



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
*Pró-Reitoria de Pós-Graduação*  
COORDENAÇÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA



**ZENAIDE SEVERINA DO MONTE**

*Desenvolvimento de um Novo Método para Controle  
de Qualidade do Cloridrato de Paroxetina e do  
Cloridrato de Biperideno por Dicroísmo Circular*

RECIFE  
2012

ZENAIDE SEVERINA DO MONTE

*Desenvolvimento de um Novo Método para Controle  
de Qualidade do Cloridrato de Paroxetina e do  
Cloridrato de Biperideno por Dicroísmo Circular*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de mestre em química.

Orientador: Prof. Dr. Clécio Souza Ramos

RECIFE  
2012

## FICHA CATALOGRÁFICA

M772d Monte, Zenaide Severina do  
Desenvolvimento de um Novo Método para Controle de  
Qualidade do Cloridrato de Paroxetina e do Cloridrato de  
Biperideno por Dicroísmo Circular / Zenaide Severina do  
Monte. -- 2012.  
108 f.: il.

Orientador: Clécio Souza Ramos.  
Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade  
Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Química,  
Recife, 2012.

Inclui referências, anexo e apêndice.

1. Cloridrato de biperideno 2. Cloridrato de paroxetina  
3. Dicroísmo circular 4. Drogas quirais 5 Controle de  
qualidade I. Ramos, Clécio Souza, orientador II. Título

CDD 540

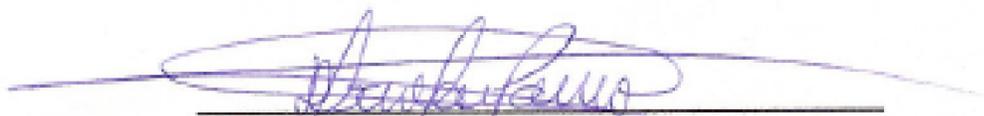
**AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO PARCIAL OU TOTAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVÊNACIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS ACADÊMICOS E CIENTÍFICOS, DESDE QUE CITADA A FONTE.**

**ZENAIDE SEVERINA DO MONTE**

***Desenvolvimento de um Novo Método para Controle de  
Qualidade do Cloridrato de Paroxetina e do Cloridrato de  
Biperideno por Dicroísmo Circular***

Esta dissertação foi aprovada em 24/02/12 pelo Programa de Pós-Graduação em Química.

**BANCA EXAMINADORA**



**Prof. Dr. Clécio Souza Ramos (DCM - UFRPE)**

**Orientador**



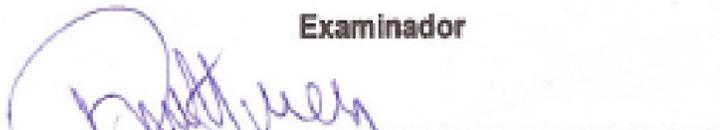
**Prof. Dr. João Rufino de Freitas Filho (DCM - UFRPE)**

**Examinador**



**Prof. Dr. André Fernando Lavorante (DCM - UFRPE)**

**Examinador**



**Prof. Dr. Roberto de Vasconcelos Antunes (DCM - UFRPE)**

**Examinador**

*Dedico este trabalho a Deus, a  
minha família, em especial a  
minha mãe, Sr<sup>a</sup> Zenaide  
Hortência de Souza, que  
sempre compreende e apóia  
minha filosofia de vida.*

## Liberdade

Ai que prazer  
Não cumprir um dever,  
Ter um livro para ler  
E não o fazer!  
Ler é maçada,  
Estudar é nada.  
O sol doira  
Sem literatura.  
O rio corre, bem ou mal,  
Sem edição original.  
E a brisa, essa,  
De tão naturalmente matinal,  
Como tem tempo não tem pressa...

Livros são papéis pintados com tinta.  
Estudar é uma coisa em que está indistinta  
A distinção entre nada e coisa nenhuma.

Quanto é melhor, quanto há bruma,  
Esperar por D. Sebastião,  
Quer venha ou não!

Grande é a poesia, a bondade e as danças...  
Mas o melhor do mundo são as crianças,  
Flores, música, o luar, e o sol, que peca  
Só quando, em vez de criar, seca.

O mais que isto  
É Jesus Cristo,  
Que não sabia nada de finanças  
Nem consta que tivesse biblioteca...

*Fernando Pessoa*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus, por fortalecer-me e orientar-me no decorrer da minha vida oferecendo-me conforto e alimento ao espírito.

Agradeço a minha mãe que sempre me apóia e está comigo nas decisões que tomo sem a qual não poderia continuar trilhando meus caminhos. Agradeço também a todos os meus parentes que acreditam no meu potencial.

Ao professor e orientador: Clécio Souza Ramos agradeço a contribuição no enriquecimento da minha vida profissional.

Agradeço aos meus amigos que, estiveram comigo na vivência acadêmica.

A todos os professores do Mestrado, especialmente os professores aos que contribuíram no enriquecimento do conhecimento. Em especial meu agradecimento ao coordenando do programa de pós-graduação em química o prof. Dr. Celso de Amorim Câmara.

À Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco – FACEPE pela bolsa concedida.

Aos Laboratórios: Centro de apoio a pesquisa – CENAPESQ e Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste – CETENE.

## RESUMO

O presente trabalho descreve a análise qualitativa e quantitativa por dicroísmo circular (DC) do cloridrato de paroxetina e a análise qualitativa do cloridrato de biperideno. Foi desenvolvido um método simples, rápida, que faz uso da absorção diferenciada da luz circularmente polarizada a direita e a esquerda para a qualificação e quantificação da matéria-prima e os fármacos citados anteriormente empregando a técnica por dicroísmo circular. O desenvolvimento do método seguiu os critérios das normas vigentes e recomendadas pela ANVISA e ICH. O cloridrato de paroxetina e o cloridrato de biperideno são drogas quirais, que pode ser utilizadas para o tratamento da depressão e de parkinson, respectivamente. A paroxetina (PRX), um fármaco quiral, apresenta dois carbonos estereogênicos em sua estrutura química. A PRX, foi dissolvida em água ultrapura a concentração de  $5,47 \cdot 10^{-4} \text{ molL}^{-1}$  para análise em DC. O seu espectro apresentou um Efeito Cotton intenso e negativo em  $-37,4653 \text{ mdeg}$ . A curva da solução de referência apresentou um coeficiente de correlação de 0,9907 para o intervalo de concentração de  $0,91 \cdot 10^{-4}$  a  $5,47 \cdot 10^{-4} \text{ molL}^{-1}$ . Os limites de detecção e quantificação foram de  $0,197 \cdot 10^{-4}$  e de  $0,656 \cdot 10^{-4} \text{ molL}^{-1}$ , respectivamente. A repetitividade e precisão intermediária apresentaram variancia média 1,32. A exatidão apresentou resultados bons para o intervalo de confiança de 95%. The study recovery averaged 94.5%. The method is robust to variations in sample volume and the gas flow and the samples were stable to temperature variations. O método foi seletivo para quantificação do fármaco avaliando a interferência dos excipientes. As análises com o biperideno, uma substância que tem quatro centros quirais, foram realizadas com o padrão secundário BPR e com o fármaco por DC nas concentrações molares de  $3,21 \cdot 10^{-3}$  e de  $3,21 \cdot 10^{-4}$  respectivamente. As amostras apresentaram EC negativos, assim como no BPR padrão primário da USP. O espectro obtido por cálculo teórico apresentou um Efeito Cotton positivo para um dos enantiômeros do BPR. Esses resultados indicam que um dos enantiômeros do BPR pode está em excesso ou que a substância está pura ou ainda que existem impurezas quirais.

Palavras-Chave: Cloridrato de biperideno, Cloridrato de paroxetina, Dicroísmo circular, Drogas quirais, Controle de qualidade.

## ABSTRACT

This paper describes the qualitative and quantitative analysis by circular dichroism (CD) of paroxetine hydrochloride and qualitative analysis of biperiden hydrochloride. It was developed the method a simple, rapid, which uses the differential absorption of circularly polarized light right and left environment for the qualification and quantification of raw materials the drugs mentioned above using the technique by circular dichroism. The method developed followed the criteria of rules and recommended by ANVISA and ICH. The paroxetine hydrochloride and biperiden hydrochloride are chiral drug that can be used for the treatment of depression and Parkinson's, respectively. Paroxetine (PRX), a chiral drug, has two stereogenic carbon atoms in its chemical structure. The PRX, was dissolved in ultrapure water concentration  $5,47 \cdot 10^{-4} \text{ molL}^{-1}$  DC analysis. Their spectrum showed an intense negative Cotton effect in mdeg -37.4653. The standard curve the solution of reference a correlation coefficient of 0.9907 for the concentration range of the  $0,91 \cdot 10^{-4} / 5,47 \cdot 10^{-4} \text{ molL}^{-1}$ . The limits of detection and quantification were  $0,197 \cdot 10^{-4}$  and  $0,656 \cdot 10^{-4} \text{ molL}^{-1}$ , respectively. The repeatability and precision intermediate had variance of 1.32. The results showed good accuracy for interval of 95%. The study showed that the recovery of the extraction method of PRX the drug was effective. The method is robust and the samples were stable to temperature variations. The method was selective for quantification of the drug by evaluating the interference of the excipients. Analyses with biperiden, a substance which has four chiral centers, were performed with the secondary standard BPR and the drug by the DC of molar concentrations  $3,21 \cdot 10^{-3}$  and  $3,21 \cdot 10^{-4}$  respectively. The samples had EC negative as well as the primary standard USP BPR. The spectrum obtained by theoretical calculation showed a positive Cotton effect of the enantiomers of BPR. These results indicate that one of the enantiomers can BPR is in excess or that the substance is pure or impurities which are chiral.

**Keywords:** Biperiden hydrochloride, Paroxetine hydrochloride, Circular dichroism, Chiral drugs, Quality control.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	A estrutura do enantiômero da ( <i>S</i> ) - talidomida efeito teratogênico	25
FIGURA 2	A estrutura do enantiômero da paroxetina biologicamente ativo	30
FIGURA 3	As estruturas para um par de enantiômeros do biperideno biologicamente ativo	31
FIGURA 4	Luz plano polarizada: campo elétrico (E) em função do tempo (t)	42
FIGURA 5	Efeito do dicroísmo circular sobre as componentes circularmente polarizadas <i>ER</i> e <i>EL</i> . (5A) Componentes circularmente polarizadas de mesma amplitude que, quando combinadas com componentes de magnitudes diferentes, resultam em uma luz elipticamente polarizada(5B)	42
FIGURA 6	Elipcidade [ ] tangente obtida pela razão do menor e do maior eixo da elipse	43
FIGURA 7	Ilustração do equipamento de dicroísmo circular	44
FIGURA 8	Fluxograma das etapas do desenvolvimento da pesquisa	48
FIGURA 9	Imagem do espectropolarímetro Jasco J-815	51
FIGURA 10	Espectro de dicroísmo circular do sal da cânfora em água ultrapura. Em 198 nm; 190,4 mdeg e 291 nm; 79,10 mdeg	51
FIGURA 11	Esquema das diluições sucessivas a partir da solução estoque da PRX a $5,47 \cdot 10^{-4} \text{ molL}^{-1}$	54
FIGURA 12	Estruturas tridimensionais para o cloridrato de paroxetina	61
FIGURA 13	Espectro de ultravioleta da paroxetina em água ultrapura, concentração de $2,73 \cdot 10^{-4} \text{ molL}^{-1}$ , em cubeta de 10 mm	62
FIGURA 14	Espectro de dicroísmo circular da paroxetina em diclorometano na concentração de $5,47 \cdot 10^{-4} \text{ molL}^{-1}$ , em cubeta de 0,2 mm	63
FIGURA 15	Espectro de dicroísmo circular da paroxetina em dimetilformamida na concentração de $5,47 \cdot 10^{-4} \text{ molL}^{-1}$ , em	63

cubeta de 0,2 mm

- FIGURA 16 Espectro de dicroísmo circular da paroxetina em 64  
dimetilsulfóxido na concentração de  $5,47 \cdot 10^{-4} \text{ molL}^{-1}$ , em  
cubeta de 0,2 mm
- FIGURA 17 Espectro de dicroísmo circular da paroxetina em metanol na 64  
concentração de  $5,47 \cdot 10^{-4} \text{ molL}^{-1}$ , em cubeta de 0,2 mm
- FIGURA 18 Espectro de dicroísmo circular da paroxetina em água 65  
ultrapura na concentração de  $5,47 \cdot 10^{-4} \text{ molL}^{-1}$ , em cubeta de  
10 mm
- FIGURA 19 Espectros de dicroísmo circular da paroxetina em água 66  
ultrapura na concentração de  $5,47 \cdot 10^{-4} \text{ molL}^{-1}$  e do solvente,  
água ultrapura, em cubeta de 10 mm
- FIGURA 20 Espectro de dicroísmo circular da mistura dos excipientes em 67  
água ultrapura no intervalo de comprimento de onda de 400 a  
190 nm
- FIGURA 21 Espectros de dicroísmo circular da paroxetina em água 68  
ultrapura no intervalo de  $5,47 \cdot 10^{-4}$  a  $0,91 \cdot 10^{-4} \text{ molL}^{-1}$ , em  
cubeta de 10 mm
- FIGURA 22 Representação das curvas das soluções de referência da 69  
paroxetina em água ultrapura no intervalo de concentração de  
 $0,91 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$  a  $5,47 \cdot 10^{-4} \text{ molL}^{-1}$ , medidas no de 218 nm
- FIGURA 23 Espectros sobrepostos de todas as análises por dicroísmo 70  
circular da paroxetina em água ultrapura no intervalo de  
 $5,47 \cdot 10^{-4}$  a  $0,91 \cdot 10^{-4}$ , cubeta de 10 mm
- FIGURA 24 Representação gráfica da curva da solução de referência da 71  
paroxetina em água ultrapura, medidos no de 218nm por  
dicroísmo circular. Equação da reta:  $y = -3,93x - 16,613$  e o  $r^2$   
0,9907
- FIGURA 25 Espectros de dicroísmo circular do padrão secundário da 71  
paroxetina em água ultrapura no intervalo de de 400 a 190  
nm, em cubeta de 10 mm
- FIGURA 26 Espectros de dicroísmo circular da paroxetina extraída do 77  
fármaco cloridrato de paroxetina em água ultrapura e do

	padrão secundário da paroxetina na concentração de $5,47 \cdot 10^{-4}$ molL <sup>-1</sup> , em cubeta de 0,2 m	
FIGURA 27	Espectro de ultravioleta do biperideno em água ultrapura. Concentração de $3,21 \cdot 10^{-4}$ molL <sup>-1</sup> , em cubeta de 10 mm	78
FIGURA 28	Espectro de ultravioleta do biperideno obtido por cálculo teórico	78
FIGURA 29	Espectro de dicroísmo do biperideno em diclorometano na concentração de $2,73 \cdot 10^{-4}$ molL <sup>-1</sup> , em cubeta de 0,2 mm	79
FIGURA 30	Espectro de dicroísmo do biperideno em dimetilformamida na concentração de $2,73 \cdot 10^{-4}$ molL <sup>-1</sup> , em cubeta de 0,2 mm	79
FIGURA 31	Espectro de dicroísmo do biperideno em dimetilsulfóxido na concentração de $2,73 \cdot 10^{-4}$ molL <sup>-1</sup> , em cubeta de 0,2 mm	80
FIGURA 32	Espectro de dicroísmo do biperideno em metanol na concentração de $2,73 \cdot 10^{-4}$ molL <sup>-1</sup> , em cubeta de 0,2 mm	80
FIGURA 33	Espectro de dicroísmo do biperideno em água ultrapura na concentração de $2,73 \cdot 10^{-3}$ molL <sup>-1</sup> , em cubeta de 0,2 mm	81
FIGURA 34	Estruturas tridimensionais para o cloridrato de biperideno	81
FIGURA 35	Espectro de dicroísmo circular do padrão primário do biperideno da USP em metanol	82
FIGURA 36	Espectro de dicroísmo circular biperideno obtido por calculo teórico	83
FIGURA 37	Espectro de dicroísmo circular do cloridrato de biperideno extraído do fármaco em água ultrapura, na concentração de $2,73 \cdot 10^{-3}$ molL <sup>-1</sup> , em cubeta de 0,2 mm	84
FIGURA 38	Espectro de ultravioleta do biperideno em água ultrapura das soluções usadas para obter a curva da solução de referência nas concentrações molares de $3,21 \cdot 10^{-4}$ a $0,321 \cdot 10^{-4}$ , medidas no de 263 nm	85
FIGURA 39	Espectro de UV na faixa de 190 – 400 nm do biperideno obtido para o fármaco	85
FIGURA 40	Representação gráfica da curva da solução de referência construída com biperideno, medidas no de 230 nm por UV. A equação de reta: $y = 2,684x + 0,024$ e $r^2 = 0,999$	86

## LISTA DE QUADROS

QUADRO 1	Diferenças farmacocinéticas e farmacodinâmicas de alguns fármacos quirais com atividade biológica exercidas por formas enantioméricas puras.	27
QUADRO 2	Concentrações da paroxetina, padrão secundário, selecionados para construção da curva da solução de referência	67
QUADRO 3	Concentrações do biperideno, padrão secundário, selecionados para construção da curva da solução de referência	86

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Critérios para o desenvolvimento de métodos analíticos	33
TABELA 2	Parâmetros empregados no método quantitativo	34
TABELA 3	Limites percentuais do teor do analito que devem estar contidos no intervalo de linearidade para alguns métodos analíticos	37
TABELA 4	Os comprimentos de ondas, as concentrações das amostras, as transições eletrônicas de alguns cromóforos em função das cubetas	41
TABELA 5	Resultados das curvas das soluções de referência obtidas para a paroxetina em água ultrapura	69
TABELA 6	Valores dos ângulos da média das 10 leituras, cada uma obtida pela média de 5 acumulações e em cada um dos 6 pontos da curva da solução de referência para a paroxetina, medidas no 218 nm	70
TABELA 7	Resultado da repetitividade nas concentrações experimentais para paroxetina em água ultrapura	73
TABELA 8	Resultado da precisão intermediária nas concentrações experimentais para paroxetina em água ultrapura	73
TABELA 9	Resultado da exatidão nas concentrações experimentais para a paroxetina em água ultrapura. $t_{95\%(n-1)} = 2,045$	74
TABELA 10	Resultados das análises das amostras adicionadas e não adicionadas do padrão secundário da paroxetina em água ultrapura obtidos por DC	75

## LISTA DE EQUAÇÕES

EQUAÇÃO 1	Regressão linear	35
EQUAÇÃO 2	Limite de detecção	36
EQUAÇÃO 3	Limite de quantificação	36
EQUAÇÃO 4	Desvio padrão relativo	38
EQUAÇÃO 5	Coefficiente de variação	38
EQUAÇÃO 6	Cálculo da recuperação	38
EQUAÇÃO 7	Diferença da absorvidade molar	43
EQUAÇÃO 8	Elipticidade molar	43
EQUAÇÃO 9	Tangente de	43
EQUAÇÃO 10	Teste F	55
EQUAÇÃO 11	Teste $t$	56
EQUAÇÃO 12	Cálculo da absorvidade	62
EQUAÇÃO 13	Teor de biperideno	85

## LISTA DE ANEXOS

ANEXO A	A Monografia completa da EP-5.0 da paroxetina	88
ANEXO B	A monografia completa da EP-5.0 do biperideno	94

## LISTA DE APÊNDICES

ANEXO A	Espectros de dicroísmo circular dos solventes: água ultrapura, metanol, diclorometano, dimetilformamida e dimetilsulfóxido	99
ANEXO B	Espectro de ultravioleta do solvente água ultrapura	101

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

BPR – Biperideno

PRX – Paroxetina

CG – Cromatografia gasosa

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

WHO – *World Health Organization*

INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ICH – Conferência Internacional de Harmonização

CT – Concentração teórica

CMAAP – Concentração média da amostra adicionada do padrão secundário

CMANAP – Concentração média da amostra não adicionada do padrão

CD – *Circular dichroism*

DC – Dicroísmo Circular

DCM – Diclorometano

DMF – Dimetilformamida

DMSO – Dimetilsulfóxido

RL – sentido horário

EL – sentido anti-horário

EDC – Espectro de Dicroísmo Circular

EC – Efeito Cotton

mdeg – Milidegre

RE – Resolução

RDC – Resolução de Diretoria Colegiada

EP – Farmacopéia européia

= – Igual

– Diferente

– Menor ou igual

– maior ou igual

% – Porcentagem

E – Exatidão

R – Recuperação

n – número de amostra

$S^2$  – Variância

CV – Coeficiente de variação

PA – Alta pureza

HCl – Ácido clorídrico

rpm – Rotações por minuto

RSD – Desvio padrão relativo

s – Desvio padrão absoluto

S – Desvio padrão

UV– Ultravioleta

UV-Vis – Ultravioleta, visível

USP – Farmacopéia americana

– Média aritmética

= absorbitividade molar

l = caminho óptico em

c = concentração

$r^2$  – Coeficiente de correlação

– Diferença na absorbitividade molar

$\epsilon_L$  – Coeficientes de extinção molar para esquerda

$\epsilon_D$  – Coeficientes de extinção molar para direita

– Elipticidade molar

tg – Tangente de Teta

– Comprimento de onda

LD – Limite de detecção

LQ – Limite de quantificação

Abs (A) – Absorbância do biperideno amostra

Abs (P) – Absorbância do biperideno padrão de referência

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>25</b>
<b>1.1</b>	<b><i>Fármacos quirais</i></b>	<b>25</b>
<b>1.2</b>	<b><i>Doenças que atinge a população da terceira idade</i></b>	<b>28</b>
<b>1.2.1</b>	<b><i>Depressão</i></b>	<b>28</b>
<b>1.2.1.1</b>	<b><i>Paroxetina</i></b>	<b>29</b>
<b>1.2.2</b>	<b><i>Doença de Parkinson</i></b>	<b>30</b>
<b>1.2.2.1</b>	<b><i>Biperideno</i></b>	<b>31</b>
<b>1.3</b>	<b><i>Desenvolvimento de método analítico</i></b>	<b>32</b>
<b>1.3.1</b>	<b><i>Seletividade e especificidade</i></b>	<b>34</b>
<b>1.3.2</b>	<b><i>Linearidade</i></b>	<b>35</b>
<b>1.3.3</b>	<b><i>Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)</i></b>	<b>35</b>
<b>1.3.4</b>	<b><i>Intervalo</i></b>	<b>37</b>
<b>1.3.5</b>	<b><i>Repetitividade e Precisão intermediária</i></b>	<b>37</b>
<b>1.3.6</b>	<b><i>Exatidão</i></b>	<b>38</b>
<b>1.3.6.1</b>	<b><i>Recuperação</i></b>	<b>38</b>
<b>1.3.7</b>	<b><i>Robustez</i></b>	<b>39</b>
<b>1.4</b>	<b><i>Estabilidades das amostras</i></b>	<b>39</b>
<b>1.5</b>	<b><i>Dicroísmo circular</i></b>	<b>39</b>

1.5.1	<i>Descrições e características do equipamento dicróismo circular</i>	44
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>46</b>
2.1	<i>Objetivo geral</i>	46
2.2	<i>Objetivos específicos</i>	46
<b>3</b>	<b>EXPERIMENTAL</b>	<b>47</b>
3.1	<i>Padrões secundários e fármacos</i>	49
3.2	<i>Solventes e vidrarias</i>	49
3.3	<i>Equipamentos e softwares</i>	50
3.4	<i>Biperideno HCl padrão primário</i>	50
3.5	<i>Primeira etapa: Desenvolvimento do método para as análises da paroxetina</i>	50
3.6	<i>Análise do padrão secundário da paroxetina por ultravioleta</i>	51
3.6.1	<i>Preparação da amostra da paroxetina para análise por ultravioleta</i>	52
3.7	<i>Análise da resolução e da razão sinal/ruído do cromóforo da paroxetina por DC</i>	52
3.7.1	<i>Preparação da amostra do padrão secundário da paroxetina</i>	52
3.8	<i>Parâmetros avaliados para o desenvolvimento do método analítico por dicróismo circular</i>	52

<i>3.8.1</i>	<i>Seletividade e especificidade</i>	53
<i>3.8.2</i>	<i>Linearidade</i>	54
<i>3.8.3</i>	<i>Limite de quantificação e detecção</i>	54
<i>3.8.4</i>	<i>Intervalo</i>	55
<i>3.8.5</i>	<i>Precisão</i>	55
<i>3.8.5.1</i>	<i>Repetitividade</i>	55
<i>3.8.5.2</i>	<i>Precisão intermediária</i>	56
<i>3.8.6</i>	<i>Exatidão</i>	56
<i>3.8.6.1</i>	<i>Recuperação</i>	56
<i>3.8.7</i>	<i>Robustez</i>	57
<i>3.8.7.1</i>	<i>Variação do scan e da vazão do gás</i>	57
<i>3.8.7.2</i>	<i>Análises de diferentes volumes da amostra</i>	57
<b>3.9</b>	<b><i>Estabilidades das amostras analisadas por DC</i></b>	<b>57</b>
<b>3.10</b>	<b><i>Extração da paroxetina HCl do fármaco</i></b>	<b>57</b>
<b>3.11</b>	<b><i>Análise por DC da paroxetina HCl do fármaco</i></b>	<b>58</b>
<b>3.12</b>	<b><i>Segunda etapa: Desenvolvimento do método para as análises do biperideno</i></b>	<b>58</b>
<i>3.12.1</i>	<i>Análise das amostras do biperideno padrão secundário por ultravioleta</i>	58
<i>3.12.2</i>	<i>Preparação da amostra do biperideno para análise por ultravioleta</i>	59

3.13	<i>Análise da resolução e da razão do sinal/ruído dos cromóforos do BPR obtidos por DC</i>	59
3.14	<i>Análise do biperideno padrão secundário por DC</i>	59
3.15	<i>Extração do biperideno HCl do fármaco</i>	60
3.16	<i>Análise por dicroísmo circular do biperideno HCl do fármaco</i>	60
3.17	<i>Análise do teor de biperideno presente no fármaco por ultravioleta</i>	60
4	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	61
4.1	<i>Análise por dicroísmo circular para a paroxetina</i>	61
4.2	<i>Resolução e razão do sinal/ruído obtido para a o cromóforo da paroxetina</i>	62
4.3	<i>Desenvolvimento do método por DC</i>	65
4.3.1	<i>Seletividade e especificidade</i>	66
4.3.2	<i>Linearidade</i>	67
4.3.3	<i>Limite de detecção e limite de quantificação</i>	72
4.3.4	<i>Intervalo</i>	72

4.3.5	<i>Repetitividade</i>	72
4.3.5.2	<i>Precisão intermediária</i>	73
4.3.6	<i>Exatidão</i>	74
4.3.6.1	<i>Recuperação</i>	75
4.3.7	<i>Robustez</i>	76
4.3.7.1	<i>Variação do scan e da vazão do gás</i>	76
4.3.7.2	<i>Análises de diferentes volumes da amostra</i>	76
4.3.8	<i>Estabilidades das amostras analisadas</i>	76
4.3.9	<i>Análise do cloridrato de paroxetina extraído do fármaco</i>	77
4.4	<i>Dicroísmo circular para o padrão secundário do biperideno</i>	77
4.5	<i>Resolução e razão do sinal/ruído dos cromóforos do biperideno obtidos por DC</i>	79
4.6	<i>Análise do padrão secundário do biperideno</i>	81
4.7	<i>Comparação do espectro dicroísmo de circular do biperideno padrão primário da farmacopéia com os espectros do biperideno padrão secundário e fármaco e com o espectro obtido por cálculo teórico</i>	82
4.8	<i>Análise do cloridrato de biperideno extraído do fármaco</i>	83
4.9	<i>Análise do teor do biperideno presente no fármaco por ultravioleta</i>	84

4.9.1	<i>Teor do biperideno no fármaco por ultravioleta</i>	84
5	<b>CONCLUSSÕES</b>	87
	<b>REFERÊNCIAS</b>	102

## 1 INTRODUÇÃO

A inserção de um fármaco no mercado é constituída de diversas etapas que vão da caracterização da estrutura química do fármaco, testes clínicos e os desenvolvimentos de métodos analíticos que garantem a sua qualidade. Este processo pode ser realizado em um período de 5 a 10 anos, com custo que pode chegar a 500 milhões de reais. Após, todas as etapas concluídas, o processo é submetido às agências regulamentadoras para aprovação e liberação do fármaco para comercialização, no caso do Brasil: a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária).

