UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos
Área de Produção e Controle Farmacêuticos

Desenvolvimento e validação de metodologia para medicamentos
contendo dipirona sódica e cloridrato de papaverina isolados e
em associação

Andréia Peraro do Nascimento

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientador:
Profa. Titular Erika R. M. Kedor -Hackmann

São Paulo
2005

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Nascimento, Andréia Peraro do
N244d Desenvolvimento e validação de metodologia para medicamentos
contendo dipirona sódica e cloridrato de papaverina isolados e
em associação / Andréia Peraro do Nascimento. -- São Paulo,
2005.
141p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo. Departamento de Farmácia.
Orientador: Kedor-Hackmann, Erika Rosa Maria

1. Medicamento : Controle de qualidade 2. Cromatografia em
líquido de alta eficiência : Análise química : Farmacologia
3. Espectrofotometria : Análise de medicamentos I. T. II Kedor-
Hackmann, Erika Rosa Maria, orientador.

615.19015 CDD

Andréia Peraro do Nascimento

Desenvolvimento e validação de metodologia para medicamentos
contendo dipirona sódica e cloridrato de papaverina isolados e
em associação

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Profa. Dra. Erika Rosa Maria Kedor-Hackmann
orientador/presidente

Profa. Dra. Magali Benjamim de Araújo
1º. examinador

Profa. Dra. Maria Palmira Daflon Gremião
2º. examinador

Profa. Dra. Veni Maria Andres Felli
3º. examinador

Profa. Dra. Maria Inês Rocha Miritello Santoro
4º. examinador

São Paulo, 31 de janeiro de 2006.

**A glória não consiste em jamais cair, mas sim de erguer-se
toda vez que for necessário.**

À Deus,

"Os que confiam no Senhor serão como o monte de Sião, que não se abala, mas permanece para sempre"

Salmo 125:1

Aos meus pais Ademar Peraro e Durvalina Cricco Peraro pela força, amor e tanta compreensão, principalmente nos momentos mais difíceis.

Ao meu irmão Luciano Cricco Peraro e à Maria Helena pelo apoio, mesmo à distância.

**Ao meu marido Lafaiete Marcos pela sua
compreensão, apoio, amizade, encorajamento e amor.**

À professora Erika Rosa Maria Kedor-Hackmann, pela orientação, compreensão, sabedoria, apoio profissional e pessoal durante a realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

À Coordenadoria do Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos do Departamento de Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

À profa Titular Maria Inês Rocha Miritello Santoro, pela amizade, incentivo colaboração.

Ao prof Dr Anil Kumar Singh, pela amizade, incentivo e sugestões.

Às amigas e colegas Rosa Fernanda Ignácio, Elizângela Abreu Dutra, Flávia Garcia e Nájla Mohamed Kassab, pelas sugestões, discussões, companheirismo e convívio.

Ao amigo Marcello Garcia Trevisan do Instituto de Química da Unicamp, pelos cálculos e interpretações com a calibração multivariada, pelas correções e valiosas sugestões.

Ao Prof. Dr Ronei Jesus Poppi do Instituto de Química da Unicamp, pelo uso do programa MATLABTM, pela atenção e paciência.

Ao Prof Dr Martin Steppe, pelas amostras de Dipaverina.

Ao Coordenador do curso de Farmácia do Centro Universitário de Lavras-Unilavras prof Disney Ribeiro Dias, pela atenção, compreensão e apoio.

Ao amigo Dr. Matheus Puggina de Freitas, pela preciosa sugestão.

Ao amigo Diogo Teixeira Carvalho, pelas correções e incentivo.

Aos colegas do Laboratório de Controle de Qualidade Físico-Químico Tatiana de Fázio, Pedro Garcia, Ricardo Leite, Renata pelo auxílio e amizade.

À funcionária Iria Raimunda da Silva pelo carinho, compreensão e colaboração.

À Kátia Botelho, pela amizade e colaboração.

Às profas Dra Valentina Porta e Dra Maria Palmira Gremião pelas correções e sugestões.

À Eliane Silva de Sousa, bibliotecária do Centro Universitário de Lavras-Unilavras, pelo auxílio bibliográfico.

Ao prof Dr Jorge Seferin Martins pelo apoio.

Às funcionárias Raquel e Regina Maura Rojas, pela colaboração.

À Elizabete C. S. Paiva, secretária do Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos, pela atenção e colaboração.

Aos funcionários da Secretaria de Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo Elaine M. Ychico, Jorge de Lima e Majô pela atenção e colaboração.

Aos tios do Lafaiete, Antônio Batista da Matta e Odete Caputo da Matta, pelo apoio e incentivo.

À Fundação de apoio para o remédio popular – Furp, pelo fornecimento de matérias-primas.

À Indústria Cristália Produtos Químicos e Farmacêuticos pelo fornecimento de matérias-primas e solventes.

Ao CNPq pela concessão da bolsa, mesmo tendo sido utilizada por alguns meses.

A todos que direta e indiretamente colaboraram pela realização deste trabalho.

RESUMO

A dipirona sódica em associação com o cloridrato de papaverina é usada como medicamento analgésico e antiespasmódico. O objetivo desta pesquisa foi o desenvolvimento e validação de métodos analíticos para a determinação de dipirona sódica e cloridrato de papaverina em preparações farmacêuticas. A solução oral contendo dipirona sódica isolada e a solução oral contendo a associação de dipirona sódica e cloridrato de papaverina foram determinadas por cromatografia líquida de alta eficiência, com as condições padronizadas: Coluna cromatográfica: Supelcosil C18 - LCPH (250 mm X 4,6 mm, 5µm) Supelco e pré – coluna C -18 (20 X 4,6 mm, 5µm) Supelco, fase móvel: água: acetonitrila: metanol (70: 20: 10) trietilamina 0,3% e pH: 3,0 ajustado com ácido ortofosfórico, vazão de 0,7 mL/min e detecção no UV a 254 nm.

Para a solução injetável contendo cloridrato de papaverina foi padronizado e validado o método por cromatografia líquida de alta eficiência, empregando coluna cromatográfica Merck LiChrospher® 100 RP - 18 (125 X 4,6 mm, 5µm), fase móvel: água : acetonitrila : metanol (70 : 20 : 10) trietilamina 0,3% e pH: 3,0 ajustado com ácido ortofosfórico, vazão: 1,0 mL/min e detecção no UV a 254 nm.

Para a determinação simultânea de dipirona sódica e cloridrato de papaverina em solução oral, foi desenvolvida uma nova metodologia utilizando espectrofotometria na região do ultravioleta (UV) e calibração multivariada. Neste sistema, utilizou-se a faixa de leitura: 210 a 300 nm (passo 0,5 nm) e metanol como solvente. A calibração foi feita com 25 soluções nas concentrações de 15,0 a 35,0 µg/mL para a dipirona sódica e de 0,5 a 1,5 µg/mL para o cloridrato de papaverina.

As curvas de calibração foram lineares. Os excipientes das amostras não interferiram nas metodologias. Foram apresentados adequados resultados de desvio padrão e média de recuperação. Os métodos propostos mostraram especificidade, precisão e exatidão para a determinação de dipirona sódica e cloridrato de papaverina em formulações farmacêuticas.

ABSTRACT

Dipyrone sodium and papaverine hydrochloride are used as an analgesic and antispasmodic drugs. The objective of this study was to develop and validate analytical methods for determination of dipyrone sodium and papaverine hydrochloride in pharmaceutical preparations.

The commercial formulations with dipyrone hydrochloride alone and its combination with papaverine hydrochloride were analysed by liquid chromatography. A Supelcosil C18 - LCPH column (250 X 4.6 mm, 5 μ m) Supelco and a mobile phase constituted by water: acetonitrile: methanol (70:20:10), with 0.3% of triethylamine and pH adjusted to 3.0 with phosphoric acid were used. The flow rate was 0.7 mL/min and UV detection at 254 nm.

The injection formulation with papaverine hydrochloride was analysed by a high performance liquid chromatographic method. The method was standardized and validated using a Merck LiChrospher[®] 100 RP – 18 column (125 X 4.6 mm, 5 μ m) and a mobile phase constituted of water: acetonitrile: methanol (70:20:10), with 0.3% of triethylamine and pH adjusted to 3.0 with phosphoric acid. The flow rate was 1.0 mL/min and UV detection at 254 nm.

The same oral solution with the combination of dipyrone sodium and papaverine hydrochloride was also quantified by UV spectrophotometry using multivariate calibration, in the range of 210 to 300 nm. The calibration set was constructed with twenty-five solutions in the concentration ranges from 15.0 to 35.0 μ g mL⁻¹ for dipyrone sodium and 0.5 to 1.5 μ g mL⁻¹ for papaverine hydrochloride in methanol.

The results show that the methods presented good relative standard deviation and good recovery values. The obtained data indicates specificity, precision and accuracy of the proposed methods for the simultaneous determination of dipyrone sodium and papaverine hydrochloride in pharmaceutical formulations.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	01
2 REVISÃO DE LITERATURA	05
2.1 Dor	05
2.1.1 Classificação da dor	06
2.1.2 Tratamentos da dor	07
2.2 Analgésicos, antipiréticos e antiinflamatórios	08
2.2.1 Dipirona sódica	11
2.2.1.1. Metabolismo	12
2.2.1.2. Mecanismo de ação da dipirona	13
2.2.1.3 Usos clínicos da dipirona	14
2.2.1.4 Polêmica sobre o uso da dipirona	15
2.2.2 Metodologias para a análise de dipirona sódica	19
2.2.2.1 Espectrofotometria Ultravioleta/Visível (UV/VIS)	19
2.2.2.2 Cromatografia líquida de alta eficiência – CLAE	22
2.2.2.3 Outras metodologias analíticas para a determinação de dipirona sódica	23
2.3 Cloridrato de papaverina	24
2.3.1 Farmacocinética	25
2.3.2 Farmacodinâmica	25
2.3.3 Usos clínicos	25
2.3.1. Metodologias analíticas para determinação de cloridrato de papaverina	26
2.3.1.1. Cromatografia líquida de alta eficiência – CLAE	26
2.3.1.2 Outras metodologias utilizadas para a determinação analítica de cloridrato de papaverina	29
2.4 Espectrofotometria no Ultravioleta e Visível (UV/VIS)	30
2.5 Cromatografia líquida de alta eficiência – CLAE	34
2.5.1 Instrumentação para a CLAE	35
2.5.2 Modos de separação por CLAE	37
2.5.2.1 Cromatografia em fase normal	38
2.5.2.2 Cromatografia em fase reversa	39
2.5.2.3 Cromatografia de compostos iônicos	39
2.5.2.4 Cromatografia de troca iônica	40
2.5.2.5 Cromatografia de exclusão	41
2.6 Métodos de calibração multivariada	41
2.7 Quimiometria	44
2.8 Validação de métodos analíticos	45
3 OBJETIVOS	51
4 MATERIAL E MÉTODOS	52
4.1 Material	52
4.1.1 Reagentes e solventes	52
4.2 Substâncias químicas de referência	53
4.1.3 Equipamentos e acessórios	53
4.1.4 Amostras	54

4.2 Métodos	56
4.2.1 Testes preliminares	56
4.2.2 Ensaios cromatográficos preliminares para a análise de dipirona sódica e cloridrato de papaverina	57
4.2.3 Validação da metodologia analítica para a cromatografia líquida de alta eficiência	60
4.2.3.1 Padronização do método cromatográfico para a associação de dipirona sódica e cloridrato de papaverina	60
4.2.3.1.1 Construção da curva analítica	61
4.2.3.1.2 Pesquisa de interferentes a partir de excipientes para a Amostra 1	63
4.2.3.1.3 Aplicação do método padronizado à Amostra 1	64
4.2.3.1.4 Pesquisa de interferentes a partir de excipientes para a Amostra 2	65
4.2.3.1.5 Aplicação do método padronizado à Amostra 2	67
4.2.3.2 Padronização do método cromatográfico para o cloridrato de papaverina isolado	69
4.2.3.2.1 Construção da curva analítica	70
4.2.3.2.2 Pesquisa de interferentes a partir de excipientes	70
4.2.3.2.3 Aplicação do método padronizado à Amostra 3	72
4.3 Ensaios preliminares utilizando a espectrofotometria no UV com aplicação do PLS (Partial Least Squares) para a análise de dipirona sódica e cloridrato de papaverina	74
4.3.1 Modelo de calibração para a espectrofotometria no UV com aplicação do PLS	75
4.3.1.1 Pesquisa de interferentes a partir de excipientes	77
4.3.1.2 Aplicação do método padronizado à Amostra 1	78
5 RESULTADOS	81
5.1 Testes preliminares com as substâncias de referência	81
5.1.1 Testes descritos pela Farmacopéia Britânica	81
5.1.2 Teste de identificação por espectrofotometria no UV	83
5.2 Ensaios cromatográficos preliminares para a análise de dipirona sódica e cloridrato de papaverina	84
5.2.1 Testes preliminares com a coluna cromatográfica Merck LiChrospher® 100RP- 8 (125 X 4,6 mm , 5µm)	84
5.2.2 Testes preliminares com a coluna cromatográfica Merck LiChrospher® 100 RP -18 (125 X 4,6 mm, 5µm)	86
5.2.3 Testes preliminares com a coluna cromatográfica Nova Pack C18® (300 x 3,9mm)	88
5.2.4 Seleção de melhor comprimento de onda através de espectros de absorbância	88
5.3 Padronização do método cromatográfico para a associação de dipirona sódica e cloridrato de papaverina	90
5.3.1 Construção da curva analítica	90
5.3.2 Pesquisa de interferentes a partir de excipientes para a Amostra 1 - Especificidade	93
5.3.3 Aplicação do método padronizado à Amostra 1	95

5.3.4 Pesquisa de interferentes a partir de excipientes para a Amostra 2 – Especificidade	97
5.3.5 Aplicação do método padronizado à Amostra 2	99
5.4 Padronização do método cromatográfico para o cloridrato de papaverina em amostra isolada	100
5.4.1 Construção da curva analítica	100
5.4.2 Pesquisa de interferentes a partir de excipientes	103
5.4.3 Aplicação do método padronizado à Amostra 3	104
5.5 Ensaios preliminares utilizando a espectrofotometria no UV com aplicação do PLS para a análise de dipirona sódica e cloridrato de papaverina	106
5.5.1 Pesquisa de interferentes a partir de excipientes - Especificidade	109
5.6 Comparação estatística dos métodos de cromatografia líquida (CLAE) e espectrofotometria na região do ultravioleta (UV) com aplicação do PLS	113
6 DISCUSSÃO	116
7 CONCLUSÕES	124
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	126

1. INTRODUÇÃO

A dor é, em geral, um grande aliado do ser humano, um indicador de que alguma coisa vai mal no organismo. É ela que aponta para a existência de uma doença ou avisa que o corpo pode ter chegado ao limite em razão de um esforço físico ou mesmo do stress. Em muitos casos a dor é a própria doença, não consegue-se a cura (BUCHALLA, A. P.; POLES, C., 2002). De acordo com a Associação Internacional do Estudo da Dor, a dor é uma experiência sensitiva e emocional desagradável associada ou relacionada à lesão real ou potencial dos tecidos, e cada indivíduo aprende a utilizar esse termo através das suas próprias experiências anteriores. Daí que é comum se ouvir que cada pessoa entende da sua dor, o quanto dói, onde dói, como dói, e o que reduz ou piora a sensação dolorosa (International Association for the Study of Pain, IASP) (TEIXEIRA, M. J, 2005).

De acordo com dados aceitos e divulgados por diversas entidades médicas internacionais, pelo menos 30% dos indivíduos sentem dor durante algum momento da sua vida e, em mais de um terço dos casos, a dor tem duração superior a um dia. A dor é a causa principal de sofrimento, incapacitação para o trabalho e ocasiona graves consequências psicossociais e econômicas. Não existem dados estatísticos oficiais sobre a dor no Brasil, mas a sua ocorrência tem aumentado substancialmente nos últimos anos (SOCIEDADE, 2005).

Os dados referentes à incidência da dor crônica, aquela cuja duração é igual ou superior a seis meses, mostram que entre 7 a 40% da população mundial têm este tipo de dor e, desse contingente de pessoas, cerca de 60% ficam parcial ou totalmente incapacitados, de maneira transitória ou permanente, comprometendo de modo significativo a sua qualidade de vida (SOCIEDADE, 2005).

O aumento dos casos de dor registrados em todo o mundo, especialmente os de dor crônica, vem crescendo talvez em decorrência de novos hábitos de vida, maior

longevidade dos indivíduos, prolongamento da sobrevida de pessoas com males naturalmente fatais, modificações do ambiente em que se vive e, provavelmente, do reconhecimento de novos quadros dolorosos e da aplicação de novos conceitos que expliquem ou justifiquem as tão diversas sensações dolorosas.

As dores que mais atingem a população são a cefaléia, quase 30 % dos brasileiros sofrem de dores de cabeça crônicas, as mais comuns são a enxaqueca e a cefaléia tensional. A cefaléia de cunho crônico ocupa o primeiro lugar não apenas entre os adultos, mas também entre as crianças.

A lombalgia, tradicional dor nas costas, vitima cerca de 20 % da população. Outros tipos de dores musculares que surgem em qualquer parte do corpo, estão associadas a movimentos repetitivos, má postura, stress, traumatismos ou sobrecarga muscular (VAN TULDER M, KOES B, 2001). O tratamento, na maioria das vezes, consiste de analgésicos, antidepressivos e sessões de alongamento.

Outras causas de dor crônica são a artrose (desgaste da cartilagem de uma articulação) e artrite reumatóide (inflamação na articulação), nesses casos é inevitável o uso contínuo de analgésicos e antiinflamatórios (BUCHALLA, A. P.; POLES, C., 2002)

Dentre os 5 fármacos mais vendidos em todo o mundo, 4 são analgésicos: a dor movimenta uma indústria de bilhões de dólares anualmente. Hoje, graças à ação de fármacos cada vez mais eficazes, somos capazes de lutar e vencer a dor (QUIMICA VS DOR, 2005).

A produção de analgésicos e antiinflamatórios é o ramo que mais cresce em toda a indústria farmacêutica mundial. O Brasil é o segundo maior mercado consumidor de analgésicos do mundo, com cerca de 500 milhões de dólares movimentados anualmente. A lista dos dez medicamentos mais procurados nas farmácias brasileiras inclui quatro medicamentos para combater a dor, dentre eles a dipirona sódica é um dos medicamentos mais consumidos (BUCHALLA, A. P.; POLES, C., 2002).

A dipirona é, em verdade, o principal analgésico da terapêutica brasileira, com 31,8 % do mercado, sendo o paracetamol com 29,7 % em segundo e o ácido acetil salicílico, com 27,1 %, em terceiro (GAZETA MERCANTIL, 2003). Existem no país 125 produtos a base de dipirona, sendo 71 em associação a outras substâncias (ANDRADE, M. P. 2005). Dentre estas há medicamentos com associação de dipirona sódica, que age como analgésico e antipirético e cloridrato de papaverina, que possui ação antiespasmódica. No mercado brasileiro comercializam-se os seguintes medicamentos contendo essa associação: Atroveran (Laboratório DM); Melpaz (Laboratório Profarb); Sedalene (Cristália Produtos Químicos e Farmacêuticos), entre outros (DEF, 2004; DEF, 2005).

Há também outras associações entre analgésicos, por exemplo: dipirona sódica e paracetamol; paracetamol e ibuprofeno; dipirona, citrato de orfenadrina e cafeína; dipirona e butil brometo de escopolamina; dipirona, cloridrato de prometazina e cloridrato de adifenina, entre outros (DEF, 2005).

Nos compêndios oficiais não constam monografias de medicamentos analgésicos em associação, a maioria é analisada individualmente.

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é um dos métodos analíticos mais utilizados para a determinação de compostos em misturas, como por exemplo, a associação de fármacos (ALTUN, M.L., 2001). Um dos grandes problemas dessa metodologia é o alto custo dos equipamentos e sua manutenção, além do uso de solventes altamente puros.

Alguns laboratórios de pesquisas têm procurado técnicas alternativas quando não há possibilidade de se usar a CLAE. Os pesquisadores têm buscado melhorar as metodologias já existentes.

Um grande avanço nas técnicas instrumentais analíticas foi impulsionado pela presença de microprocessadores e microcomputadores nos laboratórios químicos, no início dos anos setenta. Foi necessário criar técnicas de tratamento de dados

mais complexas do ponto de vista matemático e estatístico, surgindo uma nova disciplina chamada quimiometria (SENA, M.M.; POPPI, R.J., 2004).

A quimiometria (do inglês chemometrics) descreve as técnicas e operações associadas com o tratamento matemático e a interpretação de dados químicos. Com o avanço da instrumentação e automação dentro dos laboratórios de análise, uma enorme quantidade de dados, tabelas e gráficos começaram a ser gerados muito rapidamente. A identificação, classificação e interpretação desses dados podem ser fatores limitantes na eficiência e na operação efetiva das análises, principalmente sem a utilização de um tratamento de dados adequado.

A espectroscopia molecular tem sido a área da química analítica, onde mais a quimiometria tem contribuído. São numerosas as metodologias quantitativas desenvolvidas nas últimas décadas baseadas na combinação de calibração multivariada (BRERETON, R.G., 2000) com técnicas de espectroscopia molecular tais como, absorção no ultravioleta (UV) (DINÇ, E.; BALEANU, D.; ONUR, F., 2001), e/ou no visível, no infravermelho (IV) médio ou próximo, Raman e fluorescência molecular (BRAGA, J. W. B.; POPPI, R.J. 2004).

Para a determinação direta de fármacos tem sido aplicada a combinação de quimiometria e espectroscopia molecular. A calibração multivariada e a espectroscopia molecular é uma alternativa rápida, simples e relativamente barata para a determinação direta de fármacos (SENA, M.M.; POPPI, R. J, 2004).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Dor

A dor continua sendo uma das grandes preocupações da Humanidade. Desde os primórdios do ser humano, conforme sugerem alguns registros gráficos da pré-história e os vários documentos escritos posteriormente, o homem sempre procurou esclarecer as razões que justificassem a ocorrência de dor e os procedimentos destinados a seu controle. A expressão da dor varia não somente de um indivíduo para outro, mas também de acordo com as diferentes culturas. A ocorrência de dor, especialmente crônica, é crescente, talvez em decorrência de novos hábitos de vida; maior longevidade do indivíduo; prolongamento de sobrevida dos doentes com afecções clínicas naturalmente fatais; modificações do ambiente em que vivemos; e provavelmente do reconhecimento de novos quadros dolorosos e da aplicação de novos conceitos que traduzam seu significado. Além de gerar estresses físicos e emocionais para os doentes e para os seus cuidadores, a dor é razão de fardo econômico e social para a sociedade (TEIXEIRA, M. J, 2005).

Nos Estados Unidos, dor é uma prioridade para a saúde pública, sendo a partir de 2000, escolhida como a década da dor, e um dos quatro aspectos analisados no credenciamento e pontuação dos hospitais. Os hospitais também devem ter o 5º sinal vital (dor) registrado obrigatoriamente, além de temperatura, pressão arterial, pulso e respiração nas papeletas hospitalares (MARQUEZ, J. O., 2005).

Atualmente o tratamento da dor tem recebido atenção especial de médicos de todo o mundo, com um crescente número de profissionais que estudam e se dedicam ao aperfeiçoamento dos cuidados clínicos e terapêuticos da dor. Há também todo um movimento para incluir a dor como 5º sinal vital (SOCIEDADE, 2005), como já ocorre nos Estados Unidos.

2.1.1 Classificação da dor

A dor pode ser considerada como um sintoma ou manifestação de uma doença ou afecção orgânica, mas também pode vir a constituir um quadro clínico mais complexo. Existem muitas maneiras de se classificar a dor. Considerando a duração da sua manifestação, ela pode ser de três tipos: - DOR AGUDA - Aquela que se manifesta transitoriamente durante um período relativamente curto, de minutos a algumas semanas, associada à lesões em tecidos ou órgãos, ocasionadas por inflamação, infecção, traumatismo ou outras causas. Normalmente desaparece quando a causa é corretamente diagnosticada e quando o tratamento recomendado pelo especialista é seguido corretamente pelo paciente. A dor constitui-se em importante sintoma que primariamente alerta o indivíduo para a necessidade de assistência médica, por exemplo: a dor pós-operatória (que ocorre após uma cirurgia); a dor que ocorre após um traumatismo; a dor durante o trabalho de parto; a dor de dente; as cólicas em geral, como nas situações normais (fisiológicas) do organismo que podem provocar dores agudas, como o processo da ovulação e da menstruação na mulher (SOCIEDADE, 2005).

DOR CRÔNICA - Tem duração prolongada, que pode se estender de vários meses a vários anos e que está quase sempre associada a um processo de doença crônica. A dor crônica também pode ser consequência de uma lesão já previamente tratada. Exemplos: Dor ocasionada pela artrite reumatóide (inflamação das articulações), dor do paciente com câncer, dor relacionada a esforços repetitivos durante o trabalho, dor nas costas e outras (SOCIEDADE, 2005).

DOR RECORRENTE - Apresenta períodos de curta duração que, no entanto, se repetem com frequência, podendo ocorrer durante toda a vida do indivíduo, mesmo sem estar associada a um processo específico. Um exemplo clássico deste tipo de dor é a enxaqueca (SOCIEDADE, 2005).

2.1.2 Tratamentos da dor

O tratamento adequado dos processos dolorosos tem como pilar fundamental o diagnóstico das causas que provocaram o seu aparecimento, com base no exame clínico e nos exames complementares. Nos casos de dor aguda, a remoção da causa da dor (por exemplo, a extração de um dente cariado), o uso de medicamentos adequados e em determinados casos procedimentos de fisioterapia e / ou psicologia são suficientes para a melhora da dor e restabelecimento do indivíduo em suas atividades normais. Os casos de dor crônica demandam um tratamento mais complexo e prolongado, por serem resultantes de mecanismos multifatoriais que conduziram o organismo afetado a esse ponto de cronicidade e, em geral, demandam avaliação por especialistas de várias áreas para se obter um melhor alívio da dor. Os métodos para o tratamento da dor são utilizados de maneira associada (conjunta), conforme a necessidade de cada paciente e são descritos a seguir:

- **TRATAMENTO MEDICAMENTOSO:** A medicação deve ser utilizada de acordo com a orientação médica e não somente quando o paciente considere necessário. Consiste na administração por via oral, injetável ou uma outra mais apropriada, de produtos como os analgésicos e anti-Inflamatórios, que combatem a dor e as inflamações nos tecidos ou órgãos e de produtos adjuvantes, que são auxiliares dos analgésicos, aumentando a sua eficiência no alívio da dor e, ao mesmo tempo, melhorando o apetite, o humor e a parte emocional. São eles: antidepressivos, que tem efeito analgésico e que, além disso, melhoram o humor, o sono e o apetite; neurolépticos, que em geral diminuem a ansiedade gerada pela dor e que também colaboram no seu alívio; corticosteróides, que em geral reduzem o inchaço e a inflamação local, aumentam o apetite e o ânimo. Em situações especiais também são utilizados os anticonvulsivantes, miorrelaxantes e outros tranqüilizantes.

