



UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
ESCOLA DE FARMÁCIA



Danielli Figueiredo Superbi

**DOSEAMENTO DE FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS DE LIBERAÇÃO
MODIFICADA DE DONEPEZILA**

OURO PRETO - MG

2023

Danielli Figueiredo Superbi

**DOSEAMENTO DE FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS DE LIBERAÇÃO
MODIFICADA DE DONEPEZILA**

Trabalho de conclusão de curso apresentado
ao curso de Farmácia, da Universidade
Federal de Ouro Preto, pela disciplina
Trabalho de Conclusão de Curso (FAR 007).

Orientador: Prof. Dr. André Luís Morais
Ruela

OURO PRETO - MG

2023

SISBIN - SISTEMA DE BIBLIOTECAS E INFORMAÇÃO

S959d Superbi, Danielli Figueiredo.
Doseamento de formulações farmacêuticas de liberação modificada de donepezil. [manuscrito] / Danielli Figueiredo Superbi. - 2023.
40 f.: il.: color., tab..

Orientador: Prof. Dr. André Luís Morais Ruela.
Monografia (Bacharelado), Universidade Federal de Ouro Preto.
Escola de Farmácia. Graduação em Farmácia .

1. Cromatografia a Líquido de alta eficiência. 2. Espectrofotometria ultravioleta. 3. Alzheimer, Doença de. 4. Donepezila. I. Ruela, André Luís Morais. II. Universidade Federal de Ouro Preto. III. Título.

CDU 543.54

Bibliotecário(a) Responsável: Soraya Fernanda Ferreira e Souza - SIAPE: 1.763.787



FOLHA DE APROVAÇÃO

Danielli Figueiredo Superbi

Doseamento de formulações de liberação modificada de donepezila

Monografia apresentada ao Curso de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Farmácia

Aprovada em 15 de setembro de 2023

Membros da banca

Prof Dr André Luís Morais Ruela - Orientador - Universidade Federal de Ouro Preto
Mestranda PPG CiPharma - Farmacêutica Lorena Kelly Santiago Ramos - Universidade Federal de Ouro Preto
Doutoranda PPG CiPharma - MSc Gabriela Roberta Ramos Fernandes - Universidade Federal de Ouro Preto

André Luís Morais Ruela, orientador do trabalho, aprovou a versão final e autorizou seu depósito na Biblioteca Digital de Trabalhos de Conclusão de Curso da UFOP em 18/09/2023



Documento assinado eletronicamente por **Andre Luis Morais Ruela, PROFESSOR DE MAGISTERIO SUPERIOR**, em 18/09/2023, às 19:15, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.ufop.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0591449** e o código CRC **8B8F28DC**.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me guiar e iluminar meus passos. Aos meus pais Lucilene e Derbe pelo exemplo, ensinamentos, confiança e por fazerem dos meus sonhos os seus. Vocês são a minha força, amo muito vocês. Aos meus irmãos Delber e Lorena, vocês são minha paixão, obrigada por cada sorriso, carinho e apoio. Aos meus avós, tios, primos e todos meus amigos por todos os momentos e incentivo. Ao Pedro, por todo apoio, amor, incentivo e companheirismo, obrigada por fazer parte da minha vida. À Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP), pelo ensino de qualidade, à gloriosa Escola de Farmácia (EFAR) pela oportunidade de aprender com tantos doutores acadêmicos. Ao Centro Acadêmico Livre de Farmácia José Badini (CALF) por toda experiência, amizade e aprendizado. Ao meu orientador Dr. André Luís Morais Ruela pela confiança, apoio, aprendizado e paciência nessa etapa de conclusão do curso. Ao Programa de Pós-Graduação (PPG) em Ciências Farmacêuticas da Escola de Farmácia (CiPharma) da UFOP (Laboratório Multiusuário 1, LM1, e Laboratório de Controle de Qualidade, LCQ), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Kerry do Brasil Ltda e ao Laboratório Cristália, pelo apoio e incentivo a pesquisa. As empresas Cruz Leal e VITAE pelas oportunidades e crescimento. A vida republicana e todo aprendizado, em especial à minha amada Republica Cirandinha, uma honra fazer parte desse lar, dessa família maravilhosa. Obrigada pelos melhores anos da minha vida. Vocês me dão sorte na vida.

RESUMO

A doença de Alzheimer (DA) é uma doença neurodegenerativa que afeta principalmente pessoas idosas e é caracterizada pela perda progressiva de memória, função cognitiva e habilidades motoras, causando demência. A donepezila é um fármaco inibidor da colinesterase de segunda geração, muito utilizado no tratamento da DA, que atua aumentando os níveis cerebrais de acetilcolina. Entretanto, o fármaco está associado a efeitos colaterais e, por isso, estudos para desenvolvimento de novas formulações são pertinentes. Neste estudo, o objetivo foi padronizar metodologia analítica por espectrofotometria no ultravioleta (UV) para doseamento de cloridrato de donepezila em formas farmacêuticas de liberação modificada conforme a RDC 166/2017 da Anvisa. Para isso, o doseamento da donepezila foi realizado com preparo das amostras em dois diluentes: metanol e fluido gástrico simulado sem enzimas (FGSSE). Os resultados das análises por métodos espectrofotométricos foram comparados com quantificação por metodologia previamente padronizada usando RP-CLAE. Primeiramente, realizou-se varreduras espectrais da donepezila na região do UV em metanol e FGSSE, selecionando-se os picos de absorção em 313 nm e 316 nm, respectivamente. A análise espectrofotométrica no UV em metanol e FGSSE apresentou-se linear, conforme demonstrado por análise estatística apropriada. A dose de donepezila nas formulações testadas foi de 10 mg/g. Foram analisadas duas formulações para liberação modificada, com aspecto de gel de alta consistência. Os resultados foram estatisticamente iguais entre as metodologias analíticas por CLAE-UV e espectrofotometria no UV a 313 (diluyente metanol), porém diferentes da metodologia analítica por espectrofotometria no UV a 316 (diluyente FGSSE). Possivelmente, este resultado está relacionado à maiores interferências do placebo (efeito matriz) quando o FGSSE foi usado como diluyente. No geral, os resultados da análise das amostras das duas formulações testadas indicaram que a donepezila foi incorporada de modo homogêneo nas preparações, permitindo demonstrar que a espectrofotometria no UV pode ser uma ferramenta útil no doseamento das formulações na etapa de desenvolvimento farmacotécnico, porém mais estudos precisam ser conduzidos para validação destas metodologias.