Depois do maior acidente com má administração de um fármaco na década de 60, conhecida por talidomida, comercializada na forma racêmica, no qual um dos enantiômeros é teratogênico (Figura 1), e provocou deformações congênitas nos fetos das gestantes que ingeriram contra enjôos, ou seja, as crianças nasciam com um tipo peculiar de malformação congênita, as agências regulamentadoras e as indústrias farmacêuticas começaram a ter uma atenção maior para a liberação da comercialização de drogas quirais, principalmente no controle de qualidade.

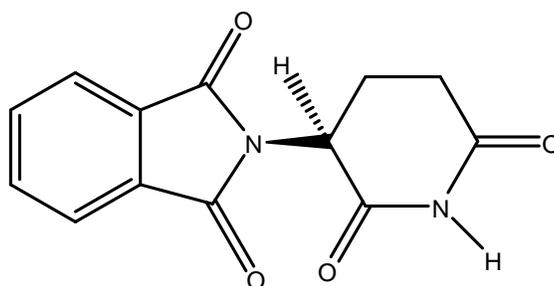


Figura 1: A estrutura do enantiômero da (*S*) - talidomida efeito teratogênico.

### *1.1 Fármacos quirais*

Em países de primeiro mundo, cuja indústria farmacêutica é responsável pela quase totalidade do arsenal terapêutico existente, a busca para o desenvolvimento de fármacos enantiomericamente puros tem crescido (LIMA, 1997; ORLANDO et al., 2007).

Os fármacos enantioméricos recebem maior atenção em controle de qualidade, pois as vias sintéticas de fármacos quirais, em sua maioria, não são

estereosseletivas, levando à formação de ambos os enantiômeros, no qual exige o desenvolvimento de técnicas mais seletivas e custosas para o seu controle de qualidade como cromatografia com coluna quiral (ORLANDO et al., 2007)

Enantiômeros apresentam propriedades químicas idênticas e, fisicamente, eles demonstram comportamentos diferentes somente em ambientes quirais (HYNECK et al., 1990). Apresentam interações altamente específicas fármaco-receptor e podem levar também a diferenças farmacológicas. Da mesma forma, a absorção, distribuição, eliminação e, principalmente, o metabolismo de estereoisômeros podem ser altamente específicos (HYNECK et al., 1990; CALDWELL, 1995).

Os compostos quirais de forma geral e simplificada, apresentam quatro tipos de comportamentos biológicos (LIMA, 1997; ORLANDO et al., 2007):

A atividade biológica desejada é atribuída a apenas um dos enantiômeros, enquanto que o outro é inativo;

Os enantiômeros possuem propriedades farmacológicas semelhantes;

A atividade é qualitativamente idêntica, mas quantitativamente diferentes entre os estereoisômeros;

As atividades dos dois enantiômeros são qualitativamente diferentes.

No quadro 1 podem ser visualizados alguns exemplos de fármacos com suas diferentes atividades devido a sua estereoquímica. Muitos fármacos quirais apresentam diferenças estereosseletivas significativas quanto à toxicidade, absorção e metabolismo (LIMA, 1997; MADESCLAIRE, 1987; FASSIHI, 1993; ORLANDO et al., 2007).

Quadro 1 - Diferenças farmacocinéticas e farmacodinâmicas de alguns fármacos quirais com atividade biológica exercidas por formas enantioméricas puras (LIMA, 1997).

Fármaco	Efeito
Etambutol	forma <i>SS</i> : tuberculostático forma <i>RR</i> : pode provocar cegueira
Penicilamina	forma <i>S</i> : anti-artrítico forma <i>R</i> : extremamente tóxico
Estrona	forma (+): hormônio estrogênico forma (-): inativo
Adrenalina	A forma levógira é 20 vezes mais ativa e igualmente mais tóxica
Talidomida	forma <i>S</i> : teratogênico forma <i>R</i> : sedativo
Salbutamol	forma <i>R</i> (-) é 80 vezes mais ativo que a forma <i>S</i> (+)
Bupivacaína	forma (+/-) ambas os isômeros possuem atividade anestésica local. Mas, apenas (-) apresenta ação vasoconstritora, prolongando assim a ação anestésica local.
Anfetamina	a forma dextrógira é 2 vezes mais ativa que o enantiômero (-)
Indacrinona	a forma (+): ação diurética e retenção do ácido úrico a forma (-): efeito uricosúrico
Clofeniramina	A atividade anti-histamínica é devida essencialmente à configuração <i>S</i> (+)

A talidomida, como citada anteriormente, provocou o maior acidente com a má administração de um fármaco. O enantiômero *S*-talidomida possui um efeito teratogênico, enquanto o enantiômero na configuração *R*-talidomida possui efeito sedativo (LIMA, 1997; ORLANDO et al., 2007).

Vários países possuem legislação própria quanto ao desenvolvimento e comercialização de fármacos quirais. No Brasil o controle e legislação vigente

são regulamentados pela ANVISA através da RE (Resolução) nº899 e RDC (Resolução de Diretoria Colegiada) nºs135 e 136 ambas de 29 de maio de 2003. Essas resoluções descrevem registros com procedimentos para o desenvolvimento de novo método. As agências regulamentadoras têm estabelecido documentos oficiais que são diretrizes a serem adotadas no processo de implantação de novos métodos analíticos. Um processo de desenvolvimento de método analítico bem definido e documentado oferece às agências reguladoras evidências objetivas de que os métodos e os sistemas são adequados para o uso desejado. (ANVISA, 2003; RIBANI et al., 2004 ).

### ***1.2 Doenças que atingem a população da terceira idade***

A *World Health Organization* (WHO) estima que até 2025 a população mundial cresça em cinco vezes, enquanto que a população idosa brasileira cresça em 16 vezes. O Brasil será a sexta maior população compreendida nesta faixa etária, isso representa uma população idosa de 32 milhões de habitantes (WHO, 2009; ZAMPIERE, 2010).

As doenças da terceira idade que tem aumentado significativamente são doenças crônicas e degenerativas que atuam no estado psicomotor comprometendo o funcionamento do sistema nervoso central. Dentre essas doenças estão à síndrome da depressão uma enfermidade neuropsiquiátrica e a síndrome do parkinson uma enfermidade neurodegenerativa (WHO, 2009; ABDEL-REHIM et al., 2005; JAGERDEO e ABDEL-REHIM, 2009; ZAMPIERE, 2010).

Cabe ressaltar que, a depressão em idosos, na maior parte dos casos é oriunda da perda de qualidade de vida, que podem está associada ao isolamento social e ao surgimento de doenças clínicas graves como o parkinson.

#### ***1.2.1 Depressão***

A depressão, o transtorno do humor, é uma doença crônica e recorrente associada à incapacidade funcional, que compromete a saúde física e mental. Descrita pela primeira vez pelo pai da medicina Hipócrates entre 470 e 377 AC. Os sintomas da síndrome do transtorno do humor podem ser aversão a comida,

falta de sono, desespero, irritabilidade, inquietação, perda de energia e alteração da cognição, ou seja, sintomas associados à melancolia (WHO, 2009; KAPLAN et al., 1997; MORENO et al., 1999; ZAMPIERE, 2010).

De acordo com WHO estima-se que no mundo cerca de 340 milhões de pessoas serão vítimas da síndrome da depressão, dos quais 10 milhões serão de brasileiros. Essa doença atinge toda faixa etária da população, entretanto tem apresentado alta incidência na população idosa (WHO, 2009; STOPFORTH et al., 2007; CHAVES, et al., 2010; ZAMPIERE, 2010).

Os portadores em estágios avançado da doença têm elevados graus de tristezas e culpas imotivadas, com perdas de prazeres em situações antes agradáveis e pensamentos suicidas (PACHER, et al., 2001). O índice de suicídio em pacientes deprimidos é 20 vezes maior do que a população suicida em geral. A WHO divulgou em 2009 que nos próximos 20 anos a depressão será a doença que mais atingirá a população, inclusive será mais incidente que o câncer e doenças cardíacas, tornando-se assim o problema de saúde pública (WHO, 2009; ABDEL-REHIM et al., 2005; JAGERDEO e ABDEL-REHIM, 2009; ZAMPIERE, 2010).

O tratamento do transtorno depressivo representa altos custos na economia mundial, na Europa em 2004 foram gastos 78 bilhões de Euros com a morbidade e mortalidade (WHO, 2009; GONÇALVES, 2011). O tratamento consiste no aumento da concentração dos neurotransmissores na fenda sináptica com a inibição do metabolismo por administração de droga, ou seja, os antidepressivos, que pertence à classe dos medicamentos psicoativos, atuam inibindo a recaptação seletiva da serotonina e noradrenalina (WHO, 2009;; MOINUDDIN et al., 2010; ROBERT, 2003; PACHER et al., 2001; MARQUES et al., 2007; KAPLAN et al., 1997; GOODNICK e GOLDSTEIN, 1998; TOURNEL et al., 2001). Uma substância quiral que é utilizada no tratamento da depressão é a paroxetina (PRX).

#### *1.2.1.1 Paroxetina*

A paroxetina ( $C_{19}H_{20}FNO_3$ ), massa molecular 365,83 Da, é um pó branco cristalino, estável em temperatura ambiente, funde entre 129°C a 131°C, inodoro, ligeiramente solúvel em água, álcool e diclorometano. O nome da

paroxetina pela IUPAC é: (3*S*, 4*R*)-3-(1,3-benzodioxol-5-iloximetil)-4-(4-fluorofenil)piperidina. A estrutura química da PRX apresenta dois carbonos estereogênicos, podendo existir como dois pares de enantiômeros (Figura 2).

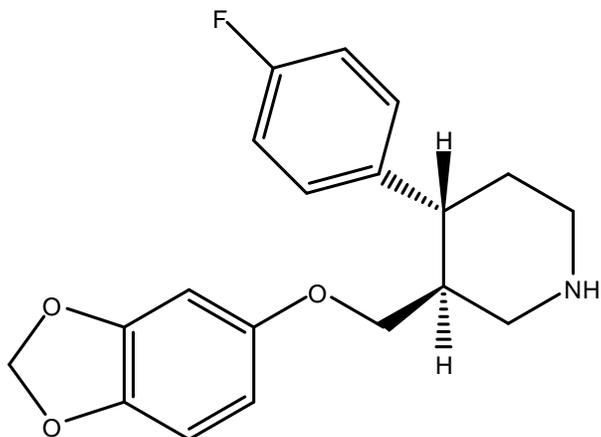


Figura 2: A estrutura do enantiômero da paroxetina biologicamente ativo.

A PRX possui atividade antidepressiva sendo indicado também para o transtorno obsessivo compulsivo, transtorno do pânico com ou sem fobia, transtorno ansiedade social e fobia social (WHO, 2009; SUN, et al., 2010; ROBERT, 2003).

A paroxetina está disponível em comprimidos de 20 mg, 30 mg e 40 mg. A dose estimada é de 10 a 50 mg/dia e a administração é via oral.

Alguns métodos têm sido relatados para análise do teor da paroxetina, como cromatografia em fase gasosa (GC) descrito na Farmacopéia Européia ou cromatografia líquida. Os métodos citados são seletivos e sensíveis para análises da PRX. Entretanto, as análises são demoradas e precisam de ambientes quirais, essas características representam altos custos para análises de rotina em laboratórios de controle de qualidade (MOINUDDIN et al., 2010; ZHANG, et al., 2011; MASSAROTI, 2005; SUN et al., 2010; LAMBROPOULOS, et al., 1999).

### *1.2.2 Doença de Parkinson*

A doença de Parkinson é uma síndrome crônica degenerativa que provoca a redução progressiva dos neurônios, descrita pela primeira vez pelo médico inglês James Parkinson em 1817. Os principais sintomas da doença de

Parkinson são tremores, distonia e uma postura curvada. Como a doença progride, vários músculos tornam-se progressivamente paralisados, o portador da doença pode ser levado à morte por dificuldade respiratória, pneumonia ou embolia pulmonar. Outra patologia com sintomas semelhantes aos da doença de Parkinson é coletivamente conhecido como "parkinsonismo". O tratamento com medicamentos neurolépticos pode causar efeitos colaterais idênticos aos sintomas das doenças de Parkinson, como tremores e dificuldades em movimento, que são conhecidos como "síndrome extrapiramidal" e são causados pela inibição da transmissão dopaminérgica (HADIDI, 2004).

Tratamento da doença de Parkinson e síndromes similares são baseados numa terapia de substituição da dopamina. Uma das drogas mais usadas para o tratamento da doença de Parkinson é o biperideno (BPR), um composto quiral.

#### 1.2.2.1 Biperideno

O biperideno ( $C_{21}H_{29}NO$ ), peso molecular 311, 4611 Da, é um pó branco cristalino, estável em temperatura ambiente, funde em aproximadamente  $270^{\circ}C$  com decomposição, inodoro, ligeiramente solúvel em água e álcool. O nome do biperideno pela regra da IUPAC é: (1*RS*)-1-[(1*RS*, 2*SR*, 4*RS*)-biciclo [2.2.1] hept-5-en-2-il]-1-fenil-3-(piperidina-1-il)propano-1-ol. A estrutura química do BPR apresenta quatro carbonos estereogênicos, podendo existir como quatro pares de enantiômeros comercializados na forma de uma mistura racêmica e na forma exo (Figura 3).

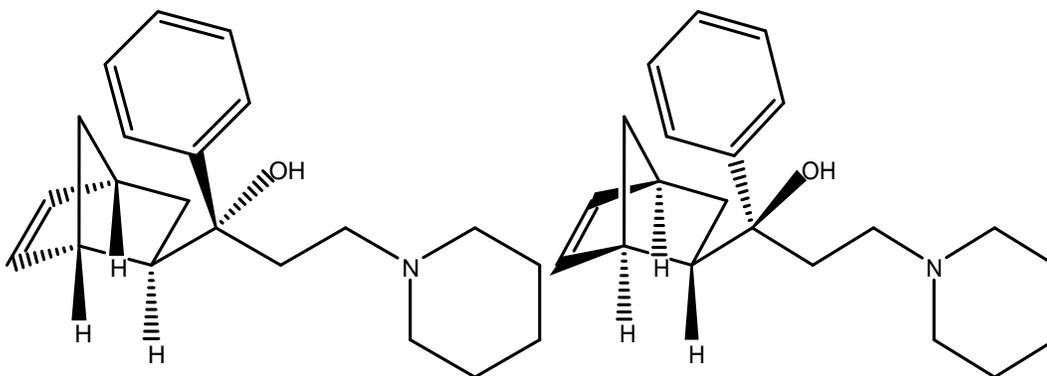


Figura 3: As estruturas para um par de enantiômeros do biperideno biologicamente ativo.

O BPR possui atividades antiparkinsoniano e anti-muscarínicos (O'NEIL et al., 2001). O biperideno pertence a uma classe de medicamentos anticolinérgicos que agem bloqueando parcialmente a receptores colinérgicos (MCEVOY e OY, 2001).

O BPR está disponível em comprimidos de 2 mg e em cápsulas de 4 mg. A dose estimada é de 3 a 16 mg/dia e a administração é via oral (SWEETMAN, 2005; USP, 2005).

Segundo Mandrioli (2006) o (+)-biperideno mostra forte seletividade específica para subtipos de receptores muscarínicos, farmacocinética enantiosseletiva, já o (-)-biperideno exibe baixa seletividade. Baseada nestas informações, a Farmacopéia Americana (USP) admitiu em 2007 a necessidade de novos métodos alternativos para a análise do teor do biperideno, que sejam mais seletivos a presença de estereoisômeros (MANDRIOLI et al., 2006).

As Farmacopéias Européias e Britânicas determinaram o método de cromatografia gasosa para análise de teor do biperideno e a Farmacopéia Americana (USP) utiliza os métodos titulométrico (MOHAMMADI, et al., 2007).

Os métodos citados acima não são seletivos para enantiômeros, exceto o CG se for desenvolvido em ambiente quiral. Existem dois relatos de métodos de análises para o biperideno que são seletivos aos enantiômeros, porém não regulamentados: eletroforese capilar e cromatografia líquida em ambiente quiral (ORLANDO et al., 2007)

### ***1.3 Desenvolvimento de método analítico***

A necessidade de se mostrar a qualidade de medições químicas através de sua comparabilidade e confiabilidade está sendo cada vez mais reconhecida e exigida, e pode ser adquirida quando se conhece cada fase do método desenvolvido. O desenvolvimento de um método é um processo contínuo que começa no planejamento da estratégia analítica e continua ao longo de todo o seu desenvolvimento e transferência. Para registro de novos produtos, todos os órgãos reguladores do Brasil e de outros países exigem o desenvolvimento de metodologia analítica e, para isso, a maioria deles tem estabelecido documentos oficiais que são diretrizes a serem adotadas no processo. Uma metodologia desenvolvida deve ser bem definida e documentada oferece às agências

reguladoras evidências objetivas de que os métodos e os sistemas são adequados para o uso desejado (RIBANI et al., 2004). Portanto, os principais aspectos do desenvolvimento de métodos analíticos, buscam demonstrar que os resultados das análises executadas permitam uma avaliação dos parâmetros específicos da qualidade do produto, assegurando tanto a implantação do método com a confiabilidade dos resultados analíticos (USP, 1999; ICH, 2005).

As agências normativas que descreve guias para os procedimentos de implementação de novos métodos analíticos são ICH (Conferência Internacional de Harmonização), a ANVISA e o INMETRO (Instituto nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial). A ANVISA descreve guias com quatro tipos de testes na RE nº 899 (tabela 1). Esses testes são aplicados em analíticos métodos analíticos para fármacos e matérias-primas.

Tabela 1- Critérios para o desenvolvimento de métodos analíticos.

<b>Categoria</b>	<b>Finalidade do teste</b>
<b>I</b>	Testes quantitativos para a determinação do princípio ativo em produtos farmacêuticos ou matérias-primas
<b>II</b>	Testes quantitativos ou ensaio limite para a determinação de impurezas e produtos de degradação em produtos farmacêuticos e matérias-primas
<b>III</b>	Testes de desempenho (por exemplo: dissolução, liberação do ativo)
<b>IV</b>	Testes de identificação

Adaptado: ANVISA

Os parâmetros exigidos pela ANVISA para desenvolvimento de método quantitativo, referentes às categorias I e II estão apresentados na tabela 2.

Tabela 2 – Parâmetros empregados no método quantitativo.

Parâmetro	Definição
<b>Seletividade</b>	Capacidade de medir um dos compostos na presença dos placebos e das impurezas
<b>Linearidade</b>	Faixa de concentração com relação linear entre concentração e resposta.
<b>Intervalo</b>	Faixa entre os limites de quantificação e superior e inferior da concentração teste.
<b>Limites de detecção e quantificação</b>	Limite de detecção é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado. 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.
<b>Exatidão</b>	Proximidade dos resultados obtidos em relação ao valor verdadeiro.
<b>Precisão / Repetitividade</b> <b>Precisão / Intermediária *</b>	Precisão intra-corrída (repetitividade), variação dos resultados em período curto de tempo realizado pelo mesmo analista e instrumentação. Precisão inter-corrída (intermediária), concordância entre os resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes, com analistas diferentes e/ou equipamentos diferentes.
<b>Robustez</b>	Mede a sensibilidade do método em face de pequenas variações. Diz-se que um método é robusto quando ele não é afetado por uma modificação pequena e deliberado em seus parâmetros.

\* Apenas comprovada quando não há a confirmação da repetitividade.

Adaptado: ANVISA

### *1.3.1 Seletividade e especificidade*

A seletividade mede a capacidade do método em detectar e/ou separar o analito de interesses sem mascaramento. Logo, o método deve garantir que a resposta é do composto específico, mesmo na presença dos interferentes presentes na amostra, como a presença de outros compostos, excipientes, impurezas, produtos degradados, assim como compostos com propriedades semelhantes ao seu analito (BRESSOLLE et al., 1996).

Como a seletividade visa uma única resposta para substância de interesse, também pode ser chamado de específico. Um método que produz respostas para vários compostos químicos, com uma característica em comum, pode ser chamado de seletivo (AMARANTE et al., 2001).

Para análise quantitativa (teor), a especificidade pode ser obtida pela comparação dos resultados obtidos de amostra (fármaco) contaminada com quantidades apropriadas de impurezas e amostras não contaminadas, para demonstrar que o resultado do teste não tem interferência (INMETRO, 2003; ANVISA, 2003).

### *1.3.2 Linearidade*

A linearidade é a capacidade do método analítico apresentar resultados diretamente proporcionais às concentrações da substância em análise, portanto é necessário o conhecimento prévio das concentrações e do pico ou amplitude do sinal escolhido para análise (BARROS et al., 2002).

A curva da solução de referência requer tratamento estatístico, tal como a regressão linear, coeficientes a e b, que constituem a reta (Equação 1). É necessário calcular o coeficiente de correlação ( $r^2$ ), que permite por estimativa a qualificação da reta, que segundo ANVISA o valor que atesta uma boa correlação tem o  $r^2 = 0,99$  obtidos entre as concentrações das amostras e as respostas apresentadas no sinal (CHUI et al., 2001).

$$y = ax + b$$

Equação 1

### *1.3.3 Limite de Detecção e Limite de Quantificação*

O limite de detecção (LD) é a menor concentração da substância em análise que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada (ICH, 2005; RIBANI et al., 2004).

O LD pode ser definido por três maneiras diferentes:

*Método visual.* Método que utiliza uma matriz com adição de concentrações conhecidas da substância de interesse, sendo possível diferenciar o ruído e o sinal analítico pela visualização da menor concentração detectável:

*Método da razão sinal/ruído:* método que pode ser aplicado somente em procedimentos analíticos que mostram o ruído da linha de base. A relação sinal/ruído é feita pela comparação das medições dos sinais da amostra em baixa concentração conhecida da substância de interesse. A relação sinal/ruído pode ser de 3:1 ou 2:1, estas proporções são geralmente aceitas para o limite de detecção;

*Método baseado em parâmetros da curva da solução de referência:* o limite de detecção (LD). É obtido pela razão sinal/ruído o LD pode ser expresso pela equação 2.

$$LD = 3.s / S$$

Equação 2

s = estimativa do desvio padrão das respostas, que também pode ser determinado pelo desvio padrão do branco, da equação da linha de regressão ou do coeficiente linear da equação.

S = inclinação ou coeficiente angular da curva analítica.

O limite de quantificação (LQ) é a menor concentração da substância em análise que pode ser medida com segurança (ICH, 2005; ANVISA, 2003; RIBANI et al., 2004). Os critérios para estabelecer o LQ são o sinal do analito e o ruído da linha de base. A razão sinal/ruído que podem ser adotada para o LQ deve estar na proporção 10:1, calculado a partir da equação 3.

$$LQ = 10.s / S$$

Equação 3

Para muitas aplicações farmacêuticas o LQ é geralmente um parâmetro mais significativo e importante que o limite de detecção (RIBANI et al., 2004).

### 1.3.4 Intervalo

O intervalo normalmente é derivado do estudo de linearidade e depende da aplicação pretendida do método (Tabela 3). O intervalo é estabelecido pela confirmação de que o método apresenta linearidade e exatidão adequadas quando aplicados as amostras contendo quantidades de substâncias dentro do intervalo especificado (ICH, 2005; ANVISA 2003).

Tabela 3: Limites percentuais do teor do analito que devem estar contidos no intervalo de linearidade para alguns métodos analíticos.

<b>Ensaio</b>	<b>Alcance</b>
<b>Determinação quantitativa da matéria-prima ou em fármacos</b>	De 80% a 120% da concentração teórica do teste.
<b>Determinação de impurezas</b>	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.
<b>Uniformidade de conteúdo</b>	De 70% a 130% da concentração teórica do teste.
<b>Ensaio de dissolução</b>	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.

Adaptado: ANVISA

### 1.3.5 Repetitividade e Precisão intermediária

A precisão analisa as concordâncias dos resultados obtidos em um conjunto de medidas obtidas por replicatas de cada ponto da amostra em diferentes concentrações (ICH, 2005; ANVISA, 2003; LEITE, 2002).

A repetitividade ou precisão intra-ensaio ou intra-corrída representa a concordância entre os resultados de medições sucessivas do método (ANVISA, 2003).

A precisão intermediária ou precisão inter-corrída apresenta o grau de concordância entre os resultados das amostras analisadas em dias diferentes, com analistas diferentes e/ou equipamentos diferentes. Para a determinação da

precisão intermediária recomenda-se um mínimo de 2 dias diferentes com analistas diferentes (ANVISA, 2003).

A precisão pode ser expressa através da estimativa do desvio padrão ou desvio padrão relativo (RSD), equação 4 (ANVISA, 2003).

$$\text{RSD \%} = (s / \bar{x}) 100 \quad \text{Equação 4}$$

s = desvio padrão absoluto

$\bar{x}$  = a média aritmética

### *1.3.6 Exatidão*

Representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados para um conjunto de amostras e um valor aceito como referência (RIBANI et al., 2004; LEITE, 2002). A exatidão é expressa em porcentagem (%) de erro do desvio padrão, coeficiente de variação (CV), a partir dos dados experimentais inter-corridos, o desvio não deve exceder 15% (equação 5). A ANVISA recomenda que a exatidão seja obtida em três concentrações, no qual cada concentração deve ser analisada no mínimo em cinco leituras.

$$\text{CV} = (\text{CMAP} / \text{CT}) 100 \quad \text{Equação 5}$$

CMAP = concentração média da amostra padrão secundário

CT = concentração teórica

#### *1.3.6.1 Recuperação*

A recuperação é obtida quando se compara as respostas da amostra não adicionada de padrão com os resultados das amostras adicionadas de padrão, equação 6. A amostra deve ser lida em no mínimo 9 leituras (RIBANI et al., 2004; ANVISA, 2003).

$$\text{R} = ( \text{CMAAP} - \text{CMANAP} / \text{CT} ) 100 \quad \text{Equação 6}$$

CMAAP = concentração média da amostra adicionada de padrão

CMANAP = concentração média da amostra não adicionada de padrão

A porcentagem de recuperação do analito embora tenha valores desejados de 100%, são aceitos valores acima de 70% para a recuperação (ANVISA, 2003).

### *1.3.7 Robustez*

O método é robusto na medida em que, ao sofrer pequenas alterações não comprometem a confiabilidade dos resultados. Logo, os testes de robustez, em geral, representam pequenas variações dos parâmetros do método sem variações significativas dos resultados das análises, mesmo quando esse método for transferido para outro laboratório, for utilizado por outro analista ou for utilizado em outro equipamento (ICH, 2005; ANVISA, 2003).

### *1.4 Estabilidades das amostras*

A estabilidade do analito pode ser avaliada durante a coleta e manuseio da amostra, após armazenagem de longa duração (congelamento) e curta duração (à temperatura ambiente), ou seja, após ciclos de congelamento e descongelamento e nas condições de análise (ANVISA, 2003).

