

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**MIANSERINA: DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS
E ESTUDO DA ESTABILIDADE**

LETÍCIA LENZ SFAIR

PORTO ALEGRE, 2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**MIANSERINA: DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS
E ESTUDO DA ESTABILIDADE**

Tese apresentada por **LETÍCIA LENZ SFAIR** para
obtenção do TÍTULO DE DOUTOR em Ciências
Farmacêuticas.

Orientador: Prof^a. Dr. Elfrides E. S. Schapoval

Coorientador: Prof. Dr. Martin Steppe

Porto Alegre, 2012

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Doutorado da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 11.09.2012, pela Banca Examinadora constituída por:

Prof. Dr. Andreas Sebastian Loureiro Mendez
Universidade Federal do Pampa

Profa. Dr. Érika Rosa Maria Kedor-Hackmann
Universidade de São Paulo

Profa. Dr. Nadia Maria Volpato
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

SFAIR, LETÍCIA LENZ
MIANSERINA: DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS
ANALÍTICOS E ESTUDO DA ESTABILIDADE / LETÍCIA LENZ
SFAIR. -- 2012.
185 f.

Orientadora: ELFRIDES EVA SCHERMAN SCHAPOVAL.
Coorientador: MARTIN STEPPE.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-
Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-
RS, 2012.

1. CONTROLE DE QUALIDADE DE MEDICAMENTOS. 2.
DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS ANALÍTICOS. 3. ESTUDO DA
ESTABILIDADE. I. SCHAPOVAL, ELFRIDES EVA SCHERMAN,
orient. II. STEPPE, MARTIN, coorient. III. Título.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Controle de Qualidade Farmacêutico, Departamento de Produção e Controle de Medicamentos da Faculdade de Farmácia da UFRGS, na cidade de Porto Alegre, com financiamento da CAPES e do CNPq. O autor recebeu bolsa de estudos CAPES-REUNI.

AGRADECIMENTOS

À Professora Dr. Elfrides Schapoval pela orientação, confiança e dedicação durante o desenvolvimento deste trabalho, além do exemplo pessoal e profissional marcados principalmente pela competência e otimismo.

Ao Professor Dr. Martin Steppe pela coorientação e pela importante colaboração no desenvolvimento deste trabalho e, acima de tudo, pelos conhecimentos compartilhados.

Aos professores Dr. Cássia Garcia, Dr. Célia Chaves, Dr. Nadia Volpato e Dr. Tércio Oppe pelo exemplo profissional e auxílio. Aos amigos do LCQFar: Alianise, Amanda, Camila, Clésio, Diogo, Gustavo, Jaison, Lorena, Márcia, Mariana, Nathalie, Maximiliano, Rúbia e Vítor pela amizade e auxílios prestados. Em especial à bolsista de iniciação científica Caren Gobetti pela amizade, dedicação e colaboração na execução deste trabalho.

A minha colega e amiga Alini Lange pela amizade, companheirismo, auxílio e experiências compartilhadas.

Ao Cassiano Scaravonatto pelo amor, companheirismo e compreensão, extremamente importantes nesse momento.

Aos meus pais Flávio e Márcia, que sempre incentivaram meus estudos, agradeço pela dedicação ao longo dos anos, amor incondicional e por sempre acreditarem em mim. A minha irmã Luísa pelo apoio, amor e amizade.

Aos meus familiares que sempre torceram por mim e me apoiaram.

Ao Programa de Pós-Graduação desta Faculdade pela oportunidade de aprimoramento científico e crescimento pessoal e aos professores do PPGCF pelas disciplinas disponibilizadas.

A todos aqueles, que de uma maneira ou outra, contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

RESUMO

O cloridrato de mianserina é um fármaco utilizado no tratamento da depressão e depressão associada a ansiedade. Seu efeito antidepressivo é atribuído, principalmente, ao bloqueio dos receptores α_2 -adrenérgicos pré-sinápticos e à atividade antagonista nos receptores de serotonina. A mianserina é classificada como um antidepressivo atípico, tendo como base o seu mecanismo de ação não-definido. A análise de fármacos é fundamental nas diversas fases do desenvolvimento farmacêutico e a literatura pesquisada apresenta poucos relatos de determinação quantitativa e estudos de estabilidade deste fármaco na forma farmacêutica comprimido revestido. Assim, objetivou-se o desenvolvimento e validação de métodos analíticos para determinação qualitativa e quantitativa por espectrofotometria na região do ultravioleta (UV), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e eletroforese capilar (EC). Inicialmente foi realizada a caracterização da substância química de referência (SQR) de cloridrato de mianserina por espectroscopia de absorção na região do infravermelho (IV), análise térmica por calorimetria exploratória de varredura (DSC), determinação da faixa de fusão, espectrometria de massas e ressonância magnética nuclear. Além disso, o trabalho apresenta o ensaio de dissolução e o estudo da estabilidade do fármaco nos comprimidos revestidos com isolamento e identificação do produto de degradação majoritário obtido em condições oxidativas. A identificação do produto de degradação majoritário foi realizada por cromatografia líquida de ultra-performance (UPLC) acoplado à espectrometria de massas (EM).

Palavras-chaves: cloridrato de mianserina, cromatografia líquida de alta eficiência, eletroforese capilar, espectrometria de massas, ensaio de dissolução, estudo de estabilidade.

ABSTRACT

Mianserin hydrochloride is a drug for the treatment of depressive illness and depression associated with anxiety. Its antidepressant effect is mainly attributed to presynaptic α -2-adrenoreceptor blocking activity and serotonin receptors antagonism. Mianserin is classified as an atypical antidepressant, based on its mechanism of action not defined. The drug analysis is necessary in all steps of the pharmaceutical development and the literature has few reports of quantitative determination and stability studies of this drug in pharmaceutical formulation. Thus, the objective was the development and validation of analytical methods for qualitative and quantitative determination by UV spectrophotometry, liquid chromatography (LC) and capillary electrophoresis (CE). Initially was performed the characterization of mianserin reference standard by infrared spectroscopy (IR), thermal analysis by differential scanning calorimetry (DSC), determination of melting range, by mass spectrometry (MS) and by nuclear magnetic resonance techniques. Besides, it presents a dissolution test and stability study of the drug in coated tablets by the isolation and identification of the major degradation product from oxidative conditions. The identification of the major degradation product was performed by ultra high performance liquid chromatography (UHPLC) coupled to tandem mass spectrometry (MS).

Keywords: mianserin hydrochloride, liquid chromatography, capillary electrophoresis, mass spectrometry, dissolution test, stability studies.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.1. Estrutura química do cloridrato de mianserina	26
FIGURA 4.1. Curva de DSC da SQR de cloridrato de mianserina, obtida em atmosfera de nitrogênio.....	46
FIGURA 4.2. Espectro de absorção na região do IV da SQR do cloridrato de mianserina.....	49
FIGURA 4.3. Espectro de massas do cloridrato de mianserina SQR.....	50
FIGURA 4.4. Espectro de RMN ¹ H em metanol deuterado do cloridrato de mianserina.....	51
FIGURA 4.5. Estrutura química do cloridrato de mianserina com as respectivas atribuições.....	52
FIGURA 4.6. Espectro RMN ¹³ C em metanol deuterado do cloridrato de mianserina.....	52
FIGURA 5.1. Cromatograma obtido por CCD na análise da solução da SQR de cloridrato de mianserina.....	60
FIGURA 5.2. Espectros sobrepostos na região do UV das soluções da SQR e da solução amostra dos comprimidos de cloridrato de mianserina em HCl 0,1 M	61
FIGURA 5.3. Cromatogramas sobrepostos da SQR de cloridrato de mianserina e da solução amostra dos comprimidos de cloridrato de mianserina na concentração de 80,0 µg/ml.....	63
FIGURA 5.4. Eletroferogramas sobrepostos da SQR de cloridrato de mianserina e da solução amostra dos comprimidos de cloridrato de mianserina na concentração de 90,0 µg/ml, PI= tetraciclina.....	65
FIGURE 6.2.1. Chemical structure of mianserin hydrochloride.....	74
FIGURE 6.2.2. Chromatogram of the sample and excipients solution (a), after acid - HCl 1.0 M/2h and basic degradation - NaOH 1.0 M/2h (b), after UV-C light degradation – 254 nm/30 min (c) and oxidation (d).....	82
FIGURE 6.2.3. Plots of concentration (a) zero-order reaction, log of concentration (b) first-order reaction, and reciprocal of concentration (c) second-order reaction of mianserin hydrochloride remaining versus time..	84
FIGURE 6.2.4. Effects of different concentrations of mianserin (10 - 500 µg/ml) on cellular integrity, accessed by LDH released. Results are expressed as mean ± S.E.M. for two independent experiments performed	

in triplicate. Filled bars represent the control groups (methanol 8% and Triton X-100 1%) and open bars represent groups treated with mianserin: ^a values significantly different when compared with the control group; ^b values significantly different when compared with Mi 200; ^c values significantly different when compared with Mi 500; ^d values significantly different when compared with Triton X-100 1%, as determined by one-way ANOVA followed by Duncan's test.....	84
FIGURE 6.3.1. Chemical structure of mianserin hydrochloride.....	90
FIGURE 6.3.2. UV spectrum of formulation excipients, mianserin hydrochloride reference standard and sample in HCl 0.1 M.....	94
FIGURE 6.4.1. Chemical structure of mianserin hydrochloride	100
FIGURE 6.4.2. Representative electropherogram of (1) tetracycline and (2) mianserin hydrochloride at a concentration of 90.0 µg/mL. Operating conditions: 50 mM TRIS buffer and 50 mM SDS (pH 10.6), hydrodynamic injection (5 s at 50 mbar), 25 Kv, 25 °C and 220 nm.....	108
FIGURE 6.4.3. Electropherograms of the sample with internal standard and tablet excipients (a), after UV-C light degradation – 120 min (b), after oxidation – 120 min (c) and after acid (d) and basic (e) degradation.....	109
FIGURE 6.4.4. The full scan MS spectra of mianserin. (a) mianserin hydrochloride tablet solution and after degradation under: (b) oxidative condition: degraded products with <i>m/z</i> 141.2, <i>m/z</i> 158.1, <i>m/z</i> 208.3 and <i>m/z</i> 281.5 (8-hydroxymianserin and mianserin- <i>N</i> -oxide); (c) photolytic condition: degraded products with <i>m/z</i> 141.1, <i>m/z</i> 158.1 and <i>m/z</i> 249.3 (<i>N</i> -desmethyalmianserin); <i>m/z</i> 265.6 is mianserin.....	111
FIGURE 7.2.1. Chemical structure of mianserin hydrochloride.....	129
FIGURE 7.2.2. Dissolution profiles of mianserin hydrochloride tablets using acetate buffer pH 4.1, acetate buffer pH 5.0 and phosphate buffer pH 6.8 and apparatus 2 rotating at 75 rpm.....	134
FIGURE 7.2.3. Tablets dissolution profile using HCl 0.1 M and paddle at 50 rpm.....	135
FIGURE 7.2.4. UV spectrum of mianserin hydrochloride reference standard (___) and placebo (...) before (A) and after (B) filtration with 0.45 µm nylon filter to the dissolution test in 0.1 M HCl at 37± 0.5 °C and paddle rotating at 150 rpm for 1 h.....	136
FIGURE 7.2.5. Percentage of drug absorbed (FA) versus time curve for mianserin hydrochloride tablets using Wagner-Nelson method.....	137
FIGURE 7.2.6. Plot of mean percentage of drug absorbed (FA) versus mean percentage of drug dissolved (FD) for Tolvon®.....	138

FIGURE 8.2.1. Chemical structure of mianserin hydrochloride.....	149
FIGURE 8.2.2. MIA methanolic solution after UV-C light (90 min) and after oxidative degradation (H ₂ O ₂ 3% - 24h).....	152
FIGURE 8.2.3. Analysis of two degradation products formed after oxidative degradation (H ₂ O ₂ 20% - 3h) by HPLC analytical method.....	153
FIGURE 8.2.4. HPLC chromatogram to evaluate the purity of the DP by UV detection at 278 nm. Chromatographic conditions: Luna Phenomenex C ₁₈ (250 x 10.0 mm, 5 μm), 1.0 mL.min ⁻¹ flow rate and mobile phase: methanol and water (80:20, v/v).....	154
FIGURE 8.2.5. Analysis of MIA reference solution (100.0 μg.mL ⁻¹) by UPLC-Micromass Q-ToF mass spectrometer, UPLC-UV and UPLC-MS....	155
FIGURE 8.2.6. Analysis of isolated DP (100.0 μg.mL ⁻¹) by UPLC-Micromass Q-ToF mass spectrometer, UPLC-UV and UPLC-MS.....	156
FIGURE 8.2.7. The MS/MS analysis of the ion <i>m/z</i> 561.15 and the ion <i>m/z</i> 281.06.....	157
FIGURE 8.2.8. Proposed oxidative fragmentation of MIA by UPLC-UV-MS.....	158
FIGURE 8.2.9. Cytotoxicity study of MIA and DP at concentrations of 10.0, 25.0, 50.0 and 100.0 μg.mL ⁻¹ . Values of 100% indicates total cellular viability. Triton X-100 1% represents cell injury (positive control). S: samples and DP: isolated degradation product (after degradation in H ₂ O ₂ 20% for 3h); *Significant differences between means (p<0.05).....	159

LISTA DE TABELAS

TABELA 4.1. Frequências de absorção das principais bandas de absorção do cloridrato de mianserina e suas respectivas atribuições.....	49
TABELA 4.2. Atribuições do espectro de RMN ¹ H do cloridrato de mianserina em metanol deuterado.....	51
TABELA 4.3. Atribuições do espectro de RMN ¹³ C do cloridrato de mianserina em metanol deuterado.....	53
TABELA 5.1. Determinação da solubilidade da SQR de cloridrato de mianserina conforme a F. Bras. IV (1988).....	58
TABELA 5.2. Condições cromatográficas definidas para identificação e quantificação de cloridrato de mianserina nos comprimidos revestidos por CLAE.....	62
TABELA 5.3. Condições eletroforéticas para identificação e quantificação de cloridrato de mianserina nos comprimidos revestidos por MECK.....	64
TABLE 6.2.1. Precision of HPLC method for determination of mianserin hydrochloride.....	83
TABLE 6.2.2. Accuracy of HPLC method for determination of mianserin hydrochloride.....	83
TABLE 6.2.3. Robustness of the HPLC method.....	83
TABLE 6.3.1. Precision of UV method for determination of mianserin hydrochloride.....	94
TABLE 6.3.2. Accuracy of UV method for determination of mianserin hydrochloride.....	94
TABLE 6.3.3. Results of the determination of mianserin hydrochloride in coated tablets.....	95
TABLE 6.4.1. Factors and levels applied to the robustness test.....	106
TABLE 6.4.2. Intra-day and inter-day precision of mianserin hydrochloride by CE method.....	112
TABLE 6.4.3. Results for mianserin hydrochloride accuracy test by CE method.....	112
TABLE 6.4.4. Plackett-Burman experimental design, the obtained response for each experiment and the effects of the investigated factors in robustness evaluation.....	113

TABLE 7.2.1. Precision of the Dissolution Method.....	136
--	------------

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	25
2. OBJETIVOS.....	29
2.1. Objetivo geral e objetivos específicos.....	31
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	33
3.1. Aspectos gerais.....	35
3.2. Aspectos farmacológicos.....	36
3.3. Características físico-químicas.....	37
3.3.1. Mianserina.....	37
3.3.2. Cloridrato de mianserina.....	37
3.4. Determinação qualitativa e quantitativa	37
3.4.1. Espectrofotometria na região do ultravioleta (UV) e do visível (VIS).....	38
3.4.2. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	38
3.4.3. Eletroforese capilar (EC).....	39
3.5. Ensaio de dissolução.....	40
3.6. Estabilidade - Isolamento e identificação de produtos de degradação.....	41
4. CAPÍTULO I – CARACTERIZAÇÃO DA SUBSTÂNCIA QUÍMICA DE REFERÊNCIA (SQR) DE CLORIDRATO DE MIANSERINA.....	43
4.1. Introdução.....	45
4.2. SQR de cloridrato de mianserina.....	45
4.3. Parte experimental.....	46
4.3.1. Caracterização da SQR de cloridrato de mianserina.....	46
4.3.1.1. Análise térmica por calorimetria diferencial de varredura (DSC).....	46
4.3.1.1.1. Resultados e discussão.....	46
4.3.1.2. Faixa de fusão pelo método de capilar.....	47
4.3.1.2.1. Resultados e discussão.....	47
4.3.1.3. Faixa de fusão utilizando microscópio de ponto de fusão tipo Koffler.....	48
4.3.1.3.1. Resultados e discussão.....	48
4.3.1.4. Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (IV).....	48
4.3.1.4.1. Resultados e discussão.....	48
4.3.1.5. Espectrometria de massas.....	50
4.3.1.5.1. Resultados e discussão.....	50

4.3.1.6. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ¹ H) e de carbono (RMN ¹³ C).....	50
4.3.1.6.1. Resultados e discussão.....	50
4.4. Conclusões.....	54
5. CAPÍTULO II – DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA DETERMINAÇÃO QUALITATIVA DE CLORIDRATO DE MIANSERINA EM COMPRIMIDOS REVESTIDOS.....	55
5.1. Introdução.....	57
5.2. Produto Farmacêutico.....	57
5.3. Parte experimental.....	58
5.3.1. Determinação da solubilidade da SQR de cloridrato de mianserina	58
5.3.1.1. Resultados e discussão.....	58
5.3.2. Cromatografia em camada delgada (CCD).....	59
5.3.2.1. Condições cromatográficas.....	59
5.3.2.2. Resultados e discussão.....	59
5.3.3. Espectrofotometria na região do UV	60
5.3.3.1. Condições espectrofotométricas.....	60
5.3.3.2. Resultados e discussão.....	61
5.3.4. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	62
5.3.4.1. Condições cromatográficas.....	62
5.3.4.2. Resultados e discussão.....	63
5.3.5. Eletroforese Capilar (EC).....	63
5.3.5.1. Condições eletroforéticas.....	63
5.3.5.2. Resultados e discussão.....	64
5.4. Conclusões.....	65
6. CAPÍTULO III - DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA DE CLORIDRATO DE MIANSERINA EM COMPRIMIDOS REVESTIDOS	67
6.1. Introdução.....	69
6.2. Photodegradation kinetics, cytotoxicity assay and determination by stability-indicating HPLC method of mianserin hydrochloride.....	71
6.3. Ultraviolet Spectrophotometric Method for Analytical Determination of Mianserin Hydrochloride in Coated Tablets and Comparision with LC.....	87

6.4. Micellar electrokinetic chromatographic method for mianserin hydrochloride and analysis of degradation products by mass spectrometry.....	97
7. CAPÍTULO IV – ENSAIO DE DISSOLUÇÃO PARA OS COMPRIMIDOS DE CLORIDRATO DE MIANSERINA.....	119
7.1. Introdução.....	121
7.2. Dissolution Test for Mianserin Hydrochloride in Tablets.....	125
8. CAPÍTULO V – ESTUDO DA ESTABILIDADE: ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DO PRODUTO DE DEGRADAÇÃO MAJORITÁRIO OBTIDO.....	141
8.1. Introdução.....	143
8.2. Isolation and identification of mianserin hydrochloride oxidative degradation products by UPLC-UV-MS and cytotoxicity <i>in vitro</i> assay.....	145
9. DISCUSSÃO GERAL.....	163
10. CONCLUSÕES.....	173
11. REFERÊNCIAS.....	177

1. INTRODUÇÃO

A depressão é uma condição psiquiátrica extremamente comum, para a qual existe uma série de teorias neuroquímicas e uma variedade correspondente de diferentes tipos de fármacos usados no tratamento. Pesquisas sugerem que desequilíbrios apresentados em dois neurotransmissores, serotonina (5-hidroxitriptamina, 5-HT) e norepinefrina (NE), possuem importante papel, não somente nos sintomas emocionais da depressão, mas também nos sintomas físicos dolorosos, frequentemente associados com a doença (STAHL, 2002).