Palavras-chave: Donepezila; doença de Alzheimer; doseamento; formulações; cromatografia líquida de alta eficiência, espectrofotometria no ultravioleta

ABSTRACT

Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative disease that mainly affects elderly people and is characterized by progressive loss of memory, cognitive function and motor skills, causing dementia. Donepezil is a second-generation cholinesterase inhibitor drug, widely used in the treatment of AD, which acts by increasing brain levels of acetylcholine. However, the drug is associated with side effects and, therefore, studies for the development of new formulations are relevant. In this study, the objective was to standardize analytical methodology by ultraviolet (UV) spectrophotometry for measuring donepezil hydrochloride in modified-release pharmaceutical forms according to Anvisa's RDC 166/2017. For this, donepezil dosage was performed by preparing the samples in two diluents: methanol and simulated gastric fluid without enzymes (SGF). The results of analyzes by spectrophotometric methods were compared with quantification by previously standardized methodology using RP-HPLC. First, spectral scans of donepezil were performed in the UV region in methanol and SGF, selecting the absorption peaks at 313 nm and 316 nm, respectively. The UV spectrophotometric analysis in methanol and SGF was linear, as demonstrated by appropriate statistical analysis. The dose of donepezil in the tested formulations was 10 mg/g. Two formulations for modified release, with the appearance of a high consistency gel, were analyzed. The results were statistically equal between the analytical methodologies by HPLC-UV and UV spectrophotometry at 313 (methanol diluent), but different from the analytical methodology by UV spectrophotometry at 316 (diluent SGF). Possibly, this result is related to greater interference from placebo (matrix effect) when SGF was used as a diluent. In general, the results of the analysis of the samples of the two formulations tested indicated that donepezil was incorporated homogeneously in the preparations, allowing to demonstrate that the UV spectrophotometry can be a useful tool in the dosage of the formulations in the pharmacotechnical development stage, but more studies need to be conducted to validate these methodologies.

Keywords: Donepezil; Alzheimer's disease; dosing; formulations; high performance liquid chromatography, ultraviolet spectrophotometry

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1- Estrutura química do cloridrato de donepezila	13
FIGURA 2- Espectrofotometria na região do ultravioleta e visível duplo feixe.....	17
FIGURA 3 - Cromatografia líquida de alta eficiência em modo fase reversa.....	18
FIGURA 4 - Varreduras espectrais na região do UV de a) solução padrão de donepezila a 40 µg/mL diluída em FGSSE; b) placebo de formulação preparado em solução diluída em FGSSE; c) solução padrão de donepezila a 40 µg/mL diluída em metanol; b) placebo de formulação preparado em solução diluída em metanol	27
FIGURA 5 - Curva analítica para quantificação da donepezila (a) e gráfico da dispersão dos resíduos (b), nas diluições em metanol (313nm)	28
FIGURA 6 - Curva analítica para quantificação da donepezila (a) e gráfico da dispersão dos resíduos (b), nas diluições em FGSSE (316 nm)	30

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 1 - Diluições da curva analítica do cloridrato de donepezila	22
TABELA 2 - Curva analítica com diluição das soluções de trabalho em metanol e análise em 313 nm (n=3)	29
TABELA 3 - Curva analítica com diluição das soluções de trabalho em FGSSE e análise em 316 nm (n=3)	31
TABELA 4 - Doseamento das formulações de liberação modificada de donepezila (n=2)	32

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Anvisa - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CLAE - Cromatografia líquida de alta eficiência

DA - Doença de Alzheimer

DP – Donepezila

DPR – Desvio padrão relativo

FDA - *Food and Drug Administration*

FGSSE - Fluido gástrico simulado sem enzimas

FR - Fase reversa

UV - Ultravioleta

VIS - Visível

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	09
1.1 Objetivo Geral	11
1.2 Objetivos específicos	11
2. REFERENCIAL TEÓRICO	12
2.1 Donepezila	12
2.1.1 Farmacologia Clínica da donepezila	14
2.2 Métodos e Técnicas Analíticas	15
2.2.1 Espectrofotometria na região do ultravioleta e visível	16
2.2.2 Cromatografia líquida de alta eficiência em modo fase reversa	18
3.MATERIAL E MÉTODOS	19
3.1 Material	20
3.1.1 Insumos farmacêuticos ativos, reagentes e solventes	20
3.1.2 Equipamentos e acessórios	20
3.2 Métodos	20
3.2.1 Formulações de liberação modificada de donepezila	21
3.2.2 Análise por espectrofotometria no UV	21
3.2.3 Análise por cromatografia líquida de alta eficiência com detector ultravioleta	23
3.3 Análise das formulações	25
4. RESULTADOS	26
5. DISCUSSÃO	32
6. CONCLUSÃO	35
REFERÊNCIAS	35

1. INTRODUÇÃO

A doença de Alzheimer (DA) é a causa mais comum de demência em pessoas idosas. A perda da capacidade cognitiva com a idade é considerada um processo normal, cuja velocidade e extensão são muito variáveis. Sua prevalência aumenta abruptamente com a idade. É possível observa-se na DA uma diminuição da atividade colinérgica, sendo o tratamento farmacológico disponível em grande parte realizado com fármacos inibidores da colinesterase, que diminuem a depuração da acetilcolina no cérebro. A donepezila (DP) é classificada como um fármaco inibidor da colinesterase de segunda geração, que permite prolongar a atividade da acetilcolina no sistema nervoso central (SNC) (RANG et al, 2020; SUTTHAPITAKSAKUL et al., 2021).

O medicamento contendo o sal cloridrato de DP, na forma farmacêutica comprimidos de liberação imediata (5 e 10 mg), foi aprovado em 1996 nos Estados Unidos pela *Food and Drug Administration* (FDA). É indicado para tratamento da DA leve e moderada e, posteriormente, recebeu aprovação para uso na DA grave no ano de 2006. A DP se liga reversivelmente à acetilcolinesterase no SNC, especificamente no sítio de ligação do ânion no anel indol, para reduzir a atividade enzimática. Dessa forma, aumenta o conteúdo de acetilcolina no cérebro, melhorando a eficiência da transmissão colinérgica no SNC, o que pode ter efeito positivo ao paciente, tendo importância na redução da progressão dos sintomas, no intuito de preservar por mais tempo as funções intelectuais e avanço da doença (RANG et al., 2020; SUTTHAPITAKSAKUL et al.,2021).

A DP está associada a efeitos colaterais que são principalmente leves, mas que podem levar as pessoas a interromper o tratamento. Efeitos adversos como diarreia, vômito, insônia, fadiga, câibras musculares, náuseas e anorexia são causados pelo aumento da secreção gástrica devido ao aumento da atividade colinérgica no trato gastrointestinal na administração oral da DP. Existem também relatos de problemas de mastigação de pacientes idosos, em que o amargor característico da DP ao ingerir é considerado desagradável e incômodo. Além disso, há efeito de primeira passagem, picos plasmáticos e flutuações das concentrações na corrente sanguínea, o que pode contribuir para aumentar a incidência de efeitos colaterais (ZHAO et al.,2021).

Há muitos trabalhos recentes direcionados ao estudo de novos sistemas de liberação para DP. São consideradas diferentes vias de administração, na busca de uma melhor aplicação clínica do fármaco, uma vez que a DP é o fármaco mais prescrito mundialmente no tratamento

da DA, apesar da alta incidência de efeitos adversos (ALLEN Jr. et al., 2007; PEZZINI et al., 2007).