### *1.5 Dicroísmo circular*

A origem da palavra dicroísmo vem do grego *dikhroos*, cor-de-dois, e refere-se a qualquer dispositivo ótico que possa dividir um feixe de luz em dois feixes com diferentes comprimentos de onda. Esse fenômeno foi inicialmente observado pelo austríaco Wilhelm Carl Ritter Von Haidinger em 1847 em cristais de quartzo ametista. Posteriormente, esse fenômeno foi observado em moléculas opticamente ativas, mais especificamente em soluções de tartarato de cobre e cromo, pelo francês Aimé Cotton (RINALDO, 2010; BERTUCCI et al., 2000).

Dicroísmo circular (CD, do inglês *circular dichroism*) é uma técnica espectroscópica dita *quiróptica*, que é capaz de diferenciar entre dois enantiômeros (RESENDE, 2008).

O espectro de dicroísmo circular (EDC) mostra o Efeito Cotton (EC) do centro quiral gerado quando a luz incide sobre a amostra, que possui cromóforo. O EC é representado por sinais máximos e mínimos nos espectros na região do ultravioleta-visível (UV-VIS), podem ser negativos e positivos (LORIN, 2007).

A técnica espectroscópica dicroísmo circular envolve duas propriedades físico-químicas, a quiralidade e absorção, que servem para determinações qualitativas e quantitativas, respectivamente. Nas análises qualitativas o dicroísmo circular (DC) oferece espectro com característica bem peculiar ao cromóforo, já as análises quantitativas são realizadas com base na medida da diferença de intensidade de absorção entre a luz circularmente dextro rotatória e levo rotatória. (RESENDE, 2008).

A seguir estão descritos na tabela 4, os comprimentos de ondas (  $\lambda$  ), as concentrações das amostras, as transições eletrônicas de alguns cromóforos em função das cubetas.

Tabela 4: Os comprimentos de ondas, as concentrações das amostras, as transições eletrônicas de alguns cromóforos em função das cubetas.

<b>Cromóforo</b>	<b>Transição eletrônica e em (nm)</b>	<b>Concentração em (%)</b>	<b>Comprimento da cubeta (mm)</b>
<b>Alcino</b>	- * 220 – 190	0,1	1 – 0,5
<b>Alceno</b>	- * 200 – 185	0,1	0,5 – 0,1
<b>Aleno</b>	- * 300 – 250	0,01 – 0,0005	10
<b>Cetonas / Aldeídos</b>	<i>n</i> - * 350 – 240	0,1	10
<b>Alceno com cetona</b>	<i>n</i> - ' 400 – 260	0,1	10
<b>Alceno com cetona</b>	- ' 280 – 200	0,1	1 – 0,2
<b>Ác. Carboxílico /Éster/Lactona/</b>	<i>n</i> - ' 250 - 200	0,1	10 – 1
<b>Aromático (terpenos)</b>	- ' 250 – 200	0,1	1 – 0,2
<b>Dissulfeto</b>	<i>n</i> - * 350 – 250	0,1	10
<b>Proteína, aromático</b>	- * 260 – 200	0,1	1 – 0,5
<b>Polipeptídeo</b>	- * 260 – 185	0,1	1 – 0,5
<b>Polipeptídeo (transição)</b>	- * 300 – 200	0,02	1 – 0,5
<b>RNA, DNA</b>	<i>d-d*</i> 700 – 300	0,1	1 – 10
<b>Co-complexo / quelato</b>	<i>d-d*</i> 700 – 300	0,01	10

Adaptado: Manual do espectropolarímetro da Jasco J-815

A luz é constituída por ondas eletromagnéticas que oscilam por todos os sentidos. Com a utilização de um filtro polarizador é possível selecionar ondas que oscilem em um único plano, conhecidas como luz plano polarizada (Figura 4).

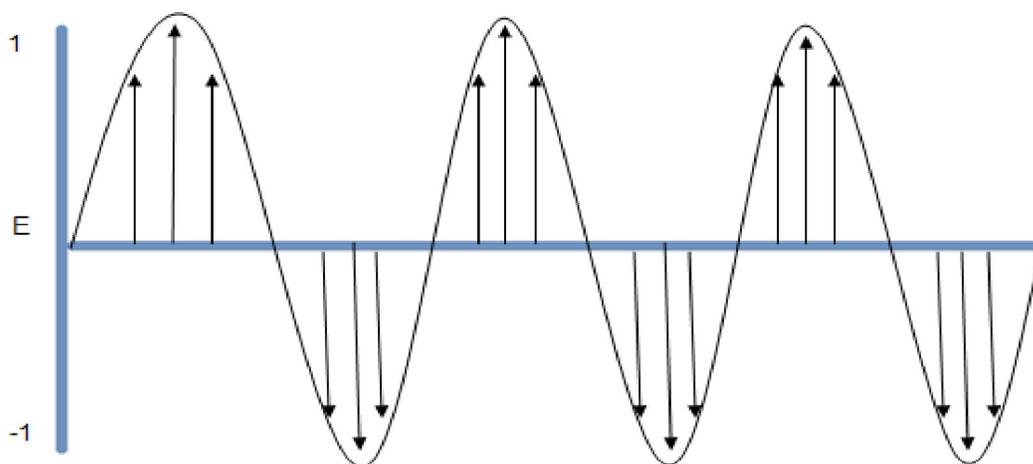


Figura 4: Luz plano polarizada: campo elétrico (E) em função do tempo (t).

Adaptado: Rodger e Norden, 1997

A luz circularmente polarizada pode ser representada pelo somatório de duas componentes circularmente polarizadas e de mesma magnitude, contudo girando em sentidos contrários, uma em sentido horário ( $RL$ ) e outra em sentido anti-horário ( $EL$ ), figura 5A. Se o feixe de luz polarizado incide sobre uma amostra quiral, os feixes de luzes direito e esquerdo circularmente polarizado são absorvidos pelo(s) cromóforo(s) da amostra com intensidades diferentes, tem-se o fenômeno dicroísmo circular, figura 5B (HAN et al.,1986; BALOGHNE, 2003).

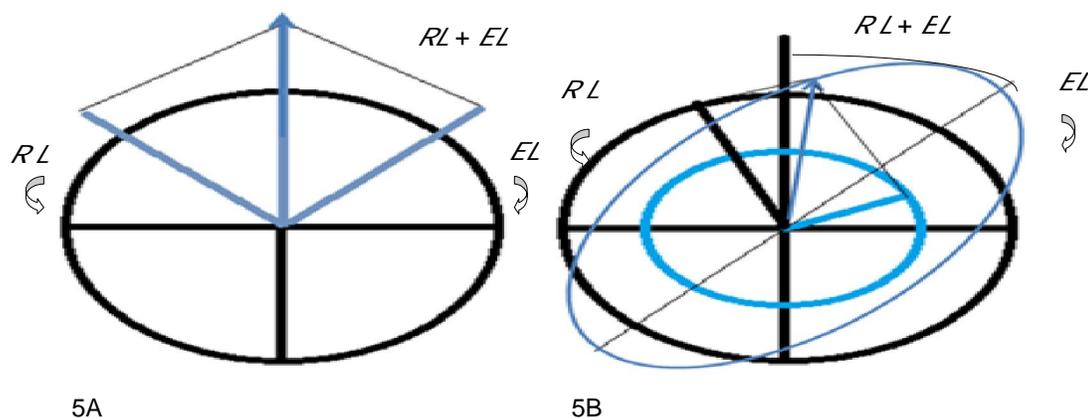


Figura 5: Efeito do dicroísmo circular sobre as componentes circularmente polarizadas  $ER$  e  $EL$ . (5A) Componentes circularmente polarizadas de mesma amplitude que, quando combinadas geram radiação com componentes de magnitude diferentes, resultam em uma luz elípticamente polarizada (5B).

Adaptado: Rodger e Norden, 1997

A espectroscopia de dicroísmo circular (DC) mede a diferença na absorvidade molar ( ) das duas componentes da luz polarizada circularmente à esquerda e a direita, equação 7 (BEROVA et al.,2000; KOTT et al., 2007; RODGER e NORDEN, 1997). Assim, a absorção diferencial dicróica é definido como:

$$= I - D \quad \text{Equação 7}$$

Onde:  $I$  e  $D$  são os coeficientes de absorvidade molar para esquerda à direita, respectivamente.

A elipticidade molar [ ] é obtida pela pela razão diretamente proporcional entre a constante (32,982) e a (KOTT et al., 2007; RODGER e NORDEN, 1997). A elipticidade molar está relacionada com a absorção diferencial dicróica, equação 8.

$$[ ] = 32,982. \quad \text{Equação 8}$$

A diferença de absorção dicróica também pode ser descrita em termos de elipcidade molar, a qual é representada pela tangente (tg). A tangente é obtida pela razão entre o menor e o maior eixo da elipse (Equação 9; Figura 6). A elipcidade pode assumir valores positivos ou negativos.

$$tg = \frac{RL - RE}{RL + RE} \quad \text{Equação 9}$$

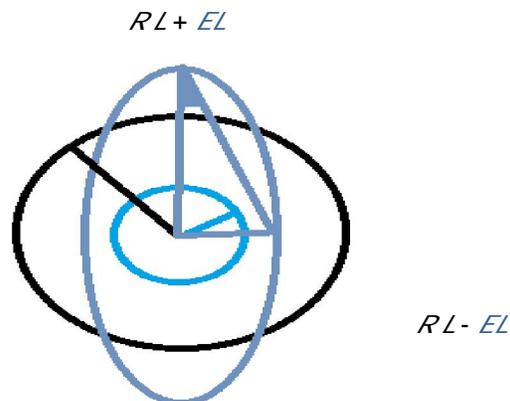


Figura 6: Elipcidade [ ] tangente obtida pela razão do menor e do maior eixo da elipse. Adaptado: Rodger e Norden, 1997

### 1.5.1 Descrições e características do equipamento dicroísmo circular

A Figura 7 mostra uma descrição ilustrativa dos componentes de um equipamento de dicroísmo circular.

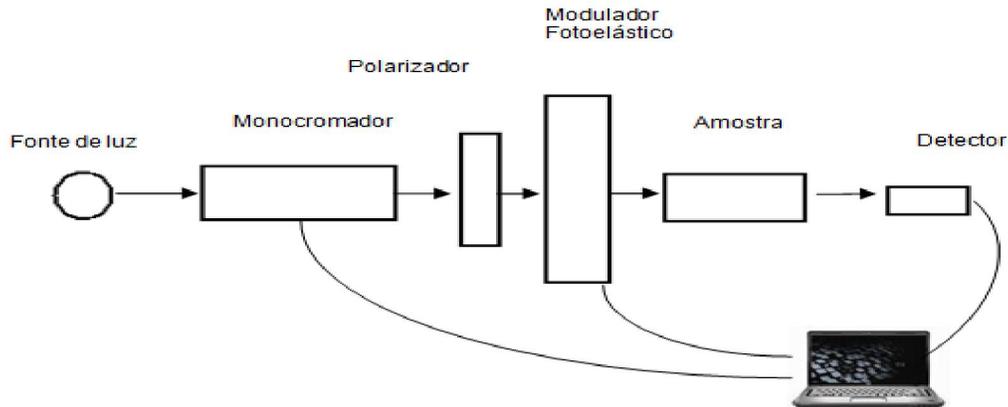


Figura 7: Ilustração do equipamento de dicroísmo circular.

Adaptado: Rodger e Norden, 1997

As análises são feitas em solução. Este detalhe é importante, pois, no processo de cristalização pode ocorrer alteração na estrutura da molécula, para o caso de proteínas em solução temos reprodução muito próxima do que é a realidade dos sistemas biológicos *"In Vivo"* (CANTOR e SCHIMMEI, 1980).

O DC pode ser utilizado para detectar:

Mudanças na configuração de macromoléculas;

Interação destas macromoléculas com outras moléculas menores, especialmente aquirais.

Podem-se citar algumas vantagens na utilização desta técnica como, por exemplo:

Experimentos simples e rápidos;

Pequena quantidade de material necessária para efetuar as medidas;

Aplicada às moléculas em solução.

Assim, a técnica espectroscópica utilizada para o desenvolvimento do método foi à espectroscopia por dicroísmo circular, uma técnica rápida e eficaz nas análises de substâncias quirais, sendo pouca explorada e conhecida em laboratórios de controle de qualidade (RESENDE, 2008).

## 2 OBJETIVOS

### *2.1 Objetivo geral*

Desenvolver um novo método pela técnica espectroscopia de dicroísmo circular como uma ferramenta rápida e eficaz no controle de qualidade da matéria-prima e fármaco da Paroxetina e Biperideno.

### *2.2 Objetivos específicos*

Extrair a paroxetina HCl e o biperideno HCl do fármaco para análise por dicroísmo circular.

Analisar os padrões secundários e os fármacos da paroxetina e do biperideno por dicroísmo circular.

Desenvolver o método quantitativo e qualitativo para paroxetina HCl por dicroísmo circular.

Comparar os espectros de dicroísmo circular do biperideno, padrão secundário e fármaco, com o espectro do padrão primário do biperideno adquirido da farmacopéia americana e com o espectro obtido por cálculo teórico.

Determinar o teor da biperideno HCl no fármaco por UV - VIS.

### 3 EXPERIMENTAL

A pesquisa foi realizada em duas etapas distintas. A primeira etapa compreende o desenvolvimento de um método com a análise qualitativa e quantitativa do padrão secundário da paroxetina bem como do fármaco obtido comercialmente por DC. O desenvolvimento do método foi realizado conforme recomendações da ICH (Conferência Internacional de Harmonização) e da ANVISA. Os parâmetros usados no método foram a seletividade, linearidade, intervalo, limites de detecção e quantificação, repetitividade/ precisão intermediária, exatidão, recuperação, robustez e estabilidade das amostras. Na segunda etapa foi realizada análise qualitativa do padrão secundário do biperideno por DC. Nas etapas do desenvolvimento do método foi definido o comprimento de onda mais adequado para os testes por DC empregando a técnica espectrofotométrica UV-VIS. Nos espectros por ultravioleta foram avaliadas as absorvidades molares e definições das condições de preparo das amostras da paroxetina e do biperideno, além da determinação do teor do princípio ativo, biperideno, em fármaco comercial. O espectro de um dos enantiômeros presentes no biperideno foi obtido por cálculo teórico. Nas etapas do método por DC foram testados diferentes solventes (DCM, DMF, DMSO, metanol e água ultrapura) para avaliar a resolução e a razão do sinal/ruído das respostas dos padrões secundários. As etapas descritas estão esquematizadas no fluxograma da figura 8.

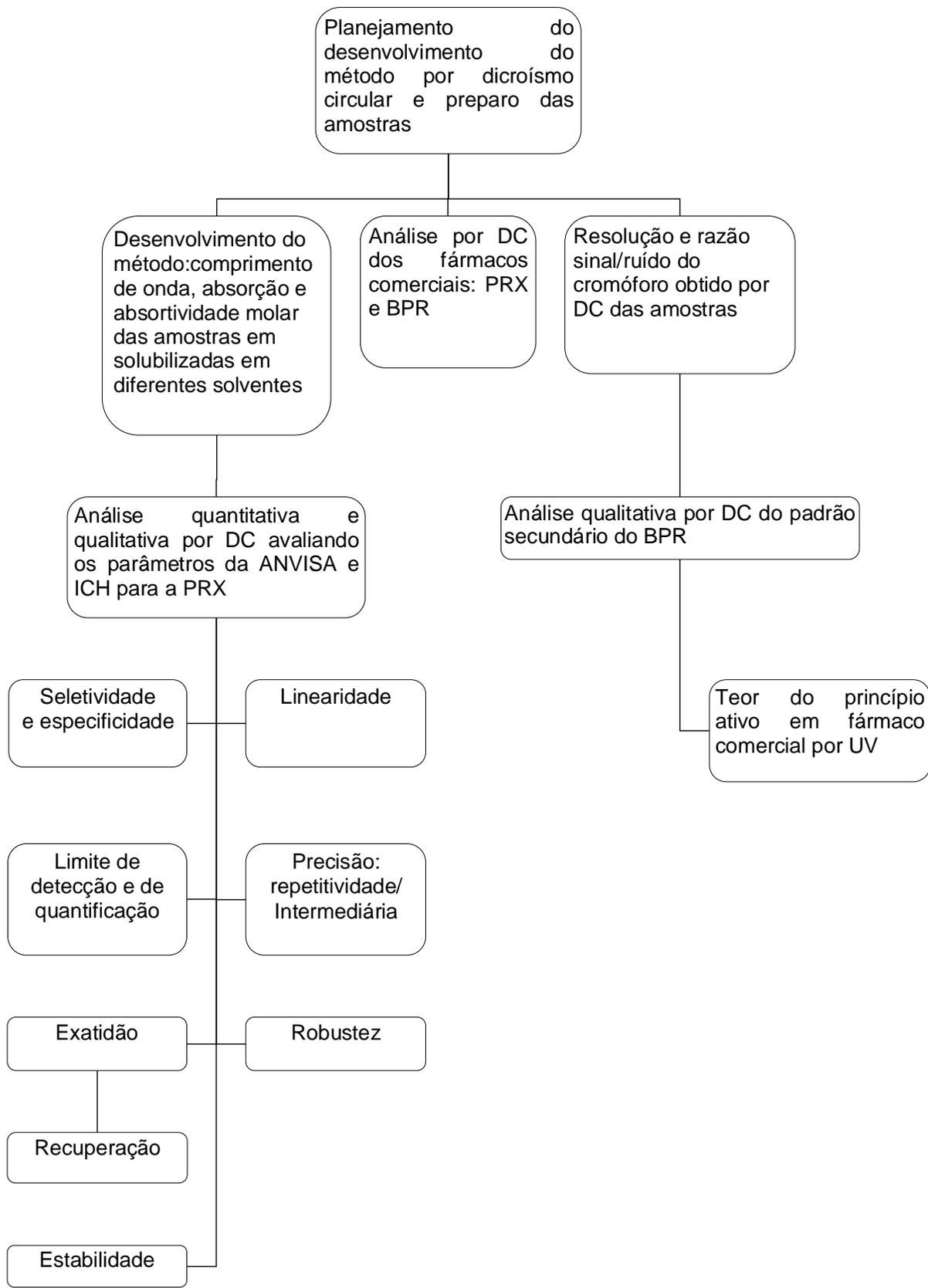


Figura 8: Fluxograma das etapas da pesquisa.

### *3.1 Padrões secundários e fármacos*

Os padrões secundários e fármacos da PRX e do BPR foram obtidos comercialmente e armazenados entre 15°C à 30°C.

Informações dos padrões secundários analisados:

Padrão secundário: Paroxetina HCl (Cristália)

Lote: 100301/2011

Data de fabricação: 03/10

Data de validade: 03/12

Padrão secundário: Biperideno HCl (Cristália)

Lote: 00280/2010

Data de fabricação: 12/09

Data de validade: 12/12

Informações dos fármacos obtidos comercialmente:

Fármaco: cloridrato de paroxetina (Benepax® - APSEN) 20 mg

Lote: 10100383

Data de fabricação: 08/10

Data de validade: 08/12

Fármaco: cloridrato de biperideno (Akineton® - Abbott) 2 mg

Lote: 850018F02

Data de fabricação: 01/10

Data de validade: 07/13

### *3.2 Solventes e vidrarias*

Os solventes utilizados foram os seguintes: metanol alta pureza PA (J.T.Backer), diclorometano PA (Cinética) dimetilformamida (Vetec) e dimetilsulfóxido PA (Cromato Produtos Químicos) água ultrapura (Milli-Q Millipore). As vidrarias volumétricas utilizadas foram todas com certificações (UNIGLAS).

### *3.3 Equipamentos e softwares*

Balança analítica (Sartorius, modelo TE2145), Rotavapor (Agente), espectrofotômetro UV-VIS (Agilent Technologies, modelo 8453), ultrassom (Ultra Cleaner, modelo 801), centrífuga (HERMLE, modelo Z36HK), espectropolarímetro de dicroísmo circular e absorvância em UV-VIS (Jasco, modelo J-815), software ChemBiooffice2008® (ChemBioDraw Ultra 11) Software Origin 8,0® e software Microsoft Office 2007®(Excel).

### *3.4 Biperideno HCl padrão primário*

O padrão primário do biperideno foi adquirido da Farmacopéia Americana (USP).

### *3.5 Primeira etapa: Desenvolvimento do método para as análises da paroxetina*

Para estas análises foram utilizadas soluções com concentrações de  $5,47 \cdot 10^{-4}$  a  $0,91 \cdot 10^{-4}$  molL<sup>-1</sup>. As amostras da PRX foram colocadas em células circulares de quartzo, com 0,2 mm e com 10 mm. As análises foram realizadas à 25°C no equipamento da Jasco (J-815), figura 9. O espectro foi obtido com resposta em 4 segundos, a sensibilidade de 100 mdeg no intervalo de comprimento de onda de 400 a 190 nm. Os scan dos espectros foram de 50 nmmin<sup>-1</sup> e de 100 nmmin<sup>-1</sup>. Estas condições de análises foram aplicadas as soluções dos experimentos 1, 2 e 3. Para as análises da resolução e da razão sinais/ruído para o cromóforo da paroxetina foi utilizada cubetas de 0,2 mm. As análises foram realizadas no Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE).



Figura 9: Imagem do espectropolarímetro Jasco J-815.

A calibração do equipamento espectropolarímetro foi realizada com o padrão sal da cânfora a 0,06% (0,01 L de água ultrapura em 0,006 g do padrão sal da cânfora). O EDC foi obtido à sensibilidade 100 mdeg, scan de 100 nmmin<sup>-1</sup>, resposta em 4 segundos e a leitura obtida pela média de 5 acumulações, na faixa de comprimento de onda de 400 a 190 nm. O EDC padrão do sal da cânfora (figura 10) foi subtraído do EDC do solvente água ultrapura.

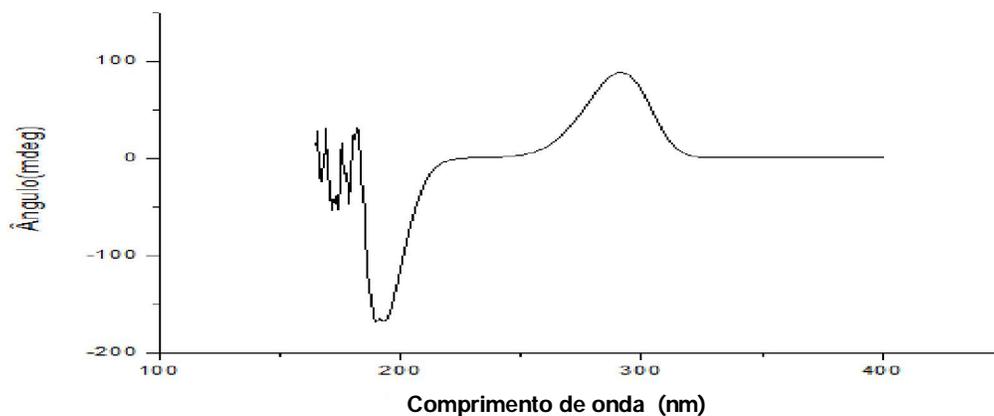


Figura 10: Espectro de dicroísmo circular do sal da cânfora em água ultrapura, em cubeta de 10 mm. Em 198 nm; 190,4 mdeg e 291 nm; 79,10 mdeg.

### ***3.6 Análise do padrão secundário da paroxetina por ultravioleta***

A análise com a amostra do padrão secundário da paroxetina apresentou sinais associados ao cromóforo de transição  $\pi^*$  do anel aromático, com absorção entre 250 e 200 nm. Para esse comprimento de onda foi calculado a absorvidade molar ( $\epsilon$ ). Para as análises por UV foram retiradas alíquotas de 3

mL, os espectros foram obtidos pela média de 5 repetições no de comprimento de onda de 233 nm. As análises foram realizadas no espectrofotômetro do Centro de Apoio a Pesquisa (CENAPESQ) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE). O espectro foi analisado na intervalo de comprimento de onda de 190-400 nm com células circulares de quartzo, com 10 mm.

### *3.6.1 Preparação da amostra da paroxetina para análise por ultravioleta*

A amostra foi preparada a  $2,73 \cdot 10^{-4} \text{ molL}^{-1}$ , (0,01 L em 0,001 g) da PRX em água ultrapura.

### *3.7 Análise da resolução e da razão do sinal/ruído do cromóforo da PRX obtido por DC*

As análises das soluções preparadas a  $5,47 \cdot 10^{-4} \text{ molL}^{-1}$  (0,01 L em 0,002 g) da PRX nos solventes água ultrapura, metanol, DCM, DMF e DMSO foram definidos a melhor resolução e a razão do sinal/ruído. Foram retiradas alíquotas de 200  $\mu\text{L}$  de cada solução a 25°C para a análise por DC. Os espectros foram obtidos à sensibilidade 100 mdeg, scan de  $50 \text{ nmmin}^{-1}$  e resposta em 4 segundos. Foram realizadas 10 leituras para cada concentração, cada leitura obtida pela média de 5 acumulações, na faixa de comprimento de onda de 400 a 190 nm. O espectro do padrão secundário da PRX foi subtraído dos seus respectivos solventes.

#### *3.7.1 Preparação da amostra do padrão secundário da paroxetina*

As amostras das soluções estoque dos experimentos 1, 2 e 3 foram preparadas a  $5,47 \cdot 10^{-4} \text{ molL}^{-1}$  (0,01 L em 0,002 g) da PRX em água ultrapura.

### *3.8 Parâmetros avaliados para o desenvolvimento do método analítico por dicroísmo circular*

O método qualitativo e quantitativo para a PRX seguiu os parâmetros dos guias da ANVISA e do ICH. Para as análises dos resultados dos parâmetros

seletividade, linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, intervalo, recuperação e estabilidade, foram retiradas alíquotas de 3 mL das amostras dos experimentos 1, 2, e 3, medidos no de 218 nm, em cubeta de 10 mm. Já para as análises da precisão, da exatidão e da robustez foram retiradas alíquotas de 200 µL e de 3 mL das amostras dos experimentos 1, 2 e 3, medidos no de 218 nm, em cubetas de 0,2 mm e de 10 mm. Para análises dos parâmetros do desenvolvimento do método foram selecionados 6 pontos para o intervalo de referência, cada espectro do intervalo de referência variou em 10% de uma concentração para outra. Os espectros de cada ponto foram obtidos com 10 leituras de cada ponto do intervalo de referência, sendo cada leitura obtida pela média de 5 acumulações. Os dados experimentais foram avaliados estatisticamente através do coeficiente de variação, variância, e teste *t*-Student. A regressão linear foi obtida pelo método dos mínimos quadrados empregando o software da Microsoft Office® Excel versão 2007.

### *3.8.1 Seletividade e especificidade*

Primeiramente foram avaliadas as interferências no sinal do solvente, água ultrapura, metanol, diclorometano, dimetilformamida e dimetilsulfóxido no sinal do analito, a paroxetina. Para a análise do parâmetro seletividade foi preparada uma solução estoque da paroxetina a  $5,47 \cdot 10^{-4} \text{ molL}^{-1}$ , a qual foi acrescentada 80 mg da mistura dos excipientes amido 15%, polyox, 25%, etilcelulose 33%, magnésio 1%, cab-o-sil 1%, estabilizador 5% (ácido ascórbico e  $\alpha$ -ciclodextrina hidroxipropil), a mistura foi dissolvida e diluída sob agitação durante 30 minutos a 40°C. A solução estoque foi filtrada e diluída até as concentrações de  $4,56 \cdot 10^{-4}$ ;  $3,66 \cdot 10^{-4}$ ;  $2,73 \cdot 10^{-4}$ ;  $1,82 \cdot 10^{-4}$ ;  $0,91 \cdot 10^{-4} \text{ molL}^{-1}$  e analisadas por DC. Os resultados destas soluções foram comparados aos resultados obtidos das soluções preparadas apenas com o padrão secundário na ausência dos excipientes. A proporção de cada excipiente na mistura segue o *Handbook of Pharmaceutical Excipients* para a composição de comprimidos (PRX 20 mg e excipientes 80 mg). Os resultados obtidos das amostras na presença e na ausência dos excipientes foram avaliados estatisticamente.