- **TRATAMENTOS AUXILIARES:** Além dos medicamentos, a utilização de recursos como a fisioterapia, a acupuntura e a psicologia auxiliam num melhor controle do processo da dor. Esses recursos, além de aliviarem a dor, têm a

vantagem de apresentarem pouco ou nenhum efeito colateral e de diminuir a necessidade de analgésicos (TEIXEIRA, M. J, 2005).

2.2 Analgésicos, antipiréticos e antiinflamatórios

A dor e a febre, associadas ou não a processos inflamatórios, têm preocupado a humanidade há muitos séculos. A utilização de infusões de plantas, notadamente de *Salix alba vulgaris* (casca do salgueiro), como antipirético remonta ao século XVIII. Da casca do salgueiro Leroux isolou, em 1827, a salicina, que, por hidrólise, libera glicose e álcool salicílico (saligenina). Mais tarde, em 1838, Piria isolou um ácido da salicina, que denominou de ácido salicílico. Em 1844, o ácido salicílico foi isolado por Cahours do óleo de gaultéria (wintergreen), e finalmente, em 1860, Kolbe e Lautemann conseguiram obtê-lo através de síntese. Em 1899, Dreser introduziu no uso clínico o ácido acetilsalicílico. Tais descobertas foram seguidas pela introdução de novos produtos, dando início à terapêutica de importantes compostos de ação analgésica, antipirética e antiinflamatória, que ainda hoje continuam em franco desenvolvimento (SILVA, P. 2002)

Analgésicos são depressores seletivos do sistema nervoso central empregados para aliviar a dor sem causar a perda de consciência. Agem por elevar o limiar da percepção da dor. O termo analgesia vem da palavra grega que significa “sem dor”.

A associação Médica Norte-Americana dividiu os analgésicos em duas classes: analgésicos fortes ou hipnoanalgésicos e os analgésicos suaves.

Os analgésicos suaves, isto é, os que eliminam dores moderadas, tais como cefaléia, mialgia, artralgia e outras, podem apresentar também ações antitérmica, antiinflamatória e antigotosa, além de outras. Distinguem-se, portanto, os antipiréticos, os anti-reumáticos e os uricosúricos.

Antipiréticos ou antitérmicos são fármacos que eliminam ou aliviam os estados febris. Não baixam a temperatura normal, mas apenas quando ela está elevada.

A temperatura corporal é controlada por um mecanismo regulador situado no hipotálamo, que controla a produção e a perda de calor. O hipotálamo é, por assim dizer, o “termostato” do organismo. Ao sobrevir à febre, eleva-se o nível do termostato, embora persista o equilíbrio entre a produção e perda de calor. Entre as causas da febre sobressaem as seguintes: inflamação, neoplasias, lesões do sistema nervoso central, desidratação (sobretudo em crianças), certos fármacos, moléstias infecciosas (KOROLKOVAS, A. BURCKHALTER, J. H., 1988).

O desequilíbrio entre a produção e a perda de calor é desencadeado pelos neurônios do hipotálamo em resposta a um estímulo provocado por piretogênios endógenos leucocitários, que são proteínas específicas veiculadas pelo plasma. Estes piretogênios são sintetizados por certos tipos de leucócitos quando os piretogênios exógenos (tais como bactérias) invadem o organismo. Os antipiréticos produzem abaixamento da temperatura corporal elevada em consequência do aumento da perda de calor (KOROLKOVAS, A. BURCKHALTER, J. H., 1988).

Os analgésicos antipiréticos e antiinflamatórios constituem um grupo de compostos muito heterogêneos com várias estruturas químicas, podendo ser distribuídos nas seguintes classes, de acordo com o grupo químico a que pertencem (KOROLKOVAS, FRANÇA, F.F.A.C., 2002):

- salicilatos: salicilato de sódio, ácido acetilsalicílico, salicilamida, diflunisal;
- derivados da pirazolona: fenazona; metamizol; propifenazona
- derivados do para-aminofenol: paracetamol (acetaminofeno);
- derivados de ácidos arilpropionícos: ibuprofeno, naproxeno, fenoprofeno;

Além dos analgésicos que também são usados como antipiréticos, há aqueles que se utilizam exclusivamente como analgésicos, embora possam exercer igualmente outras ações. Esses fármacos são divididos em: fármacos usados no tratamento de neuralgias; fenamatos; fármacos antieméticos e diversos (KOROLKOVAS, FRANÇA, F.F.A.C., 2002) :

- fármacos usados no tratamento de neuralgias: neuralgia do trigêmeo – carbamazepina (anticonvulsivante); baclofeno (miorrelaxante) e fenitoína (anticonvulsivante); neuralgia glossofaríngea – carbamazepina; neuralgia pós-herpética – amitriptilina (antidepressivo); neuralgia diabética – carbamazepina, fenitoína ou antidepressivos tricíclicos;

- fenamatos e isómeros: ácido mefenâmico; clonixinato de lisina; floctafenina;

- fármacos antieméticos: diidroergotamina; ergotamina; metisergida; naratriptana; pizotifeno; rizatriptana; sumatriptana; zolmitriptana; betabloqueadores; bloqueadores do canal de cálcio; antidepressivos e compostos de lítio;

- diversos: flupirtina, levomepromazina e viminalol.

No comércio são encontradas especialidades farmacêuticas que contêm um produto isoladamente ou associação de princípios ativos pertencentes ao mesmo ou a diferentes grupos (SILVA, P. 2002).

2.2.1 Dipirona sódica

Figura 1 - Estrutura química da dipirona

A dipirona também chamada de Noramidopiriniometanossulfonato sódico, analgina, metamizol, metampirona, noramidopirona, sulpirina e por outros nomes, é um dos derivados do pirazol.

Pó cristalino branco ou quase branco, inodoro, solúvel em água. É reconhecidamente analgésico e antipirético eficiente. Por ser hidrossolúvel, pode ser administrado parenteralmente em grandes doses, o que constitui vantagem e, provavelmente, contribui para o abuso deste fármaco, que é o analgésico e antipirético mais vendido no Brasil sob dezenas de nomes comerciais, principalmente como constituinte de associações medicamentosas (KOROLKOVAS, A. BURCKHALTER, J. H., 1988).

A dipirona sódica é um derivado pirazolônico introduzido na prática clínica em 1922, na Alemanha. A história de sua síntese remonta a 1883, quando a única forma conhecida de combate à febre, na Europa, era o consumo de um produto feito à base de casca de cinchona, árvore natural de Java, da família das rubiáceas. Este produto, além de ter eficiência relativa, tinha custo excessivamente alto, em razão de sua escassez e difícil obtenção. Assim, a produção industrial da antipirina (ou fenazona), que é um derivado pirazolônico sintetizado a partir da anilina (um corante), por um laboratório farmacêutico alemão, à medida que permitiu a produção sintética de um medicamento que só podia ser obtido da Natureza, tornou o combate à febre mais eficaz e menos oneroso. Tal fato era essencial para o combate a diversas doenças que grassavam na época, notadamente tuberculose, malária e demais epidemias. Somente alguns anos após sua introdução constataram-se as propriedades analgésicas do composto. Tal fato ocorreu em 1889, durante um surto da gripe influenza que assolou a Europa, onde este medicamento foi utilizado amplamente para o tratamento. Estas propriedades analgésicas foram reforçadas pela síntese e introdução no mercado alemão de um novo composto em 1921, a primeira pirazolona de uso clínico nomeada dipirona (em verdade, composta por 50% melubrina e 50% aminopirina). No Brasil, a dipirona foi introduzida em 1922 pela Hoechst AG, com o nome de Novalgina® (ANDRADE, M. P., 2005).

2.2.1.1. Metabolismo

A dipirona apresenta, de acordo com estudos realizados em voluntários humanos, quatro metabólitos conhecidos: 4-metil-amino-antipirina (MAA), 4-amino-antipirina (AA), 4-acetil-amino-antipirina (AAA) e 4-formil-amino-antipirina (FAA) (LEVY, M.; FLUSSER, D.; ZYLBER-KATZ, E.; GRANIT, L., 1984). Após administração por via oral, a dipirona passa por rápida hidrólise não-enzimática, determinando a formação do metabólito MAA, que é a seguir metabolizado no fígado por demetilação a AA, e por oxidação a FAA (ERGÜN, H.; FRATTARELLI, D.A.C.; ARANDA, J. V., 2004). Nenhum desses metabólitos liga-se extensivamente às proteínas plasmáticas, (ROHDEWALD, P.; DREHSEN, G.; MILSMANN, E.; DERENDORF, H., 1983) sendo predominantemente excretados pelo rim. Os efeitos analgésicos correlacionam-se, de modo bem próximo, com as concentrações dos

dois primeiros metabólitos acima descritos (MAA e AA) (SCHUG, S.A.; ZECH, D. ; DÖRR, U., 1990). Além da importante propriedade analgésica destacada ao longo do tempo, o fármaco ainda apresenta propriedades antiinflamatórias que foram identificadas em alguns modelos farmacológicos, mas cuja relevância clínica é, até o presente momento, questionável. Weithmann e Alpermann (WEITHMANN, K.U.; ALPERMANN, H.G, 1985) avaliaram os efeitos bioquímicos e farmacológicos da dipirona e metabólitos sobre a cascata do ácido araquidônico e verificaram que os metabólitos 4-MAA e 4-AA inibiram a síntese de prostaglandinas na faixa de 10^{-3} a 10^{-4} mol/L, sendo, portanto, comparáveis ao ácido acetilsalicílico, enquanto os outros dois metabólitos mostraram-se praticamente inativos. Os dados dão suporte ao conceito de serem estes os metabólitos responsáveis pelos efeitos analgésicos clínicos da dipirona.

2.2.1.2.Mecanismo de ação da dipirona

A despeito de inúmeros estudos comportamentais e eletrofisiológicos, o mecanismo de ação pelo qual se evidencia o efeito analgésico da dipirona ainda não está claramente elucidado, parecendo concorrer mecanismos periféricos e centrais. Em nível periférico, alguns trabalhos experimentais iniciais enfatizam a ação da dipirona sobre a hiperalgesia decorrente da lesão tecidual, tanto por inibição da ativação da adenilciclase por substâncias hiperalgésicas como por bloqueio direto do influxo de cálcio no nociceptor (LORENZETTI, B.B., FERREIRA, S.H., 1985). Lorenzetti e Ferreira descrevem a ativação de uma via arginina-óxido nítrico para explicar a analgesia periférica e espinal da dipirona (LORENZETTI, B.B.; FERREIRA, S.H. 1996). Trabalhos experimentais mais recentes sugerem que o efeito antinociceptivo periférico também decorre da ativação de canais de potássio sensíveis ao ATP (ALVES, D.; DUARTE, I.,2002). Sachs, Cunha e Ferreira, neste sentido, situam a dipirona como fazendo parte de uma nova classe de fármacos analgésicos capazes de ativar a via arginina/ NO/ GMPc/proteína cinase G/canais de K⁺ ATP sensíveis ao ATP, constituindo-se numa categoria de analgésicos periféricos com mecanismo de ação diverso dos glicocorticóides ou inibidores de ciclooxigenases. Outros grupos procuraram investigar o mecanismo de ação analgésico da dipirona a partir da reconhecida propriedade antipirética, que decorre

da capacidade de inibição de prostaglandinas no sistema nervoso central (SNC), notadamente no hipotálamo. Para estes autores, a propriedade analgésica da dipirona dever-se-ia à ação dos metabólitos sobre a síntese de prostaglandinas no SNC. (SACHS, D; CUNHA, F.Q.; FERREIRA, S.H., 2004). Campos e colaboradores estudaram a ação da dipirona sobre a regulação da atividade das cicloxigenases, descrevendo-se, mais recentemente, que a dipirona seria capaz de inibir uma isoenzima da cicloxigenase (COX 3), mecanismo central pelo qual o fármaco exerceria as ações analgésicas e antipiréticas. (ANDRADE, M.P., 2005). Muitos trabalhos têm respaldado, porém, que o mecanismo de ação analgésico da dipirona se efetive, de modo relevante, por sua ação espinal. Neugebauer e colaboradores em estudos conduzidos em felinos e roedores, apresentam evidências eletrofisiológicas que respaldam um sítio de ação antinociceptivo espinal, situando-o no corno dorsal da medula espinal (NEUGEBAUER, V.; SCHAIBLE, H.G.; HE, X.; LÜCKE, T.; GÜNDLING, P.; SCHMIDT, R.F., 1994). Este último sítio de ação é reforçado por estudos recentes (VAZQUEZ, E; HERNANDEZ, N; ESCOBAR, W; VANEGAS, H., 2005) que administrando a dipirona por via venosa no rato (200 mg/kg) demonstraram a ativação de circuitos opioidérgicos endógenos na substância periaquedutal cinzenta e no núcleo magno da rafe - ativação esta reversível pela naloxona diretamente aplicada nestas áreas, que compõem o chamado sistema descendente inibitório espinal. Deste modo, parece que o mecanismo de ação da dipirona permanece não totalmente elucidado, possivelmente decorrendo a ação analgésica da atividade tanto central quanto periférica, e em diferentes níveis de processamento da informação dolorosa.

2.2.1.3 Usos clínicos da dipirona

A dipirona é um analgésico não-opiíide empregado em âmbito mundial para tratamento da dor, tanto aguda quanto crônica (EDWARDS, J. E., MCQUAY, H. J., 2002). A eficácia clínica em diversos quadros álgicos tem sido relatada, destacando-se, entre outros, a utilidade no tratamento da dor pós-operatória (STANKOW, G.; SCHMIEDER, G.; LECHNER, F.J.; SCHINZEL, S., 1995), episódios de cólicas nefréticas (GARCIA-ALONSO, F.; GONZALES DES SUSO, M.J.; LOPEZ-ALVAREZ, M.; PALOP, R.; LUCENA, M.I.; MARIN R., 1991) crises de enxaqueca com e sem

aura (BIGAL, M.E.; BORDINI, C.A.; SPECIALI, J.G., 2002), tratamento da dor dentária (ANDRADE, M.P., 2005) e dores do câncer (RODRIGUEZ, M.; BARUTELL, C.; RULL, M.; GALVEZ, R; PALLARES, J.; VIDAL, F.; ALIAGA, L., 1994), é considerada um dos melhores antitérmicos para crianças (BERLIN, C., 2001; SPIGSET O, HAGG S, 2000). A dipirona sódica, disponível em formulações para uso por via oral, parenteral e retal, é bastante utilizada como agente único ou coadjuvante no tratamento da dor pós-operatória. Posso e outros autores em trabalho clínico, prospectivo e duplamente-encoberto com placebo conduzido em cirurgias abdominais, avaliaram a importância da dose administrada no período pós-operatório no que diz respeito à analgesia conferida pela dipirona, onde se empregaram três diferentes doses (500 mg, 1.000 mg e 2.000 mg). Os autores ressaltaram a analgesia dose-dependente da dipirona, descrevendo que o aumento da dose administrada acompanhou-se de redução da intensidade de dor referida pelos pacientes (POSSO, I.; ABRAMOF, S.; CRISCUOLO, D., 1996). Demais autores compararam, no âmbito da dor pós-operatória, a analgesia provida por doses maiores de dipirona (em torno de 30-35 mg/kg) com a proporcionada pela administração de opióides de potência intermediária, como tramadol (SPACEK, A.; GORAJ, E.; NEIGER, F. X.; JAROSZ, J.; KRESS, H. G. 2003). Em outro trabalho foi descrito um efeito poupador de opióides atribuível à dipirona quando administrada conjuntamente com a morfina, no período pós-operatório, a pacientes adultos submetidos a procedimentos abdominais e urológicos (TEMPEL, G.; VON HUNDELSHAUSEN, B.; REE-KER, W., 1996). No âmbito da dor pós-operatória, a maioria dos trabalhos publicados tem avaliado as características da analgesia conferida pela dipirona quando administrada após a incisão cirúrgica (ANDRADE, M.P. 2005).

2.2.1.4 Polêmica sobre o uso da dipirona

A dipirona sódica é amplamente usada não só no Brasil, mas como em outros países como a França, Alemanha, Hungria, Israel, Espanha, Suécia e Tailândia. Todavia, nos Estados Unidos o uso da dipirona foi proscrito há mais de 20 anos, em virtude do suposto papel em deprimir a medula óssea, causando anemia aplástica e agranulocitose (BENSEÑOR, I.M. 2001).

Em 1932, Madison e Squier estabeleceram, pela primeira vez, a relação entre o uso da aminopirina e agranulocitose. Entre 1934 e 1937 ocorreu principalmente nos EUA, uma crescente atenção para a possibilidade de tal efeito adverso. Em 1937, a antipirina foi retirada do mercado americano pela Food and Drug Administration (FDA). A aminopirina, por sua vez, dado o seu parentesco com a antipirina, foi colocada no Schedule IV do Pharmacy and Poisons Act, de 1938, restringindo o seu uso “sob prescrição médica”. Desta forma, a dipirona passou a ser olhada com desconfiança. Em 1952, Discombe realizou um estudo retrospectivo agregando dados de três outros trabalhos retrospectivos e de uma comunicação pessoal, pretendendo estudar a relação entre a aminopirina (e não a dipirona) e a incidência de agranulocitose na população geral. Trata-se de um levantamento com erros metodológicos graves, que incluiu casos expostos a outros fatores por si só capazes de ocasionar agranulocitose, como a fenilbutazona, acarretando uma incidência inaceitavelmente alta (morbidade de 1 caso/115 exposições e mortalidade de 1 caso/159 exposições). Seguiram-se outros levantamentos, incluindo o de Huguley, em 1964, que simplesmente recompilou o trabalho de Discombe, acrescentando os resultados de mais três pesquisadores, sem que entre os casos arrolados se acrescentasse mais um caso de agranulocitose e originando, assim, números discretamente diferentes dos citados por Discombe. No entanto, as reações do FDA, do Reino Unido e da Suécia que se seguiram foram baseadas neste trabalho. Desta forma, a Austrália retirou a dipirona de seu mercado em 1965. (BRASIL, 2005).

Em 1986 publicaram-se os dados de um vultoso estudo epidemiológico que buscou analisar esta questão, o estudo de Boston; “The International Agranulocytosis and Aplastic Anemia Study”, que por sua perfeição metodológica veio a colocar um ponto final nas especulações existentes. Este estudo foi conduzido em sete países (Alemanha, Itália, Espanha, Hungria, Israel, Bulgária e Suécia) de 1980 a 1984, incluindo 300 hospitais e 22,2 milhões de pessoas e concluiu que: - o risco estimado para agranulocitose entre os usuários de dipirona era bastante baixo, não se verificando correlação entre uso de dipirona e incidência de agranulocitose; - a agranulocitose e a anemia aplástica podem ser causadas por muitos medicamentos, assim como agentes químicos e pesticidas; - a agranulocitose ocorre raramente em crianças, aumentando a sua incidência com a faixa etária; - a

agranulocitose é, basicamente, uma reação alérgica, iniciando-se os sintomas entre 2-3 dias após a exposição ao agente químico ou medicamento; - o excesso de risco de agranulocitose atribuível à dipirona é, quando muito, de 1,1 caso por milhão de pessoas expostas que tenham tomado o fármaco por 7 dias antes do início da doença; - a dipirona não está associada à anemia aplástica (THE, 1986).

Alguns pesquisadores afirmam que o risco de agranulocitose através do uso de dipirona é mínimo e a mortalidade é praticamente a mesma relacionada ao uso de paracetamol (CAMU, F.; VANLERSBERGHE, C., 2002).

Em julho de 2001, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) conduziu o “Painel Internacional de Avaliação da Segurança da Dipirona” (BRASIL, 2005), contando com a participação de autoridades nacionais e estrangeiras, com o objetivo de promover esclarecimento sobre os aspectos da segurança do uso clínico da dipirona. Os seguintes pareceres foram emitidos:

- há consenso de que a eficácia da dipirona como analgésico e antitérmico seja inquestionável;

- há consenso de que os riscos atribuídos à sua utilização em nossa população até a presente data sejam baixos, e de que os dados científicos disponíveis apontando a ocorrência destes riscos não sejam suficientes para se indicar uma alteração do status regulatório (venda sem prescrição);

- os dados apresentados durante o painel permitiram aos participantes concluir que os riscos da dipirona são similares, ou menores, que os de outros analgésicos/antitérmicos disponíveis no mercado;

- a mudança da regulamentação atual da dipirona incorreria em aspectos negativos para a população, aumentando os riscos de utilização de outros fármacos indicados para a mesma finalidade terapêutica.

Um estudo recente sobre o risco de agranulocitose atribuível à dipirona com base em banco de dados de laboratórios de hematologia e registro de discrasias sangüíneas associadas ao uso concomitante do fármaco também concluiu pela baixa incidência deste evento adverso (IBANEZ, L.; VIDAL, X.; BALLARIN, E.; LAPORTE, J.R. 2005).

Em dezembro de 2004, os consumidores do analgésico e antitérmico mais usado no Brasil foram surpreendidos pela notícia de que, a partir de 14 de janeiro do ano seguinte, a Anvisa deveria restringir alguns dos medicamentos comercializados contendo a dipirona como princípio ativo, que só poderiam ser vendidos com apresentação de receita médica e deveriam portar tarja vermelha. O Ministério Público Federal apresentou denúncia da Sociedade Brasileira de Vigilância de Medicamentos (Sobrevime) sobre os riscos que esta substância poderia trazer à saúde, alegando que a dipirona é uma “substância que provoca funestas conseqüências decorrentes de sua alta toxicidade”, como anemia, náuseas, reações alérgicas e que pode levar à morte. O Ministério Público se baseava no fato de vários países já proibirem a livre comercialização da dipirona, citando, também, estudos realizados pela Organização Mundial da Saúde, pelo Conselho Federal de Farmácia, pela Universidade de Brasília e pela Sociedade Brasileira de Vigilância de Medicamentos para restringir o uso da dipirona através da exigência da receita médica (ANDRADE, M.P.)

Por decisão judicial, estes medicamentos deveriam entrar para a categoria dos fármacos que demandam prescrição médica. Logo após esta decisão, porém, um recurso impetrado por um dos laboratórios fabricantes derrubou a liminar. Chamada a opinar na ação, a Anvisa alegou que a dipirona está no mercado mundial há 80 anos, sendo o analgésico e antitérmico mais usado no País. Disse ainda, segundo a Justiça Federal, que os riscos atribuídos à substância até o presente são baixos. A diretoria da Anvisa, na ocasião, citou ainda o painel organizado pela agência, que concluiu que a dipirona é um medicamento seguro e eficaz. Desta forma, a dipirona sódica permanece em nosso país sob comercialização livre de prescrição médica (ANDRADE, M.P., 2005).

2.2.2 Metodologias para a análise de dipirona sódica

2.2.2.1 Espectrofotometria Ultravioleta/Visível (UV/VIS)

Amostras de comprimidos contendo dipirona sódica foram analisadas por espectrofotometria visível através de reação com iodato de potássio 0,1 M, produzindo um composto de cor amarelo avermelhada por cinco minutos, com λ (comprimento de onda) máximo em 460 nm. Essa metodologia seguiu a lei de Beer no intervalo de concentração de 1 a 10 mg para dipirona sódica (QUERSHI, S.Z.; SAEED, A.; HASAN, T., 1989).

Foram testados vários solventes para o doseamento de dipirona por espectroscopia no ultravioleta (UV). Foram realizados espectros na região de 225 a 300nm com soluções preparadas com ácido clorídrico 0,1 M, hidróxido de sódio 0,1 M, água deionizada e álcool etílico. Através da análise de regressão linear, o ácido clorídrico apresentou melhores resultados, sendo o solvente mais indicado para este tipo de análise (CARDOSO, T.F.M.; KANIS, L.A.; SILVA, W.B.; GALATO, D., 2003).

SAKIARA, K. A. et al. determinaram a dipirona sódica nas formulações farmacêuticas comprimidos e solução oral através da espectrofotometria. O método foi baseado na seleção oxidativa da dipirona, em presença de ácido sulfúrico, formaldeído reagindo com um ácido cromóforo, produzindo um composto de cor violeta-avermelhado (λ max = 575 nm). O método mostrou ser simples, exato, seletivo e apresentou linearidade (SAKIARA, K.A.; PEZZA, L.; MELIOS, C.B.; PEZZA, H.R.; MORAES, M., 1999).

LIMA, J.L.F.C. et al., desenvolveram um método de determinação de dipirona através de sistema de injeção de fluxo em espectrofotometria. Foi utilizado um sistema de micro-bombas e as amostras foram monitoradas por espectrofotometria a 430 nm. O método mostrou muita versatilidade, exatidão, precisão e limite de detecção de 1mg/L de dipirona (LIMA, J.L.F.C.; SÁ, S.M.O.; SANTOS, J.L.M.; ZAGATTO, E.A.G., 2003).

ERK, N. e ONUR, F. analisou comprimidos contendo dipirona sódica e paracetamol em associação. Determinaram os dois compostos simultaneamente através da espectrofotometria derivada de primeira ordem, utilizando metanol como solvente. A dipirona foi medida em 249,2 nm e o paracetamol em 264,8 nm (ERK, N.; ONUR, F., 1997).

DOGAN, H.N. fez a determinação simultânea de dipirona sódica, paracetamol e cafeína através da espectrofotometria, devido as soluções padrão terem o ponto isoabsortivo em 265,4 nm, utilizando-se etanol como solvente. Aplicou-se o método dos mínimos quadrados e determinou-se a concentração de cada componente. Os excipientes do comprimido não interferiram na análise. Os resultados mostraram um método simples, sensível e exato (DOGAN, H.N., 1996).