Para superar as limitações da DP, incluindo sabor amargo, efeitos adversos e fatores relacionados ao paciente, é interessante o desenvolvimento de novas formulações para liberação modificada deste fármaco. O termo “liberação modificada” é utilizado para descrever formas farmacêuticas que apresentam diferentes características de liberação ao longo do tempo, duração e/ou localização, delineadas para alcançar as conveniências e os objetivos terapêuticos não oferecidos pelas formas farmacêuticas convencionais (ALLEN Jr. et al., 2007; PEZZINI et al., 2007).

À vista disso, é interessante propor métodos analíticos para análise destes medicamentos, que para assegurar sua confiabilidade devem passar por estudos de validação analítica. A Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) 166/2017 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) está em vigência atualmente no Brasil, estabelecendo os critérios para validação de métodos analíticos. Deste modo, o presente estudo foi desenvolvido a fim de validar um método analítico para análise do cloridrato de DP em formulações farmacêuticas de liberação modificada por espectrofotometria na região do ultravioleta (UV) e visível (vis), comparando os resultados das análises com análises realizadas por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção UV (CLAE-UV).

A espectrofotometria na região do UV-vis é uma técnica analítica muito usada para análises quantitativas de espécies químicas, devido à robustez, operacionalização relativamente simples, baixo custo e as suas inúmeras aplicações. Em uma análise espectrofotométrica utiliza-se uma fonte de radiação que chega na região UV-vis do espectro da luz. Para realizar análises quantitativas, devem ser escolhidos comprimentos de onda de radiação bem estabelecidos e com largura de banda menor que um nanômetro, sendo necessário usar um espectrofotômetro. Este tipo de instrumento é equipado com uma tecnologia 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. Essa técnica se baseia na medida da absorção de radiação eletromagnética nas regiões vis e UV por espécies químicas (moléculas ou íons) em solução. Na análise quantitativa, a atenuação do feixe de radiação é, dentro de certos limites, proporcional à concentração da espécie química a ser determinada. As espécies químicas de interesse geralmente estão presentes em solução líquida, embora seja também possível medidas em fase sólida ou gasosa (VOGEL, 2022).

O primeiro cromatógrafo à líquido foi construído por Csaba Horvath em 1964. A CLAE tem como principal característica a capacidade de separar e quantificar substâncias de diferentes

polaridades. É uma técnica com alta versatilidade associada com alta eficiência, exatidão e precisão, se mostrando uma ferramenta analítica indispensável no controle de qualidade de produtos terminados do segmento farmacêutico, permitindo o estudo de misturas muito difíceis de separar, especialmente misturas de moléculas (VOGEL, 2022; PHARMAKON et al., 2018).

Na cromatografia líquida de alta eficiência em modo fase reversa (FR-CLAE, do inglês *reverse phase - high performance liquid chromatography*, RP-HPLC), a fase estacionária contida dentro da coluna não é polar, enquanto a fase móvel é polar. A técnica FR-CLAE usa geralmente colunas cromatográficas preparadas comumente a partir de partículas de um material à base de sílica modificada quimicamente. É comum utilizar colunas cromatográficas em que a sílica é modificada com grupos octadecilsilano (C18), que conferem hidrofobicidade à superfície das partículas. Com isso, considerando que a maioria dos fármacos são parcialmente hidrofóbicos, sendo possível que estes sejam capazes de interagir com fases estacionárias menos polares, como colunas com partículas de sílica modificadas com grupos C18. Como a fase móvel é polar e geralmente tem água, a FR-CLAE se aplica principalmente à separação de fármacos por interação diferencial entre as fases estacionária e móvel (VOGEL, 2022; PHARMAKON et al., 2018; MAJORS, 2015).

Neste trabalho, buscou-se por avaliar três metodologias analíticas para quantificação de donepezila por duas técnicas analíticas diferentes, a espectrofotometria na região do UV-vis e a FR-CLAE. Estas metodologias analíticas foram aplicadas para quantificação da donepezila em formulações de liberação modificada. Assim, avaliou-se a homogeneidade do fármaco incorporado na forma solúvel na matriz destas preparações, estabelecendo um comparativo entre métodos e técnicas analíticas para esta finalidade.

1.1 OBJETIVO GERAL

Padronizar metodologias analíticas por espectrofotometria no UV-vis para doseamento de cloridrato de donepezila em formas farmacêuticas de liberação modificada para tratamento da DA.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Definir as condições do método analítico espectrofotométrico como comprimento de onda de máxima absorção, diluente e faixa de trabalho (intervalo de concentrações);

- Determinar a linearidade, precisão e recuperação do método analítico baseada na RDC 166/2017 da Anvisa;
- Comparar os resultados do método espectrofotométrico com metodologia para quantificação de donepezila por RP-CLAE.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

A seguir, apresenta-se o referencial teórico deste trabalho.

2.1 DONEPEZILA

É importante reforçar que atualmente não existe um medicamento para curar a DA, sendo que, os medicamentos disponíveis são indicados para tratar os sintomas e reduzir a sua velocidade de progressão. Embora não haja cura para a DA, fármacos como DP aliviam os sintomas cognitivos, reduzindo os sintomas relacionados à sua evolução. Sendo os inibidores das colinesterases a principal classe de fármacos usados atualmente, em que se promove o aumento da disponibilidade sináptica de acetilcolina pelo bloqueio das suas principais enzimas catalíticas. Assim, estes medicamentos contendo fármacos anticolinérgicos exercem efeito sintomático simples na cognição, algumas vezes favorecendo também certas alterações não-cognitivas da demência (PARK et al., 2013; FORLENZA, 2005).

A DP é classificada como um inibidor seletivo e reversível da enzima acetilcolinesterase, sendo quimicamente um derivado de piperidina, apresentando-se como uma amina terciária, aromática (figura 1) e de caráter alcalino ($pK_a = 8,82$). Em medicamentos na forma de comprimidos, utiliza-se o cloridrato de DP, quimicamente (\pm) -2,3-diidro-5,6-dimetoxi-2- [[1-(fenilmetil) -4-piperidinil] metil] -1H-inden-1-ona, com fórmula molecular $C_{24}H_{29}NO_3$, e peso molecular de 416,0 g/mol. A base livre de DP possui peso molecular de 379,5 g/mol. O cloridrato de DP apresenta-se fisicamente como um pó branco, cristalino, totalmente solúvel em clorofórmio, solúvel em água (55 g/L a 25°C), com ponto de fusão de 224°C (RANG et al., 2020; MOFFAT et al., 2011).

