

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
FACULDADE DE FARMÁCIA
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

JULLIANA RODRIGUES MOURA

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA
APLICÁVEL AO DESENVOLVIMENTO FARMACOTÉCNICO DE COMPRIMIDOS
DE OLANZAPINA**

Goiânia
2009

JULLIANA RODRIGUES MOURA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA
APLICÁVEL AO DESENVOLVIMENTO FARMACOTÉCNICO DE COMPRIMIDOS
DE OLANZAPINA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Goiás, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Área de concentração: fármacos e medicamentos

Orientadora: Prof^a Dr^a Eliana Martins Lima

Goiânia
2009

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Sônia e Weber, pela minha formação, incentivo e apoio em todas as etapas da minha vida.

Ao meu marido, Guilherme, pelo amor, compreensão e apoio.

Às minhas irmãs, Camilla e Fernanda, e aos meus avós, D. Antônia e Sr. José, pela compreensão diante das constantes ausências familiares.

À Profa. Dra. Eliana Martins Lima pela confiança, paciência e orientação.

Ao ICF, Instituto de Ciências Farmacêuticas, e seu Diretor Executivo, Leonardo de Souza Teixeira, por me presentear com essa oportunidade e por acreditar e apostar no meu crescimento profissional.

Aos amigos do laboratório de Equivalência e Bioequivalência Farmacêutica do ICF: Carina, Douglas, Fernanda, Iram, Mário, Paulyne, Rogério e Talyta.

Aos amigos do laboratório de Tecnologia Farmacêutica (FARMATEC/FF/UFG): Daniele, Érika, Fabrícia, Marco Júnio, Mariana, Marilisa, Luciana e Thaís.

À secretária do Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Farmácia da UFG, Fernanda Bellato, pelas doces palavras de conforto.

À Faculdade de Farmácia da UFG pela oportunidade de aprendizado.

À FINEP pelo auxílio financeiro ao projeto.

A todos que, direta ou indiretamente, participaram deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	3
LISTA DE TABELAS	4
LISTA DE QUADROS	7
LISTA DE FIGURAS	8
RESUMO	9
ABSTRACT	10
1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO DA LITERATURA	14
2.1 OLANZAPINA	15
2.2 FUNDAMENTOS DAS TÉCNICAS QUANTITATIVAS DE ANÁLISE.....	17
2.2.1 Espectrometria de absorção no Ultravioleta/Visível (UV/VIS).....	17
2.2.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)	19
2.3 DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA ANALÍTICA.....	22
2.4 VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA ANALÍTICA	23
2.4.1 Seletividade.....	24
2.4.2 Linearidade/Intervalo	24
2.4.3 Precisão	25
2.4.4 Exatidão	26
2.4.5 Limite de Detecção	27
2.4.6 Limite de Quantificação	27
2.4.7 Robustez	28
2.4.8 Estabilidade.....	29
3 OBJETIVOS	31
4 MATERIAL E MÉTODOS	33
4.1 MATERIAL.....	34
4.2 MÉTODOS	35
4.2.1 Substância Teste.....	35
4.2.2 Parâmetros Físico-Químicos e de Estabilidade	35
4.2.3 Caracterização do Perfil Espectrofotométrico	36
4.2.4 Ensaios físicos.....	38
a) Aspecto/Descrição	38
b) Dureza	39
c) Determinação de peso em comprimidos	39
d) Determinação do tempo de desintegração para comprimidos.....	40
4.2.5 Desenvolvimento do método analítico de dissolução e doseamento para quantificação de olanzapina por espectrofotometria no UV-VIS	40
a) Dissolução	40
b) Doseamento.....	42
4.2.6 Validação do método analítico de dissolução e doseamento para quantificação de olanzapina por espectrofotometria no UV-VIS	43
a) Seletividade.....	44
b) Linearidade do método.....	45
c) Precisão/Exatidão	45
d) Limites de Detecção (LD) e Quantificação (LQ).....	46
e) Robustez	47
f) Estabilidade.....	47
4.2.7 Desenvolvimento do método analítico de doseamento para quantificação da olanzapina por HPLC	48

4.2.8	Validação do método analítico de doseamento para quantificação da olanzapina por HPLC	49
a)	Seletividade.....	50
b)	Linearidade do método.....	51
c)	Exatidão/Precisão	51
d)	Limites de Detecção e Quantificação.....	52
e)	Robustez	53
f)	Estabilidade.....	53
4.2.9	Aplicação da Metodologia Desenvolvida e Validada	54
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
5.1	SUBSTÂNCIA TESTE	56
5.2	CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL ESPECTROFOTOMÉTRICO	56
5.3	ENSAIOS FÍSICOS	57
5.3.1	Aspecto	58
5.3.2	Dureza	58
5.3.3	Peso Médio	59
5.3.4	Desintegração.....	63
5.4	DETERMINAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO DE DISSOLUÇÃO E DOSEAMENTO PARA QUANTIFICAÇÃO DE OLANZAPINA POR ESPECTROFOTOMETRIA NO UV-VIS	63
5.4.1	Dissolução.....	63
5.4.2	Doseamento.....	66
5.5	VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO DE DISSOLUÇÃO E DOSEAMENTO PARA QUANTIFICAÇÃO DE OLANZAPINA POR ESPECTROFOTOMETRIA NO UV-VIS	67
5.5.1	Seletividade.....	67
5.5.2	Linearidade	68
5.5.3	Exatidão / Precisão	70
5.5.3.1	Intra-lotes.....	70
5.5.3.2	Inter Lote (Precisão Intermediária).....	71
5.5.4	Limite de Detecção e Limite de Quantificação	72
5.5.5	Robustez	73
5.5.6	Estabilidade.....	73
5.6	DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO ANALÍTICO DE DOSEAMENTO PARA QUANTIFICAÇÃO DA OLANZAPINA POR HPLC 75	
5.6.1	Ensaio I	75
5.6.2	Ensaio II	77
5.6.3	Aplicação do método de doseamento para quantificação de Olanzapina por HPLC-UV (teste I) 77	
5.6.4	Ensaio III.....	79
5.6.5	Aplicação do método de doseamento para quantificação de olanzapina por HPLC-UV (teste II) 80	
5.7	VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO DE DOSEAMENTO PARA QUANTIFICAÇÃO DA OLANZAPINA POR HPLC 82	
5.7.1	Seletividade.....	82
5.7.2	Linearidade	83
5.7.3	Exatidão / Precisão	85
5.7.3.1	Intra-lotes.....	85
5.7.3.2	Inter Lote/Precisão Intermediária.....	86
5.7.4	Limite de Detecção / Limite de Quantificação	87
5.7.5	Robustez	88
5.7.6	Estabilidade.....	90
5.8	APLICAÇÃO DO MÉTODO VALIDADO NO DESENVOLVIMENTO FARMACOTÉCNICO DE COMPRIMIDOS DE OLANZAPINA	91
6	CONCLUSÕES	104
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	107

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

HPLC: High Performance Liquid Chromatography

INMETRO: Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial

RDC: Resolução da Diretoria Colegiada

RE: Resolução Específica

UV: Ultra-violeta

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Parâmetros físico-químicos da olanzapina encontrados em literatura	35
Tabela 2 – Caracterização da solubilidade de acordo com a parte do solvente requerido (mL) para solubilizar uma parte (1 g) do soluto.	36
Tabela 3 - Variação de peso em comprimidos revestidos.....	39
Tabela 4 - Resultados individuais e média da dureza de dez comprimidos revestidos de 2,5mg, 5,0mg e 10,0mg do Zyprexa®.....	59
Tabela 5 - Resultados individuais e média do peso de vinte comprimidos revestidos de Zyprexa® 2,5 mg	60
Tabela 6 - Resultados individuais e média do peso de vinte comprimidos revestidos de Zyprexa® 5,0 mg	61
Tabela 7 - Resultados individuais e média do peso de vinte comprimidos revestidos de Zyprexa® 10,0 mg.....	62
Tabela 8 - Resultados da aplicação do método de doseamento para quantificação de olanzapina por espectrofotometria UV-VIS nos comprimidos revestidos de 2,5 mg do Zyprexa® utilizando ácido clorídrico 0,1 mol/L como solvente e detecção UV a 259 nm:	67
Tabela 9 – Valores obtidos para seletividade do método de dissolução e doseamento para quantificação de olanzapina com detecção por espectrofotometria UV-VIS	68
Tabela 10 – Tratamento estatístico dos dados resultados da curva de calibração para o método dissolução e doseamento para quantificação de olanzapina com detecção por espectrofotometria UV-VIS.....	68
Tabela 11 – Desvios das concentrações nominais na curva analítica para a determinação da linearidade do método de dissolução e doseamento para quantificação de olanzapina com detecção por espectrofotometria UV-VIS.....	69
Tabela 12 – Quantificação da olanzapina (lote 1) no ensaio de exatidão e precisão (repetibilidade) do método de dissolução e doseamento para quantificação de olanzapina com detecção por espectrofotometria UV-VIS.....	70
Tabela 13 – Quantificação da olanzapina (lote 2) no ensaio de exatidão e precisão (repetibilidade) do método de dissolução e doseamento para quantificação de olanzapina com detecção por espectrofotometria UV-VIS.....	71
Tabela 14 – Quantificação da olanzapina (lote 3) no ensaio de exatidão e precisão (repetibilidade) do método de dissolução e doseamento para quantificação de olanzapina com detecção por espectrofotometria UV-VIS.....	71
Tabela 15 – Determinação de olanzapina durante o ensaio de exatidão e precisão (intermediária) do método de dissolução e doseamento para quantificação de olanzapina com detecção por espectrofotometria UV-VIS.....	72
Tabela 16 – Determinação de olanzapina durante o ensaio de LQ e LD das amostras de 1 a 100% da concentração de trabalho (0,005 mg/mL), do método de dissolução e doseamento para quantificação de olanzapina com detecção por espectrofotometria UV-VIS.....	72
Tabela 17 – Determinação de olanzapina durante o ensaio de robustez do método de dissolução e doseamento para quantificação de olanzapina com detecção por espectrofotometria UV-VIS por meio da variação do comprimento de onda.....	73
Tabela 18 – Determinação quantitativa da olanzapina em amostras mantidas a temperatura ambiente (25°C) durante o ensaio de estabilidade do método de dissolução e doseamento para quantificação de olanzapina com detecção por espectrofotometria UV-VIS	74
Tabela 19 – Determinação quantitativa da Olanzapina em amostras mantidas a temperatura de resfriamento (5°C) durante o ensaio de estabilidade do método de dissolução e doseamento para quantificação de olanzapina com detecção por espectrofotometria UV-VIS.....	74
Tabela 20 – Determinação quantitativa da Olanzapina em amostras mantidas a temperatura de aquecimento (37°C) durante o ensaio de estabilidade do método de dissolução e doseamento para quantificação de olanzapina com detecção por espectrofotometria UV-VIS.....	74
Tabela 21 - Resultados da aplicação do método de doseamento para quantificação de olanzapina por HPLC-UV (teste I) nos comprimidos revestidos de 2,5 mg do Zyprexa® e nos comprimidos (núcleo) de 2,5 mg do piloto I utilizando acetonitrila : água (1 : 1) como solvente, tampão fosfato 0,01 mol/L pH 2,5 + acetonitrila 70:30 como fase móvel, fluxo de 0,8 mL/min e detecção UV a 259 nm:.....	78