Pesquisadores fizeram a determinação simultânea de dipirona sódica, paracetamol e cafeína através da espectrofotometria derivada pelo método de zero-crossing, utilizando HCl 0,1 M, como solvente. As concentrações dos três compostos na mistura foram determinadas pelo uso de gráficos de calibração de cada componente obtidos pela medida da amplitude dos comprimentos de onda máximo e mínimo selecionados. Foram feitos cálculos matemáticos através dos valores obtidos de absorvidade de cada composto. Essa nova metodologia possibilitou um melhor uso da espectrofotometria para a análise de mistura de componentes (DINÇ, E.; ONUR, F., 1998)

Para a análise simultânea da mesma mistura ternária, contendo dipirona sódica, paracetamol e cafeína em comprimidos foram pesquisadas duas técnicas de calibração multivariada, também chamada quimiometria. Foram aplicadas as técnicas de método dos mínimos quadrados inverso (ILS) e análise do componente principal (PCA) sobre a análise espectrofotométrica desses multicomponentes. Foram medidas as absorbâncias dos três componentes em solução de HCl 0,1 M, na faixa espectral de 225 a 285 nm (passo = 5 nm). Os 13 comprimentos de onda utilizados para a realização do modelo de calibração da mistura ternária foram tratados pelo software 'MAPLE V'. Através de cálculos matemáticos foram obtidos os valores de desvio padrão relativo para o ILS e PCA para os três princípios ativos e

as respectivas médias de recuperação. Os resultados obtidos foram comparados com os resultados de CLAE, nas seguintes condições cromatográficas: coluna Nucleosil C₁₈(250 x 4,6 mm); fase móvel: água: metanol 18:82 v/v; vazão de 1mL/min e detecção a 254 nm. As duas técnicas aplicadas sobre a espectrofotometria possibilitaram bons resultados de eficiência, precisão, exatidão e linearidade (DINÇ, E.; BALEANU, D. e ONUR, F., 2001).

ABURJAI et al, determinaram simultaneamente a dipirona sódica e a vitamina C em comprimido e solução injetável, através da espectrofotometria derivada de segunda ordem, utilizando-se o comprimento de onda de 280 nm para a vitamina C e 272 nm para a dipirona, usando metanol como solvente. Neste mesmo trabalho, utilizaram a cromatografia em camada delgada de alta eficiência para essa mesma determinação. As amostras foram dissolvidas em soluções metanólicas e aplicadas em placa de sílica gel para cromatografia em camada delgada e examinadas a 260 nm. As duas metodologias mostraram bons resultados para a análise das amostras (ABURJAI, T.; AMRO, B.I.; AIEDEH, K.; ABUIRJEIE, M.; AL-KHALIL, S., 2000).

MORELLI, B. analisou a mistura binária de dipirona sódica e cloridrato de pitofenona, um fármaco antiespasmódico, por espectrofotometria derivada.

O primeiro método utilizado foi a aplicação da derivada de segunda ordem com calibração linear a 266,5 e 302,5 nm (dipirona), 257 e 286 nm (pitofenona) e para a derivada de terceira ordem a 242 e 278,3 nm (dipirona) e 228,5 e 300 nm (pitofenona). No segundo método foram utilizadas as derivadas de primeira ordem com calibração linear para os seguintes comprimentos de onda: 235 e 262 nm (dipirona) e 229,5 e 288,5 nm (pitofenona), para a derivada de segunda ordem 249,7 e 268 nm (dipirona) e 280,5 e 300 nm (pitofenona). Todas as soluções foram preparadas em água destilada. Os procedimentos foram simples, rápidos e não necessitaram de separação preliminar ou tratamento para as amostras (MORELLI, B., 2003).

2.2.2.2 Cromatografia líquida de alta eficiência - CLAE

ASMARDI, G. e JAMALI, F. fizeram a determinação de dipirona e de seu metabólito ativo o 4-metil-amino-antipirina (MAA) através da cromatografia líquida. A dipirona foi determinada através da coluna de troca iônica Bondapak AX/Corasil (Waters Assoc.) 61 cm X 2 mm (35-50 μ m), fase móvel: tampão fosfato pH 5,6: metanol (85:15), vazão de 0,5 mL/min, detecção no ultravioleta(UV) a 254 nm. Para a determinação do MAA utilizou-se uma coluna de fase reversa 30 cm X 3,9 mm (10 μ m) (μ Bondapak C₁₈, Waters Assoc.). A fase móvel foi água: metanol: ácido acético (75:20:5), vazão de 1,0 mL/min e detecção no UV a 280 nm. As amostras foram analisadas dos fluídos biológicos urina e plasma (ASMARDI, G.; JAMALI, F., 1983).

Através da CLAE pesquisadores separaram e determinaram quantitativamente a dipirona e seus produtos de degradação, os parâmetros seguidos foram: coluna cromatográfica de fase reversa Merck RP – 18 (25 cm X 4,6 mm, 10 μ m) e pré-coluna RP-18 de 5 cm, 10 μ m); fase móvel: metanol: água: trietilamina (50:50:0,025), vazão de 0,3 mL/min. a dipirona foi detectada no UV a 228 nm, e seus produtos de degradação a 244 nm (EDDINE,N.H.;BRESSOLE,F.;MANDROU,B.; FABRE,H., 1982).

KATZ, E.Z. et al. fez a determinação simultânea de dipirona e seus metabólitos em plasma utilizando-se como metodologia a cromatografia líquida, com os seguintes parâmetros: coluna cromatográfica μ Bondapak C₁₈(300 mm X 30 cm, 10 μ m), fase móvel:8% de metanol em solução de acetato de sódio 0,01 M , pH 3,0 ajustado com ácido clorídrico concentrado, vazão de 1,6 mL/min, detecção no UV a 257 nm. Através desse método foi possível uma boa separação entre a dipirona e seus metabólitos (KATZ, E.Z.; GRANT, L.; DRAYER, D.E.; LEVY, M., 1984).

ABOUNASSIF, M.A.; GAD-KAREIM e WAHBI, A.M. determinaram simultaneamente pela CLAE dipirona, fenobarbital e quelina em comprimidos. Os parâmetros utilizados: coluna de fase reversa μ Pak Varian, fase móvel: metanol:água(68:32) para a retenção de quelina e dipirona com detecção UV a 254 nm; 94,5 mL de água, 0,5 mL de amônia(para ajustar o pH a 10,5) e 5mL de metanol

para fenobarbital detectado em UV a 240 nm e vazão de 0,7 mL/min. Essa metodologia apresentou reprodutibilidade, especificidade e exatidão (ABOUNASSIF, M.A.; GAD-KAREIM e WAHBI, A.M., 1990).

ALTUN, M.L. fez a determinação simultânea de dipirona, paracetamol e cafeína pelo método cromatográfico com os parâmetros: coluna cromatográfica μ - Bondapak C₈; fase móvel KH₂PO₄ 0,01 M-metanol-acetonitrila-álcool isopropílico (420:20: 30:30), vazão de 1mL/min, detecção espectrofotométrica a 215 nm (ALTUN, M.L., 2002).

SENYUVA, H.Z. et al. determinaram a dipirona em formulações líquidas e sólidas pela cromatografia líquida com detecção de arranjo de diodos, utilizando a uma coluna de fase reversa Zorbax SB C₁₈(250 X 4,6 mm, 5 μ m), fase móvel: metanol/água (80/20), detecção UV a 254 nm. Os resultados foram comparados com a espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) (SENYUVA, H.Z.; AKSAHIN, I.; OZCAN, S.; KABASAKAL, B.V., 2005).

2.2.2.3 Outras metodologias analíticas para a determinação de dipirona sódica

A amperometria foi utilizada como método de determinação de dipirona em formulações farmacêuticas, utilizando-se eletrodo de ouro. Os resultados foram comparados com a titulação iodométrica, que é o método oficial preconizado pela farmacopéia britânica (MUÑOZ, R.A.A.; MATOS, R.C.; AGNES, L., 2001).

A espectroscopia Raman com transformada de Fourier foi empregada para a determinação quantitativa de dipirona sódica (IZOLANI, A.O.; MORAES, M.T.; TÉLLEZ, C.A., 2003).

Através da cromatografia em camada delgada alguns pesquisadores separaram e quantificaram a dipirona e seus produtos de degradação, os parâmetros foram os seguintes: placa cromatográfica de sílica gel F₂₅₄, espessura de 0,25 mm; fase móvel: etanol-clorofórmio-benzeno-solução de amônia a 10% (50:30:18:2). As manchas foram reveladas sobre luz UV a 254 nm e quantificadas

por medidas espectrofotométricas de reflectância a 273 nm (FABRE, H.; EDDINE, N.H.; BRESSOLE, F.; MANDROU, B. 1982).

Pelos compêndios oficiais a dipirona sódica é determinada através de titulação iodométrica (FARMACOPEIA, 1977; BRITISH, 2002).

2.3 Cloridrato de papaverina

O cloridrato de papaverina foi o primeiro agente miotrópico a ser introduzido na medicina, é um dos alcalóides extraídos do ópio, as cápsulas de sementes imaturas de papoula, *Papaver somniferum*, nas quais ocorre na proporção de 1%. A papaverina foi isolada por Merck, em 1848, e sintetizada em 1909, por Pictet e Gams. Atualmente é obtida por síntese total (KOROLKOVAS, A.; BURCKHALTER, J.H., 1988)

Figura 2 – Estrutura química da papaverina

Faz parte do grupo da benzilisoquinolina, depressor da musculatura lisa sem ação sobre o sistema nervoso central, não sendo euforizante. Considerada como protótipo dos fármacos vasodilatadores, costuma ser confrontada em testes de novas substâncias para esse propósito (SILVA, P. 2002).

É um dos fármacos mais importantes que atuam como relaxantes da musculatura uterina, juntamente com a hioscina, fazem parte do grupo de fármacos anticolinérgicos. Sua ação é espasmolítica, analgésica e sedativa. Suas vias de administração são a oral, intramuscular e endovenosa (SILVA, P. 2002).

2.3.1 Farmacocinética

Quando a papaverina é administrada por via oral, a meia-vida é de uma a duas horas: entretanto, há uma grande variação interindividual. Liga-se à proteínas plasmáticas em 90%, é metabolizada no fígado e excretada na urina quase totalmente como metabólitos fenólicos conjugados com glucoronídeos (SILVA, P. 2002).

2.3.2 Farmacodinâmica

Relaxa a musculatura lisa vascular por inibição inespecífica da fosfodiesterase, promovendo aumento do AMP cíclico (SILVA, P. 2002).

2.3.3 Usos clínicos

Tem ação espasmolítica, sendo útil em processos caracterizados por espasmo vascular. Tem sido usada em pacientes com insuficiência arterial periférica e cerebral. É útil para realização do teste de ereção fármaco-induzida e como fármaco utilizado para auto-injeção em pacientes com impotência sexual orgânica isoladamente ou associada a outros fármacos (SILVA, P. 2002).

Muito eficaz no tratamento de espasmo vasocerebral agudo por diferentes vias de administração (LIU, H.M. TU, Y.K. 2002).

Está sendo amplamente utilizada em doenças arteriais, como o embolismo pulmonar e também no alívio de cólicas renais e biliares (YAN, J.; MI, J –Q.; HE, J-T.; GUO, Z-Q.; ZHAO, M-P.; CHANG, W-B., 2005)

2.3.1 Metodologias analíticas para determinação de cloridrato de papaverina

2.3.1.1. Cromatografia líquida de alta eficiência – CLAE

SINGH, D.V. et al. analisaram os principais alcalóides contidos na *Papaver somniferum*, através da CLAE, utilizando uma coluna Merck Durasil C₁₈(250 x 4,6 mm) com fase móvel acetonitrila: tampão fosfato (20:80) e pH 3,8 ajustado com ácido acético glacial; vazão de 1 mL/min e detecção a 240 nm, com arranjo de fotodiodo. Foi possível a quantificação de morfina, codeína, oripavina, codeinona, reticulina, tebaína, papaverina e narcotina (SINGH, D.V.; PRAJAPATI, S.; BAJPAI, S.; VERMA, R.K.; GUPTA, M.M.; KUMAR, S. 2000).

Para determinação de cloridrato de papaverina em xarope foi utilizada a CLAE seguindo os parâmetros: coluna Ultrasphere 5 μ m Spherical 80 Å (250 mm X 46 mm), fase móvel: água: acetonitrila, etanol (38:60:2) contendo ácido perclórico 1 mM, vazão de 1mL/min e detector de condutividade (LAU,O-W; MOK,C-S.; 1995).

Para a determinação simultânea de cloridrato de efedrina, teofilina, cloridrato de papaverina e cloridrato de hidroxizina foi usada a CLAE nas seguintes condições: fase móvel: acetonitrila: água (5:95 v/v), pH 2,4 $\pm$ 0,1 ajustado com ácido orto - fosfórico, vazão de 1,5 mL/min, coluna Nucleosil C₁₈ (150 X 4,6 mm ,5 μ m), sistema gradiente e detecção a 220 nm (BOBERIC, D.B.;RADULOVIC',D.; IVANOVIC',D.; RISTIC',P., 1999.)

Na determinação de alguns alcalóides através de mistura de solventes orgânicos-aquosos analisados por CLAE foram seguidos os parâmetros: detector UV a 254 nm, coluna Lichrosorb Si 60(100 X 4 mm,10 μ m), fase móvel: mistura de tampão fosfato (ácido fosfórico com hidróxido de sódio 5 M, com concentração final de 0,2 M) (GOLKIEWICZ, W.; KUCZYNSKI, J.; MARKOWSKI, W.; JUSIAK, L., 1994).

Na Farmacopéia Britânica 2002 consta como método de análise para um medicamento chamado Papaveretum injetável, que contém uma mistura de

papaverina, morfina e codeína, a CLAE, usando-se coluna 10 cm X 4,6 mm, vazão de 2 mL/min, fase móvel: acetato de sódio 0,01 M e sulfossuccinato dioctilsódico 0,005 M em metanol 60%, ajustado ao pH 5,5 com ácido acético glacial ou NaOH 2 M, detecção UV a 285 nm (BRITSH, 2002).

Determinou-se a papaverina em plasma e urina por CLAE através dos parâmetros: coluna fase-reversa C₈ (25 cm X 4.6 mm, 10 µm); detector UV-Vis a 239 nm; fase móvel: metanol: borato de sódio 0,015 M pH 8,5 (58:42) ; vazão: 2,7 mL/min e laudosina como padrão interno (GAUTAM, S.R.; NAHUM, A.; BAECHLER, J. BOURNE, D.W.A., 1980).

A CLAE foi utilizada na determinação de papaverina em amostra de sangue total através de cromatógrafo (injetor com loop de 100 µL), coluna Micropak CN – 10 (30 mm X 4 mm, 10 µm) a 30 °C , fase móvel: n- hexano – diclorometano – acetonitrila – propilamina(50: 25 :25: 0,1) com detector UV a 254 nm, vazão de 2 mL/min. A amostra foi submetida à uma extração por mistura de clorofórmio e n-hexano(2:3) (HOOGEWIJS,G.; MICHOTTE, Y.; LAMBRECHT, J.; MASSART, D.L., 1981).

AYYANGAR, N.R. e Bhide, S.R. desenvolveram uma metodologia de separação de oito alcalóides e do ácido mecônico e quantificação de cinco principais alcalóides, dentre eles a papaverina por CLAE, através de coluna Bondapack Phenyl (30 cm X 3.9 mm, 10 µm), para as corridas preliminares e coluna MN – Nucleosil 7 C₆H₅ (25 cm X 4,0 mm, 7 µm) e pré-coluna Resolve CN(10 µm) para a quantificação, fase móvel : metanol : água (5:95), sistema gradiente; vazão: 1,5 mL/min e detecção UV a 280 nm (AYYANGAR, N.R. ; Bhide, S.R., 1988).

Para uma separação de morfina, codeína, noscapina e papaverina foi usada a cromatografia de fase reversa com pareamento iônico, com os seguintes parâmetros: coluna µBondapack C₁₈ (300 X 4 mm); eluente ou fase móvel: metanol: água (35: 65) com variação de proporção de tampão fosfato 0, 050 M e ácido camulfônico, variando-se o pH entre 2,3 e 4, vazão de 1,5 mL/min e detecção a 254 nm (LINDBERG, W.; JOHANSSON, E.; JOHANSSON, K., 1981).

Para a otimização e validação de metodologia analítica para a determinação de alcalóides (sendo a papaverina, um deles) com a finalidade de acrescentar a metodologia em compêndios de avaliação de qualidade, utilizou-se a CLAE. Foram preparadas soluções de papaverina em etanol 96 %, como fase móvel foi utilizada tampão fosfato pH: 3/ metanol (65:35) + ácido-pentanossulfônico de sódio a 0,005 M, vazão: 1,5 mL/ min, detecção UV 254 nm e coluna C₁₈ (250 X 4mm) aço inoxidável (BUDVARI-BARANY, Z.; SZÁSZ, G.; GYIMESI-FORRÁS, K., 1997).

MAURICH, V. e MONEGHINI, M. desenvolveram uma metodologia por CLAE para a separação de papaverina e seus produtos de degradação, utilizando coluna Lichrosorb RP 18, 10 µm; fase móvel: acetonitrila: metanol: água (470:340:190), ácido acético 0,5 mL /L e dodecilsulfonato sódico puro, vazão de 2,5 mL/min e detecção no UV a 238 nm (MAURICH, V. e MONEGHINI, M., 1983).

Através da CLAE fez-se a determinação simultânea de metilbrometo de homatropina e a mistura de cinco alcalóides, dentre eles o cloridrato de papaverina, os parâmetros seguidos foram: coluna Nucleosil C₈ (120 X 4,65 mm); fase móvel: tampão fosfato 0,01 M(pH 5,0):40% de acetonitrila, vazão de 1mL/min e detecção a 220 nm. A cromatografia gasosa também foi utilizada nesta pesquisa (MAJLAT, P.; HELBOE, P.; KRISTENSEN, A.K., 1981).

EL-GINDY, A. comparou duas metodologias para a determinação simultânea de cloridrato de papaverina, diprofilina e fenobarbital, a CLAE e a espectrofotometria UV com aplicação de calibração multivariada. A CLAE foi padronizada e validada com os parâmetros: coluna HALSIL 100 C- 18 (250 x 4,6 mm, 5 µm); fase móvel: fosfato de potássio 0,02M, pH ajustado com ácido fosfórico e acetonitrila na proporção 55:45 v/v; vazão de 1,5 mL/min e detecção UV a 210 nm. No método espectrofotométrico foram aplicados aos dados os métodos PLS (mínimos quadrados parciais) e PCR (análise do componente principal), a faixa de leitura dos espectros foi de 215 a 245 nm, com intervalo de 0,2 nm, utilizando-se 23 soluções para a construção do modelo de calibração. Os métodos propostos mostraram concordância quando comparados (EL-GINDY, A., 2005).

2.3.1.2 Outras metodologias utilizadas para a determinação analítica de cloridrato de papaverina

O cloridrato de papaverina foi analisado por espectrofotometria juntamente com o cloridrato de meclocina em formulações farmacêuticas. Primeiramente fez a extração dos fármacos através de clorofórmio e diclorometano e reações com produtos fenilazólicos, produzindo compostos coloridos. Fizeram-se leituras de absorbância a 524 e 536 nm para meclocina e 528 e 540 nm para papaverina. (ABDEL-GHANI, N.T.; SHOUKRY, A.F.; ISSA, Y.M.; WAHDAN, O.A., 2002).

A cromatografia em camada delgada foi usada para a determinação e separação da papaverina e seus produtos de oxidação, usando-se placa com espessura de 0,25 mm coberta por gel de sílica fluorescente (20 X 20 X 0,3cm), visualização em UV 254 nm ou com spray de reagente Dragendorff. A papaverina foi dissolvida em 1 mL de ácido acético glacial e 2mL de ácido clorídrico. (HABASHY, G.M.; FARID, N.A., 1973).

Pelo método potenciométrico pôde-se determinar o cloridrato de papaverina, utilizando-se célula potenciométrica, pH mantido a 5,3 com tampão acetato 0,01 M. Nesta pesquisa sugere-se a aplicação deste método para a análise de papaverina em presença de novacaína, dipirona, ácido acetil salicílico e outros fármacos em associação. (SHETEROVA, I.P.; KARIBYAN, E.E.; TURAEVA, S.S.; PENZINA, M.M., 1995).

Para a detecção de baixas concentrações de papaverina usou-se a espectrometria de massa com ionização de fissão de fragmentos, em amostras de fluidos biológicos. (CHIVANOV, V.D.; EREMENKO, I.A.; AKSENOV, S.A.; GREBENIK, L.I. EREMENKO, V.I.; KALINICHENKO, T.G.; TATARINOVA, V.I.; ZDOIMA, N.G.; SKLYAROVA, Z.V., KURAEV, V.V.; KNYSH, A.N.; MISHNEV, A.K., 1997).

A eletroforese capilar foi utilizada para a análise de uma mistura de morfina, codeína, normorfina, tebaína, noscapina e papaverina, nas seguintes condições:

capilar 55,5 cm X 50µm, detecção a 214 e 254 nm, tendo como meio eletroforético acetato de amônio 25 mM – ácido acético 1M em acetonitrila, metanol, formamida ou N-metilformamida. (BJORNSDOTTIR, I.; HANSEN, S.H., 1995).

Foram analisadas soluções contendo papaverina para investigar seus produtos de degradação e oxidação através de degradação fotoquímica. Tanto a papaverina quanto seus produtos de degradação e oxidação foram determinados por espectroscopia Raman, Ressonância Magnética Nuclear e os resultados comparados com a CLAE. (GIRRESER, U.; HERMANN, T.W.; PIOTROWSKA, K. 2003).

Mirzeva et. al. determinaram a papaverina e dimedrol em formulações farmacêuticas foi utilizada uma extração com um azo reagente, e em seguida o composto colorido formado pela papaverina e pelo sulfonazo foram detectados por fotometria a 580nm. (MIRZAEVA, K.A.; AKHMEDOVA, M.S.; RAMAZANOV, A.S.; AKHMEDOV, S.A., 2004).

A Farmacopéia Brasileira preconiza a titulação em meio não aquoso, como método de doseamento para o cloridrato de papaverina (FARMACOPEIA, 1977) e a Farmacopéia Britânica tem a potenciometria como método de doseamento. (BRITISH, 2002).

2.4 Espectrofotometria no Ultravioleta e Visível (UV/VIS)

A Espectrofotometria, também pode ser chamada de espectroscopia eletrônica molecular ou espectrometria de absorção molecular abrange a região de comprimento de onda de 160 a 780 nm. Medidas de absorção da radiação ultravioleta e visível têm ampla aplicação na determinação quantitativa de uma grande variedade de espécies inorgânicas e orgânicas. (SKOOG, D.A.; HOLLER, F.J.; NIEMAN, T.A., 2002).

A variação da cor de um sistema com a mudança da concentração de um componente é a base da análise colorimétrica. A cor é, usualmente, devido à

formação de um composto colorido pela adição de um reagente apropriado ou é inerente ao constituinte que se deseja analisar. A intensidade da cor é comparada com a intensidade da cor que se obtém com o mesmo procedimento pelo tratamento de uma amostra cuja quantidade e concentração são conhecidas. Na análise espectrofotométrica usa-se uma fonte de radiação que alcança a região ultravioleta do espectro. Para isso, escolhe-se comprimentos de onda bem definidos e com largura de banda de menos de um nanômetro (VOGEL, 2002).

Um espectrofotômetro óptico é um instrumento que possui um sistema óptico que dispersa a radiação eletromagnética incidente e permite a medida da quantidade de radiação transmitida em determinados comprimentos de onda selecionados da faixa espectral. Um fotômetro é um equipamento que mede a intensidade da radiação transmitida ou uma função desta quantidade. Quando combinado em um espectrofotômetro, o espectrômetro e o fotômetro produzem sinal que corresponde à diferença entre a radiação transmitida por um material de referência e a radiação transmitida por uma amostra em comprimentos de onda selecionados. A vantagem principal dos métodos colorimétrico e espectrofotométrico é que eles são uma maneira simples de determinar quantidades muito pequenas de substâncias. A seletividade da técnica espectrofotométrica pode ser aumentada com a espectrofotometria derivada. (VOGEL, 2002).

A espectroscopia de absorção molecular está baseada na medida da transmitância T ou absorbância A de soluções contidas em células transparentes tendo um caminho óptico de b cm. De forma comum, a concentração c de um analito absorvente está relacionada linearmente à absorbância, conforme representado pela equação:

$$A = -\log T = \log \frac{P_o}{P} = \epsilon bc \quad (1)$$

Sendo: - P , P_o - potência de radiação ou intensidade de radiação I , I_o ;

- a – absorptividade = $\frac{A}{bc}$ ou coeficiente de extinção, k ; c pode ser expresso em g/L ou em outras unidades de concentração; b pode ser expresso em cm ou em outras unidades de comprimento;

ε = absorptividade molar = $\frac{A}{bc}$ ou coeficiente molar de extinção, c está expresso em mol/L; b está expresso em cm.

A equação (1) é uma representação matemática da lei de Beer. Normalmente, a transmitância e a absorbância não podem ser medidas em laboratório porque a solução do analito precisa estar contida em um recipiente transparente, ou célula (também chamada de cubeta). Ocorre reflexão nas duas interfaces parede/solução. A atenuação resultante do feixe de luz é substancial, além disso, pode ocorrer atenuação de um feixe de luz por espalhamento por moléculas grandes e, às vezes, por absorção pelas paredes do recipiente. Para compensar esses efeitos, a potência do feixe transmitido pela solução do analito é comparada com a potência do feixe transmitido por uma célula idêntica contendo apenas o solvente. A transmitância e a absorbância experimentais que se aproximam muito das verdadeiras são obtidas através das equações (SKOOG, D.A.; HOLLER, F.J.; NIEMAN, T.A., 2002):

$$T = \frac{P_{\text{solução}}}{P_{\text{solvente}}} = \frac{P}{P_o} \quad (2)$$

$$A = \log \frac{P_{\text{solvente}}}{P_{\text{solução}}} = \log \frac{P_o}{P} \quad (3)$$

- Desvios da Lei de Beer

A lei de Beer é geralmente válida em uma faixa de concentrações razoavelmente elevada, se a estrutura do íon colorido ou do não-eletrólito colorido em solução não mudar com a concentração. Pequenas quantidades de eletrólitos que não reagem quimicamente com os componentes coloridos normalmente não afetam a absorção da luz. Grandes quantidades de eletrólitos podem deslocar a posição do máximo de absorção e, também, mudar a absortividade molar. Encontram-se discrepâncias, usualmente, quando o soluto colorido se ioniza, se dissocia ou se associa em solução, porque, neste caso, a natureza da espécie que absorve varia com a concentração. A lei de Beer não é válida quando o soluto forma complexos cuja composição depende da concentração. Podem ocorrer discrepâncias quando a luz utilizada não é monocromática. É sempre possível testar o comportamento de uma substância fazendo-se o gráfico $\log(P_0/P_t)$, sendo P_t potência da luz transmitida) ou $\log(I_0/I_t)$ sendo I_t intensidade de luz transmitida), contra a concentração. Uma linha reta que passa pela origem indica que a lei de Beer está sendo obedecida(VOGEL, 2002).

