</b>	10-9	1 ppb (µg/kg)	45

**Fonte:** AOAC - 2016

Um método estatístico adequado para comparar os resultados obtidos da precisão intermediária/reprodutibilidade frente à repetibilidade é recomendado pela RDC 166/2017

(ANVISA, 2017). Segundo Vieira (2008), para comparar dois grupos independentes, é utilizado o teste T de Student. Antes da aplicação do teste T é recomendado calcular o valor de F para identificar o grau de semelhança ou diferença das variâncias, devendo o valor  $F_{\text{calculado}}$  ser menor que o  $F_{\text{Tabelado}}$ , sendo determinado pela Equação (21). Para aplicabilidade do teste é necessário realizar o cálculo do valor de T pela Equação (22) e comparar com o T crítico disponibilizado por Vieira (2008) na Tabela 5 utilizando-se como referência o grau de liberdade  $(n_1 + n_2 - 4)$  e nível de significância 5%. Caso apresente diferença na variância, ou seja, o valor de  $F_{\text{calculado}}$  for maior que o  $F_{\text{Tabelado}}$ , aplica-se a fórmula de Equação (23) para determinar o grau de liberdade (N) e posterior identificação do T crítico disponibilizada por Vieira (2008) na Tabela 5:

$$F_{\text{calc}} = \frac{Var_{\text{maior}}}{Var_{\text{menor}}} \quad (21)$$

$$T = \frac{Média\ 1 - Média\ 2}{\sqrt{\left(\frac{Var_1}{n}\right) + \left(\frac{Var_2}{n}\right)}} \quad (22)$$

$$N = \frac{\left(\frac{Var_1}{n_1} + \frac{Var_2}{n_2}\right)^2}{\frac{S_1^4}{n_1^2 * (n_1 - 1)} + \frac{S_2^4}{n_2^2 * (n_2 - 1)}} \quad (23)$$

**Tabela 5** – Valor de t, segundo grau de liberdade e o valor de  $\alpha$ .

Graus de liberdade	Nível de significância ( $\alpha$ )		
	10%	5%	1%
<b>1</b>	6,31	12,71	63,66
<b>2</b>	2,92	4,30	9,92
<b>3</b>	2,35	3,18	5,84
<b>4</b>	2,13	2,78	4,60
<b>5</b>	2,02	2,57	4,03
<b>6</b>	1,94	2,45	3,71
<b>7</b>	1,90	2,36	3,50
<b>8</b>	1,86	2,31	3,36
<b>9</b>	1,83	2,26	3,25
<b>10</b>	1,81	2,23	3,17

Fonte: Adaptado de VIEIRA, 2008

### 3.11.6 Exatidão

O ensaio de exatidão avalia o grau de concordância entre o valor de referência aceito eo valor medido, essa expressa em porcentagem de recuperação. A medição deve ocorrer a partir de, no mínimo, 9 (nove) determinações, contemplando o intervalo linear do método analítico, ou seja, 3 (três) concentrações: baixa, média e alta, com 3 (três) réplicas em cada nível podendo ser preparadas individualmente ou utilizando uma solução diluída da mesma solução mãe (ANVISA,2017).

Conforme a RDC nº 166/2017 a exatidão deve ser expressa pela relação percentual de recuperação do analito de concentração conhecida adicionado à amostra ou pela relação entre a concentração média, determinada experimentalmente, e a concentração teórica correspondente, dada pela Equação (24) ou (25). INMETRO, 2020 descreve os limites de recuperação, disponibilizada por AOAC internacional, obtidos a partir da concentração máxima da amostra (Concentração da Amostra em (mg/mL)/1000) demonstrado na Tabela 6 utilizando como referência.

$$Recuperação = \frac{\text{Concentração média experimental}}{\text{Concentração teórica}} \times 100 \quad (24)$$

$$Recuperação = \frac{CA(\text{amostra adicionada}) - CA(\text{amostra})}{CTA} \times 100 \quad (25)$$

**Tabela 6** – Limites de recuperação em função da concentração do analito.

<b>Analito (%)</b>	<b>Fração Mássica (C)</b>	<b>Unidade</b>	<b>Limites de Recuperação (%)</b>
<b>100</b>	1	100%	98-102
<b>10</b>	$10^{-1}$	10%	
<b>1</b>	$10^{-2}$	1%	97-103
<b>0,1</b>	$10^{-3}$	0,1%	95-105
<b>0,001</b>	$10^{-4}$	100 ppm (mg/kg)	90-107
<b>0,0001</b>	$10^{-5}$	10 ppm (mg/kg)	80-110
<b>0,00001</b>	$10^{-6}$	1 ppm (mg/kg)	
<b>0,00001</b>	$10^{-7}$	100 ppm (mg/kg)	
<b>0,000001</b>	$10^{-8}$	10 ppm (mg/kg)	60-115
<b>0,0000001</b>	$10^{-9}$	1 ppm (mg/kg)	40-120

**Fonte:** AOAC (2016).

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 MATERIAL

#### 4.1.1 Equipamentos e reagentes

**Quadro 5** – Lista de equipamentos.

<b>EQUIPAMENTO</b>	<b>MARCA</b>	<b>MODELO</b>
Balança Analítica	Mettler Toledo	Xs205
Lavadora Ultrassônica	Unique	Usc-2800 <sup>a</sup>
Dissolutor	Vankel	Vk7010
Espectrofotômetro Uv/Vis	Agilent	Cary 50
HPLC	Hitachi	Chromaster
Pipetador automático	Brand	Touch

**Fonte:** dados da pesquisa.

#### 4.1.2 Reagentes

**Quadro 6** – Lista de substância química de referência, amostras e reagentes.

<b>Substância química de referência/amostras/reagentes</b>	<b>Lote</b>	<b>Marca</b>
Olanzapina padrão primário	Gol368	USP
Olanzapina 5 Mg Comprimido Revestido	21010038	Lafepe
Olanzapina 10 Mg Comprimido Revestido	21100020	Lafepe
Placebo Olanzapina 5 mg	2101LBS001	Lafepe
Placebo Olanzapina 10 mg	1812LBS001	Lafepe
Ácido Clorídrico PA	222401	Sinth
Ácido Clorídrico PA	X52C04	J.T Beker
Água Ultrapurificada	N/A	LAFEPE
Acetato de Amônio	BCBW4807	Sinth
Metanol	1044207	Merck
Ácido Fosfórico 85 %	STBJ4058	Sigma

**Fonte:** dados da pesquisa

### 4.1.3 Vidrarias

**Quadro 7** - Lista de vidrarias.

<b>Vidraria</b>	<b>Capacidade</b>	<b>Marca</b>
Balão volumétrico	50 mL	Brand
Balão volumétrico	100 mL	Brand
Pipeta volumétrica	1 mL	Pyrex
Pipeta volumétrica	5 mL	Pyrex
Pipeta volumétrica	6 mL	Pyrex
Pipeta graduada	25 mL	Pyrex

**Fonte:** dados da pesquisa.

### 4.1.4 Membranas

**Quadro 8** - Lista de membranas.

<b>Membrana</b>	<b>Tamanho</b>	<b>Marca</b>
Membrana de PVDF	0,45 $\mu\text{m}$	Miliipore
Papel filtro faixa preta	28 $\mu\text{m}$	Quanty

**Fonte:** dados da pesquisa.

## 4.2 MÉTODOS

### 4.2.1 Condição de análise para validação dos medicamentos olanzapina 5/10 mg

- a) Meio: 900 mL de Ácido Clorídrico 0,1 N por cuba;
- b) Aparato 2: pás;
- c) Temperatura: 37°C;
- d) Rotação: 50 rpm;
- e) Tempo: 30 minutos;
- f) Tolerância:  $Q > 80\%$ ;
- g) Detector: UV a 260 nm;

## 4.2.2 Preparo das soluções para o medicamento Olanzapina 5 mg

### 4.2.2.1 Solução para o meio de dissolução

Solução de ácido clorídrico 0,1N para o meio de dissolução.

### 4.2.2.2 Solução Padrão (Olanzapina 5 mg)

- a) pesar, com exatidão, cerca de 27,775 mg de padrão de Olanzapina e transferir para balão volumétrico de 50 mL;
- b) dissolver, completar o volume com ácido clorídrico 0,1 M e homogeneizar (solução P1);
- c) transferir 1,0 mL da solução (P1) para balão volumétrico de 100 mL e completar o volume com ácido clorídrico 0,1 N (solução P2);
- d) transferir 6,0 mL da solução (P2) para um tubo e adicionar 1,0 mL de ácido clorídrico 0,1 N;
- e) homogeneizar a solução final (cf = 0,00476 mg/mL de Olanzapina).

### 4.2.2.3 Solução Padrão (Olanzapina 10 mg)

- a) pesar, com exatidão, cerca de 22,222 mg de padrão de Olanzapina e transferir para balão volumétrico de 100 mL;
- b) dissolver, completar o volume com ácido clorídrico 0,1 M e homogeneizar (solução P1);
- c) transferir 5,0 mL da solução (P1) para balão volumétrico de 100 mL e completar o volume com ácido clorídrico 0,1 N (solução P2);
- d) transferir 5,0 mL da solução (P2) para um tubo e adicionar 2,0 mL de ácido clorídrico 0,1 N;
- e) homogeneizar a solução final (cf = 0,00794 mg/mL de Olanzapina).