Tabela 22 – Resultados da aplicação do método de doseamento para quantificação de olanzapina por HPLC-UV (teste II) nos comprimidos revestidos de 2,5 mg do Zyprexa® e nos comprimidos (núcleo) de 2,5 mg do piloto I utilizando tampão fosfato 0,01mol/L pH 2,5 + acetonitrila 70:30 como fase móvel, fluxo de 0,8 mL/min, detecção UV a 254 nm e HCl 0,1 mol/L (1ª solubilização) e a própria fase móvel (diluente) como sistema solvente:.....	80
Tabela 23 – Valores obtidos para seletividade do método de doseamento por HPLC-UV para determinação de olanzapina	83
Tabela 24 – Tratamento estatístico dos dados da curva de calibração do método de doseamento de olanzapina por HPLC-UV.....	83
Tabela 25 – Desvios das concentrações nominais na curva analítica para a determinação da linearidade do método de doseamento de olanzapina por HPLC-UV.....	84
Tabela 26 – Determinação de olanzapina (lote 1) durante o ensaio de exatidão e precisão (repetibilidade) do método doseamento de olanzapina por HPLC-UV	85
Tabela 27 – Determinação de olanzapina (lote 2) durante o ensaio de exatidão e precisão (repetibilidade) do método doseamento de olanzapina por HPLC-UV	86
Tabela 28 – Determinação de olanzapina (lote 3) durante o ensaio de exatidão e precisão (repetibilidade) do método doseamento de olanzapina por HPLC-UV	86
Tabela 29 – Determinação de olanzapina durante o ensaio de exatidão e precisão (intermediária) do método doseamento de olanzapina por HPLC-UV	87
Tabela 30 – Determinação de olanzapina durante os ensaios de LQ e LD das amostras de 1 a 100% da concentração de trabalho (0,01 mg/mL), do método doseamento de olanzapina por HPLC-UV.....	87
Tabela 31 – Determinação de olanzapina durante o ensaio de robustez do método doseamento de olanzapina por HPLC-UV por meio da variação do fluxo para 0,6 e 1,0 mL/min.....	88
Tabela 32 – Determinação de olanzapina durante o ensaio de robustez do método doseamento de olanzapina por HPLC-UV por meio da variação da temperatura da coluna para 23°C e 27°C.....	88
Tabela 33 – Determinação de olanzapina durante o ensaio de robustez do método doseamento de olanzapina por HPLC-UV por meio da variação da proporção da fase móvel	89
Tabela 34 - Determinação de olanzapina durante o ensaio de robustez do método doseamento de olanzapina por HPLC-UV por meio da variação do pH do tampão fosfato de potássio monobásico 0,01 mol/L da fase móvel.....	89
Tabela 35 – Determinação quantitativa da olanzapina em amostras mantidas a temperatura ambiente () durante o ensaio de estabilidade do método de doseamento de olanzapina 25°C por HPLC-UV	90
Tabela 36 - Determinação quantitativa da olanzapina em amostras mantidas a temperatura de resfriamento (5°C) durante o ensaio de estabilidade do método de doseamento de olanzapina por HPLC-UV	90
Tabela 37 – Determinação quantitativa da olanzapina em amostras mantidas a temperatura de aquecimento (37°C) durante o ensaio de estabilidade do método de doseamento de olanzapina por HPLC-UV.....	91
Tabela 38 - Perfil de dissolução resultado da média da quantificação por espectrofotometria – UV de 12 comprimidos de Zyprexa® 2,5 mg Lotes A416200 e A472325 em cada tempo de coleta utilizando o ácido clorídrico 0,1 mol/L como meio de dissolução	92
Tabela 39 - Resultado do doseamento de olanzapina presente no medicamento Zyprexa® 2,5 mg comprimidos revestidos Lote A416200 e Lote A472325	92
Tabela 40 - Perfil de dissolução resultado da média da quantificação por espectrofotometria – UV de 12 comprimidos em cada tempo de coleta de Zyprexa® 2,5 mg lote A416200, de olanzapina 2,5 mg comprimidos revestidos Piloto lote 01, de olanzapina 2,5 mg comprimidos (núcleo) Piloto Lote 02 e de olanzapina 2,5 mg comprimidos revestidos Piloto Lote 02 - A utilizando o ácido clorídrico 0,1 mol/L como meio de dissolução	93
Tabela 41 - Perfil de dissolução resultado da média da quantificação por espectrofotometria – UV de 12 comprimidos em cada tempo de coleta de Zyprexa® 2,5 mg comprimidos revestidos Lote A416200, de olanzapina 2,5 mg comprimidos núcleo Piloto Lote 03 e de olanzapina 2,5 mg comprimidos revestidos Piloto Lote 03 utilizando o ácido clorídrico 0,1 mol/L como meio de dissolução	95
Tabela 42 - Perfil de dissolução resultado da média da quantificação por espectrofotometria – UV de 12 comprimidos em cada tempo de coleta de Zyprexa® 2,5 mg comprimidos revestidos Lote A416200, de olanzapina 2,5 mg comprimidos revestidos Piloto Lote 04, de olanzapina 2,5 mg comprimidos núcleo Piloto Lote 05, de olanzapina 2,5 mg comprimidos revestidos Piloto Lote 05-A e de olanzapina 2,5 mg comprimidos revestidos Piloto Lote 05-B utilizando o ácido clorídrico 0,1 mol/L como meio de dissolução	96
Tabela 43 - Resultado do doseamento dos lotes piloto 01 a 05 de olanzapina 2,5 mg comprimidos revestidos.....	98

Tabela 44 - Perfil de dissolução resultado da média da quantificação por espectrofotometria – UV de 12 comprimidos em cada tempo de coleta de Zyprexa® 2,5 mg comprimidos revestidos Lote A416200, de olanzapina 5 mg comprimidos núcleo Piloto Lote 01 e de olanzapina 5 mg comprimidos revestidos Piloto Lote 01 utilizando o ácido clorídrico 0,1 mol/L como meio de dissolução	100
Tabela 45 - Resultado do doseamento do lote piloto 01 de olanzapina 5 mg comprimidos revestidos...	101
Tabela 46 - Perfil de dissolução resultado da média da quantificação por espectrofotometria – UV de 12 comprimidos em cada tempo de coleta de Zyprexa® 2,5 mg comprimidos revestidos Lote A416200, de olanzapina 10mg comprimidos núcleo Piloto Lote 01 e de olanzapina 10 mg comprimidos revestidos Piloto Lote 01 utilizando o ácido clorídrico 0,1 mol/L como meio de dissolução	101
Tabela 47 – Resultado do cálculo de F1 (fator de diferença) e F2 (fator de semelhança) do perfil de dissolução resultado da média da quantificação por espectrofotometria –UV de 12 comprimidos em cada tempo de coleta do Zyprexa® 2,5 mg Lote A416200, de olanzapina 10 mg comprimidos núcleo Piloto Lote 01 e de olanzapina 10 mg comprimidos revestidos Piloto Lote 01	102
Tabela 48 - Resultado do doseamento do lote piloto 01 de olanzapina 10 mg comprimidos revestidos.	103