Agentes antidepressivos, também conhecidos como antidepressores, são aqueles usados para restaurar pacientes mentalmente deprimidos a um estado mental melhorado. São úteis em depressões e sintomas depressivos e, até certo ponto, no tratamento das fases depressivas de determinados tipos de esquizofrenia. Diminuem a intensidade dos sintomas, reduzem a tendência ao suicídio e aceleram a velocidade de normalização. Não se conhece o mecanismo de ação exato dos agentes antidepressivos. A demora no início da atividade clínica destes fármacos levou à hipótese atual de que os efeitos farmacológicos e clínicos produzidos pela administração destes agentes por tempo prolongado resultam de alteração gradual, ou mudanças “adaptativas”, de receptores adrenérgicos, dopaminérgicos e serotoninérgicos (KOROLKOVAS, 2006).

Desde 1950, consistente evidência tem sido obtida acerca da efetividade do tratamento farmacológico nas depressões. Os medicamentos antidepressivos têm reduzido a morbidade e melhorado o desfecho clínico de milhares de casos de depressão em todo o mundo. Apesar do grande avanço nesta área e do desenvolvimento de novas classes de agentes antidepressivos, os profissionais envolvidos com o manejo desses pacientes ainda se defrontam com algumas dificuldades. Infelizmente cerca de 30% a 40% dos enfermos não respondem adequadamente ao tratamento inicial e podem levar cerca de seis semanas para caracterizar que um determinado medicamento não é efetivo para aquele caso (LIMA *et al.*, 2004).

O uso de fármacos com eficácia em distúrbios psiquiátricos tornou-se disseminado a partir da década de 50 (BALDESSARINI, 2003). Estudos epidemiológicos de grande escala mostram que a depressão e os distúrbios de ansiedade juntos são as condições clínicas que mais aparecem no mundo (HOLSBOER, 2004). A depressão é uma doença comum que aflige 5-6% da

população. Além disso, é estimado que 10-15% das pessoas têm experiência de depressão alguma vez durante a vida (WALLACE, 2000).

O cloridrato de mianserina (Figura 1.1) é um antidepressivo tetracíclico que apresenta menor atividade anticolinérgica e cardiotoxicidade quando comparado aos antidepressivos tricíclicos (HEFNAWY e ABOUL-ENEIN, 2004). É administrado na forma de racemato R (-) e S (+) em uma dose de 30 a 90 mg por dia (XU *et. al.*, 2008).

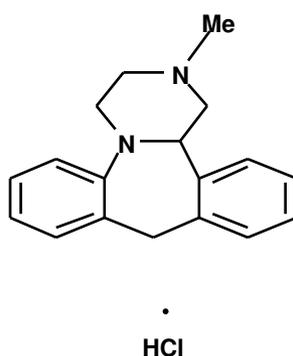


FIGURA 1.1. Estrutura química do cloridrato de mianserina.

No Brasil, a mianserina é utilizada com o nome comercial de Tolvon® sob apresentação de comprimidos revestidos. O desenvolvimento e a comercialização do produto são de responsabilidade da Indústria Farmacêutica Organon (Schering-Plough).

A análise de fármacos é fundamental nas diversas fases de desenvolvimento farmacêutico, tais como estudos de formulação, estabilidade e controle de qualidade. A falta de métodos confiáveis para avaliação da qualidade dos produtos farmacêuticos limita a eficiência dos programas de validação e da vigilância desses produtos (SWARTZ e KRULL, 1998). Diante disso, somente a validação de métodos analíticos, utilizados para avaliar a qualidade dos fármacos, garante que os mesmos atendam às exigências das aplicações analíticas e assegure a confiabilidade dos resultados obtidos (BRASIL, 2003a; ICH 2005, USP 34, 2011).

A Farmacopéia Britânica (BP 2011) possui a monografia do fármaco, porém a única metodologia descrita para o doseamento do mesmo é a cromatografia gasosa.

Na literatura pesquisada foram encontrados poucos métodos para determinação quantitativa do cloridrato de mianserina na forma farmacêutica comprimido, bem como relatos sobre sua estabilidade. Além disso, não foi encontrado método para o ensaio de dissolução dos comprimidos revestidos. Com base no exposto, a validação de métodos analíticos para realização do controle de qualidade do fármaco em comprimidos revestidos, possibilitando a análise qualitativa e quantitativa, o ensaio de dissolução e o estudo de estabilidade com posterior isolamento e elucidação estrutural do(s) produto(s) de degradação majoritário(s) formado(s) justificam a realização deste trabalho.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Desenvolver e validar metodologia analítica para a caracterização e determinação qualitativa e quantitativa do cloridrato de mianserina em comprimidos revestidos, desenvolver e validar o ensaio de dissolução, bem como realizar estudo da estabilidade com posterior isolamento e elucidação do produto de degradação majoritário formado.

2.1.1. Objetivos específicos

- Caracterizar a substância química de referência (SQR) por meio das análises de calorimetria diferencial de varredura (DSC), espectroscopia na região do infravermelho (IV), espectrometria de massas (EM) e ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ^1H) e carbono (RMN ^{13}C);
- Desenvolver métodos para identificação do cloridrato de mianserina nos comprimidos revestidos, utilizando cromatografia em camada delgada (CCD), espectrofotometria na região do UV, cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e eletroforese capilar (EC);
- Desenvolver e validar métodos para quantificação do cloridrato de mianserina em comprimidos revestidos por espectrofotometria na região do UV, CLAE e EC;
- Realizar análise estatística comparativa entre os métodos propostos;
- Desenvolver e validar o ensaio de dissolução para os comprimidos revestidos;
- Realizar estudo da estabilidade térmica, química e fotoquímica da SQR e dos comprimidos revestidos de cloridrato de mianserina;
- Realizar ensaio de citotoxicidade com a amostra após degradação fotolítica;
- Isolar o produto de degradação majoritário, obtido em condições oxidativas, por CLAE semi-preparativa;
- Identificar o produto de degradação majoritário formado do cloridrato de mianserina, utilizando UPLC acoplado à espectrometria de massas.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Aspectos gerais

A depressão é o mais comum dos distúrbios afetivos, podendo variar desde uma condição muito branda, limítrofe da normalidade, até uma depressão severa (psicótica) acompanhada de alucinações e delírios (RANG *et al.*, 2004).

A *World Health Organization* (WHO) define a depressão como um transtorno mental comum que se apresenta com humor deprimido, perda de interesse ou prazer, sentimentos de culpa e baixa auto-estima, distúrbios do sono e baixa concentração. Estes problemas podem se tornar crônicos ou recorrentes e levar a prejuízos substanciais na capacidade de uma pessoa para cuidar de suas responsabilidades cotidianas. Na pior das hipóteses, a depressão pode levar ao suicídio, uma fatalidade trágica associada com a perda de cerca de 850.000 vidas a cada ano.

As observações iniciais de que os antidepressivos bloqueiam a recaptção neuronal ou inibem o metabolismo de NE ou 5-HT levaram à hipótese clássica de que a depressão decorreria da falta desses neurotransmissores no sistema nervoso central (KOROLKOVAS, 1988; BALDESSARINI, 2003; FUCHS e WANNMACHER, 2004). O restabelecimento das funções neuronais envolvidas na regulação do humor ocorre através da ligação destes neurotransmissores aos seus receptores, desencadeando uma cascata de sinais intracelulares que ativam fatores de transcrição, os quais promovem a expressão de genes (VETULANI e NALEPA, 2000).

Há uma grande sobreposição dos sintomas mediados por estes dois neurotransmissores, tornando impossível determinar clinicamente se um paciente deprimido responderá melhor a um inibidor de recaptção de 5-HT ou de NE. Além disso, pelo fato de muitos pacientes apresentarem tanto os sintomas emocionais quanto físicos da depressão, usar um antidepressivo que atue tanto na 5-HT como na NE pode aumentar a chance de melhora de todos os sintomas dos pacientes (WECKER e CATALANO, 2006).

A mianserina é um antidepressivo tetracíclico que bloqueia os receptores α_2 -pré-sinápticos, resultando em níveis mais altos de NE na fenda sináptica e que

também apresenta propriedades anti-histamínicas, sendo assim empregada tanto no tratamento da depressão quanto em distúrbios do sono (XU *et al.*, 2008). Apresenta também atividade antagonista nos receptores de 5-HT (PAWLOWSKA *et al.*, 2003).

Sua metabolização ocorre principalmente por N-desmetilação, hidroxilação aromática, N-oxidação e N-glicuronidação. A N-desmetilmianserina é o principal metabólito da mianserina em plasma e contribui para os efeitos terapêuticos da mesma nos pacientes (CHAUHAN *et al.*, 2005).

3.2. Aspectos farmacológicos

A mianserina é administrada por via oral e absorvida rapidamente. Atinge concentração plasmática máxima em duas a três horas, sendo que seu tempo de meia-vida plasmática é cerca de 17 horas. Sua biodisponibilidade é baixa, de aproximadamente 30% e fixa-se extensivamente (90%) a proteínas plasmáticas. Sofre biotransformação hepática por hidroxilação aromática, desmetilação e N-oxidação; 70% do fármaco e seus metabólitos são excretados pela urina e quase todo resto pelas fezes, sendo que apenas 0,2 a 0,6% são eliminados pelo leite.

O fármaco é indicado para os estados depressivos de todas as naturezas, sobretudo na depressão endógena, depressão reativa, melancolia involutiva, depressão associada a distúrbios somáticos e estados depressivos do tipo neurótico.

A dose inicial recomendada para adultos, via oral, é de 30 a 40 mg por dia, sendo que esta dose pode ser ajustada de acordo com a resposta clínica. A dose máxima diária é de 90 mg e a dose para crianças não foi determinada.

Alguns efeitos adversos que podem ocorrer são: sonolência, secura da boca, constipação, raramente ocorrem convulsões, ganho de peso, edemas e disfunção hepática, discrasias sanguíneas como granulocitopenia ou agranulocitose (KOROLKOVAS, 2006).

3.3. Características Físico-Químicas (BP, 2011; THE MERCK, 2001; ACD, 2009)

3.3.1. Mianserina

- Nome químico: 1,2,3,4,10,14-b-hexahidro-2-metildibenzo[c,f]pirazino[1,2- α]azepina
- CAS: 24219-97-4
- Fórmula molecular: $C_{18}H_{20}N_2$
- Massa molecular: 264,36

3.3.2. Cloridrato de mianserina

- CAS: 21535-47-7
- Fórmula molecular: $C_{18}H_{20}N_2.HCl$
- Massa molecular: 300,83
- Pó branco ou quase branco
- Faixa de fusão: 282 – 284 °C
- Solubilidade: moderadamente solúvel em água, solúvel em diclorometano e ligeiramente solúvel em álcool
- $pK_{a1} = 8,26$; $pK_{a2} = 2,70$

3.4. Determinação Qualitativa e Quantitativa

A identificação dos fármacos nos produtos acabados é fundamental para o controle de qualidade dos mesmos. São várias as metodologias e técnicas analíticas utilizadas na identificação e caracterização de substâncias, sendo escolhidas avaliando-se fatores relativos à substância como também ao método empregado.

Em relação à quantificação, devem ser utilizados métodos analíticos validados. A validação de um método analítico é o processo pelo qual se estabelece, através de estudos laboratoriais, se os parâmetros de desempenho analítico atendem às exigências para a aplicação analítica pretendida. Os estudos para validação dos métodos analíticos devem ser realizados de acordo com os principais Códigos Oficiais, avaliando os seguintes parâmetros de desempenho analítico:

especificidade, linearidade, precisão (repetibilidade e precisão intermediária), exatidão, robustez, e, quando aplicáveis, limites de detecção e quantificação (BRASIL, 2003a; ICH, 2005; USP 34, 2011).

A utilização de métodos analíticos validados é imprescindível para que o controle de qualidade possa garantir a segurança, eficácia e qualidade de um medicamento. São várias as metodologias e técnicas analíticas disponíveis, sendo que a escolha baseia-se em fatores relativos à substância a ser analisada, bem como nas características do método a ser empregado.

3.4.1. Espectrofotometria na região do ultravioleta (UV) e do visível (VIS)

A espectrofotometria na região do UV/visível é um método muito utilizado no controle de qualidade de produtos farmacêuticos pelo potencial da grande maioria dos fármacos de absorver energia nessas regiões. A disponibilidade de instrumentação, a simplicidade dos procedimentos, a velocidade, precisão e exatidão da técnica ainda fazem dos métodos espectrofotométricos uma atraente opção.

A literatura pesquisada descreve a determinação de mianserina em preparações farmacêuticas por espectrofotometria através de uma reação colorimétrica, onde a mianserina reage com o ácido sulfônico de alizarina resultando em uma solução de cor amarelo-avermelhada (KHAN e colaboradores, 2002); DEVANI e colaboradores (1990) descrevem a determinação da mianserina com 3-metil-2-benzotiazolinona-hidrazona em 580 nm; e ainda FARAG e colaboradores (2011) descrevem um método onde ocorre uma reação de complexação do fármaco com ácido pícrico, vermelho de clorofenol, azul de bromotimol e púrpura de bromocresol. Os métodos mostraram-se adequados para quantificação do fármaco.

3.4.2. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Atualmente, a CLAE é uma das técnicas analíticas mais utilizadas na determinação quantitativa de fármacos. A maioria dos Códigos Oficiais preconiza a

utilização desta técnica em função de suas inúmeras vantagens como precisão, exatidão, seletividade e capacidade de automação.

A CLAE, especialmente com detecção na região do UV, constitui-se em um procedimento de ampla utilização, principalmente em razão da sua versatilidade e disponibilidade em diversos laboratórios. A possibilidade de variação dos tipos de colunas, fase móvel empregada e do modo de detecção permite o uso desta técnica nas diferentes fases de estudo de produtos farmacêuticos (COLLINS e colaboradores, 2006; KAZAKEVICH & LOBRUTTO, 2007).

Na literatura pesquisada, foram encontrados diversos artigos que empregam a CLAE para a quantificação do cloridrato de mianserina em fluidos biológicos, dentre os quais pode-se destacar: BROWN E COLABORADORES (1992) descreveram um método analítico para determinação da mianserina em plasma utilizando detecção eletroquímica; CHAUHAN e colaboradores (2005) que descreveram um método utilizando detecção por espectrometria de massas para a quantificação de cloridrato de mianserina e seus metabólitos em fluidos biológicos, uma vez que a CLAE acoplada à EM é amplamente utilizada devido a sua elevada sensibilidade e precisão; HEFNAWY e ABOUL-ENEIN (2004) descreveram um método para análise da mianserina e seus metabólitos em plasma utilizando extração em fase sólida; LUKASZKIEWICZ e colaboradores (2007) descreveram um método para determinação da mianserina em plasma com detector de UV e, ainda, XU e colaboradores (2008), descreveram a determinação da mianserina em plasma para aplicação em estudos de bioequivalência. Também é descrita a separação enantiomérica da mianserina de seu principal metabólito, 6-azamianserina, utilizando fase estacionária quiral (SELDITZ e colaboradores, 1998). No entanto, não foram encontrados relatos de quantificação do fármaco em comprimidos revestidos.

3.4.3. Eletroforese capilar (EC)

A EC é uma técnica de separação muito utilizada para análise de compostos ionizados. Sua aplicação permite a determinação quantitativa de fármacos, impurezas e substâncias relacionadas em produtos acabados, bem como sua

utilização em análises enantiosseletivas. Além disso, apresenta uma série de vantagens sobre a CLAE, como, por exemplo, elevada eficiência, alta resolução e reduzido consumo de solvente (ALTRIA *et al.*, 1998). Essa técnica assume outras vantagens sobre a CLAE, pois problemas como pressão elevada, vazamento dos solventes e o custo elevado das colunas são eliminados. Entretanto, a técnica apresenta algumas desvantagens, como uma menor sensibilidade que está relacionada ao baixo volume de amostra injetado, estreita faixa de detecção devido ao diâmetro dos capilares e menor precisão de injeção (ALTRIA *et al.*, 1998; ALTRIA, 1999; WÄTZIG & GÜNTER, 2003).