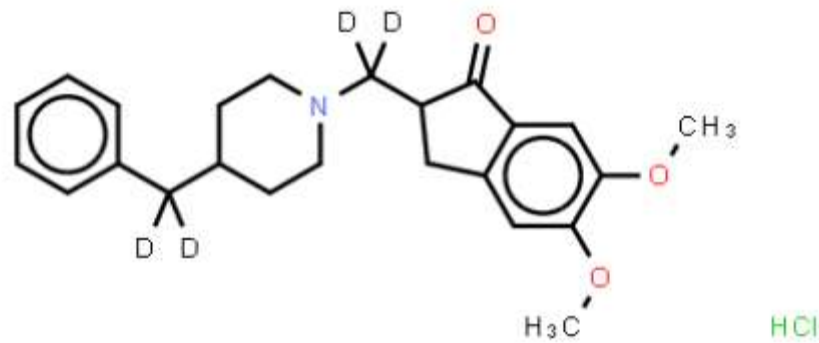


Figura 1. Estrutura química do cloridrato de donepezila

Fonte: Silva (2022, p. 20)

Este inibidor da colinesterase inibe a degradação do neurotransmissor químico acetilcolina e vem sendo considerada como o tratamento de primeira escolha para a DA. O fármaco na forma de cloridrato demonstrou muitos efeitos benéficos em ensaios clínicos, incluindo melhora da função cognitiva nas atividades diárias e do comportamento dos pacientes com DA leve, moderada e até mesmo grave. A biodisponibilidade relativa da DP por via oral chega a 100%, devido ao seu caráter lipofílico, alcançando um pico de concentração plasmática em 3 a 4 horas. Sua farmacocinética após administração oral é linear em uma faixa de dosagem de 1 a 10 mg/dia. A presença de alimentos não interfere na extensão ou velocidade de absorção deste fármaco. A meia-vida de eliminação varia de 50 a 70 horas. A ligação às proteínas plasmáticas é de aproximadamente 96%. Após administração oral, a DP é metabolizada parcialmente no fígado por CYP450, no qual quatro metabólitos são produzidos a partir da O-desalquilação seguida por hidroxilação e glicuronidação ou hidrólise parcial subsequente. Além dos efeitos terapêuticos da DP na transmissão do sinal colinérgico no SNC, há também evidências que o fármaco promova uma redução no acúmulo de A β proteína no cérebro, sendo este um fator benéfico para reduzir a progressão da DA (PHARMA.PRESS, 2011; ROGERS et al., 1998).

Segundo Barner e Gray (1998), a DP é um inibidor da colinesterase seletivo e específico para a acetilcolinesterase. É metabolizado pelas isoenzimas hepáticas CYP2D6 e CYP3A4 e sofre glucuronidação. Segundo os autores, as informações sobre interações medicamentosas são limitadas, mas existe um potencial para que interações medicamentosas aconteçam, dada a via de eliminação. Em ensaios de 15 e 30 semanas, a DP foi eficaz em pacientes com DA leve

a moderada, conforme demonstrado por melhorias nos instrumentos de avaliação padrão (ou seja, a Escala de Avaliação da Doença de Alzheimer–Subescala Cognitiva, a Impressão de Mudança Baseada em Entrevista Clínica com entrada do cuidador).

Espera-se que sistemas de liberação de fármacos mais eficientes e seguros possam melhorar o perfil de segurança da DP, atingindo concentrações terapêuticas estáveis e reduzindo a quantidade e a frequência da dosagem. A partir disso, pode-se aumentar a adesão do paciente ao tratamento. Entretanto, há vários desafios considerando estudos para desenvolvimento de novas formulações para liberação modificada (PARK et al., 2013).

É importante ressaltar os fatores que motivam o desenvolvimento de formulações para liberação modificada da DP. O sabor amargo da DP é um problema significativo para as formas farmacêuticas orais convencionais, sobretudo ao considerar que a via oral é majoritariamente usada para administração deste fármaco. Várias abordagens têm sido empregadas para mascarar o sabor. Outro ponto a se considerar é a flutuação dos níveis de concentração plasmática de DP, que está relacionada com efeitos adversos no trato gastrointestinal. Formas farmacêuticas de liberação modificada para administração por via oral e outras vias como adesivo transdérmico, injeção parenteral e por via intranasal podem ser desenvolvidas na busca para diminuir os efeitos colaterais e/ou modificar a velocidade de liberação do fármaco a partir do medicamento. A maioria dos estudos se limitaram à fase pré-clínica, porém outros, como os transdérmicos, já tiveram estudos clínicos conduzidos, podendo receber aprovação de agências reguladoras a curto prazo. Estas considerações reafirmam o potencial de inovação de estudos focados no desenvolvimento de novos sistemas de liberação de fármacos contendo DP (RANG et al., 2020; SUTTHAPITAKSAKUL et al., 2021).

O desenvolvimento de novas opções terapêuticas mais eficazes e seguras é de grande relevância como uma perspectiva de melhorar o tratamento da DA. Fármacos capazes de modificar a evolução natural da DA, ao lado da antecipação do diagnóstico, representarão o futuro do seu tratamento, assim como de outras demências (FORLENZA, 2005).

2.1.1 FARMACOLOGIA CLÍNICA DA DONEPEZILA

Segundo Ehab et al. (2019), a acetilcolina é um neurotransmissor importante para a memória e a aprendizagem, e a sua deficiência é uma das características da DA. Os autores apontam que a DP é administrada por via oral e deve ser tomado uma vez ao dia, preferencialmente à noite antes de dormir. Para os autores, a dosagem inicial é de 5 mg por dia, aumentando para 10 mg por dia após 4-6 semanas e, no entanto, a dosagem máxima

recomendada é de 10 mg por dia.

Ainda conforme Ehab et al. (2019), a DP é metabolizada principalmente no fígado e eliminado pelos rins. É importante monitorar a função hepática e renal em pacientes que fazem uso do fármaco, podendo interagir com outros medicamentos, como aqueles contendo fármacos da classe dos antidepressivos tricíclicos, dos antimuscarínicos e dos anti-inflamatórios não esteroidais. Por isso, a DP deve ser usada com cautela em pacientes que usam esses outros medicamentos. Os efeitos colaterais comuns da DP incluem náuseas, vômitos, diarreia, perda de apetite, insônia e fadiga. Esses efeitos geralmente são leves e desaparecem após algumas semanas de tratamento.

Deardorff e Grossberg (2016) apontam que, em casos raros, a DP pode causar problemas cardíacos, convulsões, alucinações e icterícia. Sendo importante informar o médico sobre quaisquer efeitos colaterais ou reações adversas durante o tratamento. Além disso, a DP não é uma cura para a DA e não impede a progressão da doença, mas pode ajudar a melhorar os sintomas e a qualidade de vida dos pacientes.

O tratamento com DP é geralmente iniciado em uma dose baixa, como 5 mg uma vez ao dia, e aumentado gradualmente ao longo de várias semanas para uma dose máxima de 10 mg uma vez ao dia. A dose pode ser ajustada com base na resposta do paciente e na tolerabilidade ao medicamento. Além disso, é importante que os pacientes com DA recebam cuidados adequados para garantir sua segurança e qualidade de vida (DEARDORFF et al., 2016).

Falco *et al.* (2016) explicam que a DP tem uma meia-vida de eliminação de cerca de 70 horas, o que significa que leva vários dias para o medicamento ser eliminado do organismo. Segundo os autores, é importante que o medicamento seja administrado regularmente para manter os níveis de acetilcolina no cérebro elevados. Em pacientes com DA leve a moderada, o fármaco pode melhorar a cognição, a função diária e a qualidade de vida. No entanto, não é curativo e não retarda a progressão, o tratamento com DP deve ser parte de um plano de tratamento abrangente que inclui terapia ocupacional, fisioterapia, terapia da fala e outras intervenções de suporte.