Um dos principais usos da espectrofotometria no UV/VIS refere-se a medições quantitativas. Uma concentração desconhecida de um composto conhecido, quando se adapta a lei de Beer, pode ser determinada. As amostras para a absorção UV podem ser examinadas na forma de vapor ou de uma solução. Solventes apolares e polares podem ser empregados para preparar uma amostra analítica. Um diagrama simplificado de um espectrofotômetro UV/VIS está apresentado na Figura 3.

Figura 3 – Espectrofotômetro clássico UV-VIS com seus respectivos componentes.

Os avanços na tecnologia levaram ao desenvolvimento e a implementação de detectores de fotodiodo, os quais, quando colocados em grupos lineares intimamente espaçados, oferecem a análise rápida e exata do espectro. A principal vantagem dos detectores de feixe linear é que eles permitem a análise simultânea de todo um espectro no período de alguns segundos. Isso é vantajoso quando se realizam estudos cinéticos envolvendo elementos rapidamente mutáveis (ABDOU, H.; HANNA, S.; MUHAMMAD, N. 2004).

2.5 Cromatografia líquida de alta eficiência - CLAE

A CLAE também é conhecida por cromatografia líquida de alto desempenho, cromatografia líquida de alta performance, cromatografia líquida de alta pressão e mais comumente HPLC de High Performance Liquid Chromatography (CIOLA, 1998). A cromatografia é um método físico-químico de separação. Ela está fundamentada na migração diferencial dos componentes de uma mistura, que ocorre devido a diferentes interações entre duas fases imiscíveis, a fase móvel e a fase estacionária. A grande variedade de combinações entre as fases móveis e estacionárias torna-a uma técnica extremamente versátil e de grande aplicação.

A separação cromatográfica baseia-se na migração diferencial dos componentes de uma mistura, que ocorre devido às diferentes interações entre duas fases imiscíveis, a fase móvel e a fase estacionária, e no alargamento de bandas,

que é dependente de processos físicos e não da diferença de equilíbrio. A migração diferencial resulta da diferença de equilíbrio dos analitos entre as duas fases imiscíveis e é determinada pelos fatores que afetam este equilíbrio: composição da fase móvel, composição da fase estacionária e temperatura da separação. Mudanças em um ou mais destes parâmetros levam a alterações na migração diferencial.

2.5.1 Instrumentação para a CLAE

A instrumentação necessária para a CLAE é extremamente sofisticada, muito diferente das utilizadas pela Cromatografia Clássica. A Figura 4 mostra os componentes fundamentais de um equipamento para CLAE.

Atualmente, existem equipamentos totalmente computadorizados. São divididos em módulos, que podem ser controlados individualmente ou por computador. Os softwares disponíveis são capazes de detectar problemas de funcionamento e também a necessidade de troca de alguma peça.

Figura 4 – Esquema básico de um equipamento para CLAE

O desenvolvimento de colunas com fases estacionárias preparadas com partículas de menor diâmetro, as quais ofereciam maior resistência à passagem de fase móvel, tornou necessária a utilização de sistemas de bombeamento mais eficientes.

- Bombas - Uma bomba para CLAE precisa ser capaz de reproduzir fluxo constante e reprodutível, sem pulsos, nas altas pressões necessárias, e ser resistente às fases móveis utilizadas.
- Injetores – Para a introdução da amostra eram utilizadas microsseringas. Atualmente, são utilizados injetores de válvula. A alça de amostragem (loop) de tais válvulas pode ser externa ou interna. As alças externas nada mais são que tubulações de volume preciso, as quais podem ser trocadas para que se permita a injeção de diferentes volumes de amostra. Estas válvulas possuem duas posições. Na posição LOAD, a amostra é injetada na alça de amostragem com uma seringa de ponta rombuda, sendo o excesso imediatamente descartado. A posição INJECT abre a válvula para que a fase móvel empurre a amostra para a coluna.
- Detectores – a função destes equipamentos é a detecção dos compostos vindos do eluente da coluna. São de vários tipos:
 - a) UV-Visível – é o detector mais usado em CLAE; seu princípio é absorção de luz ultravioleta ou visível, por parte da amostra, quando nela passa radiação eletromagnética;
 - b) Fluorescência – é um detector para moléculas que fluorescem;
 - c) Índice de refração: mede a diferença no índice de refração da fase móvel e do eluente vindo da coluna; é muito utilizado em análises de amostras que não absorvem no UV e não fluorescem e em cromatografia preparativa;

d) Infravermelho – seu princípio a absorção de luz infravermelha por parte da amostra, quando nela passa radiação eletromagnética, detecção pouco utilizada;

e) Polarímetro e dicroísmo circular: medem o efeito da luz plana ou circularmente polarizada sobre compostos opticamente ativos, são equipamentos seletivos, específicos para a detecção de compostos quirais;

f) Eletroquímicos: baseiam-se em interações eletroquímicas úteis à detecção do analito por CLAE, são seletivos para solutos iônicos, oxidáveis ou redutíveis, e apresentam alta sensibilidade e baixos limites de detecção; g) Espalhamento de luz: seu princípio envolve a nebulização do eluente vindo da coluna em um aerossol, seguido de vaporização do solvente para produzir pequenas partículas que serão detectadas em uma cela de espalhamento de luz, detector não – seletivo e destrutivo;

h) Espectrometria de massas: é um detector universal, embora destrutivo, que apresenta alta sensibilidade, fornece a massa molecular dos solutos e permite a elucidação estrutural destes;

i) Ressonância magnética nuclear: combina o poder de separação da CLAE às informações estruturais obtidas pela RMN, não é de uso rotineiro, devido à dificuldade encontrada e sua hibridização à CLAE (CASS, Q.B.; DEGANI, A.L.G., 2001).

- Colunas: a separação cromatográfica é efetuada dentro das colunas cromatográficas. Os tubos das colunas são cheios com a fase estacionária conveniente, geralmente sílica ou seus derivados (CIOLA, R., 1998).

2.5.2 Modos de separação por CLAE

A classificação da cromatografia líquida de acordo com a fase estacionária levou a uma grande variedade de tipos. A primeira grande divisão feita foi:

cromatografia de adsorção e cromatografia de partição, referindo-se às fases estacionárias sólida e líquida, respectivamente.

No caso das fases estacionárias serem líquidas, estas podem estar simplesmente adsorvidas sobre um suporte sólido ou imobilizadas sobre ele. No primeiro caso, a cromatografia é referida como cromatografia de partição. A cromatografia de partição perdeu espaço para a cromatografia de fases quimicamente ligadas, devido à maior estabilidade conferida por estas quando comparadas com as fases líquidas adsorvidas. Estas fases com suportes modificados são consideradas à parte por diferirem dos outros modos em seu mecanismo de separação.

O grande desenvolvimento conseguido a partir das fases líquidas quimicamente ligadas fez com que estas sejam majoritariamente usadas em CLAE analítica.

A separação de uma mistura por CLAE se dá por uma ou mais interações entre o soluto, a fase estacionária e a fase móvel, as quais podem ser pontes de hidrogênio, interações eletrostáticas e hidrofóbicas ou forças de Van der Waals, entre outras. Os modos de separação podem ser classificados de acordo com a natureza destas interações. São eles: cromatografia em fase reversa, em fase normal, por pareamento de íons ou por troca iônica e por exclusão.

2.5.2.1 Cromatografia em fase normal

A fase estacionária é mais polar que a fase móvel; o oposto ocorre em cromatografia no modo reverso. Os solventes usados são normalmente uma mistura de solventes orgânicos sem a adição de água.

Os modelos de retenção interação-solvente e competição-solvente têm sido usados para descrever o efeito da fase móvel em cromatografia líquida no modo normal.

Embora moléculas iônicas ou ionizáveis possam ser separadas por cromatografia no modo normal, a aplicação majoritária tem sido para moléculas neutras. As moléculas hidrofóbicas (menos polares) são eluídas primeiro, enquanto as moléculas hidrofílicas (mais polares) são mais retidas.

2.5.2.2 Cromatografia em fase reversa

A fase móvel é mais polar do que a fase estacionária. A cromatografia em fase reversa é a mais utilizada em CLAE, pois permite a separação de uma grande quantidade de solutos e o uso de fases móveis aquosas. A fase móvel mais comumente utilizada é uma mistura de acetonitrila/água, sendo a acetonitrila, quando necessário, substituída pelo metanol ou tetraidrofurano (THF). O uso de apenas esses três solventes deve-se à pequena quantidade de solventes orgânicos miscíveis em água.

A separação em fase reversa se deve principalmente a interações entre a parte não-polar do soluto e a fase estacionária, isto é, à repulsão desta parte do soluto pela fase móvel aquosa.

2.5.2.3 Cromatografia de compostos iônicos

A separação de compostos ionizáveis pode ser conseguida por supressão da ionização ou, então, por completa ionização e separação por pareamento de íons ou por troca iônica.

Em cromatografia de fase reversa, a retenção diminui para compostos mais hidrofílicos, assim, quando um ácido ou uma base são ionizados, eles se tornam menos hidrofóbicos e, conseqüentemente, a retenção é reduzida. Com o aumento do pH, a retenção para ácidos diminui e para bases aumenta.

Quando o pH é igual ao pK_a de um composto, este se encontra parcialmente ionizado. Todas as mudanças de retenção ocorrem dentro de uma faixa de $\pm$

1,5(CASS, Q.B.; DEGANI, A.L.G., 2001) ou 2,00 unidades de pK_a (CIOLA, R., 1998). Fora desta faixa, o composto ou está ionizado ou está não ionizado, e a retenção não muda muito.

Ácidos e bases fortes não podem ser separados por pareamento iônico de íons porque permanecem iônicos na faixa de pH de 2 a 8, ou às vezes maior. Se a forma ativa for a não dissociada, então será possível de se analisar por cromatografia em fase reversa. Se ela for iônica, não será possível a não ser que sua carga seja modificada por algum processo. A técnica que permite a eliminação da forma dissociada é chamada de supressão iônica e só pode ser empregada com ácidos ou bases fracas (CIOLA, R., 1998), devido a maior facilidade deve ser escolhida como primeira alternativa a supressão iônica e eluição no modo reverso. A adição de um par iônico deve ser considerada quando a primeira alternativa falhar (CASS, Q.B.; DEGANI, A.L.G., 2001).

Numa separação perfeita os compostos são retidos e particionados por um único mecanismo de retenção. Em fases reversas os solutos reagem hidrofobicamente com as cadeias alquílicas do empacotamento. Nas colunas de fase reversa a presença de grupos silanóis residuais pode chegar a 20,0% e com isso acarretar fortes interações com o soluto. Como resultado, terá a formação de caudas levando a assimetria dos picos. Este efeito pode ser eliminado introduzindo, na fase móvel, compostos que competem fortemente com as hidroxilas ácidas dos grupos silanóis. Pequenas concentrações de aminas, por exemplo, a trietilamina são eficientes. (CIOLA, R., 1998).

2.5.2.4 Cromatografia de troca iônica

É o método de escolha para análise de íons inorgânicos e, às vezes, é o preferido para a análise de pequenos íons orgânicos. A retenção em troca iônica se dá por atração eletrostática entre íons na fase móvel e os íons de carga oposta na fase estacionária. As fases estacionárias são referidas como resinas trocadoras de íons e são classificadas em aniônicas e catiônicas. As aniônicas fortes têm usualmente um íon amônio quaternário imobilizado, enquanto a catiônica forte tem

um ácido sulfônico, sendo ionizados na faixa completa e pH. As resinas aniônicas fracas apresentam aminas imobilizadas, enquanto as catiônicas fracas têm ácidos carboxílicos.

As resinas catiônicas são usadas para separação de cátions como bases protonadas, enquanto as aniônicas são usadas para a separação de ânions ou solutos ácidos.

2.5.2.5 Cromatografia de exclusão

É usada especialmente para: separação preliminar de amostras complexas visando isolar ou purificar polímeros, na análise de polímeros para observar a presença de dímeros, trímeros, etc. ou para estimar o peso molecular de polímeros sintéticos ou naturais. A separação por exclusão requer que o tamanho do poro da fase estacionária seja adequadamente selecionado de acordo com o tamanho das moléculas que se pretende separar. As moléculas pequenas devem penetrar nos poros, enquanto as moléculas grandes devem ser excluídas de todos os poros da fase estacionária. As de tamanho intermediário serão só parcialmente excluídas.

2.6 Métodos de calibração multivariada (UNICAMP, 2005)

A calibração multivariada tem como princípio básico a utilização simultânea de muitas variáveis independentes $x_1, x_2, \dots, x_n$ (ex: valores de absorvância a vários comprimentos de onda), para quantificar alguma variável dependente y (ex: concentração). A seguir, são apresentados os principais métodos de calibração multivariada.

Regressão Linear Múltipla (RLM)

O método mais simples de calibração multivariada é a RLM. Na RLM, a variável a ser prevista para várias amostras (vetor y) é estimada por uma combinação linear das variáveis independentes contidas na matriz X ,

$$y = Xb \quad \text{ou} \quad y = b_1x_1 + b_2x_2 + \dots + b_nx_n$$

onde b é o vetor com os coeficientes de regressão. A solução por mínimos quadrados é: $b = (X'X)^{-1}X'y$. A RLM é o melhor método de calibração para sistemas bem comportados (respostas lineares, sem interferentes, sem interações entre analitos, com baixo ruído e nenhuma colinearidade). Entretanto, a sua limitação está no fato de ela usar toda a informação contida na matriz X , não importando se é relevante ou não, para construir o modelo. Com isso, quantidade significativa de variância (informação) irrelevante é incorporada e o modelo se torna pouco robusto, isto é, com pouca habilidade para prever novas amostras. Outro problema está na etapa de inversão da matriz $(X'X)$. Se a matriz X contiver menos linhas que colunas (menos amostras que variáveis), ela não poderá ser invertida e a solução não existirá. Portanto, são necessárias mais amostras do que variáveis. Uma das maneiras de contornar as limitações da RLM é utilizar previamente algum método de seleção das variáveis.

Regressão em Componentes Principais (PCR)

A PCR, do inglês “principal components regression”, é um método que fornece uma maneira de superar as limitações da RLM. A regressão, ao invés de ser feita nas variáveis originais, é feita nos escores obtidos em uma PCA. Após a decomposição da matriz X , a matriz de escores obtida, T , é usada na determinação dos coeficientes de regressão, que por sua vez serão usados na previsão das novas amostras;

$$y = Tb + E$$

onde b contém os coeficientes de regressão e y os valores da variável dependente. A solução é dada por $b = (T'T)^{-1}T'y$.

Mínimos Quadrados Parciais (PLS)

O PLS, do inglês “partial least squares”, é o método mais usado em calibração multivariada e difere da PCR por usar a informação de y no cálculo das chamadas variáveis latentes (equivalentes as CPs na PCA). As matrizes X e Y são decompostas simultaneamente em uma soma de h variáveis latentes, como nas equações a seguir:

$$X = TP' + E = \sum t_h p'_h + E$$

$$Y = UQ' + F = \sum u_h q'_h + F$$

onde T e U são as matrizes de escores das matrizes X e Y , respectivamente; P e Q são as matrizes dos pesos das matrizes X e Y , respectivamente; e E e F são os resíduos. A correlação entre os dois blocos X e Y é simplesmente uma relação linear obtida pelo coeficiente de regressão linear, tal como descrito abaixo,

$$u_h = b_h t_h$$

para h variáveis latentes, sendo que os valores de b_h são agrupados na matriz diagonal B , que contém os coeficientes de regressão entre a matriz de escores U de Y e a matriz de escores T de X . A melhor relação linear possível entre os escores desses dois blocos é obtida através de pequenas rotações das variáveis latentes dos blocos de X e Y .

A matriz Y pode ser calculada de u_h ,

$$Y = TBQ' + F$$

e a concentração de novas amostras prevista a partir dos novos escores, T^* , substituídos na Equação anterior.

$$Y = T \cdot BQ'$$

Nesse processo, é necessário achar o melhor número de variáveis latentes, o que normalmente é feito usando um procedimento chamado validação cruzada (“cross validation”), no qual o erro mínimo de previsão é determinado. Deve ser mencionada ainda, a diferenciação entre PLS1, em que a regressão é feita para uma variável dependente de cada vez (a matriz Y é um vetor coluna), e PLS2, onde todas as variáveis dependentes são calculadas simultaneamente.

2.7 Quimiometria (UNICAMP, 2005)

A quimiometria é uma área que se refere à aplicação de métodos estatísticos e matemáticos, assim como aqueles baseados em lógica matemática, a problemas de origem química.

Com a sofisticação crescente das técnicas instrumentais, impulsionada pela invasão de microprocessadores e microcomputadores no laboratório químico, tornaram-se necessários tratamentos de dados mais complexos do ponto de vista matemático e estatístico, a fim de relacionar os sinais obtidos (intensidades, por exemplo) com os resultados desejados (concentrações).

As análises quantitativas que eram realizadas na maioria das vezes por “via úmida” como titulação, precipitação e reações específicas, que são demoradas e muitas vezes pouco precisas, estão cada vez mais sendo substituídas por técnicas instrumentais como: Ressonância Magnética Nuclear, Espectroscopia no Infravermelho, Espectroscopia no visível/ultravioleta, Espectroscopia de Massa, Cromatografia, Polarografia, Análise por Injeção em Fluxo, etc., que aliam a velocidade de análise com uma boa qualidade de resultados. Nessas técnicas instrumentais não é obtida uma informação direta do resultado, mas sim uma grande quantidade de sinais (curvas, picos) que podem ser tratados para uma possível quantificação das várias espécies presentes.

Muita ênfase tem sido dada aos sistemas multivariados, nos quais se pode medir muitas variáveis simultaneamente, ao se analisar uma amostra qualquer. Nesses sistemas, a conversão da resposta instrumental no dado químico de interesse, requer a utilização de técnicas de estatística multivariada, álgebra matricial e análise numérica. Essas técnicas se constituem no momento na melhor alternativa para a interpretação de dados e para a aquisição do máximo de informação sobre o sistema.

De todos os ramos da química clássica, talvez a química analítica tenha sido a mais afetada pelo desenvolvimento recente da instrumentação química associada a computadores. De fato, a “Chemometrics Society”, organização internacional dedicada ao uso e desenvolvimento de métodos em quimiometria, é composta principalmente por químicos interessados em problemas analíticos. Atualmente é muito raro se encontrar qualquer periódico respeitável sobre pesquisas em química analítica, que não traga artigos reportando dados obtidos com o auxílio de microcomputadores, ou tratados por matemática multivariada ou métodos estatísticos, sempre com o objetivo de melhorar a qualidade dos resultados ou facilitar a sua interpretação.

2.8 Validação de métodos analíticos

A necessidade de se mostrar a qualidade de medições químicas, através de sua comparabilidade, rastreabilidade e confiabilidade, está sendo cada vez mais reconhecida e exigida. Dados analíticos não confiáveis podem conduzir a decisões desastrosas e a prejuízos financeiros irreparáveis. Para garantir que um novo método analítico gere informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra, ele deve sofrer uma avaliação denominada validação. A validação de um método é um processo contínuo que começa no planejamento da estratégia analítica e continua ao longo de todo o seu desenvolvimento e transferência. Para registro de novos produtos, todos os órgãos reguladores do Brasil e de outros países exigem a validação de metodologia analítica e, para isso, a maioria deles tem estabelecido documentos oficiais que são diretrizes a serem adotadas no processo de validação.

Há várias definições para a validação, como por exemplo: - a validação deve garantir, através de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados, definição da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) que desde 29 de maio de 2003, preconiza a Resolução 899 para os testes de validação;

- Validação é o processo de definir uma exigência analítica e confirmar que o método sob investigação tem capacidade de desempenho consistente com o que a aplicação requer – é o que define o Eurachem Working Group;

- Confirmação por testes e apresentação de evidências objetivas de que determinados requisitos são preenchidos para um dado uso internacional, conceito dado pela ISSO/IEC 17025;

- Para a Farmacopéia Americana: A validação assegura a credibilidade dos métodos analíticos durante o uso rotineiro, sendo algumas vezes mencionado como o “processo que fornece uma evidência documentada de que o método realiza aquilo para o qual é indicado para fazer”;

- A Organização Mundial de Saúde diz que validação é “Avaliação sistemática de um procedimento analítico para demonstrar que está sob as condições nas quais deve ser aplicado”. (RIBANI, M. et al.,2004).

Os parâmetros analíticos normalmente encontrados para validação de métodos são: seletividade, linearidade e faixa de aplicação, precisão, exatidão, limite de detecção, limite de quantificação e robustez.

Estes termos são conhecidos como parâmetros de desempenho analítico, características de desempenho e, algumas vezes, como figuras de mérito.

- Seletividade ou especificidade

A seletividade de um método instrumental é a capacidade de avaliar, de forma inequívoca, as substâncias em exame na presença de componentes que podem interferir com a sua determinação em uma amostra complexa. Se a seletividade não for assegurada, a linearidade, a exatidão e a precisão estarão seriamente comprometidas.

- Linearidade

A linearidade corresponde à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em exame, dentro de uma determinada faixa de aplicação.

A correlação entre o sinal medido e a massa ou concentração da espécie a ser quantificada muito raramente é conhecida *a priori*. Na maior parte dos casos, a relação matemática entre o sinal e a concentração ou massa da espécie de interesse deve ser determinada empiricamente, a partir de sinais medidos para massas ou concentrações conhecidas dessa espécie. Essa relação matemática, muitas vezes, pode ser expressa como uma equação de reta chamada de curva analítica.

- Precisão

Representa a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, sobre condições definidas. A precisão é avaliada pelo desvio padrão absoluto (σ), que utiliza um número significativo de medições, normalmente maior que 20. Na prática, em validação de métodos, o número de determinações é geralmente pequeno e o que se calcula é a estimativa do desvio padrão absoluto (s).

$$s = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$

$\bar{x}$ é a média aritmética de um pequeno número de medições (média das determinações), sendo uma estimativa de μ a média verdadeira (média da população); x_i é o valor individual de uma medição e n é o número de medições.

A precisão também pode ser expressa através do intervalo de uma confiança da média que é uma faixa de valores no qual existe uma determinada probabilidade de se encontrar um certo valor de uma variável, calculada pela equação:

$$\text{Intervalo de confiança da média} = \bar{x} \pm t_{n-1} \frac{s}{\sqrt{n}}$$

em que: t_{n-1} = valor crítico da distribuição de Student com $n-1$ graus de liberdade. O valor t é tabelado e apresenta valores para diferentes níveis de confiança.

Outra expressão da precisão é através da estimativa do desvio padrão relativo (DPR) ou (RSD), também conhecido como coeficiente de variação (CV) ou DPR% ou RSD%.

$$\text{RSD (\%)} \text{ ou } \text{CV(\%)} = \frac{s}{\bar{x}} \times 100$$

Normalmente, métodos que quantificam compostos em macro quantidades requerem um RSD ou DPR de 1 a 2%. Em métodos de análise de traços ou impurezas, são aceitos RSD ou DPR de até 20%, dependendo da complexidade da amostra. Uma maneira simples de melhorar a precisão é aumentar o número de replicatas.

A precisão em validação de métodos é considerada em três níveis diferentes: repetitividade; precisão intermediária; reprodutibilidade.

Repetitividade: representa a concordância de resultados de medições sucessivas de um mesmo método, efetuadas sob as mesmas condições de medições: mesmo procedimento; mesmo analista; mesmo instrumento usado sob as mesmas condições; mesmo local; repetições em um curto intervalo de tempo.

Precisão intermediária: é reconhecida como a mais representativa da variabilidade dos resultados em um único laboratório e, como tal, mais aconselhável de ser adotada. O objetivo da validação da precisão intermediária é verificar que no mesmo laboratório o método fornecerá os mesmos resultados.

Reprodutibilidade: é o grau de concordância entre os resultados das medições de uma mesma amostra, efetuadas sob condições variadas (mudanças de operador, local, equipamento, etc.). A reprodutibilidade refere-se aos resultados dos estudos de colaboração entre laboratórios e deve ser considerada em situações como a padronização de procedimentos analíticos a serem incluídos, por exemplo, em farmacopéias, procedimentos do CODEX, etc.

- **Exatidão**

Representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e um valor de referência aceito como verdadeiro. É importante observar que um valor exato ou verdadeiro é o valor obtido por uma medição perfeita e este valor é indeterminado por natureza. (RIBANI, M. et al., 2004).

O teste de recuperação é efetuado para comprovar a exatidão do método proposto. O procedimento usual consiste em adicionar à amostra quantidades conhecidas da substância padrão em estudo, empregando-se em seguida, o método proposto para análise e verificando-se o percentual recuperado.

- Limite de detecção

Representa a mais baixa concentração da substância em exame que pode ser detectada com um certo limite de confiabilidade utilizando um determinado procedimento experimental.

- Limite de quantificação

Representa a mais baixa concentração da substância em exame que pode ser determinada de forma quantitativa com precisão e exatidão aceitáveis utilizando um determinado procedimento experimental

- Robustez

A robustez de um método mede a sensibilidade que este apresenta face a pequenas variações. Diz-se que um método é robusto quando ele não é afetado por uma modificação pequena e deliberada em seus parâmetros (RIBANI, M. et al.,2004).

3. OBJETIVOS

- Desenvolvimento de métodos analíticos para a determinação de dipirona sódica e cloridrato de papaverina isolados e em associação em formulações farmacêuticas;

- Validação e padronização da metodologia analítica por cromatografia líquida de alta eficiência para a determinação de dipirona sódica e cloridrato de papaverina isolados e em associação em formulações farmacêuticas;

- Validação e padronização da metodologia analítica empregando a espectrofotometria no ultravioleta para a determinação de dipirona sódica e cloridrato de papaverina em associação, utilizando a calibração multivariada.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico ou grau cromatográfico (HPLC).