### 3.8.2 Linearidade

As soluções estoques de cada uma das três curvas das soluções de referência foram preparadas  $5,47 \cdot 10^{-4} \text{ molL}^{-1}$  (0,25 L em 0,05 g) da PRX em água ultrapura. As três curvas das soluções de referência obtidas com 6 pontos foram preparadas diariamente com o padrão secundário da paroxetina nas concentrações molares de  $5,47 \cdot 10^{-4}$ ,  $4,56 \cdot 10^{-4}$ ;  $3,66 \cdot 10^{-4}$ ;  $2,73 \cdot 10^{-4}$ ;  $1,82 \cdot 10^{-4}$ ;  $0,91 \cdot 10^{-4}$ , a última diluição foi realizada em um pH 3,5, fosfato 5mM tampão. Cada uma das três curvas das soluções de referência construídas com 6 pontos por DC foi construída como no esquema de diluições ( figura 11) e para cada curva da solução de referência foi obtida a equação da reta. Na equação da reta foi obtido a intersecção com o eixo  $Y$ , coeficiente angular e desvio padrão relativo.

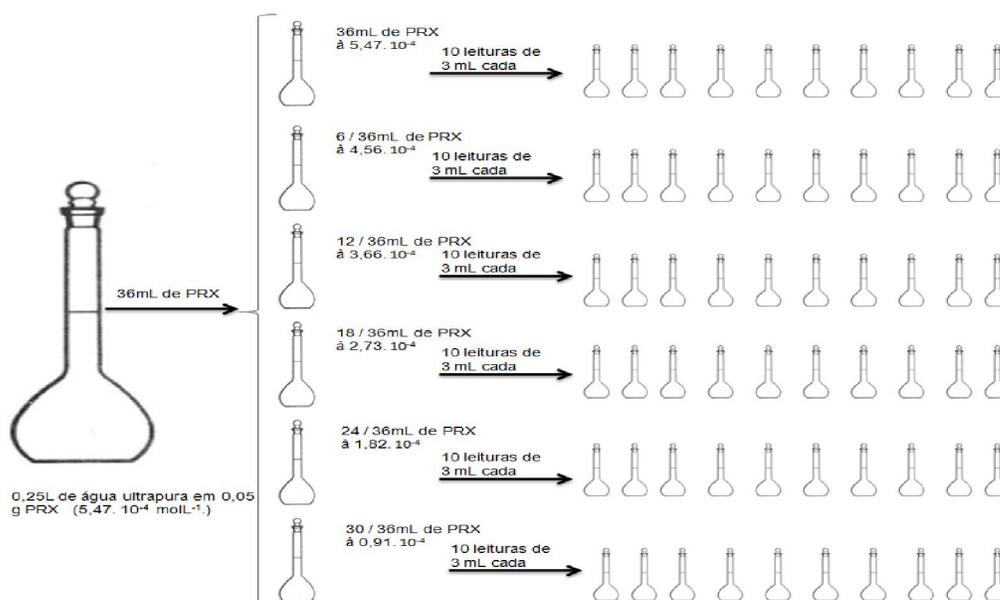


Figura 11: Esquema das diluições sucessivas a partir da solução estoque da PRX a  $5,47 \cdot 10^{-4} \text{ molL}^{-1}$ .

### 3.8.3 Limite de quantificação e detecção

Para a determinação do limite de quantificação e detecção utilizou-se as equações:  $LD = 3 \cdot s/S$  e  $LQ = 10 \cdot s/S$ .

O LD e o LQ foram obtidos a partir inclinação média das retas e valor do desvio padrão do intercepto com o eixo y das curvas das soluções de referência dos experimentos 1, 2 e 3.

#### *3.8.4 Intervalo*

A concentração teste foi de  $2,73 \cdot 10^{-4} \text{ molL}^{-1}$  no intervalo de  $1,82 \cdot 10^{-4}$  a  $3,66 \cdot 10^{-4} \text{ molL}^{-1}$ . O intervalo mais amplo foi definido pelas concentrações de  $5,47 \cdot 10^{-4}$ ;  $4,56 \cdot 10^{-4}$ ;  $3,66 \cdot 10^{-4}$ ;  $2,73 \cdot 10^{-4}$ ;  $1,82 \cdot 10^{-4}$ ;  $0,91 \cdot 10^{-4} \text{ molL}^{-1}$ , para a determinação quantitativa do princípio ativo em matéria-prima ou em fármacos.

#### *3.8.5 Precisão*

Para avaliar a repetitividade e precisão intermediária das análises foi aplicado o Teste F, grau de liberdade (n-1), com n (30) e o valor tabelado de 1,85, que foram comparados com o CV. Neste caso determinou-se a variância ( $S^2$ ) do conjunto de medidas, equação 10 (LEITE, 2002).

$$F = \text{Maior}_S^2 / \text{Menor}_S^2 \qquad \text{Equação 10}$$

Em seguida comparou-se o valor numérico obtido o com o valor tabelado. Se o resultado da equação for menor que o valor tabelado pode-se dizer que não houve diferença significada entre as duas precisões no nível de confiança de 5%, a recíproca e verdadeira.

As soluções foram preparadas nas concentrações molares de  $1,82 \cdot 10^{-4}$ ;  $2,73 \cdot 10^{-4}$  e  $3,66 \cdot 10^{-4}$  para os experimentos 1, 2 e 3.

##### *3.8.5.1 Repetitividade*

As soluções molares de  $1,82 \cdot 10^{-4}$ ;  $2,73 \cdot 10^{-4}$  e  $3,66 \cdot 10^{-4}$  foram preparadas e no mesmo dia e analisadas no mesmo equipamento nas mesmas condições de análises. Foi calculado a média e a estimativa de desvio padrão, a variância e o coeficiente de variação,  $\text{DPR} = (s / \bar{x}) \cdot 100$ , considerando-se os valores satisfatórios inferiores a 5%.

### 3.8.5.2 Precisão intermediária

A precisão intermediária foi avaliada através da comparação dos resultados obtidos em três dias consecutivos de 0, 24 e 48 horas com as soluções nas concentrações molares de  $1,82 \cdot 10^{-4}$ ;  $2,73 \cdot 10^{-4}$  e  $3,66 \cdot 10^{-4}$ . Foi calculado, o média, desvio padrão, a variância e o desvio padrão relativo inter-dia,  $RSD = (s / \bar{x}) \cdot 100$ , considerando-se os valores satisfatórios inferiores a 5%.

### 3.8.6 Exatidão

A exatidão (E) foi determinada através do erro do desvio padrão ou coeficiente de variação (CV), calculado pela razão entre a concentração média experimental e a concentração teórica. O Erro do desvio foi aplicado às soluções de concentrações molares de  $1,82 \cdot 10^{-4}$ ; de  $2,73 \cdot 10^{-4}$  e de  $3,66 \cdot 10^{-4}$ . Foi calculado o  $(CV) = (C_{MAP} / C_T) \cdot 100$ . O coeficiente de variação recomendado é menor ou igual a 15%.

A exatidão das amostras foram determinadas aplicando-se o teste *t* de *Student*, valor tabelado de 2,045 para o intervalo de confiança de 95%, para  $n = 30$ . (LEITE, 2002). O teste *t* foi verificado a partir da equação 11.

$$t = ( \bar{x} - \mu ) / ( s / n^{1/2} ) \quad \text{EQUAÇÃO 11}$$

#### 3.8.6.1 Recuperação

A recuperação das amostras nas concentrações molares ( $1,82 \cdot 10^{-4}$ ;  $2,73 \cdot 10^{-4}$  e  $3,66 \cdot 10^{-4}$ ) foram avaliadas pelas respostas das amostras não adicionada de padrão secundário da PRX com as amostras adicionadas de padrão secundário da PRX. Valores acima de 70% foram considerados aceitáveis, já as próximas de 100% são desejáveis. A recuperação foi calculada por  $R = ( C_{MAAP} - C_{MANAP} / C_T ) \cdot 100$ .

### *3.8.7 Robustez*

Para avaliar a robustez do método foram realizadas análises variando o número de scan ( $50 \text{ nmmin}^{-1}$  e  $100 \text{ nmmin}^{-1}$ ) e os tamanhos das cubetas (0,2 mm e 10 mm) nas concentrações molares de  $1,82 \cdot 10^{-4}$ ;  $2,73 \cdot 10^{-4}$ ;  $3,66 \cdot 10^{-4}$ .

#### *3.8.7.1 Variação do scan e da vazão do gás*

A variação do scan das leituras de cada espectro foram  $50 \text{ nm/ min}$  e em  $100 \text{ nm/ min}$  com vazão do gás (nitrogênio) de 0,5 para  $1 \text{ cm}^3$ , aplicadas às soluções da paroxetina nas concentrações:  $1,82 \cdot 10^{-4}$ ;  $2,73 \cdot 10^{-4}$ ;  $3,66 \cdot 10^{-4} \text{ molL}^{-1}$ . Os resultados foram comparados pelo valor desvio padrão relativo.

#### *3.8.7.2 Análises de diferentes volumes da amostra*

As análises das amostras da PRX foram avaliadas em volumes de 200  $\mu\text{L}$  e 3mL e em diferentes tamanhos de cubetas (0,2 e 10 mm), nas concentrações molares de:  $1,82 \cdot 10^{-4}$ ;  $2,73 \cdot 10^{-4}$ ;  $3,66 \cdot 10^{-4}$ . Os resultados foram comparados pelo valor do desvio padrão relativo.

### *3.9 Estabilidades das amostras analisadas por DC*

Foram preparadas soluções em concentrações molares de  $1,82 \cdot 10^{-4}$ ;  $2,73 \cdot 10^{-4}$ ;  $3,66 \cdot 10^{-4} \text{ molL}^{-1}$  para o estudo da estabilidade. As amostras armazenadas congeladas à  $-10^\circ\text{C}$  com ciclos de congelamento e descongelamento a temperatura ambiente de 0, 24 e 48 horas. Os resultados foram comparados pelo valor do desvio padrão.

### *3.10 Extração da paroxetina HCl do fármaco*

Os fármacos paroxetina HCl foram adquiridos em farmácia comercial na forma de comprimido. 30 comprimidos contendo cada fármaco com dosagens de 0,02 g de cloridrato de paroxetina, dos quais apenas 10 comprimidos foram macerados em almofariz com pistilo durante 20 minutos, produzindo um pó

branco homogêneo (2, 503 g). Toda a amostra macerada foi extraída com 100 mL de diclorometano. A solução foi por três vezes em sonicação durante 3 min. Em seguida a solução foi centrifugada por 10 minutos a 10.000 rotações por minutos (rpm), que após filtração e secagem em Rotavapor, 40 °C, produziu 0,19280 g do cloridrato de paroxetina.

### ***3.11 Análise por DC da paroxetina HCl do fármaco***

A solução foi preparada a  $5,47 \cdot 10^{-3} \text{ molL}^{-1}$  (0,01 L em 0,002 g) da PRX em água ultrapura. Para esta análise foram utilizados 3 mL de PRX a uma sensibilidade 100 mdeg, scan de  $50 \text{ nmmin}^{-1}$ , com resposta em 4 segundos para cada varredura. O espectro foi coletado no intervalo de comprimento de onda de 400 a 190 nm com 5 acumulações. O espectro da PRX foi subtraído do seu respectivo solvente.

### ***3.12 Segunda etapa: Desenvolvimento do método para as análises do biperideno***

Primeiramente realizou-se teste de resolução e da razão do sinal/ruído (a 25 °C) com diferentes solventes como água ultrapura, metanol, diclorometano (DCM), dimetilformamida (DMF) e dimetilsulfóxido (DMSO) todos PA. Para estas análises foram retiradas alíquotas de 200  $\mu\text{L}$  de cada solução para a análise de DC, sensibilidade 100 mdeg, scan de  $50 \text{ nmmin}^{-1}$ , resposta em 4 segundos para cada varredura. Foram realizadas 3 leituras de cada amostra e cada leitura obtida pela média de 3 acumulações. A faixa de comprimento de onda foi de 400 a 190 nm. Os espectros do analito foram subtraídos dos respectivos solventes. Nesta etapa foi observada a resolução e a razão do sinal/ruído dos cromóforos das amostras apresentados nos espectros. As análises foram realizadas no CETENE.

#### ***3.12.1 Análises das amostras do biperideno padrão secundário por ultravioleta***

As análises com as amostras do padrão secundário da biperideno apresentaram sinais para o cromóforo de transição – \* do anel aromático e

do alceno, com absorção entre 250 e 200 nm e entre 300 e 250 nm, respectivamente. Nas análises foram retiradas alíquotas de 3 mL das amostras e os espectros por UV para a BPR foram obtidos em 5 leituras, cada uma lida em triplicatas e medidos no de 263 nm. Para este comprimento de onda foi calculado absorvidade molar ( ). As análises com as amostras do BPR foram realizados no espectrofotômetro CENAPESQ. O espectro foi analisado na intervalo de comprimento de onda de 190-400 nm com células circulares de quartzo, com 10 mm.

### *3.12.2 Preparação da amostra do biperideno para análise por ultravioleta*

A amostra foi preparada a  $3,21 \cdot 10^{-4} \text{ molL}^{-1}$ , (0,1 L em 0,01 g) da BPR em água ultrapura.

### *3.13 Análise da resolução e da razão do sinal/ruído dos cromóforos do BPR obtidos por DC*

As análises das soluções preparadas a  $3,21 \cdot 10^{-3} \text{ molL}^{-1}$  (0,01 L em 0,01 g) da BPR em água ultrapura e as análises das soluções preparadas a  $3,21 \cdot 10^{-4} \text{ molL}^{-1}$  ( 0,01 L em 0,001g) de BPR em (metanol, DCM, DMF e DMSO) definiram a melhor resolução e razão do sinal/ruído do cromóforo. Foram retiradas alíquotas de 200  $\mu\text{L}$  de cada solução a 25°C para a análise de DC. Os espectros foram obtidos à sensibilidade 100 mdeg, o scan de  $50 \text{ nmmin}^{-1}$  com resposta em 4 segundos. Foram realizadas 5 leituras para cada concentração, cada uma obtida pela média de 5 acumulações, na faixa de comprimento de onda de 400 a 190 nm. O espectro do padrão secundário da BPR foi subtraído dos seus respectivos solventes.

### *3.14 Análise do biperideno padrão secundário obtido por DC*

Para as análises da solução preparada a  $3,21 \cdot 10^{-3} \text{ molL}^{-1}$  (0,01 L em 0,01 g) da BPR em água ultrapura foram retiradas alíquotas de 200  $\mu\text{L}$  de cada solução a 25°C para a análise de DC. O espectro foi obtido à sensibilidade 100 mdeg, o scan de  $50 \text{ nmmin}^{-1}$  com resposta em 4 segundos. Foram realizadas 5

leituras para cada concentração, cada uma obtida pela média de 5 acumulações, na faixa de comprimento de onda de 400 a 190 nm. O espectro do padrão secundário da BPR foi subtraído dos seus respectivos solventes.

### ***3.15 Extração do biperideno HCl do fármaco***

Os fármacos biperideno HCl foram adquiridos em farmácia comercial em forma de comprimido. 80 comprimidos contendo cada fármaco com dosagens de 0,002 g de cloridrato de biperideno, dos quais apenas 10 comprimidos foram macerados em almofariz com pistilo produzindo um pó branco homogêneo (1,296 g). Da amostra macerada foram retirados 0,6325 mg, a qual foi extraída com 100 mL de diclorometano. A solução foi por três vezes em sonicação durante 3 min. Em seguida a solução foi centrifugada por 10 minutos a 10.000 rotações por minutos (rpm), que após filtração e secagem em Rotavapor, 40 °C, produziu 0,00969 g gramas da matéria extraída do cloridrato biperideno.

### ***3.16 Análise por dicroísmo circular do biperideno HCl do fármaco***

A solução foi preparada a  $3,21 \cdot 10^{-4} \text{ molL}^{-1}$  (0,01 L em 0,001 g) do BPR extraído em água ultrapura. Para esta análise foram utilizados 3 mL de PRX em solução lidas a sensibilidade 100 mdeg, scan de  $50 \text{ nmmin}^{-1}$ , resposta em 4 segundos para cada varredura. O espectro foi obtido no intervalo de comprimento de onda de 400 a 190 nm com 5 acumulações. O espectro da PRX foi subtraído do solvente, isto é, solução contendo apenas água ultrapura.

### ***3.17 Análise dot eor do biperideno presente no fármaco por ultravioleta***

Partindo da solução estoque do padrão BPR ( $3,21 \cdot 10^{-4} \text{ molL}^{-1}$ ), foram realizadas diluições com água ultrapura para a obtenção das seguintes concentrações molares:  $0,321 \cdot 10^{-4}$ ;  $0,642 \cdot 10^{-4}$ ;  $0,953 \cdot 10^{-4}$ ;  $1,284 \cdot 10^{-4}$ ;  $1,605 \cdot 10^{-4}$ ;  $1,926 \cdot 10^{-4}$ ;  $2,247 \cdot 10^{-4}$ ;  $2,568 \cdot 10^{-4}$ ;  $2,889 \cdot 10^{-4}$ . A curva foi obtida em 10 pontos lidos em triplicata, medidos no de 263 nm. Os resultados obtidos foram tratados estatisticamente através do cálculo de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados, empregando o programa Excel do Office 2007.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A paroxetina e o biperideno apresentaram características organolépticas, solubilidade, pH e ponto de fusões semelhantes àqueles descritos nas monografias, ou seja, apresentaram-se na forma de pó branco cristalino solúvel em água:  $2,73 \cdot 10^{-4} \text{ molL}^{-1}$  e  $3,21 \cdot 10^{-3} \text{ molL}^{-1}$  respectivamente. Em solução têm pH 5,5 para a PRX e 5,2 para BPR. Os pontos de fusões da PRX e do BPR foram de  $135^{\circ}\text{C}$  e de  $236^{\circ}\text{C}$ .

### *4.1 Análise por dicroísmo circular para a paroxetina*

A estrutura química da paroxetina possui propriedades quiróticas, o que justificou o desenvolvimento do método por dicroísmo circular (Figura 12).

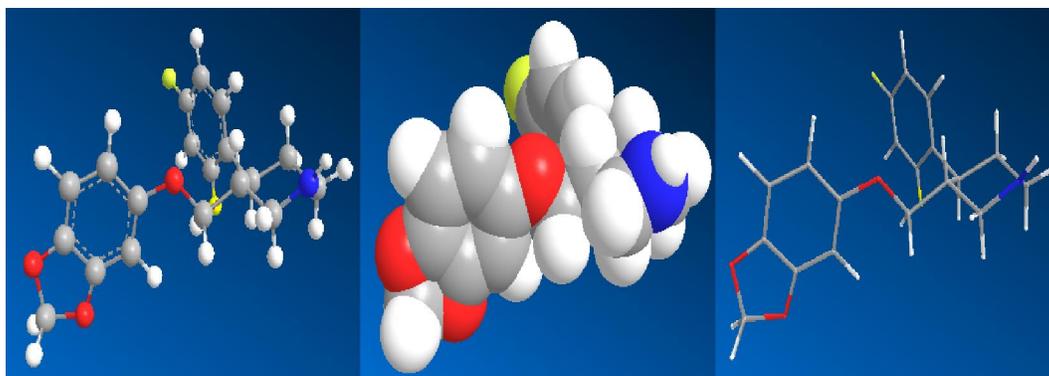


Figura 12: Estruturas tridimensionais para o cloridrato de paroxetina.

A figura 13 mostra o espectro da paroxetina por UV com bandas intensas na faixa de 200 a 250 nm, na concentração de  $2,73 \cdot 10^{-4} \text{ molL}^{-1}$ .

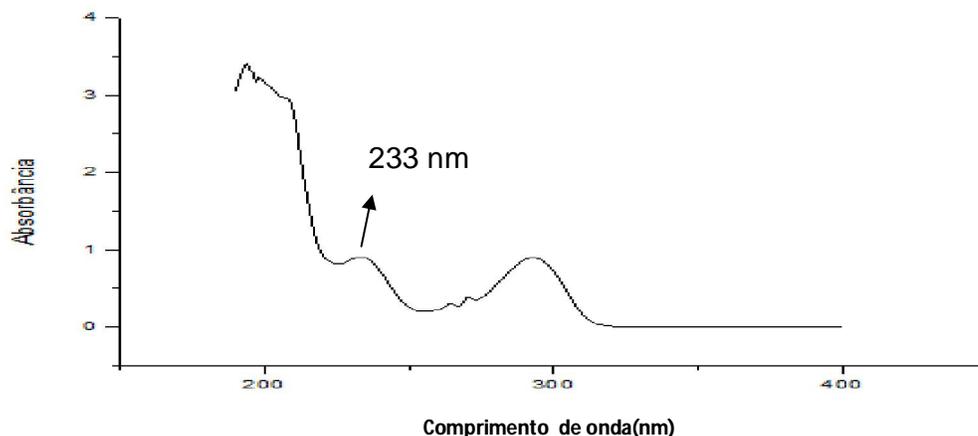


Figura 13: Espectro de ultravioleta da paroxetina em água ultrapura. Concentração de  $2,73 \cdot 10^{-4}$  molL<sup>-1</sup>, em cubeta de 10 mm.

A banda no comprimento de onda de 233 foi selecionada para os cálculos da absorvidade. Esta banda está associada ao cromóforo de transições  $\pi - \pi^*$  presente na estrutura da paroxetina. A absorbância no comprimento de onda selecionado foi de 0,992584, que apresentou absorvidade molar (  $\epsilon$  ) de 3054,69 Lmol<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> calculada pela equação 12 de Lei de *Lambert-Beer*.

$$A = \epsilon \cdot l \cdot c$$

EQUAÇÃO 12

$\epsilon$  = absorbitividade molar em unidades de L.mol<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>

l = caminho óptico em unidade de cm. Sabendo-se que 10 mm = 1cm

c = concentração em unidade molL<sup>-1</sup>

$$\begin{aligned} 0,83393 &= \epsilon \cdot 1 \cdot 2,73 \cdot 10^{-4} \\ \epsilon &= 3054,69 \text{ Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1} \end{aligned}$$

#### ***4.2 Resolução e razão do sinal/ruído obtido para o cromóforo da paroxetina***

A paroxetina foi analisada por DC em DCM, DMF e DMSO, metanol e água ultrapura para escolha do solvente que mostrasse melhor resolução e razão sinal/ruído. Foram observados que os resultados das análises por DC para as soluções da paroxetina, padrão secundário, independente dos solventes

utilizados apresentaram picos mínimos e máximos intensos, sendo, portanto solúveis em todos os solventes (Figura 14-18).

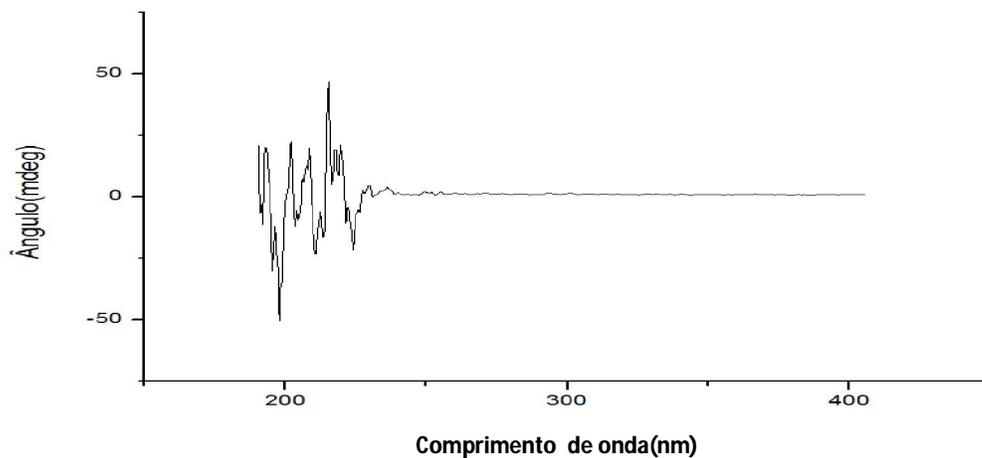


Figura 14: Espectro de dicroísmo circular da paroxetina em diclorometano na concentração de  $5,47 \cdot 10^{-4} \text{ molL}^{-1}$ , em cubeta de 0,2 mm.

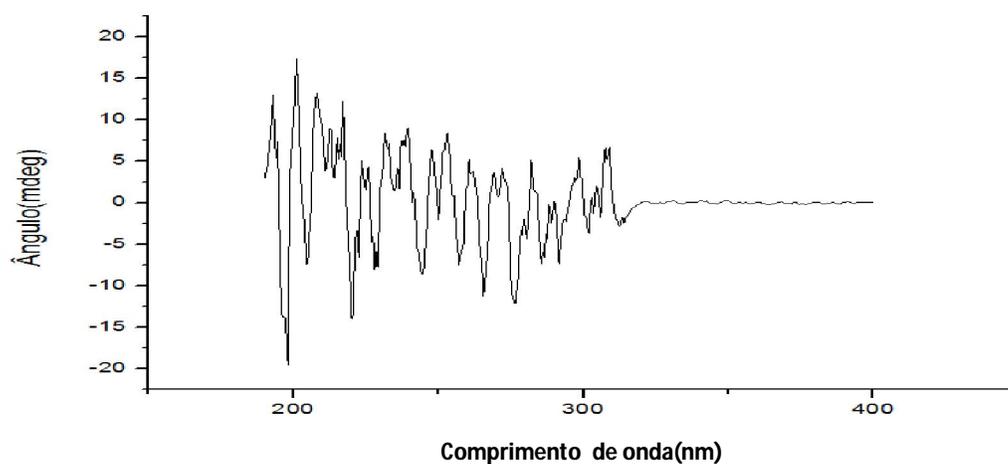


Figura 15: Espectro de dicroísmo circular da paroxetina em dimetilformamida na concentração de  $5,47 \cdot 10^{-4} \text{ molL}^{-1}$ , em cubeta de 0,2 mm.

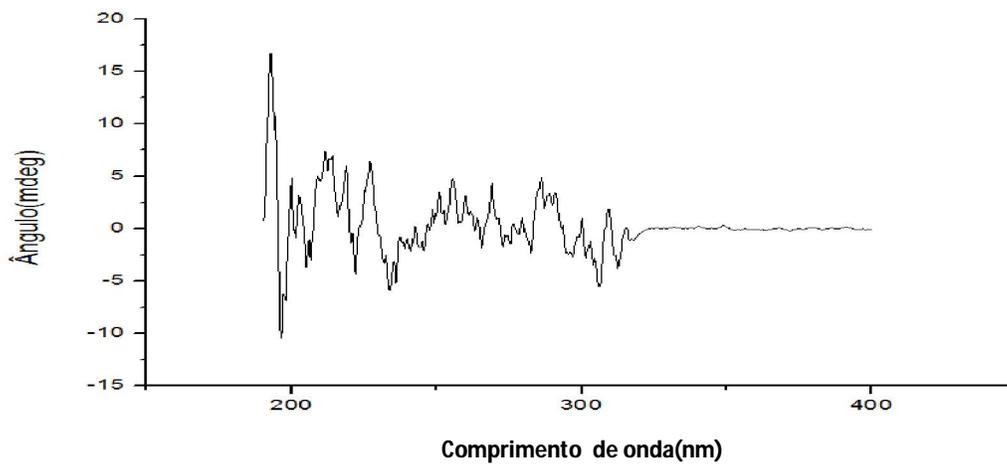


Figura 16: Espectro de dicroísmo circular da paroxetina em dimetilsulfóxido na concentração de  $5,47 \cdot 10^{-4} \text{ molL}^{-1}$ , em cubeta de 0,2 mm.