2.2 MÉTODOS E TÉCNICAS ANALÍTICAS

Para proceder com análises farmacêuticas, técnicas instrumentais como a espectrofotometria na região do UV-VIS e a FR-CLAE são muito usadas (WAGNER, 2018).

A espectrofotometria na região do UV-VIS é uma técnica baseada na medida da

absorção de luz por uma solução (contendo o analito diluído) em comprimentos de onda selecionados. Essa técnica é particularmente útil para a determinação da concentração de compostos que absorvem luz na região do UV-vis do espectro eletromagnético, como proteínas, ácidos nucleicos e várias classes de fármacos.

A FR-CLAE, por sua vez, é uma técnica separativa que permite separar, identificar e quantificar compostos em uma amostra. Essa técnica utiliza uma coluna cromatográfica, onde ocorre a separação dos componentes da amostra por interação diferencial entre as fases estacionária e móvel, com base nas propriedades físicas e químicas dos componentes da amostra, como polaridade, tamanho e afinidade por um suporte estacionário. A FR-CLAE é frequentemente usada na determinação de impurezas e na quantificação de fármacos em formulações diversas (WAGNER, 2018).

Ambas as técnicas podem ser usadas para validar métodos analíticos e são complementares em alguns casos. A escolha da técnica mais apropriada depende do objetivo do método analítico e das características da amostra do medicamento a ser analisada.

2.2.1 ESPECTROFOTOMETRIA NA REGIÃO DO ULTRAVIOLETA E VISÍVEL

Segundo Wagner (2018), a espectrofotometria na região do UV-vis é comumente utilizada em química analítica, bioquímica e biologia molecular para determinar a concentração de soluções de compostos orgânicos e inorgânicos. Conforme o mesmo autor, esta técnica é particularmente útil para analisar moléculas contendo grupos cromóforos, que são grupos funcionais que absorvem luz na faixa espectral UV-vis. A espectrofotometria na região do UV-vis também é utilizada em muitas outras áreas, como análise de alimentos, medicamentos, cosméticos, tintas, polímeros, petróleo e água.

Golan et al. (2009) afirmam que a espectrofotometria na região do UV-vis é baseada no princípio básico em que a absorção de luz na região do UV-vis em uma solução é diretamente proporcional à concentração do composto absorvente presente nesta solução (baseada na lei de Lambert-Beer). Para realizar a análise na região do visível, uma amostra da solução é colocada em uma célula ou cubeta de vidro transparente, e a luz é transmitida através dela. Para análises na região do UV, utilizam-se cubetas de quartzo. A cubeta é então colocada em um espectrofotômetro, que mede a quantidade de luz que é absorvida pela amostra em diferentes comprimentos de onda.

Os métodos espectrofotométricos são utilizados há décadas e continuam sendo

aplicados por terem diversas vantagens. A espectrofotometria na região do UV-vis é muito utilizada para desenvolver metodologias analíticas para quantificação de diversos tipos de analitos, sendo baseados em uma técnica rápida e simples. É utilizada de várias formas para facilitar a análise qualitativa e quantitativa, podendo ser utilizada na avaliação de uma diversidade de compostos e insumos farmacêuticos, na avaliação da estabilidade de compostos, dentre muitas outras aplicações (EDWARDS et al., 2017; SKOOG et al., 2007; DEHGHANI et al., 2012).

Tem como vantagens, além de ser rápido e de fácil operação, sua versatilidade; envolve procedimentos simples; possui grande exatidão e precisão; de fácil aquisição e disponibilidade da instrumentação e baixo custo por determinação. Sendo essa técnica utilizada no setor de controle de qualidade na indústria farmacêutica, departamento que requer rapidez e confiabilidade nos resultados analíticos (PIETTA 2000; MAGALHAES et al. 2008).

Como desvantagens dos métodos espectrofotométricos podemos destacar a dificuldade na determinação de analitos em baixas concentrações; a presença de interferentes na amostra que absorvem a luz na mesma região espectral; a necessidade de preparação da amostra para melhorar a seletividade, sensibilidade e manuseio, sendo necessárias calibrações periódicas para manter a exatidão e precisão (EDWARDS et al., 2017; DEHGHANI et al., 2012).

Rocha e Teixeira (2004) explicam que os espectrofotômetros modernos (esquemático na figura 2) geralmente têm um comprimento de onda mais precisamente ajustável e uma fonte de luz de amplo espectro, como uma lâmpada de deutério ou tungstênio, que emitem radiação respectivamente na região do UV e do visível. Segundo os autores, os dados de absorção podem também ser registrados na forma de varredura espectral, em que são registrados em uma faixa de espectro de absorção na região do UV-vis.

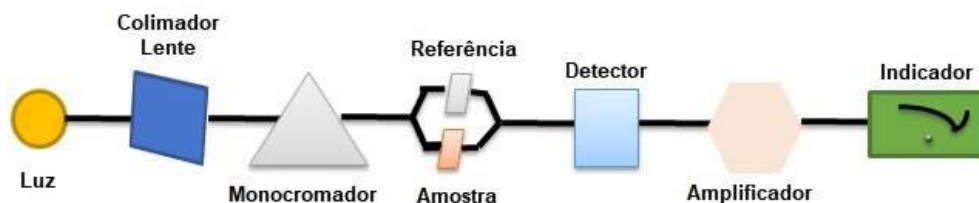


Figura 2. Espectrofotometria na região do ultravioleta e visível duplo feixe

Fonte: da autora.

Assim, é construído um gráfico que representa a absorção da luz em diferentes comprimentos de onda. Os autores explicam ainda que a partir deste espectro, pode-se determinar os comprimentos de onda de máxima absorção de um composto absorvente, permitindo a seleção do comprimento de onda (λ) a ser utilizado em análises quantitativas. Geralmente, seleciona-se um comprimento de onda de máxima absorção ($\lambda_{\text{máx}}$). Após selecionar o $\lambda_{\text{máx}}$ em uma solução padrão de um fármaco em determinado solvente, pode-se construir uma curva de calibração, que relaciona a intensidade da absorção de luz com a variação da concentração do composto (analito) (ROCHA et al., 2004).

2.2.2 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA EM MODO FASE REVERSA

Grotto (2007) afirma que a FR-CLAE (Figura 3) é uma técnica de separação que utiliza uma fase móvel líquida, com natureza polar, para separar os componentes de uma amostra em uma fase estacionária, na forma de uma coluna com recheio sólido e de maior caráter apolar. É frequentemente utilizada para separar, identificar e quantificar compostos em uma amostra complexa, como fármacos, produtos químicos e biomoléculas. Segundo o mesmo autor, as análises são realizadas a partir da injeção da amostra na fase móvel, que é então forçada sob alta pressão, por intermédio de uma bomba, através da fase estacionária. A fase estacionária retém os componentes da amostra com base em suas propriedades químicas e físicas, como polaridade, tamanho e afinidade por grupos funcionais específicos.