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Tipos de espectrofotometrias e relativos comprimentos de onda.	18
Quadro 2 - Técnicas de análise cromatográfica empregadas para a detecção e determinação qualitativa e quantitativa de olanzapina.....	23
Quadro 3 – Limites percentuais do teor do analito que devem estar contidos no intervalo de linearidade para alguns métodos analíticos	25
Quadro 4 – Fatores que devem ser considerados na determinação da robustez do método analítico	29
Quadro 5 - Condições das amostras preparadas de olanzapina em diferentes concentrações e utilizando diferentes solventes submetidas à varredura na região de 200 a 400nm do espectro de absorção em espectrofotômetro ultravioleta.....	37
Quadro 6 - Condições iniciais do teste de dissolução utilizando os comprimidos revestidos do Zyprexa® 2,5 mg para determinação do método analítico de dissolução de comprimidos revestidos de olanzapina.....	41
Quadro 7 - Descrição de analistas e datas de cada teste realizado para a validação do método de dissolução e doseamento para quantificação de olanzapina por espectrofotometria UV	43
Quadro 8 - Quantidade de solução padrão mãe pipetada e concentração obtida (mg/mL) para cada ponto da curva de calibração para validação do método de dissolução e doseamento para quantificação de olanzapina por espectrofotometria UV	45
Quadro 9 - Quantidade de solução padrão mãe e placebo pipetadas e as concentrações obtidas (mg/mL) para os pontos de 50,100 e 150% da curva de calibração para a avaliação da exatidão e precisão na validação do método de dissolução e doseamento para quantificação de olanzapina por espectrofotometria UV.....	46
Quadro 10 - Quantidade de solução padrão mãe e placebo pipetadas e as concentrações obtidas (µg/mL) para os pontos de 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 80 e 100% da curva de calibração para a avaliação do LQ e LD na validação do método de dissolução e doseamento para quantificação de olanzapina por espectrofotometria UV	47
Quadro 11 - Descrição de analistas e datas de cada teste realizado para a validação do método de doseamento por HPLC-UV	49
Quadro 12 – Quantidade de solução padrão mãe pipetada e concentração obtida (mg/mL) para cada ponto da curva de calibração para validação do método de doseamento de Olanzapina por HPLC-UV.....	51
Quadro 13 - Quantidade de solução padrão mãe e placebo pipetadas e as concentrações obtidas (mg/mL) para os pontos de 80,100 e 120% da curva de calibração para a avaliação da exatidão e precisão na validação do método de doseamento de Olanzapina por HPLC-UV	52
Quadro 14 - Quantidade de solução padrão mãe e placebo pipetadas e as concentrações obtidas (µg/mL) para os pontos de 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 80 e 100% da curva de calibração para a avaliação do LQ e LD na validação do método de doseamento de Olanzapina por HPLC-UV	53
Quadro 15 – Tabela de preços praticados no ano de 2007 do Instituto Adolfo Lutz para as análises de doseamento, uniformidade e dissolução de medicamentos nas formas farmacêuticas de comprimidos simples e cápsulas gelatinosas duras.....	99
Quadro 16 – Principais diferenças de custos dos itens envolvidos nas análises de doseamento por espectrofotometria e por HPLC	99

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fórmula estrutural da olanzapina	15
Figura 2 – Representação esquemática do funcionamento de um espectrofotômetro.....	19
Figura 3 – Componentes de cromatógrafo líquido.....	20
Figura 4 - À esquerda, ilustração da aplicação de força no teste de dureza de comprimidos. À direita, exemplo de durômetro.	39
Figura 5 - Gráfico de absorção espectrofotométrica (200 a 400 nm) de olanzapina 0,1 mg/mL em metanol (a), de olanzapina 0,01 mg/ml em metanol (b), olanzapina 5 µg/ml no provável meio de dissolução para método de dissolução (HCl 0,1 mol/L) (c), olanzapina 0,01 mg/ml em água : acetonitrila (1:1) (d), olanzapina 0,01 mg/ml em ácido clorídrico 0,1 mol/L na primeira diluição e tampão fosfato de potássio monobásico 0,01 mol/L pH 2,5 : acetonitrila (70:30) na segunda diluição (e).....	57
Figura 6- Fotografia dos comprimidos revestidos Zyprexa® (olanzapina) 2,5 mg (a), 5 mg (b) e 10 mg (c)	58
Figura 7 – Gráfico do perfil de dissolução dos comprimidos revestidos de Zyprexa® (Olanzapina) 2,5mg lote A438662 nos meios de dissolução água, ácido clorídrico 0,1 mol/L, tampão acetato de sódio pH 4,5 e tampão fosfato de potássio monobásico pH 6,8	64
Figura 8 – Linearidade do método de dissolução e doseamento para quantificação de olanzapina com detecção por espectrofotometria UV-VIS Lote 1 (a), Lote 2 (b) e Lote 3 (c)	69
Figura 9 – Cromatogramas olanzapina (0,01 mg/mL; fluxo de 0,8 mL/min; detecção UV a 259 nm; tampão fosfato 0,01 mol/L pH 2,5 + acetonitrila 70:30 como fase móvel) utilizando como solvente metanol 100% (a) e metanol 50% (água : metanol) (b), a fase móvel proposta (c), acetonitrila 100% (d) e acetonitrila 50% (água : acetonitrila) (e).	76
Figura 10 - Cromatogramas olanzapina (0,01 mg/mL; acetonitrila : água (1 : 1) como solvente; detecção UV a 259 nm; tampão fosfato 0,01 mol/L pH 2,5 + acetonitrila 70:30 como fase móvel) utilizando fluxo de 1,0 mL/min, (a) e 0,8 mL/min (b).	77
Figura 11 – Cromatograma olanzapina 0,01 mg/mL obtido a um fluxo de 0,8 mL/min, com fase móvel constituída por tampão fosfato 0,01 mol/L pH 2,5 + acetonitrila 70:30 e detecção ultravioleta a 254 nm solubilizada em HCl 0,1 mol/L e diluída na própria fase móvel.....	79
Figura 12 – Cromatogramas solução padrão 100% (0,01mg/mL) de olanzapina (a) e solução placebo (b) resultados da análise da seletividade do método de doseamento por HPLC-UV utilizando tampão fosfato de potássio monobásico 0,01 mol/L pH 2,5 + acetonitrila (70:30) como fase móvel, fluxo de 0,8 mL/min, 254 nm e coluna Varian (150 x 4,6)mm, 5µm;.....	82
Figura 13 – Linearidade do método de doseamento de olanzapina por HPLC-UV Lote 1 (a), Lote 2 (b) e Lote 3 (c)	84
Figura 14 – Curva do perfil de dissolução resultada da média da quantificação por espectrofotometria – UV de 12 comprimidos de Zyprexa® 2,5 mg Lotes A416200 e A472325 em cada tempo de coleta utilizando o ácido clorídrico 0,1 mol/L como meio de dissolução	92
Figura 15 - Curva do perfil de dissolução resultada da média da quantificação por espectrofotometria – UV de 12 comprimidos de Zyprexa® 2,5 mg Lote A416200, de olanzapina 2,5 mg comprimidos revestidos Piloto Lote 01, de olanzapina 2,5 mg comprimidos (núcleo) Piloto Lote 02 e de olanzapina 2,5 mg comprimidos revestidos Piloto Lote 02 – A utilizando o ácido clorídrico 0,1 mol/L como meio de dissolução	94
Figura 16 - Curva do perfil de dissolução resultada da média da quantificação por espectrofotometria – UV de 12 comprimidos de Zyprexa® 2,5 mg Lote A416200, de olanzapina 2,5 mg comprimidos núcleo Piloto Lote 03 e de olanzapina 2,5 mg comprimidos revestidos Piloto Lote 03 utilizando o ácido clorídrico 0,1 mol/L como meio de dissolução	95
Figura 17 - Curva do perfil de dissolução resultada da média da quantificação por espectrofotometria – UV de 12 comprimidos de Zyprexa® 2,5 mg Lote A416200, de olanzapina 2,5 mg comprimidos revestidos Piloto Lote 04, de olanzapina 2,5 mg comprimidos núcleo Piloto Lote 05, de olanzapina 2,5 mg comprimidos revestidos Piloto Lote 05-A e de olanzapina 2,5 mg comprimidos revestidos Piloto Lote 05-B utilizando o ácido clorídrico 0,1 mol/L como meio de dissolução.....	97
Figura 18 - Curva do perfil de dissolução resultada da média da quantificação por espectrofotometria – UV de 12 comprimidos de Zyprexa® 2,5 mg Lote A416200, de olanzapina 5 mg comprimidos núcleo Piloto Lote 01 e de olanzapina 5 mg comprimidos revestidos Piloto Lote 01 utilizando o ácido clorídrico 0,1 mol/L como meio de dissolução.....	100
Figura 19 - Curva do perfil de dissolução resultada da média da quantificação por espectrofotometria – UV de 12 comprimidos de Zyprexa® 2,5 mg Lote A416200, de olanzapina 10 mg comprimidos núcleo Piloto Lote 01 e de olanzapina 10 mg comprimidos revestidos Piloto Lote 01 utilizando o ácido clorídrico 0,1 mol/L como meio de dissolução	102

Resumo

Moura, J. R. **Desenvolvimento e validação de metodologia analítica aplicável ao desenvolvimento farmacotécnico de comprimidos de olanzapina.** Goiânia, 2009. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Farmácia – Universidade Federal de Goiás.