#### 4.2.2.4 Solução amostra (Olanzapina 5 mg)

- a) a solução amostra inicia com a solução já dissolvida, que parte da adição do comprimido na cuba contendo 900 mL do meio de dissolução (solução de ácido clorídrico 0,1N);
- b) ao final do tempo do teste (30 minutos), retirar uma alíquota de 25 ml de cada cuba de dissolução individualmente e filtrar imediatamente em membrana de 0,45  $\mu\text{m}$ ;
- c) transferir 6,0 mL do filtrado para um tubo e adicionar 1,0 mL do meio de dissolução;
- d) Homogeneizar a solução final (cf = 0,00476 mg/mL de Olanzapina).

#### 4.2.2.5 Solução amostra (Olanzapina 10 mg)

- a) a solução amostra inicia com a solução já dissolvida, que parte da adição do comprimido na cuba contendo 900 mL do meio de dissolução (solução de ácido clorídrico 0,1N);
- b) ao final do tempo do teste (30 minutos), retirar uma alíquota de 25 ml de cada cuba de dissolução individualmente e filtrar imediatamente em membrana de 0,45  $\mu\text{m}$ ;
- c) transferir 5,0 mL do filtrado para um tubo e adicionar 2,0 mL do meio de dissolução;
- d) homogeneizar a solução final (cf = 0,00794 mg/mL de Olanzapina).

### 4.2.3 Procedimento para quantificação do teor dissolvido dos medicamentos Olanzapina 5/10 mg

- a) realizar uma varredura da solução amostra em espectrofotômetro UV entre 200nm e 300nm;
- b) verificar o espectro de absorção no ultravioleta obtido a partir da solução amostra que deve apresentar máximo de absorção em cerca de 260nm;
- c) ajustar as condições do espectrofotômetro para as condições do método de análise;
- d) utilizar o meio de dissolução como o branco;

- e) determinar as absorvâncias das soluções padrão e amostra em 260nm;
- f) calcular a porcentagem dissolvida de Olanzapina na amostra utilizando a seguinte Equação 24:

$$(\%) \text{ Olanzapina dissolvida} = \frac{C_p}{C} \times \frac{Ab_{am}}{Ab_{sp}} \times D \times V \times 100 \quad (26)$$

Onde:

C<sub>p</sub>: concentração de Olanzapina na solução padrão, em mg/mL;

C: concentração de Olanzapina na solução amostra, em mg/mL;

Ab<sub>am</sub>: absorvância de Olanzapina obtida com a solução amostra; Ab<sub>sp</sub> : absorvância de Olanzapina obtida com solução padrão;

D : diluição da amostra;

V: volume do meio de dissolução, em mL. btidas no estudo, assim como o código utilizado nas sessões futuras para se referir a cada um.

### 4.3 PREPARO DAS AMOSTRAS DE VALIDAÇÃO

#### 4.3.1 Repetibilidade

Realizada por meio da quantificação de seis preparações individuais da solução amostra contendo o ativo na concentração de 0,00476mg/mL e 0,00794 mg/mL em sextuplicata com alíquota de 25 ml de cada cuba de dissolução, ao final do tempo do teste, conduzindo cada amostra individualmente conforme preparo de amostra e padrão do medicamento Olanzapina 5/10 mg.

Determinar a absorvância das soluções padrão (em triplicata) e amostra (em sextuplicata) calculando a concentração (mg/mL) e percentual de Olanzapina obtida nas soluções amostras.

##### 4.3.1.1 Critério de aceitação – repetibilidade

Calcular a média, o desvio padrão e o desvio padrão relativo dos valores obtidos (n = 6) para todas as amostras e utilizar a Equação de Horwtz para determinar o critério de

aceitação para o desvio padrão relativo e conferir o valor aceitável conforme concentração do analito do medicamento Olanzapina 5/10 mg disposto na Tabela 7.

**Tabela 7** – Critério de aceitação repetibilidade.

<b>Medicamento</b>	<b>Concentração do analito</b>	<b>DPR aceitável (%)</b>
<b>Olanzapina 5 mg comprimido revestido</b>	0,00476 mg/mL	8,43
<b>Olanzapina 10 mg comprimido revestido</b>	0,00794 mg/mL	7,81

**Fonte:** dados da pesquisa.

#### **4.3.2 Precisão intermediária**

Verificada por meio da proximidade dos resultados obtidos no mesmo laboratório, por analistas diferentes, contendo o ativo na concentração de 0,00476mg/mL e 0,00794 mg/mL a partir de seis determinações da solução amostra individuais conforme preparo de amostra e padrão do medicamento Olanzapina 5/10 mg.

Determinar a absorvância das soluções padrão (em triplicata) e amostra (em sextuplicata) calculando a concentração (mg/mL) e percentual de olanzapina obtida nas soluções amostras.

##### *4.3.2.1 Critério de aceitação – precisão intermediária*

Calcular a média, o desvio padrão e o desvio padrão relativo dos valores obtidos ( $n = 12$ ) para todas as amostras e realizar o teste T de student comparando os resultados obtidos entre os dois analistas onde o t calculado deve ser menor que o t Tabelado em um nível de confiança de 95 %.

#### **4.3.3 Seletividade**

##### *4.3.3.1 Solução placebo para os medicamentos olanzapina 5/10 mg*

Utilizando o comprimido placebo proceder conforme o preparo da amostra do medicamento Olanzapina 5/10 mg.

- a) A solução amostra inicia com a solução já dissolvida, que parte da adição do comprimido placebo na cuba contendo 900 mL do meio de dissolução (solução de ácido clorídrico 0,1N);
- b) ao final do tempo do teste (30 minutos), retirar uma alíquota de 25 ml da cuba de dissolução e filtrar imediatamente em membrana de 0,45 µm;
- c) transferir 6,0 mL do filtrado para um tubo e adicionar 1,0 mL do meio de dissolução;
- d) homogeneizar a solução final

Verificar a capacidade do método em quantificar o analito Olanzapina realizando análises de amostra, padrão e placebo conforme descrito no procedimento de quantificação.

#### 4.3.3.2 Critério de aceitação – Seletividade

Avaliar se o espectro de absorção no ultravioleta obtido a partir da solução padrão e amostra são correspondentes e o placebo e do branco não apresentam absorção no comprimento de onda avaliado.

#### 4.3.4 Exatidão

Para o teste de dissolução: a faixa compreenderá de -20% (menos vinte por cento) da menor concentração esperada a +20% (mais vinte por cento) da maior concentração esperada a partir do perfil de dissolução.

##### 4.3.4.1 Preparo das soluções estoque para exatidão para olanzapina 5 mg

- a) Pesar, com exatidão, cerca de 27,775 mg de padrão de Olanzapina, transferir para balão volumétrico de 50 mL, dissolver com ácido clorídrico 0,1 N e sonicar por 10 minutos;
- b) completar com ácido clorídrico 0,1N e homogeneizar;
- c) transferir 1,0 mL da solução acima para balão volumétrico de 100 mL e completar o volume com ácido clorídrico 0,1 N (solução SE, cf = 0,005555 mg/mL);
- d) Transferir alíquotas das soluções estoques descritos acima para balão volumétrico adequado de acordo com a Tabela 8.

**Tabela 8** – Diluições da exatidão olanzapina 5 mg.

<b>Nível</b>	<b>Concentração (%)</b>	<b>Alíquota Solução Estoque - SE (mL)</b>	<b>Volume de ácido clorídrico 0,1 N – em tubo de ensaio (mL)</b>	<b>Concentração final (mg/mL)</b>
<b>Baixo</b>	60	3,6	3,4	0,00286
<b>Médio</b>	80	4,8	2,2	0,00381
<b>Alto</b>	100	6	1	0,00476

**Fonte:** dados da pesquisa.

#### 4.3.4.2 *Preparo das soluções estoque para exatidão para olanzapina 10 mg*

- a) Pesar, com exatidão, cerca de 22,222 mg de padrão de olanzapina, transferir para balão volumétrico de 100mL, dissolver com ácido clorídrico 0,1 N e sonicar por 10 minutos;
- b) completar com ácido clorídrico 0,1N e homogeneizar;
- c) transferir 5,0 mL da solução acima para balão volumétrico de 100 mL e completar o volume com ácido clorídrico 0,1 N (solução SE, cf = 0,01111 mg/mL);
- d) Transferir alíquotas das soluções estoques descritos acima para balão volumétrico adequado de acordo com a Tabela 9.

Determinar a absorvância das soluções padrão e amostra (níveis baixo, médio e alto), todas em triplicata conforme procedimento para quantificação e calcular a porcentagem de recuperação individual e média (nível), o desvio padrão e o desvio padrão relativo de cada nível conferir o valor aceitável conforme concentração do analito do medicamento Olanzapian 5/10mg dispostos na Tabela 10.

**Tabela 9** – Diluições da exatidão olanzapina 10 mg.

Nível	Concentração (%)	Alíquota Solução Estoque SE (mL)	Volume de ácido clorídrico 0,1 N – em tubo de ensaio (mL)	Concentração final (mg/mL)
Baixo	60	6	8	0,00476
Médio	80	8	6	0,00635
Alto	100	10	4	0,00794

Fonte: dados da pesquisa.

**Tabela 10** – Critério de aceitação – Exatidão

Medicamento	DPR aceitável concentração baixa (%)	DPR aceitável concentração média (%)	DPR aceitável concentração alta (%)
Olanzapina 5 mg comprimido revestido	9,11	8,72	8,43
Olanzapina 10 mg comprimido revestido	8,43	8,08	7,81

Fonte: dados da pesquisa.

#### 4.4 COMPARAÇÃO DO MÉTODO DESENVOLVIDO COM O MÉTODO VALIDADO

##### 4.4.1 Critério de aceitação - Exatidão

Realizar a comparação, através de test t de student entre os resultados obtidos do método em estudo com o método validado onde o t calculado deve ser menor que o t Tabelado em um nível de confiança de 95 %.