A literatura pesquisada descreve a determinação dos enantiômeros da mianserina e seus metabólitos em plasma por EC (EAP *et al.*, 1997), pelo método de zona livre (GRODNER e PACHECKA, 2006) e ainda a separação dos enantiômeros utilizando ciclodextrinas neutras e carregadas (CHANKVETADZE *et al.*, 1995), porém, em relação à quantificação da mianserina na forma farmacêutica comprimido, não foram encontrados trabalhos científicos.

3.5. Ensaio de dissolução

A dissolução de medicamentos pode ser definida como o fenômeno em que um fármaco no estado sólido se libera de sua forma farmacêutica de administração e entra em solução. Uma vez solubilizado, o fármaco está pronto para ser absorvido pelo organismo. Para medicamentos de administração oral, os parâmetros fundamentais que controlam a taxa e a extensão da absorção são a sua solubilidade aquosa e sua permeabilidade gastrintestinal (AMIDON *et al.*, 1995; KASIM *et al.*, 2003).

Face à dose, à solubilidade e à permeabilidade, os fármacos podem ser classificados como pertencentes às seguintes classes (AMIDON *et al.*, 1995; BRASIL, 2003b; LINDENBERG *et al.*, 2004):

- Classe I: alta solubilidade (AS) e alta permeabilidade (AP);
- Classe II: baixa solubilidade (BS) e alta permeabilidade (AP);

- Classe III: alta solubilidade (AS) e baixa permeabilidade (BP);
- Classe IV: baixa solubilidade (BS) e baixa permeabilidade (BP).

A correlação *in vitro in vivo* (CIVIV) é esperada quando a dissolução é a etapa limitante da absorção do fármaco na circulação, ou seja, para aqueles com baixa solubilidade. Por essa razão, se o fármaco é altamente permeável e a dissolução é a etapa limitante da absorção (Classe II), é muito provável o desenvolvimento de uma CIVIV (AMIDON *et al.*, 1995; FDA, 1997).

Na literatura pesquisada não é descrita a classificação biofarmacêutica da mianserina. No entanto, com base nos dados de biodisponibilidade (30%) e alta solubilidade do fármaco, sua classificação biofarmacêutica pode ser sugerida.

Os estudos de dissolução *in vitro* constituem um dos elementos essenciais para avaliar e garantir as propriedades biofarmacotécnicas das formulações. Como não foram encontrados dados na literatura para o ensaio de dissolução da mianserina na forma farmacêutica comprimido revestido, justifica-se a realização de perfis de dissolução com os meios que apresentarem condição *sink* para o controle de qualidade de rotina dos comprimidos do fármaco.

3.6. Estabilidade - Isolamento e identificação de produtos de degradação

A introdução de fármacos no mercado faz com que sejam necessários métodos analíticos para identificar e quantificar as substâncias, bem como a realização de estudos de estabilidade para observar a formação de produtos de degradação e a redução do teor da substância em estudo.

O teste de estabilidade fornece informações sobre como a qualidade da matéria-prima ou mesmo do produto acabado varia frente a diversos fatores, como, por exemplo, temperatura, umidade, luz, reações de hidrólise e oxidação (KOMMANABOYINA e RHODES, 1999). Além disso, a estabilidade depende das propriedades físicas, químicas e físico-químicas dos fármacos, excipientes e embalagens utilizados (MATTHEWS, 1999). Para verificar o impacto desses fatores

sobre a estabilidade de fármacos ou medicamentos, são realizados testes de estabilidade com o propósito de monitorar reações de degradação, bem como avaliar a cinética de degradação do produto farmacêutico.

As reações de degradação de um produto farmacêutico ocorrem em velocidades definidas, são de natureza química e dependem de várias condições, como, por exemplo, concentração dos reagentes, temperatura, pH, radiação ou presença de catalisadores. No entanto, para definir a ordem e a velocidade de reação são necessários estudos de cinética química, os quais podem ser classificados em reações de ordem zero, primeira ordem ou segunda ordem (LACHMAN *et al.*, 2001).

A degradação de um produto farmacêutico pode ocasionar inúmeras alterações em suas características, com sérias consequências a sua qualidade, tais como redução ou aumento de sua atividade, alteração da biodisponibilidade, perda da uniformidade de conteúdo, perda da qualidade microbiológica, formação de produtos de degradação tóxicos e perda da integridade do recipiente de armazenamento, entre outras (RHODES, 2000).

O conhecimento teórico das reações de degradação e dos princípios de cinética química, assim como uma ampla pesquisa em torno dos procedimentos utilizados, são necessários para os estudos de estabilidade. Além disso, sabe-se que as reações de degradação nos medicamentos são de natureza química e ocorrem a velocidades definidas que podem ser aceleradas através do aumento da temperatura (RHODES, 2000).

Face aos inúmeros problemas decorrentes da degradação de um medicamento, torna-se muito importante a avaliação da estabilidade do mesmo, de forma a assegurar a identidade, a eficácia, a potência, a segurança e a pureza até o momento do seu uso, estabelecendo as condições mais apropriadas para sua armazenagem (NUDELMAN, 1975; MATTHEWS, 1999; KLICK *et al.*, 2005; MELVEGER e HUYNH-BA, 2009). Na literatura pesquisada não foram encontrados dados sobre a estabilidade da mianserina.

**4. CAPÍTULO I - CARACTERIZAÇÃO DA SUBSTÂNCIA QUÍMICA DE
REFERÊNCIA (SQR) DE CLORIDRATO DE MIANSERINA**

4.1. Introdução

O desenvolvimento de um método analítico depende de diversos fatores para oferecer resultados apropriados. Dentre esses, a substância utilizada como referência constitui-se em fator principal. Nesse sentido, a pureza da SQR é essencial para a validação de métodos analíticos. De acordo com o Food and Drug Administration (FDA), existem duas categorias de SQR: compendiais – as quais são obtidas de fontes como a USP e não necessitam de caracterização posterior e as não compendiais – são aquelas com elevado teor de pureza, mas que devem ser cuidadosamente caracterizadas para garantir sua identidade, potência e pureza (SWARTZ e KRULL, 1998). Diante disso, objetiva-se a caracterização da substância química de referência (SQR) de cloridrato de mianserina utilizada nesse estudo.

A análise espectrofotométrica no infravermelho (IV) é um dos métodos mais empregados para a identificação de fármacos. Através da análise de um espectro obtido no infravermelho é possível visualizar as bandas características de grupos funcionais que permitem a obtenção de informações estruturais úteis para a identificação de substâncias (CIENFUGOS e VAISTMAN, 2000).

Outra técnica adequada para este objetivo e sensível é a análise térmica por calorimetria diferencial de varredura (DSC) que permite avaliar as propriedades físico-químicas das substâncias em função da temperatura, podendo indicar a pureza e a identidade de fármacos (USP 34, 2011).

A ressonância magnética nuclear também fornece informações estruturais importantes para a caracterização e identificação de moléculas, enquanto que a espectrometria de massas permite a identificação pela massa do íon molecular e fragmentos.

4.2. SQR de Cloridrato de mianserina

A SQR de cloridrato de mianserina foi gentilmente cedida pela Indústria Farmacêutica Organon (Schering-Plough, São Paulo-SP), com teor de 99,90%.

4.3. Parte Experimental

4.3.1. Caracterização da SQR de cloridrato de mianserina

Utilizaram-se as seguintes técnicas para caracterização da SQR de cloridrato de mianserina: análise térmica por DSC, faixa de fusão, espectrofotometria na região do infravermelho (IV), espectrometria de massas (EM) e ressonância magnética nuclear (RMN).

4.3.1.1. Análise térmica por calorimetria diferencial de varredura (DSC)

As análises foram realizadas em calorímetro diferencial exploratório por fluxo de calor, Shimadzu DSC-60, dotado de controlador de fluxo para gás de purga (N₂) FC-60-A, integrador TA-60WS e *software* de controle e análise TA-60 versão 2.0.

Para realizar o ensaio, transferiu-se, aproximadamente 1,0 mg da SQR de cloridrato de mianserina para porta-amostra de alumínio, a qual foi selada e colocada no forno. A rampa de aquecimento utilizada foi de 10 °C/minuto até 300 °C e o fluxo de nitrogênio foi de 50 ml/minuto.

4.3.1.1.1. Resultados e discussão

A Figura 4.1 apresenta a curva de aquecimento obtida por DSC para a SQR de cloridrato de mianserina.

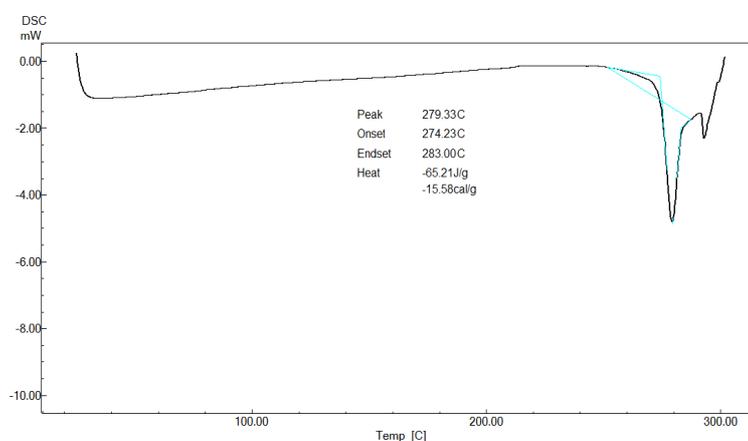


FIGURA 4.1. Curva obtida por DSC para a SQR de cloridrato de mianserina em atmosfera de nitrogênio e velocidade de aquecimento de 10 °C/minuto.

O ponto de fusão fornecido pelo equipamento de DSC é chamado de temperatura de fusão onset (T_{onset}), que é a temperatura de intersecção da linha de base extrapolada com a extremidade principal da transição extrapolada. Esta temperatura não sofre influência da velocidade de aquecimento (CLAS *et al.*, 1999). Uma taxa de aquecimento rápida (10 °C/minuto) é recomendada para amostras que degradam com o aquecimento (MATHKAR *et al.*, 2009).

O termograma obtido indicou faixa de fusão compreendida entre 274,23 °C e 283,0 °C, com pico em 279,33 °C. Além disso, o fármaco apresentou uma transição endotérmica, ou seja, absorve calor para fundir. A faixa de fusão obtida mostrou-se extremamente alargada em relação ao preconizado na literatura (282 °C – 284 °C). Esse fato pode estar relacionado com a provável decomposição da amostra durante a fusão (MATHKAR *et al.*, 2009). Assim sendo, esta técnica não é adequada para a identificação da SQR de cloridrato de mianserina.

4.3.1.2. Faixa de fusão pelo método de capilar

As análises pelo método do capilar foram realizadas em equipamento Mettler Toledo, FP 90, previamente calibrado. A amostra foi compactada em tubo capilar com diâmetro de 1 mm e 6 cm de comprimento e o aquecimento foi de 5 °C/minuto.

4.3.1.2.1. Resultados e discussão

A análise da faixa de fusão foi realizada em duplicata e os resultados obtidos foram: 279,5 °C – 280,5 °C e 279,1 °C – 281,5 °C, sendo que a faixa média foi de 279,3 °C – 281,0 °C. Os valores encontrados estão próximos do valor descrito na literatura, porém, foram necessárias cinco análises para obtenção dos resultados, devido à ocorrência de carbonização da amostra na temperatura próxima ao ponto de fusão. Essa decomposição, verificada pelo escurecimento da amostra dentro do capilar, impediu a adequada determinação do processo de fusão.

4.3.1.3. Faixa de fusão utilizando microscópio de ponto de fusão tipo Koffler

As análises foram realizadas em equipamento ponto de fusão tipo Koffler, marca Wagner & Muniz. Uma pequena quantidade de SQR foi colocada sobre a lâmina de vidro e após colocou-se a lamínula sobre a amostra. A lâmina passou por um aquecimento gradual em chapa metálica. Observou-se a fusão dos cristais através de microscópio.

4.3.1.3.1. Resultados e discussão

A faixa de fusão média obtida foi de 273 °C a 276 °C (n = 2). A faixa obtida experimentalmente apresenta-se inferior à faixa descrita na literatura. Assim sendo, esta técnica também não é adequada para a determinação da faixa de fusão da SQR de cloridrato de mianserina. As diferenças obtidas podem estar relacionadas com a ocorrência da degradação da amostra numa temperatura muito próxima ao ponto de fusão.

4.3.1.4. Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (IV)

A caracterização da SQR de cloridrato de mianserina por espectroscopia na região do IV foi realizada em espectrofotômetro FT-IR Perkin Elmer, modelo Spectrum BX. Neste equipamento de IV não é necessária a formação da pastilha de KBr, pois a amostra é introduzida diretamente no equipamento.

4.3.1.4.1. Resultados e discussão

O espectro na região do IV da SQR de cloridrato de mianserina está apresentado na Figura 4.2.

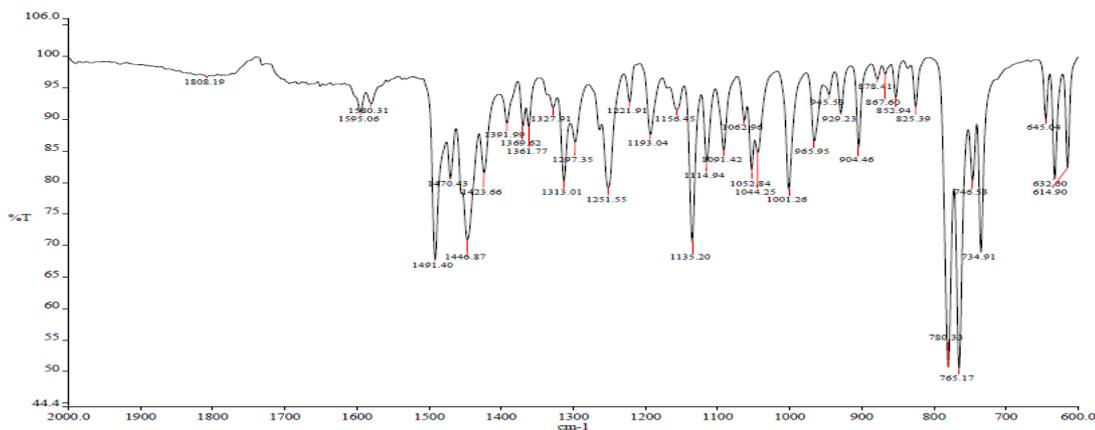


FIGURA 4.2. Espectro de absorção na região do IV da SQR de cloridrato de mianserina.

A identificação das bandas de absorção dos principais grupamentos químicos presentes na molécula de cloridrato de mianserina está descrita na Tabela 4.1., sendo que a atribuição das bandas características da molécula foi realizada com base na literatura pertinente (NAKANISHI, 1977; SILVERSTEIN *et al.*, 2007; PAVIA *et al.*, 2009;).

TABELA 4.1. Frequências das principais bandas de absorção de cloridrato de mianserina e suas respectivas atribuições

Frequência (cm ⁻¹)	Atribuição
1600 – 1400	Defomação axial de C=C de aromático
1350 – 1250	Amina aromática terciária (C-N)
900 – 675	Deformação angular de C-H fora do plano
785 – 765	Substituição em orto de fenila

O espectro de absorção obtido para a SQR de cloridrato de mianserina na região do infravermelho está de acordo com os dados encontrados na literatura e com o espectro apresentado na Farmacopéia Britânica, assegurando a identidade da substância química de referência (MOFFAT *et al.*, 2004; BP 2011).

4.3.1.5. Espectrometria de massas

O espectro de massas foi obtido por UPLC-UV/MS, no equipamento Waters® Acquity e espectrômetro de massas Micromass Q-Tof. A detecção do fármaco foi realizada por detector com interface de ionização por *eletrospray*, operado no modo positivo (ES⁺).

4.3.1.5.1. Resultados e discussão

O espectro de massas da SQR de cloridrato de mianserina está apresentado na Figura 4.3.

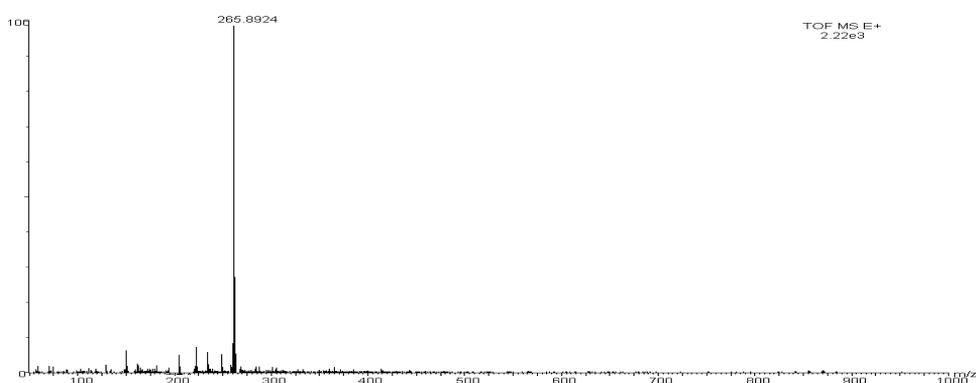


FIGURA 4.3. Espectro de massas do cloridrato de mianserina SQR.

O espectro de massas do cloridrato de mianserina SQR (Figura 4.3) apresenta o íon molecular em m/z 265,89, conferindo o peso molecular do fármaco.

4.3.1.6. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ¹H) e de carbono (RMN ¹³C)

As análises foram realizadas em espectrômetro da Bruker 250 MHz. O cloridrato de mianserina foi solubilizado em metanol deuterado para obtenção dos espectros de RMN ¹H e de RMN ¹³C.

4.3.1.6.1. Resultados e discussão

O resultado de RMN ^1H do cloridrato de mianserina está apresentado na Figura 4.4.