A olanzapina é um fármaco antipsicótico e sua comercialização no Brasil, na forma de produto acabado, está protegida por patente até 2011. Como é recente no mercado farmacêutico e não há descrição da metodologia em formulários oficiais capazes de assegurar a qualidade das novas formulações, o objetivo deste trabalho foi caracterizar os parâmetros físico-químicos da olanzapina, desenvolver e validar, segundo RE N°899, de 29 de maio de 2003, método analítico para doseamento e dissolução e aplicar os métodos desenvolvidos e validados no desenvolvimento farmacotécnico dos comprimidos. Foram caracterizados alguns parâmetros físico-químicos, de solubilidade e de absorção da luz (200 a 400 nm) em diversos solventes e foram desenvolvidos e validados métodos de doseamento e dissolução por espectrofotometria com detecção ultravioleta (UV) e de doseamento por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção ultravioleta (HPLC-UV) para quantificação de olanzapina presente em comprimidos revestidos de 2,5, 5,0 e 10,0 mg. O fármaco apresentou baixa solubilidade em água e os comprimentos de onda de máxima absorção da luz ficaram entre 254 e 273 nm. Para o método de dissolução por espectrofotometria UV, os melhores parâmetros foram ácido clorídrico 0,1 mol/L como meio de dissolução, volume de 1.000 mL (5 e 10 mg de Olanzapina) e 500mL (2,5mg de Olanzapina), aparato II (pás) e rotação de 50rpm. Os parâmetros espectrofotométricos foram ácido clorídrico 0,1 mol/L como branco e 259nm de comprimento de onda. Para o método de doseamento por espectrofotometria UV foi utilizado como solvente e solução branco ácido clorídrico 0,1 mol/L e comprimento de onda de 259 nm. Foi utilizado cromatógrafo líquido de alta eficiência ProStar 210 UV/VIS VARIAN, coluna C18 (150x4,6) mm 5µm a temperatura ambiente (25°C), fluxo de 0,8mL/min, comprimento de onda de 254 nm e fase móvel constituída por uma mistura de tampão fosfato de potássio monobásico 0,01 mol/L pH 2,5 e acetonitrila (70:30) para o método de doseamento por HPLC-UV. Os resultados encontrados dos parâmetros de especificidade, linearidade, exatidão, precisão, limites de quantificação e detecção e estabilidade nas validações dos métodos confirmam que os mesmos foram adequados para a finalidade proposta. Os métodos desenvolvidos e validados foram aplicados na determinação de olanzapina em várias propostas de formulações que foram desenvolvidas e auxiliou a equipe de desenvolvimento farmacotécnico na definição da melhor formulação da olanzapina na concentração de 2,5mg.

Palavras Chaves: Olanzapina; HPLC; Desenvolvimento de Método; Validação.

Abstract

Moura, J. R. **Development and validation of an analytical methodology applicable to the pharmacotechnical development of olanzapine tablets.** Goiânia, 2009. Paper for Mastership title. Pharmacy College – Federal University of Goiás.

Olanzapine is an antipsychotic active ingredient and its marketing in Brazil, in the form of terminated product, is protected by patent up to 2011. As it is recent in the pharmaceutical market and there is not a methodology described in official forms that is capable of assuring the quality of new formulations, the objective of this paper was to characterize Olanzapine physical-chemical parameters, to develop and validate, in accordance with RE N°899, from May 29th 2003, the analytical methodology for assay and dissolution and to apply the developed and validated methodologies in the pharmacotechnical development of tablets. It was characterized some physical-chemical parameters of solubility and of light absorption (from 200 to 400nm) in several solvents and it was developed and validated assay and dissolution methodologies by spectrophotometry with ultraviolet detection (UV) and the assay by high efficiency liquid chromatography with ultraviolet detection (HPLC-UV) for the quantification of olanzapine present in film coated tablets of 2.5, 5.0 and 10.0mg. The active ingredient presented a low solubility in water and the wave lengths of maximum light absorption were within the range of 254 and 273nm. For the dissolution methodology by UV spectrophotometry, the parameters were chloride acid 0.1 mol/L as the dissolution media, volume of 1,000mL (5 and 10mg of Olanzapine) and 500mL (2.5mg of Olanzapine), apparatus II (paddles) and a rotation of 50 rpm. The spectrophotometric parameters were chloride acid 0.1 mol/L as blank and 259nm of wave length. For the assay methodology by UV spectrophotometry, it was used as a solvent and as a blank solution chloride acid 0.1 mol/L and a wave length of 259nm. It was used a ProStar 210 UV/VIS VARIAN high efficient liquid chromatographer, a C18 (150x4,6)mm 5µm column in room temperature (25°C), a flux of 0,8mL/min, a wave length of 254nm and a mobile phase constituted of a mixture of monobasic potassium phosphate buffer 0,01 mol/L pH 2,5 and acetonitrile (70:30) for the assay methodology by HPLC-UV. The results found from the parameters of specificity, linearity, accuracy, precision, quantification and detection limits and stability in the methodologies validations confirm that they were adequate for the purpose proposed. The methodologies developed and validated were applied in Olanzapine determination in several formulation propositions which have been developed and they assisted the pharmacotechnical development team in the definition of the best olanzapine formulation in the 2.5mg strength.

Key-words: Olanzapine; HPLC; Methodology Development; Validation.

1 INTRODUÇÃO

Com a introdução da norma NBR ISO/IEC 17025, utilizada para a certificação de laboratórios de ensaio, torna-se necessária a demonstração de que os métodos de análise utilizados em laboratórios sejam apropriados para uso e validados. Além disso, a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) ressalta a importância da qualidade analítica dos resultados como um dos instrumentos fundamentais para a proteção e promoção da saúde da população (ANVISA, 2004).

De acordo com o INMETRO (INMETRO, 2003), método analítico normalizado é aquele desenvolvido por um organismo de normalização ou outras organizações, e que são aceitos pelo setor técnico em questão. Estão nesse caso incluídas, todas as metodologias analíticas farmacopeicas. Os métodos analíticos não normalizados são aqueles desenvolvidos pelo próprio laboratório ou outras partes (por exemplo: pelo laboratório produtor do medicamento, laboratórios de pesquisa etc). De acordo com a Resolução - RE nº 899, de 29 de maio de 2003, no caso de metodologia analítica não descrita em farmacopéias ou formulários oficiais (métodos não normalizados) é necessário desenvolver e validar método analítico capaz de assegurar a qualidade do produto.

De forma geral, o desenvolvimento de metodologias analíticas para o controle de qualidade ou pesquisa de um produto farmacêutico envolve a avaliação de vários parâmetros, desde o preparo da amostra, separação cromatográfica, detecção e quantificação. Para isso é recomendado seguir as seguintes etapas:

- Levantamento bibliográfico sobre o assunto;
- Seleção e desenvolvimento do método;
- Validação do método.

Na etapa de levantamento bibliográfico, são pesquisadas informações da existência de algum método descrito na literatura, do conhecimento das substâncias relacionadas, da estabilidade, das propriedades físico-químicas do fármaco, dos possíveis produtos de degradação etc. Na etapa de seleção e desenvolvimento do método, buscam-se saber a aplicação do método, a matriz, solventes, concentração do fármaco, a instrumentação a ser utilizada, as condições analíticas, entre outros. Por último, o método selecionado deverá passar pelo processo de validação, de acordo com os parâmetros de especificidade e seletividade, linearidade, precisão, exatidão,

limites de detecção e quantificação e robustez, o que garantirá que o método seja realmente apropriado para o uso pretendido.

A olanzapina é um derivado tienobenzodiazepínico que possui afinidade principalmente pelos sítios de ligação dopaminérgicos (D1-D4) e serotoninérgicos, é um fármaco antipsicótico, utilizado no tratamento de distúrbios do humor e esquizofrenia. Está disponível no mercado farmacêutico nos medicamentos Zyprexa®, na forma farmacêutica de comprimidos revestidos com concentrações de 2,5, 5 e 10 mg, e Zyprexa Zidis® na forma de comprimidos orodispersíveis com concentrações de 5 e 10 mg, ambos fabricados pela empresa Eli Lilly.

Como não há descrição de metodologia analítica para comprimidos de olanzapina descrita em farmacopéia oficial e que, portanto, será necessário seguir metodologia desenvolvida e validada para subsidiar o desenvolvimento farmacotécnico, as análises de rotina de controle de qualidade e os estudos de equivalência farmacêutica e perfis de dissolução, esse trabalho foi inserido como parte de um projeto-mãe, que visa desde o desenvolvimento das formulações de comprimidos de olanzapina ao estudo de bioequivalência farmacêutica. Além disso, considerando que a olanzapina encontra-se ainda sob proteção patentária, até 2011, sendo recente no mercado farmacêutico mundial, serão necessários estudos quanto a sua caracterização e desenvolvimento de metodologia analítica capaz de assegurar a qualidade das formulações a serem desenvolvidas deste fármaco.

Sendo assim, a realização deste trabalho subsidiou e ainda subsidiará dados suficientes para garantir a qualidade de todo o processo produtivo. Os resultados servirão como método validado para controle de qualidade de produto final e para os estudos de equivalência farmacêutica, tanto das formulações em desenvolvimento, ao qual este está inserido, quanto para as formulações produzidas pelas indústrias farmacêuticas com o intuito de registro como medicamento genérico e/ou similar no Brasil.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Olanzapina

O desenvolvimento dos antipsicóticos representa um dos mais importantes avanços na história da psicofarmacologia e da psiquiatria. Atualmente, os esforços concentram-se na busca de antipsicóticos com menos efeitos extrapiramidais e que sejam eficazes no tratamento dos sintomas negativos da doença. Dentre os fármacos antipsicóticos disponíveis para tratamento, a olanzapina é o de primeira escolha para o tratamento de esquizofrenia e transtornos do humor, pois diminui tanto os sintomas positivos quanto os negativos e possui baixa incidência de efeitos extrapiramidais (SILVA, 2002; HOWLAND, 2006).

A olanzapina, cuja fórmula estrutural está representada na Figura 1, é um antipsicótico da classe dos tienobenzodiazepínicos que possui afinidade pelos sítios de ligação dopaminérgicos (D1-D4), serotoninérgicos, muscarínicos, adrenérgicos e histaminérgicos. Apresenta-se como um sólido cristalino amarelo. O seu nome químico é 2-metil-4-(4-metil-1-piperazinil)-10H-tieno[2,3-b][1,5] benzodiazepina. Apresenta fórmula molecular $C_{17}H_{20}N_4S$ e peso molecular de 312,439 g/mol. Está disponível no mercado farmacêutico nos medicamentos Zyprexa®, na forma farmacêutica de comprimidos revestidos com concentrações de 2,5, 5 e 10mg, e ZyprexaZidis® na forma de comprimidos orodispersíveis com concentrações de 5 e 10mg, ambos fabricados pela empresa Eli Lilly, sob proteção patentária até o ano de 2011 (MATERIAL SAFETY DATA SHEET, 2008).