##### 4.4.2 Condições de análise

- a) Meio: 900 mL de Ácido Clorídrico 0,1 N por cuba;
- b) Aparato 2: pás;

- c) Temperatura: 37°C;
- d) Rotação: 50 rpm;
- e) Tempo: 30 minutos;
- f) Tolerância:  $Q > 80\%$ ;
- g) Coluna: Zorbax SB-CN (4,6 x 150 mm - 5  $\mu\text{m}$ );
- h) Detector: UV a 260 nm;
- i) Fluxo: 1,5 mL/min;
- j) Temperatura do forno: 25°C;
- k) Volume de Injeção: 50  $\mu\text{L}$ ;
- l) Tempo de retenção da olanzapina: cerca de 2 minutos;
- m) Tempo de Análise: 8 minutos
- n) Fase Móvel

#### 4.4.2.1 *Solução Padrão olanzapina 5 mg*

- a) Pesar, com exatidão, cerca de 27,775 mg de padrão de olanzapina sonicar por 10min e transferir para balão volumétrico de 50 mL;
- b) dissolver, completar o volume com ácido clorídrico 0,1 N e homogeneizar (soluçãoP1);
- c) transferir 1,0 mL da solução (P1) para balão volumétrico de 100 mL e completar o volume com ácido clorídrico 0,1 M (solução P2);
- d) transferir 5,0 mL da solução (P2) para um tubo e adicionar 2,0 mL de fase móvel;
- e) homogeneizar e filtrar em membrana de 0,45  $\mu\text{m}$  (cf = 0,00397 mg/mL de olanzapina).

#### 4.4.2.2 *Solução Amostra Olanzapina 5 mg*

- a) retirar uma alíquota de 25 ml de cada cuba ao final do tempo do teste e filtrar imediatamente em membrana de 0,45  $\mu\text{m}$ ;
- b) transferir 5,0 mL do filtrado para um tubo e adicionar 2,0 mL de fase móvel;
- c) homogeneizar e filtrar em membrana de 0,45  $\mu\text{m}$  (cf = 0,00397 mg/mL de olanzapina).

#### 4.4.2.3 *Solução padrão e amostra Olanzapina 10 mg*

Proceder conforme prepara de amostra e padrão do nível 100 % ( $\mu\text{m}$  (cf = 0,00794mg/mL de olanzapina).

#### 4.4.2.4 *Adequabilidade do Sistema*

A adequabilidade do sistema cromatográfico deverá atender os requisitos a seguir:

- a) Solução padrão
- b) Desvio padrão relativo: máximo 2,0%.

#### 4.4.2.5 *Procedimento cromatográfico para olanzapina 5/10 mg*

- a) condicionar a coluna deixando a fase móvel passar até a estabilização do sistema;
- b) injetar, separadamente, o volume indicado (50  $\mu\text{L}$ ) das soluções padrão e amostra, registrar os cromatogramas e medir as respostas dos picos de Olanzapina;
- c) calcular a porcentagem dissolvida de olanzapina utilizando o sistema de calibração do equipamento ou a seguinte Equação:

Onde:

CP: concentração de olanzapina na solução padrão, em mg/mL; C:

dosagem do comprimido, em mg;

A<sub>am</sub> : área do pico da olanzapina obtido com a solução amostra;

A<sub>P</sub> : área do pico da olanzapina obtido com a solução padrão;

V: volume do meio de dissolução, em mL;

D: diluição da amostra.

### 4.4.3 Linearidade

Preparar cinco pontos dentro da faixa de Q-20% a Q+20% de forma independente podendo ser utilizadas soluções diluídas de uma mesma solução mãe da SQR conforme descrito na Tabela 13 de diluições da olanzapina 5/10 mg.

#### 4.4.3.1 Solução Estoque para a linearidade olanzapina 5 e 10 mg

- pesar, com exatidão, cerca de 22,222 mg de padrão de olanzapina, transferir para balão volumétrico de 100mL, dissolver com ácido clorídrico 0,1 N e sonicar por 10 minutos;
- completar com ácido clorídrico 0,1N e homogeneizar;
- transferir 5,0 mL da solução acima para balão volumétrico de 100 mL e completar o volume com ácido clorídrico 0,1 N (solução SE, cf = 0,01111 mg/mL);

**Tabela 11** – Diluições da linearidade olanzapina 5 mg.

Nível	Concentração (%)	Alíquota Solução Estoque SE (mL)	Volume de ácido clorídrico 0,1 N (mL) – em tubo de ensaio (14 mL)	Concentração final (mg/mL)
1	60	3,6 SE (1,2 e 3)	10,4	0,00286
2	70	4,2 SE (1,2 e 3)	9,8	0,00333
3	80	4,8 SE (1,2 e 3)	9,2	0,00381
4	90	5,4 SE (1,2 e 3)	8,6	0,00428
5	100	6 SE (1,2 e 3)	8	0,00476
6	110	6,6 SE (1,2 e 3)	7,4	0,00524
7	120	7,2 SE (1,2 e 3)	6,8	0,00571

**Fonte:** dados da pesquisa.

**Tabela 12** – Diluições da linearidade olanzapina 10 mg.

Nível	Concentração (%)	Alíquota Solução Estoque SE (mL)	Volume de ácido clorídrico 0,1 N (mL) – em tubo de ensaio	Concentração final (mg/mL)
1	60	6 SE (1,2 e 3)	8	0,00476
2	70	7 SE (1,2 e 3)	7	0,00556
3	80	8 SE (1,2 e 3)	6	0,00635
4	90	9 SE (1,2 e 3)	5	0,00714
5	100	10 SE (1,2 e 3)	4	0,00794
6	110	11 SE (1,2 e 3)	3	0,00873
7	120	12 SE (1,2 e 3)	2	0,00952

**Fonte:** dados da pesquisa.

Realizar leitura das amostras em espectrofotômetro, conforme método de quantificação, e realizar o tratamento estatístico conforme descrito no Quadro 9:

#### 4.4.4 Desenvolvimento analítico e Robustez

##### 4.4.4.1 Desenvolvimento analítico

O desenvolvimento analítico deverá:

- Pesquisar métodos disponíveis na literatura para aplicação da técnica de quantificação do ativo Olanzapina em meio de dissolução por espectrofotometria;
- Realizar varredura espectral para identificar o comprimento de onda ( $\lambda$ ) onde ocorre maior absorção da Olanzapina;
- Aplicar o método por HPLC, diluição das amostras após dissolução das apresentações de Olanzapina 5mg e 10mg, utilizando como técnica de quantificação a espectrofotometria;
- Realizar ajustes, se necessário, na concentração das amostras para atendimento a Lei de Lambert- beer.

**Quadro 9** – Avaliação da linearidade e cálculos estatísticos.

<b>Avaliação</b>	<b>Teste estatístico</b>	<b>Critério de aceitação</b>
Avaliar a relação gráfica da resposta analítica em função da concentração do analito.	Avaliação visual	Relação linear entre a resposta analítica em função da concentração.
Avaliar a homocedasticidade	Teste de Cochran (ANVISA,2017)	C calculado menor que C Tabelado para homocedastico. Caso homocedastico. C calculado maior que C Tabelado para heterocedástico.
Calcular a Equação da reta de regressão y em x	Homocedastico – MMQO (ANVISA, 2017) Heterocedastico – MMQP (ANVISA, 2017)	Calcular o intercepto, coeficiente correlação (r) e determina ( $r^2$ )
Realizar teste t para avaliar se o intercepto é estatisticamente diferente de zero	Teste T (MILLER, 2010);	o intercepto é estatisticamente diferente de zero
Avaliar a significância do coeficiente angular	ANOVA (ANVISA, 2017)	F calculado menor que o F Tabelado.
Avaliar o coeficiente de correlação (r) e determina ( $r^2$ )	MMQO (ANVISA,2017) MMQP (ANVISA, 2017)	$r > 0,990$
Avaliação visual dos resíduos	Não se aplica	Gráfico de todos os resíduos em função da concentração e da resposta (ANVISA, 2017)
Avaliar a independência dos resíduos	Teste de Durbin Watson (MAPA/ACS, 2011)	Os resíduos são independentes ( $D \geq 1,5$ )
Avaliar a normalidade dos resíduos	Shapiro Wilk (ANVISA, 2017)	Resultado de W deve ser maior que o W crítico.

**Fonte:** ANVISA, 2017; MAPA/ACS, 2011; MILLER, 2017.

#### 4.4.4.2 Robustez – Tempo de extração

Preparar amostras e padrões conforme preparo da Olanzapina 5/10 mg. A caracterização da extração em um preparo de amostra é obtida pelo sonicção/agitação seguida de sonicção. Assim, o tempo de extração pode ser avaliado no padrão variando o tempo de sonicção ou na

amostra variando o tempo na cuba. Preparar uma solução padrão e solução amostra, realizar a leitura no espectrofotômetro, conforme a Tabela 13 abaixo:

**Tabela 13** – Robustez -Tempo de extração.

<b>Leitura no espectrofotômetro</b>	<b>Tempo durante a análise do padrão (minutos)</b>	<b>Tempo durante a análise da amostra (minutos)</b>
1 <sup>a</sup>	5	30
2 <sup>a</sup>	10	35
3 <sup>a</sup>	15	40

**Fonte:** dados da pesquisa.

#### 4.4.4.3 Robustez - Compatibilidade de filtros

Filtrar uma porção da solução padrão e amostra utilizando os diferentes filtros, PVDF0,45 µm e faixa preta. Realizar a leitura no espectrofotômetro.