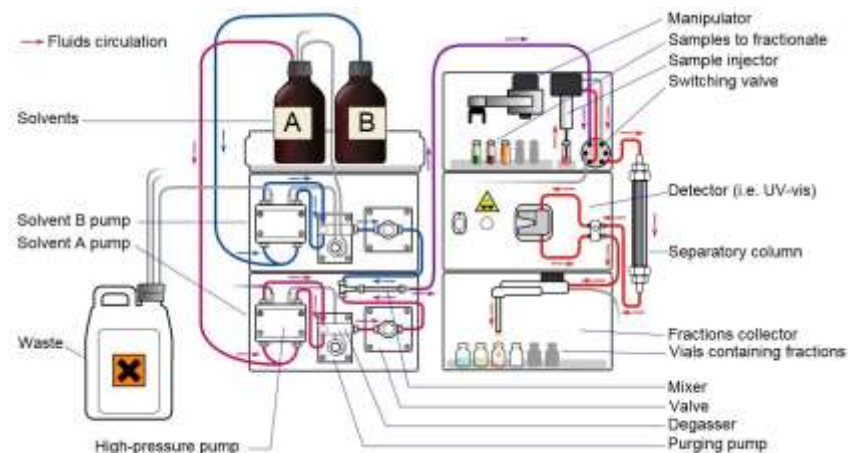


Figura 3. Cromatografia líquida de alta eficiência em modo fase reversa

Fonte: Siqueira (2018).

Os componentes da amostra são separados à medida que passam pela fase estacionária, para análise são dissolvidas em um solvente e passam por uma coluna empacada com um material estacionário, na forma de um sólido finamente dividido, geralmente em partículas de tamanho submicrométrico e homogêneo. O material estacionário, é um sólido poroso ou um gel que interage com os componentes da mostra à medida que passa através da coluna. Na FR-CLAE, o material de enchimento mais utilizado é a sílica modificada com grupamentos C18. Tendo interações diferenciais conforme suas características físico-químicas, e, por isso, as amostras eluem da coluna em diferentes tempos, o que auxilia na sua identificação e quantificação. Para realização das análises quantitativas, a quantidade de cada componente na amostra pode ser quantificada usando soluções preparadas com padrões de referência e comparando os sinais do detector. É uma técnica analítica muito poderosa e versátil que pode separar e quantificar uma ampla variedade de componentes em uma amostra líquida. A detecção pode ser feita por diversos métodos, como espectrofotometria na região do UV-vis, fluorescência, condutividade elétrica, índice de refração, entre outros. FR-CLAE é amplamente utilizada em muitas áreas, incluindo química, bioquímica, farmacologia, alimentos e bebidas, meio ambiente, entre outras (SCHOTT, 2005; KASSAB,2001).

A técnica do FR-CLAE é conhecida por suas vantagens como a alta resolução na separação de compostos em amostras contendo misturas, elevada sensibilidade, alta eficiência, grande reprodutibilidade e grande versatilidade de detectores. Já por outro lado, métodos por FR-CLAE podem ser demorados, considerando o tempo que é gasto desde o preparo das amostras e soluções padrão, requer profissional capacitado. Outro ponto a se considerar é o alto custo dos materiais para análises por FR-CLAE, incluindo solventes com alto grau de pureza, filtros de seringa, membranas filtrantes e colunas cromatográficas, entre outros insumos (FERRARI et al., 2011; WOLLGAST et al., 2000; MARKHAM et al., 1998).

3 MATERIAL E MÉTODOS

O material e métodos serão apresentados nesta seção. Este é um trabalho de natureza experimental, envolvendo análises pelas técnicas analíticas de espectrofotometria no UV e CLAE-UV, com fins de desenvolvimento de metodologias para doseamento da DP em formulações farmacêuticas.

3.1 MATERIAL

A seguir, detalha-se o material utilizado neste trabalho.

3.1.1 INSUMOS FARMACÊUTICOS ATIVOS, REAGENTES E SOLVENTES

Ácido clorídrico 37% P.A.; ácido fosfórico 85% P.A.; água ultrapura; cloreto de sódio P.A.; metanol grau CLAE, cloridrato de donepezila (gentilmente cedido pelo Laboratório Cristália); trietilamina P.A. (TEA). Os componentes das formulações preparadas para liberação modificada de donepezila foram o Myverol 18-92 K (gentilmente cedido pela Kerry do Brasil Ltda), água ultrapura, polissorbato 80 e miristato de isopropila.

3.1.2 EQUIPAMENTOS E ACESSÓRIOS

Banho ultrassom; balança analítica de precisão; bomba de vácuo; espectrofotômetro ultravioleta-visível (UV-vis) duplo-feixe modelo AJX-6100PC Micronal, usando cubetas de quartzo de 1 cm com caminho óptico 10 mm e volume 3,5 mL); filtro de seringa PVDF 0,45 µm; membrana de filtração de fase móvel PVDF 0,45 µm; sistema CLAE-UV modelo Alliance marca Waters; medidor de pH de bancada; micropipetadores automáticos de volume ajustável 100-1000 µL e 500 – 5000 µL; sistema de purificação de água incluindo osmose reversa Milli-Q; sistema de filtração de fase móvel; vidrarias e utensílios diversos.

3.2 MÉTODOS

A seguir, detalham-se a metodologia deste trabalho.

3.2.1 FORMULAÇÕES DE LIBERAÇÃO MODIFICADA DE DONEPEZILA

Ambas as formulações foram previamente testadas quanto à composição (proporção dos excipientes) por estudos do grupo de pesquisa que ainda não foram publicados. A concentração de donepezila nas formulações foi de 10 mg/g. Foram testadas duas formulações de liberação modificada de donepezila, com aspecto de um gel de alta consistência. A formulação 1 foi preparada com Myverol 18-92 K e água, e a formulação 2 foi preparada com polissorbato 80, miristato de isopropila e água.

3.2.2 ANÁLISE POR ESPECTROFOTOMETRIA NO UV

O detalhamento da padronização do método para quantificação de donepezila em formulações de liberação modificada por espectrofotometria no UV está descrito a seguir.

Varredura espectral na região do UV

Varredura espectrais na região do UV (200-400 nm) foram realizadas com duas soluções de donepezila a 40 µg/mL, sendo diluídas em dois diferentes diluentes, o FGSSE e metanol, tendo como objetivo determinar o comprimento de onda de máxima absorção ($\lambda_{\text{máx}}$).

Preparo do fluido gástrico simulado sem enzimas (FGSSE)

O fluido gástrico simulado sem enzimas (FGSSE), foi preparado usando 7,0 mL de ácido clorídrico 37% P.A. e 2,0 g de cloreto de sódio (USP, 2018). Os reagentes foram diluídos em 1 L de água ultrapura. O pH do diluente foi determinado pH, obtendo valores de aproximadamente 1,2.