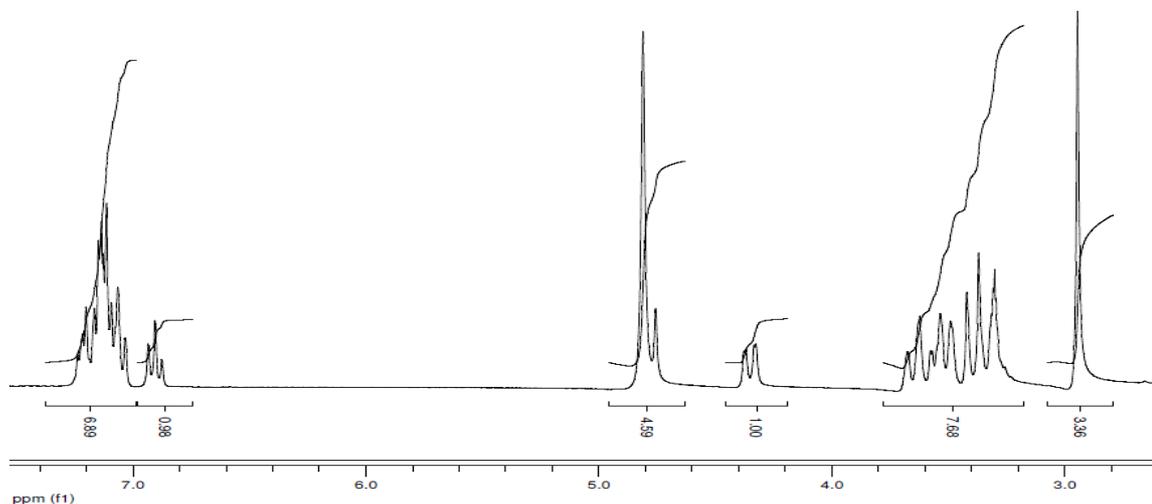


FIGURA 4.4. Espectro de RMN ^1H em metanol deuterado do cloridrato de mianserina.

As atribuições do espectro de RMN ^1H , bem como a estrutura química do cloridrato de mianserina indicando essas atribuições, estão apresentadas na Tabela 4.2 e na Figura 4.5, respectivamente.

TABELA 4.2. Atribuições do espectro de RMN ^1H do cloridrato de mianserina em metanol deuterado (PRETSCH *et al.*, 2000; PAVIA *et al.*, 2009)

Deslocamento químico (PPM)	Integração	Multiplicidade	Atribuição
2,94	3H	singleto	CH ₃ (c)
3,30	-	multipleto	metanol d ₄
3,50	6H	multipleto	CH ₂ (b), CH ₂ (d), CH ₂ (e)
4,35	1H	duplo dubleto	CH (a)
4,75	2H	singleto	CH ₂ (l)
4,81	-	singleto	metanol d ₄
6,90	1H	tripleto	CH (g)
7,12	7H	multipleto	CH (h), CH (i), CH (j), CH (n), CH (o), CH (p), CH (q)

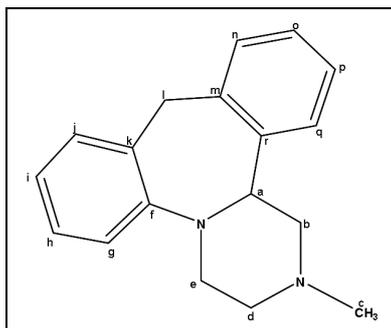


FIGURA 4.5. Estrutura química do cloridrato de mianserina com as respectivas atribuições.

O resultado de RMN ^{13}C , bem como as atribuições do espectro de RMN ^{13}C do cloridrato de mianserina, estão apresentados na Figura 4.6 e na Tabela 4.3, respectivamente.

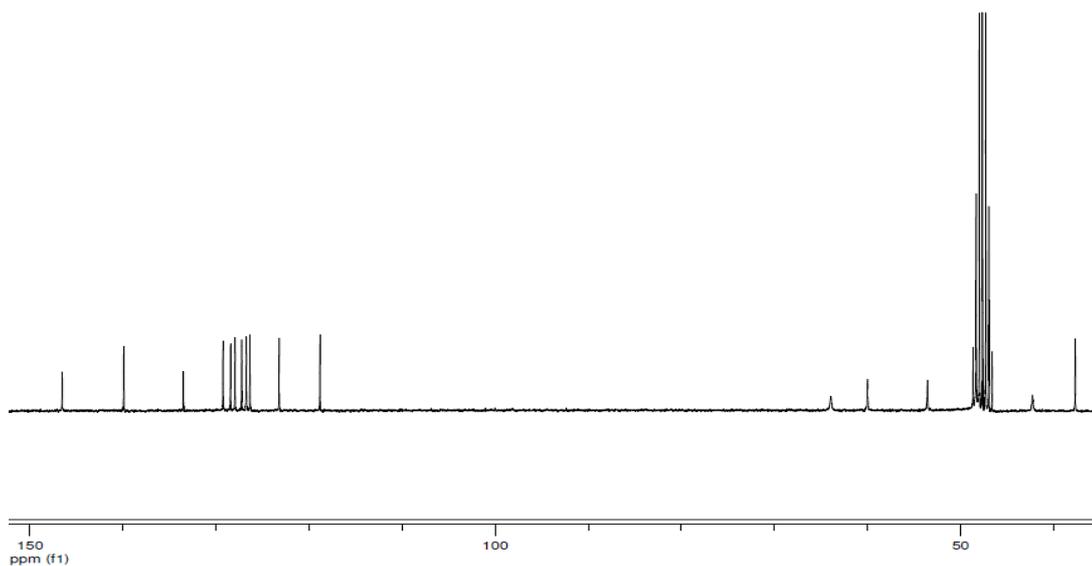


FIGURA 4.6. Espectro de RMN ^{13}C em metanol deuterado do cloridrato de mianserina.

TABELA 4.3. Atribuições do espectro de RMN ^{13}C do cloridrato de mianserina em metanol deuterado (PRETSCH *et al.*, 2000; PAVIA *et al.*, 2009)

Deslocamento químico (ppm)	Atribuição
39,04	CH ₃ (c)
43,64	CH ₂ (e)
49,00	metanol d ₄
54,92	CH ₂ (l)
61,35	CH ₂ (b) e CH ₂ (d)
65,30	CH (a)
120,19	CH (g)
124,58	CH (i)
127,72 a 130,61	CH (i), CH (j), CH (n), CH (o), CH (p), CH (q)
134,88	C (k)
141,28	C (m), C (r)
147,89	C (f)

No RMN ^{13}C foi possível observar os deslocamentos referentes a carbonos quaternários (f, k, m, r) que absorvem em regiões mais desblindadas, entre 134,88 e 147,89 ppm. Na literatura pesquisada foi encontrado um trabalho de WIKSTRÖM e colaboradores (2002), onde foi possível identificar alguns sinais semelhantes obtidos para o RMN ^1H e RMN ^{13}C .

Assim, a análise dos resultados obtidos nos ensaios de RMN ^1H e RMN ^{13}C para o cloridrato de mianserina permitiu a identificação da SQR pela interpretação dos principais deslocamentos químicos da molécula.

4.4. Conclusões

- ❖ A técnica da determinação da faixa de fusão pelo método de capilar, utilizando o equipamento Metler Toledo, foi a que apresentou o valor mais próximo ao descrito pela literatura e as técnicas de DSC e ponto de fusão não foram adequadas para a identificação da SQR de cloridrato de mianserina, devido à degradação da amostra;
- ❖ A análise do espectro na região do IV demonstrou as bandas características do cloridrato de mianserina permitindo a obtenção de informações estruturais úteis, assegurando assim a identidade da SQR;
- ❖ A análise por espectrometria de massas permitiu a identificação do cloridrato de mianserina através da verificação da sua massa molecular;
- ❖ A interpretação dos espectros de RMN-¹H e RMN-¹³C demonstrou que os sinais obtidos estão de acordo com as atribuições esperadas para a molécula do cloridrato de mianserina;
- ❖ A partir dos resultados obtidos, caracterizou-se a SQR de cloridrato de mianserina como adequada para ser utilizada nos estudos propostos nesta Tese.

**5. CAPÍTULO II - DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA
DETERMINAÇÃO QUALITATIVA DE CLORIDRATO DE MIANSERINA EM
COMPRIMIDOS REVESTIDOS**

5.1. Introdução

A identificação de fármacos em produtos acabados é normalmente realizada por meio da aplicação de técnicas cromatográficas e espectrofotométricas.

A CCD é uma técnica de separação que oferece fácil compreensão e execução, separações em breve espaço de tempo, versatilidade, grande reprodutibilidade e baixo custo (LOPES, 1997).

A identificação de fármacos por espectrofotometria na região do UV é realizada através da comparação do espectro da solução amostra com o espectro de uma solução padrão do mesmo fármaco em determinada concentração. Além disso, é possível verificar se os produtos apresentam os mesmos comprimentos de onda máximos e mínimos de absorção. Mesmo não sendo um método seletivo, possui ampla aplicação nos Códigos Oficiais (WATSON, 2005).

A CLAE, quando utilizada para identificação de compostos, realiza a comparação entre os tempos de retenção obtidos para o pico da solução amostra e da solução padrão do fármaco. A utilização de detectores de arranjo de fotodiodos permite, além da comparação do tempo de retenção, verificar a similaridade entre os espectros obtidos para cada pico.

Na EC a identificação do fármaco na amostra de comprimidos é realizada através da comparação do tempo de migração da solução amostra com a solução padrão de fármaco. Da mesma forma, é possível caracterizar a pureza do pico eletroforético e sua identificação, através da análise do espectro gerado pelo detector DAD acoplado ao equipamento.

5.2. Produto Farmacêutico

Comprimidos revestidos de cloridrato de mianserina, contendo 30 mg (Tolvon[®]), fabricados pela Indústria Farmacêutica Organon, foram adquiridos no comércio farmacêutico local. Os excipientes presentes na formulação são: amido, dióxido de silício, estearato de magnésio, metilcelulose, fosfato de cálcio dibásico, hidroxipropilmetilcelulose, polietilenoglicol e dióxido de titânio.

5.3. Parte experimental

5.3.1. Determinação da solubilidade da SQR de cloridrato de mianserina

A determinação da solubilidade da SQR de cloridrato de mianserina foi realizada para verificar quais solventes poderiam ser utilizados como diluentes. Esse ensaio foi realizado conforme descrito na FB 5, 2010, através do método de partes, porém ao invés de pesar 1,0 g da SQR de cloridrato de mianserina, pesou-se 10,0 mg. Os solventes utilizados para verificação da solubilidade foram: água, metanol, acetonitrila, diclorometano, ácido clorídrico 0,1 *M* e 0,01 *M* e soluções tampão fosfato de potássio 50 mM pH 4,0, 5,0, 6,0 e pH 7,0 mantidos à temperatura ambiente.

5.3.1.1. Resultados e discussão

Os resultados da determinação da solubilidade da SQR de cloridrato de mianserina estão descritos na Tabela 5.1.

TABELA 5.1. Determinação da solubilidade da SQR de cloridrato de mianserina conforme a FB 5, 2010.

Solvente	Solubilidade
Água	Ligeiramente solúvel
Acetonitrila	Pouco solúvel
Ácido clorídrico 0,1 <i>M</i> e 0,01 <i>M</i>	Ligeiramente solúvel
Diclorometano	Ligeiramente solúvel
Metanol	Solúvel
Tampão fosfato pH 4,0	Ligeiramente solúvel
Tampão fosfato pH 5,0	Ligeiramente solúvel
Tampão fosfato pH 6,0	Pouco solúvel
Tampão fosfato pH 7,0	Muito pouco solúvel

5.3.2. Cromatografia em camada delgada (CCD)

5.3.2.1. Condições cromatográficas

Inicialmente testou-se a metodologia descrita na monografia do cloridrato de mianserina presente na Farmacopéia Britânica 2011, a qual emprega uma solução na concentração 2,0 mg/ml e um sistema eluente composto por dietilamina: éter:cicloexano (5:20:75, v/v). Porém, a metodologia não se mostrou reprodutível e as manchas apresentaram formação de cauda. Assim sendo, foram necessários ajustes para a otimização da técnica. Para tal, foram testadas diferentes concentrações de amostra e diferentes solventes orgânicos a fim de verificar qual o melhor sistema eluente a ser empregado na análise. Para demonstrar a adequabilidade do sistema em analisar substâncias estruturalmente semelhantes, testou-se a mirtazapina e a carbamazepina, pois o cloridrato de mianserina não pertence a uma classe específica de antidepressivos. Porém, como a mirtazapina não apresentou resultados satisfatórios, optou-se por utilizar a carbamazepina.

As soluções da SQR de cloridrato de mianserina, da amostra e da SQR de carbamazepina foram preparadas em diclorometano na concentração de 0,5 mg/ml.

O desenvolvimento cromatográfico foi realizado em placas cromatográficas aluminizadas de sílica-gel 60 F₂₅₄ (Merck). Após as aplicações das soluções, as placas foram transferidas para cubas, previamente saturadas com o sistema eluente, constituído de uma mistura de trietilamina, metanol e clorofórmio (03:92:05, v/v). Desenvolveu-se o cromatograma e realizou-se a visualização das manchas, por meio da exposição das placas à lâmpada de UV (254 nm).

5.3.2.2. Resultados e discussão

O perfil cromatográfico das amostras após revelação com luz ultravioleta a 254 nm pode ser visualizado na Figura abaixo:

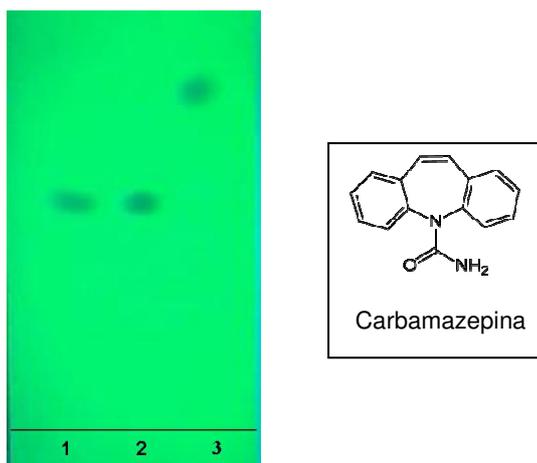


FIGURA 5.1. Cromatograma obtido por CCD na análise da solução SQR de cloridrato de mianserina (1), solução amostra dos comprimidos de cloridrato de mianserina (2) e da solução da SQR de carbamazepina (3), revelados por luz UV 254 nm.

Os valores de Rf obtidos para as soluções da SQR e da solução amostra dos comprimidos de cloridrato de mianserina foi de 0,55 e o Rf obtido para a SQR de carbamazepina foi de 0,73. O Rx obtido entre o Rf do cloridrato de mianserina e o Rf da carbamazepina foi de 0,75, demonstrando a capacidade do método em separar outra substância com estrutura semelhante. Os resultados obtidos sugerem a mesma identidade da SQR de cloridrato de mianserina e dos comprimidos revestidos, devido à similaridade no perfil cromatográfico demonstrado com a utilização do revelador luz UV (254 nm).

5.3.3. Espectrofotometria na região do UV

5.3.3.1. Condições espectrofotométricas

Foram traçados espectros de absorção molecular na faixa de 200 a 400 nm das soluções de SQR e dos comprimidos de cloridrato de mianserina, na concentração de 80,0 µg/ml, diluídas em HCl 0,1 M, metanol, água e diclorometano. As soluções amostra foram colocadas em banho de ultrassom por 20 minutos e, posteriormente, foram filtradas com papel filtro.

As análises espectrofotométricas foram realizadas em espectrofotômetro ultravioleta Shimadzu, modelo UV-160A. Os espectros obtidos foram sobrepostos e comparados quanto a seus perfis característicos.

5.3.3.2. Resultados e discussão

Foram testados HCl 0,1 M, metanol, diclorometano e água como solventes na espectrofotometria na região do UV. Quando foi utilizada a água como solvente, observou-se uma redução na intensidade de absorção da solução amostra em relação à solução SQR, podendo este fato estar relacionado com a presença dos excipientes da formulação. No caso do HCl 0,1 M, do metanol e do diclorometano, as intensidades de absorção foram bem semelhantes, então optou-se por utilizar HCl 0,1 M por se tratar de um solvente menos tóxico e de baixo custo.

Os espectros sobrepostos das soluções da SQR e da amostra dos comprimidos de cloridrato de mianserina, diluídos em HCl 0,1 M, na concentração de 80,0 µg/ml, estão apresentados na Figura 5.2.

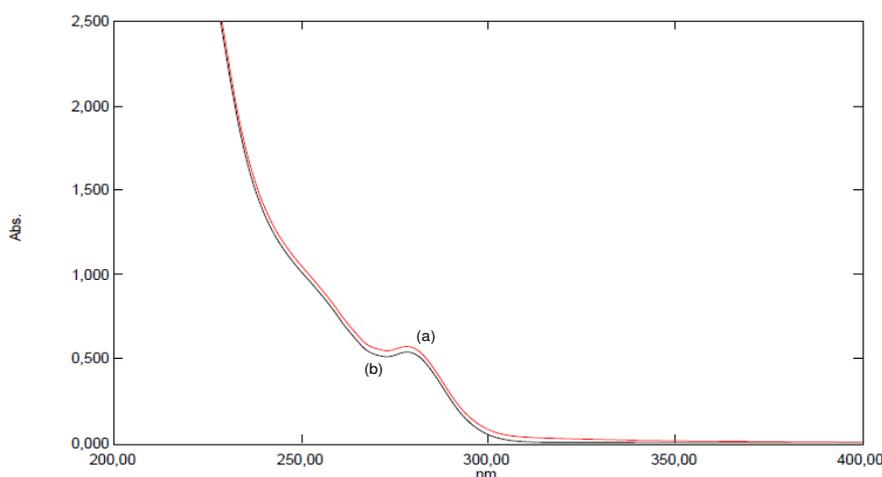


FIGURA 5.2. Espectros sobrepostos na região do UV das soluções da SQR (a) e da solução amostra dos comprimidos (b) de cloridrato de mianserina em HCl 0,1 M na concentração de 80,0 µg/ml.

Os espectros na região do UV obtidos para as soluções da SQR de cloridrato de mianserina e da amostra dos comprimidos, em HCl 0,1 M, apresentaram máximos de absorção no mesmo comprimento de onda, 278 nm. Além disso, os resultados obtidos indicam que a espectrofotometria na região do UV é útil para a identificação de cloridrato de mianserina na forma farmacêutica.