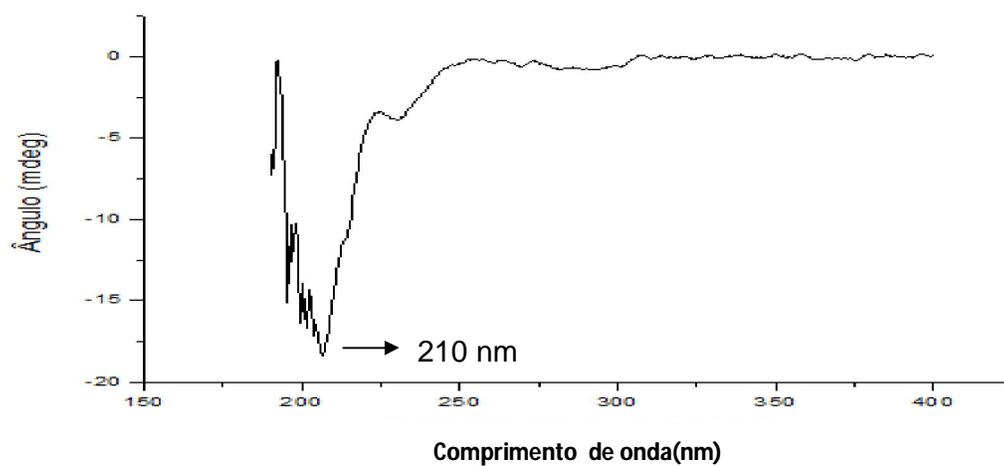


Figura 17: Espectro de dicroísmo circular da paroxetina em metanol na concentração de  $5,47 \cdot 10^{-4} \text{ molL}^{-1}$ , em cubeta de 0,2 mm.

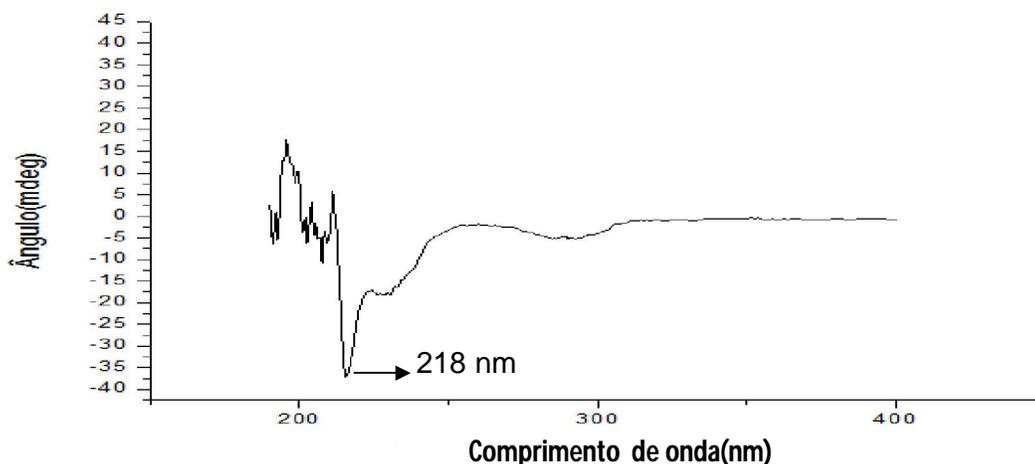


Figura 18: Espectro de dicroísmo circular da paroxetina em água ultrapura na concentração de  $5,47 \cdot 10^{-4} \text{ molL}^{-1}$ , em cubeta de 10 mm.

Uma melhor resolução e razão do sinal/ruído dos espectros da PRX obtidos por DC foram obtidos nas soluções preparadas em metanol e água ultrapura.

Foi selecionada a água como solvente para o desenvolvimento do método, em vez do metanol, pois a água por não ser tóxica, e não poluente, além de ter apresentada a maior diferença dicróica no espectropolarímetro. O espectro de dicroísmo da paroxetina em metanol apresentou um EC negativo em 210 nm com ângulo de rotação de 17,19 mdeg, enquanto em água ultrapura o EC intenso e negativo, que foi observado em 218 nm com ângulo de rotação de -37,4653 mdeg.

#### ***4.3 Desenvolvimento do método por DC***

Considerando que a PRX apresentou propriedades *quiróptica*, iniciou-se o desenvolvimento do método por DC.

O desenvolvimento do método seguiu os parâmetros recomendados pela ANVISA resolução RDC 899, de 29 de maio de 2003 e o guia do ICH – Q5, 2005. Para o desenvolvimento do método por DC foi utilizado um padrão secundário da paroxetina.

### 4.3.1 Seletividade e especificidade

Primeiramente analisou-se a interferência do solvente, a água, nos sinais obtidos para a paroxetina por dicroísmo circular. A figura 19 mostra simultaneamente os espectros de dicroísmo circular da paroxetina e da água ultrapura. No espectro da paroxetina em água ultrapura não foi observado Efeito Cotton coincidindo com os sinais da amostra. Os sinais da paroxetina são referentes os cromóforos, anéis aromáticos, próximos dos centros quirais.

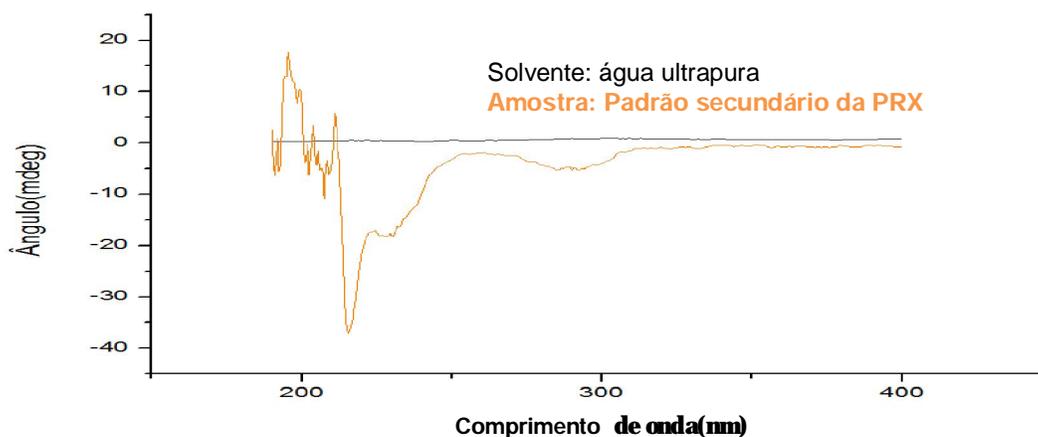


Figura 19: Espectro de dicroísmo circular da paroxetina em água ultrapura na concentração de  $5,47 \cdot 10^{-4} \text{ molL}^{-1}$  e do solvente, água ultrapura, em cubeta de 10 mm.

A seletividade do método por DC também foi realizada ao contaminar a solução padrão de referência da PRX com os excipientes (interferentes). Os excipientes utilizados foram os mesmos que fazem parte da composição do medicamento comercializado. A proporção de cada excipiente na mistura segue o *Handbook of Pharmaceutical Excipients* para a composição das cápsulas da PRX (páginas 53 e 54). A figura 20 mostra o EDC dos excipientes em água ultrapura.

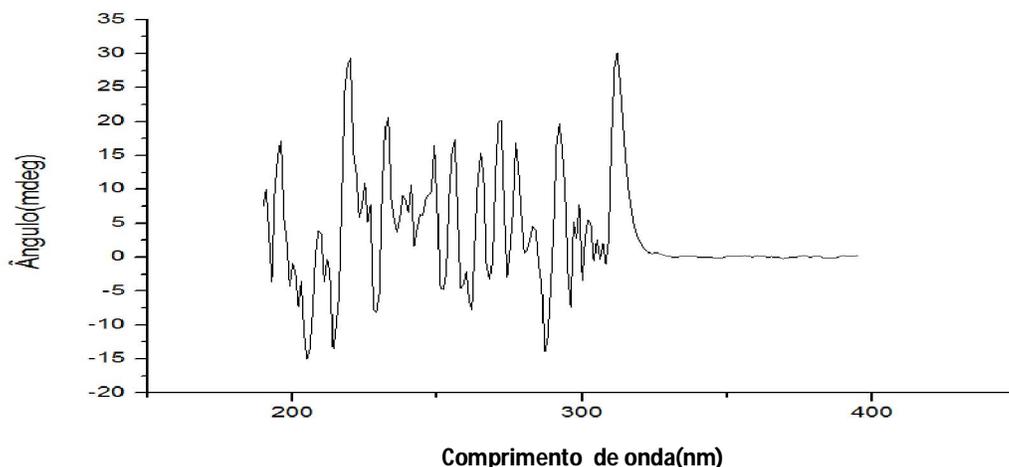


Figura 20: Espectro de dicroísmo circular da mistura de excipientes em água ultrapura no intervalo de comprimento de onda de 400 a 190 nm.

As soluções contendo o padrão mais excipientes foram centrifugadas por 10 minutos a 10.000 rpm. As análises das soluções nas seguintes situações: padrão e os excipientes, padrão e excipientes centrifugados, e padrão e excipientes centrifugados e filtrados. Foi observado que, de alguma forma a membrana do papel de filtro testado apresenta interferência no resultado experimental, reduzindo significativamente o valor do ângulo de rotação, expresso em milidegree (mdeg).

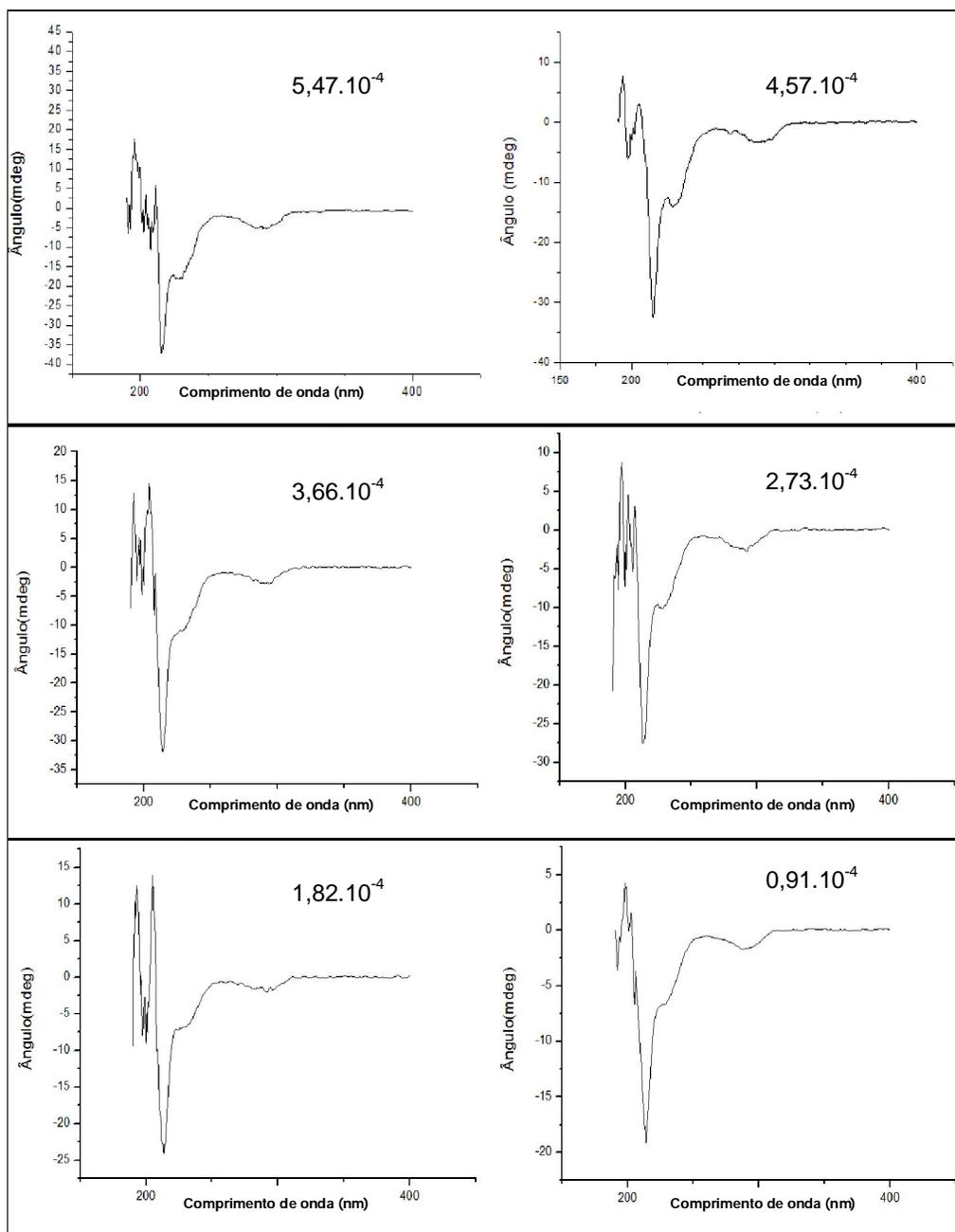
#### 4.3.2 Linearidade

A linearidade do método por DC foi testada em 218 nm no intervalo de concentrações molares de  $5,47 \cdot 10^{-4}$ ;  $4,56 \cdot 10^{-4}$ ;  $3,66 \cdot 10^{-4}$ ;  $2,73 \cdot 10^{-4}$ ;  $1,82 \cdot 10^{-4}$  e  $0,91 \cdot 10^{-4}$ , no qual foram apresentados os ângulos em mdeg de -19,1794, -24,3641, -27,5171, -31,7101, -34,5719 e 37,4653, respectivamente (quadro 2).

Quadro 2: Concentrações da paroxetina, padrão secundário, selecionados para construção da curva da solução de referência.

Solução estoque	Razão entre a solução estoque e o solvente	Concentração do PRX ( $\text{molL}^{-1}$ )	Ângulo (mdeg)
0,05 g em 0,25 L	1 mL em 5 mL	$0,91 \cdot 10^{-4}$	-19,1794
0,05 g em 0,25 L	2 mL em 4 mL	$1,82 \cdot 10^{-4}$	-24,3641
0,05 g em 0,25 L	3 mL em 3 mL	$2,73 \cdot 10^{-4}$	-27,5171
0,05 g em 0,25 L	4 mL em 2 mL	$3,66 \cdot 10^{-4}$	-31,7101
0,05 g em 0,25 L	5 mL em 1 mL	$4,56 \cdot 10^{-4}$	-34,5719
0,05 g em 0,25 L	Sem diluição	$5,47 \cdot 10^{-4}$	-37,4653

A figura 21 mostra os seis espectros de dicroísmo circular das referentes às seis amostras.



Figuras 21: Espectros de dicroísmo circular da paroxetina em água ultrapura no intervalo de  $5,47 \cdot 10^{-4}$  a  $0,91 \cdot 10^{-4}$  molL<sup>-1</sup>, em cubeta de 10 mm.

No intervalo escolhido ( $5,47 \cdot 10^{-4}$  a  $0,91 \cdot 10^{-4}$  molL<sup>-1</sup>) foram traçadas três curvas das soluções de referência, figura 22 e tabela 5. As curvas das soluções

de referência foram obtidas por uma relação diretamente proporcional entre o ângulo (mdeg) e a concentração ( $\text{molL}^{-1}$ ) no comprimento de onda de 218 nm.

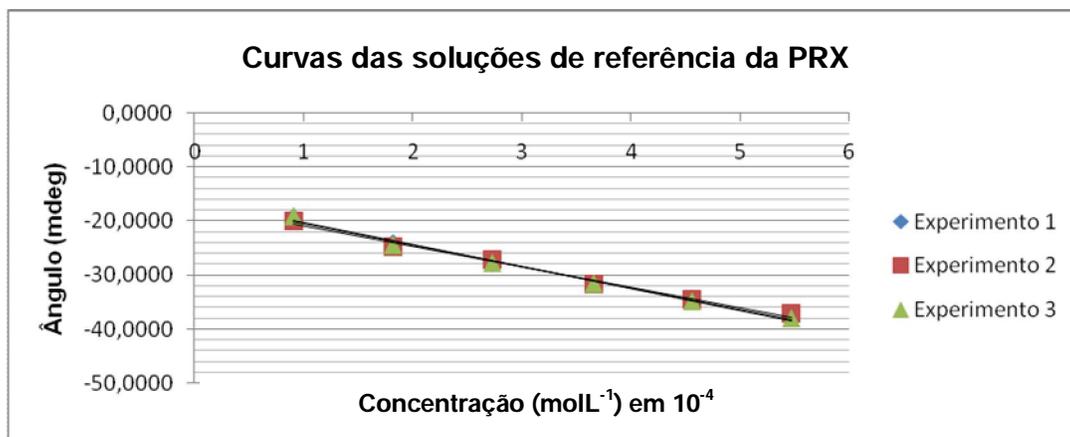


Figura 22: Representação das curvas das soluções de referência da paroxetina em água ultrapura no intervalo de concentração de  $0,91 \cdot 10^{-4} \text{ molL}^{-1}$  a  $5,47 \cdot 10^{-4} \text{ molL}^{-1}$ , medidos no de 218 nm.

Tabela 5: Resultados das curvas das soluções de referência obtidas para a paroxetina em água ultrapura.

Experimento	Numero de leitura (n)	Coefficiente angular (a)	Coefficiente linear (b)	Coefficiente de correlação ( $r^2$ )
1	10	-3,757	-17,19	0,990
2	10	-4,065	-16,22	0,991
3	10	-3,968	-16,43	0,991
<b>Média</b>		-3,93	-16,613	
<b>S</b>		0,104	0,254	
<b>% CV</b>		2,65	1,53	

Observou-se que o coeficiente de correlação de todos os experimentos foi no mínimo igual a 0,99. Esses valores estiveram dentro do critério mínimo aceitável pela ANVISA,  $r^2 \geq 0,99$ . Indicando baixa dispersão entre os dados.

As curvas analíticas apresentaram (CV) expresso em porcentagem (%), os valores foram de 2,65% para o coeficiente angular e de 1,53% para o coeficiente linear. Esses valores estiveram dentro do critério aceitável pela ANVISA e ICH que é menor ou igual a 15%.

A tabela 6 mostrou a média dos ângulos obtidos para as 10 leituras de cada uma das concentrações dos experimentos 1, 2, e 3 dentro do intervalo de referência amplo ( $5,47 \cdot 10^{-4}$  a  $0,91 \cdot 10^{-4} \text{ molL}^{-1}$ ).

Tabela 6: Valores dos ângulos da média das 10 leituras, cada uma obtida pela média de 5 acumulações e em cada um dos 6 pontos da curva da solução de referência para a paroxetina, medidos no de 218 nm.

Concentração (molL <sup>-1</sup> ) em 10 <sup>-4</sup>	*Exp. 1	*Exp. 2	*Exp. 3	Média	Desvio Padrão	Coef. de variação
0,91	-19,2100	-19,9601	-18,9681	-19,3794	0,5172	2,0264
1,82	-24,0166	-24,7115	-24,3489	-24,3590	0,3475	1,5189
2,73	-27,7780	-27,0925	-27,6808	-27,5171	0,3709	1,3478
3,66	-31,5273	-31,6929	-31,4836	-31,5579	0,1104	1,0244
4,56	-34,6040	-34,5398	-34,7760	-34,6399	0,1221	0,3526
5,47	-37,8005	-37,1505	-34,9303	-37,6271	0,4178	1,0204

\* Cada valor de ângulo das amostras do padrão secundário da PRX obtidos nos experimentos 1, 2 e 3 foram obtidos por 10 leituras para cada concentração, e cada uma obtida pela média de cinco acumulações (n=30).

Foi observado que os coeficientes de variações entre os três experimentos apresentou a média de 1,2547%, dentro do mínimo aceitável pela ANVISA e ICH, que menor ou igual 15%.

Na figura 23 estão apresentados espectros sobrepostos das leituras das amostras dos experimentos 1, 2 e 3.

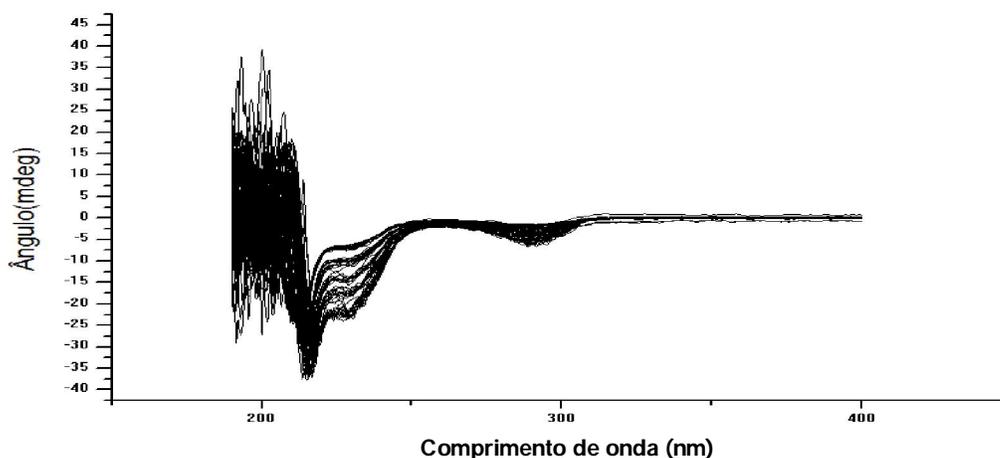


Figura 23: Espectros sobrepostos de todas as análises por dicroísmo circular da paroxetina em água ultrapura no intervalo de  $5,47 \cdot 10^{-4}$  a  $0,91 \cdot 10^{-4}$ , em cubeta de 10 mm.

O gráfico (Figura 24) obtido pelo método dos mínimos quadrados, apresentou a inclinação da reta média de -3,93 e o desvio padrão do intercepto das três curvas de 0,254. O valor médio obtido a partir da média do coeficiente de correlação das três retas (os três experimentos) foi 0,9907.

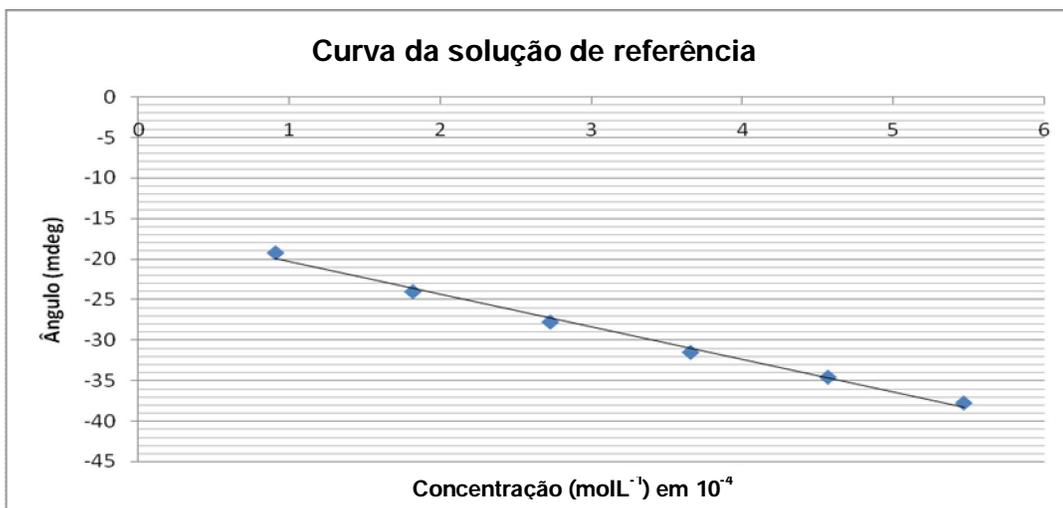


Figura 24: Representação gráfica da curva da solução de referência da paroxetina em água ultrapura, medidos no de 218 nm por dicroísmo circular. Equação da reta:  $y = -3,93x - 16,613$  e o  $r^2$  0,9907.

Na figura 25 estão os espectros da curva da solução de referência da PRX, medido no de 218 nm.

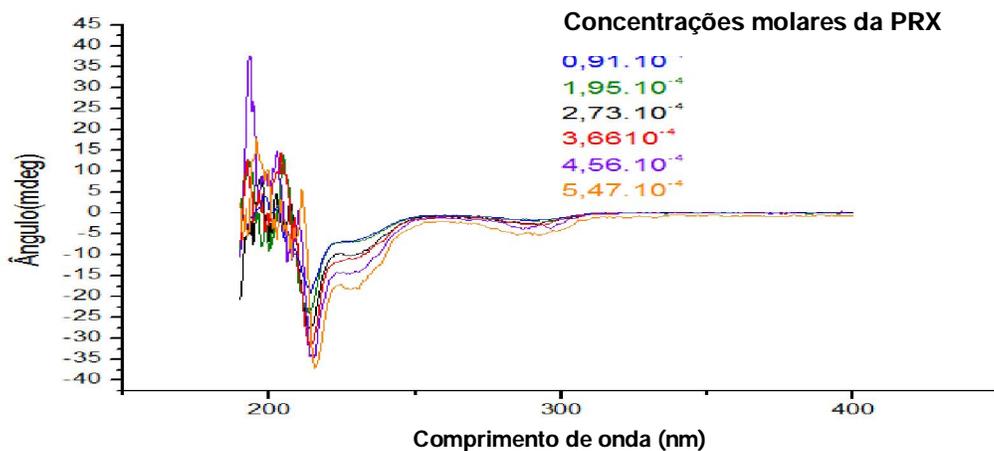


Figura 25: Espectros de dicroísmo circular do padrão secundário da paroxetina em água ultrapura no intervalo de de 400 a 190 nm, em cubeta de 10 mm.

#### *4.3.3 Limite de detecção e limite de quantificação*

Nos experimentos realizados para as curvas padrões (tabela 5), foram observados os LD e LQ, que foram calculados através do intercepto da curva média com valor de -16,613 e da estimativa dos valores de desvio padrão do intercepto com o eixo y com valor de 0,254. Os valores de limite de detecção (LD=  $0,197 \cdot 10^{-4} \text{ molL}^{-1}$ ) e limite de quantificação (LQ=  $0,656 \cdot 10^{-4} \text{ molL}^{-1}$ ).

$$\text{LD} = 0,254 / | -16,613 | \times 3$$

$$\text{LD} = 0,197 \cdot 10^{-4} \text{ molL}^{-1}$$

$$\text{LQ} = 0,254 / | -16,613 | \times 10$$

$$\text{LQ} = 0,656 \cdot 10^{-4} \text{ molL}^{-1}$$

#### *4.3.4 Intervalo*

Para definição da faixa do intervalo considerou-se a concentração de  $2,73 \cdot 10^{-4} \text{ molL}^{-1}$ , como concentração teste, o intervalo de concentração molar de  $0,182 \cdot 10^{-4}$  a  $3,66 \cdot 10^{-4}$ . Esse intervalo abrange uma faixa mais ampla do que a definida pela ANVISA de 80 a 120 % da concentração teste no caso de ensaios de uniformidade de conteúdo. Portanto, esse intervalo também atende os limites estabelecidos para a determinação quantitativa do princípio ativo da matéria-prima ou em fármacos.