Preparo da solução estoque, solução intermediária e soluções de trabalho

Pesou-se quantitativamente, em triplicata, 25,0 mg de cloridrato de donepezila e transferiu-se a massa pesada para balão volumétrico de 25 mL. Adicionou-se 10 mL de metanol. Levou-se em banho de ultrassom sem aquecimento por 10 minutos. Em seguida, ajustou-se o volume com metanol, obtendo uma solução na concentração final de 1000 µg/mL (Solução estoque).

A seguir, a solução estoque foi diluída com 2 diluentes diferentes, de modo a obter soluções intermediárias na concentração de 100 µg/mL. Pipetou-se 10 mL de cada solução estoque para dois balões volumétrico diferentes de 100 mL, completando o volume de um balão com metanol e de outro balão com FGSSE. Deste modo, obtiveram-se 3 soluções intermediárias independentes em cada um dos diluentes (metanol e FGSSE).

As soluções intermediárias foram posteriormente diluídas para construção de curva analítica no intervalo de 10 a 40 µg/mL.

Três curvas independentes foram diluídas em cada diluente (metanol e FGSSE). Em seguida, prosseguiu-se com a leituras das soluções de trabalho de donepezila no intervalo de 10 a 40 µg/mL nos comprimentos de onda de máxima absorção na região do UV em cada diluente, sendo 313 nm para soluções diluídas em metanol e 316 nm para diluições em FGSSE. As curvas analíticas foram, portanto, construídas a partir de soluções intermediárias independentes, conforme apresentado na **Tabela 1**.

Tabela 1. Diluições da curva analítica do cloridrato de donepezila.

Concentração (µg/mL)	Alíquota da solução estoque (mL)	Balão volumétrico (mL)
10	1,0	
15	1,5	
20	2,5	
25	3,0	10
30	3,5	
35	4,0	
40	4,5	

Fonte: Da autora.

Figuras de mérito do método espectrofotométrico

A linearidade e precisão intradia do método analítico foram caracterizadas conforme os critérios da Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 166, de 24 de julho de 2017, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, que dispõe sobre a validação de métodos analíticos (BRASIL, 2017).

Após as diluições, as soluções de trabalho de donepezila foram analisadas em espectrofotômetro nos comprimentos de onda definidos para cada diluente (FGSSE e metanol). A partir das leituras, foi possível determinar a absorbância de cada solução de trabalho usando cubeta de quartzo de 1 cm, sendo estes dados utilizados para realização dos cálculos. A partir dos cálculos, determinou-se a curva analítica em triplicata para cada diluente (FGSSE e metanol) por meio da equação de reta ($y = ax + b$) e também o coeficiente de correlação (r). O valor de r deve ser maior que 0,990 para caracterizar a linearidade do método analítico (BRASIL, 2017).

Realizou-se análise de variância para avaliação da significância do coeficiente angular e coeficiente linear, determinando se são significativamente diferentes ou iguais a zero. Foi realizada a plotagem do gráfico dos resíduos calculados a partir da curva analítica e a sua análise estatística pelo teste de Breush-Pagan, demonstrando a homoscedasticidade, ou seja, se a variância dos erros é constante.

A precisão intradia na quantificação da donepezila também foi calculada, de modo a avaliar a variabilidade dos resultados em torno do valor médio determinado. Para isso, determinou-se a média e o desvio padrão das concentrações avaliadas na determinação da linearidade ($n=3$). Os resultados foram expressos como desvio padrão relativo (DPR), a partir do quociente do desvio padrão pela média, sendo o resultado multiplicado por 100, de modo a ser expresso em porcentagem (%).

Calculou-se a recuperação das concentrações avaliadas de donepezila na determinação da linearidade ($n=3$) usando a própria curva analítica. A porcentagem de recuperação foi determinada pelo quociente da concentração experimental pela concentração teórica, sendo o resultado multiplicado por 100, de modo a ser expresso em porcentagem (%).

3.2.3 ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA COM DETECTOR ULTRAVIOLETA

O detalhamento da padronização do método para quantificação de donepezila em formulações de liberação modificada por CLAE-UV está descrito a seguir.

Preparo de soluções para análises cromatográficas e validação analítica

O diluente das amostras e padrões foi uma mistura de metanol e água ultrapura 1:1 (v/v).

Para o preparo da solução aquosa da fase móvel, adicionou-se 5 mL da solução de TEA em balão volumétrico de 1 L contendo aproximadamente 900 mL de água ultrapura. Adicionou-se em seguida 1 mL de ácido fosfórico P.A, adicionando mais ácido fosfórico até obter um pH final de 3,0 usando um medidor de pH calibrado. O volume foi ajustado para 1 L com água ultrapura. A solução aquosa da fase móvel foi filtrada à vácuo usando membrana hidrofílica de PVDF com porosidade de 0,45 μm . A fase móvel foi degaseificada em ultrassom por 30 minutos antes do início das análises.

Condições cromatográficas

As condições cromatográficas para análise da donepezila foram baseadas em estudo anterior do grupo de pesquisa (RUELA et al., 2014). As separações foram realizadas em modo fase reversa usando colunas cromatográficas da marca Waters, modelo XTerra[®], com dimensões de 150 mm x 4,6 mm; 5 μm de diâmetro das partículas; com recheio octadecilsilano (C18). A fase móvel testada foi uma solução de TEA a 0,5% v/v com pH ajustado com ácido fosfórico para 3,0 e metanol (65:35, v/v), usando canais separados. O volume de injeção foi de 20 μL . A vazão de fase móvel foi de 1,0 mL/minuto, forno a 30 °C, tempo de corrida de 10 minutos e detecção UV a 268 nm. Todas soluções injetadas em sistema CLAE-UV, incluindo soluções padrão e amostras diluídas, foram previamente filtradas usando filtro de seringa de PVDF hidrofílico com porosidade de 0,45 μm .

Curva analítica por CLAE-UV

Utilizou-se curva analítica preparada em diluente metanol: água (1:1, v/v). Esta curva analítica foi preparada em estudo anterior do grupo de pesquisa (Resultados ainda não foram publicados) para estudos envolvendo quantificação do fármaco (RUELA et al., 2014). O preparo da solução padrão estoque de cloridrato de donepezila foi realizado em triplicata. Pesou-se quantitativamente 10,00 mg de cloridrato de donepezila em balança analítica de precisão com 5 casas decimais. Em seguida, a massa pesada foi transferida quantitativamente para balão volumétrico de 50 mL e o volume ajustado com o diluente. Obtiveram-se três soluções padrão estoque de concentração 200 µg/mL, que foram posteriormente diluídas para construção de curva analítica no intervalo de 2 a 40 µg/mL. As curvas analíticas foram, portanto, construídas a partir de soluções padrão estoque independentes. Após as diluições, as soluções de trabalho foram filtradas em filtros de seguida de PVDF 0,45 µm e depois injetadas no sistema CLAE-UV nas condições cromatográficas estabelecidas. A partir dos cromatogramas, foi possível determinar a área dos picos, após integração usando software Waters Empower™, que foram utilizadas para realização dos cálculos. Após os cálculos, determinou-se a curva analítica por meio da equação de reta ($y = ax + b$) e também o coeficiente de correlação (r). O valor de r deve ser maior que 0,990 para caracterizar a linearidade do método analítico (BRASIL, 2017). A curva analítica foi usada para realizar a quantificação da donepezila nas formulações de liberação modificada avaliadas neste trabalho.