4.1.1 Reagentes e solventes

- acetonitrila (Merck[®])
- acetato de amônio (Merck[®])
- acetato de sódio (Merck[®])
- ácido acético glacial (Merck[®])
- ácido ortofosfórico (Merck[®])
- fosfato de sódio monobásico (Merck[®])
- fosfato de potássio dibásico (Merck[®])
- fosfato monobásico de potássio (Merck[®])
- metanol para cromatografia (Merck[®])
- trietilamina (Merck[®])

4.1.2 Substâncias químicas de referência

Os fármacos empregados como substâncias químicas de referência, foram gentilmente cedidos por laboratórios farmacêuticos. Os fármacos vieram identificados com as respectivas porcentagens de pureza e foram utilizados sem ulterior purificação:

- dipirona sódica – grau de pureza – 100,80 % (Furp)
- cloridrato de papaverina – grau de pureza – 99,80 % (Cristália)

4.1.3 Equipamentos e acessórios

- Balança analítica- OHAUS
- Balança eletrônica BG 200 GEHAKA
- Banho ultrassônico Thornton T14
- Coluna cromatográfica Merck LiChrospher® 100 RP - 18 (125 X 4,6 mm, 5µm)
- Coluna cromatográfica Supelcosil C18 LC - PAH (250 mm X 4,6 mm, 5µm) Supelco, Bellefonte, USA e pré – coluna C 18 (20 X 4,6 mm ,5µm) Supelco
- Coluna Nova Pack C18® (300 x 3,9mm)
- Coluna Cromatográfica Merck LiChrospher® 100 RP - 8 (125 X 4,6 mm, 5µm)

- Sistema de cromatografia líquida de alta eficiência, modelo Varian 5000 (Varian Associates, CA, USA)
- Válvula giratória de injeção, modelo 7125, Rheodyne com um “ loop “ de 20µL
- Detector de ultravioleta variável, Varian modelo 4000
- Integrador modelo 4000, (Varian Associates, CA, USA)
- Espectrofotômetro UV/Visível Shimadzu UV 1601, acoplado a computador Intel e impressora HP 660 C, com cubetas de quartzo de 1cm de caminho ótico
- Medidor de ponto de fusão (Melting Point SMP1 Stuart Scientific)
- Membrana Millipore®
- Milli - Q Plus Milipore® – obtenção de água
- pHmetro DM 21 Digimed TE 901
- programa MATLAB TM, versão 6.5 (The MathWorks, Natick, EUA) PLS Toolbox, versão 3.5 (Eigenvector Technologies, Manson, EUA), para as análises com o PLS.

4.1.4 Amostras

- **Amostra 1** – Melpaz® – Solução oral – Frasco com 15 mL

Dipirona sódica..... 250 mg

Cloridrato de papaverina..... 10 mg

Veículo (sacarina sódica; metilparabeno; álcool etílico e água destilada)
qsp..... 1mL

- **Amostra 2** - Dipirona gotas:

Dipirona sódica..... 500mg

Veículo (água destilada; edetato de sódio; metabissulfito de sódio e sorbitol)

qsp1mL

- **Amostra 3** - Dipaverina[®] injetável:

Cloridrato de papaverina..... 100 mg

Veículo (álcool etílico; metabissulfito de sódio; cloreto de sódio; água para injetáveis)

qsp..... 2 mL

- **Amostra 4** – Placebo da solução oral (Amostra 1)

Sacarina sódica..... 0,5 g

Metilparabeno..... 0,2 g

Álcool etílico..... 10 mL

Água destilada qsp..... 100 mL

- **Amostra 5** – placebo da solução oral (Amostra 2)

Edetato de sódio..... 0,5 g

Metabissulfito de sódio..... 0,5g

Sorbitol..... 2,5 g

Água destilada qsp..... 50 mL

- **Amostra 6** – placebo da solução injetável (Amostra 3)

Álcool etílico..... 6 mL
Metabissulfito de sódio..... 0,1 g
Cloreto de sódio..... 0,9 g
Água para injetáveis qsp..... 100 mL

4.2 Métodos

4.2.1 Testes preliminares

A substância de referência cloridrato de papaverina foi submetida a alguns ensaios farmacopêicos descritos em compêndios oficiais. Foram realizados os testes de solubilidade, presença de cloretos, aparência e pH da solução, perda por dessecação a 105°C, cinzas sulfatadas, doseamento através de titulação potenciométrica e verificou-se o seu aspecto. (BRITISH Pharmacopoeia, 2002). Foi preparada uma solução de cloridrato de papaverina a 5,0 µg/mL em HCl 0,1 M e efetuou-se leitura por espectrofotometria no UV. A substância de referência de dipirona sódica foi submetida aos testes de solubilidade, identificação através de reação com peróxido e teste de sódio, perda por dessecação a 105°C, aspecto de uma solução de 2g em 40 mL de água livre de dióxido de carbono e doseamento por titulação com iodo.(BRITISH Pharmacopeia, 2002). Preparou-se uma solução da substância de referência dipirona sódica a 20 µg/mL em HCl 0,1 M e fez-se leitura por espectrofotometria no UV, também como ensaio de identificação, seguindo dados da literatura, que preconiza como pico máximo de absorção, nestas condições, 258 nm(CLARKE, E.C.G., 1986).

4.2.2 Ensaios cromatográficos preliminares para a análise de dipirona sódica e cloridrato de papaverina

As Tabelas 1, 2 e 3 descrevem as condições cromatográficas que foram testadas em diferentes colunas cromatográficas.

Tabela 1 - Condições utilizadas nos testes com uma coluna cromatográfica Merck LiChrospher® 100 RP - 8 (125 X 4,6 mm, 5µm)

	Fase móvel			Vazão(mL/min)		Detector UV (nm)
Água	Acetonitrila	Metanol	Trietilamina	pH		
75	15	5	0,3%	3,0	1,0	254
65	20	15	0,3%	3,0	1,0	254
40	60	-	-	3,0	1,0	254
50	50	-	-	3,0	1,0	254
50	50	-	0,1%	3,0	1,0	254
50	50	-	0,05%	3,0	1,0	254
60	30	10	0,3%	3,0	1,0	254
80	10	10	0,3%	3,0	1,0	254
80	10	10	0,3%	3,0	0,5	254
70	20	10	0,3%	3,0	1,0	254
70	20	10	0,3%	3,0	0,5	254
75	15	10	0,3%	3,0	1,0	254
80	10	10	0,4%	3,0	1,0	254
70	20	10	0,3%	4,9	1,0	254
70	20	10	0,3%	5,5	1,0	220
70	20	10	0,3%	5,5	1,0	254
70	20	10	0,3%	5,5	1,0	275
70	20	10	0,3%	4,7	1,0	254
70	20	10	0,3%	4,7	0,8	254
70	20	10	0,3%	4,5	1,0	254
Tampão acetato de amônio 0,01 M	Acetonitrila	Metanol	Trietilamina	pH		
70	20	10	0,3%	4,5	1,0	254
Tampão acetato de sódio 0,01 M	Acetonitrila	Metanol	Trietilamina	pH		
70	20	10	0,3%	5,5	1,0	285
70	20	10	0,3%	4,5	1,0	254
Tampão fosfato	Acetonitrila	Metanol	Trietilamina	pH		
80	16	4	0,28%	4,5	1,0	254
80	16	4	-	4,5	1,0	254
80	10	10	-	4,5	1,0	254
80	20	-	-	4,5	1,0	254
80	12	8	-	3,0	1,0	220
60	40	-	-	-	1,0	220; 234; 254

Tabela 2 - Condições utilizadas nos testes com uma coluna Nova Pack C18® (300 x 3,9mm)

Fase móvel					Vazão(mL/min)	Detector UV (nm)
Água	Acetonitrila	Metanol	Trietilamina	pH		
70	20	10	-	3,0	0,8	215
70	20	10	-	3,0	0,8	273
70	20	10	-	3,0	0,6	254

Tabela 3 - Condições utilizadas nos testes com uma coluna Merck LiChrospher® 100 RP - 18 (125 X 4,6 mm,5µm)

Fase móvel					Vazão(mL/min)	Detector UV (nm)
água	acetonitrila	metanol	trietilamina	pH		
70	20	10	0,3%	6,5	1,0	254
25	60	15	-	3,38	1,0	254
15	70	15	-	3,1	1,0	254
70	15	15	-	6,86	0,5	254
70	-	30	-	6,0	0,8	254
70	-	30	-	6,0	0,5	254
75	20	5	0,3%	3,3	1,0	254
70	20	10	-	3,3	1,0	254
50	35	15	-	3,5	1,0	254
70	20	10	0,3%	4,4	1,0	254
70	20	10	0,3%	3,0	0,8	254
75	15	10	0,3%	3,3	1,0	254
75	20	5	0,3%	3,3	1,0	254
78	20	2	0,3%	3,3	1,0	254
70	30	-	0,4%	5,0	1,0	254
50	50	-	-	3,0	1,0	254
80	20	-	0,3%	3,4	1,0	254
Tampão fosfato	Acetonitrila	Metanol	trietilamina	pH		
60	30	10	0,3%	4,5	1,0	254
70	20	10	0,3%	4,5	1,0	254
70	28	2	0,3%	4,5	1,0	254
50	40	10	-	4,5	1,0	254
95	5	-	-	3,4	1,0	254
80	20	-	0,3%	7,0	1,0	254
80	20	-	0,3%	5,0	1,0	254
80	16	4	0,28%	4,5	1,0	254

Nas condições cromatográficas citadas nas Tabelas 1,2 e 3 o pH foi ajustado com ácido ortofosfórico, quando foi necessário.

A coluna cromatográfica Supelcosil C18 LC - PAH (250 mm X 4,6 mm , 5µm) e pré – coluna C 18 (20 X 4,6 mm, 5µm) foi testada utilizando-se as seguintes condições:

- Fase móvel: água: acetonitrila: metanol (70: 20: 10) trietilamina 0,3% e pH: 3,0 ajustado com ácido ortofosfórico; vazão de 0,7 mL/min e detector de UV a 254 nm.

As amostras foram dissolvidas e diluídas em cada fase móvel utilizada, variando-se as concentrações de 250,0 a 50,0 µg/mL para a dipirona sódica e de 50,0 a 1,0 µg/mL para cloridrato de papaverina.

Foram preparadas soluções de dipirona sódica padrão e cloridrato de papaverina padrão nas concentrações de 20,0 µg/mL e 10 µg/mL, respectivamente na fase móvel: água: acetonitrila: metanol (70: 20: 10) trietilamina 0,3% e pH: 3,0 ajustado com ácido ortofosfórico e efetuadas leituras por espectrofotometria no UV para seleção de melhor comprimento de onda.

4.2.3 Validação da metodologia analítica para a cromatografia líquida de alta eficiência

4.2.3.1 Padronização do método cromatográfico para a associação de dipirona sódica e cloridrato de papaverina

Após vários experimentos, foram fixados os seguintes parâmetros:

- Fase móvel: água: acetonitrila: metanol (70: 20: 10) trietilamina 0,3% e pH: 3,0, ajustado com ácido ortofosfórico.

A fase móvel foi filtrada em membrana para filtração Millipore® de 0,5µm e degaseificada antes de ser utilizada.

- Vazão: 0,7 mL/min
- Detecção no UV: 254 nm
- Atenuação: 2 A.U.F.S.
- Temperatura ambiente (25°C ± 1°C)
- Volume de injeção: 20 µL
- Coluna cromatográfica Supelcosil C18 LCPH 250 mm X 4,6 mm (5µm) Supelco e pré – coluna C 18 20 X 4,6 mm(5µm) Supelco
- Solvente: fase móvel

As soluções foram filtradas em unidades filtrantes HV MILLEX® 0,45 µm, antes de serem injetadas no cromatógrafo.

4.2.3.1.1 Construção da curva analítica

a) Preparação da solução padrão de dipirona sódica

Foram pesados exatamente cerca de 50,0 mg de dipirona sódica e transferidos para balão volumétrico de 100 mL, dissolvendo-se e completando-se o volume com fase móvel, obtendo-se solução de concentração final de 500,0 µg/mL de dipirona sódica.

b) Preparação da solução padrão de cloridrato de papaverina

Foram pesados exatamente cerca de 40,0 mg de cloridrato de papaverina e transferidos para balão volumétrico de 200 mL, dissolvendo-se e completando-se o volume com fase móvel, em seguida foi tomada uma alíquota de 10,0 mL desta solução e transferida para balão volumétrico de 100 mL obtendo-se uma solução de concentração final de 20,0 µg/mL de cloridrato de papaverina.

c) Preparo da solução padrão de mistura de dipirona sódica e cloridrato de papaverina

Foi transferida uma alíquota de 10,0 mL da solução final de (a) e uma alíquota de 10,0 mL da solução final de (b) para um balão de 50 mL e completou-se o volume do balão com fase móvel. Obtendo-se uma solução com concentrações finais de 100,0 µg/mL de dipirona sódica e 4,0 µg/mL de cloridrato de papaverina.

d) Procedimento

Alíquotas de 4,0; 4,5; 5,0; 5,5; 6,0 e 6,5 mL da solução padrão de (c) foram transferidas para balões volumétricos de 10,0 mL e completou-se o volume de cada balão com fase móvel, obtendo-se soluções com concentrações de 40,0; 45,0; 50,0; 55,0; 60,0 e 65,0 µg/mL de dipirona sódica e 1,6; 1,8; 2,0; 2,2; 2,4 e 2,6 µg/mL de cloridrato de papaverina, respectivamente.

4.2.3.1.2 Pesquisa de interferentes a partir de excipientes para a Amostra 1

Especificidade

a) Preparação da solução padrão de dipirona sódica e cloridrato de papaverina

Primeiramente foi preparada uma solução seguindo o procedimento do item 4.2.3.1.1 c., obtendo-se uma solução padrão de 100 µg/mL de dipirona sódica e 4 µg/mL de cloridrato de papaverina. Desta solução transferiu-se uma alíquota de 5,0 mL para balão volumétrico de 10 mL, completou-se o volume com fase móvel e obteve-se uma concentração final de 50,0 µg/mL de dipirona sódica e 2,0 µg/mL de cloridrato de papaverina.

b) Preparação da solução da Amostra 1

Foi transferida uma alíquota de 2,0 mL da solução oral do medicamento que contém 250 mg/mL de dipirona sódica e 10 mg/mL de cloridrato de papaverina para balão volumétrico de 1000 mL e diluiu-se com água Milli - Q, obtendo-se uma solução com concentração de 500,0 µg/mL de dipirona sódica e 20,0 µg/mL de cloridrato de papaverina. Desta solução foi transferida uma alíquota de 10,0 mL para balão volumétrico de 100 mL, completou-se o volume com fase móvel, obtendo-se concentrações finais de 50,0 µg/mL de dipirona sódica e 2,0 µg/mL de cloridrato de papaverina.

c) Preparação da – Amostra 4 (solução placebo da Amostra 1)

Foram feitas diluições com a solução da Amostra 4, seguindo o mesmo procedimento do item 4.2.3.1.2 b.

4.2.3.1.3 Aplicação do método padronizado à Amostra 1

Desvio padrão relativo - Precisão

a) Preparação da solução padrão de dipirona sódica e cloridrato de papaverina

Foram preparadas três soluções padrão conforme item 4.2.3.1.2 a. e efetuadas três leituras de cada solução padrão. Utilizou-se a média aritmética dessas leituras como valor do padrão.

b) Preparação da solução da Amostra 1

A solução da Amostra 1 foi preparada conforme descrito no item 4.2.3.1.2b. Foram realizadas 9 determinações para cada amostra e os resultados foram analisados estatisticamente.

Teste de recuperação - Exatidão

a) Preparação da solução padrão de dipirona sódica e cloridrato de papaverina

Foi preparada uma solução seguindo o mesmo procedimento do item 4.2.3.1.1 c, obtendo-se uma solução padrão de 100 µg/mL de dipirona sódica e 4 µg/mL de cloridrato de papaverina.

b) Preparação da solução da Amostra 1

Foi transferida uma alíquota de 2,0 mL da solução oral do medicamento contendo 250,0 mg/mL de dipirona sódica e 10,0 mg/mL de cloridrato de papaverina para balão volumétrico de 1000 mL e diluiu-se com água Milli - Q, obtendo-se uma solução com concentração de 500,0 µg/mL de dipirona sódica e 20,0 µg/mL de cloridrato de papaverina. Desta solução foi transferida uma alíquota de 5,0 mL para balão volumétrico de 25 mL, obtendo-se soluções com concentrações finais de 100,0 µg/mL de dipirona sódica e 4,0 µg/mL de cloridrato de papaverina.

Procedimento:

Alíquotas de solução padrão e de amostra comercial foram transferidas para balão volumétrico de 10 mL, conforme procedimento que segue:

	Amostra comercial	Padrão	Concentração	Concentração
	dipirona sódica (100,0µg/mL)	dipirona sódica (100,0µg/mL)	final de dipirona sódica	final de cloridrato papaverina
	cloridrato de papaverina (4,0µg/mL)	cloridrato de papaverina (4,0µg/mL)		
1	4,0 mL		40,0 µg/mL	1,6 µg/mL
2		4,0mL	40,0 µg/mL	1,6 µg/mL
3	4,0 mL	1,0 mL	50,0 µg/mL	2,0 µg/mL
4	4,0 mL	1,5 mL	55,0 µg/mL	2,2 µg/mL
5	4,0 mL	2,0 mL	60,0 µg/mL	2,4 µg/mL

Em todos os balões volumétricos o volume foi completado com fase móvel.

4.2.3.1.4 Pesquisa de interferentes a partir de excipientes para a Amostra 2

Especificidade

a) Preparação da solução padrão de dipirona sódica

Foram pesados exatamente cerca de 50,0 mg de padrão de dipirona sódica e transferidos para balão volumétrico de 100 mL, obtendo-se uma solução padrão de 500,0 µg/mL de dipirona sódica. Desta solução transferiu-se uma alíquota de 10,0 mL para balão volumétrico de 100 mL, completou-se o volume com fase móvel e obteve-se uma concentração final de 50,0 µg/mL de dipirona sódica.

b) Preparação da solução da Amostra 2

Foi transferida uma alíquota de 2,0 mL da solução oral do medicamento que contém 500,0 mg/mL de dipirona sódica para balão volumétrico de 2000 mL e diluiu-se com água Milli - Q, obtendo-se uma solução com concentração de 500,0 µg/mL de dipirona sódica. Desta solução foi transferida uma alíquota de 5,0 mL para balão volumétrico de 100 mL, completou-se o volume com fase móvel, obtendo-se concentração final de 50,0 µg/mL de dipirona sódica.

c) Preparação da Amostra 5 (solução placebo da Amostra 2)

Foram preparadas diluições com a solução da amostra 5, seguindo-se o mesmo procedimento do item 4.2.3.1.4 b

4.2.3.1.5 Aplicação do método padronizado à Amostra 2

Desvio padrão relativo – Precisão

a) Preparação da solução padrão de dipirona sódica

Foram preparadas três soluções padrão conforme item 4.2.3.1.4a. e efetuadas três leituras dessa solução. Utilizou-se a média aritmética dessas leituras como valor do padrão.

b) Preparação da solução da Amostra 2

A solução de amostra comercial foi preparada conforme descrito no item 4.2.3.1.4b. Foram realizadas 10 determinações e os resultados foram analisados estatisticamente.

Teste de recuperação - Exatidão

a) Preparação da solução padrão de dipirona sódica

Foram pesados exatamente cerca de 25,0 mg de padrão de dipirona sódica e transferidos para balão volumétrico de 25 mL, obtendo-se uma solução padrão de 1000,0 µg/mL de dipirona sódica. Desta solução foram transferidos 10 mL para balão volumétrico de 100 mL e completou-se o volume com fase móvel, obtendo-se uma concentração final de 100,0 µg/mL.

b) Preparação da solução da Amostra 2

Foi transferida uma alíquota de 2,0 mL da solução oral do medicamento que contém 500,0 mg/mL de dipirona sódica para balão volumétrico de 1000 mL e diluiu-se com água Milli Q, obtendo-se uma solução com concentração de 1000,0 µg/mL de dipirona sódica. Desta solução foi transferida uma alíquota de 5,0 mL para balão volumétrico de 50 mL, obtendo-se solução com concentração final de 100,0 µg/mL de dipirona sódica.

Procedimento:

Alíquotas de solução padrão e de amostra comercial foram transferidas para balão volumétrico de 10 mL, conforme procedimento que segue:

	Amostra comercial dipirona sódica (100,0µg/mL)	Padrão dipirona sódica (100,0µg/mL)	Concentração final de dipirona sódica
1	4,0 mL		40,0 µg/mL
2		4,0mL	40,0 µg/mL
3	4,0 mL	1,0 mL	50,0 µg/mL
4	4,0 mL	1,5 mL	55,0 µg/mL
5	4,0 mL	2,0 mL	60,0 µg/mL

Em todos os balões volumétricos o volume foi completado com fase móvel.

4.2.3.2 Padronização do método cromatográfico para o cloridrato de papaverina isolado

Parâmetros utilizados:

- Fase móvel: água: acetonitrila: metanol (70: 20: 10) trietilamina 0,3% e pH: 3,0. ajustado com ácido ortofosfórico.

A fase móvel foi filtrada em membrana para filtração Millipore[®] de 0,5 µm e degaseificada antes de ser utilizada.

- Vazão: 1,0 mL/min
- Detecção no UV: 254 nm
- Atenuação: 2 A.U.F.S.
- Temperatura ambiente(25°C ± 1°C)
- Volume de injeção: 20 µL
- Coluna cromatográfica Merck LiChrospher[®] 100 - RP 18 (125 X 4,6 mm, 5µm)
- Solvente: fase móvel

As soluções foram filtradas em unidades filtrantes HV MILLEX[®] 0,45 µm, antes de serem injetadas no cromatógrafo.

4.2.3.2.1 Construção da curva analítica

a) Preparação da solução padrão de cloridrato de papaverina

Foram pesados exatamente cerca de 50,0 mg de cloridrato de papaverina e transferidos para balão volumétrico de 50 mL, dissolvendo-se e completando-se o volume com fase móvel, em seguida foi tomada uma alíquota de 2,0 mL desta solução e transferida para balão volumétrico de 100 mL obtendo-se uma solução de concentração final de 20,0 µg/mL de cloridrato de papaverina.

Procedimento

Alíquotas de 10,0; 11,0; 12,0; 13,0; 14,0 e 15,0 mL da solução padrão de cloridrato de papaverina foram transferidas para balões volumétricos de 25 mL e completou-se o volume de cada balão com fase móvel, obtendo-se soluções com concentrações de 8,0; 8,8; 9,6; 10,4; 11,2 e 12,0 µg/mL de cloridrato de papaverina.

4.2.3.2.2 Pesquisa de interferentes a partir de excipientes

Especificidade

a) Preparação da solução padrão de cloridrato de papaverina

Foram exatamente pesados cerca de 10,0 mg de cloridrato de papaverina e transferidos para balão volumétrico de 100 mL, dissolvendo-se e completando-se o volume com fase móvel, em seguida foi tomada uma alíquota de 5,0 mL desta solução e transferida para balão volumétrico de 50 mL obtendo-se uma solução de concentração final de 10,0 µg/mL de cloridrato de papaverina.

b) Preparação da solução da Amostra 3

Foi transferida uma alíquota de 5,0 mL da solução injetável do medicamento que contém 100,0 mg/2mL de cloridrato de papaverina para balão volumétrico de 100 mL e diluiu-se com água Milli Q, obtendo-se uma solução com concentração de 2,5 mg/mL de cloridrato de papaverina. Desta solução foi transferida uma alíquota de 5,0 mL para balão volumétrico de 250 mL, completou-se o volume com fase móvel, obtendo-se 50,0 µg/mL de cloridrato de papaverina. Desta solução transferiu-se uma alíquota de 2,0 mL para balão volumétrico de 10 mL, completando-se o volume com fase móvel, obtendo-se uma concentração final de 10,0 µg/mL de cloridrato de papaverina.

Foram realizadas leituras em triplicata.

c) Preparação da Amostra 6 (solução placebo da Amostra 3)

Foi transferida uma alíquota de 5,0 mL da solução da Amostra 6 para balão volumétrico de 100 mL e diluiu-se com água Milli Q. Desta solução foi transferida uma alíquota de 5,0 mL para balão volumétrico de 250 mL, completou-se o volume com fase móvel. Em seguida, transferiu-se uma alíquota de 2,0 mL desta última diluição para balão volumétrico de 10 mL, completando-se o volume com fase móvel. Foram realizadas leituras em triplicata.

4.2.3.2.3 Aplicação do método padronizado à Amostra 3

Desvio padrão relativo - Precisão

a) Preparação da solução padrão de cloridrato de papaverina

Foram pesados exatamente cerca de 25,0 mg de cloridrato de papaverina e transferidos para balão volumétrico de 25 mL, dissolvendo-se e completando-se o volume com fase móvel, em seguida foi tomada uma alíquota de 5,0 mL desta solução e transferida para balão volumétrico de 100 mL obtendo-se uma solução de concentração final de 50,0 µg/mL de cloridrato de papaverina.

Foram preparadas três soluções padrão e efetuadas três leituras de cada solução padrão. Utilizou-se a média aritmética dessas leituras como valor do padrão.

b) Preparação da solução da Amostra 3

Foi transferida uma alíquota de 5,0 mL da solução injetável do medicamento que contém 100,0 mg/2mL de cloridrato de papaverina para balão volumétrico de 100 mL e diluiu-se com água Milli Q, obtendo-se uma solução com concentração de 2,5 mg/mL de cloridrato de papaverina. Desta solução foi transferida uma alíquota de 5,0 mL para balão volumétrico de 250 mL, completou-se o volume com fase móvel, obtendo-se 50,0 µg/mL de cloridrato de papaverina. A partir desta solução foram tomadas 10 alíquotas de 2,0 mL para 10 balões volumétricos de 10 mL, cada balão contendo uma concentração final de 10,0 µg/mL de cloridrato de papaverina.

Foram realizadas leituras em triplicata para cada amostra e os resultados foram analisados estatisticamente.

Teste de recuperação – Exatidão

a) Preparação da solução padrão de cloridrato de papaverina

Foram pesados exatamente cerca de 10,0 mg de cloridrato de papaverina e transferidos para balão volumétrico de 100 mL, dissolvendo-se e completando-se o volume com fase móvel, obtendo-se uma solução com concentração de 100,0 µg/mL de cloridrato de papaverina. Desta solução foi transferida uma alíquota de 10,0 mL para balão volumétrico de 100 mL, completou-se o volume com fase móvel, obtendo-se concentração final de 10,0 µg/mL de cloridrato de papaverina.

b) Preparação da solução da Amostra 3

Foi transferida uma alíquota de 5,0 mL da solução injetável do medicamento que contém 100 mg/2 mL, ou seja 50,0 mg/mL de cloridrato de papaverina para balão volumétrico de 1000 mL e diluiu-se com água Milli Q, obtendo-se uma solução com concentração de 250,0 µg/mL de cloridrato de papaverina. Desta solução foi transferida uma alíquota de 10,0 mL para balão volumétrico de 25 mL, completou-se o volume do balão com fase móvel obtendo-se concentrações final 100,0 µg/mL de cloridrato de papaverina.