#### *4.3.5 Repetitividade*

A repetitividade obtida pela média da variância foi de 0,002, o que indica que o método apresenta uma boa repetitividade, pois estes valores são inferiores a 5%. A tabela 7 apresenta os dados das análises referentes ao estudo repetitividade.

Tabela 7: Resultado da repetitividade nas concentrações experimentais para paroxetina em água ultrapura.

Conc. teórica (molL <sup>-1</sup> ) em 10 <sup>-4</sup>	Conc. Exp. 1	Conc. Exp. 2	Conc. Exp. 3	*Média	Desvio Padrão	Coef. de variação	Variância
1,82	1,88	1,97	1,97	1,94	0,052	2,68	0,0027
2,73	2,84	2,66	2,81	2,77	0,096	3,46	0,0032
3,66	3,78	3,83	3,79	3,8	0,023	0,50	0,00005
Média						2,21	0,002

\* Cada valor de concentração das amostras do padrão secundário da PRX foi obtido por 10 leituras para cada concentração e cada uma obtida pela média de cinco acumulações, aplicados aos experimentos 1,2 e 3 (n = 30).

#### 4.3.5.1 Precisão intermediária

A precisão intermediária apresentou o valor da média da variância foi de 0,0026, os valores foram satisfatórios e inferiores de 5%. A tabela 8 apresenta os dados referentes às análises da precisão intermediária.

Tabela 8: Resultado da precisão intermediária nas concentrações experimentais para paroxetina em água ultrapura.

Conc. teórica (molL <sup>-1</sup> ) em 10 <sup>-4</sup>	Conc. Exp. 1	Conc. Exp. 2	Conc. Exp. 3	*Média	Desvio Padrão	Coef. de variação	Variância
	1,88	1,87	1,80				
1,82	1,92	1,87	1,80	1,83	0,056	3,06	0,0032
	1,78	1,78	1,76				
	2,84	2,66	2,71				
2,73	2,69	2,78	2,79	2,74	0,056	2,2	0,0031
	2,73	2,75	2,71				
	3,69	3,73	3,79				
3,66	3,75	3,70	3,79	3,73	0,04	1,07	0,0016
	3,69	3,76	3,71				
Média						2,11	0,0026

\* Cada valor de concentração das amostras do padrão secundário da PRX foi obtido por 10 leituras para cada concentração e cada uma obtida pela média de cinco acumulações, aplicados aos experimentos 1,2 e 3 (n = 30).

Comparando-se o resultado da média da variância da repetitividade com o valor da média da precisão intermediária foi obtido um quociente de 1,32, que é menor que o valor tabelado de 1,85 para  $n = 30$ . Observa-se que não houve diferença significativa entre os resultados das amostras realizadas no mesmo dia e nos três dias diferentes e consecutivos, o valor esteve abaixo de 5%.

#### 4.3.6 Exatidão

Na tabela 9, são mostrados os dados para o estudo da exatidão.

Tabela 9: Resultado da exatidão nas concentrações experimentais para paroxetina em água ultrapura.  $t_{95\%(n-1)} = 2,045$ .

Conc. teórica (molL <sup>-1</sup> ) em 10 <sup>-4</sup>	Conc. Exp. 1	Conc. Exp. 2	Conc. Exp. 3	*Média	Desvio Padrão	%CV	E(%)	$\lambda(95\%)$
	1,88	1,87	1,80					
1,82	1,92	1,87	1,80	1,83	0,056	3,06	100,5	1,48
	1,78	1,78	1,76					
	2,84	2,66	2,71					
2,73	2,69	2,78	2,79	2,74	0,056	2,2	100,3	0,6
	2,73	2,75	2,71					
	3,69	3,73	3,79					
3,66	3,75	3,70	3,79	3,73	0,04	1,07	101,9	2,74
	3,69	3,76	3,71					

\* Cada valor de concentração das amostras do padrão secundário da PRX foi obtido por 10 leituras para cada concentração e cada uma obtida pela média de cinco acumulações, aplicas aos experimentos 1,2 e 3 ( $n = 30$ ).

As concentrações molares teóricas foram ( $1,82 \cdot 10^{-4}$ ;  $2,73 \cdot 10^{-4}$  e  $3,66 \cdot 10^{-4}$ ) e a média das concentrações molares experimentais foram ( $1,87 \cdot 10^{-4}$ ;  $2,76 \cdot 10^{-4}$  e  $3,8 \cdot 10^{-4}$ ).

As médias das porcentagens dos coeficientes de variação foram 3,06 para a concentração teórica ( $1,82 \cdot 10^{-4}$  molL<sup>-1</sup>), 2,2 para a concentração teórica ( $2,73 \cdot 10^{-4}$  molL<sup>-1</sup>) e 1,07 para a concentração teórica ( $3,66 \cdot 10^{-4}$  molL<sup>-1</sup>). As exatidões ficaram entre 100,5 e 101,9%, com média em 100,9%. Os valores dos

CV estão abaixo de 15 %, logo apresentam baixa dispersão. Observa-se que o  $t_{\text{calculado}}$  foi menor do que o  $t_{\text{tabelado}}$  nos níveis baixo e médio do intervalo de referência de  $3,66 \cdot 10^{-4}$  a  $1,82 \cdot 10^{-4} \text{ molL}^{-1}$ , o que permite concluir que o método apresentou exatidão no intervalo de confiança de 95%.

#### 4.3.6.1 Recuperação

Na tabela 10, mostra os resultados da recuperação das análises das amostras adicionadas e não adicionadas do padrão secundário da paroxetina em água ultrapura obtidos por DC.

Tabela 10: Resultados das análises das amostras adicionadas e não adicionadas do padrão secundário da paroxetina em água ultrapura obtidos por DC.

*CMANAP (molL <sup>-1</sup> ) em 10 <sup>-4</sup>	**CMAAP (molL <sup>-1</sup> ) em 10 <sup>-4</sup>	R (molL <sup>-1</sup> )	R(%)	Média	Desvio Padrão	%CV
1,86	1,83	1,65	90,2			
1,91	1,87	2,19	117,1	99,2	0,035	0,74%
1,84	1,81	1,65	90,2			
2,76	2,69	2,56	95,2			
2,73	2,66	2,56	96,2	90,4	0,02	1,42%
2,8	2,74	2,19	79,9			
3,78	3,66	3,28	89,6			
3,8	3,68	3,28	89,1	93,9	0,035	0,37%
3,83	3,69	3,82	103,5			

\* Cada valor de concentração das amostras não adicionadas de padrão secundário da PRX foi obtido por 10 leituras para cada concentração e cada uma obtida pela média de cinco acumulações. (n=30)

\*\* Cada valor de concentração das amostras adicionadas de padrão secundário da PRX foi obtido por 10 leituras para cada concentração e cada uma obtida pela média de cinco acumulações. (n=30)

As médias das concentrações molares das amostras não adicionadas do padrão secundário da paroxetina foram ( $1,87 \cdot 10^{-4}$ ;  $2,76 \cdot 10^{-4}$  e  $3,8 \cdot 10^{-4}$ ) e a

média das concentrações molares das amostras adicionadas do padrão secundário da paroxetina foram ( $1,84 \cdot 10^{-4}$ ;  $2,69 \cdot 10^{-4}$  e  $3,68 \cdot 10^{-4}$ ).

A recuperação das amostras da paroxetina foi ( $1,83 \cdot 10^{-4}$ ;  $2,44 \cdot 10^{-4}$  e  $3,46 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ ), quando expresso em (%) foram (99,2; 90,4 e 93,9) com erro de desvio padrão (0,035; 0,02; 0,035), respectivamente. O valor da média da recuperação foi de 94,5%, próximo do valor desejado para ANVISA que é de 100%.

#### *4.3.7 Robustez*

##### *4.3.7.1 Variação do scan e da vazão do gás*

Na tabela 7 (p. 73) estão mostrados os valores dos coeficientes de variação (2,68; 3,46 e 0,50) quando se variou os scans de  $100 \text{ nmmin}^{-1}$  e  $50 \text{ nmmin}^{-1}$  com a vazão do gás (nitrogênio) de 0,5 para  $1 \text{ cm}^3$ , respectivamente. Os valores dos CV foram abaixo do valor de 5%, recomendado pela ANVISA, indicando baixa dispersão entre os dados.

##### *4.3.7.2 Análises de diferentes volumes da amostra*

Na tabela 8 (p. 73) estão mostrados os valores dos coeficientes de variação (3,06; 2,2 e 1,07) para os volumes de 200  $\mu\text{L}$  e 3mL das amostras da paroxetina, realizadas em cubetas de tamanhos diferentes (0,2 e 10 mm). Os valores do CV foram abaixo de 5 %, recomendado pela ANVISA, indicando baixa dispersão entre os dados.

#### *4.3.8 Estabilidades das amostras analisadas*

Os resultados das leituras das amostras obtidos em 0, 24 e 48, indicam que as soluções são estáveis nesse tempo.

#### 4.3.9 Análise do cloridrato de paroxetina extraído do fármaco

O EDC para o cloridrato de biperideno paroxetina extraído mostrou um EC com sinais semelhantes aos EDC da paroxetina padrão secundário. (Figura 26).

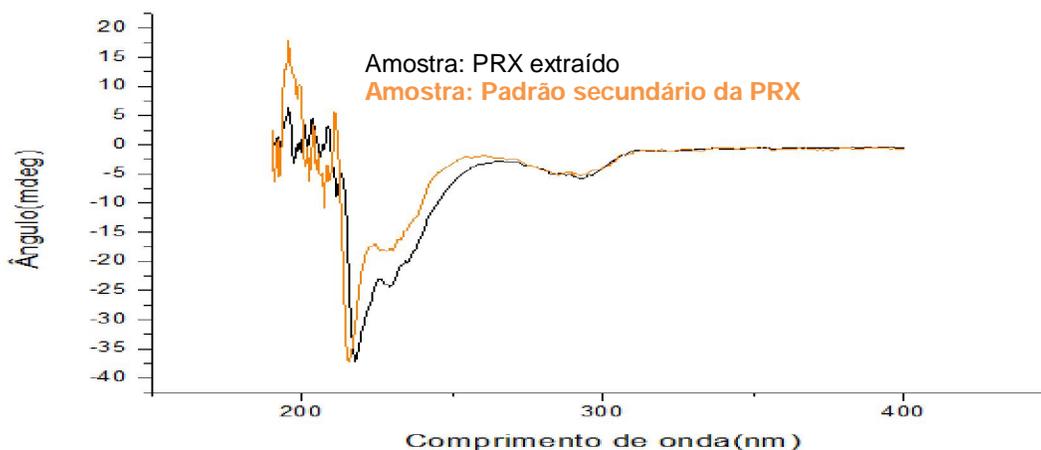


Figura 26: Espectros de dicroísmo circular da paroxetina extraída do fármaco cloridrato de paroxetina em água ultrapura e do padrão secundário da paroxetina na concentração de  $5,47 \cdot 10^{-4} \text{ molL}^{-1}$ , em cubeta de 0,2 mm.

O espectro do dicroísmo circular da paroxetina, em padrão secundário e em produto extraído do fármaco, apresentou semelhança no sinal obtido. O ângulo para o padrão secundário da paroxetina foi de -37,4653 mdeg e para o produto extraído do cloridrato de paroxetina foi de -36,9437 mdeg em 218 nm e 216,5 nm, respectivamente.

#### 4.4 Dicroísmo circular para o padrão secundário do biperideno

Considerando que a o princípio ativo comercializada do biperideno não é uma mistura racêmica verdadeira iniciou-se análise qualitativa do biperideno, padrão secundário. A definição da faixa do comprimento de onda mais adequado para análise qualitativa do biperideno foi selecionado por UV entre 190 a 400 nm (figura 27).

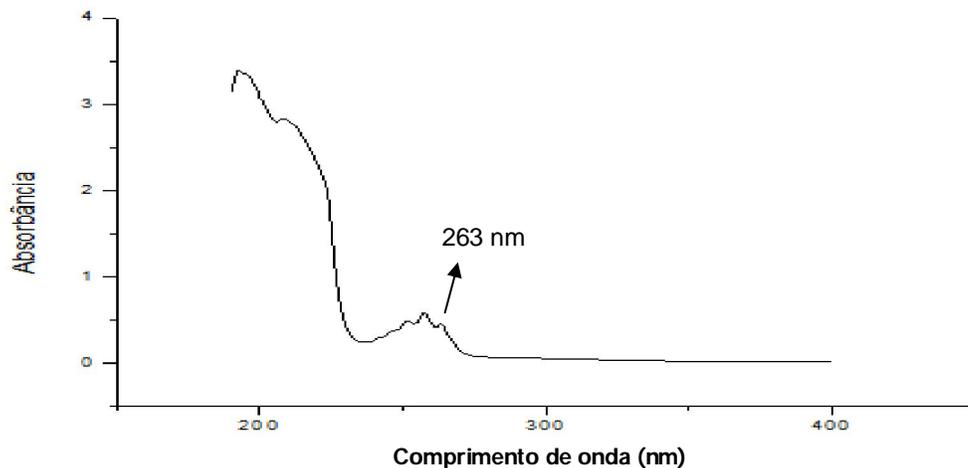


Figura 27: Espectro de ultravioleta do biperideno em água ultrapura. Concentração de  $3,21 \cdot 10^{-4}$  molL<sup>-1</sup>, em cubeta de 10 mm.

No comprimento de onda de 263 nm foi observada absorção referente aos cromóforos (anel aromático e alceno) de transições  $\pi - \pi^*$  presentes na amostra do BPR. A absorbância no comprimento de onda selecionado, 263 nm, foi de 0,45465, que apresentou absorvidade molar (  $\epsilon$  ) de 1416,35 Lmol<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>.

$$0,45465 = \epsilon \cdot l \cdot c$$

$$= 1416,35 \text{ Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$$

A figura 28 apresenta o espectro de UV do BPR obtido por cálculos teóricos. O valor do  $\epsilon$  é de aproximadamente 120 Lmol<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> em 275 nm.

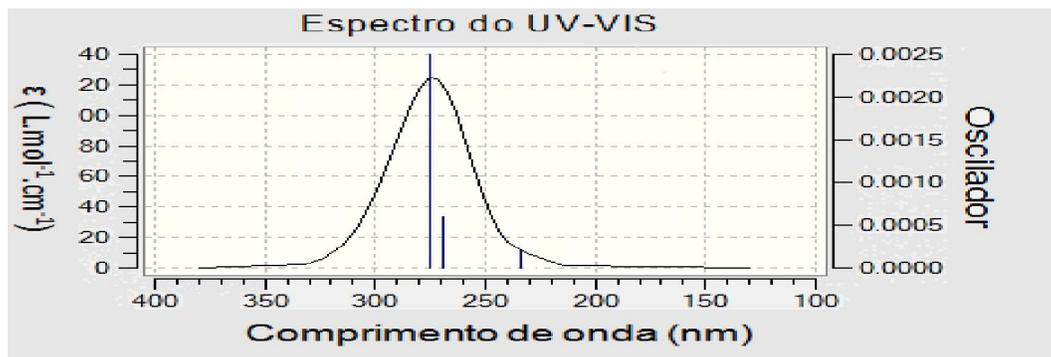


Figura 28: Espectro de ultravioleta do biperideno obtido por cálculo teórico.

#### 4.5 Resolução e razão do sinal/ruído dos cromóforos do BPR obtidos por DC

Foram realizados teste de resolução e da razão do sinal/ruído dos cromóforos do BPR nos espectros em diferentes solventes ( DCM, DMF, DMSO e metanol e água ultrapura) por DC (Figuras 29-33).

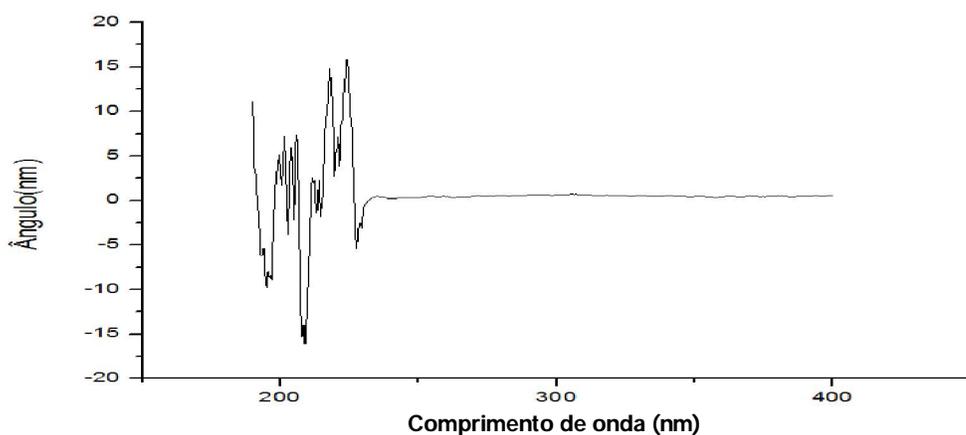


Figura 29: Espectro de dicroísmo circular do biperideno em diclorometano na concentração de  $3,21 \cdot 10^{-4} \text{ molL}^{-1}$ , em cubeta de 0,2 mm.

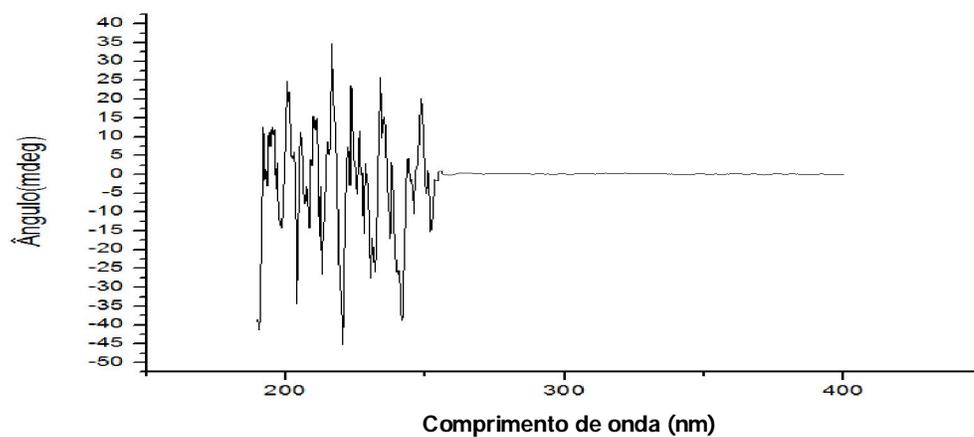


Figura 30: Espectro de dicroísmo circular do biperideno em dimetilformamida na concentração de  $3,21 \cdot 10^{-4} \text{ molL}^{-1}$ , em cubeta de 0,2 mm.

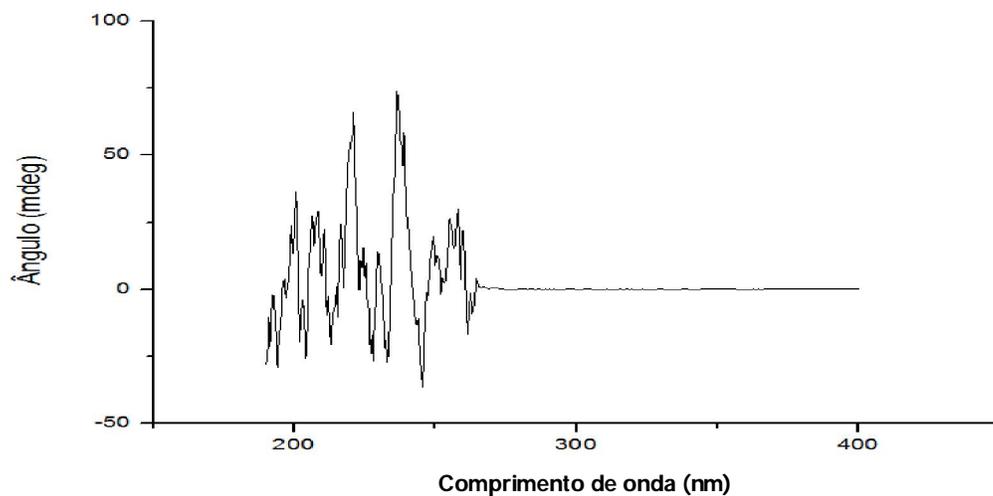


Figura 31: Espectro de dicroísmo circular do biperideno em dimetilsulfóxido na concentração de  $3,21 \cdot 10^{-4} \text{ molL}^{-1}$ , em cubeta de 0,2 mm.

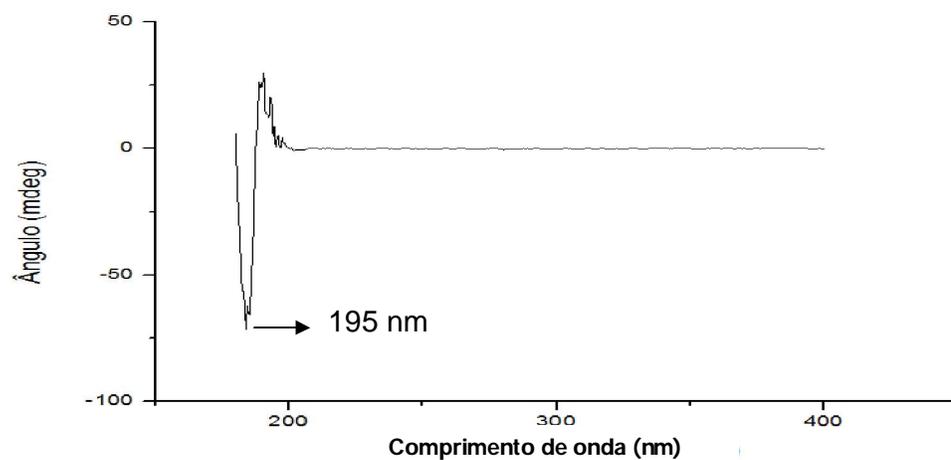


Figura 32: Espectro de dicroísmo circular do biperideno em metanol na concentração de  $3,21 \cdot 10^{-4} \text{ molL}^{-1}$ , em cubeta de 0,2 mm.

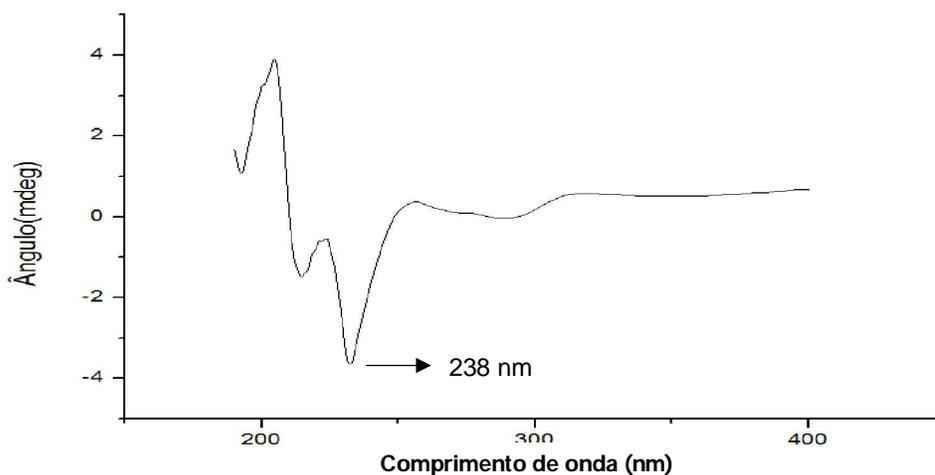


Figura 33: Espectro de dicroísmo circular do biperideno em água ultrapura na concentração de  $3,21 \cdot 10^{-3} \text{ molL}^{-1}$ , em cubeta de 0,2 mm.

Os espectros de dicroísmo do biperideno em água ultrapura e metanol mostraram melhor resolução e razão sinal/ruído quando comparada com os solventes como dimetilformamida, diclorometano e dimetilsulfóxido.

O espectro de dicroísmo do biperideno em metanol apresentou um EC negativo em 190 nm, enquanto em água ultrapura o EC negativo foi observado em 238 nm.

#### ***4.6 Análise do padrão secundário do biperideno***

Os Efeitos Cotton intenso e negativo observado no espectro de CD para o biperideno podem corresponder ao anel bicíclico e ou fenil à transição  $\pi \rightarrow \pi^*$  presente no BPR (Figura 34).

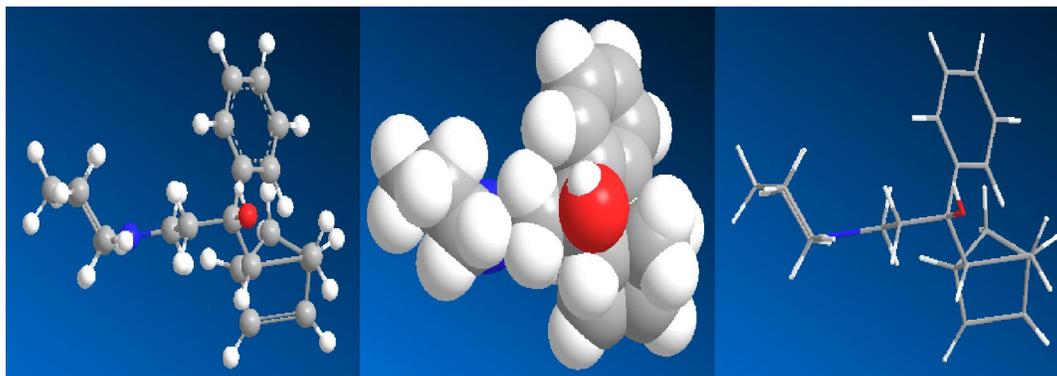


Figura 34: Estruturas tridimensionais para o cloridrato de biperideno.

Como o biperideno é comercializado como uma mistura racêmica o EDC deveria ter sido nulo, pois o EC positivo seria gerado em mesma intensidade que o EC negativo, portanto se anulariam. Contudo, não foi observado o cancelamento dos efeitos Cotton nas análises, logo, esses sinais do espectro do BPR podem indicar que a mistura racêmica do biperideno não é verdadeira e não estão na proporção 1:1 entre os isômeros, ou que o composto é puro, ou que existem impurezas quirais.

Para o BPR já está descrito na literatura método analítico validado empregando a eletroforese capilar desenvolvida e aplicado a análise enantiosseletiva do biperideno usando a ciclodextrinas como seletores quirais (MANDRIOLI, et al., 2006). Na validação do método por eletroforese capilar verificou-se que o BPR não estava em uma proporção 1:1 nos fármacos (MANDRIOLI, et al., 2006).

#### ***4.7 Comparação do espectro de dicróismo de circular do biperideno do padrão primário da farmacopéia, com os espectros do biperideno do padrão secundário e fármaco e com o espectro obtido por cálculo teórico***

O EDC do padrão da farmacopéia detectou um EC negativo e intenso para cloridrato de biperideno em 210 nm quando analisado em metanol (Figura 35).

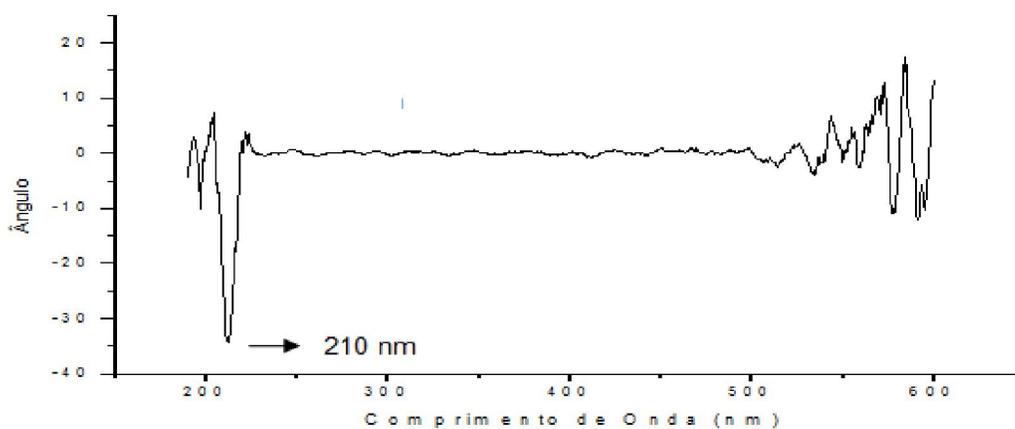


Figura 35: Espectro de dicróismo circular do cloridrato de biperideno padrão da farmacopéia americana em metanol.