#### 4.4.4.4 Robustez - Diferentes fabricantes de solventes

Realizar as análises (padrão e amostra) com diferentes fabricantes de ácido clorídrico conforme Tabela 14.

**Tabela 14** – Robustez - Variação de marca do reagente.

<b>REAGENTE</b>	<b>MARCA</b>	<b>LOTE</b>
Ácido Clorídrico PA	J.T. Baker	Lote X52C04
Ácido Clorídrico PA	Synth	Lote 222401

**Fonte:** dados da pesquisa.

#### 4.4.4.5 Robustez - Estabilidade das soluções analíticas

Preparar uma solução padrão e solução amostra, realizar a leitura no espectrofotômetro, conforme a Tabela 15 abaixo.

**Tabela 15** – Robustez - Tempo de preparo das soluções.

<b>Leitura no espectrofotômetro</b>	<b>Tempo após o preparo (horas)</b>
1 <sup>a</sup>	0
2 <sup>a</sup>	24
3 <sup>a</sup>	48
4 <sup>a</sup>	72

**Fonte:** dados da pesquisa.

#### 4.4.4.6 Critério de aceitação – robustez

Verificar o percentual do ativo encontrado para cada condição, avaliando os resultados de acordo os mesmos critérios utilizados para a exatidão. Será realizado tratamento estatístico, efetuando o teste t para comparação dos resultados obtidos. Sendo o valor do t calculado menor que o valor do t Tabelado com um nível de confiança de 95 %

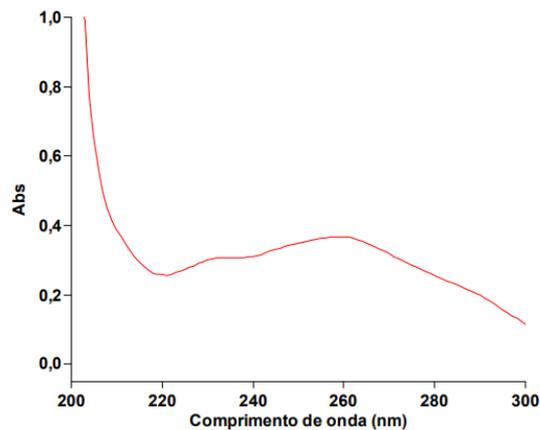
## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO

#### 5.1.1 Especificidade

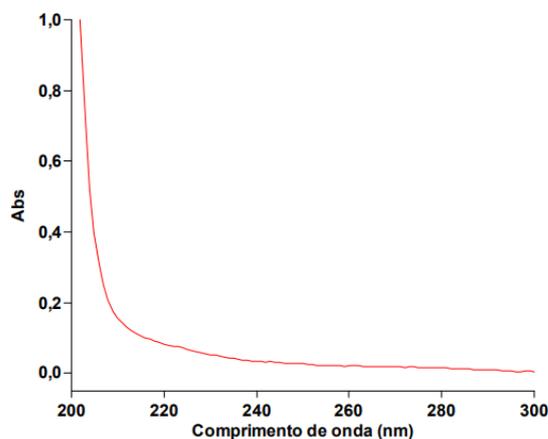
A especificidade foi comprovada através dos valores dos espectros obtidos do padrão, placebo e branco demonstrados nas Figuras 8, 9 e 10. O padrão apresentou absorvância em comprimento de onda 260 nm não evidenciado na leitura do placebo e branco. Com isso pode-se comprovar que o método é específico.

**Figura 8** – Espectro do padrão de Olanzapina 5 mg.

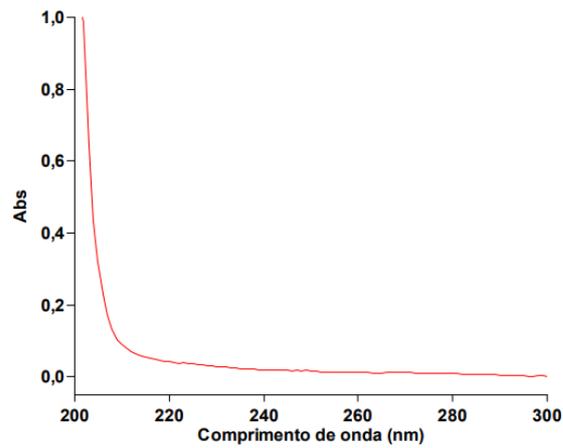


Fonte: O Autor (2022).

**Figura 9** – Espectro do placebo.



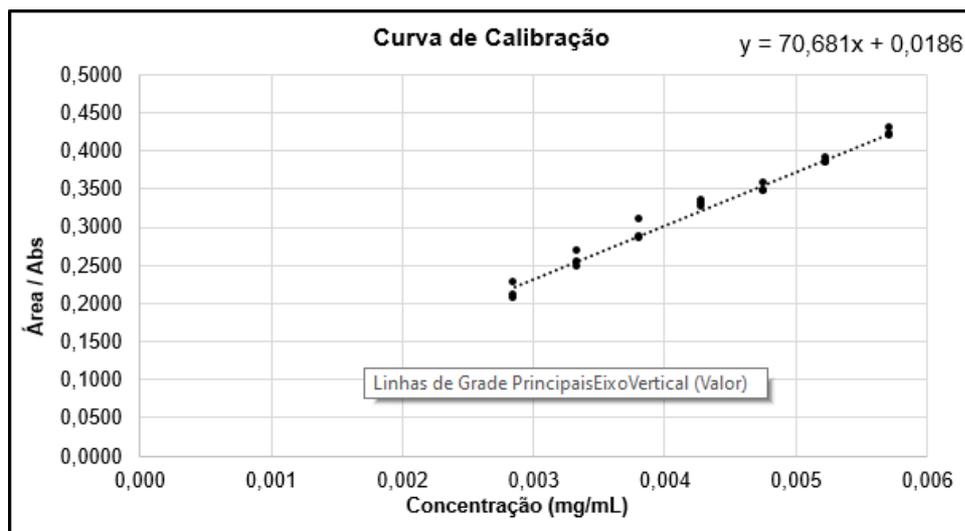
Fonte: O Autor (2022).

**Figura 10** – Espectro do branco

Fonte: O Autor (2022).

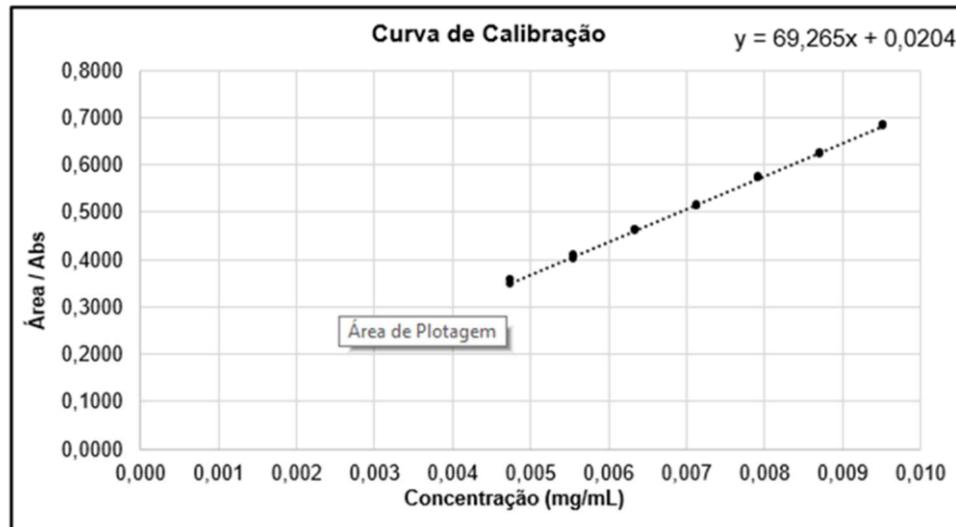
### 5.1.2 Linearidade

A linearidade foi avaliada utilizando-se o resultado encontrado do valor médio obtido de três curvas autênticas, nos pontos de 60%; 70%; 80%; 90%, 100%, 110% e 120% da concentração do padrão de Olanzapina 5 e 10 mg. Pode-se observar que existe uma relação linear entre a concentração da amostra e a resposta obtida pelo método representadas pelas Figuras 11 e 12 onde estão os gráficos obtidos com os valores médios.

**Figura 11** – Gráfico resposta x concentração - olanzapina 5 mg.

Fonte: O Autor (2022)

**Figura 12** – Gráfico resposta x concentração - olanzapina 10 mg.



**Fonte:** O Autor (2022).

Os resultados estão descritos na Tabela 16 e 17 para as duas apresentações. Apresentaram homocedasticidade onde o C calculado foi menor que o C Tabelado demonstrado na Tabela 19. Assim, foi utilizado o cálculo da regressão ordinária – MMQO para determinação da Equação da reta descritas na Tabela 16 para as duas apresentações.

Os resultados do teste t dos interceptos das três curvas estão descritos na Tabela 18. Foi comprovando que estatisticamente não difere de zero visto que o t calculado foi menor que o t Tabelado.

O coeficiente de correlação (r) apresentou valor superior a 0,990 confirmando a correlação entre as duas variáveis. Os resultados estão descritos na Tabela 18.

Os gráficos de dispersão de resíduos estão representados pelas Figuras 13 e 14 onde a variação devida à regressão (modelo) é suficientemente maior que a devida ao erro (resíduos). Os gráficos apresentam a distribuição dos resíduos em função da concentração e resposta analítica, sendo a comprovação da independência evidenciada pelo valor de  $D \geq 1,5$  com os resultados descritos na Tabela 18.