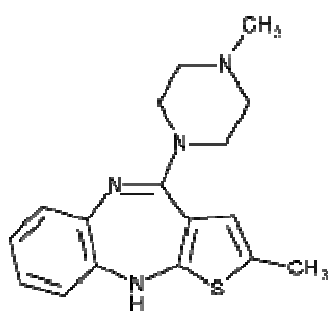


Figura 1 – Fórmula estrutural da olanzapina

A olanzapina é bem absorvida após administração oral, atingindo concentrações plasmáticas máximas dentro de 5 a 8 horas. A absorção não é afetada pelo alimento.

As concentrações plasmáticas de olanzapina foram lineares e proporcionais à dose em estudos clínicos nas doses de 1 a 20 mg. A olanzapina é metabolizada no fígado pelas vias conjugativa e oxidativa. O maior metabólito circulante é o 10-N-glucuronida, que não ultrapassa a barreira hemato-encefálica. As isoformas CYP1A2 e CYP2D6 do citocromo P450 contribuem para a formação dos metabólitos N-desmetil e 2-hidroximetil, ambos exibindo significativamente menor atividade farmacológica *in vivo* do que a olanzapina em estudos animais. A atividade farmacológica predominante é a da olanzapina original (CALLAGHAN, 1999; KAPLAN, 1997).

Após administração oral a indivíduos saudáveis, a meia-vida média de eliminação da olanzapina foi de 33 horas (21 a 54 h para o 5º a 95º percentil) e o *clearance* plasmático médio foi de 26 L/h (12 a 47 L/h para o 5º a 95º percentil). Aproximadamente 57% da olanzapina é excretada na urina, principalmente na forma de seus metabólitos. A ligação da olanzapina às proteínas plasmáticas foi cerca de 93% em uma faixa de concentração de 7 a 1000 ng/mL (BRODY, 2006).

A olanzapina é um fármaco antipsicótico com um perfil farmacológico amplo que atua em vários sistemas de receptores. Em estudos pré-clínicos, a olanzapina demonstrou afinidade pelos receptores de serotonina 5HT_{2A/C}, 5HT₃, 5HT₆; dopamina D₁, D₂, D₃, D₄, D₅; muscarínicos M₁₋₅; α ₁-adrenérgico e histamina H₁. Os estudos de comportamento em animais dos efeitos da olanzapina indicaram antagonismo aos receptores 5HT, dopaminérgicos e colinérgicos, consistente com o perfil de ligação a esses receptores. A olanzapina demonstrou maior afinidade *in vitro* ao receptor da serotonina 5HT₂, bem como maior atividade *in vivo*, comparada à afinidade e atividade para o receptor da dopamina D₂. Os estudos eletrofisiológicos demonstraram que a olanzapina reduziu seletivamente a ativação dos neurônios dopaminérgicos mesolímbicos (A₁₀), enquanto demonstrou pouco efeito sobre as vias estriatais (A₉) envolvidas na função motora. A olanzapina reduziu uma resposta condicionada de aversão, que é um teste indicativo de atividade antipsicótica, em doses abaixo das que produzem catalepsia, que é um efeito indicativo de efeitos motores adversos. Ao contrário de outros fármacos antipsicóticos, a olanzapina aumenta a resposta em um teste “ansiolítico” (MARKOWITZ, 2006).

2.2 Fundamentos das Técnicas Quantitativas de Análise

De acordo com a Resolução RE nº 310, “Guia para realização de estudo e elaboração do relatório de equivalência farmacêutica e perfil de dissolução”, o “medicamento deve cumprir em sua totalidade com os requisitos farmacopeicos da monografia individual, inscrita na Farmacopéia Brasileira. Na falta de monografia farmacopeica oficial, o estudo deve ser realizado utilizando-se método fornecido pela empresa solicitante, co-validado pelo laboratório executor do estudo, complementando-se com os ensaios descritos em métodos gerais da Farmacopéia Brasileira vigente.”

Como não há descrição de metodologia analítica para comprimidos de olanzapina em farmacopéia oficial será necessário seguir metodologia desenvolvida e validada para subsidiar o desenvolvimento farmacotécnico, as análises de rotina de controle de qualidade e os estudos de Equivalência Farmacêutica e Perfis de dissolução. As metodologias mais aplicadas atualmente envolvem técnicas de cromatografia (HPLC – do inglês, High Performance Liquid Chromatography, em português, Cromatografia Líquida de Alta Eficiência) e espectrofotometria de absorção no ultravioleta (UV).

2.2.1 Espectrometria de absorção no Ultravioleta/Visível (UV/VIS)

A espectrometria de absorção no UV/VIS é uma das ferramentas mais úteis e amplamente usadas para a análise quantitativa. Os métodos de espectrometria de absorção apresentam características que permitem uma ampla aplicação a sistemas orgânicos e inorgânicos, boa sensibilidade, seletividade moderada a alta, baixo custo, boa exatidão e facilidade e conveniência de aquisição de dados (SKOOG, 2002).

O fundamento do método de espectrofotometria UV/VIS, baseia-se no fato de que quando a energia eletromagnética luminosa atravessa uma solução, parte desta radiação é absorvida e o restante é transmitido. A radiação absorvida, por sua vez, depende da quantidade de moléculas presente e da estrutura destas moléculas (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988).

O estudo desta dependência juntamente com as peculiaridades da estrutura molecular das substâncias, caracteriza a espectrometria de absorção, e de acordo com a técnica, equipamentos e principalmente a frequência de energia eletromagnética

utilizada nessa técnica, enquadra-se regiões de luz ultravioleta, visível ou infravermelho. A frequência da radiação eletromagnética se propaga em forma de ondas que de acordo com o seu comprimento é determinado o tipo de espectrometria, conforme Quadro 1 (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988).

Tipo de espectrofotometria	Faixa de comprimento de onda
Ultravioleta distante	100 – 200 nm
Ultravioleta	200 – 380 nm
Visível	380 – 780 nm
Infravermelho (próximo)	780 – 3000 nm

Quadro 1 – Tipos de espectrofotometrias e relativos comprimentos de onda.

A análise espectrofotométrica quantitativa tem como princípio a relação proporcional existente entre a quantidade de luz absorvida e a concentração da solução da substância, Lei de Lambert-Beer. Considerada uma solução diluída de substância capaz de absorver luz de dado comprimento de onda em solvente transparente, verifica-se que o decréscimo na intensidade da luz ao atravessar a solução é diretamente proporcional à intensidade da radiação incidente, à concentração da substância absorvente e à espessura (distância percorrida pela luz na solução) (SKOOG, 2002).

As análises por espectrofotometria são realizadas por equipamentos chamados de espectrofotômetros, compostos fundamentalmente por:

- Fonte de luz (lâmpada de tungstênio para luz visível e de hidrogênio ou deutério para luz ultravioleta);
- Dispositivo monocrômador compreendendo filtro (colorímetros e espectrocolorímetros) ou dispersor de luz (prisma ou, mais frequentemente, grade de difração) equipado com seletor de comprimento de onda;
- Compartimento de cubetas, para inserção de soluções de amostras no feixe de luz monocromática;
- Fotodetector associado a conversor-amplificador e instrumento para medida da luz transmitida pela amostra (análogo ou digital).

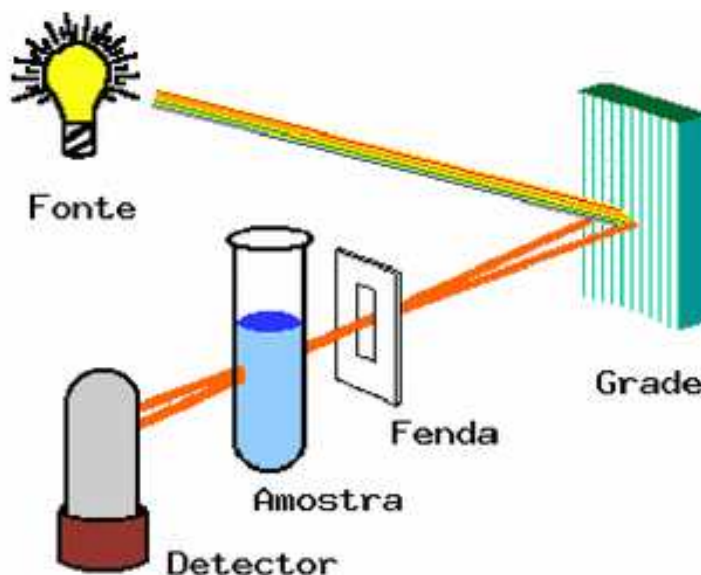


Figura 2 – Representação esquemática do funcionamento de um espectrofotômetro.

Fonte: disponível em http://www.c2o.pro.br/automacao/figuras/feixe_simples.png

As cubetas, recipientes que armazenam a amostra e o solvente, apresentam caminho óptico para passagem da luz incidente e transmitida de material transparente, normalmente quartzo ou sílica fundida, à radiação empregada. Na região do visível empregam-se cubetas de sílica enquanto o ultravioleta requer cubetas de quartzo. A qualidade de dados de absorbância depende fundamentalmente do modo como as cubetas são usadas. Impressões digitais, gordura ou outros depósitos nas paredes alteram significativamente as características de transmissão (SKOOG, 2002).