A figura 36, apresenta o espectro simulado por cálculo teórico para um dos enantiômeros do BPR. Um EC positivo foi evidenciado no espectro em 275 nm, o EC apresentou variação do com valor de  $0,6 \text{ Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ .

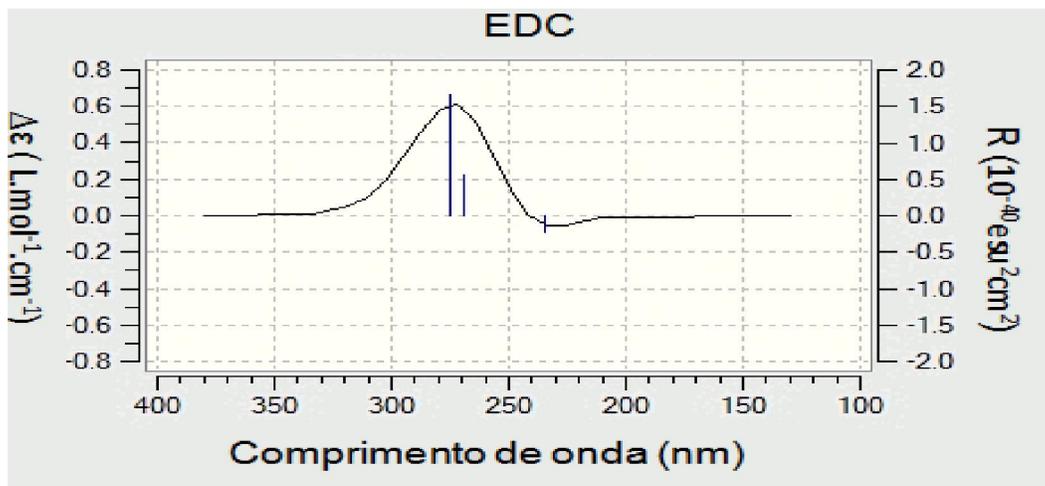


Figura 36: Espectro de dicroísmo circular biperideno obtido por calculo teórico.

A análise por DC do padrão secundário do BPR (figura 33, página 81) e do padrão primário do BPR (figura 35, página 83), não apresentaram semelhança com o espectro de um dos enantiômeros do biperideno obtido por cálculo teórico.

#### ***4.8 Análise do cloridrato de biperideno extraído do fármaco***

Selecionado o solvente, a água, análises por DC foram realizadas com cloridrato de biperideno extraído de comprimidos do fármaco comercial. O EDC para o cloridrato de biperideno extraído (Figura 37) mostrou um EC intenso e negativo em 198 nm.

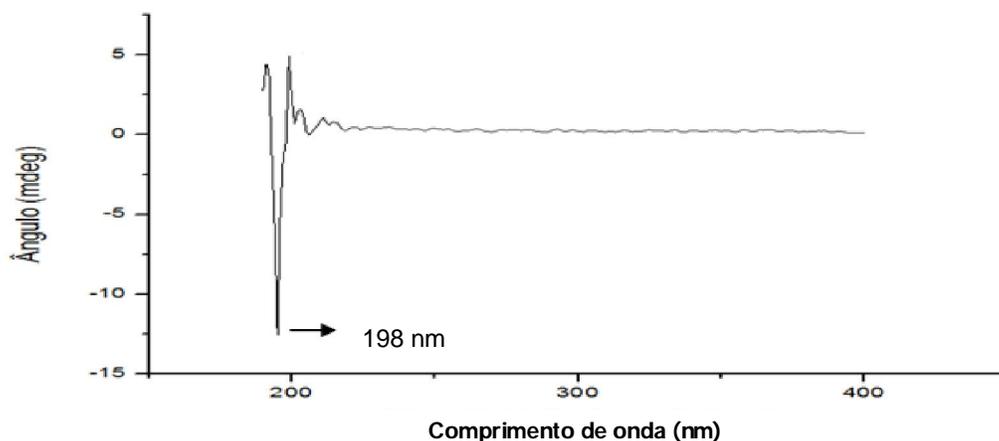


Figura 37: Espectro de dicroísmo circular do cloridrato de biperideno extraído do fármaco comercial em água ultrapura, na concentração de  $3,21 \cdot 10^{-4} \text{ molL}^{-1}$ , em cubeta de 0,2 mm.

Os sinais dos espectros obtidos para a amostra do padrão secundário do BPR não apresentam semelhanças como os sinais do padrão primário do BPR da USP. Os sinais obtidos para o BPR extraído não foram semelhantes aos DC do biperideno padrão secundário, bem como do padrão primário da USP.

#### ***4.9 Análise do teor de biperideno presente no fármaco por ultravioleta***

Os cromóforos de transição  $\pi - \pi^*$  do BPR geraram absorção na região do UV, como pode ser observada na figura 27, página 79. A absorbância de 0,59403 foi escolhida em 263 nm para o biperideno padrão secundário quando solubilizado em água ultrapura. O comprimento de onda de 263 nm foi usado para analisar o teor do princípio ativo no fármaco.

##### ***4.9.1 Teor de biperideno no fármaco por ultravioleta***

O comprimento de onda em 263 nm foi selecionado para a quantificação do biperideno (Figura 38).

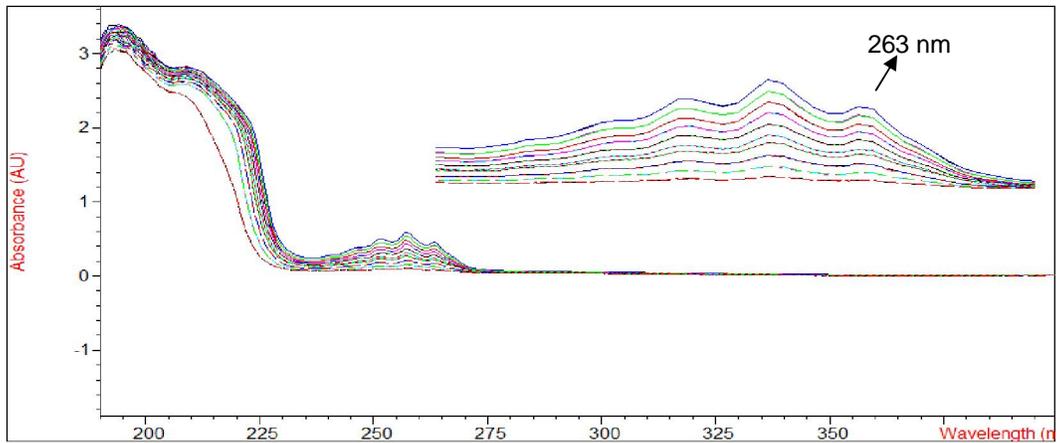


Figura 38: Espectro de ultravioleta do biperideno em água ultrapura das soluções usadas para obter a curva das soluções de referência nas concentrações molares de  $3,21 \cdot 10^{-4}$  a  $0,321 \cdot 10^{-4}$ .

A figura 39 mostra os espectros do fármaco cloridrato de biperideno e do biperideno padrão secundário usado como referência na quantificação do princípio ativo em fármaco obtido comercialmente. Os valores das absorbâncias foram usados para quantificar o biperideno obtido comercialmente, equação 13.

$$\% \text{ Biperideno} = \frac{\text{Abs (A)} \cdot 0,41914}{\text{Abs (P)} \cdot 0,45465} \cdot 100 \% = 92,19 \% \quad \text{Equação 13}$$

Onde:

Abs (A) = Absorbância do biperideno amostra

Abs (P) = Absorbância do biperideno padrão de referência

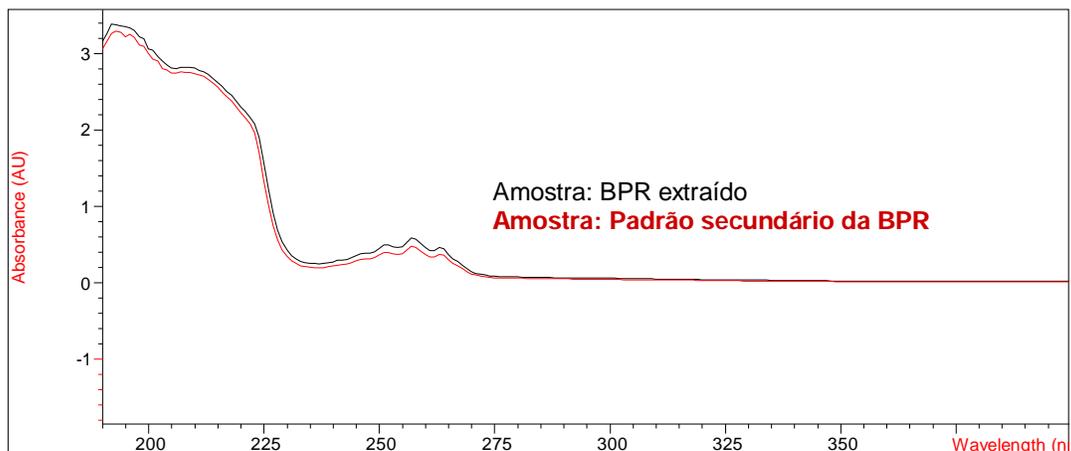


Figura 39: Espectro de UV na faixa de 190 – 400 nm do biperideno obtido para fármaco.

A análise do teor do BPR foi de 89,99% no fármaco.

A curva da solução de referência apresentou um  $r^2$  de 0,999 obtido na equação  $y = 2,684x + 0,024$ . Segue as concentrações do usadas na construção da curva da solução de referência do BPR (Figura 40, quadro 3). O valor do (r) foi maior do que 0,99, o que indica baixa dispersão entre os dados.

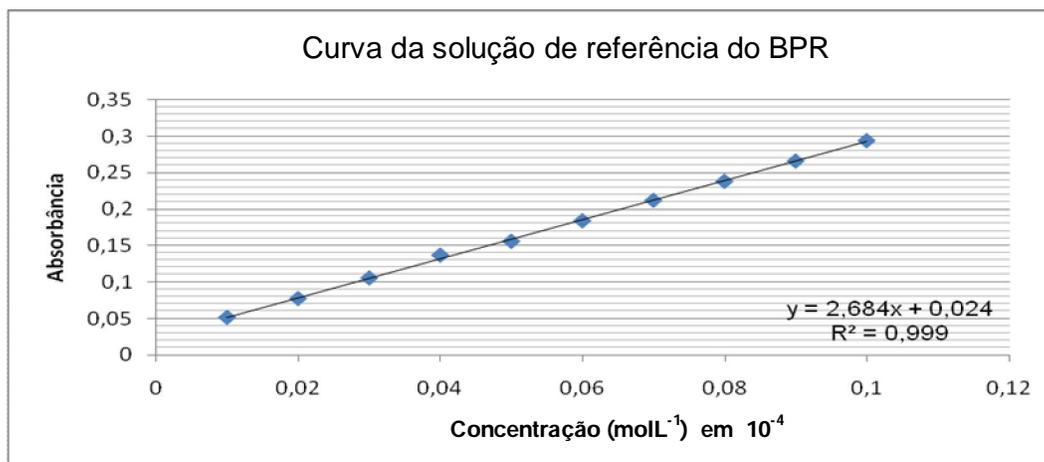


Figura 40: Representação gráfica da curva da solução de referência construída com biperideno, medidos no de 230 nm por UV. A equação de reta:  $y = 2,684x + 0,024$  e  $r^2$  0,999.

Quadro 3: Concentrações do biperideno, padrão secundário, selecionados para construção da curva da solução de referência.

Solução estoque	Razão entre a solução estoque e o solvente	Concentração do BPR(molL <sup>-1</sup> )	Absorbância
0,01 g em 0,1 L	1 mL em 9 ml	$0,321 \cdot 10^{-4}$	0,06388
0,01 g em 0,1 L	2 mL em 8 ml	$0,642 \cdot 10^{-4}$	0,09252
0,01 g em 0,1 L	3 mL em 7 mL	$0,953 \cdot 10^{-4}$	0,12470
0,01 g em 0,1 L	4 mL em 6 ml	$1,284 \cdot 10^{-4}$	0,16746
0,01 g em 0,1 L	5 mL em 5 mL	$1,605 \cdot 10^{-4}$	0,21757
0,01 g em 0,1 L	6 mL em 4 ml	$1,926 \cdot 10^{-4}$	0,24253
0,01 g em 0,1 L	7 mL em 3 mL	$2,247 \cdot 10^{-4}$	0,28589
0,01 g em 0,1 L	8 mL em 2 ml	$2,568 \cdot 10^{-4}$	0,36733
0,01 g em 0,1 L	9 mL em 1 mL	$2,889 \cdot 10^{-4}$	0,41127
0,01 g em 0,1 L	Sem diluição	$3,21 \cdot 10^{-4}$	0,45465

## 5 CONCLUSÕES

Nas condições testadas o método foi desenvolvido por dicróismo circular para o controle de qualidade e quantidade da paroxetina em matéria-prima e fármaco seguindo-se os parâmetros da ANVISA e ICH. O método por dicróismo circular foi seletivo, com melhor resolução e razão do sinal/ruído quando as amostras foram preparadas nos solventes água ultrapura e metanol, em comparação com os solventes diclorometano, dimetilsulfóxido e dimetilformamida, mas, a água foi selecionada para o desenvolvimento do método, por não ser tóxica e poluente.

O método DC para a paroxetina apresenta-se como uma alternativa viável para análise de rotina de controle de qualidade de laboratório, tanto padrão secundário da como fármaco, com as vantagens de ter análises com respostas rápidas, de ter a recuperação da amostra, de se utilizar a água como solvente.

Apesar, do biperideno, ser comercializado na forma racêmica, as análises por DC apresentou sinais para as amostras dos padrões primários e secundários, bem como para o biperideno extraído. O que pode indicar que a substância está pura ou tem um excesso de um dos enantiômeros do princípio ativo, ou ainda contêm impurezas quirais.

## Anexo A: Monografia completa da EP-5.0 da paroxetina

1 – Paroxetina, pó branco cristalino, que contém não menos de 97,5 por cento e não mais de 102,0 por cento de  $C_{19}H_{20}FNO_3$ , calculada em base seca. Embalagem e armazenamento devem ser bem fechados e em recipiente resistente a luz, respectivamente. Ligeiramente solúvel em água, álcool e diclorometano.

### 2 - IDENTIFICAÇÃO

A. espectrofotometria de absorção no infravermelho.  
Comparação: paroxetina cloridrato.

B. Cromatografia de camada fina

Solução de teste.

Dissolver 100 mg da substância a ser examinada em 20 mL metanol e diluir para 100 ml com fase móvel.

Solução referência (a). Dissolver 1 mL de da solução teste para 100 mL de metanol e diluir a 100 ml com fase móvel.

Solução referência (b). Dissolver 5 mg da paroxetina impureza D em 2 mL da solução referência (a) e diluir a 100 ml com fase móvel.

Solução de referência (c). Dissolver 10 mg de paroxetina em 2 ml de metanol e diluir para 10,0 ml com fase móvel.

Placa: placa de TLC de sílica gel F254 *R*.

Fase móvel: metanol, cloreto de sódio (1:4V/V).

Aplicação: 5 µl.

Desenvolvimento: ao longo de um trajeto de 15 cm.  
Secagem: ao ar.

Deteção A: revelar em luz ultravioleta a 295 nm.

Resultado: o pico principal no cromatograma obtido com a solução de teste é similar em tamanho e tempo de retenção ao pico principal no cromatograma obtido com a solução de referência (c).

### 3 - TESTE

#### D. Cromatografia líquida

Solução teste. Dissolver 100 mg da substância a ser examinados em 20 ml de metanol e diluir para 100,0 ml do mesmo solvente.

Solução de referência (a). Diluir 1,0 ml da solução teste para 100,0 ml metanol.

Solução de referência (b). Dissolver 5 mg de paroxetina impureza D e 5 mg de cloridrato de paroxetina em 2 ml de metanol e diluir para 100,0 ml do mesmo solvente.

Solução de referência (c). Dissolver 10 mg do cloridrato de paroxetina em 2 ml de metanol e diluir para 10,0 ml.

pH: 5,5 para a solução.

#### Substâncias relacionadas. Cromatografia líquida

Mistura de solventes. Misturar 1 volume de tetrahydrofurano e  $\mathcal{R}$  9 volumes de água  $\mathcal{R}$ .

Solução de teste. Dissolver 50,0mg da substância a ser examinados na mistura de solventes e diluir para 50,0 ml com a mesma mistura de solventes.

Solução de referência (a). Diluir 5,0 ml da solução de teste para 50,0 ml com a mistura de solvente.

Solução de referência (b). Dissolver 2 mg de paroxetina impureza C na mistura de solventes e diluir para 20,0 ml com a mesma mistura de solventes.

Solução de referência (c). Para 2,0 ml de solução de referência (a) adicionar 2,0 ml da solução de referência (b) e diluir para 20,0 ml com a mistura de solvente.

Solução de referência (d). Diluir 2,0 ml da solução de referência (a) para 200,0 ml com a mistura de solvente.

Solução de referência (e). Dissolver 2 mg de paroxetina A impureza na mistura de solventes e diluir para 20 ml com a mesma mistura de solventes.

Coluna:

Material: sílica fundida. Fase estacionária: capped octilsilil

Tamanho: L = 50 m, Ø = 0,25 mm, fase móvel A: ácido trifluoroacético R, R tetrahydrofurano, água R(5:100:900V/V/V), fase móvel B: ácido trifluoroacético R, tetrahydrofurano R, acetonitrila R (5:100:900 V/V/V)  
 Gás: N<sub>2</sub> para cromatografia R. Fluxo: 0,4 ml / min.  
 Split: 1:250.

	Tempo(min)	Fase A	Fase B	Temperatura(°C)
Coluna	0 - 30	80	20	40
	30 - 50	80 20	20 80	
	50 - 60	20	80	
	60 - 65	20 80	80 20	
	65 - 70	80	20	

Detector: FID

Injeção: 2 µl.

Tempo: duas vezes o tempo de retenção de biperideno.  
 Retenção relativa com referência ao biperideno: A impureza A = 0,8.

Adequação do sistema:

Resolução: mínimo de 3,5 entre os picos devido às impurezas C e paroxetina no (1º pico) e do pico devido à impureza A (2º Pico), no cromatograma obtido com referência solução (b).

Relação sinal-ruído: mínimo de 6 para o pico principal no cromatograma obtido com a solução de referência (a).

Limites:

As impurezas, B, C: para cada impureza, no máximo 0,50 % da área do pico principal, qualquer outra impureza: para cada impureza, no máximo 0,10 % da área do pico principal. Um total de impurezas, B e C: no máximo 1,0 por cento a área do pico principal, total de impurezas que não seja A, B e C: no máximo 0,50 % da área do pico principal.

Limite de desprezado: 0,05 % da área do principal pico.

Impurezas F: 2 ppm máximo.

Metais pesados: máximo 20 ppm. 1,0 g em conformidade com limite de teste D. Preparar o padrão usando 2 ml de solução padrão de chumbo (10 ppm Pb) .

Perda por secagem: máximo 0,5% determinado a 1,000 g por secagem em estufa a 100-105 °C por 2h.

Cinzas sulfatadas: máximo 0,1 % determinado em um 1,0 g.

Metais pesados (2.4.8): máximo de 20 ppm. 1,0 g em conformidade com limite de teste C. Use um cadinho de platina. Prepare o padrão com 2 ml de solução padrão de chumbo

(10 ppm Pb) *R*. Água (2.5.12): 2,2 por cento para 2,7 por cento, determinado em 0,300 g. Cinzas sulfatadas (2.4.14): máximo de 0,1 por cento, determinado em 1,0 g em um cadinho de platina.

#### ENSAIO:

Cromatografia líquida.

Solução de teste. Dissolver 50,0mg da substância a ser examinado em água e diluir para 100,0 ml com o mesmo solvente.

Solução de referência (a). Dissolver 50,0 mg cloridrato de paroxetina em *R* água e diluir a 100,0 ml com o mesmo solvente.

Solução de referência (b). Dissolver 5,0 mg cloridrato de paroxetina 5 mg de paroxetina A impureza na água e diluir para 10,0 ml com o mesmo solvente.

Coluna:

Material: sílica fundida. Fase estacionária: sílica gel para trimetilsilil

Tamanho: L = 50 m, Ø = 0,25 mm, cromatografia *R* (5 µm). Fase móvel: dissolver 3,85 g de acetato de amônio *R* em água *R*, ajuste de pH 5.5 com acético anidro O ácido *R* e diluir para 600 ml com o mesmo solvente, adicionar 400 ml de *R* acetonitrila; adicionar lentamente, com agitação, 10 ml de *R* trietilamina e reajustar a pH 5.5 com anidro ácido acético *R*.

Taxa de fluxo: 1mL/min.

Injeção: 10 ml.

Tempo de execução: o dobro do tempo de retenção da paroxetina. Adequação do sistema: solução de referência (b): Resolução: mínimo de 2 entre os picos devido à paroxetina e impureza A.

#### 4 – TEOR

Calcular o teor de cloridrato de paroxetina percentual utilizando o cromatograma obtido com a solução de referência (a)..

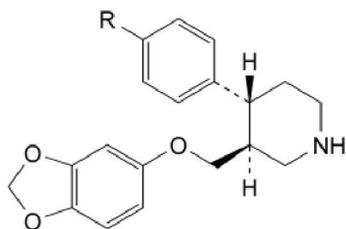
#### 5 - ARMAZENAMENTO

Em um recipiente hermético, protegido da luz.

## 6 - IMPUREZAS:

Impurezas previstas: A, B, C, F.

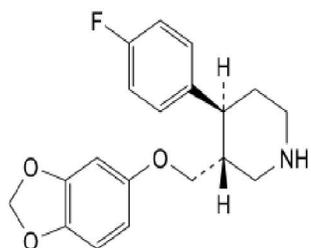
Outras impurezas detectáveis: D, E, G.



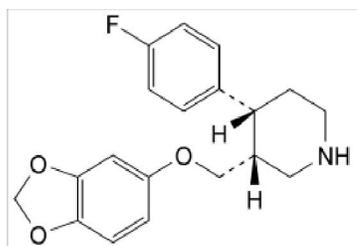
A. (3S, 4R) - 3 - [(1,3-benzodioxol-5-iloxi) metil] - 4 - fenilpiperidina (desfluoroparoxetina),

B. R = OCH<sub>3</sub>: (3S, 4R) -3 - [(1,3-benzodioxol-5-iloxi) metil] -4 - (4-metoxifenil) piperidina,

C. R = OC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>: (3S, 4R) -3 - [(1,3-benzodioxol-5-iloxi) metil] -4 - (4-etoxifenil) piperidina,

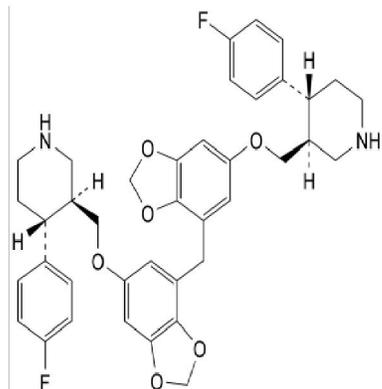


D. (3R, 4S) - 3 - [(1,3-benzodioxol-5-iloxi)metil]-4-(4-fluorofenil)piperidina (+)-trans-paroxetina),

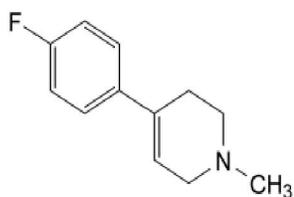


E. (3RS, 4RS) - 3 - [(1,3-benzodioxol-5-iloxi)metil] - 4 - (4 -

fluorofenil)piperidina(cis-paroxetina),



F. 3,3' - [metileno(1,3-benzodioxole-6, 4 -diiloximetileno)] bis [4 - (4-fluorofenil) piperidina],



G.4-(4-fluorofenil)-1-metil-1,2,3,6-Tetrahidropiridina.

FARMACOPÉIA EUROPÉIA, 2005

## Anexo B: Monografia completa da EP-5.0 do biperideno

1 – Biperideno, pó branco cristalino, que contém não menos de 99,0 por cento e não mais de 101,0 por cento de  $C_{21}H_{29}NO$ , calculada em base seca. Embalagem e armazenamento devem ser bem fechados e em recipiente resistente a luz, respectivamente. Ligeiramente solúvel em água, álcool e diclorometano. Decomposição em 280°C.

### 2 - IDENTIFICAÇÃO

Primeira identificação: A, D.

Segunda Identificação: B, C, D.

A. espectrofotometria de absorção no infravermelho.

Comparação: biperideno cloridrato.

B. Cromatografia de camada fina

Solução de teste.

Dissolver 10 mg da substância a ser examinada em uma mistura 1:1 de metanol e água diluir para 10 ml com o mesmo solvente.

Solução referência (a). Dissolver 10 mg da substância a ser examinada em uma mistura 1:1 de metanol e água diluir para 10 ml com o mesmo solvente.

Solução referência (b). Dissolver 10 mg do paroxetina impureza A na solução referência (a) e diluir a 2 ml com a mesma solução.

Placa: placa de TLC de sílica gel F254 *R*.

Fase móvel: dietilamina, metanol, tolueno (1:1:20V/V/V).

Aplicação: 5 µl.

Desenvolvimento: ao longo de um trajeto de 15 cm.

Secagem: ao ar.

Deteção A: revelar em luz ultravioleta a 254 nm.

Resultados A: o ponto principal do cromatograma obtido com a solução de teste é semelhante em posição e tamanho ao ponto principal no cromatograma obtido com solução de referência (a).

Deteção de B: spray com uma solução diluída de iodo bismutado de potássio e em seguida com uma solução de nitrito de sódio analisar a luz do dia.

Resultados B: a mancha principal do cromatograma obtido com a solução teste

é semelhante na posição, cor e tamanho a mancha principal do cromatograma obtidos com a solução referência.

- (a). Sistema avaliável: solução de referência
- (b). O cromatograma mostra duas manchas claramente separadas.
- (c). Para cerca de 20 mg adicionar 5 ml de ácido fosfórico. A cor verde é observada.
- (d). Teste de cloretos

### 3 - TESTE

Solução *S*: Dissolver 0,10 g da amostra em dióxido de carbono livre de água I, aquecendo suavemente, se necessário, e diluir para 50 ml com o mesmo solvente.

Aspecto da solução. Solução *S* é opalescente não mais do que suspensão referência II (Método II).

pH: 5,0 a 6,5 para a solução *S*.

Substâncias relacionadas: Cromatografia gasosa.

Solução teste. Dissolver 0,10 g da substância a ser examinada em metanol e diluir para 10 ml com o mesmo solvente. Solução referência.

- (a). Diluir 0,5 ml da solução teste para 100 ml com metanol. Diluir 10 ml desta solução para 50 ml com metanol. Solução referência.
- (b). Dissolver 5 mg da substância a ser examinada e 5 mg de biperideno impureza A em metanol e diluir para 5 ml com o mesmo solvente. Diluir 1 ml da solução para 10 ml com metanol.