5.3.4. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

5.3.4.1. Condições cromatográficas

As análises cromatográficas foram realizadas em cromatógrafo a líquido de alta eficiência Agilent, modelo 1200 Series operado pelo programa *ChemStation*. As condições cromatográficas definidas para identificação e quantificação de cloridrato de mianserina estão apresentadas na Tabela 5.2.

As amostras foram preparadas utilizando a fase móvel na segunda diluição, sendo que a primeira diluição foi realizada em metanol. Para extrair o fármaco da forma farmacêutica, as soluções iniciais foram mantidas em banho de ultrassom por 20 minutos e posteriormente filtradas. Tanto a solução amostra quanto a solução de SQR de cloridrato de mianserina foram analisadas na concentração final de 80,0 µg/ml.

TABELA 5.2. Condições cromatográficas para identificação e quantificação de cloridrato de mianserina nos comprimidos revestidos por CLAE.

Parâmetro	Descrição
Fase móvel	Tampão fosfato de potássio monobásico pH 7,0 (com 0,3% de trietilamina) e metanol (15:85, v/v)
Fluxo	1,0 ml/min
Coluna	ACE [®] 5 C18 (250 mm x 4,0 mm, 5 µm)
Deteção	278 nm, detector de arranjo de fotodiodos
Temperatura do forno	25 °C
Volume injetado	20 µl

A fase móvel foi preparada a partir da mistura de tampão fosfato de potássio monobásico 50 mM (pH 7,0; contendo 0,3% de trietilamina) e metanol na proporção de 15:85 (v/v), sendo que o pH foi ajustado com ácido fosfórico 10%.

5.3.4.2. Resultados e discussão

Os cromatogramas sobrepostos da SQR de cloridrato de mianserina e da solução amostra dos comprimidos estão apresentados na Figura 5.3.

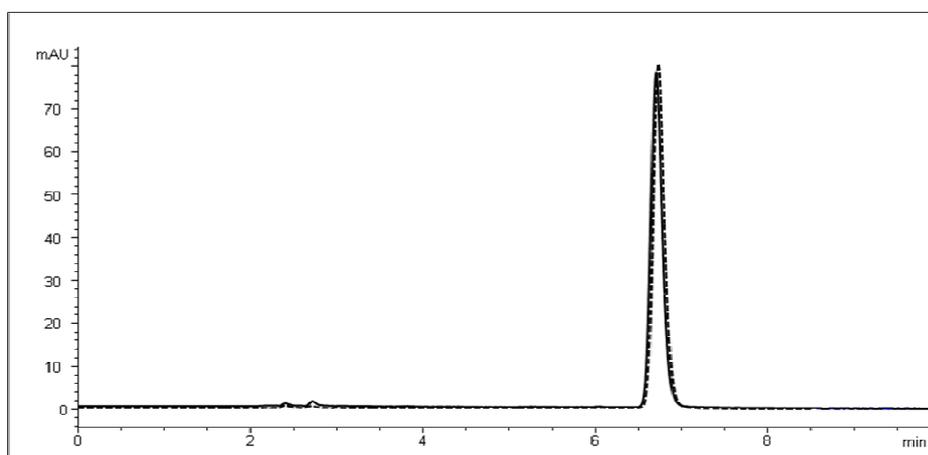


FIGURA 5.3. Cromatogramas sobrepostos da SQR de cloridrato de mianserina (---) e da solução amostra dos comprimidos revestidos (—) na concentração de 80,0 µg/ml.

A semelhança entre os tempos de retenção (6,6 minutos) obtidos para a solução da SQR de cloridrato de mianserina e solução dos comprimidos revestidos, demonstra a adequabilidade do método desenvolvido por CLAE para a determinação qualitativa de cloridrato de mianserina nos comprimidos revestidos.

5.3.5. Eletroforese Capilar (EC)

5.3.5.1. Condições eletroforéticas

Os experimentos por EC foram realizados em equipamento Agilent ^{3D}CE (Agilent Technologies) equipado com injetor automático, DAD e controlador de temperatura. O programa CE *ChemStation* foi utilizado para controle do sistema e tratamento de dados. As condições eletroforéticas definidas para identificação e quantificação de cloridrato de mianserina, utilizando o modo de separação por cromatografia eletrocínica micelar (MEKC) e tetraciclina como padrão interno, estão apresentadas na Tabela 5.3.

TABELA 5.3. Condições eletroforéticas para identificação e quantificação de cloridrato de mianserina nos comprimidos revestidos por MECK.

Parâmetro	Descrição
Capilar	40 cm de comprimento efetivo; 50 µm de d.i.
Temperatura	25 °C
Eletrólito	TRIS 50 mM pH 10,6 : SDS 50 mM
Tensão aplicada	25 kV (corrente aproximada de 22 µA)
Injeção	50 mBar durante 5 s
Detecção	DAD em 220 nm
Pré-condicionamento	1,5 min NaOH 0,1M; 1,5 min água; 3 min eletrólito
Padrão interno (PI)	Cloridrato de tetraciclina

5.3.5.2. Resultados e discussão

Da mesma forma que no método por CLAE, a identificação do fármaco na amostra de comprimidos foi realizada através da comparação do tempo de migração da amostra com aquele da solução de SQR de cloridrato de mianserina. Os eletroferogramas obtidos para a solução de SQR e solução amostra foram sobrepostos e podem ser visualizados na Figura 5.4.

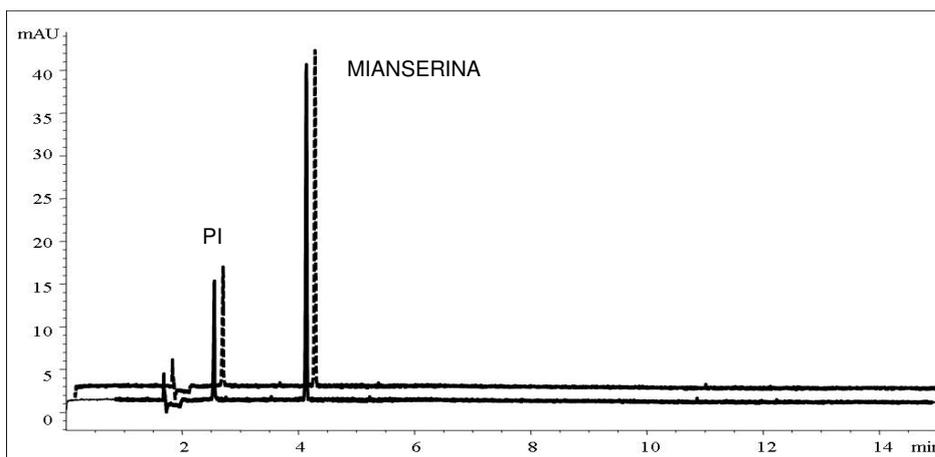


FIGURA 5.4. Eletroferogramas sobrepostos e propositalmente deslocados da SQR de cloridrato de mianserina (---) e da solução amostra dos comprimidos de cloridrato de mianserina (—) na concentração de 90,0 µg/ml, PI = tetraciclina

5.4. Conclusões

- ❖ O método proposto por CCD mostrou-se adequado para identificação de cloridrato de mianserina nos comprimidos revestidos;
- ❖ A obtenção de espectros com o mesmo comprimento de onda máximo de absorção, para as soluções da SQR de cloridrato de mianserina e amostra, preparadas em HCl 0,1 M, demonstrou a viabilidade da utilização do método por espectrofotometria na região do UV para determinação qualitativa do fármaco em sua forma farmacêutica estudada;
- ❖ Os semelhantes tempos de retenção obtidos para as soluções da SQR de cloridrato de mianserina e para a amostra, demonstraram a viabilidade da utilização do método por CLAE para identificação do fármaco nos comprimidos revestidos;

- ❖ O método eletroforético (MECK), o qual utilizou a tetraciclina como padrão interno, apresentou tempos de migração similares para as soluções da SQR de cloridrato de mianserina e para a amostra, demonstrando assim que o método por MECK é adequado para identificação do fármaco nos comprimidos revestidos.

**6. CAPÍTULO III - DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS
ANALÍTICOS PARA DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA DE CLORIDRATO DE
MIANSERINA EM COMPRIMIDOS REVESTIDOS**

6.1. Introdução

O controle de qualidade é fundamental no processo de desenvolvimento de novos fármacos e de formas farmacêuticas, associado ao controle aplicado nos processos de produção destes medicamentos, visando assim produzir, manter e assegurar a qualidade e a eficácia para cada unidade do produto farmacêutico (AVENDAÑO, 1993).

Para que um medicamento apresente o efeito terapêutico desejado, o mesmo deve conter o teor declarado do fármaco. Para isto, é imprescindível a utilização de métodos analíticos sensíveis e específicos à forma farmacêutica e às propriedades físico-químicas do fármaco.

A credibilidade nos procedimentos aplicados no controle de qualidade de medicamentos é um fator essencial na indústria farmacêutica, para isto é necessário que o método analítico empregado seja validado, assegurando, assim, a confiabilidade dos resultados obtidos.

A validação de um método analítico é o processo pelo qual se estabelece, através de estudos laboratoriais, se os parâmetros de desempenho analítico do método contemplam as exigências para a aplicação analítica pretendida. Os estudos para validação dos métodos analíticos foram realizados de acordo com os principais Códigos Oficiais, avaliando os seguintes parâmetros de desempenho analítico: especificidade, linearidade, precisão (repetibilidade e precisão intermediária), exatidão e robustez. Além disso, quando necessário, são avaliados os limites de detecção e quantificação (BRASIL, 2003a; ICH, 2005; USP 34, 2011).

Os estudos de degradação forçada demonstram a especificidade quando o método é desenvolvido como indicativo de estabilidade. O ICH recomenda a realização de teste de degradação para elucidar a característica da estabilidade dos fármacos (ICH, 2003).

A espectrofotometria na região do UV é um método utilizado no controle de qualidade de produtos farmacêuticos, devido ao potencial da grande maioria dos fármacos de absorver energia nessas regiões (WATSON, 2005). Sua principal

limitação é a falta de seletividade, uma vez que mais de uma substância pode apresentar absorção em um mesmo comprimento de onda.

Dentre os métodos propostos, a CLAE é a técnica analítica de escolha da indústria farmacêutica para a realização das análises de seus produtos e o método mais preconizado pelos Códigos Oficiais, apresentando maior sensibilidade e reprodutibilidade dos resultados (WATSON, 2005). Além disso, a técnica continua em ascensão devido às constantes inovações nos materiais de empacotamento das colunas, *softwares* de controle dos equipamentos e capacidade de hifenização com técnicas espectroscópicas.

O método por CLAE também pode ser utilizado para a determinação da cinética de reação de uma determinada substância, uma vez que o estudo da cinética de degradação é fundamental para o estudo da estabilidade de preparações farmacêuticas. Apresenta como objetivos obter, experimentalmente, os dados cinéticos e correlacioná-los, por equações matemáticas, além de propor mecanismos para as reações de degradação e estabelecer condições para acelerar ou diminuir a velocidade das reações (NUDELMAN, 1975; LACHMAN *et al.*, 2001; WATERMAN, 2009).

Por sua vez, a EC tem alcançado rápido desenvolvimento e ampla aplicação, principalmente na comunidade científica. Permite a otimização de diversos modos de separação utilizando o mesmo equipamento e o mesmo capilar, com alteração apenas da solução eletrolítica, além de sua aplicação ser voltada para um grande número de amostras, incluindo separação de compostos quirais, determinação de impurezas, substâncias relacionadas, produtos de degradação e metabólitos. A EC encontra-se bem estabelecida como técnica analítica, apresentando características como alta eficiência de separação, baixo consumo de amostras e reagentes e, principalmente, gera baixíssimo volume de resíduos (ALTRIA *et al.*, 1998; SANTORO *et al.*, 2000).

A determinação quantitativa de cloridrato de mianserina em comprimidos revestidos foi realizada utilizando a espectrofotometria na região do UV, CLAE e EC, apresentados nesse trabalho na forma de artigos científicos.

6.2. Photodegradation kinetics, cytotoxicity assay and determination by stability-indicating HPLC method of mianserin hydrochloride.

Pharmazie, v. 67 (6), p. 490-494, 2012.

Photodegradation kinetics, cytotoxicity assay and determination by stability-indicating HPLC method of mianserin hydrochloride.**ABSTRACT**

A stability-indicating HPLC method for the determination of mianserin hydrochloride in coated tablets was developed and validated. Also, the drug photodegradation kinetics and cytotoxicity assay were determined. Chromatographic analyses were performed in an Ace RP-18 column (250mm×4.6mm i.d., particle size 5 µm) maintained at ambient temperature. The mobile phase was composed of methanol, 50 mM monobasic potassium phosphate buffer and 0.3% triethylamine solution adjusted to pH 7.0 with phosphoric acid 10% (85:15, v/v) in isocratic mode at a flow rate of 1.0 mL.min⁻¹. The performed degradation conditions were: acid and basic media with HCl 1.0 M and NaOH 1.0 M, respectively, oxidation with H₂O₂ 3% and the exposure to UV-C light. No interference in the mianserin hydrochloride elution was verified. Linearity was assessed and ANOVA showed non-significative linearity deviation ($p>0.05$). Adequate results were obtained for repeatability, intermediate precision, accuracy and robustness. The photodegradation kinetics of mianserin hydrochloride was evaluated in methanol and could be better described as zero order kinetic ($r = 0.9982$). The UV-C degraded samples of mianserin hydrochloride were also studied in order to determine the preliminary cytotoxicity *in vitro* against mononuclear cells.

Keywords: photodegradation kinetics; cytotoxicity; method validation; stability-indicating method; mianserin hydrochloride.

REFERENCES

- [1] J. Pawlowska, Z. Czarnocki, K. Wojtasiewicz, J. Maurin, Stereoselective synthesis of (R)-(-)-mianserin., *Tetrahedron Asymm.*, **2003**, 3335-3342.
- [2] The Merck Index, 13th ed., Merck&Co., Inc, New York, **2001**.
- [3] B. Chauhan, S. Rani, S. Gutikkar, A. Zope, N. Jadon, H. Padh, Analytical method development and validation of mianserin hydrochloride and its metabolite in human plasma by LC-MS., *J. Chromatogr. B*, **2005**, 823, 69-74.
- [4] M. Hefnawy, H. Aboul-Enein, Fast high-performance liquid chromatographic analysis of mianserin and its metabolites in human plasma using monolithic silica column and solid phase extraction, *Anal. Chim. Acta*, **2004**, 504, 291-297.
- [5] P. Xu, H. Li, B. Chen, N. Ma, M. Yan, Y. Zhu, Determination of mianserin in human plasma by high performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry (HPLC-ESI/MS): Application to a bioequivalence study in Chinese volunteers, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2008**, 47, 994-999.
- [6] B. Grodner, J. Pachecka, A simpler and faster capillary electrophoresis method for determination of mianserin enantiomers in human serum., *Acta Polon. Pharm.-Drug Research*, **2006**, 63, 9-14.
- [7] I.U. Khan, T. Aman, A.A. Kazi, Z.A. Khan, Spectrophotometric determination of mianserin in pure and pharmaceutical preparations, *J. Chem. Society of Pakistan*, **2002**, 24, 114-118.
- [8] M.E. Swartz, I.S. Krull, Validação de métodos cromatográficos, *Pharm. Technology*, **1998**, 2, 12-20.
- [9] BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 02 jun., **2003**.

[10] ICH. Harmonised Tripartite Guideline. Validation of Analytical methods text and methodology Q2(R1). In: International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, **2005**.

[11] USP 32. THE UNITED STATES Pharmacopoeia. 32th ed. Rockville: USP Convention, **2009**.

[12] ICH Q1A (R2). Stability Testing of New Drug Substance and Products: Text and Methodology. In: Proceedings of the International Conference on Harmonization, **2003**.

[13] G. P. Carr, J.C. Wahlich, A practical approach to method validation in pharmaceutical analysis, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **1990**, 8, 613 – 618.

[14] J. Ermer, H-J. Ploss, Validation in pharmaceutical analysis. Part II: central importance of precision to establish acceptance criteria and for verifying and improving the quality of analytical data, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2005**, 37, 859-870.

6.3. Ultraviolet Spectrophotometric Method for Analytical Determination of Mianserin Hydrochloride in Coated Tablets and Comparison with LC

A ser submetido

Ultraviolet Spectrophotometric Method for Analytical Determination of Mianserin Hydrochloride in Coated Tablets and Comparison with LC

ABSTRACT

Ultraviolet spectrophotometric method for the determination of mianserin hydrochloride in pharmaceutical formulation was developed. The various parameters, such as specificity, linearity, precision and accuracy were studied according to International Conference on Harmonization (ICH, 2005). For UV method, mianserin hydrochloride was determined at 278 nm using HCl 0.1 M as the solvent. The response was linear in the concentration range of 20.0 - 140.0 µg/mL ($r = 0.9998$). Precision data evaluated by relative standard deviation was lower than 2%. The UV method was simple, rapid and low cost. LC method was specific, linear, precise, exact and robust. The results confirmed that the both methods are valid and useful to the routine quality control of mianserin hydrochloride in coated tablets. Statistical analysis by Student's *t*-test showed no significant difference between the results obtained by UV and LC methods.

Keywords: UV method, LC method, validation, mianserin hydrochloride.

6.4. Micellar electrokinetic chromatographic method for mianserin hydrochloride and analysis of degradation products by mass spectrometry.

Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 60 (11), p.1-8, 2012.

Micellar electrokinetic chromatographic method for mianserin hydrochloride and analysis of degradation products by mass spectrometry.**ABSTRACT**

A simple and stability-indicating micellar electrokinetic chromatography (MEKC) method was developed and validated for the analysis of mianserin hydrochloride in coated tablets. The method employed TRIS 50 mM added by SDS 50 mM at pH 10.6 as the electrolyte with an applied voltage of 25 kV. The capillary used was of 48.5 cm length (40.0 cm effective length and 50.0 μm i.d.) and the detection wavelength was 220 nm. Tetracycline was used as internal standard. The method was validated in accordance with the ICH requirements, which involved specificity, linearity, precision, accuracy and robustness. The stability-indicating capability of the method was established by enforced degradation studies combined with peak purity assessment using photodiode array detection. The degradation products formed under photolytic and oxidative conditions were investigated by electrospray ionization mass spectrometry. The method was linear over the concentration range of 50.0 – 130.0 $\mu\text{g/mL}$. It was precise as reflected by inter-day and intra-day relative standard deviation of less than 2.0%. The proposed validated MEKC method showed recoveries between 98.16 and 102.80% of the nominal contents. The Plackett-Burman design was applied for the robustness test in order to examine potential sources of variability by screening a large number of factors in relatively small number of experiments.