2.2.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) é uma técnica cromatográfica que utiliza como fase móvel um líquido e fase estacionária líquida ou sólida para separar os componentes de uma amostra, pela interação destes com a fase móvel. A grande variedade de combinações entre fases móveis e estacionárias torna-a uma técnica extremamente versátil e de grande aplicação (CASS; DEGANI, 2001).

A técnica HPLC faz análises mais rápidas com alta resolução e eficiência. Dependendo do detector pode atingir sensibilidade em nível de parte por bilhão (ppb), ou trilhão (ppt) (SKOOG, 2002).

Um sistema HPLC (Figura 3) consiste basicamente de: reservatório dos solventes, sistema de bombeamento da fase móvel, sistema de introdução de amostras (injetor), coluna cromatográfica, detector e registrador de dados (SKOOG, 2002).

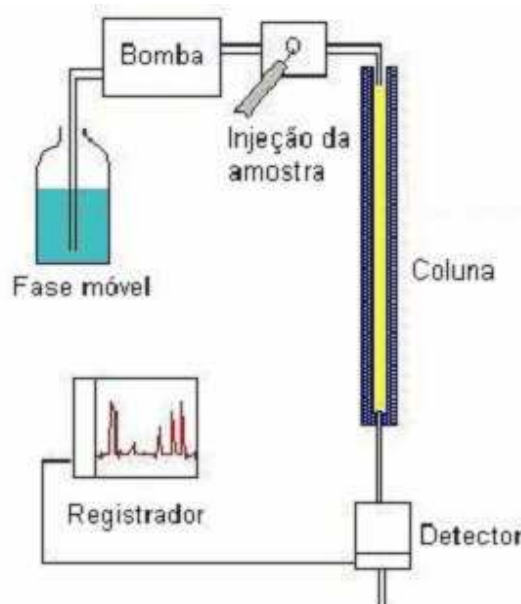


Figura 3 – Componentes de cromatógrafo líquido

Fonte: disponível em

<http://www.fcf.usp.br/Ensino/Graduacao/Disciplinas/Exclusivo/Inserir/Anexos/LinkAnexos/Resumo%20G6.pdf>

Com o desenvolvimento tecnológico, principalmente após os anos 60, houve a necessidade de fases estacionárias com tamanho de partículas extremamente pequenas, abaixo de 10 micrômetros. Assim houve o desenvolvimento de bombas para líquidos de alta precisão e exatidão para operações a pressões de 500 atm e baixas vazões (0,010 a 3 mL/ min) (SKOOG, 2002).

A fase móvel, formada por solventes encontrados nos reservatórios, é bombeada com o auxílio da bomba através do sistema de introdução das amostras até uma coluna cromatográfica, situada ou não dentro de um termostato. Nesta fase estacionária (coluna) efetua-se a separação dos componentes da mistura de acordo com a natureza da fase móvel, da fase estacionária e dos componentes analisados. A fase móvel sai da coluna e passa por um sistema de detecção, onde são detectadas alterações de alguma propriedade física específica. Esta variação é transformada num sinal elétrico, que é registrado e tratado matematicamente por um processador

conveniente. Um gráfico conhecido por cromatograma é obtido (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988).

Os equipamentos comumente apresentam bombas quaternárias, ou seja, a capacidade de bombear quatro solventes simultaneamente, em quantidades previamente determinadas e antes de chegar ao sistema de introdução de amostras os mesmos solventes são degaseificados pelo próprio equipamento. Entretanto todos reagentes e solventes da fase móvel são especiais com pureza e qualidade altas e antes de serem utilizados, principalmente os tampões preparados em laboratório, são filtrados á vácuo em membranas de 0,45 μ m (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988).

O sistema de introdução das amostras deve ser de preferência automatizado, de forma que as amostras preparadas sejam colocadas em frasco de borossilicato (vials) e o próprio aparelho toma uma quantidade conhecida da amostra e encaminha para o sistema analítico. Estes sistemas possuem a capacidade de amostrar centenas de vezes seqüencialmente, trazendo economia, precisão e exatidão a análise. Os vials contendo amostras são colocados em uma estante (rack) onde podem ser refrigerados ou aquecidos, de acordo com a necessidade da análise (United States Pharmacopoeia, 2008).

As colunas utilizadas podem ter diversos comprimentos, diâmetros, tamanho de partículas, e tipo de empacotamento. A mais utilizada é coluna com empacotamento C18 para realização da cromatografia em fase reversa. Termostatos para o compartimento de colunas podem ser utilizados para controlar a temperatura de trabalho das mesmas (ATIKINS, 2001).

Para a detecção do fármaco, os equipamentos utilizam com maior freqüência a técnica de espectrofotometria em ultravioleta (UV). Estes detectores geram sinais elétricos que são convertidos em cromatogramas por softwares especiais, instalados em computadores. Assim os equipamentos são controlados via computadores e todos os cálculos das análises são realizados pelos mesmos (ATIKINS, 2001).

Para a análise quantitativa, preparam-se soluções amostras e padrões conforme a monografia individual de cada fármaco e calcula-se a concentração conforme descrito na espectrometria, mas ao invés de absorbância obtêm-se a área obtida no gráfico (cromatograma) referente à substância.

2.3 Desenvolvimento de Metodologia Analítica

O desenvolvimento de metodologias analíticas requer a seleção de uma forma de análise e tipo de instrumentação a ser usada e, nesse estágio, são decididos vários parâmetros desde o preparo da amostra, separação cromatográfica, detecção e quantificação (SWARTZ *et al*, 1997).

Para desenvolver um método é necessário considerar as propriedades do analito de interesse realizando levantamento bibliográfico sobre o assunto. Nessa etapa, são pesquisadas informações em compêndios oficiais (Farmacopéias, Meck Index) nacionais e internacionais, em periódicos técnicos e científicos e em artigos científicos sobre a existência de algum método analítico do fármaco de interesse descrito em literatura (ver Quadro 2), do conhecimento das substâncias relacionadas, da estabilidade, das propriedades físico-químicas do fármaco, dos possíveis produtos de degradação etc. Após a reunião dessas informações, prossegue-se com a etapa de seleção e desenvolvimento do método na qual se busca saber a aplicação do método, a matriz, solventes, concentração do fármaco, a instrumentação a ser utilizada, as condições analíticas, entre outros. Também deve ser considerada a facilidade do uso do método, bem como o custo e a rapidez da análise que o mesmo proporciona (SWARTZ *et al*, 1997).

O método selecionado deverá passar pelo processo de validação, de acordo com os parâmetros de especificidade e seletividade, linearidade, precisão, exatidão, limites de detecção e quantificação e robustez, o que garantirá que o método seja realmente apropriado para o uso pretendido. Um método bem desenvolvido deve ser fácil de ser validado (BREAUX *et al*, 2003).

Matriz	Fase Estacionária	Fase Móvel	Detector	Referência
Plasma	Sperisorb S5W (150 mm × 4,6 mm; 5 µm)	Tampão acetato de amônia 50 mM pH 9,9 with água–metanol (15:85).	Ultravioleta, 270nm	Olesen <i>et al</i> , 1998
Plasma e urina	C18 (250 mm x 4,0 mm; 5 µm)	Tampão fosfato de amônia pH 2,5 e metanol (70:30)	Ultravioleta, 214nm	Boulton <i>et al</i> , 2001
Plasma	C8 (150 mm × 4,6 mm; 5 µm)	Metanol (30%) e a tampão fosfato (70%) pH 3,5.	Colorimétrico	Sabbioni <i>et al</i> , 2004
Plasma	C18 ODS Hypersil (250mm × 4,6 mm; 5 µm)	Acetonitrila–água–tetrametiletilenodiamina (37:62.6:0.4, v/v/v) pH 6,5	Ultravioleta, 254nm	Weigmann <i>et al</i> , 2001
Forma farmacêutica	C18 (150 mm x 6,0 mm; 5 µm)	Tampão fosfato pH 5,5 e acetonitrila (7:3 v/v).	Ultravioleta diodo-array detector 295nm	Biryol, 2003
Plasma	Water Spherisorb S5 C ₆ (250 mm x 4,6 mm)	Água-acetonitrila 55:45 vol/vol contendo 0,009 mol/L ácido heptanosulfonato de sódio e 0,06 mol/L fosfato de potássico monobásico pH 2,7	Ultravioleta, 254nm	D'Arrigo <i>et al</i> , 2006
Forma farmacêutica (Olanzapina e Fluoxetina)	C18 (250 mm x 4,0 mm; 5 µm)	Tampão fosfato de potássio 0,05M pH 5,6 e Acetonitrila (50 50, v/v)	Ultravioleta, 233nm	Shah <i>et al</i> , 2007
Forma farmacêutica	C18 (250 mm x 4,0 mm; 5 µm)	Tampão fosfato de amônia pH 2,5 e metanol (70:30)	Ultravioleta, 220nm	Rani <i>et al</i> , 2009
Forma farmacêutica	Intersil ODS (150 mm x 4,6 mm; 5 µm)	Acetato de amônia 0,25% pH 4,5 e acetonitrila 70:30	Ultravioleta, 271nm	Basavaiah <i>et al</i> , 2008

Quadro 2 - Técnicas de análise cromatográfica empregadas para a detecção e determinação qualitativa e quantitativa de olanzapina

2.4 Validação da Metodologia Analítica

Uma vez definida a metodologia analítica, a validação da mesma deverá ser efetuada de acordo com o “Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos”, Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003. A validação analítica deve garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados. Para a validação dos métodos são considerados dentre outros parâmetros: seletividade, curva de

calibração/linearidade, limite de quantificação e detecção, precisão, exatidão, robustez, reprodutibilidade e estabilidade. (ANVISA, 2003)

2.4.1 Seletividade

Para análise quantitativa, a seletividade é a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes como excipientes, impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz. Em muitas publicações seletividade e especificidade são frequentemente usadas aleatoriamente e permutavelmente. Por isso, existem debates sobre o uso da terminologia especificidade sobre a seletividade. Para constatar que o método é específico para uma dada substância deve-se atestar que somente a substância de interesse pode ser detectada não sendo possível a detecção de nenhuma outra. A seletividade verifica a capacidade do método de diferenciar compostos medindo exatamente a substância de interesse na presença de outras (CHAN *et al*, 2004).