Coluna:

Material: sílica fundida.

Tamanho: L = 50 m, Ø = 0,25 mm, fase estacionária: poli (dimetil) (difenil) (divinil) *R*siloxano (espessura 0,25 µm).

Gás: N<sub>2</sub> para cromatografia *R*. Fluxo: 0,4 ml / min.

Split: 1:250.

Temperatura:	Tempo(min)	Temperatura(°C)
Coluna	0 - 5	200
	5 - 40	200 270
Injetor		250
Detector		300

Detector: FID

Injeção: 2 µl.

Tempo: duas vezes o tempo de retenção de biperideno.  
Retenção relativa com referência ao biperideno: As impurezas B e C = entre 0,95 e 1,05.

Adequação do sistema:

Resolução: mínimo de 2,5 entre o pico devido à biperideno (1º pico) e do pico devido à impureza A (2º Pico), no cromatograma obtido com referência solução (b).

Relação sinal-ruído: mínimo de 6 para o pico principal no cromatograma obtido com a solução de referência (a).

Limites:

As impurezas, B, C: para cada impureza, no máximo 0,50 % da área do pico principal, qualquer outra impureza: para cada impureza, no máximo 0,10 % da área do pico principal. Um total de impurezas, B e C: no máximo 1,0 por cento a área do pico principal, total de impurezas que não seja A, B e C: no máximo 0,50 % da área do pico principal.

Limite de desprezado: 0,05 % da área do principal pico.

Impurezas F: 2 ppm máximo.

Metais pesados: máximo 20 ppm. 1,0 g em conformidade com limite de teste D. Preparar o padrão usando 2 ml de solução padrão de chumbo (10 ppm Pb) .

Perda por secagem: máximo 0,5% determinado a 1,000 g por secagem em estufa a 100-105 °C por 2h.

Cinzas sulfatadas: máximo 0,1 % determinado em um 1,0 g.

#### 4 - TEOR

Dissolver 0,200 g em 60 ml de álcool, titular com hidróxido de potássio 0,1M alcoólica, determinação do ponto final potenciométricamente. 1 ml de 0,1 M de hidróxido de potássio alcoólico é equivalente a 34,79 mg de C<sub>21</sub>H<sub>30</sub>ClNO.

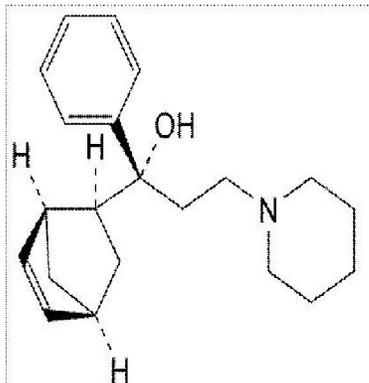
#### 5 - ARMAZENAMENTO

Em um recipiente hermético, protegido da luz.

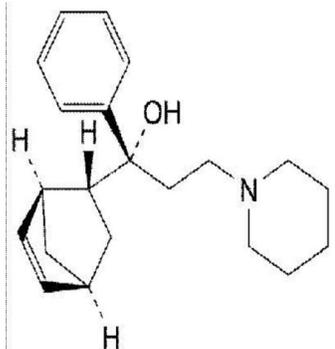
#### 6 - IMPUREZAS:

Impurezas previstas: A, B, C, F.

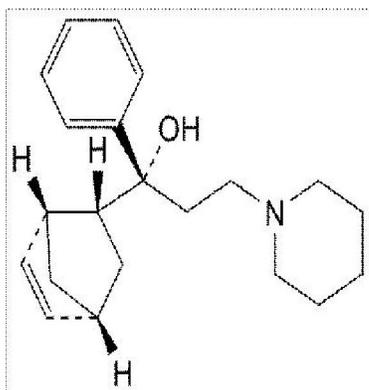
Outras impurezas detectáveis: D, E.



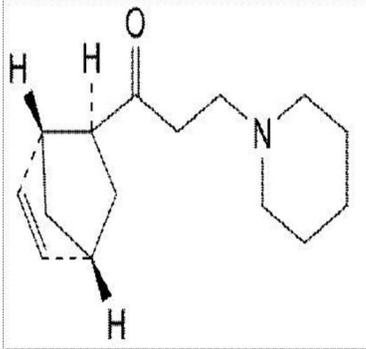
A. (1*R*) -1 - [(1*S*,2*S*,4*S*)-biciclo [2.2.1] hept-5-en-2-il] -1 - fenil-3-(piperidina-1-il)propano-1-ol(endoforma)



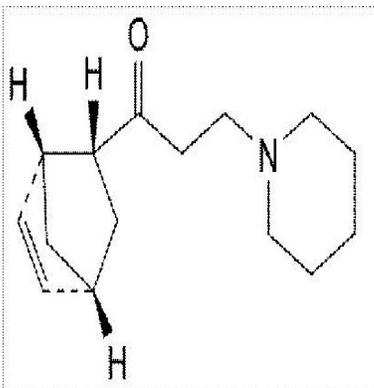
B. (1*R*) -1 - [(1*S*,2*R*,4*S*)-biciclo [2.2.1] hept-5-en-2-il] -1 - fenil-3-(piperidina-1-il)propan-1-ol,



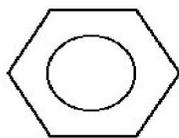
C. (1*R*) -1 - [(1*R*,2*R*,4*R*)-biciclo [2.2.1] hept-5-en-2-il] -1 - fenil-3-(piperidina-1-il)propan-1-ol,



D. 1- [(1 *RS*;2 *SR*;4 *RS*)-biciclo [2.2.1] hept-5-en-2-il] -3 -(piperidina-1-il) propano-1-ona,



E. 1-[(1 *RS*;2 *RS*;4 *RS*)-biciclo[2.2.1]hept-5-en-2-il]-3 -- (piperidina-1-il) propano-1-ona.

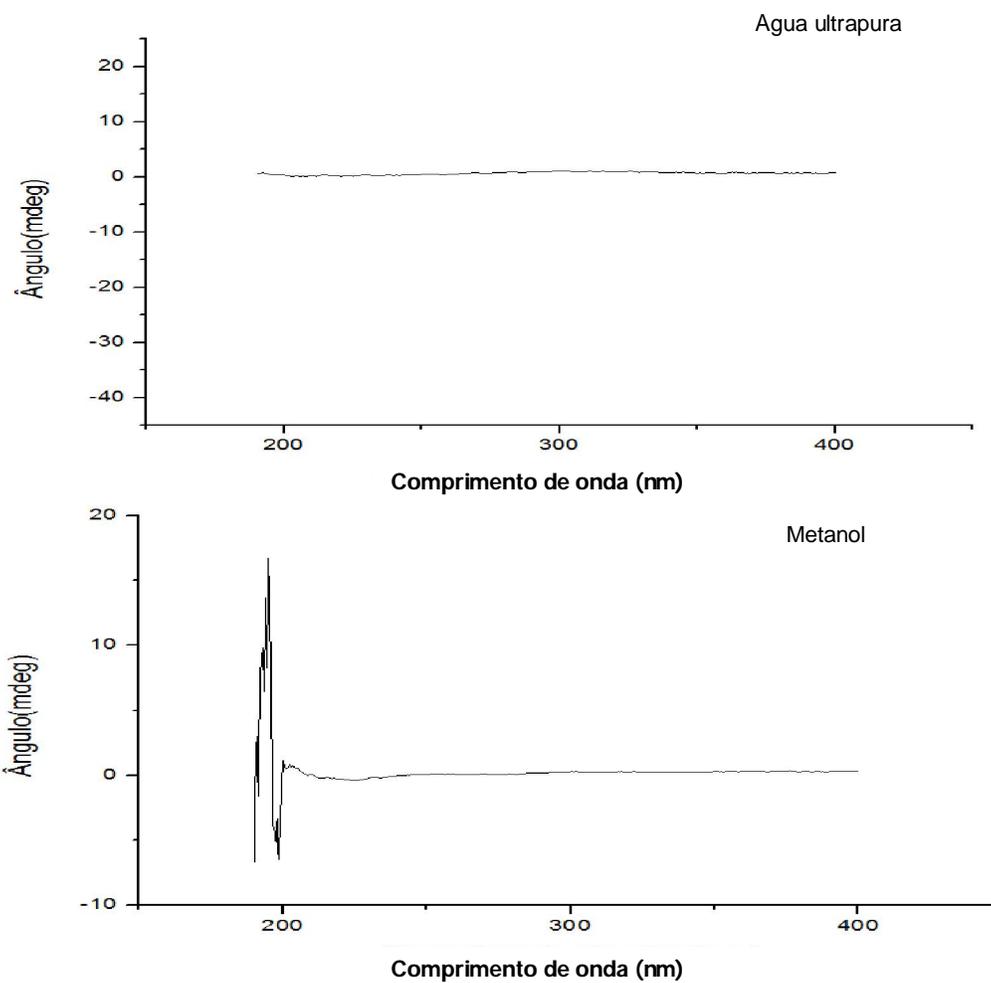


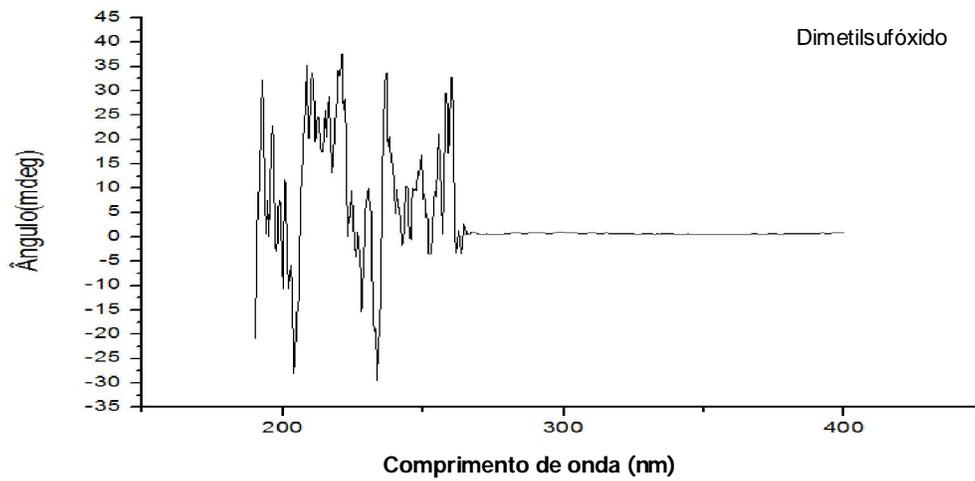
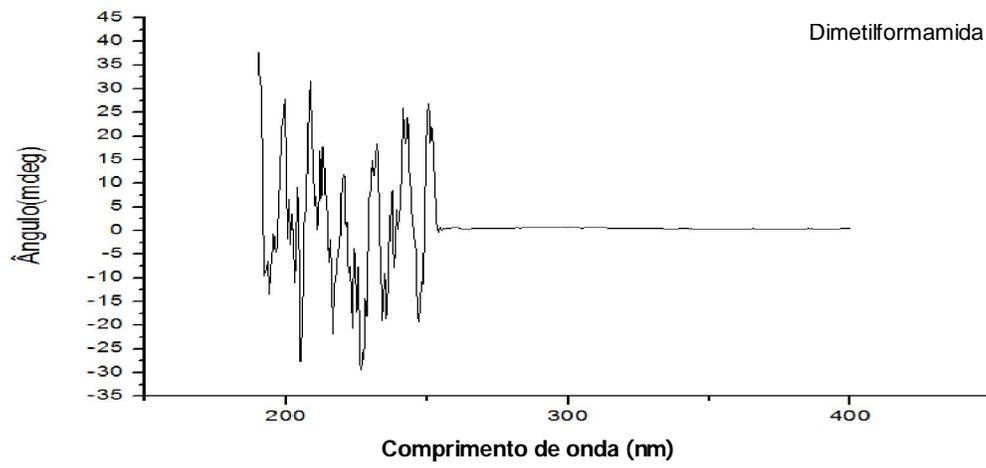
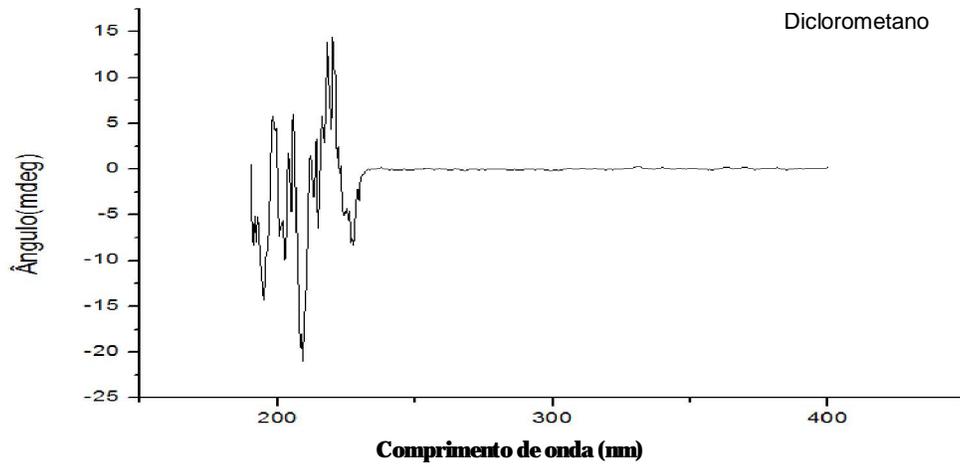
F. Benzeno

FARMACOPÉIA EUROPÉIA, 2005

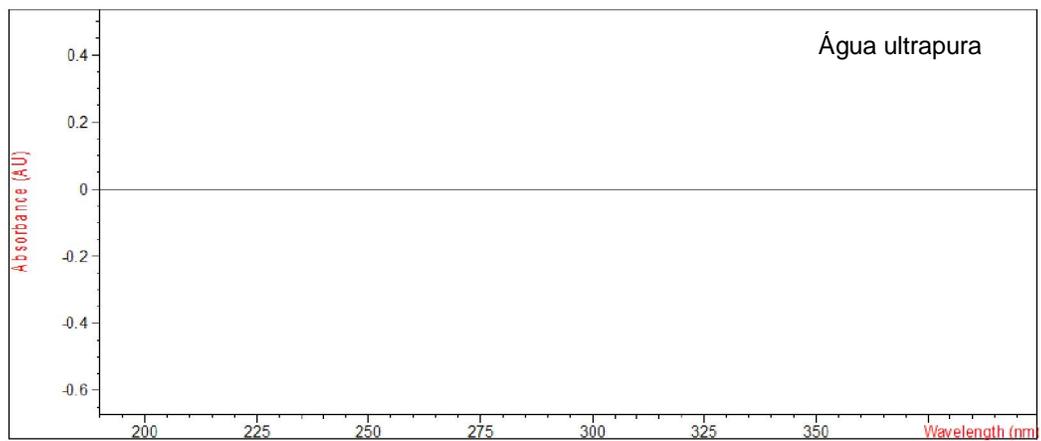
## LISTA DE APÊNDICES

Anexo A: Espectros de dicroísmo circular dos solventes: água ultrapura, metanol, diclorometano, dimetilformamida e dimetilsulfóxido





## Anexo B: Espectro de ultravioleta do solvente água ultrapura



## REFERÊNCIAS

ABDEL-REHIM, M.; SKANSEN, P.; HASSAN, M.; VITA, M.; HASSAN, Q.; BLOMBERG, L.G.; HASSAN, M. Microextraction in packed syringe/liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry for quantification of olomoucine in human plasma samples. **Analytica Chimica Acta**. Vol. 539, p. 35-39, 2005.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA), Resolução nº 899 de 29 de maio de 2003 que determina a publicação do Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Brasília. **Diário Oficial da União**. 02 fevereiro de 2003. Disponível em: [http://www.gov.br/legis/resol/2003/re899\\_03re.htm/](http://www.gov.br/legis/resol/2003/re899_03re.htm/). Acesso em: 12/04/2010.

AMARANTE, O.P.J; CALDAS, E.P.A.; BRITO, N.M; SANTOS, T.C.R.; VALE, M. L.B.F. Validação de métodos analíticos: uma breve revisão. **Caderno de Pesquisa**. Vol. 12, p. 116-131, 2001.

BALOGHNE, S.A. Application of difference circular dichroism (CD) spectroscopy for determination of pharmaceutical compounds. Analysis of stereoisomers by the HPLC-CD/UV method. **Acta Pharmaceutica Hungarica**. 73(3), 185-195, 2003.

BARROS N.B.; PIMENTEL, M.F.; ARAUJO, M.C.U. Recomendações para calibração em química analítica – Parte I. Fundamentos e calibração comum componente (calibração univariada). **Química Nova**. 25, 856, 2002.

BEROVA, N.; NAKANISHI, K.; WOODY, R.W. **Circular dichroism: principles and applications**. 2nd ed. New York: John Wiley & Sons, 877 p., 2000.

BERTUCCI, C.; ANDRISANO, V.; CAVRINI, V.; CASTIGLIONI, E. Reliable assay of extreme enantiomeric purity values by a new circular dichroism based HPLC detection system. Chirality. **Journal Chromatography B**. 12(2), 84-92, 2000.

BRESSOLLE, F.; BROMET-PETIT, M.; AUDRAN, M. Validation of liquid chromatographic and gas chromatographic methods: applications to pharmacokinetics. **Journal Chromatography B**. Vol. 686, p.3-10, 1996.

CALDWELL, J. Stereochemical determinants of the nature and consequences of drugs metabolism. **Journal of Chromatography**, v. 694, p. 39-48, 1995.

CANTOR, C.R.; SCHIMMEI, P.R. **Biophysical Chemistry**. 1.ed. San Francisco, capítulo 8, 1980.

CHAVES, A. R.; LEANDRO, F. Z.; CARRIS, J. A., QUEIROZ, M.E.C. Microextraction in packed sorbent for analysis of antidepressants in human plasma by liquid chromatography and spectrophotometric detection. **Journal of Chromatography B**. Vol. 878, p. 2123-2129, 2010.

CHUI, Q. S. H.; ZUCCHINI, R. R.; LICHTIG, J., **Química Nova**. 24, 374, 2001.

FASSIHI, A. R. An Introduction to Medicinal Chemistry. **International Journal of Pharmaceutics**. 92, 1. 1993.

GONÇALVES, B.J.S. Desenvolvimento de métodos cromatográficos hifenados (in-tube SPME/LC-FLD e GCxGC/qMS) para análises de fármacos e agrotóxicos em amostras complexas". **Tese (Doutorado em Química)**. USP-Ribeirão Preto Universidade de São Paulo, 2011.

GOODNICK, P.J., GOLDSTEIN, B.J. Selective serotonin reuptake inhibitors in affective disorders: Basic pharmacology. **Journal Psychopharmacol.** Vol. 12, n. 3 suppl B, p.3-20,1998.

HADIDI, K.A., Development of a screening method for the most commonly abused anticholinergic drugs in Jordan; trihexyphenidyl, procyclidine and biperiden. **Legal Medicine.** (6), p. 234, 2004.

HAN, S.M.; PURDIE, N. Determination of stereoisomers by circular dichroism. **Analytical Chemistry.** 58(2), 455-8, 1986.

HYNECK, M.; DENT, J.; HOOK, J. CHIRALITY. Chirality in Drug Design and Synthesis. **Pharmacological Action and Drug Development.** 1.ed. Londres, Academic Press, capítulo 2, 1990.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION (ICH). **Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology.** Q2(R1), nov. 2005.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL (INMETRO); **Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos.** DOQ-CGCRE-008, 2003.

JAGERDEO, E.; ABDEL-REHIM, M. Screening of Cocaine and Its Metabolite in Human Urine Samples by Direct Analysis in Real-Time Source Coupled to Time-of-Flight mass Spectrometry After Online Preconcentration Utilizing Microextraction by Packed Sorbent. **Journal Of American Society for Mass Spectrometry.** Vol. 20, p. 891-899, 2009.

KAPLAN, H.I.; SADOCK, B.B.J.; GREAB, J.A. **Compêndio de Psiquiatria.** 7. Ed. Porto Alegre, Artmed, 1997.

KOTT, L.; HOLZHEUER, W. BRIAN; W., MEGAN M.; WEBSTER, G. K. An evaluation of four commercial HPLC chiral detectors: A comparison of three polarimeters and a circular dichroism detector. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. 43(1), 57-65. 2007.

LAMBROPOULOS J; SPANOS G. A.; LAZARIDIS, N.V. Method development and validation for the HPLC assay (potency and related substances) for 20 mg paroxetine tablets. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**. 19(5), 793-802. Journal code: 8309336. ISSN:0731-7085, 1999.

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

LIMA, V.L.E. Os fármacos e a quiralidade: uma breve abordagem. **Química Nova**. vol.20, p.657-663, 1997.

LORIN, M.; DELEPEE, R.; RIBET, J.P.; MORIN, P. Validation of a method using an achiral liquid chromatography sorbent and a circular dichroism detector. **Journal of Chromatography**. 1141(2), 244-250, 2007.

MADESCLAIRE, M.; Stéréoisométrie: Généralités et incidences en chimie thérapeutique. **International Journal of Pharmaceutics**. Paris, Ellipses, p. 126, 1987.

MANDRIOLI, R.; MUSENGAA, A.; LASAPONARA, S.S.; SARACINO, M. A.; FANALI, S.; RAGGI, M.A. Enantioseparation and quality control of biperiden in pharmaceutical formulations by capillary electrophoresis. **Analytica Chimica Acta**. (560), 6.ed. Italy, capítulo 6, 2006.

MASSAROTI, P.; CASSIANO N.M.; DUARTE L.F. Validation of a selective method for determination of paroxetine in human plasma by LC MS/MS. **Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**. 8 Suppl 2 : 340–347, 2005.

MCEVOY G.K.; OY G.K., Control of biperiden in pharmaceutical formulations by capillary electrophoresis *Analytica Chimica Acta*. **American Society of Health-System Pharmacists**. Bethesda, p. 1177, 2001.

MOHAMMADI A., HARIRIAN I., REZANOUR N., GHIASI L., WALKER R.B., Development and validation of a stability-indicating high performance liquid chromatographic (HPLC) assay for biperiden in bulk form and pharmaceutical dosage forms. **Journal of Chromatography B**. (854), 2007.

MOINUDDIN, R S., SEEMA, H., JITENDRA, B. N., UV Spectrophotometric Method Development and Validation for Determination of Paroxetine Hydrochloride in Pharmaceutical Dosage Form. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**. Vol 2, Suppl 2, 2010.

MARQUES, A.H.; CIZZA, G.; STERNBERG, E. Interações imunocerebrais e implicações nos transtornos psiquiátricos. **Revista Brasileira de Psiquiatria**. Vol. 29, sulp. 1, p. 27-32, 2007.

MORENO, R.A.; MORENO, D.H.; SOARES, M.B.M. Psicofarmacologia de antidepressivo. **Revista Brasileira de Psiquiatria**. Vol. 21, supl. 1, p.24-40, 1999.

NAGATA, N. Uso de métodos de calibração multivariada na análise de amostras de interesse industrial e espécies de importância ambiental. Campinas. **Tese ( Doutorado em Química)**. Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, 2001.

O'NEIL M.J.; SMITH A.; HECKELMAN; P.E.; BUDAVARI, S. The Merck Index, , Drugs and Biologicals, **An Encyclopedia of Chemicals**. 13.ed. Merck & Co. Inc., White House Station, New Jersey, 2p. 201, 2001.

ORLANDO, R.M.; FILHO, N.C.; GIL, E.S.; STRINGHETTA, J.P.S. Importância farmacêutica de fármacos quirais. **Revista Eletrônica de Farmácia**. Vol IV (1), 08-14, 2007.

PACHER, P.; KOHEGYI,E.; KECSKEMETI, V.; FURST,S. Curret trends in the development of new antidepressants. **Current Medicinal Chemistry**. Vol.8, n. 2, p.89-100, 2001.

RINALDO, D. Determinação de enantiômeros em extratos vegetais por cromatografia quiral e dicroísmo circular. **Tese ( Doutorado em Química)**. Universidade Estadual Paulista, Universidade Estadual de Campinas, 2010.

RESENDE, R.L.O. Separação dos enatiômeros do cetoprofeno e do fenoprofeno por CLAE em fase estacionária quiral. **Dissertação ( Mestrado em Química)**. Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, 2008.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H. ; JARDIM, I.C.S.F.;MELO, L.F.C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**. v. 27 no.5, p. 771-780, 2004.

RODGER, A.; NORDÉN, B. **Circular Dichroism and Linear Dichroism**. Oxford University Press, Oxford (1997).

ROBERT, S.; GENOWEFA M. MARCIN, K. Determination of fluoxetine and paroxetine in pharmaceutical formulations by densitometric and videodensitometric TLC. **Journal of Planar Chromatography. Modern TLC**. 16 Suppl 1 : 19–22, 2003.

STEWART S.H., KARP JULIE, P.R.O.; PETERSON, R. A. Anxiety sensitivity and self-reported reasons for drug use. **Journal Substance Abuse**. 9:223-240, 1997.

STOPFORTH, A.; BURGER, B.V.; CROUCH, A. M.; SANDRA, P. The analysis of estrone and 17 $\beta$ -estradiol by stir bar sorptive extraction-thermal desorption-gas chromatography/mass spectrometry: Application to urine samples after oral administration of conjugated equine estrogens. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**. 856 (1-2), pp. 156-164, 2007.

SUN, Y.; WANG, W.; TANG, S. Determination of residual organic solvents in paroxetine hydrochloride by headspace capillary GC and research of matrix-induced effect. **Tianjin Institute of Drug Control, Journal written in Chinese**. Tianjin, Peop. Rep. China. Yaowu Fenxi Zazhi , 30(5), 963-967. CODEN: YFZADL ISSN:0254-1793. CAN 155:282837 AN 2011:86458, 2010.

SWEETMAN, S.C., Martindale the Complete Drug Reference. **Pharmaceutical Press**. 34.ed. London, p. 479, 2005.

WORLD ORGANIZATION HEALTH (WHO). First Global Mental Health Summit – World Health Organization Warns. **Depression Lowho As Global Crisis (UK): WHU**, 2009. Disponível em: <http://www.who.int.int/en/>. Acesso em: 12/11/2011.

TOURNEL, G.; HOUDRET, N.; HEDOUIN, V.; DEVEAUX, M.; GOSSET, D.; LHERMITE, M. High-performance liquid chromatographic method to screen and

quantitate seven selective serotonin reuptake inhibitors in human serum. **Journal of Chromatography B**. Vol, 761,n. 2, p. 147-158, 2001.

UNITED STATES PHARMACOPEIA (USP). **United States Pharmacopeial Convention**. 28-NF,23, Rockville, MD, p. 260, 2005.

UNITED STATES PHARMACOPEIA (USP) CONVENTION. **Validation of Compendial Methods**. 24-NF, 1225, Rockville, 1999.

ZAMPIERI, F.L. Desenvolvimento das barras imunosorventes de agitação e avaliação da técnicas extração sortiva em barra de agitação, microextração em solvente empacotado e cromatografia líquida gasosa para análise de antidepressivo em plasma. **Dissertação ( Mestrado em Ciências- área química)** – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras da Universidade de São Paulo, 2010.

ZHANG, Y.; ZHANG, W.; HUANG, L.; YANG, Y. Determination of the in vitro release of paroxetine hydrochloride enteric sustained-release capsule. Medical College, Jinhua College of Profession and Technology. **Journal written in Chinese**. Zhongguo Yaoxue Zazhi (Beijing, China), 46(10), 797-798. CODEN: ZYZAEU ISSN:1001-2494. AN 2011:891295, 2011.