Procedimento:

Alíquotas de solução padrão e de amostra comercial foram transferidas para balão volumétrico de 25,0 mL, conforme procedimento que segue:

	Amostra comercial cloridrato de papaverina (100,0µg/mL)	Padrão cloridrato de papaverina (10,0µg/mL)	Concentração final de cloridrato papaverina
1	2,0 mL	_____	8,0 µg/mL
2	_____	20,0mL	8,0 µg/mL
3	2,0 mL	2,5 mL	9,0 µg/mL
4	2,0 mL	5,0 mL	10,0µg/mL
5	2,0 mL	10,0 mL	12,0 µg/mL

Em todos os balões volumétricos o volume foi completado com fase móvel.

4.3 Ensaios preliminares utilizando a espectrofotometria no UV com aplicação do PLS (Partial Least Squares) para a análise de dipirona sódica e cloridrato de papaverina

Primeiramente foram preparadas soluções de dipirona sódica padrão a 20,0 µg/mL e cloridrato de papaverina padrão a 4,0 µg/mL em metanol separadamente e analisadas por espectrofotometria no UV. Em seguida foram preparadas misturas das soluções de dipirona sódica a 25,0 µg/mL , cloridrato de papaverina a 1,0 µg/mL e do placebo(todos os componentes do veículo) da Amostra 1 em metanol e em ácido clorídrico 0,1 M, respectivamente.

As soluções foram preparadas seguindo a proporção dos medicamentos na amostra comercial 1 (250,0 mg de dipirona sódica, 10,0 mg de cloridrato de papaverina).

Após a análise dos resultados foram padronizados os seguintes parâmetros:

- Solvente: metanol
- Faixa de leitura: 210 a 300 nm (passo ou intervalo de 0,5 nm)

4.3.1 Modelo de calibração para a espectrofotometria no UV com aplicação do PLS

Preparação das soluções

Foram pesados exatamente cerca de 25,0 mg de dipirona sódica e transferidos para balão volumétrico de 250 mL e completou-se o volume com metanol, obtendo-se uma solução na concentração de 100,0 µg/mL. Em seguida, foram pesados exatamente cerca de 25,0 mg de cloridrato de papaverina e transferidos para balão volumétrico de 250 mL, o volume foi completado com metanol. Desta solução a 100,0 µg/mL de cloridrato de papaverina, foi transferida uma alíquota de 5,0 mL para balão volumétrico de 100 mL, obtendo-se uma solução de concentração final de 5,0 µg/mL de cloridrato de papaverina.

Destas soluções foram preparadas 25 soluções em balões volumétricos de 10 mL contendo misturas de dipirona sódica e cloridrato de papaverina da seguinte maneira:

Solução n°	Alíquota de solução de dipirona sódica (100,0 µg/mL) mL	Concentração de dipirona sódica	Alíquota de solução de cloridrato de papaverina (5,0 µg/mL) mL	Concentração de cloridrato de papaverina
1	1,5	15,00	1,0	0,50
2	2,0	20,00	1,0	0,50
3	2,5	25,00	1,0	0,50
4	3,0	30,00	1,0	0,50
5	3,5	35,00	1,0	0,50
6	1,5	15,00	1,5	0,75
7	2,0	20,00	1,5	0,75
8	2,5	25,00	1,5	0,75
9	3,0	30,00	1,5	0,75
10	3,5	35,00	1,5	0,75
11	1,5	15,00	2,0	1,00
12	2,0	20,00	2,0	1,00
13	2,5	25,00	2,0	1,00
14	3,0	30,00	2,0	1,00
15	3,5	35,00	2,0	1,00
16	1,5	15,00	2,5	1,25
17	2,0	20,00	2,5	1,25
18	2,5	25,00	2,5	1,25
19	3,0	30,00	2,5	1,25
20	3,5	35,00	2,5	1,25
21	1,5	15,00	3,0	1,50
22	2,0	20,00	3,0	1,50
23	2,5	25,00	3,0	1,50
24	3,0	30,00	3,0	1,50
25	3,5	35,00	3,0	1,50

Todas as soluções foram transferidas para balões volumétricos de 10 mL através de bureta calibrada e os volumes foram completados com metanol.

Todos os espectros de absorvância das soluções acima foram tratados pelo programa MATLABTM, aplicando-se o método de calibração multivariada PLS (Partial Least Squares) ou método dos mínimos quadrados parciais.

4.3.1.1 Pesquisa de interferentes a partir de excipientes

Especificidade

a) Preparação da solução padrão de dipirona sódica e cloridrato de papaverina

Inicialmente pesou-se exatamente cerca de 25,0 mg de dipirona sódica e transferiu-se para balão volumétrico de 100 mL, diluindo-se e completando-se o volume com metanol, obtendo-se uma solução padrão de 250,0 µg/mL de dipirona sódica. Em seguida foram pesados exatamente cerca de 20,0 mg de cloridrato de papaverina e transferidos para balão volumétrico de 200 mL, diluiu-se e completou-se o volume, obtendo-se uma concentração de 100,0 µg/mL de cloridrato de papaverina. Desta solução transferiu-se uma alíquota de 5,0 mL para balão volumétrico de 50 mL, completou-se o volume com metanol e obteve-se uma concentração final de 10,0 µg/mL de cloridrato de papaverina. Desta solução foi transferida uma alíquota de 5,0 mL para balão volumétrico de 50 mL, neste mesmo balão foi transferida uma alíquota de 5,0 mL da solução de dipirona sódica a 250,0 µg/mL, completou-se o volume deste balão com metanol, obtendo-se uma solução com concentração final de 25,0 µg/mL de dipirona sódica e 1,0 µg/mL de cloridrato de papaverina.

b) Preparação da solução da Amostra 1

Foi transferida uma alíquota de 2,0 mL da solução oral do medicamento que contém 250,0 mg/mL de dipirona sódica e 10,0 mg/mL de cloridrato de papaverina para balão volumétrico de 1000 mL e diluiu-se com água Milli - Q, obtendo-se uma solução com concentração de 500,0 µg/mL de dipirona sódica e 20,0 µg/mL de cloridrato de papaverina. Desta solução foi transferida uma alíquota de 5,0 mL para

balão volumétrico de 100 mL, completou-se o volume com metanol, obtendo-se concentrações finais de 25,0 µg/mL de dipirona sódica e 1,0 µg/mL de cloridrato de papaverina.

c) Preparação da Amostra 4 (solução placebo da Amostra 1)

Foi transferida uma alíquota de 2,0 mL da solução da Amostra 4 para balão volumétrico de 1000 mL e diluiu-se com água Milli Q. Desta solução foi transferida uma alíquota de 5,0 mL para balão volumétrico de 100 mL e completou-se o volume com metanol.

Os espectros de absorvância de todas as soluções foram tratados pelo programa MATLABTM, aplicando-se o PLS.

4.3.1.2 Aplicação do método padronizado à Amostra 1

Desvio padrão relativo - Precisão

a) Preparação da solução padrão de dipirona sódica e cloridrato de papaverina

Foram preparadas três soluções padrão conforme item 4.3.1.1a. e efetuadas três leituras de cada solução padrão. Utilizou-se a média aritmética dessas leituras como valor do padrão.

b) Preparação da solução de amostra comercial - Amostra 1

A solução de amostra comercial foi preparada conforme descrito no item 4.3.1.1b. Foram realizadas 9 determinações para cada amostra e os resultados foram analisados estatisticamente.

Os espectros de absorvância de todas as soluções foram tratados pelo programa MATLABTM, aplicando-se o PLS.

Teste de recuperação - Exatidão

a) Preparação da solução padrão de dipirona sódica e cloridrato de papaverina

Pesou-se exatamente cerca de 25,0 mg de dipirona sódica e transferiu-se para balão volumétrico de 100 mL, diluindo-se e completando-se o volume com metanol, obtendo-se uma solução padrão de 250,0 µg/mL de dipirona sódica. Em seguida foram pesados 10,0 mg de cloridrato de papaverina e transferidos para balão volumétrico de 200 mL, diluiu-se e completou-se o volume, obtendo-se uma concentração de 50,0 µg/mL de cloridrato de papaverina. A partir destas soluções foram transferidos 25,0 mL e 5,0 mL para um balão volumétrico de 50 mL, respectivamente, completou-se o volume com metanol e obteve-se concentrações de 125,0 µg/mL de dipirona sódica e 5,0 µg/mL de cloridrato de papaverina.

b) Preparação da solução de amostra comercial 1

Foi transferida uma alíquota de 2,0 mL da solução oral do medicamento que contém 250,0 mg/mL de dipirona sódica e 10,0 mg/mL de cloridrato de papaverina para balão volumétrico de 1000 mL e diluiu-se com água Milli - Q, obtendo-se uma solução com concentração de 500,0 µg/mL de dipirona sódica e 20,0 µg/mL de

cloridrato de papaverina. Desta solução foi transferida uma alíquota de 25,0 mL para balão volumétrico de 50 mL, obtendo-se soluções com concentrações finais de 250,0 µg/mL de dipirona sódica e 10,0 µg/mL de cloridrato de papaverina.

Procedimento:

Alíquotas de solução padrão e de amostra comercial foram transferidas para balão volumétrico de 50 mL, conforme procedimento que segue:

	Amostra comercial dipirona sódica (250,0µg/mL) cloridrato de papaverina (10,0µg/mL)	Padrão dipirona sódica (125,0µg/mL) cloridrato de papaverina (5,0µg/mL)	Concentração final de dipirona sódica	Concentração final de cloridrato papaverina
1	4,0 mL	_____	20,0 µg/mL	0,8 µg/mL
2	_____	8,0mL	20,0 µg/mL	0,8 µg/mL
3	4,0 mL	1,0 mL	22,5 µg/mL	0,9 µg/mL
4	4,0 mL	2,0 mL	25,0 µg/mL	1,0 µg/mL
5	4,0 mL	3,0 mL	27,5 µg/mL	1,1 µg/mL

Os espectros de absorvância de todas as soluções foram tratados pelo programa MATLABTM, aplicando-se o PLS.

5. RESULTADOS

5.1 Testes preliminares com as substâncias de referência

5.1.1 Testes descritos pela Farmacopéia Britânica

Tabela 4 – Testes da Farmacopéia Britânica aplicados à substância de referência - Cloridrato de papaverina

Teste	Especificações	Resultados
Aspecto	Pó cristalino, branco, inodoro	De acordo
Solubilidade	Água (1:30) - solúvel, metanol-solúvel, álcool-fracamente solúvel, clorofórmio-insolúvel, éter-insolúvel	De acordo
Cloretos	Presença de cloretos	De acordo
pH	3 a 4,5	3,18
Doseamento	98,5 a 100,5%	99,72%
Cinzas sulfatadas	≤0,1%	0,09%

Tabela 5 – Testes da Farmacopéia Britânica aplicados à substância de referência -
Dipirona sódica

Teste	Especificações	Resultados
Aspecto	Pó cristalino, branco, inodoro	De acordo
Solubilidade	água-solúvel; álcool-solúvel, clorofórmio-insolúvel, éter-insolúvel	De acordo
Identificação	Presença de sódio – chama amarela Reação com peróxido – cor azul altera-se para vermelha	Positivo
Perda por dessecação	4,9 a 5,3%	5,0%
Doseamento	98,0 a 101,2%	101,0%
Aparência da solução	amarelada	De acordo

5.1.2 Teste de identificação por Espectrofotometria no UV

Figura 5 – Espectro de absorção do cloridrato de papaverina a 5,0 $\mu\text{g/mL}$ em HCl 0,1 M. λ máximo: 250 nm.

Figura 6 – Espectro de absorção da dipirona sódica padrão a 20,0 $\mu\text{g/mL}$ em HCl 0,1 M, λ máximo: 258 nm.

5.2 Ensaios cromatográficos preliminares para a análise de dipirona sódica e cloridrato de papaverina

5.2.1 Testes preliminares com a Coluna Cromatográfica Merck

LiChrospher® 100RP- 8 (125 X 4,6 mm , 5µm)

Figura 7 - Cromatogramas da dipirona a 50,0 µg/mL e do cloridrato de papaverina a 25,0 µg/mL diluídos em fase móvel. Condições cromatográficas: Fase móvel: tampão acetato de sódio 0,01M:acetonitrila:metanol (70:20:10) trietilamina 0,3% e pH 5,5; vazão de 1 mL/min e detector de UV a 285 nm. Coluna Cromatográfica Merck LiChrospher® 100RP - 8 (125 X 4,6 mm , 5µm)

Figura 8 - Cromatogramas da dipirona a 50,0 µg/mL e do cloridrato de papaverina a 25,0 µg/mL diluídos em fase móvel. Condições cromatográficas: Fase móvel: tampão acetato de amônio 0,01M:acetonitrila:metanol (70:20:10) trietilamina 0,3% e pH 4,5; vazão de 1 mL/min e detector de UV a 254 nm. Coluna Cromatográfica Merck LiChrospher® 100RP - 8 (125 X 4,6 mm , 5µm)

5.2.2 Testes preliminares com a Coluna Cromatográfica Merck LiChrospher®

100 RP -18 (125 X 4,6 mm, 5µm)

Figura 9 - Cromatograma da dipirona a 50,0 µg/mL diluída em fase móvel. Condições cromatográficas: Fase móvel :água:acetonitrila (50:50) pH: 3,0; vazão de 1mL/min e detector de UV a 254 nm. Coluna Cromatográfica Merck LiChrospher® 100 RP -18 (125 X 4,6 mm, 5µm)

Figura 10 - Cromatogramas da dipirona a 50,0 $\mu\text{g/mL}$ e do cloridrato de papaverina a 15,0 $\mu\text{g/mL}$ diluídos em fase móvel. Condições cromatográficas: Fase móvel: água:acetonitrila:metanol (70:20:10) trietilamina 0,3% e pH: 6,5; vazão de 1,0 mL/min e detector de UV a 254 nm. Coluna Cromatográfica Merck LiChrospher[®] 100 RP -18 (125 X 4,6 mm, 5 μm)

5.2.3 Testes preliminares com a Coluna Cromatográfica Nova Pack C18®

(300 x 3,9mm)

Figura 11 - Cromatogramas da dipirona a 50,0 µg/mL e do cloridrato de papaverina a 15,0 µg/mL diluídos em fase móvel. Condições cromatográficas: Fase móvel: água:acetonitrila:metanol (70:20:10) pH = 3,0 ajustado com ácido ortofosfórico= 3,0; vazão de 0,8 mL/min e detector de UV a 273 nm. Coluna Cromatográfica Nova Pack C18®(300 x 3,9mm)

5.2.4 – Seleção de melhor comprimento de onda através de espectros de absorbância

Foram desenvolvidos espectros de absorção na região do UV de cada fármaco, para verificar qual o melhor comprimento de onda empregado na cromatografia. As figuras 12 e 13 ilustram os espectros de absorção das soluções de dipirona sódica e cloridrato de papaverina, respectivamente.

Figura 12 – Espectro de absorção de dipirona sódica a 20,0 µg/mL em fase móvel: água:acetonitrila:metanol (70:20:10) pH = 3,0 ajustado com ácido ortofosfórico.

Figura 13 – Espectro de absorção de cloridrato de papaverina a 10,0 µg/mL em fase móvel: água:acetonitrila:metanol (70:20:10) pH = 3,0 ajustado com ácido ortofosfórico.

5.3 Padronização do método cromatográfico para a associação de dipirona sódica e cloridrato de papaverina

5.3.1 Construção da curva analítica

A Figura 14 representa a curva analítica da dipirona sódica. Os valores experimentais obtidos para a construção da curva analítica são descritos na Tabela 6 e análise estatística na Tabela 7.

Figura 14 - Curva analítica da dipirona sódica. Concentrações de 40,0; 45,0; 50,0; 55,0; 60,0 e 65,0 $\mu\text{g/mL}$ de dipirona sódica. Condições cromatográficas: Coluna cromatográfica: Supelcosil C18 - LCPH (250 mm X 4,6 mm, 5 μm) Supelco e pré-coluna C -18 (20 X 4,6 mm, 5 μm) Supelco. Fase móvel: água:acetonitrila:metanol (70:20:10) trietilamina 0,3% e pH: 3,0 ajustado com ácido ortofosfórico. Vazão: 0,7 ml/min. Detecção no UV: 254 nm.

Tabela 6 – Valores experimentais obtidos na determinação da curva analítica da dipirona sódica, por cromatografia líquida de alta eficiência, empregando Coluna cromatográfica: Supelcosil C18 - LCPH (250 mm X 4,6 mm, 5µm) e pré – coluna C18 – (20 X 4,6mm, 5µm) Supelco.

Concentração (µg/mL)	Área Média ^(a) (mV.min)
40,0	29058
45,0	32671
50,0	36137
55,0	40637
60,0	43572
65,0	46980

^(a)Média de três leituras

Tabela 7 – Análise estatística dos resultados obtidos na determinação da curva analítica da dipirona sódica pela cromatografia líquida de alta eficiência

Parâmetros	Resultados obtidos
Intersecção da reta (a)	131,93
Coeficiente angular (b)	724,65
Desvio da intersecção da reta(a)	941,22
Desvio do coeficiente angular(b)	17,70
Coeficiente de correlação (r)	0,9988
Desvio padrão	370,13

A Figura 15 representa a curva analítica do cloridrato de papaverina. Os valores experimentais obtidos para a construção da curva analítica são descritos na Tabela 8 e análise estatística na Tabela 9.

Figura 15 - Curva analítica do cloridrato de papaverina. Concentrações de 1,6; 1,8; 2,0; 2,2; 2,4 e 2,6 µg/mL de cloridrato de papaverina. Condições cromatográficas: Coluna cromatográfica: Supelcosil C18 - LCPH 250 mm X 4,6 mm, 5µm) Supelco e pré – coluna C - 18 (20 X 4,6 mm, 5µm) Supelco. Fase móvel: água:acetonitrila:metanol (70:20:10) trietilamina 0,3% e pH: 3,0 ajustado com ácido ortofosfórico. Vazão: 0,7 ml/min. Detecção no UV: 254 nm.

Tabela 8 – Valores experimentais obtidos na determinação da curva analítica do cloridrato de papaverina, por cromatografia líquida de alta eficiência, empregando Coluna cromatográfica: Supelcosil C18 - LCPH (250 mm X 4,6 mm , 5µm) e pré – coluna C - 18 (20 X 4,6mm, 5µm) Supelco.

Concentração (µg/mL)	Área Média ^(a) (mV.min)
1,6	4906
1,8	5503
2,0	6120
2,2	6734
2,4	7387
2,6	8115

^(a)Média de três leituras

Tabela 9 – Análise estatística dos resultados obtidos na determinação da curva analítica do cloridrato de papaverina pela cromatografia líquida de alta eficiência

Parâmetros	Resultados obtidos
Intersecção da reta (a)	-232,47
Coeficiente angular (b)	3187,29
Desvio da intersecção da reta(a)	118,17
Desvio do coeficiente angular(b)	55,54
Coeficiente de correlação (r)	0,9993
Desvio padrão	46,47

5.3.2 - Pesquisa de interferentes a partir de excipientes para a Amostra 1 - Especificidade

A Figura 16 mostra os cromatogramas do placebo – Amostra 4 (todos os componentes do veículo) (A), padrão de dipirona sódica e cloridrato de papaverina(B) e Amostra 1(C):

Figura 16 – Cromatogramas A – placebo – Amostra 4, B - padrão de dipirona sódica a 50,0 $\mu\text{g/mL}$ (t_r = 2,30 min) e cloridrato de papaverina a 2,0 $\mu\text{g/mL}$ (8,68 min) e C – Amostra 1 - contendo dipirona sódica a 50,0 $\mu\text{g/mL}$ (2,32 min) e cloridrato de papaverina a 2,0 $\mu\text{g/mL}$ (8,72 min). Condições cromatográficas: Coluna cromatográfica: Supelcosil C18 - LCPH (250 mm X 4,6 mm, 5 μm) Supelco e pré – coluna C - 18 (20 X 4,6 mm, 5 μm) Supelco .Fase móvel: água:acetonitrila:metanol (70:20:10) trietilamina 0,3% e pH: 3,0 ajustado com ácido ortofosfórico. Vazão: 0,7 mL/min. Detecção no UV: 254 nm.

5.3.3 Aplicação do método padronizado à Amostra 1

Desvio padrão relativo – Precisão

Os valores experimentais obtidos na determinação quantitativa da Amostra 1 contendo dipirona sódica e cloridrato de papaverina através da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) podem ser observados nas Tabelas 10 e 11.

Tabela 10 - Valores experimentais obtidos na determinação quantitativa da dipirona sódica na amostra comercial por CLAE e análise estatística dos resultados

Amostra	Concentração de dipirona sódica (50,0 µg/mL)	Porcentual obtido %	Desvio Padrão Absoluto	Desvio padrão relativo DPR	DPR %	Intervalo de confiança
1	50,17	100,35				
2	50,08	100,15				
3	50,12	100,24				
4	49,13	98,26				
5	50,25	100,51	1,008	0,010	1,01	99,73 ± 0,78
6	48,90	97,81				
7	50,32	100,63				
8	49,89	99,78				
9	49,96	99,92				

Tabela 11 - Valores experimentais obtidos na determinação quantitativa da cloridrato de papaverina na amostra comercial por CLAE e análise estatística dos resultados

Amostra	Concentração cloridrato de papaverina (2,0 µg/mL)	Porcentual obtido %	Desvio padrão	Desvio padrão relativo DPR	DPR %	Intervalo de confiança
1	2,03	101,42				
2	1,99	99,66				
3	1,98	98,90				
4	1,95	97,60				
5	1,97	98,35	1,15	0,012	1,16	99,29 ± 0,88
6	1,97	98,35				
7	1,99	99,73				
8	2,01	100,29				
9	1,99	99,66				

Teste de recuperação para o método cromatográfico – Exatidão

As Tabelas 12 e 13 apresentam os resultados do teste de recuperação para a dipirona sódica e para o cloridrato de papaverina, respectivamente na Amostra comercial 1.

Tabela 12 - Resultados obtidos para o teste de recuperação pelo método cromatográfico para a dipirona sódica na Amostra 1.

Amostra	Quantidade de padrão adicionado (µg/mL)	Quantidade de padrão recuperado*(µg/mL)	Recuperação (%)
1	10,00	10,22	102,18
2	15,00	15,34	102,24
3	20,00	20,27	101,92

*média de três determinações

Tabela 13 - Resultados obtidos para o teste de recuperação pelo método

cromatográfico para o cloridrato de papaverina na Amostra 1.

Amostra	Quantidade de padrão adicionado (µg/mL)	Quantidade de padrão recuperado*(µg/mL)	Recuperação (%)
1	0,40	0,39	98,75
2	0,60	0,59	99,03
3	0,80	0,79	98,50

*média de três determinações

5.3.4 - Pesquisa de interferentes a partir de excipientes para a Amostra comercial 2

Especificidade

A Figura 17 mostra os cromatogramas do placebo – Amostra 5 (A), padrão de dipirona sódica (B) e Amostra 2 (C):

Figura 17 – Cromatogramas A – placebo Amostra 5, B - padrão de dipirona sódica a 50,0 $\mu\text{g/mL}$ ($t_r = 2,30$ min) e C – Amostra 2 contendo dipirona sódica a 50,0 $\mu\text{g/mL}$ ($t_r = 2,35$ min). Condições cromatográficas: Coluna cromatográfica: Supelcosil C18 - LCPH (250 mm X 4,6 mm, 5 μm) Supelco e pré – coluna C - 18 (20 X 4,6 mm, 5 μm) Supelco. Fase móvel: água:acetonitrila:metanol (70:20:10) trietilamina 0,3% e pH: 3,0. Vazão: 0,7 ml/min. Detecção no UV: 254 nm.

5.3.5 Aplicação do método padronizado à Amostra 2

Desvio padrão relativo – Precisão

Os valores experimentais obtidos na determinação quantitativa da amostra comercial (Amostra 2) de solução oral contendo dipirona sódica através da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) podem ser observados na Tabela 14.

Tabela 14 - Valores experimentais obtidos na determinação quantitativa da dipirona sódica na amostra comercial por CLAE e análise estatística dos resultados

Amostra	Concentração de dipirona sódica (50,0 µg/mL)	Porcentual obtido %	Desvio padrão absoluto	Desvio padrão relativo DPR	Desvio padrão relativo DPR %	Intervalo de confiança
1	50,10	100,20				
2	50,08	100,16				
3	50,10	100,20				
4	50,04	100,07				
5	50,09	100,17	0,071	0,000708	0,071	100,17 ± 0,06
6	50,13	100,26				
7	50,13	100,26				
8	50,11	100,22				
9	50,04	100,07				
10	50,04	100,07				

Teste de recuperação para o método cromatográfico – Exatidão

A Tabela 15 apresenta os resultados do teste de recuperação para a dipirona sódica na amostra comercial 2.

Tabela 15 - Resultados obtidos para o teste de recuperação pelo método cromatográfico para a dipirona sódica na Amostra 2

Amostra	Quantidade de padrão adicionado ($\mu\text{g/mL}$)	Quantidade de padrão recuperado* ($\mu\text{g/mL}$)	Recuperação (%)
1	10,0	10,11	101,10
2	15,0	15,04	100,23
3	20,0	20,01	100,07

*média de três determinações

5.4 Padronização do método cromatográfico para o cloridrato de papaverina em amostra isolada

5.4.1 Construção da curva analítica

A Figura 18 representa a curva analítica do cloridrato de papaverina. Os valores experimentais obtidos para a construção da curva de analítica são descritos na Tabela 16 e análise estatística na Tabela 17.

Figura 18 - Curva de calibração da cloridrato de papaverina. Concentrações de 8,0; 8,8; 9,6; 10,4; 11,2 e 12,0 µg/mL de cloridrato de papaverina. Condições cromatográficas: Coluna cromatográfica Merck LiChrospher® 100 RP - 18 (125 X 4,6 mm, 5µm). Fase móvel: água:acetonitrila:metanol (70:20:10) trietilamina 0,3% e pH: 3,0 ajustado com ácido ortofosfórico. Vazão: 1,0 ml/min. Detecção no UV: 254 nm.