Keywords: mianserin hydrochloride; micellar electrokinetic chromatography; Plackett-Burmann design; stability-indicating method; electrospray ionization mass spectrometry; validation.

References

- [1] Pawlowska, J.; Czarnocki, Z.; Wojtasiewicz, K.; Maurin, J. Stereoselective synthesis of (R)-(-)-mianserin., *Tetrahedron Asymm.*, 14, p. 3335-3342 (2003).
- [2] Koyama, E., Chiba, K., Tani, M. and Ishizaki, T. Identification of human cytochrome P450 isoforms involved in the stereoselective metabolism of mianserin enantiomers. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 278, p. 21–30 (1996).
- [3] Heinig R., Delbressine, L. P. C., Kaspersen, F. M. and Blaschke, G. Enantiomeric aspects of the metabolism of mianserin in rats. *Arzneim-Forsch/Drug Res.*, 7, p. 709-715 (1993).
- [4] Chauhan, B.; Rani, S.; Gutikkar, S.; Zope, A.; Jadon, N.; Padh, H. Analytical method development and validation of mianserin hydrochloride and its metabolite in human plasma by LC-MS., *J. Chromatogr. B*, 823, p. 69-74 (2005).
- [5] Hefnawy, M.; Aboul-Enein, H. Fast high-performance liquid chromatographic analysis of mianserin and its metabolites in human plasma using monolithic silica column and solid phase extraction., *Anal. Chim. Acta*, 504, p. 291-297 (2004).
- [6] Xu, P.; Li H.; Chen, B.; Ma, N.; Yan, M.; Zhu, Y. Determination of mianserin in human plasma by high performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry (HPLC-ESI/MS): Application to a bioequivalence study in Chinese volunteers., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 47, p. 994-999 (2008).
- [7] Khan, I.U.; Aman, T.; Kazi, A.A.; Khan, Z.A. Spectrophotometric determination of mianserin in pure and pharmaceutical preparations., *J. Chem. Society of Pakistan*. 24, n. 2, p. 114-118 (2002).
- [8] Grodner, B.; Pachecka, J. A simpler and faster capillary electrophoresis method for determination of mianserin enantiomers in human serum., *Acta Polon. Pharm.-Drug Research*, 63, n. 1, p. 9-14 (2006).

- [9] Altria, K., Marsh, A., Griend, C. S., *Electrophoresis*, 27, 2263-2282 (2006).
- [10] Holland, L. A., Chetwyn, N. P., Perkins, M. D., Lunte, S. M., *Pharmaceutic. Research*, 14, p. 372-388, (1997).
- [11] S. Terabe, Capillary Electrophoresis, *Enc. of Sep. Scien.* p. 01-06 (2007).
- [12] J.R. Petersen, A.O. Okorodudu, A. Mohammad, D.A. Payne, Capillary electrophoresis and its application in the clinical laboratory, *Clin. Chim. Acta*, 330, p. 1 –30 (2003).
- [13] P. Gomes, J. Sippel, A. Jablonski, M. Steppe, Determination of rosiglitazone in coated tablets by MEKC and HPLC methods, *J. of Pharm. and Biom. Anal.*, 36, p. 909-913 (2004).
- [14] ICH. Harmonised Tripartite Guideline. Validation of Analytical methods text and methodology Q2(R1). In: International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, 2005.
- [15] USP 34. THE UNITED STATES Pharmacopoeia. 34th ed. Rockville: USP Convention, 2011.
- [16] B. Dejaegher, Y.V. Heyden, Ruggedness and robustness testing, *J. of Chrom. A.*, 1158, p. 138 – 157(2007).
- [17] M. Zeaiter, J.M. Roger, V. Bellon-Maurel, D.N. Rutledge, Robustness of models developed by multivariate calibration. Part I: the assessment of robustness, *Trends in Analytical Chemistry*, 23, p. 157 – 170 (2004).
- [18] Y.V. Heyden, A. Nijhuis, J. Smeyers-Verbeke, B.G.M. Vandeginste, D.L. Massart, Guidance for robustness/ruggedness tests in method validation, *J. of Pharm. and Biom. Anal.*, 24, p. 723 – 753 (2001).

[19] International Conference on Harmonization of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceutical for Human Use, Stability Testing of New Drugs Substance and Products Q1A(R2), (2003).

[20] Y.V. Heyden, A. Nijhuis, J. Smeyers-Verbeke, B.G.M. Vandeginste, D.L. Massart, Guidance for robustness/ruggedness tests in method validation, *J. of Pharm. and Biom. Anal.*, 24, p. 723 – 753 (2001).

[21] Altria, K. D., Capillary Electrophoresis Guidebook, Human Press, New Jersey, 1996.

[22] D.R. Nogueira, M.S. Sangoi, L.M. Silva, V. Todeschini, S.L. Dalmora, Determination of rupatadine in pharmaceutical formulations by a validated stability-indicating MEKC method, *J. Sep. Sci.*, 31, p. 3098 – 3105 (2008).

[23] Ogamo, A., Fukumoto, M., Preparation of Metabolites by Chemical Reaction: Conversion of Antipsychotic Phenothiazines to their Sulfoxides and Tertiary Amino Cyclic Antidepressants to their N-Oxide with Hydrogen Peroxide Using Titanosilicate Catalyst. *J. Health Sci.*, 50, No. 4, p. 396-406 (2004).

[24] Chow, T., Hiroi, T., Imaoka, S., Chiba, K. and Funae, Y. Isoform-selective metabolism of mianserin by cytochrome P-450. *Drug Metab. Dispos.*, 27, p. 1200-1204 (1999).

**7. CAPÍTULO IV – ENSAIO DE DISSOLUÇÃO PARA OS COMPRIMIDOS
DE CLORIDRATO DE MIANSERINA**

7.1. Introdução

A absorção de fármacos, após administração oral, a partir de formas farmacêuticas sólidas, depende de sua liberação da forma farmacêutica, da dissolução ou solubilização sob condições fisiológicas e da permeabilidade através das membranas. Fatores relacionados ao paciente, tais como fisiologia da membrana, fluxo sanguíneo e pH do trato gastrintestinal, bem como fatores relacionados ao fármaco e à formulação, como solubilidade e natureza química do fármaco, polimorfismo, coeficiente de partição, quiralidade, tamanho de partícula, entre outros, tornam o processo de absorção complexo e variável. Qualquer fator que afete a desagregação ou a dissolução pode afetar a biodisponibilidade do fármaco (SHARGEL *et al.*, 2005).

A correlação *in vitro in vivo* (CIVIV) é esperada quando a dissolução é a etapa limitante da absorção do fármaco na circulação, ou seja, para aqueles com baixa solubilidade. Por essa razão, se o fármaco é altamente permeável e a dissolução é a etapa limitante da absorção (Classe II), é muito provável o desenvolvimento de uma CIVIV (AMIDON *et al.*, 1995; FDA, 2000).

Na literatura pesquisada não é descrita a classificação biofarmacêutica do fármaco cloridrato de mianserina. No entanto, existem dados de biodisponibilidade (30%) e, com a determinação da solubilidade do fármaco, sua classificação biofarmacêutica poderá ser sugerida.

Além da possibilidade da CIVIV, o método de dissolução é requisito fundamental na indústria farmacêutica para assegurar a qualidade lote a lote do produto farmacêutico, desenvolvimento de novas formulações e garantir a qualidade após mudanças na formulação e no processo de produção, avaliar a qualidade da formulação em função do tempo e condições de armazenamento durante o período de validade do produto (FDA, 1997; MARQUES e BROWN, 2002). Devido a isso, o método de dissolução é exigido pelo FDA para todos os produtos apresentados como formas farmacêuticas sólidas de uso oral (SHARGEL *et al.*, 2005).

No desenvolvimento de um método de dissolução, muitas são as variáveis a serem analisadas que influenciam a dissolução e a reprodutibilidade dos resultados

dos testes (MARQUES e BROWN, 2002; MARCOLONGO, 2003; STORPIRTIS *et al.*, 2004). Dentre essas variáveis, citam-se as:

- relacionadas com o fármaco: solubilidade, tamanho de partícula, polimorfismo, higroscopicidade;
- relacionadas com a forma farmacêutica: excipientes;
- relacionadas com o equipamento: dispositivo utilizado, velocidade de agitação, posição e método de amostragem, vibração do sistema, posição da haste;
- relacionadas com o meio de dissolução: volume, presença de gases, pH, temperatura, força iônica, evaporação do meio, viscosidade;
- relacionadas com o método analítico: método de filtração e método analítico empregado.

As seleções das condições do teste de dissolução devem ser no sentido de obter o máximo poder discriminatório e resultar na capacidade de refletir mudanças feitas na formulação, no processo de fabricação, ou nas características físico-químicas do fármaco (MARQUES e BROWN, 2002; PHARMACOPEIAL FORUM, 2004). A avaliação do perfil de dissolução do fármaco (porcentagem de fármaco dissolvido *versus* tempo) em diferentes meios é recomendada como suporte no desenvolvimento dos testes de dissolução.

Os meios de escolha mais usuais para o desenvolvimento do ensaio de dissolução são ácido clorídrico diluído, soluções tampão na faixa de pH fisiológico, água e tensoativos (polissorbato 80, sais biliares e laurilsulfato de sódio). A escolha do meio ideal para ensaios de rotina deve estar relacionada com a capacidade discriminativa, estabilidade do fármaco no meio e relevância do desempenho *in vivo-in vitro*, quando possível (USP 34, 2011).

Nenhum dos objetivos dos ensaios de dissolução será alcançado se o teste não for confiável e apresentar, no mínimo, especificidade, robustez, linearidade, precisão e exatidão dos resultados (MARQUES e BROWN, 2002; MARCOLONGO, 2003). Antes de prosseguir com a validação do método de dissolução deve-se

avaliar a calibração do dispositivo a ser utilizado, as condições *sink*, a influência dos filtros e a estabilidade das soluções amostra.

Segundo a legislação brasileira e o FDA, os perfis de dissolução devem ser realizados em, pelo menos, três meios de dissolução diferentes, dentro da faixa de pH fisiológico (FDA, 1997; BRASIL, 2010). A seleção do meio é feita considerando-se, em parte, a solubilidade do fármaco de maneira a assegurar as condições *sink* (MARQUES e BROWN, 2002). A determinação das condições *sink* foi realizada em cinco meios de dissolução: ácido clorídrico 0,1 M; ácido clorídrico 0,01 M; tampão acetato pH 4,1; tampão acetato pH 5,0 e tampão fosfato pH 6,8, utilizando quantidades de SQR de cloridrato de mianserina equivalentes a três vezes a dose dos comprimidos em 900 ml dos meios de dissolução. Mantendo a proporção recomendada, pesou-se o equivalente a 10,0 mg de SQR de cloridrato de mianserina e transferiu-se para um balão volumétrico contendo 100 ml dos meios de dissolução. As amostras foram agitadas lentamente e não foi utilizado aquecimento. Os meios de dissolução foram preparados segundo a Farmacopéia Americana (USP 34, 2011).

A água não foi testada por não ser um meio de dissolução adequado devido a inúmeras razões: a qualidade da água pode variar dependendo da fonte e o pH pode variar em função do dia e durante o teste em função do fármaco e dos excipientes, não é um meio representativo do trato gastrointestinal e, também, não é um meio fisiologicamente relevante (FDA, 1997; MARQUES e BROWN, 2002; PHARMACOPEIAL FORUM, 2004).

A literatura pesquisada não apresenta um método de dissolução para comprimidos de cloridrato de mianserina. Diante disso, justifica-se o desenvolvimento e validação de um ensaio de dissolução para realização do controle de qualidade do fármaco em comprimidos revestidos, a partir dos perfis de dissolução obtidos nos meios avaliados. O ensaio de dissolução do cloridrato de mianserina em comprimidos revestidos está apresentado a seguir na forma de artigo científico.

7.2. Dissolution Test for Mianserin Hydrochloride in Tablets

Submetido ao periódico Dissolution Technologies

Dissolution Test for Mianserin Hydrochloride in Tablets

ABSTRACT

A dissolution test for mianserin hydrochloride in coated tablets containing 30 mg was developed and validated using a fast ultraviolet spectrophotometric method. The appropriate conditions were determined after testing *sink* conditions, agitation speed and dissolution medium. The *sink* conditions tested showed that mianserin hydrochloride was soluble in 0.01 and 0.1 M hydrochloric acid (HCl), acetate buffer pH 4.1 and 5.0 and phosphate buffer pH 6.8. Then, dissolution tests were performed to investigate the drug release in each medium. Optimal conditions to carry out the dissolution test were 900 mL 0.1 M HCl and USP apparatus 2 (paddle) at 50 rpm stirring speed. The quantification method was also adapted and validated. The UV method showed specificity, linearity, precision and accuracy. The *in vitro* dissolution test can be used to evaluate the drug release profile and the data was used as an aid to establish a possible correlation with *in vivo* data.

Keywords: mianserin hydrochloride; dissolution test; *sink* conditions; UV method; validation; CIVIV.

8. CAPÍTULO V – ESTUDO DA ESTABILIDADE: ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DO PRODUTO DE DEGRADAÇÃO MAJORITÁRIO OBTIDO

8.1. Introdução

A estabilidade de produtos farmacêuticos constitui-se em uma ampla área que envolve diversos tipos de degradação. Qualquer modificação que ocorra em uma substância e, conseqüentemente, em sua preparação, que adversamente afete a qualidade do produto em termos de segurança e adequabilidade ao uso, constitui-se tópico de interesse para profissionais farmacêuticos e legisladores envolvidos em testes de estabilidade (KOMMANABOYINA e RHODES, 1999).

A determinação da estabilidade de um produto é de suma importância, pois fornece informações sobre como a qualidade da matéria-prima ou mesmo do produto acabado modifica frente a variações aos diferentes fatores analisados (KOMMANABOYINA e RHODES, 1999). A estabilidade de um produto farmacêutico pode ser influenciada por uma série de fatores, tais como, temperatura, umidade, luz, gases atmosféricos, solventes, pH, interações, contaminação microbiológica, entre outros. Além disso, a estabilidade depende das propriedades físicas e químicas dos fármacos, excipientes e embalagens utilizados (MATTHEWS, 1999; NUDELMAN, 1975).

De acordo com o ICH (2003), os testes de estabilidade devem ser conduzidos em duas etapas: testes acelerados e testes confirmatórios. Os testes acelerados de estabilidade (degradação forçada) servem para identificar os fatores que provocam a degradação do fármaco, selecionar os critérios de condução dos testes e para avaliar a adequabilidade das técnicas analíticas. Os estudos confirmatórios devem ser realizados para fornecer informações necessárias sobre a manipulação, embalagem e rotulagem dos produtos e para verificar se as características físicas, químicas, biológicas e microbiológicas do produto se mantêm durante e, opcionalmente, depois do prazo de validade esperado (BRASIL, 2005).

O estudo de estabilidade do cloridrato de mianserina foi realizado por meio da degradação forçada do fármaco, para o desenvolvimento de métodos analíticos indicativos de estabilidade e estudos de cinética de fotodegradação. A cinética de fotodegradação da mianserina já havia sido determinada previamente e os resultados estão apresentados juntamente com o artigo de validação do método por CLAE.

Além disso, objetivou-se o isolamento do produto de degradação majoritário formado após degradação oxidativa utilizando um método cromatográfico semi-preparativo. Para o preparo da solução a ser degradada, partiu-se de uma solução estoque de 3,0 mg/ml, adicionou-se peróxido de hidrogênio 30% a fim de obter uma concentração final de 20%. A solução na concentração de 1,2 mg/ml foi degradada por 3 horas e após alíquotas de 8 e 9 ml foram transferidas para balão volumétrico de 10 ml. O volume dos balões foi completado com fase móvel com o objetivo de parar a reação de degradação, porém foi possível observar que mesmo após a diluição a reação continuou ocorrendo, mesmo que numa velocidade menor. A fração coletada foi seca em rotaevaporador, solubilizada em metanol e analisada por UPLC-UV-MS, o que possibilitou identificar a relação massa-carga dos produtos de degradação, além de sugerir a provável rota de fragmentação. A descrição detalhada está apresentada na forma de artigo científico.

8.2. Isolation and identification of mianserin hydrochloride oxidative degradation products by UPLC-UV-MS and cytotoxicity *in vitro* assay.

A ser submetido

Isolation and identification of mianserin hydrochloride oxidative degradation products by UPLC-UV-MS and cytotoxicity *in vitro* assay

Abstract

Forced degradation studies of the tetracyclic antidepressant mianserin hydrochloride were conducted in order to isolate and elucidate the main degradation products. These studies were performed using radiation (UV-C light) and oxidative conditions. The major degradation product, formed in oxidative conditions, was isolated by reverse-phase semi-preparative liquid chromatography and identified by UPLC-UV-MS. This product was also studied in order to determine the preliminary *in vitro* cytotoxicity with mononuclear cells. The major degradation product isolated (m/z 281.06) was characterized as 8-Hydroxymianserin or Mianserin-*N*-oxide. No cytotoxicity was observed at a concentration of 100.0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. The structural characterization of the degradation product was important to understand the degradation mechanism of mianserin in oxidative conditions.

Keywords: degradation products, mianserin hydrochloride, forced degradation, isolation and structural elucidation.

9. DISCUSSÃO GERAL

O crescente desenvolvimento de fármacos e formulações pela indústria farmacêutica faz com que a preocupação com a qualidade e segurança desses produtos aumente na mesma proporção, tornando-se imprescindível a realização de ensaios de controle de qualidade em todas as fases do processo. Nesse contexto, o emprego de métodos analíticos sensíveis é imprescindível para que se possa garantir a eficácia e a segurança do uso de um medicamento (AVENDAÑO, 1993; GÖRÖG, 2008; CHEN *et al.*, 2009). Nesse sentido, e devido à carência de literatura científica sobre métodos de análise de cloridrato de mianserina na forma farmacêutica comprimido revestido, foi desenvolvida metodologia analítica com aplicação para o controle da qualidade do produto farmacêutico.