Os resultados individuais não apresentam outliers visto que o valor de Grubbs é inferior ao valor crítico conforme descritos na Tabela 18 para as duas apresentações.

**Tabela 16** – Dados da concentração das apresentações Olanzapina 5 mg.

<b>Concentração (%)</b>	<b>Massa (mg)</b>	<b>Concentração Teórica (%)</b>	<b>Área/ Abs</b>	<b>Área/ Abs Média</b>	<b>Concentração (mg/mL)</b>
<b>60,00</b>	22,22	60,00	0,2054	0,21	0,002856
	22,22	60,00	0,2103		0,002856
	22,22	60,00	0,2259		0,002856
<b>70,00</b>	22,22	70,00	0,2462	0,26	0,003332
	22,22	70,00	0,2524		0,003332
	22,22	70,00	0,2682		0,003332
<b>80,00</b>	22,22	80,00	0,2870	0,29	0,003808
	22,22	80,00	0,2845		0,003808
	22,22	80,00	0,3098		0,003808
<b>90,00</b>	22,22	90,00	0,3333	0,33	0,004284
	22,22	90,00	0,3250		0,004284
	22,22	90,00	0,3307		0,004284
<b>100,00</b>	22,22	100,00	0,3466	0,35	0,004760
	22,22	100,00	0,3460		0,004760
	22,22	100,00	0,3569		0,004760
<b>110,00</b>	22,22	110,00	0,3831	0,39	0,005236
	22,22	110,00	0,3827		0,005236
	22,22	110,00	0,3906		0,005236
<b>120,00</b>	22,22	120,00	0,4206	0,42	0,005712
	22,22	120,00	0,4190		0,005712
	22,22	120,00	0,4286		0,005712

**Fonte:** dados da pesquisa.

**Tabela 17**– Dados da concentração das apresentações olanzapina 10 mg.

<b>Concentração (%)</b>	<b>Massa (mg)</b>	<b>Concentração Teórica (%)</b>	<b>Área/Abs</b>	<b>Área/Abs Média</b>
<b>60,00</b>	22,22	35,97	0,3520	0,3581
	22,22	35,97	0,3558	
	22,22	35,97	0,3455	
<b>70,00</b>	22,22	41,96	0,4065	0,40
	22,22	41,96	0,4074	
	22,22	41,96	0,3995	
<b>80,00</b>	22,22	47,96	0,4616	0,46
	22,22	47,96	0,4614	
	22,22	47,96	0,4586	
<b>90,00</b>	22,22	53,95	0,5119	0,51
	22,22	53,95	0,5134	
	22,22	53,95	0,5100	
<b>100,00</b>	22,22	59,95	0,5725	0,57
	22,22	59,95	0,5730	
	22,22	59,95	0,5706	
<b>110,00</b>	22,22	65,94	0,6245	0,62
	22,22	65,94	0,6248	
	22,22	65,94	0,6202	
<b>120,00</b>	22,22	71,94	0,6821	0,68
	22,22	71,94	0,6832	
	22,22	71,94	0,6811	

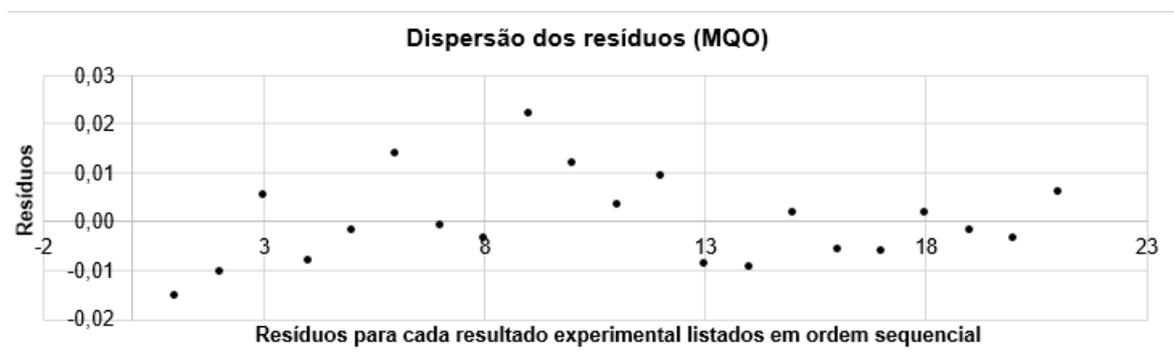
**Fonte:** dados da pesquisa.

Tabela 18 – Dados estatísticos da linearidade – olanzapina 5 mg e 10 mg.

Parâmetro estatístico	Valor de referência	Resultado Olz 5mg	Resultado Olz 10 mg
Homocedasticidade (teste de Cochran)	< 0,56	0,360	0,489
Equação ordinária - MMQO	Não se aplica	$y = 70,6807x + 0,0099$	$y = 69,2647x + 0,0331$
Test t para avaliar o intercepto diferente de “0”	t calculado menor que t Tabelado (4,30)	1,63	4,21
Avaliação da significância do coeficiente angular – ANOVA em MMQO	F calculado < Fcrítico (5,922)	1100,924	22640,427
Coeficiente de determinação	Informativo	0,983	0,999
Coeficiente de correlação	>0,99	0,991	1,00
Avaliação da independências dos resíduos (Durbin Watson)	$\geq 1,5$	1,5	2,0
Avaliação da normalidade dos resíduos (Shapiro Wilk)	>0,908	0,969	0,947
Avaliação de Outliers dos resíduos – Maior valor encontrado (Grubbs)	< 2,73	2,416	1,752

Fonte: dados da pesquisa.

Figura 13 – Gráfico de dispersão dos resíduos – Olanzapina 5 mg.



Fonte: O Autor (2022).

**Figura 14** – Gráfico de dispersão dos resíduos – olanzapina 10 mg.

**Fonte:** O Autor (2022).

### 5.1.3 Precisão

#### 5.1.3.1 Repetibilidade

A repetibilidade foi determinada utilizando-se seis amostras a 100% do padrão de Olanzapina 5 e 10 mg, sob as mesmas condições de teste, em um curto intervalo de tempo e preparadas pelo mesmo analista. Nas Tabelas 19 e 20 seguem os resultados da repetibilidade para olanzapina 5 e 10mg.

**Tabela 19** – Resultados da repetibilidade olanzapina 5 mg.

<b>Repetibilidade</b>	<b>Abs</b>	<b>%</b>
Amostra 001	0,3557	<b>100,51</b>
Amostra 002	0,3574	<b>100,99</b>
Amostra 003	0,3546	<b>100,20</b>
Amostra 004	0,3565	<b>100,73</b>
Amostra 005	0,3595	<b>101,58</b>
Amostra 006	0,357	<b>100,88</b>
Média	<b>0,3568</b>	<b>100,81</b>
Desvio Padrão	<b>0,0017</b>	<b>0,4699</b>
CV%	0,47	0,47
CV% aceitável	8,43	8,43

**Fonte:** Dados da pesquisa.

**Tabela 20** – Resultados da repetibilidade olanzapina 10 mg.

<b>Repetibilidade</b>	<b>Abs</b>	<b>%</b>
Amostra 001	0,5979	<b>100,96</b>
Amostra 002	0,5975	<b>100,89</b>
Amostra 003	0,6059	<b>102,31</b>
Amostra 004	0,5949	<b>100,46</b>
Amostra 005	0,6053	<b>102,21</b>
Amostra 006	0,6043	<b>102,04</b>
Média	<b>0,6010</b>	<b>100,46</b>
Desvio Padrão	<b>0,0047</b>	<b>0,8008</b>
CV%	0,89	0,89
CV% aceitável	7,81	7,81

**Fonte:** Dados da pesquisa.

Pode-se observar que a Repetibilidade atende às especificações para quantificação do Olanzapina 5 e 10 mg, visto que apresentou o coeficiente de variação (CV%) de 0,47 % e 0,89; sendo inferior CV% aceitável de 8,43 e 7,81 % respectivamente.

#### 5.1.3.2 *Precisão intermediária*

A precisão intermediária foi determinada utilizando-se 12 amostras para dois analistas (6 amostras para o primeiro analista e 6 amostras para o segundo analista), sob as mesmas condições do preparo das amostras e padrões de olanzapina 5 e 10 mg. Nas Tabelas 21, 22 e 23 seguem os resultados da precisão intermediária e teste t Student das apresentações Olanzapina 5 e 10 mg respectivamente.