Para a determinação da seletividade, o procedimento leva em consideração o preparo de amostras isentas do fármaco, contendo apenas os excipientes do medicamento (placebo), e solução padrão na concentração definida de trabalho, conforme a metodologia analítica desenvolvida. As análises das soluções padrão e placebo são realizadas utilizando o procedimento e condições analíticas propostas. Os resultados são comparados, avaliando se existe interferência dos excipientes na solução padrão (ANVISA, 2003).

2.4.2 Linearidade/Intervalo

A linearidade é a capacidade de um método analítico demonstrar que as respostas do aparelho analítico são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro do intervalo especificado. A linearidade é determinada pela análise de 5 (cinco) concentrações diferentes do padrão do fármaco. Estas concentrações são determinadas baseando-se no Quadro 3 e na finalidade da validação (ANVISA, 2003).

Ensaio	Alcance
Determinação quantitativa do analito em matérias-primas ou em formas farmacêuticas	De 80% a 120% da concentração teórica do teste
Determinação de impurezas	Do nível de impureza esperado até 120% do limite máximo especificado. Quando apresentarem importância toxicológica ou efeitos farmacológicos inesperados, os limites de quantificação e detecção devem ser adequados às quantidades de impurezas a serem controladas
Uniformidade de conteúdo	De 70% a 130% da concentração teórica do teste
Ensaio de dissolução	De $\pm 20\%$ sobre o valor especificado para o intervalo. Caso a especificação para a dissolução envolva mais que um tempo, o alcance do método deve incluir – 20% sobre o menor valor e + 20% sobre o maior valor.

Quadro 3 – Limites percentuais do teor do analito que devem estar contidos no intervalo de linearidade para alguns métodos analíticos

Havendo relação linear aparente após exame visual do gráfico, os resultados dos testes deverão ser tratados por métodos estatísticos apropriados para determinação do coeficiente de correlação (r), intersecção com o eixo y , coeficiente angular, soma residual dos quadrados mínimos da regressão linear e desvio padrão relativo. Se não houver relação linear, realizar transformação matemática. Como critério de aceitação, segundo a RE nº 899, 29 de maio de 2003, os resultados dos testes de linearidade serão avaliados de acordo com o valor do coeficiente de correlação, sendo o valor mínimo aceitável de 0,99.

2.4.3 Precisão

A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra. Determinando aqui a repetibilidade do método, com o mesmo analista e mesma instrumentação (precisão

intra-corrida). Determina-se também a precisão intermediária através de análises em dias diferentes com analistas diferentes (precisão intermediária, inter-corridas) (ERMER *et al*, 2005).

Para a determinação da precisão intermediária recomenda-se um mínimo de 2 dias diferentes com analistas diferentes. A precisão pode ser expressa como desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV%), segundo a fórmula,

$$DPR = \frac{DP}{CMD} \times 100$$

em que, DP é o desvio padrão e CMD, a concentração média determinada (ANVISA, 2003).

A repetibilidade do método é verificada por meio de quinze determinações, sendo três concentrações diferentes (baixa, média e alta) dentro da faixa de linearidade e cada concentração representada por cinco réplicas. O teste de precisão intermediária é avaliado por meio de três réplicas, sendo analisadas por analistas diferentes e em dias diferentes. Como critério de aceitação, segundo a RE nº 899, 29 de maio de 2003, o valor máximo aceitável deve ser definido de acordo com a metodologia empregada, a concentração do analito na amostra, o tipo de matriz e a finalidade do método, não se admitindo valores superiores a 5% para o DPR – Desvio Padrão Relativo (ANVISA, 2003).

2.4.4 Exatidão

A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro. É calculada como porcentagem de recuperação da quantidade conhecida do analito adicionado à amostra, ou como a diferença percentual entre as médias e o valor verdadeiro aceito, acrescida dos intervalos de confiança (ANVISA, 2003).

A exatidão do método deve ser determinada após o estabelecimento da linearidade, do intervalo linear e da seletividade do mesmo. É expressa pela relação

entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente:

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

A exatidão do método é verificada por meio de 9 amostras, sendo em três concentrações diferentes (baixa, média e alta) dentro da faixa de linearidade e cada concentração representada por 9 amostras. As amostras são preparadas a partir da solução placebo, sendo contaminada com concentração conhecida do analito (ANVISA, 2003). O teste de exatidão é avaliado por meio de três lotes, sendo estes lotes analisados em dias diferentes.

2.4.5 Limite de Detecção

Limite de detecção é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas (CHAN *et al*, 2004). Como procedimento deve-se preparar soluções de concentrações conhecidas e decrescentes do analito até que se obtenha menor nível detectável, que sejam confiáveis. Como critério de aceitação, segundo a RE nº 899, 29 de maio de 2003, no caso de métodos instrumentais (HPLC, GC, absorção atômica), a estimativa do limite de detecção pode ser feita com base na relação de 3 vezes o ruído da linha de base e para os métodos não instrumentais (CCD, titulação, comparação de cor) esta determinação pode ser feita visualmente, onde o limite de detecção é o menor valor de concentração capaz de produzir o efeito esperado (mudança de cor, turvação, etc).

2.4.6 Limite de Quantificação

O limite de quantificação é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas (CHAN *et al*, 2004).

O limite de quantificação é um parâmetro determinado, principalmente, para ensaios quantitativos de impurezas, produtos de degradação em fármacos e produtos de degradação em formas farmacêuticas e é expresso como concentração do analito (por exemplo, porcentagem p/p ou p/V, partes por milhão) na amostra. Como procedimento deve-se preparar soluções de concentrações conhecidas e decrescentes do analito até o menor nível determinável, com precisão e exatidão aceitáveis. Como critério de aceitação, segundo a RE nº 899, 29 de maio de 2003, a variação permitida para aprovação do limite de quantificação deve ter exatidão de 95 a 105% e precisão de $\pm 5,0\%$ (ANVISA, 2003).

2.4.7 Robustez

A robustez de um método analítico é a medida de sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos. Indica sua confiança durante o uso normal (ERMER *et al*, 2005).

Durante o desenvolvimento da metodologia, deve-se considerar a avaliação da robustez. Constatando-se a susceptibilidade do método as variações nas condições analíticas, estas deverão ser controladas e precauções devem ser incluídas no procedimento.

O Quadro 4 relaciona os principais parâmetros que podem resultar em avaliação na resposta do método.

Fontes	Variáveis
Preparo das Amostras	· Estabilidade das soluções analíticas · Tempo e condições de extração
Espectrofotometria	· Variação do pH da solução · Temperatura · Diferentes fabricantes de solventes
Cromatografia Líquida	· Variação do pH da fase móvel · Variação na composição da fase móvel · Diferentes lotes ou fabricantes de colunas
Cromatografia Gasosa	· Diferentes lotes ou fabricantes de colunas · Tipo do gás de arraste

Quadro 4 – Fatores que devem ser considerados na determinação da robustez do método analítico

Para avaliação da robustez é preparada uma solução padrão na concentração de trabalho 100% e mais nove amostras respeitando o intervalo linear proposto, ou seja, 3 (três) concentrações, baixa, média e alta, com 3 (três) réplicas cada. Como critério de aceitação, segundo a RE nº 899, 29 de maio de 2003, deve-se avaliar os resultados das seqüências quanto: precisão, exatidão. Para precisão, variação permitida de 5%. Para exatidão, variação permitida de 95,0 a 105,0% (ANVISA, 2003).

2.4.8 Estabilidade

O teste de estabilidade verifica as características físico-químicas dos analitos nas amostras solubilizadas até a realização da análise, detectando a formação de degradantes e subprodutos que possam interferir nos resultados analíticos.

Primeiramente, é preparada uma solução padrão que é submetida às condições a serem testadas como temperatura de refrigeração (2°C a 8°C), temperatura ambiente (25°C) e temperatura de aquecimento (35°C a 50°C) e posteriormente analisada. Em seguida, é preparada outra solução padrão para análise imediata. São comparados os resultados obtidos com a análise das duas soluções padrão, e verificado a estabilidade das amostras.

Como critério de aceitação, são consideradas estáveis, as amostras padrão submetidas às condições adversas que apresentam como resultado uma variação (%DPR) de no máximo 2% em relação ao resultado da leitura das amostras padrão recentes.

6 CONCLUSÕES

Como base nas condições experimentais e nos resultados obtidos pode-se concluir que:

- ❖ O comprimento de onda de máxima absorção da luz UV pela olanzapina está entre 250 e 260 nm. A olanzapina não absorve a luz em comprimento de onda maior que 300 nm.
- ❖ A matéria-prima utilizada de olanzapina é solúvel em metanol, etanol e acetonitrila e pouco solúvel em água.
- ❖ Os métodos desenvolvidos são considerados alternativos por não constarem nas edições atuais das Farmacopéias Brasileira, Americana, Britânica, Européia e em outros compêndios oficiais, e como tal, foram validados de acordo com a legislação em vigor, Resolução RE nº 899 de 29 de maio de 2003 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária.
- ❖ Os resultados obtidos mostram que os métodos de **doseamento e dissolução** por espectrofotometria UV-VIS e de **doseamento** por HPLC, atendem aos requisitos de Boas Práticas de Laboratório, pois apresentaram sensibilidade, reprodutibilidade, robustez, precisão, linearidade e finalmente a confiabilidade requerida para um método analítico, constituindo-se de alternativa analítica rápida, segura, prática, eficaz e de baixo custo.
- ❖ As indústrias farmacêuticas de todos os portes, laboratórios centrais e centros de equivalência farmacêutica ou outros laboratórios analíticos possuem opção de escolha dentre dois métodos de doseamento (quantificação por espectrofotometria – UV ou HPLC – UV) que foram validados e aplicados em diferentes formulações sem prejuízo dos resultados sendo portanto intercambiáveis. Com duas opções de método os analistas podem optar por aquele que julgar mais conveniente e que gerem resultados com a mesma confiabilidade analítica, porém por um prazo e custo reduzidos.