O fármaco cloridrato de mianserina, antidepressivo tetracíclico atípico, utilizado para o tratamento da depressão e depressão associada com ansiedade, apresenta poucos relatos na literatura para sua análise qualitativa e quantitativa na forma farmacêutica comprimido revestido, o que demonstra a importância do desenvolvimento dos métodos analíticos, ensaio de dissolução e o estudo de estabilidade desse fármaco.

A caracterização da SQR de cloridrato de mianserina foi realizada utilizando as seguintes técnicas: análise térmica por DSC, faixa de fusão, espectroscopia na região do IV, espectrometria de massas e espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ^1H) e de carbono (RMN ^{13}C).

A utilização da DSC para determinação da pureza de um insumo farmacêutico é realizada assumindo que a presença de impurezas diminuirá e alargará a faixa de fusão característica do produto puro (FORD e TINMINS, 1989). A faixa de fusão obtida por DSC foi de 274,23 °C a 283,0 °C; para o método do capilar, utilizando o equipamento Mettler Toledo, foi obtida uma faixa de 279,3 °C a 281,0 °C e com a utilização do microscópio de ponto de fusão tipo Koffler foi obtida uma faixa de 273,0 °C a 276,0 °C. A faixa obtida por DSC apresenta-se extremamente alargada quando comparada com o valor descrito na literatura (282 °C - 284 °C), sendo que esta observação pode estar relacionada com a ocorrência de degradação da amostra numa temperatura próxima ao ponto de fusão. A faixa de fusão obtida pelo método do capilar foi a que apresentou o resultado mais próximo ao valor descrito

na literatura, embora algumas amostras tenham carbonizado durante a análise. Na determinação do ponto de fusão utilizando o microscópio de ponto de fusão do tipo Koffler, os resultados também não foram satisfatórios. Assim sendo, a utilização de DSC e ponto de fusão não são métodos adequados para a identificação da SQR de cloridrato de mianserina, devido à ocorrência de degradação da substância.

O espectro de absorção na região do IV pode ser utilizado como a impressão digital da molécula, ou seja, comparando o espectro de absorção na região do IV de duas substâncias, pode-se estabelecer se as mesmas são idênticas. Se o espectro IV coincidir banda a banda, pode-se concluir, na maioria dos casos, que as substâncias apresentam a mesma identidade (PAVIA *et al.*, 2009).

A interpretação das bandas do espectro de absorção na região do IV da SQR de cloridrato de mianserina permitiu a obtenção de informações estruturais dos grupos funcionais, os quais confirmaram a identidade da molécula. Além disso, o espectro de IV obtido experimentalmente é semelhante ao encontrado na literatura.

A espectrometria de massas é uma importante ferramenta para a determinação qualitativa e quantitativa de vários componentes de uma amostra, sendo muito utilizada para obter informações sobre o íon molecular e das características estruturais da amostra. O espectro de massas permitiu a identificação da mianserina pela verificação de sua massa molecular.

A ressonância magnética nuclear é uma das técnicas empregadas para identificação e elucidação estrutural, fornecendo informações fundamentais sobre a estrutura de moléculas. Os resultados obtidos nos ensaios de RMN ^1H e RMN ^{13}C demonstraram que os sinais obtidos estão de acordo com as atribuições esperadas para a molécula de mianserina.

A determinação da solubilidade da SQR de cloridrato de mianserina foi importante para verificação dos solventes que poderiam ser utilizados para o desenvolvimento de métodos analíticos qualitativos e quantitativos.

A identificação de substâncias por CCD é feita pela comparação dos fatores de retenção da substância com o de um padrão de identidade conhecida. Durante o

desenvolvimento do método de identificação por CCD foram testadas diversas combinações de solventes orgânicos a fim de verificar qual sistema eluente permitiria a obtenção de R_f e R_x adequados (GARCIA, 2007). O sistema eluente mais adequado foi constituído de uma mistura de trietilamina, metanol e clorofórmio (03:92:05, v/v). A utilização do método por CCD permitiu identificar o fármaco cloridrato de mianserina nos comprimidos revestidos através da comparação dos valores dos fatores de retenção (R_f) obtidos com a SQR de cloridrato de mianserina. Diante dos resultados, sugere-se a mesma identidade das amostras dos comprimidos de cloridrato de mianserina em relação à SQR.

O espectro de UV é frequentemente utilizado na identificação de substâncias por ser de fácil execução, rápido e de baixo custo (WATSON, 2005). Na presença de SQR torna-se um método bastante útil para a verificação da identidade da amostra, pois a substância em análise apresenta perfil de absorção igual ao do padrão de referência. Os espectros na região do UV, na faixa de 200 a 400 nm, obtidos para a solução SQR de cloridrato de mianserina e para a solução amostra dos comprimidos revestidos em HCl 0,1 M (Figura 5.2 – pág. 39), apresentaram o mesmo perfil com a máxima absorção no mesmo comprimento de onda, confirmando a presença do fármaco nos comprimidos. Assim sendo, o comprimento de onda selecionado para determinação quantitativa foi de 278 nm.

O método por CLAE, sendo um método de separação, fornece elevada seletividade na identificação de componentes de uma amostra, garantindo a identidade das substâncias desde que haja um padrão de referência de identidade conhecida. Já no método por EC, a identificação de substâncias é possível a partir da comparação dos tempos de migração dos compostos. Assim, a semelhança entre os tempos de retenção (6,6 min) no método por CLAE (Figura 5.3 – pág. 41), bem como a semelhança entre os tempos de migração (4,1 min) no método por EC (Figura 5.4 – pág. 43), obtidos para a solução da SQR de cloridrato de mianserina e solução dos comprimidos revestidos, permite a identificação do fármaco na forma farmacêutica.

Todos os métodos desenvolvidos constituem alternativas para a identificação do fármaco na forma farmacêutica, embora, algumas vezes, para a obtenção de um resultado mais confiável, seja necessária a utilização de mais de uma técnica.

A espectrofotometria na região do UV é um método de ampla aplicação em análises farmacêuticas, podendo ser utilizada como uma técnica alternativa na ausência de equipamentos mais sofisticados como o cromatógrafo a líquido. No desenvolvimento do método foram testados diferentes solventes, com base na solubilidade da molécula. O HCl 0,1 M foi o solvente escolhido por ser menos tóxico e também pela possibilidade de ser utilizado para quantificar a liberação do fármaco nos ensaios de dissolução.

A CLAE, combinada com detectores de UV/visível, fornece um método preciso, exato e robusto para a análise quantitativa de produtos farmacêuticos. Além disso, é uma técnica versátil possibilitando o monitoramento da estabilidade de substâncias e a quantificação de produtos de degradação (WATSON, 2005). Durante o desenvolvimento do método por CLAE, diferentes colunas cromatográficas foram testadas, entre elas, colunas C₈ e C₁₈. Para o método proposto empregou-se uma coluna C₁₈, de amplo uso em laboratórios de controle de qualidade de medicamentos, a qual forneceu um desempenho cromatográfico mais adequado para o fármaco em estudo. Também foram realizados testes utilizando diferentes fases móveis, avaliando-se combinações entre solventes orgânicos e soluções tamponantes em diferentes proporções, na faixa de pH entre 3,0 e 7,0. Inicialmente testou-se solução aquosa com pH ajustado, porém foram detectados problemas de reprodutibilidade do método e a simetria do pico não estava adequada. Então, recorreu-se ao uso de sais para tamponamento da fase móvel. Resultados satisfatórios foram obtidos com a mistura constituída por tampão fosfato de potássio monobásico pH 7,0 (com 0,3% de trietilamina) e metanol (15:85, v/v). A adição de trietilamina na fase móvel permitiu a obtenção de picos mais simétricos e sem cauda, pois a adição de aminas à fase móvel afeta a separação de compostos básicos (SNYDER, 1997). Durante a avaliação da especificidade do método, a pureza do pico cromatográfico para o cloridrato de mianserina foi avaliada e o pico apresentou estar puro em todos os casos, indicando que não havia interferentes co-

eluidando e evidenciando a capacidade do método em quantificar somente o fármaco de interesse.

A EC é um método de separação relativamente recente, tendo se desenvolvido rapidamente desde sua introdução e com ampla utilização em análises farmacêuticas. Este método permite a análise de compostos polares iônicos e não-iônicos, biomoléculas de elevada massa molecular e compostos quirais (SANTORO *et al.*, 2000). A EC permite também a análise de compostos neutros. Isso é possível devido à presença do fluxo eletroosmótico (FEO), o qual é gerado a partir dos grupamentos ácidos da sílica (TAVARES, 1995). No desenvolvimento do método por EC são vários os parâmetros que devem ser cuidadosamente estabelecidos, dentre eles, a escolha correta do eletrólito (concentração e força iônica), pH da solução e o comprimento do capilar são os fatores determinantes, além do tempo de injeção da amostra, temperatura de análise e tensão aplicada. Na EC de zona livre, a simetria do pico não se apresentou adequada. Assim, foi necessária a adição do tensoativo SDS para a otimização do modo de separação por MEKC. O uso da MEKC com SDS e tampão TRIS, ambos na concentração de 50 mM com o pH ajustado em 10,6, e o emprego de um capilar de 40 cm de comprimento efetivo possibilitaram a obtenção de picos reprodutíveis e simétricos. Com o intuito de minimizar a variação do sistema de injeção e garantir uma boa reprodutibilidade dos resultados, vários fármacos foram testados para serem empregados como PI e os melhores resultados foram obtidos com a utilização da tetraciclina.

Na avaliação da robustez da MEKC, utilizou-se o desenho experimental de Plackett-Burman, o qual permite a variação de um número relativamente grande de fatores em um número reduzido de experimentos (HEYDEN *et al.*, 2001). A utilização de desenhos estatísticos experimentais tem-se constituído em modelos efetivos de análise, pois possibilita a variação constante e planejada dos fatores estudados. A metodologia do planejamento fatorial fornece informações seguras sobre o processo, possibilitando tirar conclusões mais amplas a respeito dos fatores estudados de forma simultânea, além de informar sobre a interação entre eles (WISSMANN & GROVER, 2009).

Os estudos de degradação forçada realizados proporcionaram o conhecimento dos principais fatores de degradação e a validação de métodos indicativos de estabilidade por CLAE e EC. Os resultados obtidos nos ensaios de degradação demonstraram a instabilidade do cloridrato de mianserina em condições fotolíticas (luz UV-C) e oxidativas. Durante esta fase de desenvolvimento do método analítico objetivou-se a degradação entre 5 a 20% do fármaco, evitando a degradação muito drástica.

As curvas de pureza obtidas para o pico do cloridrato de mianserina, obtido nas diferentes condições de degradação, demonstraram a seletividade dos métodos por CLAE e EC, indicando que mesmo na presença de prováveis produtos de degradação, os métodos apresentam seletividade suficiente para quantificar o fármaco de interesse.

A determinação da cinética de degradação do cloridrato de mianserina foi realizada em condições fotolíticas, empregando luz UV-C. A degradação da amostra obedece uma cinética de ordem zero, ou seja, a velocidade de decomposição do fármaco independe da concentração dos reativos (LACHMAN *et al.*, 2001)

O teste de citotoxicidade em células mononucleares humanas foi realizado com soluções do fármaco cloridrato de mianserina degradado em condições fotolíticas (UV-C). O objetivo foi verificar o potencial citotóxico do(s) produto(s) de degradação formado(s) nessa condição. Os resultados demonstraram que as amostras degradadas nas concentrações de 200,0 µg/ml e 500,0 µg/ml apresentam potencial efeito citotóxico, pois diferem significativamente do grupo controle e das concentrações inferiores.

O ensaio de dissolução é uma importante ferramenta para a caracterização do produto na área farmacêutica. O mesmo fornece informações úteis tanto na pesquisa e desenvolvimento como na produção e controle de qualidade de formas farmacêuticas (MARQUES & BROWN, 2002). Apesar de não ter sido encontrada a classificação da mianserina no Sistema de Classificação Biofarmacêutico, pode-se inferir que o fármaco seja de Classe III, visto que apresenta alta solubilidade e baixa biodisponibilidade.

No desenvolvimento do ensaio de dissolução é importante conhecer a solubilidade e estabilidade do fármaco no meio de dissolução. A mianserina mostrou-se bastante solúvel nos meios testados (HCl 0,1 M e 0,01 M; tampão acetato pH 4,1; tampão acetato pH 5,0 e tampão fosfato pH 6,8,) e sua estabilidade foi determinada no meio escolhido, HCl 0,1 M, sendo que o fármaco manteve-se estável por 24 h em temperatura ambiente. Para a escolha da velocidade de agitação, foi selecionada a faixa recomendada pela USP 34 para pás (50-75 rpm). No entanto, não foi observada uma diferença significativa nos perfis de liberação do fármaco entre as duas velocidades testadas. Assim, as condições do ensaio de dissolução foram: 900 ml HCl 0,1 M e dispotitivo 2 (pás) com velocidade de agitação de 50 rpm. O método utilizado para quantificação foi espectrofotometria no UV.

De acordo com SKOUG e colaboradores (1997), os métodos desenvolvidos para a determinação quantitativa de fármacos em matéria-prima e produtos acabados são geralmente adaptáveis para o uso na determinação da quantidade de fármaco dissolvida em ensaios de dissolução. Com isso, o método validado neste trabalho por espectrofotometria no UV, serviu como base para esta finalidade. O ensaio de dissolução desenvolvido e validado utilizando espectrofotometria no UV para determinação da quantidade de fármaco dissolvida em HCl 0,1 M apresentou especificidade, linearidade, precisão, exatidão e robustez, ou seja, mostrou-se adequado para avaliar o perfil de liberação do fármaco, bem como para a realização do controle de qualidade de rotina dos comprimidos revestidos.

O estudo da estabilidade da mianserina foi realizado por meio da degradação forçada do fármaco para o desenvolvimento dos métodos analíticos indicativos de estabilidade. A partir dos estudos preliminares da estabilidade, foi possível concluir que a luz UV-C e a oxidação foram os 2 fatores que provocaram a formação de produtos de degradação. Quando submetida à luz UV-C, observou-se aproximadamente 50% de degradação do fármaco após 90 min de exposição e, quando submetida à degradação oxidativa (H₂O₂ 20%), 70% do fármaco degradou no tempo de 180 min. A condição oxidativa foi a escolhida para o isolamento do produto de degradação, pois ela apresentou a formação de um produto majoritário, enquanto que na condição fotolítica ocorria a formação de vários produtos de degradação em quantidades menores.

A escolha do sistema eluente adequado para o desenvolvimento do método por CLAE semi-preparativo foi realizada a partir de testes com diferentes proporções de metanol e água, uma vez que sistemas tamponantes não são recomendados para fins de isolamento. Assim, foi obtida uma condição adequada de trabalho com a proporção metanol:água (80:20), fluxo de 1,0 ml/min, volume de injeção de 100 µl e temperatura ambiente. O pico do produto de degradação majoritário, eluído em 20,4 min, foi coletado em frascos âmbar e concentrado em rotaevaporador à vácuo. O resíduo obtido no balão foi reconstituído em metanol e deixado evaporar até a secura em um dessecador. A quantidade elevada de metanol facilitou a evaporação do produto de degradação coletado. A fração coletada também foi analisada pelo método por CLAE previamente validado, onde era possível observar apenas um pico com alto grau de pureza de acordo com o *software* do equipamento.

Procedeu-se então a análise por massas. O método por CLAE foi otimizado para a utilização em UPLC-UV-MS. Foram obtidos espectros para a solução SQR e a solução do produto de degradação isolado. Essa técnica hifenizada une a grande capacidade de separação da CLAE com a sensibilidade e seletividade do detector de massas. Os cromatogramas UPLC-UV e UPLC-MS obtidos para o produto de degradação isolado permitiram a visualização da presença do pico do fármaco como contaminante. Além disso, o espectro de massas possibilitou a visualização de 6 picos, revelando que a fração coletada não era apenas de um produto. Devido à elevada pureza de pico determinada anteriormente pelo PDA, acredita-se que as substâncias devam possuir estruturas cromóforas semelhantes. A partir dos valores de m/z obtidas pelo método UPLC-UV-MS foi possível propor uma rota de fragmentação oxidativa do fármaco. Além disso, o PD isolado não apresentou citotoxicidade na faixa de 10,0 a 100,0 µg/ml.

10. CONCLUSÕES

- ❖ A caracterização da SQR de cloridrato de mianserina por espectroscopia na região do IV, espectrometria de massas e espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio e de carbono, demonstrou que ela é adequada para ser utilizada como padrão. As técnicas de DSC e faixa de fusão não são adequadas para a caracterização da SQR;
- ❖ Os métodos propostos por CCD, espectrofotometria na região do UV, CLAE e EC demonstraram-se adequados para identificação do cloridrato de mianserina nos comprimidos revestidos;
- ❖ A determinação do cloridrato de mianserina em comprimidos revestidos por espectrofotometria na região do UV, empregando o comprimento de onda de 278 nm e HCl 0,1 M como solvente, demonstrou ser específica, linear, precisa e exata;
- ❖ Os métodos propostos por CLAE e EC apresentaram especificidade, linearidade, precisão, exatidão e robustez. Com isto, os métodos indicativos de estabilidade, demonstraram-se adequados para a determinação quantitativa de cloridrato de mianserina em comprimidos revestidos;
- ❖ Os métodos validados por CLAE e espectrofotometria na região do UV, para a determinação quantitativa de mianserina nos comprimidos revestidos, não apresentaram diferenças estatisticamente significativas de acordo com o Teste *t* de *Student*, presumindo variâncias equivalentes;
- ❖ A fotodegradação do cloridrato de mianserina, em solução metanólica, obedeceu a uma cinética de ordem zero, ou seja, a velocidade da reação é independente da concentração da substância reativa;
- ❖ No ensaio de citotoxicidade em células mononucleares humanas, as amostras degradadas na luz UV-C, nas concentrações de 200,0 µg/ml e 500,0 µg/ml, apresentaram um potencial efeito citotóxico;
- ❖ O ensaio de dissolução, desenvolvido e validado utilizando espectrofotometria no UV para determinação da quantidade dissolvida de

mianserina em HCl 0,1 M, foi considerado adequado para o controle de qualidade de rotina dos comprimidos revestidos do fármaco;

- ❖ O método cromatográfico semi-preparativo possibilitou adequada resolução entre o produto de degradação coletado e as demais substâncias;
- ❖ O método por UPLC-UV-MS detectou a presença do fármaco como contaminante no produto de degradação isolado, sendo que na análise por massas do PD isolado foi possível identificar 5 produtos de degradação;
- ❖ O produto de degradação majoritário (m/z 281.06) pode ser caracterizado como 8-hidroxi-mianserina ou como mianserina-*N*-óxido;
- ❖ No ensaio de citotoxicidade em células mononucleares humanas, o produto de degradação isolado não apresentou citotoxicidade na faixa de concentração de 10,0 a 100,0 µg/ml.