**Tabela 21** – Resultados da precisão intermediária olanzapina 5 mg.

<b>Analista</b>	<b>Concentração (mg/ml)</b>	<b>%</b>	<b>Analista</b>	<b>Concentração (mg/ml)</b>	<b>%</b>
Amostra 001	0,00478	100,51	Amostra 001	0,00480	01,61
Amostra 002	0,00481	100,99	Amostra 002	0,00483	02,23
Amostra 003	0,00477	100,20	Amostra 003	0,00480	01,50
Amostra 004	0,00479	100,73	Amostra 004	0,00477	00,93
Amostra 005	0,00484	101,58	Amostra 005	0,00479	01,41
Amostra 006	0,00480	100,88	Amostra 006	0,00475	00,45
Média	0,00480	100,81		0,00479	01,35
Desvio Padrão	0,000022			0,000029	
CV%	0,47			0,60	
CV% aceitável	8,43			8,43	
CV% Analista 1 + Analista 2	0,52				
CV% aceitável (12 amostras)	12,65				

**Fonte:** Dados da pesquisa.

**Tabela 22** – Resultados da precisão intermediária olanzapina 10 mg.

<b>Analista</b>	<b>Concentração (mg/ml)</b>	<b>%</b>	<b>Analista</b>	<b>Concentração (mg/ml)</b>	<b>%</b>
Amostra 001	0,00802	100,96	Amostra 001	0,00798	100,20
Amostra 002	0,00801	100,89	Amostra 002	0,00790	99,26
Amostra 003	0,00812	102,31	Amostra 003	0,00789	99,12
Amostra 004	0,00798	100,46	Amostra 004	0,00800	100,46
Amostra 005	0,00812	102,21	Amostra 005	0,00810	101,74
Amostra 006	0,00810	102,04	Amostra 006	0,00806	101,18
Média	0,0081	101,48		0,0080	100,33
Desvio Padrão	0,000064			0,000082	
CV%	0,79			1,03	
CV% aceitável	7,81			7,81	
CV% Analista 1 + Analista 2	0,99				
CV% aceitável (12 amostras)	11,71				

**Fonte:** Dados da pesquisa

**Tabela 23** – Resultados do Teste t Student. olanzapina 5mg e 10 mg.

	<b>Analista1</b>	<b>Analista 2</b>
Média Olz 5 mg	0,00480	0,00479
Média Olz 10 mg	0,0081	0,0080
Stat T Olz 5 mg	0,6927	
Stat T Olz 10 mg	1,6591	
t crítico bi-caudal Olz 5 mg	2,2281	
t crítico bi-caudal Olz 10 mg	2,2281	

**Fonte:** Dados da pesquisa

Foi verificado que o desvio padrão relativo (DPR%) aceitável para as apresentações Olanzapina 5 mg e 10 mg era de 8,43% e 7,81% para 6 amostras e de 12,65 % e 11,71 para as 12 amostras e os valores encontrado foram inferiores aos requisitados: Analista 1 = 0,47% e 0,79%; Analista 2 = 0,60% e 1,03 % para o total das 12 amostras avaliadas foram de 0,52%. e 0,99% para as apresentações 5 mg e 10 mg respectivamente. Após aplicação do teste t Student, o t calculado para as apresentações foram de 0,6927 e 1,6591, valor inferior ao t Tabelado de 2,2281 e 2,2281 com 95% de confiança. Portanto, pode-se concluir que o método foi preciso para metodologia de teor dissolvido das apresentações olanzapina 5 mg e 10 mg.

#### **5.1.4 Exatidão**

A exatidão foi preparada considerando as seguintes concentrações em triplicata: 60%, 80% e 100%. Foi avaliada a capacidade de recuperação para cada concentração de 60 a 100% do valor teórico. O cálculo do DPR% aceitável foi obtido pela Equação de Horwitz para cada concentração de Olanzapina 5mg e 10 mg respectivamente: para 60% o DPR aceitável foi de 9,11 e 8,43; para 80% o DPR aceitável de 8,72 e 8,08 e para 100% o DPR aceitável foi de 8,43 e 7,81. Os valores de DRR % encontrados para 60 % foram 0,99 e 0,67; para 80 % 0,84 e 0,12; para 100 % 1,74 e 1,78 respectivamente para as apresentações de olanzapina 5 e 10 mg, sendo, portanto, inferiores ao DPR % aceitável. Os resultados estão registrados na Tabela 24 e 25.

**Tabela 24** – Resultados da exatidão olanzapina 5 mg.

Amostra	Concentração (mg/ml)			% Recuperação		
	60%	80%	100%	60%	80%	100%
1	0,00280	0,00378	0,00466	98,16	99,76	99,95
2	0,00285	0,00372	0,00482	99,18	97,73	99,14
3	0,00285	0,00378	0,00479	97,95	101,25	100,55
Média	0,002833	0,00376	0,004757	98,43	99,58	99,88
DPR%	0,99	0,84	1,74			
DPR% aceitável	9,11	8,72	8,43			

Fonte: Dados da pesquisa.

**Tabela 25** – Resultados da exatidão olanzapina 10 mg.

Amostra	Concentração (mg/ml)			% Recuperação		
	60%	80%	100%	60%	80%	100%
1	0,00484	0,00632	0,00827	11,51	100,58	100,19
2	0,00479	0,00631	0,00808	99,54	99,31	99,50
3	0,00477	0,00632	0,00799	104,19	101,78	100,62
Média	0,0048	0,006317	0,008113	101,75	100,56	100,10
DPR%	0,67	0,12	1,78			
DPR% aceitável	8,43	8,08	7,81			

Fonte: Dados da pesquisa.

Os resultados de exatidão do método desenvolvido foram comparados com um método validado por HPLC pelo LAFEPE, sendo o DPR % aceitável foi de 12,65 para as 12 amostras obtendo-se um DPR de 1,40 para as apresentações de Olanzapina 5 mg e 10 mg conforme resultados apresentados nas Tabelas 26 e 27. Foi realizado o test T de Student para comparar as duas médias, sendo os resultados apresentados na Tabela 28 para as apresentações de Olanzapina 5mg e 10mg, onde após aplicação do teste t Student, o t calculado para as apresentações foram de - 1,1389 e 2,4320, valor inferior ao t Tabelado de 2,2281 e 2,5706 com 95% de confiança. Portanto, pode-se concluir que o método foi exato para metodologia de teordissolvido das apresentações Olanzapina 5 mg e 10 mg.

**Tabela 26** – Resultados da exatidão comparativa olanzapina 5 mg.

<b>Método Espectro</b>	<b>Concentração (mg/ml)</b>	<b>Método HPLC</b>	<b>Concentração (mg/ml)</b>
Amostra 001	0,00478	Amostra 001	0,00478
Amostra 002	0,00481	Amostra 002	0,00477
Amostra 003	0,00477	Amostra 003	0,00494
Média	0,00479		0,00483
Desvio Padrão	0,000019		0,000097
CV%	0,40		2,00
CV% aceitável	8,43		8,43
CV% Analista 1 + Analista 2	1,40		
CV% aceitável (12 amostras)	12,65		

**Fonte:** Dados da pesquisa.

**Tabela 27** – Resultados da exatidão comparativa olanzapina 10 mg.

<b>Método Espectrofotômetro</b>	<b>Concentração (mg/ml)</b>	<b>Método HPLC</b>	<b>Concentração (mg/ml)</b>
Amostra 001	0,00802	Amostra 001	0,00798
Amostra 002	0,00801	Amostra 002	0,00798
Amostra 003	0,00812	Amostra 003	0,00800
Média	0,00805		0,00799
Desvio Padrão	0,000064		0,000010
CV%	0,79		0,12
CV% aceitável	7,81		7,81
CV% Analista 1 + Analista 2	0,67		
CV% aceitável (12 amostras)	11,71		

**Fonte:** Dados da pesquisa.

**Tabela 28** – Resultados do Teste t Student. olanzapina 5mg e 10 mg.

	<b>Espectrofotômetro</b>	<b>HPLC</b>
<b>Média Olz 5 mg</b>	0,00479	0,00483
<b>Média Olz 10 mg</b>	0,00805	0,00799
<b>Stat T Olz 5 mg</b>	-1,1389	
<b>Stat T Olz 10 mg</b>	2,4320	
<b>t crítico bi-caudal Olz 5 mg</b>	2,2281	
<b>t crítico bi-caudal Olz 10 mg</b>	2,5706	

**Fonte:** Dados da pesquisa.

### 5.1.5 Desenvolvimento analítico e Robustez

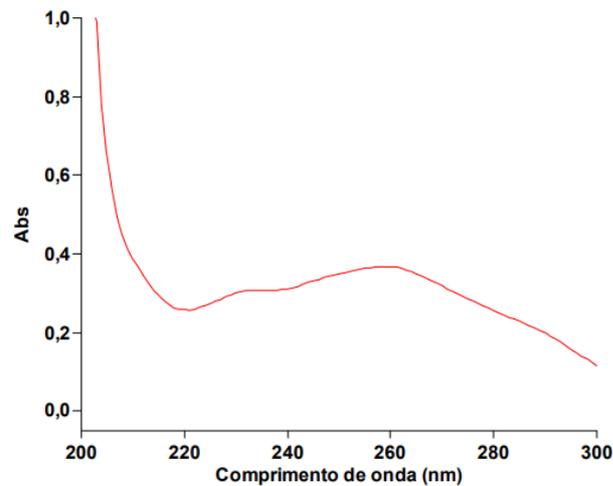
#### 5.1.5.1 Desenvolvimento analítico

Os resultados do desenvolvimento analítico estão dispostos no Quadro 10.

**Quadro 10** - Descrição dos resultados do desenvolvimento analítico.

MÉTODO	RESULTADO
Pesquisar métodos de quantificação da dissolução da Olanzapina por espectrofotometria	Em pesquisa realizada no referencial teórico não foi identificada na literatura técnica de quantificação da dissolução da Olanzapina por espectrofotometria.
Realizar varredura espectral da Olanzapina	A olanzapina apresenta maior absorção de onda ( $\lambda$ ) em 260 nm.
Aplicação do preparo de amostra (Olanzapina 5mg) do método por HPLC para quantificação por espectrofotometria	A concentração da Olanzapina 5 mg do método por HPLC não atendeu ao princípio da lei de Lambert-beer apresentando absorvância inferior 0,2 U.A. (SOARES, 2003). Sendo necessário ajuste da concentração para 0,00476 para atendimento da lei Lambert-beer.
Aplicação do preparo de amostra (Olanzapina 10 mg) do método por HPLC para quantificação por espectrofotometria	A concentração da olanzapina 10 mg do método por HPLC atendeu ao princípio da lei de Lambert-beer apresentando absorvância 0,2 e 0,8 U.A.