Tabela 16 – Resultados experimentais obtidos na determinação da curva de calibração do cloridrato de papaverina, por cromatografia líquida de alta eficiência, empregando Coluna cromatográfica: Merck LiChrospher® 100 RP - 18 (125 X 4,6 mm, 5µm)

Concentração (µg/mL)	Área Média ^(a) (mV.min)
8,0	20231
8,8	22235
9,6	24100
10,4	26117
11,2	28505
12,0	30653

^(a)Média de três leituras

Tabela 17 - Análise estatística dos resultados obtidos na determinação da curva analítica do cloridrato de papaverina pela cromatografia líquida de alta eficiência

Parâmetros	Resultados obtidos
Intersecção da reta (a)	-742,10
Coeficiente angular (b)	2604,89
Desvio da intersecção da reta(a)	534,41
Desvio do coeficiente angular(b)	52,95
Coeficiente de correlação (r)	0,9992
Desvio padrão	177,20

5.4.2 Pesquisa de interferentes a partir de excipientes

Especificidade

A Figura 19 mostra os cromatogramas do placebo – Amostra 6 (A), padrão de cloridrato de papaverina(B) e amostra comercial – Amostra 3 (C):

Figura 19 – Cromatogramas A – placebo da solução injetável – Amostra 6, B - padrão de cloridrato de papaverina a 10,0 $\mu\text{g/mL}$ ($t_r = 4,40$ min) e C – Amostra 3 contendo cloridrato de papaverina a 10,0 $\mu\text{g/mL}$ ($t_r = 4,40$ min) . Condições cromatográficas: Coluna cromatográfica Merck LiChrospher® 100 RP - 18 (125 X 4,6 mm, 5 μm). Fase móvel: água:acetonitrila:metanol (70:20:10) trietilamina 0,3% e pH: 3,0. Vazão: 1,0 mL/min. Detecção no UV: 254 nm.

5.4.3 Aplicação do método padronizado à Amostra 3

Desvio padrão relativo – Precisão

Os valores experimentais obtidos na determinação quantitativa da Amostra 3 de solução injetável contendo cloridrato de papaverina através da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) podem ser observados na Tabela 18.

Tabela 18 - Valores experimentais obtidos na determinação quantitativa do cloridrato de papaverina na Amostra 3 por CLAE e análise estatística dos resultados

Amostra	Concentração de cloridrato de papaverina (10,0 µg/mL)	Porcentual obtido %	Desvio padrão absoluto	Desvio padrão relativo DPR	Desvio padrão relativo DPR %	Intervalo de confiança
1	9,97	99,70				
2	9,98	99,80				
3	10,02	100,20				
4	10,13	101,30				
5	9,97	99,70	0,67	0,0069	0,67	100,12 ± 0,48
6	10,13	101,30				
7	9,95	99,50				
8	9,97	99,70				
9	10,04	100,40				
10	9,96	99,60				

Teste de recuperação para o método cromatográfico – Exatidão

A Tabela 19 apresenta os resultados do teste de recuperação para o cloridrato de papaverina na Amostra 3.

Tabela 19 - Resultados obtidos para o teste de recuperação pelo método cromatográfico para cloridrato de papaverina na Amostra 3.

Amostra	Quantidade de padrão adicionado (µg/mL)	Quantidade de padrão recuperado*(µg/mL)	Recuperação (%)
1	9,00	9,05	100,60
2	10,00	9,84	98,35
3	12,00	11,98	99,85

*média de três determinações

5.5 Ensaios preliminares utilizando a espectrofotometria no UV com aplicação do PLS para a análise de dipirona sódica e cloridrato de papaverina

Figura 20 – Espectro de absorção da dipirona sódica padrão a 20,0 $\mu\text{g/mL}$ em metanol. λ máximos: 234 e 263 nm.

Figura 21 - Espectro de absorção do cloridrato de papaverina padrão a 4,0 $\mu\text{g/mL}$ em metanol. λ máximo: 238 nm.

Figura 22 - Espectros de absorção no UV da dipirona sódica a 25,00 µg/mL (em preto), do cloridrato de papaverina a 1,00 µg/mL (vermelho) e do placebo (azul) em metanol

Figura 23 – Espectros de absorção no UV da dipirona sódica a 25,00 µg/mL (em verde), do cloridrato de papaverina a 1,00 µg/mL (preto) e do placebo (vermelho) em ácido clorídrico 0,1 M

Figura 24 – Espectros de absorção no UV (derivada de primeira ordem) da dipirona sódica a 25,00 $\mu\text{g/mL}$ (em azul) e do cloridrato de papaverina a 1,00 $\mu\text{g/mL}$ (vermelho) em metanol – Figura construída pelo programa MATLABTM a partir dos espectros diretos da dipirona sódica e do cloridrato de papaverina.

5.5.1 Pesquisa de interferentes a partir de excipientes

Especificidade

A Figura 25 mostra o espectro do placebo – Amostra 4, do padrão de cloridrato de papaverina e da amostra comercial – Amostra 1:

Figura 25 – Espectros de absorção no UV do padrão de dipirona sódica a 25,0 µg/mL e do cloridrato de papaverina a 1,0 µg/mL em associação; da amostra comercial – Amostra 1 e do placebo – Amostra 4. Solvente: metanol.

Aplicação do método padronizado à Amostra 1

Desvio padrão relativo – Precisão

Os valores experimentais obtidos na determinação quantitativa da amostra comercial (amostra 1) de solução oral contendo dipirona sódica e cloridrato de papaverina através da espectrofotometria no UV, com aplicação do PLS podem ser observados nas Tabelas 20 e 21.

Tabela 20 - Valores experimentais obtidos na determinação quantitativa da dipirona sódica na amostra comercial por espectrofotometria no UV com aplicação da quimiometria e análise estatística dos resultados

Amostra	Concentração de dipirona sódica (25,0 µg/mL)	Porcentual obtido %	Desvio padrão absoluto	Desvio padrão relativo DPR	DPR %	Intervalo de confiança
1	24,49	97,95				
2	24,71	98,82				
3	24,64	98,55				
4	25,11	100,44				
5	24,99	99,97				
6	24,40	97,62	1,04	0,011	1,05	99,02 ± 0,80
7	24,70	98,78				
8	24,64	98,57				
9	25,11	100,44				

Tabela 21 - Valores experimentais obtidos na determinação quantitativa do cloridrato de papaverina na amostra comercial por espectrofotometria no UV com aplicação do PLS e análise estatística dos resultados

Amostra	Concentração de cloridrato de papaverina (1,0 µg/mL)	Porcentual obtido %	Desvio padrão absoluto	Desvio padrão relativo DPR	DPR %	Intervalo de confiança
1	0,96	96,00				
2	0,97	97,00				
3	0,98	98,00				
4	0,99	99,00				
5	1,00	100,00	1,53	0,016	1,55	98,48 ± 1,18
6	0,97	97,00				
7	0,99	99,00				
8	1,00	100,00				
9	1,002	100,20				

Teste de recuperação para o método espectrofotométrico – Exatidão

As Tabelas 22 e 23 apresentam os resultados do teste de recuperação para a dipirona sódica e para o cloridrato de papaverina, respectivamente na amostra comercial 1.

Tabela 22 - Resultados obtidos para o teste de recuperação pelo método espectrofotométrico para a dipirona sódica na Amostra 1.

Amostra	Quantidade de padrão adicionado (µg/mL)	Quantidade de padrão recuperado*	Recuperação (%)
1	2,50	2,37	97,10
2	5,00	4,77	95,30
3	7,50	7,14	95,20

*média de três determinações

Tabela 23 - Resultados obtidos para o teste de recuperação pelo método

espectrofotométrico para o cloridrato de papaverina na amostra comercial 1.

Amostra	Quantidade de padrão adicionado ($\mu\text{g/mL}$)	Quantidade de padrão recuperado* ($\mu\text{g/mL}$)	Recuperação (%)
1	0,10	0,095	95,1
2	0,20	0,189	94,6
3	0,30	0,288	96,0

*média de três determinações

A Tabela 24 mostra algumas figuras de mérito que foram calculadas pelo programa MATLABTM.

Tabela 24 – Figuras de mérito usando o PLS e calculadas pelo programa MATLABTM

Figura de mérito	Dipirona sódica	Cloridrato de papaverina
R^2	0.9982	0.9970
Sinal ruído (S/N)		
mínimo	50.4480	19.1753
máximo	114.6085	116.2875
Sensibilidade (SEN)	0,002	0,024
RMSEP*	0,5709	0,0163

* Root Mean Square Error of Prediction (raiz quadrada dos erros médios quadrados de previsão)

5.6 Comparação estatística dos métodos de cromatografia líquida (CLAE) e espectrofotometria na região do ultravioleta (UV) com aplicação do PLS

As Tabelas 25, 26, 27 e 28 apresentam os parâmetros estatísticos envolvidos nos cálculos efetuados para a comparação da precisão e da exatidão dos métodos propostos, para a determinação de dipirona sódica e cloridrato de papaverina em Amostra comercial.

Tabela 25 – Resultados experimentais obtidos a partir da determinação de dipirona sódica e cloridrato de papaverina em Amostra comercial.

Fármaco	Parâmetro estatístico	Espectrofotometria UV/PLS	Cromatografia Líquida de alta eficiência (CLAE)
dipirona sódica	$\bar{X}$	99,02	99,74
	S	1,035	1,008
	n	9	9
cloridrato de papaverina	$\bar{X}$	98,48	99,29
	S	1,528	1,1504
	n	9	9

$\bar{X}$ = média dos valores experimentais obtidos na determinação do teor de dipirona sódica e cloridrato de papaverina em solução oral em %

S = desvio padrão

n = número de determinações

Tabela 26 – Resultados obtidos na comparação da média dos métodos propostos para a determinação de dipirona sódica e cloridrato de papaverina na Amostra 1

Fármaco	Métodos Espectrofotometria UV/PLS e CLAE Valor calculado de t
dipirona sódica	1,495
cloridrato de papaverina	1,271

Valor da Tabela t de student para 16 graus de liberdade e P = 95% é 2,12.

Tabela 27 – Resultados obtidos na comparação da precisão dos métodos propostos para a determinação de dipirona sódica e cloridrato de papaverina na Amostra 1.

Fármaco	Métodos Espectrofotometria UV/PLS e CLAE Valor calculado de F
dipirona sódica	1,054
cloridrato de papaverina	0,567

Valor da Tabela F de Snedecor, 8/8 graus de liberdade e P = 95% é 4,43.

Tabela 28 – Resultados obtidos na comparação da exatidão dos métodos propostos para a determinação de dipirona sódica e cloridrato de papaverina na Amostra 1.

Fármaco	Métodos
	Espectrofotometria UV/Quimiometria e CLAE
	Valor calculado de t
dipirona sódica	10,59
cloridrato de papaverina	6,79

Valor da Tabela t de student para 2 graus de liberdade e P = 95% é 4,30.

6 DISCUSSÃO

6.1. Aspectos Gerais

A dor é uma sensação desagradável e às vezes insuportável, que atinge toda a humanidade, desde a sua existência, pode atingir crianças, adultos e idosos. A dor é a causa principal de sofrimento, incapacitação para o trabalho e ocasiona graves conseqüências psicossociais e econômicas. Com a ação de fármacos, principalmente os analgésicos, temos conseguido muitas vezes superar a dor.

Os analgésicos são um dos medicamentos mais consumidos por todo o mundo. No Brasil há um alto consumo de analgésicos na forma isolada ou em associação com outros fármacos

Dentre estes medicamentos está a dipirona sódica, que é um medicamento muito utilizado em todo o Brasil, e em muitos outros países, tanto na sua forma isolada, quanto em associação. Sua monografia não consta da Farmacopéia Americana. Alguns artigos expressam que a dipirona não é comercializada nos Estados Unidos, pois foram os alemães que a sintetizaram. Pesquisadores americanos alegam que a dipirona causa agranulocitose e anemia aplástica, mas segundo dados do Painel de Segurança do uso da dipirona, realizado em Brasília – DF, no Brasil, não há comprovações científicas para retirar a dipirona do mercado, pois houve casos de pessoas que tiveram essas doenças, utilizando outros analgésicos, como o ácido acetil salicílico, o paracetamol e outros. Acredita-se que algumas pessoas já tenham predisposição a ter anemia aplástica e agranulocitose, ou que sejam pessoas que fazem uso indiscriminado desse medicamento e de outros analgésicos que em excesso possam causar discrasias sangüíneas. (BENSENOR, I.M., 2001).

A dipirona sódica é um medicamento muito polêmico, mas continua sendo um dos analgésicos mais utilizados em todo o mundo, faz parte da lista dos dez medicamentos mais vendidos no Brasil.

O cloridrato de papaverina é um fármaco derivado do ópio, como a morfina, mas não causa efeito entorpecente. Sua ação farmacológica mais explorada é a antiespasmódica, porém pode ser utilizado em casos de disfunção erétil e outros distúrbios vasculares.

A dipirona sódica em associação com o cloridrato de papaverina resulta em um medicamento muito utilizado para o alívio de dores, causadas principalmente por cólicas renais, biliares e menstruais.

Os compêndios oficiais praticamente não apresentam metodologias analíticas para medicamentos em associação.

Consultando a literatura científica não encontram-se metodologias analíticas para a determinação simultânea da dipirona sódica e cloridrato de papaverina. Somente foi verificado um trabalho em que analisou-se amostras contendo papaverina e dipirona sódica, mas a dipirona passou por um processo de extração, pois o objetivo era quantificar somente a papaverina, que foi determinada por espectrofotometria no UV, mas não houve determinação da dipirona (MOUSSA, A.F.A,1978).

Atualmente as metodologias oficiais para o doseamento de dipirona sódica é a titulação iodométrica, que consta tanto da Farmacopéia Britânica quanto da Farmacopéia Brasileira. Para o doseamento do cloridrato de papaverina as metodologias são a potenciometria, que consta em sua monografia na Farmacopéia Britânica e a titulação em meio não aquoso pela Farmacopéia Brasileira. Ainda na Farmacopéia Britânica é descrito o teste de doseamento por CLAE para um medicamento injetável que contém a associação de papaverina, morfina e codeína.

O objetivo deste trabalho foi desenvolver metodologias analíticas para medicamentos que contém dipirona sódica e cloridrato de papaverina, isolados e em associação.

As matérias-primas dipirona sódica e cloridrato de papaverina foram submetidas aos testes farmacopêicos contidos na Farmacopéia Britânica para poderem ser utilizadas como substância química de referência. Através dos resultados apresentados pelas Tabelas 4 e 5 pôde-se utilizá-las com essa finalidade. Foram aplicados como teste de identificação a avaliação dos espectros de absorção no UV, as matérias-primas mostraram resultados condizentes com a literatura.

Foram desenvolvidas as metodologias analíticas para a determinação simultânea de dipirona e papaverina através da CLAE e espectrofotometria no UV com aplicação da calibração multivariada. A CLAE também foi utilizada para a determinação de dipirona e papaverina em medicamentos que contém estes fármacos isolados.

6.2 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Para a realização dos testes envolvendo a CLAE, foi utilizado um equipamento mais simples, que não possui sistema gradiente, nem arranjo de fotodiodos. Com o objetivo de se chegar a condições adequadas e possíveis de serem padronizadas e validadas foram testadas diferentes fases móveis, vários comprimentos de onda e algumas colunas cromatográficas.

As colunas cromatográficas testadas, são colunas de fase reversa comumente encontradas em laboratórios químicos e farmacêuticos que fazem análise de rotina, não são colunas tão caras e podem ser utilizadas para a análise de inúmeras substâncias.

Inicialmente foram testadas diferentes condições cromatográficas com a Coluna Merck LiChrospher® 100 RP - 8 (125 X 4,6 mm, 5µm). Fases móveis contendo soluções tampão foram usadas no intuito de aprimorar condições já padronizadas e publicadas em artigos científicos, mas não foram obtidos bons resultados. A fase móvel que mostrou melhores resultados foi a mistura de água: acetonitrila:metanol nas respectivas proporções 70:20:10. Misturas de água com os solventes acetonitrila e metanol são as de primeira escolha quando se está padronizando uma metodologia de cromatografia líquida com coluna de fase reversa. Houve uma variação de pH de 3,0 até 5,5 e ficou constatado que para uma melhor separação entre a dipirona e a papaverina, o pH deve manter próximo de 3,0. A trietilamina, que provoca um pareamento iônico, tirou a cauda que aparecia nos picos da papaverina. Os cromatogramas que merecem comentários mais relevantes podem ser visualizados no capítulo de Resultados. Observando-se a Figura 7 pode se verificar que o uso de tampão de acetato de sódio 0,01 M, pH = 5,5 e detecção no UV a 285 nm, provocou a separação da dipirona em dois picos e a papaverina ficou retida por quase 19 minutos. Já pela Figura 8 observa-se uma separação da dipirona em dois picos, utilizando-se na fase móvel tampão acetato de amônio.

Posteriormente foram analisadas diferentes condições cromatográficas com a coluna Merck LiChrospher® 100 RP - 18 (125 X 4,6 mm, 5µm). Foram testadas fases móveis contendo diferentes proporções da mistura água, acetonitrila e metanol, foi acrescentado tampão fosfato nesta mistura, variou-se o pH de 3,0 até 6,86, a detecção no UV manteve em 254 nm. Através da Figura 7, onde a fase móvel

continha mistura de água e acetonitrila, sem metanol, a dipirona apresentou dois picos mal definidos, um deles com baixíssimo tempo de retenção, provavelmente próximo do volume morto da coluna. Na Figura 8, pode se verificar que valor de pH em torno de 6,5, a papaverina permanece retida na coluna, mesmo após vinte minutos de corrida.

Foram testadas poucas condições com a coluna Nova Pack C18® (300 x 3,9mm), mas pôde-se constatar que colunas de comprimento menor, ou seja, próximo de 125 mm, não são favoráveis para a análise de dipirona, pois ela se divide em dois picos. Pela Figura 11, observa-se um bom tempo de retenção para a dipirona, com um pico bem definido, mas para a papaverina o tempo de retenção foi muito alto e o pico apresentou-se com cauda, podendo ser pela ausência de trietilamina.

Finalmente foi testada uma coluna com tamanho intermediário, a coluna cromatográfica Supelcosil C18 LC - PAH (250 mm X 4,6 mm , 5µm) e pré – coluna C 18 (20 X 4,6 mm, 5µm) e os outros parâmetros foram: fase móvel: água:acetonitrila:metanol (70:20:10) trietilamina 0,3% e pH: 3,0 ajustado com ácido ortofosfórico; vazão de 0,7 mL/min e detector de UV a 254 nm.

Conseguiu-se, através desta coluna a padronização e a validação da metodologia analítica para a determinação simultânea da dipirona sódica e cloridrato de papaverina. A fase móvel já tinha sido ajustada com o uso de outras colunas. A detecção no UV a 254 nm foi confirmada traçando-se os espectros de soluções contendo dipirona sódica e cloridrato de papaverina em fase móvel, separadamente, por espectrofotometria na região do UV. Pela observação dos espectros pôde-se confirmar que a detecção em 254 nm para a CLAE é a mais adequada, pois os dois compostos têm picos máximos de absorção nesta região. Foi possível uma boa separação cromatográfica para os dois fármacos, picos bem definidos, com tempos de retenção de 2,30 minutos para a dipirona e 8,68 minutos para papaverina, mostrando a rapidez desta metodologia. Os resultados obtidos pela construção das curvas analíticas, mostraram que a metodologia apresenta linearidade, com valores de correlação linear $r = 0,99881$ para a dipirona sódica e de $0,99939$ para o cloridrato de papaverina (Figuras 14 e 15). A especificidade do método pode ser verificada pela não interferência dos excipientes (Figura 17). O método apresentou precisão, com os resultados de desvio padrão relativo de 1,01% para a dipirona e 1,16% para a papaverina. A exatidão da metodologia pode ser verificada pelos

valores do teste de recuperação, média de 102,11% para a dipirona e 98,76% para a papaverina.

Essa metodologia padronizada e validada foi aplicada à análise do medicamento contendo dipirona sódica isolada. Não houve interferência dos excipientes, comprovando a especificidade do método (Figura 14). A precisão foi determinada pelo valor de desvio padrão relativo de 0,0708%. A exatidão do método foi verificada pela média de recuperação de 100,47%.

Para a determinação de cloridrato de papaverina na forma farmacêutica injetável, foi padronizada e validada a CLAE com os seguintes parâmetros: Coluna cromatográfica Merck LiChrospher® 100 RP - 18 (125 X 4,6 mm, 5µm); vazão: 1,0 mL/min; detecção no UV: 254 nm. O tempo de retenção foi de 4,40 minutos, mais rápido que o tempo da metodologia por CLAE para a determinação simultânea com dipirona, tornando essa metodologia mais vantajosa quando o cloridrato de papaverina for analisado na forma isolada. A metodologia apresentou linearidade com valor de $r = 0,99917$, os excipientes não interferiram no método, comprovando a especificidade do método, a precisão foi verificada pelo valor de desvio padrão relativo de 0,669% e a exatidão pela média de recuperação de 99,6%.

6.2 Espectrofotometria no ultravioleta (UV) com aplicação do PLS

Analizando os espectros de absorção no UV de soluções de dipirona sódica e cloridrato de papaverina em metanol (Figuras 20 e 21), separadamente, pôde-se observar que através dessa metodologia não seria possível analisar os dois fármacos simultaneamente, pois nos picos máximos de cada um, o outro fármaco também absorve. Para possibilitar o uso desta metodologia foi aplicada a calibração multivariada, utilizando o método PLS (Partial Least Squares) ou método dos mínimos quadrados parciais sobre os dados fornecidos pelos espectros de absorção da mistura dos dois fármacos na faixa de comprimento de onda de 210 a 300 nm, com intervalo de 0,5 nm. Todos os dados provenientes dos espectros foram tratados pelo programa MATLABTM, por isso pode-se dizer que foi aplicada a quimiometria neste trabalho, pois quimiometria é uma área que se refere à aplicação de métodos estatísticos e matemáticos, assim como aqueles baseados em lógica matemática, a problemas de origem química. A quimiometria e a calibração multivariada, têm sido

usadas por diversos pesquisadores para um melhor aproveitamento de dados gerados por análises químicas e farmacêuticas, principalmente em métodos espectroscópicos, como a absorção no UV e infravermelho.

Durante a escolha do melhor solvente, foram preparadas soluções de dipirona sódica, cloridrato de papaverina e do placebo (Amostra 6) nos solventes metanol e ácido clorídrico 0,1 M. Com o uso do solvente metanol, não houve praticamente interferência dos excipientes, sendo este o solvente escolhido.

A validação de metodologias que aplicam a calibração multivariada está em fase de estudo, ainda não é uma técnica reconhecida pelos compêndios oficiais como as farmacopéias, mas existem inúmeras publicações em periódicos importantes para a área química e farmacêutica, utilizando essa técnica.

Foi preparado um modelo da calibração e foram realizadas leituras de 25 soluções contendo misturas desses dois fármacos. Os resultados obtidos foram tratados pelo programa MATLABTM.

Durante a análise dos resultados pelo programa MATLABTM, constatou-se que uma diminuição no intervalo de leitura para 218,5 a 300 nm e a aplicação da espectrofotometria derivada de primeira ordem sobre os espectros (Figura 24), possibilitou um melhor aproveitamento dos dados e aumentou-se a sensibilidade do método.

A metodologia foi padronizada e validada. Os valores de correlação linear foram calculados pelo programa MATLABTM, sendo $r = 0,9998$ para a dipirona sódica e $r = 0,9976$ para o cloridrato de papaverina. A especificidade do método foi confirmada pela ausência de interferência dos excipientes (Figura 23). A precisão do método foi comprovada pelos valores de desvio padrão relativo de 1,05% para a dipirona sódica e 1,55% para o cloridrato de papaverina. A exatidão verificada pelas médias de recuperação, sendo 95,87% para a dipirona sódica e 95,2 para o cloridrato de papaverina. Foram calculadas algumas figuras de mérito por este programa, comprovando a sensibilidade do método (Tabela 24).

6.3. Comparação estatística dos resultados

Os resultados de média e precisão das duas metodologias comparadas foram calculados estatisticamente seguindo diversos autores. (PRADO, M.S.A. et. al., 2005; FEIGENBAUM, A.V., 1994 e OHLWEILER, O.A., 1976).

Para a comparação das médias dos valores de teor das amostras e sobre a precisão chegou-se às seguintes constatações:

- sendo $t_{\text{calculado}} < t_{\text{tabelado}}(1,495 < 2,12)$ para a dipirona sódica, pode aceitar - se que as médias dos dois métodos são iguais e portanto as médias dos dois métodos(CLAE e Espectrofotometria UV) não apresentam diferença significativa para a dipirona sódica;
- sendo $t_{\text{calculado}} < t_{\text{tabelado}}(1,271 < 2,12)$ para o cloridrato de papaverina, pode aceitar - se que as médias dos dois métodos são iguais e portanto as médias dos dois métodos(CLAE e Espectrofotometria UV) não apresentam diferença significativa para o cloridrato de papaverina;
- como $F_{\text{calculado}} < F_{\text{tabelado}}(1,054 < 4,43)$ para a dipirona sódica, pode aceitar - se que as variâncias dos dois métodos são iguais e portanto os métodos(CLAE e Espectrofotometria UV) não apresentam diferença significativa na precisão para a dipirona sódica;
- como $F_{\text{calculado}} < F_{\text{tabelado}}(0,567 < 4,43)$ para o cloridrato de papaverina, pode aceitar - se que as variâncias dos dois métodos são iguais e portanto os métodos(CLAE e Espectrofotometria UV) não apresentam diferença significativa na precisão para o cloridrato de papaverina.

A comparação estatística dos resultados de exatidão obtidos pelo teste de recuperação foi realizada seguindo dados da literatura. (MILLER, J.C.; MILLER, J.N., 1993). Usou-se o teste t e verificou-se que:

- como $t_{\text{calculado}} > t_{\text{tabelado}}(10,59 > 4,30)$ para a dipirona sódica, pode aceitar - se que as médias de recuperação dos dois métodos são diferentes e portanto os métodos(CLAE e Espectrofotometria UV) apresentam diferença significativa na exatidão para a dipirona sódica;
- como $t_{\text{calculado}} > t_{\text{tabelado}}(6,79 > 4,30)$ para o cloridrato de papaverina, pode aceitar - se que as médias de recuperação dos dois métodos são diferentes e portanto os métodos(CLAE e Espectrofotometria UV) apresentam diferença significativa na exatidão para o cloridrato de papaverina.