- ❖ Os métodos desenvolvidos e validados neste trabalho são aplicáveis para analisar comprimidos revestidos de olanzapina nas concentrações de 2,5, 5,0 e 10 mg.
- ❖ Os métodos desenvolvidos e validados foram aplicados com sucesso nas várias propostas de formulações de comprimidos (núcleos e revestidos) e auxiliou a equipe de desenvolvimento farmacotécnico na definição da melhor formulação da olanzapina na concentração de 2,5 mg.
- ❖ O método de dissolução com detecção por espectrofotometria UV-VIS foi capaz de evidenciar as várias diferenças entre as formulações piloto.
- ❖ Os comprimidos revestidos de olanzapina nas concentrações de 2,5 e 5,0 mg apresentam perfil de dissolução de liberação imediata, pois liberam mais que 85% de olanzapina presente nas formulações em até 15 minutos.
- ❖ O perfil de dissolução dos comprimidos revestidos de olanzapina na concentração de 10 mg mostrou-se diferente quando comparado ao medicamento referência de 2,5 mg. Diante disso, deverão ser desenvolvidas novas formulações de comprimidos revestidos de 10 mg objetivando um perfil de dissolução também de liberação imediata.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMIDON, G.L.; LENNERNÄS, H; SHAH, V.P.; CRISON, J.R. **A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of *in vitro* drug product dissolution and *in vivo* bioavailability.** Pharm. Res., New York, v. 12, n.3, 1995.

BASAVAIAH, K.; RANGACHAR; A., K., U.; THARPA, K. **Quantitative Determination of Olanzapine in Pharmaceutical Preparations by HPLC.** J. Mex. Chem. Soc., 52(2), 120-1248, Sociedad Química de México, 2008.

BIRYOL, I; ERK, N. **Voltammetric, Spectrophotometric, and High Performance Liquid Chromatographic Analysis of Olanzapine.** Analytical Letters, 1532-236X, Volume 36, Issue 11, 2497 – 2513, 2003.

BOULTON, DAVID; MARKOWITZ, JOHN. **A high-performance liquid chromatography assay with ultraviolet detection for olanzapine in human plasma and urine.** Int. Journal of Chromatography, v 759, Issue 2, p. 319-323, 2001.

BRASIL - Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA); **Guia para Qualidade em Química Analítica – Uma Assistência a Acreditação**, v. 1, 1. ed, Brasília, 2004.

BRASIL - Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA); Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003 **"Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos"**. Brasília, DF, 2003. Disponível em www.anvisa.gov.br.

BRASIL - Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO); DOQ-CGCRE-008 **Orientações sobre Validações de Métodos de Ensaio Químicos**. RJ, Brasil, 2003.

BREAUX, J.; JONES, K.; BOULAS, P. **Understanding and Implementing Efficient Analytical Methods Development and Validation**, Pharmaceutical Technology analytical Chemistry & Testing, 2003.

BRODY, THEODORE; MENNEMAN, KENNETH; WECKER, LYNN. **Farmacologia Humana**. Tradução da 4ª edição. Rio de Janeiro, p. 267 - 273, 2006.

CALLAGHAN, JOHN; BERGSTROM, RICHARD; PTAK LOUIS; BEASLEY, CHARLES. **Olanzapine Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Profile.** Clin. Pharmacokinet, 1999.

CASS, Q. B.; DEGANI, A. L. G. **Desenvolvimento de métodos por HPLC fundamentos, estratégias e validações.** São Carlos: EdUFSCar, 2001. 77p. (Série Aparentamentos).

CHAN, C., C.; LAM, H.; LEE, Y., C.; ZHANG, X. **Analytical method validation and instrument performance verification.** John Wiley e sons. New Jersey, USA, 2004.

D'ARRIGO, C.; MIGLIARDI, G.; SANTORO, V.; SPINA, E. **Determination of Olanzapine in Human Plasma by Reversed-phase High-performance Liquid Chromatography With Ultraviolet Detection.** Therapeutic Drug Monitoring: Volume 28 - Issue 3 - pp 388-393, 2006.

DUSCI, LEON; HACKETT, PETER; FELLOWS, LINDA. **Determination of olanzapine in plasma by high-permance liquid chromatography using ultraviolet absorbance detection.** Int. J. AOAC International, 2002.

ERMER, J.; MILLER, J.. **Method Validation in Pharmaceutical Analysis: a guide to Best practice,** Wiley-VCH, Alemanha, 2005.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4ªed. São Paulo: Editora Atheneu,1988.

HOWLAND, RICHARD; MYCEK, MARY. **Farmacologia Ilustrada.** 3ª edição. Porto Alegre, p. 149 -155, 2006.

KAPLAN, HAROLD; SADOCK, BENJAMIN; GREBB, JACK. **Compêndio de Psiquiatria: Ciências do comportamento e Psiquiatria clínica.** Tradução da 7ª edição. Porto Alegre, p. 493 – 543, 1997.

MARCOLONGO, RAQUEL – **Dissolução de medicamentos: fundamentos, aplicações, aspectos regulatórios e perspectivas na área farmacêutica.** São Paulo, 2003.

MARKOWITZ, JOHN; MALCOLM, ROBERT. **Pharmacokinetics of Olanzapine After Single-Dose Oral Administration of Standart Tablet Versus Normal and Sublingual Administration of na Orally Desintegrating Tablet in Normal Volunteers.** J. Clin. Pharmacol., 2006.

OLESEN, O.V.; LINNET, K. **Determination of olanzapine in serum by high-performance liquid chromatography using ultraviolet detection considering the easy oxidability of the compound and the presence of other psychotropic drugs.** Journal of chromatography B: Biomedical Sciences and Application. Volume 714, Issue 2, 4, 1998, Pages 309-315, 1998.

RANI P.; SEKARAN, B. **Development of HPLC method for the determination of olanzapine in bulk and dosage forms.** International Journal of PharmTech Research Vol.1, No.3, pp 654-657 , 2009.

POLLA, G.; VEJA, D.R.; LANZA, H.; TOMBARI, D.G.; BAGGIO, R.; AYALA, A.; FILHO, J.; FERNANDEZ, D.; LEYVA, G.; DARTAYET, G. **Thermal behaviour and stability in Olanzapine.** International Journal of Pharmaceutics. Volume 301, Issues 1-2. 2005.

PRODUCT INFORMATION: Zyprexa®, olanzapine. Eli Lilly & Co, 2008.

SABBIONI, C.; SARACINO M. A.; MANDRIOLIA R.; ALBERSB L.; BONCOMPAGNID, G.; RAGGI M. A. **Rapid analysis of olanzapine and desmethyloanzapine in human plasma using high-performance liquid chromatography with coulometric detection.** Analytica Chimica Acta. Volume 516, Issues 1-2, 111-117, 2004.

SILVA, PENILDON. **Farmacologia.** 6ª edição. Rio de Janeiro, p. 304 – 318, 2002.

SHAAH, C; SHAAH, N. **Simultaneous Assay of Olanzapine and Fluoxetine by column High-Performance Liquid Chromatography High-Performance Thin-Layer Chromatography.** Int. J. AOAC International v. 90, p. 1573-1578,2007.

SKOOG, DOUGLAS; HOLLER JAMES; NIEMAN TIMOTHY. **Princípios de Análise Instrumental**. 5ª edição. Porto Alegre, 2002.

SKOOG, DOUGLAS; WEST, D.M.; HOLLER JAMES; CROUCH, S.R., **Fundamentos de Química Analítica**, Pioneira Thomson Learning, São Paulo, 2006.

SKOUG, J. W.; HASLSTEAD, G.W.; THEIS, D. L.; FREEMAN, J. E.; FAGAM, D. T.; ROHRS, B. R. **Roteiro para o desenvolvimento e validação do teste de dissolução em formas farmacêuticas sólidas para uso oral**. Pharm. Technol., New York, v. 1, p. 34-43, 1997.

STORPIRTIS, S; OLIVEIRA, P.G.; RODRIGUES, D.; MARANHO, D.; **Considerações biofarmacotecnicas relevantes na fabricação de medicamentos genéricos: fatores que afetam a dissolução e a absorção de fármacos**. Rev. Bras. Cien. Farm., São Paulo, v. 35, n. 1, p 1-16, 1999c.

SWARTZ, M. E., KRULL, I. S. **Analytical Method Development and Validation**. New York, 1997).

UNITED STATES PHARMACOPEIA – 31 ed., Rockville: The United States Pharmacopeial Convention, 2008.

WEIGMANN, H.; HÄRTTERA, S.; MAEHRLEINB, S.; KIEFERB, W.; KRÄMERB, G.; DANNHARDTB, G.; HIEMKE, C. **Simultaneous determination of olanzapine, clozapine and demethylated metabolites in serum by on-line column-switching high-performance liquid chromatography**. Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications. Volume 759, Issue 1, 63-71, 2001.