**Fonte:** Dados da pesquisa.

**Figura 15** – Varredura espectral da Olanzapina.

Fonte: Autor (2022).

#### 5.1.5.2 Robustez - Tempo de extração

Os resultados das concentrações, após quantificação, das apresentações de Olanzapina 5mg e 10 mg estão evidenciados na Tabela 29 e 30, sendo aplicado ANOVA para fator único com os resultados descritos estatisticamente na Tabela 31. Pode-se evidenciar que o F calculado é inferior ao F Tabela demonstrando que estatisticamente não há diferença significativa na alteração do tempo de extração. Sendo assim, o método é considerado robusto para alteração do tempo de extração.

**Tabela 29** – Concentração das leituras em diferentes tempos de extração olanzapina 5mg.

Leitura no espectrofotômetro	Tempo durante a análise da amostra (minutos)	Concentração
1 <sup>a</sup>		4,770
2 <sup>a</sup>	5	4,777
3 <sup>a</sup>		4,732
1 <sup>a</sup>		4,576
2 <sup>a</sup>	10	4,935
3 <sup>a</sup>		4,855
1 <sup>a</sup>		4,564
2 <sup>a</sup>	15	4,543
3 <sup>a</sup>		4,556

Fonte: Dados da pesquisa

**Tabela 30** – Concentração das leituras em diferentes tempos de extração olanzapina 10mg.

<b>Leitura no espectrofotômetro</b>	<b>Tempo durante a análise da amostra (minutos)</b>	<b>Concentração</b>
1 <sup>a</sup>		7,717
2	5	8,091
3 <sup>a</sup>		7,978
1 <sup>a</sup>		7,552
2 <sup>a</sup>	10	7,801
3 <sup>a</sup>		7,764
1 <sup>a</sup>		7,611
2 <sup>a</sup>	15	7,620
3 <sup>a</sup>		7,697

**Fonte:** Dados da pesquisa.

**Tabela 31** – ANOVA olanzapina 5 mg e 10 mg.

	<b>Tempo 0</b>	<b>Tempo 5</b>	<b>Tempo 10</b>
<b>Média Olz 5 mg</b>	4,7595	4,7887	4,5485
<b>Média Olz 10 mg</b>	7,9287	7,7055	7,6426
<b>F Olz 5 mg</b>		4,2846	
<b>F Olz 10 mg</b>		3,5549	
<b>F crítico Olz 5 mg</b>		5,1432	
<b>F crítico Olz 10 mg</b>		5,1432	

**Fonte:** Dados da pesquisa.

### 5.1.5.3 Robustez – Compatibilidade dos filtros

Os resultados das concentrações, após quantificação, das apresentações de Olanzapina 5mg e 10 mg estão evidenciados na Tabela 32 e 33, sendo aplicado o teste F para variância diferente para Olanzapina 5 mg, visto que o F calculado é maior que o F crítico, e o teste F pravaariantes equivalentes para Olanzapina 10 mg, visto que o F calculado é inferior ao F crítico. Os resultados estão descritos estatisticamente na Tabela 34. Pode-se evidenciar que o t calculado é inferior ao t Tabelado demonstrando que estatisticamente não há diferença significativa na substituição dos filtros com o grau de liberdade 2 para Olanzapina 5 mg e grau

de liberdade 4 para olanzapina 10 mg. Sendo assim, o método é considerado robusto para alteração do filtro das duas apresentações.

**Tabela 32** – Resultados da mudança de filtro Olanzapina 5 mg.

Leitura no espectrofotômetro	Filtros	Concentração
1 <sup>a</sup>		4,551
2 <sup>a</sup>	0,45 µm	4,590
3 <sup>a</sup>		4,547
1 <sup>a</sup>		4,817
2 <sup>a</sup>	Faixa preta	4,785
3 <sup>a</sup>		4,555

**Fonte:** Dados da pesquisa.

**Tabela 33** – Resultados da mudança de filtro Olanzapina 10 mg.

Leitura no espectrofotômetro	Filtros	Concentração
1 <sup>a</sup>		8,137
2 <sup>a</sup>	0,45 µm	8,230
3 <sup>a</sup>		8,127
1 <sup>a</sup>		8,237
2 <sup>a</sup>	Faixa preta	8,352
3 <sup>a</sup>		8,235

**Fonte:** Dados da pesquisa.

**Tabela 34**– Teste F e Teste t - Olanzapina 5 mg e 10 mg.

	0,45 µm	Faixa preta
<b>Média Olz 5 mg</b>	4,7194	4,5629
<b>Média Olz 10 mg</b>	8,2748	8,1646
<b>F Olz 5 mg</b>	36,7236	
<b>F Olz 10 mg</b>	1,4034	
<b>F crítico Olz 5 mg</b>	19	
<b>F crítico Olz 10 mg</b>	19	
<b>t calculado Olz 5 mg</b>	1,8713	
<b>t calculado Olz 10 mg</b>	2,1762	
<b>t Tabelado Olz 5 mg</b>	2,7764	
<b>t Tabelado Olz 10 mg</b>	4,3026	

**Fonte:** Dados da pesquisa

#### 5.1.5.4 Robustez – Mudança da marca de reagente

Os resultados das concentrações, após quantificação, das apresentações de Olanzapina 5mg e 10 mg estão evidenciados na Tabela 35 e 36, sendo aplicado teste F de duas amostras para variância equivalente visto que o F calculado é inferior ao F Tabelado. Os resultados estão descritos estatisticamente na Tabela 37. Pode-se evidenciar que o t calculado é inferior ao t Tabela demonstrando que estatisticamente não há diferença significativa na mudança do reagente. Sendo assim, o método é considerado robusto para mudança do reagente para as duas apresentações.

**Tabela 35** - Resultados da mudança da marca do reagente olanzapina 5 mg.

Leitura no espectrofotômetro	Marca	Concentração
1 <sup>a</sup>	J.T. Baker	4,790
2 <sup>a</sup>		4,719
3 <sup>a</sup>		4,786
1 <sup>a</sup>	Synty	4,753
2 <sup>a</sup>		4,673
3 <sup>a</sup>		4,749

Fonte: Dados da pesquisa

**Tabela 36** – Resultados da mudança da marca do reagente olanzapina 10 mg.

Leitura no espectrofotômetro	Marca	Concentração
1 <sup>a</sup>	J.T. Baker	8,057
2 <sup>a</sup>		8,028
3 <sup>a</sup>		7,944
1 <sup>a</sup>	Synty	8,146
2 <sup>a</sup>		7,997
3 <sup>a</sup>		8,113

Fonte: Dados da pesquisa

**Tabela 37**– Teste F e Teste t - Olanzapina 5 mg e 10 mg.

	<b>J.T. Baker</b>	<b>Synty</b>
<b>Média Olz 5 mg</b>	4,7248	4,7649
<b>Média Olz 10 mg</b>	8,0853	8,0097
<b>F Olz 5 mg</b>	1,2825	
<b>F Olz 10 mg</b>	1,7615	
<b>F crítico Olz 5 mg</b>	19	
<b>F crítico Olz 10 mg</b>	19	
<b>t calculado Olz 5 mg</b>	1,1524	
<b>t calculado Olz 10 mg</b>	2,1762	
<b>t Tabelado Olz 5 mg</b>	2,7764	
<b>t Tabelado Olz 10 mg</b>	2,7764	

**Fonte:** Dados da pesquisa

#### 5.1.5.5 Robustez – Estabilidade das soluções

Os resultados das concentrações, após quantificação, das apresentações de Olanzapina 5mg e 10 mg estão evidenciados na Tabela 38 e 39, sendo aplicado ANOVA par análise das variâncias com os resultados descritos estatisticamente na Tabela 40. Pode-se evidenciar que oF calculado é inferior ao F Tabelado demonstrando que estatisticamente não há diferença significativa na estabilidade da solução após 48 horas. Sendo assim, o método é considerado robusto para utilização da solução amostra após 48 horas.

**Tabela 38** – Resultados da estabilidade da amostra - olanzapina 5 mg.

<b>Leitura no espectrofotômetro</b>	<b>Estabilidade da amostra (horas)</b>	<b>Concentração</b>
1 <sup>a</sup>		4,553
2 <sup>a</sup>	0	4,728
3 <sup>a</sup>		4,911
1 <sup>a</sup>		4,553
2 <sup>a</sup>	24	4,728
3 <sup>a</sup>		4,911
1 <sup>a</sup>		4,7
2 <sup>a</sup>	48	4,8
3 <sup>a</sup>		4,6

**Fonte:** Dados da pesquisa.

**Tabela 39** – Resultados da estabilidade da amostra - olanzapina 10 mg.

Leitura no espectrofotômetro	Estabilidade da amostra (horas)	Concentração
1 <sup>a</sup>		7,717
2 <sup>a</sup>	0	8,091
3 <sup>a</sup>		7,978
1 <sup>a</sup>		7,552
2 <sup>a</sup>	24	7,801
3 <sup>a</sup>		7,764
1 <sup>a</sup>		7,611
2 <sup>a</sup>	48	7,620
3 <sup>a</sup>		7,697

**Fonte:** Dados da pesquisa.

**Tabela 40** – ANOVA olanzapina 5 mg e 10 mg.

	0 h	24 h	48 h
<b>Média Olz 5 mg</b>	4,7307	4,7307	4,7257
<b>Média Olz 10 mg</b>	7,8911	7,8911	7,8828
<b>F Olz 5 mg</b>	0,0010		
<b>F Olz 10 mg</b>	0,0010		
<b>F crítico Olz 5 mg</b>	5,1432		

**Fonte:** Dados da pesquisa.

## 6 CONCLUSÃO

O método analítico de doseamento do teor dissolvido das apresentações olanzapina 5 mg e 10 mg por espectrofotometria foi desenvolvido para substituição na rotina do teste de doseamento do teor por HPLC, o que possibilitará redução dos custos das análises: com a utilização de equipamento com valor de investimento menor, redução do tempo de análise: com a o resultado imediato após a leitura no espectrofotômetro, redução dos custos e exposição a solventes orgânicos, bem como disponibilização para uso do HPLC para outras técnicas de quantificação.