Pela comparação dos métodos verifica-se que os dois podem ser usados para a determinação simultânea de dipirona sódica e cloridrato de papaverina em formulações farmacêuticas, mas como a calibração multivariada está em fase de implantação de sua validação, pode ser necessário fazer alguns ajustes a este método. Porém já pode ser considerado um método alternativo para laboratórios que analisam esses tipos de medicamentos.

7. CONCLUSÕES

- A CLAE através dos resultados de desvio padrão relativo, teor de recuperação, interferência dos excipientes e coeficiente de correlação linear apresentou precisão, exatidão, especificidade e linearidade para a determinação simultânea de dipirona sódica e cloridrato de papaverina na formulação farmacêutica solução oral (Amostra 1) ;
- A Espectrofotometria no UV com a aplicação da calibração multivariada através dos resultados de desvio padrão relativo, teor de recuperação, interferência dos excipientes e coeficiente de correlação linear apresentou precisão, exatidão, especificidade e linearidade para a determinação simultânea de dipirona sódica e cloridrato de papaverina na formulação farmacêutica solução oral (Amostra 1);
- Para a determinação de dipirona sódica na formulação farmacêutica solução oral (Amostra 2) contendo somente este fármaco foi utilizada a CLAE já padronizada para a determinação simultânea de dipirona sódica e cloridrato de papaverina, com ótimos resultados de desvio padrão relativo, teor de recuperação, interferência dos excipientes, apresentando precisão, exatidão e especificidade;
- A CLAE através dos resultados de desvio padrão relativo, teor de recuperação, interferência dos excipientes e coeficiente de correlação linear apresentou precisão, exatidão, especificidade e linearidade para a determinação do cloridrato de papaverina na formulação farmacêutica injetável (Amostra 3) ;
- A comparação estatística dos métodos para a determinação simultânea de dipirona sódica e cloridrato de papaverina pode-se observar que não existe diferença significativa nas médias de teores e na precisão, mas há diferença significativa na exatidão para um nível de significância de 95%;

- A calibração multivariada, através da aplicação do PLS foi uma técnica que possibilitou um maior aproveitamento dos dados gerados pela espectrofotometria no UV para a determinação simultânea de dipirona sódica e cloridrato de papaverina;
- Todos os métodos propostos podem ser aplicados para a análise de rotina de formulações farmacêuticas que contenham dipirona sódica e cloridrato de papaverina isolados ou em associação.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

ABDEL-GHANI, N.T.; SHOUKRY, A.F.; ISSA, Y.M.; WAHDAN, O.A. Spectrophotometric determination of meclozine HCl and papaverine HCl in their pharmaceutical formulations. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, Amsterdam, v.28, p.373-378, 2002.

ABDOU, H.; HANNA, S.; MUHAMMAD, N. Métodos instrumentais de análise. In: REMINGTON: a ciência e a prática da farmácia. 20.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. cap.34, p.633-673.

ABOUNASSIF, M.A.; GAD-KAREIM, E.A.; WAHBI, A.M. High-performance liquid chromatography. **Farmaco**, Paris, v.45, n.4, p.465-472, 1990.

ABURJAI, T.; AMRO, B.I.; AIEDEH, K.; ABUIRJEIE, M.; AL-KHALIL, S. Second derivative ultraviolet spectrophotometry and HPTLC for the simultaneous determination of vitamin C and dipyrrone. **Pharmazie**, Eschborn, v.55, n.10, p.751-752, 2000.

ALTUN, M.L. HPLC method for the analysis of paracetamol, caffeine and dypirone. **Turk. J. Chem.**, Ankara, v.26, p.521-528, 2002.

*As referências bibliográficas estão de acordo com a norma NBR6023/2000 preconizada pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), e as abreviaturas dos títulos dos periódicos seguem o Chemical Abstracts Service Source Index (CASSI) 2004.

ALVES, D.; DUARTE, I. Involvement of ATP-sensitive K(+) channels in the peripheral antinociceptive effect induced by dipyrrone. **Eur. J. Clin. Pharmacol.**, Heidelberg, v.444, p.47-52, 2002.

ANDRADE, M.P Aspectos atuais do uso da dipirona no tratamento da dor. **Prát. Hosp.**, São Paulo, v.7, n.40, 2005. Disponível em: <http://www.praticahospitalar.com.br/pratica%2040/pgs/materia%2022-40.html>. Acesso em: 01 out. 2005.

ASMARDI, G.; JAMALI, F. High-performance liquid chromatography of dipyrrone and its active metabolite in biological fluids. **J. Chromatogr.**, Amsterdam, v.277, p.183-189, 1983.

AYYANGAR, N.R.; BHIDE, S.R. Separation of eight alkaloids and meconic acid and quantitation of five principal alkaloids in gum opium by gradient reversed-phase high-performance liquid chromatography. **J. Chromatogr.**, Amsterdam, v.436, p.455-465, 1988.

BENSENOR, I.M. To use or not use dipyrrone? Or maybe, Central Station versus ER? That is the question. **São Paulo Med. J.**, São Paulo, v.119, p.190-191, 2001.

BERLIN, C. Are we losing good drugs? **Clin. Pediatr.**, Hagerstown, v.40, p.325-326, 2001.

- BIGAL, M.E.; BORDINI, C.A.; SPECIALI, J.G. Intravenous dipyrone for the acute treatment of episodic tension-type headache: a randomized, placebo-controlled, double-blind study. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, Ribeirão Preto, v.35, n.10, p.1139-1145, 2002.
- BJORNSDOTTIR, I., HANSEN, S.H. Determination of opium alkaloids in crude opium using non-aqueous capillary electrophoresis. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, Amsterdam, v.13, p.1473-1481, 1995.
- BOBERIC BOROJEVIC, D.; RADULOVIC, D.; IVANOVIC, D.; RISTIC, P. Simultaneous assay of ephedrine hydrochloride, theophylline, papaverine hydrochloride and hydroxyzine hydrochloride in tablets using RP-LC. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, Amsterdam, v.21, n.1, p.15-22, 1999.
- BRAGA, J.W.B.; POPPI, R.J. Validação de modelos de calibração multivariada: uma aplicação na determinação de pureza polimórfica de carbamazepina por espectroscopia no infravermelho próximo. **Quím. Nova**, São Paulo, v.27, n.6, p.1004-1011, 2004.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Áreas de Atuação. Medicamentos. Relação Nacional de medicamentos essenciais. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/essencial.htm>. Acesso em: 27 ago. 2005.
- BRERETON, R.G. Introduction to multivariate calibration in analytical chemistry. **Analyst**, Cambridge, v.125, p.2125, 2000.

BRITISH Pharmacopeia. London: Her Majesty's Stationary Office, 2002. v.1, 2, 2623 p.

BUCHALLA, A.P.; POLES, C. Os avanços da ciência no combate à dor crônica, mal que aflige seis em cada dez brasileiros. Disponível em: <http://www.vejaonline.abril.uol.com.br>. Acesso em: 06 fev. 2002.

BUDVARI-BARANY, Z.; SZÁSZ, G.; GYIMESI-FORRÁS, K. Optimized and validated hplc methods for compendial quality assessment. II. Opium alkaloids. **J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.**, Philadelphia, v.20, n.19, p.3257-3268, 1997.

CAMU, F.; VANLERSBERGHE, C. Pharmacology of systemic analgesics. **Best Pract. Res., Clin. Anaesthesiol.**, Amsterdam, v.16, n.4, p.475-488, 2002.

CARDOSO, T.F.M.; KANIS, L.A.; SILVA, W.B.; GALATO, D. Doseamento da dipirona por espectroscopia de ultravioleta em diferentes solventes. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 23, Poços de Caldas, 2000. **Livro de resumos**. Poços de Caldas: Sociedade Brasileira de Química, 2000. res.QA084.

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

CIOLA, R. **Fundamentos da cromatografia a líquido de alto desempenho**: HPLC. São Paulo: Edgard Blücher, 1998. 179p.

CHIVANOV, V.D.; EREMENKO, I.A.; AKSENOV, S.A.; GREBENIK, L.I. EREMENKO, V.I.; KALINICHENKO, T.G.; TATARINOVA, V.I.; ZDOIMA, N.G.; SKLYAROVA, Z.V., KURAEV, V.V.; KNYSH, A.N.; MISHNEV, A.K. Rapid method for detecting papaverine in biological fluids by plasma desorption mass spectrometry with ionization by ^{252}Cf fission fragments. **Anal. Chem.**, Columbus, v.52, n.9, p.902-905, 1997.

CLARKE, E.C.G. **Clarke's isolation and identification of drugs in pharmaceutical body fluids and post-mortem material**. 2.ed. London: Pharmaceutical Press, 1986. p.563.

DEF 2003/2004: dicionário de especialidades farmacêuticas. 32.ed. Rio de Janeiro: EPUC, 2004. p.120, 252, 740.

DEF 2005/2006: dicionário de especialidades farmacêuticas. 34.ed. Rio de Janeiro: EPUC, 2006. p.37, 106, 120.

DINÇ, E.; BALEANU, D.; ONUR, F. Spectrophotometric multicomponent analysis of mixture of metamizol, acetaminophen and caffeine in pharmaceutical formulations by two chemometrics techniques. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, Amsterdam, v.26, n.5, p.949-957, 2001.

DINÇ, E.; ONUR, F. Application of a new spectrophotometric method for the analysis of a ternary mixture containing metamizol, paracetamol and caffeine in tablets. **Anal. Chim. Acta**, Amsterdam, v.359, p.93-106, 1998.

- DOGAN, H.N. Simultaneous determination of acetaminophen, dipyron and caffeine in pharmaceutical preparations by the absorbance ratio technique. **Pharmazie**, Eschborn, v.51, n.10, p.773-774, 1996.
- EDDINE, N.H.; BRESSOLE, F.; MANDROU, B.; FABRE, H. Stability indicating assay for dipyron. Part II. Separation and quantitative determination of dipyron and its degradation products by high-performance liquid chromatography. **Analyst**, Cambridge, v.107, p.67-70, 1982.
- EDWARDS, J.E.; MCQUAY, H.J. Dypirone and agranulocytosis. **Lancet**, London, v.360, p.1438, 2002. [Letter].
- EL-GINDY, A. HPLC and chemometric assisted spectrophotometric methods for simultaneous determination of diprophylline, phenobarbitone and papaverine hydrochloride. **Farmaco**, Paris, v.60, n.9, p.745-753, 2005.
- ERGÜN, H.; FRATARELLI, D.A.C.; ARANDA, J.V. Characterization of the role of physicochemical factors on the hydrolysis of dypirone. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, Amsterdam, v.35, p.479–487, 2004.
- ERK, N.; ONUR, F. Simultaneous determination of analgine and paracetamol in tablets by spectrophotometric methods. **Anal. Lett.**, Philadelphia, v.30, n.6, p.1201-1210, 1997.

FABRE, H.; EDDINE, N.H.; BRESSOLE, F.; MANDROU, B. Stability indicating assay for dipyrone. Part I. Separation and quantitative determination of dipyrone and its degradation products by thin-layer chromatography. **Analyst**, Cambridge, v.107, p.61-66, 1982.

FARMACOPEIA Brasileira. 3.ed. São Paulo: Organização Andrei, 1977. p.315-317, 406-408.

FEIGENBAUM, A.V. **Controle de qualidade total**: métodos estatísticos aplicados à qualidade. São Paulo: Makron Books, 1994. p.288-289.

GARCIA-ALONSO, F.; GONZALES DES SUSO, M.J.; LOPEZ-ALVAREZ, M.; PALOP, R.; LUCENA, M.I.; MARIN, R. Comparative study of the efficacy of dipyrone, diclofenac sodium and pethidine in acute renal colic. **Eur. J. Clin. Pharmacol.**, Heidelberg, v.40, p.543-546, 1991.

GAUTAM, S.R.; NAHUM, A.; BAECHLER, J.; BOURNE, D.W.A. Determination of papaverine in plasma and urine by high-performance liquid chromatography. **J. Chromatogr.**, Amsterdam, v.182, n.3/4, p.482-486, 1980. [Note].

GAZETA Mercantil. Dipirone: analgésico mais vendido. Disponível em: <http://www.gazetamercantil.com.br/22/05/2001>. Acesso em: 12 maio 2003.

GOLKIEWICZ, W.; KUCZYNSKI, J.; MARKOWSKI, W.; JUSIAK, L. High-performance liquid chromatography of some alkaloids on unmodified silica gel with aqueous-organic solvent mixtures. **J. Chromatogr., A**, Amsterdam, v.686, n.1, p.85-91, 1994.

- GIRRESER, U.; HERMANN, T.W.; PIOTROWSKA, K. Oxidation and degradation products of papaverine. Part II [1]: Investigations on the photochemical degradation of papaverine solutions. **Arch. Pharm.**, Weinheim, v.336, n.9, p.401-405, 2003.
- HABASHY, G.M.; FARID, N.A. Thin-layer chromatographic method for separation and determination of papaverine and its oxidation products. **Talanta**, Amsterdam, v.20, p.699-702, 1973.
- HOOGEWIJS, G.; MICHOTTE, Y.; LAMBRECHT, J.; MASSART, D.L. High-performance liquid chromatographic determination of papaverine in whole-blood. **J. Chromatogr.**, Amsterdam, v.226, n.2, p.423-430, 1981.
- IBANEZ, L.; VIDAL, X.; BALLARIN, E.; LAPORTE, J.R. Agranulocytosis associated with dipyrrone (metamizol). **Eur. J. Clin. Pharmacol.**, Heidelberg, v.60, n.11, p.821-829, 2005.
- IZOLANI, A.O.; MORAES, M.T.; TÉLLEZ, C.A. Fourier transform Raman spectroscopy of drugs: quantitative analysis of 1-phenyl-2,3-dimethyl-5-pyrazolone-4-methylaminomethane sodium sulfonate: (dipyrrone). **J. Raman Spectrosc.**, Bognor Regis, v.34, p.837-843, 2003.
- KATZ, E.Z.; GRANIT, L.; DRAYER, D.E.; LEVY, M. Simultaneous determination of dipyrrone metabolites in plasma by high-performance liquid chromatography. **J.Chromatogr.**, Amsterdam, v.305, n.2, p.477-484, 1984. [Note].

- KESSELRING, G.L. Antipyretic effects of dipyrone versus ibuprofen versus acetaminophen in children: results of a multinational, randomized, modified double blind study. **Clin. Pediatr.**, Hagerstown, v.40, p.313-324, 2001.
- KOROLKOVAS, A.; BURCKHALTER, J.H. **Química farmacêutica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1988. p.181, 182, 193, 302, 303, 309, 399.
- KOROLKOVAS, A.; FRANÇA, F.F.A.C. **Dicionário terapêutico Guanabara**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. p.1.24-1,40; 6.5.
- LAU, O.-W.; MOK, C.-S. High-performance liquid chromatographic determination of active ingredients in cough-cold syrups with indirect conductometric detection. **J. Chromatogr., A**, Amsterdam, v.693, p.45-54, 1995.
- LEVY, M.; FLUSSER, D.; ZYLBER-KATZ, E.; GRANIT, L. Plasma kinetics of dipyrone metabolites in rapid and slow acetylators. **Eur. J. Clin. Pharmacol.**, Heidelberg, v.27, n.4, p.453-458, 1984.
- LINDBERG, W.; JOHANSSON, E.; JOHANSSON, K. Application of statistical optimization methods to the separation of morphine, codeine, noscapine and papaverine in reversed-phase ion-pair chromatography. **J. Chromatogr.**, Amsterdam, v.211, p.201-212, 1981.
- LIMA, J.L.F.C.; SÁ, S.M.O.; SANTOS, J.L.M.; ZAGATTO, E.A.G. Multi-pumping flow system for the spectrophotometric determination of dipyrone in pharmaceutical preparations. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, Amsterdam, v.32, p.1011-1017, 2003.

LIU, H.M.; TU, Y.K. The efficacy of papaverine administration by different routes for the treatment of experimental acute cerebral vasospasm. **J. Clin. Neurosci.**, Amsterdam, v.9, n.5, p.561-565, 2002.

LORENZETTI, B.B.; FERREIRA, S.H. Activation of the arginine-nitric oxide pathway in primary sensory neurones contributes to dipyrrone-induced spinal and peripheral analgesia. **Inflammation Res.**, Heidelberg, v.45, p.308-311, 1996.

LORENZETTI, B.B.; FERREIRA, S.H. Mode of analgesic action of dipyrrone: direct antagonism of inflammatory hyperalgesia. **Eur. J. Pharmacol.**, Amsterdam, v.114, p.375-381, 1985.

MAJLAT, P.; HELBOE, P.; KRISTENSEN, A.K. Separation and quantitative determination of homatropine methylbromide and opium alkaloids in admixture in pharmaceutical preparations by gas-liquid and high-performance liquid chromatography. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v.9, p.245-255, 1981.

MARQUEZ, J.O. Dor diagnostico e tratamento. v.1. Disponível em: <http://www.dor.org.br>. Acesso em: 07 set. 2005.

MAURICH, V.; MONEGHINI, M. Sepazione hplc della papaverina cloridrato dai suoi prodotti di degradazione papaveraldina e papaverinolo: determinazione quantitativa em fiale e granuli. **Boll. Chim. Farm.**, Milan, v.122, p.322-329, 1983.

MILLER, J.C.; MILLER, J.N. **Estadística para química analítica**. 2.ed. Delaware: Addison-Wesley Iberoamerican, 1993. 211p.

MIRZAEVA, K.A.; AKHMEDOVA, M.S.; RAMAZANOV, A.S.; AKHMEDOV, S.A. Extraction-photometric determination of dimedrol and papaverine in pharmaceutical dosage forms. **Anal. Chem.**, Columbus, v.59, n.3, p.215-218, 2004.

MORELLI, B. Determination of binary mixtures of analgesic and spasmolytic drugs in pure and dosage forms by derivative spectrophotometry. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, Amsterdam, v.33, p.423-433, 2003.

MOUSSA, A.F.A. Spectrophotometric determination of papaverine in some pharmaceutical preparations containing noramidopyrine methansulfonate sodium. **Pharmazie**, Eschborn, v.33, n.7, p.46-461, 1978.

MUÑOZ, R.A.A.; MATOS, R.C.; AGNES, L. Amperometric determination of dipyrone in pharmaceutical formulations with a flow cell containing gold electrodes from recordable compact discs. **J. Pharm. Sci.**, Hoboken, v.90, n.12, p.1972-1977, 2001.

NEUGEBAUER, V.; SCHAIBLE, H.G.; HE, X.; LÜCKE, T.; GÜNDLING, P.; SCHMIDT, R.F. Electrophysiological evidence for a spinal antinociceptive action of dipyrone. **Agents Actions**, Basel, v.41, p.62-70, 1994.

OHLWEILER, O.A. **Química analítica quantitativa**. 2.ed. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, 1976. v.1, p.346-358.

POSSO, I.; ABRAMOF, S.; CRISCUOLO, D. Comparative double-blind randomized study of the analgesic effect of three doses of dipyrone upon pain following abdominal surgery. In: WORLD CONGRESS ON PAIN, 8, Vancouver, 1996. **Abstracts**. Seattle: IASP Press, 1996. p.261.

PRADO, M.S.A.; STEPPE, M.; TAVARES, M.F.M.; KEDOR-HACKMAN, E.R.M.; SANTORO, M.I.R.M. Comparison of capillary electrophoresis and reserved-phase liquid chromatography methodologies for determination of diazepam in pharmaceutical tablets. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, v.37, n.2, p.273-279, 2005.

QUERSHI, S.Z.; SAEED, A.; HASAN, T. Spectrophotometric determination of novalgin in tablets by use of potassium iodate. **Talanta**, Amsterdam, v.36, n.8, p.869-871, 1989.

QUIMICA vs dor. In: UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA. Informações. **Rev. Eletrôn. QMCWEB**, ano.5. Disponível em: <http://quark.qmc.ufsc.br/qmcweb/artigos/dor/index.html>. Acesso em: 22 abr. 2005.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F.; MELO, L.F.C. Validação de métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Quím. Nova**, São Paulo, v.27, n.5, p.771-780, 2004.

RODRIGUEZ, M.; BARUTELL, C.; RULL, M.; GALVEZ, R.; PALLARES, J.; VIDAL, F.; ALIAGA, L. Efficacy and tolerance of oral dipyrone versus oral morphine for cancer pain. **Eur. J. Cancer**, Amsterdam, v.30A, p.584-587, 1994.

ROHDEWALD, P.; DREHSEN, G.; MILSMANN, E.; DERENDORF, H. Relationship between saliva levels of metamizol metabolites, bioavailability and analgesic efficacy.

Arzneim. Forsch., Aulendorf, v.33, n.7, p.985-988, 1983.

SACHS, D; CUNHA, F.Q.; FERREIRA, S.H. Peripheral analgesic blockade of hypernociception: activation of arginine/NO/cGMP/protein kinase G/ATP-sensitive K⁺ channel pathway. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, Washington, v.101, n.10, p.3680-3685, 2004.

SAKIARA, K.A.; PEZZA, L.; MELIOS, C.B.; PEZZA, H.R.; MORAES, M. Spectrophotometric determination of dipyrone in pharmaceutical preparations by using chromotropic acid. **Farmaco**, Paris, v.54, p.629-635, 1999.

SCHUG, S.A.; ZECH, D.; DÖRR, U. Cancer pain management according to WHO analgesic guidelines. **J. Pain Symptom Manage.**, New York, v.5, n.1, p.27-32, 1990.

SENA, M.M. **Aplicação de métodos quimiométricos de primeira e segunda ordem na determinação direta de fármacos por espectroscopia molecular**. Campinas, 2004. 122p. Dissertação de Mestrado – Instituto de Química – Universidade Estadual de Campinas.

SENYUVA, H.Z.; AKSAHIN, I.; OZCAN, S.; KABASAKAL, B.V. Rapid simple and accurate liquid chromatography-diode array detection validated method for the determination of dipyrone in solid and liquid dosage forms. **Anal. Chim. Acta**, Amsterdam, v.547, p.73-77, 2005.

SHAPIRO. Risks of agranulocytosis and aplastic anemia: a first report of their relation to drug use with special reference to analgesics. **JAMA, J. Am. Med. Assoc.**, Chicago, v.256, n.13, p.1749-1757, 1986.

SHESTEROVA, I.P.; KARIBYAN, E.E.; TURAEVA, S.Sh.; PENZINA, M.M. Ionometric determination of alkaloids. **Chem. Nat. Compd.**, Norwell, v.31, n.1, p.175-177, 1995.

SILVA, P. **Farmacologia**. 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. p.142, 433-453, 695-697.

SINGH, D.V.; PRAJAPATI, S.; BAJPAI, S.; VERMA, R.K.; GUPTA, M.M.; KUMAR, S. Simultaneous determination of important alkaloids in *Papaver somniferum* using reversed phase high performance liquid chromatography. **J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.**, Philadelphia, v.23, n.11, p.1757-1764, 2000.

SOCIEDADE BRASILEIRA PARA O ESTUDO DA DOR. DOR – Informações Gerais. Classificação. **DOR** – **Classificação**. Disponível em: http://www.dor.org.br/dor_classificacao.asp. Acesso em: 07 set. 2005.

SPACEK, A.; GORAJ, E.; NEIGER, F.X.; JAROSZ, J.; KRESS, H.G. Superior postoperative analgesic efficacy of a continuous infusion of tramadol and dipyrone (metamizol) versus tramadol alone. **Acute Pain**, Amsterdam, v.5, p.3-9, 2003.

SPIGSET, O.; HAGG, S. Analgesics and breast-feeding: safety considerations. **Paediatr. Drugs**, Auckland, v.2, p.223-238, 2000.

STANKOW, G.; SCHMIEDER, G.; LECHNER, F.J.; SCHINZEL, S. Observer-blind multicentre study with dipyrone versus tramadol in postoperative pain. **Eur. J. Pain**, Amsterdam, v.16, p.56-63, 1995.

SKOOG, D.A.; HOLLER, F.J.; NIEMAN, T.A. **Princípios de análise instrumental**. 5.ed. São Paulo: Bookman, 2002. p.276.

TEIXEIRA, M.J. Dor. In: SOCIEDADE BRASILEIRA PARA ESTUDO DA DOR. **Dor – Informações Gerais**. Disponível em: <http://www.dor.org.br>. Acesso em: 07 set. 2005.

TEMPEL, G.; VON HUNDELSHAUSEN, B.; REE-KER, W. The opiate-sparing effect of dipyrone in postoperative pain therapy with morphine using a patient-controlled analgesic system. **Intensive Care Med.**, Berlin, v.22, p.1043-1047, 1996.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS. Instituto de Química. Laboratório de Quimiometria em Química Analítica. Pesquisa. 1. Análise Multivariada: Análise Exploratória de Dados: Calibração Multivariada. **Métodos de calibração multivariada**. Disponível em: <http://laqqa.iqm.unicamp.br/calmutpg.htm>. Acesso em: 01 out. 2005.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS. Instituto de Química. Laboratório de Quimioterapia em Química Analítica. **Quimiometria**. Disponível em: <http://laqqa.iqm.unicamp.br/>. Acesso em: 01 out. 2005.

VAN TULDER, M.; KOES, B. Low back pain and sciatica. **Clin. Evid.**, London, v.6.

Disponível em: <http://www.clinicalevidenceonline.com>. Acesso em: 12 dez. 2001.

VAZQUEZ, E.; HERNANDEZ, N.; ESCOBAR, W.; VANEGAS, H. Antinociception induced by intravenous dipyrone (metamizol) upon dorsal horn neurons: Involvement of endogenous opioids at the periaqueductal gray matter, the nucleus raphe magnus, and the spinal cord in rats. **Brain Res.**, Amsterdam, v.1048, p.211-217, 2005.

VOGEL, A.I.; Análise química quantitativa / Arthur I. Vogel; revisão de J. Mendham et al.; tradução de Julio Carlos Afonso et al. 6.ed. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, 2002. p.351-354.

WEITHMANN, K.U.; ALPERMANN, H.G. Biochemical and pharmacological effects of dipyrone and its metabolites in model systems related to arachidonic acid cascade. **Arzneim. Forsch.**, Aulendorf, v.35-1, n.6, p.947-952, 1985.

YAN, J.; MI, J.-Q.; HE, J.-T.; GUO, Z.-Q.; ZHAO, M.-P.; CHANG, W.-B. Development of an indirect competitive ELISA for the determination of papaverine. **Talanta**, Amsterdam, v.66, p.1005-1011, 2005.