11. REFERÊNCIAS

ACD/pKa v8.02. ACD, Inc. Disponível em www.acdlabs.com, 2009.

ALTRIA, K. D.; KELLY, M. A.; CLARK, B.J. Current applications in the analysis of pharmaceuticals by capillary electrophoresis. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 17, p. 204-213, 1998.

ALTRIA, K. D. Overview of capillary electrophoresis and capillary electrochromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 856, p.443-463, 1999.

AMIDON, G. L.; LENNERNÅS, H.; SHAH, V. P.; CRISON, J. R. A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. **Pharmaceutical Research**, v. 12, n. 3, p. 413-420, 1995.

AVENDAÑO, C. Introducción AL análisis farmacéutico. In: LOPEZ, M. C. A. **Introducción a la Química Farmacéutica**. Madri: Interamericana McGraaw-Hill, 1993. cap. 27. p. 843-857.

BALDESSARINI, R. J. Fármacos e o tratamento dos distúrbios psiquiátricos – depressão e distúrbios de ansiedade. In: HARDMAN, J.; LIMBIRD, L. (Ed). **Goodman & Gilman. As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 10. ed. Rio de Janeiro: McGraw Hill, 2003. p. 339-364.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 02 jun. 2003a.

_____. Resolução - RE nº 901, de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do Guia para Ensaio de Dissolução para Formas Farmacêuticas Sólidas Orais de Liberação Imediata (FFSOLI). **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 02 jun. 2003b.

_____. Resolução - RE nº 1, de 29 de julho de 2005. Determina a publicação do Guia para a Realização de Estudos de Estabilidade. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 01 ago. 2005.

_____. Resolução – RDC nº 31, de 11 de agosto de 2010. Dispõe sobre a realização dos Estudos de Equivalência Farmacêutica e de Perfil de Dissolução Comparativo. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 12 ago. 2010.

BRITISH PHARMACOPOEIA 2011 (BP 2011). British Pharmacopoeia Commission Office. London: The Stationery Office, 2011.

BROWN, L. W.; HUNDT, H. K.; SWART, K. J. Automated high-performance liquid chromatographic method for the determination of mianserin in plasma using electrochemical detection. **Journal of Chromatography**, v. 582, p. 268-272, 1992.

CHANKVETADZE, B.; ENDRESZ, G.; BERGENTHAL, D.; BLASCHKE, G. Enantioseparation of mianserine analogues using capillary eletrophoresis with neutral and charged cyclodextrin buffer modifiers. **Journal of Chromatography A**, v. 717, p.245-253, 1995.

CHAUHAN, B.; RANI, S.; GUTIKKAR, S.; ZOPE, A.; JADON, N.; PADH, H. Analytical method development and validation of mianserin hydrochloride and its metabolite in human plasma by LC-MS. **Journal of Chromatography B**, v. 823, p. 69-74, 2005.

CHEN, W.; STITHIT, S.; ZHENG, J. Y.; HWANG, R. Chapter 26 – Specification Setting and Manufacturing Process Control for Solid Oral Drug Products. In QIU, Y.; CHEN, Y.; ZHANG, G.; LIU, L.; PORTER, W. **Developing Solid Oral Dosage Forms: Pharmaceutical Theory and Practice**. Academic Press, 2009, 599-614.

CIENFUEGOS, F.; VAISTMAN, D. **Análise Instrumental**. Rio de Janeiro: Interciência, p.41-55, 2000.

CLAS, S. D.; DALTON, C.R.; HANCOCK, B. C. Differential scanning calorimetry: applications in drug development. **Pharmaceutical Science and Technology Today**, v. 02, n. 08, p. 311-320, 1999.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de Cromatografia**. Campinas, SP: Ed. Da UNICAMP, 2006.

DEVANI, M. B.; PANDYA, S. S.; SHAH, S. A. Spectrophotometric determinations of mianserin hydrochloride with -3-methyl-2- benzothiazolinone hydrozone. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 52, n. 2, p. 123-124, 1990. Abstract.

EAP, C. B.; POWELL, K.; BAUMANN, P. Determination of the Enantiomers of Mianserin and its Metabolites in Plasma by Capillary Electrophoresis After Liquid-Liquid Extraction and On-Column Sample Preconcentration. **Journal of Chromatographic Science**, v. 35. p.315-320, 1997.

FARAG, R. S.; AFIFI, M. S.; ADB-RABOW, M. M. Extrative Spectrophotometric Determination of Mianserin Hydrochloride by Acid-Dye Complexation Method in Pure and in Pharmaceutical Preparations, **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 2, p.1197-1203, 2011.

FARMACOPÉIA Brasileira, v.1. 5ª ed. Brasília: Anvisa-Fiocruz, 2010.

FDA. Guidance for Industry: Dissolution Testing of Immediate Release Solid Oral Dosage Forms. Center for Drug Evaluation and Research (CDER), August, 1997.

FDA. Guidance for Industry: Waiver of in vivo bioavailability and bioequivalence studies for immediate release solid oral dosage forms containing certain active moieties/active ingredients, based on Biopharmaceutics classification. Center for Drug Evaluation and Research (CDER), 2000.

FORD, J., TINMINS, T. **Pharmaceutical Thermal Analysis: Techniques and Applications**. New York: Ellis Hor Wood Limited, 1989. p.108-135.

FUCHS, F. D.; WANNMACHER, L. **Farmacologia Clínica: fundamentos da terapêutica racional**. 3. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

GARCIA, C. V. Tese de doutorado: **Validação de métodos analíticos e estudo da estabilidade de rabeprazol sódico**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

GÖRÖG, S. Drug safety, drug quality, drug analysis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 43, p. 247-253, 2008.

GRODNER, B.; PACHECKA, J. A simpler and faster capillary electrophoresis method for determination of mianserin enantiomers in human serum. **Acta Poloniae Pharmaceutica-Drug Research**, v. 63, n. 1, p. 9-14, 2006.

HEFNAWY, M.; ABOUL-ENEIN, H. Fast high-performance liquid chromatographic analysis of mianserin and its metabolites in human plasma using monolithic sílica column and solid phase extraction. **Analytica Chimica Acta**, v. 504, p. 291-297, 2004.

HEYDEN, Y.; NIJHUIS, A.; SMEYERS-VERBEKE, J.; VANDEGINSTE, B.; MASSART, D. Guidance for robustness/ruggedness test in method validation. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 24, p. 723-753, 2001.

HOLSBOER, F. Therapeutics for depression and anxiety disorders. **Drug Discovery Today: Therapeutic Strategies**, v. 1, n. 1, p. 105-109, 2004.

ICH – **International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use**. Guideline on Stability Testing of New Drug Substance and Products Q1A(R2). ICH Steering Committee, Switzerland, 2003.

ICH – **International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use**. Validation of Analytical methods text and methodology Q2(R1). ICH Steering Committee: Switzerland, 2005.

KASIM, N. A.; WHITEHOUSE, M.; RAMACHANDRAN, C.; BERMEJO, M.; LENNERNÄS, H.; HUSSAIN, A. J.; JUNGINGER, H. E.; STAVCHANSKY, S.A.; MIDHA, K. K.; SHAH, V. P.; AMIDON, G. L. Molecular properties of WHO essential drugs and provisional biopharmaceutical classification. **Molecular Pharmaceutics**, v. 1, n. 1, p. 85-96, 2003.

KAZAKEVICH, Y.; LOBRUTTO, R. **HPLC for Pharmaceutical Scientists**. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, 2007.

KHAN, I.U.; AMAN, T.; KAZI, A.A.; KHAN, Z.A. Spectrophotometric determination of mianserin in pure and pharmaceutical preparations. **Journal of the Chemical Society of Pakistan**. v. 24, n. 2, p. 114-118, 2002.

KLICK, S.; MUIJSELAAR, P. G.; WATERVAL, J.; EICHINGER, T.; KORN, C.; GERDING, T. K.; DEBETS, A. J.; GRIEND, C. S.; BELD, C. V. D.; SOMSEN, G. W.; JONG, G. J. Toward a generic approach for stress testing of drug substances and drug products. **Pharmaceutical Technology**, February, p. 48-66, 2005.

KOMMANABOYINA, B.; RHODES, C. Trends in stability testing with emphasis on stability during distribution and storage. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 25, n. 7, p. 857-858, 1999.

KOROLKOVAS, A. **Dicionário Terapêutico Guanabara**. 13.^a ed, Rio de Janeiro, Guanabara-Koogan, 2006.

KOROLKOVAS, A. **Química Farmacêutica**. Rio de Janeiro: Guanabara, 1988.

LACHMAN, L.; DELUCA, P.; AKERS, M. J. Testes de estabilidade e fundamentos de cinética química. In: LACHMAN, L.; LIEBERMAN, H. A.; KANIG, J. L. **Teoria e prática na indústria farmacêutica**. Lisboa: Calouste Gulben Kian, 2001, v. 2, cap. 26, p. 1277-1355.

LIMA, I. V. M.; SOUGEY, E. B.; FILHO, H. P. V. Farmacogenética do tratamento da depressão: busca de marcadores moleculares de boa resposta aos antidepressivos. **Revista de Psiquiatria Clínica**, v. 31, n.1, p. 40-43, 2004.

LINDEMBERG, M.; KOPP, S.; DRESSMAN, J. B. Classification of orally administered drugs on the world health organization model list of essential medicines according to the biopharmaceutics classification system. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 58, p. 265-278, 2004.

LOPES, J. Cromatografia em Camada Delgada. In: COLLINS, C.; BRAGA, G.; BONATO, P. **Introdução a métodos cromatográficos**. 7. Ed. São Paulo: Editora Unicamp, 1997. p. 45-56.

LUKASZKIEWICZ, J.; PIWOWARSKA, J.; SKARZYNSKA, E.; LOJEWSKA, M. S.; PACHECKA, J. Development, Validation and Application of the HPLC Method for Determination of Mianserin in Human Serum. **Acta Poloniae Pharmaceutica-Drug Research**, v. 64, n. 2, p. 103-107, 2007.

MARCOLONGO, R. Dissertação de mestrado: **Dissolução de medicamentos: fundamentos, aplicações, aspectos regulatórios e perspectivas na área farmacêutica**. 2003. 117f. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

MARQUES, M. R. C.; BROWN, W. Desenvolvimento e validação de métodos de dissolução para formas farmacêuticas sólidas. **Revista Analytica**, n. 1, p. 48-51, 2002.

MATHKAR, S.; KUMAR, S.; BYSTOL, A.; OLAWOORE, K.; MIN, D.; MARKOVICH, R.; RUSTUM, A. The use of differential scanning calorimetry for the purity verification of pharmaceutical reference standards. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 49, p. 627-631, 2009.

MATTHEWS, B. Regulatory aspects of stability testing in Europe. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 25, n. 7, p. 831-856, 1999.

MELVEGER, A. J.; HUYNH-BA, K. Critical Regulatory Requirements for a Stability Program. In: K. HUYNH-BA (Ed.), **Handbook of Stability Testing in Pharmaceutical Development Regulations, Methodologies, and Best Practices**, Springer, New York NY, 2009, p. 9-19.

MOFFAT, A.; OSSELTON, M.; WIDOOR, B. **Clarke's Analysis of Drugs and Poisons**. 3th ed. Chicago: Pharmaceutical Press, 2004. v. 2, p. 1280-1281.

NAKANISHI, K. **Infrared absorption spectroscopy**. 2. ed. San Francisco: Holden-Day, 1977.

NUDELMAN, N. S. **Estabilidad de Medicamentos**. 1. ed. Buenos Aires: El Atheneo, 1975.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. R. **Introduction to Spectroscopy: A guide for students of organic chemistry**. 4th ed. South Melbourne: Brooks/Cole, 2009.

PAWLOWSKA, J.; CZARNOCKI, Z.; WOJITASIEWICZ, K.; MAURIN, J. Stereoselective synthesis of (R)-(-)-mianserin. **Tetrahedron Asymmetry**, p. 3335-3342, 2003.

PHARMACOPEIAL FORUM. **Pharmacopeial Previews**, v. 30, n. 1, p. 351-363, 2004.

PRETSCH, E.; BÜHLMANN, P.; AFFOLTER, C. **Structure determination of organic compounds: Tables of Spectral Data**. 3. ed. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Germany, 2000.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; MOORE, P. K. **Farmacologia**. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004.

RHODES, C. T. Introductory overview. In: CARSTENSEN, J. T.; RHODES, C. T. **Drug Stability: Principles and Practice**. New York: Marcel Dekker, 2000. cap. 1, p. 1-18.

SANTORO, M. I. R. M.; PRADO, M. S. A.; STEPPE, M.; KEDOR-HACKMANN, E. R. M. Eletroforese capilar: teoria e aplicações na análise de medicamentos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 36, n. 1, 2000.

SELDITZ, U.; LIAO, Y.; FRANKE, J. P.; ZEEUW, R. A.; WIKSTRÖM, H. Direct enantiomeric separation of mianserin and 6-azamianserin derivatives using chiral stationary phases. **Journal of Chromatography A**. v. 803, p. 169-177, 1998.

SHARGEL, L.; WU-PONG, S.; YU, A. B. C. **Applied Biopharmaceutics & Pharmacokinetics**. 5. ed. New York: McGraw-Hill, 2005.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 7. ed. Rio de Janeiro, 2007.

SKOUG, J.; HALSTEAD, D.; THEIS, D.; FREEMAN, J.; FAGAM, D.; ROHRS, B. Roteiro para Desenvolvimento e Validação do Teste de Dissolução em Formas Farmacêuticas Sólidas para Uso Oral. **Pharmaceutical Technology**, p. 34-43, 1997.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; GLAJCH, J. L. **Practical HPLC Method Development**. 2. ed. New York: John Wiley & Sons, 1997, p. 293-321.

STAHL, S. M. The psychopharmacology of painful physical symptoms in depression. **Journal Clinical Psychiatry**, v.60, n. 5, p. 382-383, 2002.

STORPIRTIS, S.; MARCOLONGO, R.; GASPAROTTO, F. S.; VILANOVA, C. M. A equivalência farmacêutica no contexto da intercambialidade entre medicamentos genéricos e de referência: bases técnicas e científicas. **Infarma**, v. 16, n. 9-12, p. 51-56, 2004.

SWARTZ, M. E.; KRULL, I. S. Validação de métodos cromatográficos. **Pharmaceutical Technology**, v. 2, p. 12-20, 1998.

TAVARES, M. F. M. Eletroforese Capilar: Conceitos Básicos. **Química Nova**. v. 19, n. 2, p. 173-181, 1995.

THE MERCK Index. A encyclopedia of chemical, drugs, and biologicals. 13. ed. Whitehouse Station, New Jersey, Merck Research Laboratories Division of Merck & Co., Inc., 2001.

USP 34. THE UNITED STATES Pharmacopoeia. 34th ed. Rockville: United States Pharmacopoeial Convention, 2011.

VETULANI, J.; NALEPA, I. Antidepressants: past, present and future. **European Journal of Pharmacology**. V. 405, p. 351-363, 2000.

XU, P.; LI H.; CHEN, B.; MA, N.; YAN, M.; ZHU, Y. Determination of mianserin in human plasma by high performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry (HPLC-ESI/MS): Application to a bioequivalence study in Chinese volunteers. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 47, p. 994-999, 2008.

WALLACE, L. J. Psychopharmacologic Agents. In: GENNARO, A. R. (Ed). **Remington: The Science and Practice of Pharmacy**. 20. ed. Philadelphia: Lippincott Williams 7 Wilkins, 2000. p. 1429-1443.

WATERMAN, K. C. Understanding and Predicting Pharmaceutical Product Shelf-Life. In: K. HUYNH-BA (Ed.), **Handbook of Stability Testing in Pharmaceutical Development Regulations, Methodologies, and Best Practices**, Springer, New York NY, 2009, p. 115–135.

WATSON, G. D. **Pharmaceutical Analysis: A textbook for pharmacy students and pharmaceutical chemists**. London: Churchill Livingstone, 2005.

WÄTZIG, H.; GÜNTER, S. Capillary electrophoresis – A high performance analytical separation technique. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 46, n. 6, p. 724-738, 2003.

WECKER, L.; CATALANO, G. Tratamento dos transtornos afetivos. In: MINNEMAN, K. P. (Ed.); WECKER, L. (Ed.); LARNER, J.; BRODY, T. M. **Brody: Farmacologia Humana**, 4. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006, cap. 23, p. 275-284.

WIKSTRÖM, H. V.; MENSONIDES-HARSEMA, M. M.; CREMERS, T. I. F. H.; MOLTZEN, E. K.; ARNT, J. Synthesis and Pharmacological Testing of 1,2,3,4,10,14b-Hexahydro-6-methoxy-2-methyldibenzo[c,f]pyrazino[1,2-a]azepin and Its Enantiomers in Comparision with the Two Antidepressants Mianserin and Mirtazapine. **Journal of Medicinal Chemistry**. v. 45, p. 3280-3285, 2002.

WISSMANN, P. J.; GROVER, M. A. A new approach to batch process optimization using experimental design. **American Institute of Chemical Engineers Journal**, v. 55, n. 2, p. 342-353, 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). http://www.who.int/mental_health/management/depression. Accessed July 13, 2012.