O método foi considerado validado obedecendo os requisitos da RDC 166/2017 que dispõe sobre a validação de métodos analíticos, sendo, através de cálculos estatísticos, comprovado que o método é específico, linear, preciso, exato e robusto.

## REFERÊNCIAS

- ANDRADE, R. F. Antipsicóticos de segunda geração no tratamento da esquizofrenia. **Revista Acadêmica OSWALDO CRUZ**, [s. l.], v. n.7, 2015.
- ANVISA. Rdc No 166. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**, [s. l.], v. 2017, 2017. Disponível em: <<https://www20.anvisa.gov.br/coifa/pdf/rdc166.pdf>>
- ANVISA. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Guia N° 10. Guia para tratamento estatístico da validação analítica, [S. l.], 30 ago. 2017.
- AOAC. Association of Official Analytical Chemists. Appendix F. Guidelines for Standard Method Performance Requirements, [S. l.], 2016.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (NBR ISO/IEC). N° 17025. [S. l.], 19 dez. 2017.
- AYRES, M.; AYRES-JUNIOR, M.; AYRES, D. L.; SANTOS, A. A. S. **Aplicações estatísticas nas áreas das ciências bio-médicas**. 5. ed. Belém: Bioestat, 2007.
- BARNETT, R. Bipolar disorder. **The Lancet**, [s. l.], v. 392, n. 10157, p. 1510, 2018.
- BARROS, T. R. B. **Estudo de adsorção do chumbo ii de efluentes utilizando casca de abacaxi como biomassa adsorvente**. 2014. 42f. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Química Industrial)-Centro de Ciências e Tecnologia, Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2014.
- BASAVAIAH, K.; RANGACHAR, A. K. U.; THARPA, K. Quantitative determination of olanzapine in pharmaceutical preparations by HPLC. **Journal of the Mexican Chemical Society**, [s. l.], v. 52, n. 2, p. 120–124, 2008.
- BRASIL, Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde. Portaria n° 315, de 30 de março de 2016. Aprova o Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas do Transtorno Afetivo Bipolar do tipo I. [S. l.], 30 mar. 2016. Disponível em: [https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/sas/2016/prt0315\\_30\\_03\\_2016.html#:~:text=Aprova%20o%20Protocolo%20Cl%C3%ADnico%20e,Afetivo%20Bipolar%20do%20tipo%20I](https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/sas/2016/prt0315_30_03_2016.html#:~:text=Aprova%20o%20Protocolo%20Cl%C3%ADnico%20e,Afetivo%20Bipolar%20do%20tipo%20I). Acesso em: 13 fev. 2022.
- DEBATTISTA, C.; DEBATTISTA, K. Safety Considerations of the Use of Second Generation Antipsychotics in the Treatment of Major Depression: Extrapiramidal and Metabolic Side Effects. **Current Drug Safety**, [s. l.], v. 5, n. 3, p. 263–266, 2010.
- FARMACOPÉIA AMERICANA. **USP 44**. Estados Unidos, 2021
- FARMACOPÉIA, brasileira. 5. ed. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2010. 1396 p. v. 2.

INMETRO. DOQ-CGCRE-008. **Orientação sobre validação de métodos analíticos**, [S. l.], 2020.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE (ICH HARMONISED TRIPARTITE GUIDELINE). Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1), [S. l.], 19 dez. 2017

LIMA, L. S. Lei de Lambert–Beer. **Revista de Ciência Elementar**, [s. l.], v. 1, n. 1, p. 1–2, 2013.

LÓPEZ-MUÑOZ, F.; SHEN, W. W.; D’OCON, P.; ROMERO, A.; ÁLAMO, C. A history of the pharmacological treatment of bipolar disorder. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 19, n. 7, p. 1–38, 2018.

MCDONAGH, M. S.; PETERSON, K.; CARSON, S.; FU, R.; THAKURTA, S.; EFFECTIVENESS, D.; MCDONAGH, M.; INVESTIGATOR, P.; HELFAND, M. Drug Class Review Atypical Antipsychotic Drugs. **Drugs**, [s. l.], n. July, p. 1–4, 2010.

MOURA, J. I. De; MOITA, G. C. Determinação simultânea de olanzapina e cloridrato de fluoxetina em formulações farmacêuticas por espectrofotometria derivativa. **Quim. Nova**, [s. l.], v. 35, n. 3, p. 627–633, 2012.

MOURA, J. R. **Desenvolvimento e Validação de Metodologia Analítica Aplicável ao Desenvolvimento Farmacotécnico de Comprimidos de Olanzapina**. 2009. 41 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)-Universidade Federal do Goiás, Goiânia, 2009.

OLIVEIRA, I. R. Antipsicóticos atípicos: farmacologia e uso clínico. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, [s. l.], v. 22, n. suppl 1, p. 38–40, 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. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, [s. l.], v. 23, n. 6, p. 973–981, 2000.

RAJENDRAPRASAD, N.; BASAVAIHAH, K. Determination of olanzapine by spectrophotometry using permanganate. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, [s. l.], v. 45, n. 3, p. 539–550, 2009.

RÊGO, J. F. Do; MOURA, J. I. De; MOITA, G. C. Determinação de olanzapina em formulações farmacêuticas por espectrofotometria: desenvolvimento e validação. **Química Nova**, [s. l.], v. 33, n. 2, p. 471–477, 2010.

RENKOLLU, P.; ÇELEBIER, M.; ARICA-YEGIN, B. HPLC determination of olanzapine and carbamazepine in their nicotinamide cocrystals and investigation of the dissolution profiles of cocrystal tablet formulations. **Pharmaceutical Development and Technology**, [s. l.], v. 20, n. 3, p. 380–384, 2015.

RODRÍGUEZ, H.; GONZÁLEZ, H.; MENESES, J. Síntomas de discontinuación luego de

suspensão abrupta de olanzapina. **REV CHIL NEURO-PSIQUIAT**, [s. l.], v. 50, n. 2, p. 100–105, 2012.

ROSA, C. L.; OLIVEIRA, F. P. de S. M.; ARANTES, R. dos S.; SILVA, V. M. Da; OLIVEIRA, T. M.; SALIBA, W. A. Construção De Espectrofotômetro Visível Para Fins Didáticos Construction of Visible Spectrophotometer for Didactic Studies. **Journal of Exact Sciences-JES**, [s. l.], v. 21, n. 1, p. 20–25, 2019.

SOARES, L. A. L.; SCHMIDT, P. C.; ORTEGA, G. G.; PETROVICK, P. R. Efeito da força e da velocidade de compressão sobre as propriedades de comprimidos contendo alta concentração de extrato seco vegetal. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, [s. l.], v. 22, n. 2, p. 147–154, 2003.

SUZUKI, T.; REMINGTON, G.; UCHIDA, H.; RAJJI, T. K.; GRAFF-GUERRERO, A.; MAMO, D. C. Management of schizophrenia in late life with antipsychotic medications: A qualitative review. **Drugs and Aging**, [s. l.], v. 28, n. 12, p. 961–980, 2011.

TESTA, C. G.; PRADO, L. D.; COSTA, R. N.; COSTA, M. L.; LINCK, Y. G.; MONTI, G. A.; CUFFINI, S. L.; ROCHA, H. V. A. Challenging identification of polymorphic mixture: Polymorphs I, II and III in olanzapine raw materials. **International Journal of Pharmaceutics**, [s. l.], v. 556, n. December 2018, p. 125–135, 2019.

THOMAS, K; SAADABADI, A. Olanzapine. In: StatPearls Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021 Jan-. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK532903/>. Acesso em: 14 fev. 2022.

VIEIRA, Sonia. **Introdução à Bioestatística**. 4. ed [S. l.: s. n.], 2008.

WANNMACHER, L. Antipsicóticos atípicos: mais eficazes, mais seguros ? [s. l.], v. 1, p. 1–6, 2004.

YATHAM, L. N.; KENNEDY, S. H.; PARIKH, S. V.; SCHAFFER, A.; BOND, D. J.; FREY, B. N.; SHARMA, V.; GOLDSTEIN, B. I.; REJ, S.; BEAULIEU, S.; ALDA, M.; MACQUEEN, G.; MILEV, R. V.; RAVINDRAN, A.; O'DONOVAN, C.; MCINTOSH, D.; LAM, R. W.; VAZQUEZ, G.; KAPCZINSKI, F.; MCINTYRE, R. S.; KOZICKY, J.; KANBA, S.; LAFER, B.; SUPPES, T.; CALABRESE, J. R.; VIETA, E.; MALHI, G.; POST, R. M.; BERK, M. Canadian Network for Mood and Anxiety Treatments (CANMAT) and International Society for Bipolar Disorders (ISBD) 2018 guidelines for the management of patients with bipolar disorder. **Bipolar Disorders**, [s. l.], v. 20, n. 2, p. 97–170, 2018.