A curva analítica para a metodologia usando CLAE-UV apresentou inclinação (coeficiente angular) de 27543,5, interseção (coeficiente linear) de -7447,7 e correlação (r) de 0,99931.

3.3 ANÁLISE DAS FORMULAÇÕES

O doseamento das formulações contendo donepezila, na dose de 10 mg/g, foi realizada por diferentes técnicas (espectrofotometria no UV e CLAE-UV), de modo a caracterizar a homogeneidade do fármaco incorporado na matriz da formulação.

As análises das formulações contendo donepezila foram realizadas pelas duas técnicas avaliadas neste trabalho (CLAE-UV e espectrofotometria no UV-vis). A concentração de donepezila nas formulações foi de 10 mg/g, ou seja, cada 100 mg de formulação contém 1 mg do fármaco. As amostras foram preparadas, a partir da pesagem de 100 mg de cada formulação em duplicata (n=2), para balão de 50 mL, contendo 30 mL do diluente (que variou conforme o método de análise, conforme descrito a seguir). A amostra foi levada ao ultrassom sem aquecimento por 30 minutos. Posteriormente o volume foi ajustado com o diluente específico, obtendo-se uma concentração teórica de 20 µg/mL. No caso da análise por CLAE-UV, o diluente utilizado foi metanol: água (1:1, v/v), filtradas em filtro PVDF 0,45 µm e 20 µL foram injetados no sistema cromatográfico. No caso das análises por espectrofotometria no UV-vis, foram preparadas em dois diferentes diluentes (FGSSE e metanol), e as leituras realizadas no FGSSE a 313 nm e no metanol a 316 nm.

As análises por espectrofotometria no UV-vis necessitaram de análise do branco da amostra (matriz da formulação), devido ao efeito de matriz da formulação. Para isso, pesou 100 mg de matriz da formulação sem fármaco (placebo) e realizou-se o mesmo procedimento de preparo de amostra descrito anteriormente para os dois diluentes (FGSSE e metanol). Realizou-se a leitura das amostras preparadas com placebos no FGSSE a 313 nm e no metanol a 316 nm.

Análise estatística do doseamento de donepezila nas formulações de liberação modificada

Realizou-se análise de variância (ANOVA) com nível de significância de 5%, usando o teste Scott-Knott para comparação de médias.

4 RESULTADOS

As varreduras espectrais na faixa de 200 a 400 nm em metanol e FGSSE estão apresentadas na **Figura 4**.

Os resultados indicaram um pico de máxima absorção da donepezila em 268 nm e outro a 313 nm para o diluente metanol, enquanto que para o diluente FGSSE, observaram-se picos de máxima absorção em 271 nm e 316 nm.

A análise espectrofotométrica em metanol no comprimento de onda selecionado de 313 nm indicou os resultados apresentados a seguir.

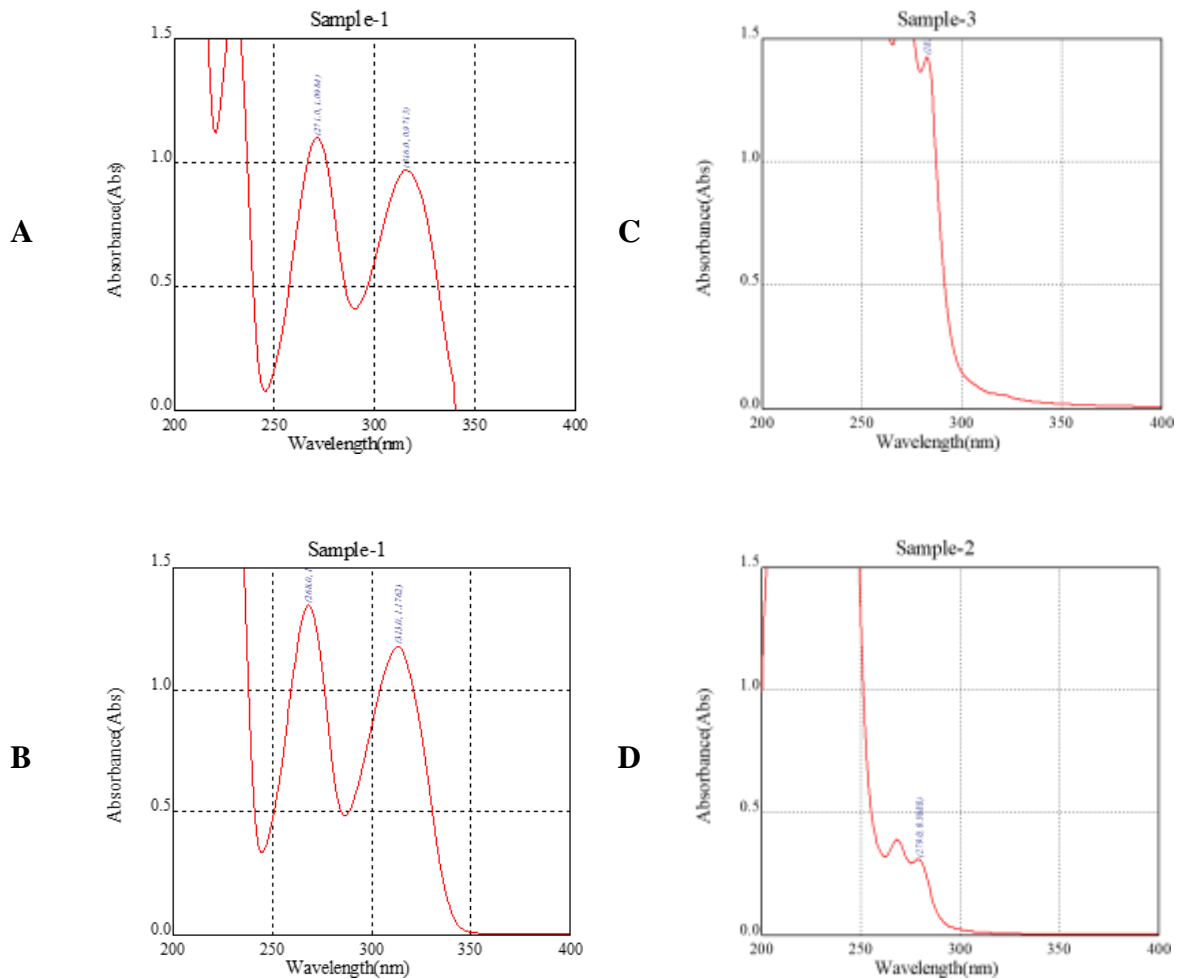


Figura 4. Varreduras espectrais na região do UV de a) solução padrão de donepezila a 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ diluída em FGSSE; b) solução padrão de donepezila a 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ diluída em metanol; c) placebo de formulação preparado em solução diluída em FGSSE; d) placebo de formulação preparado em solução diluída em metanol.

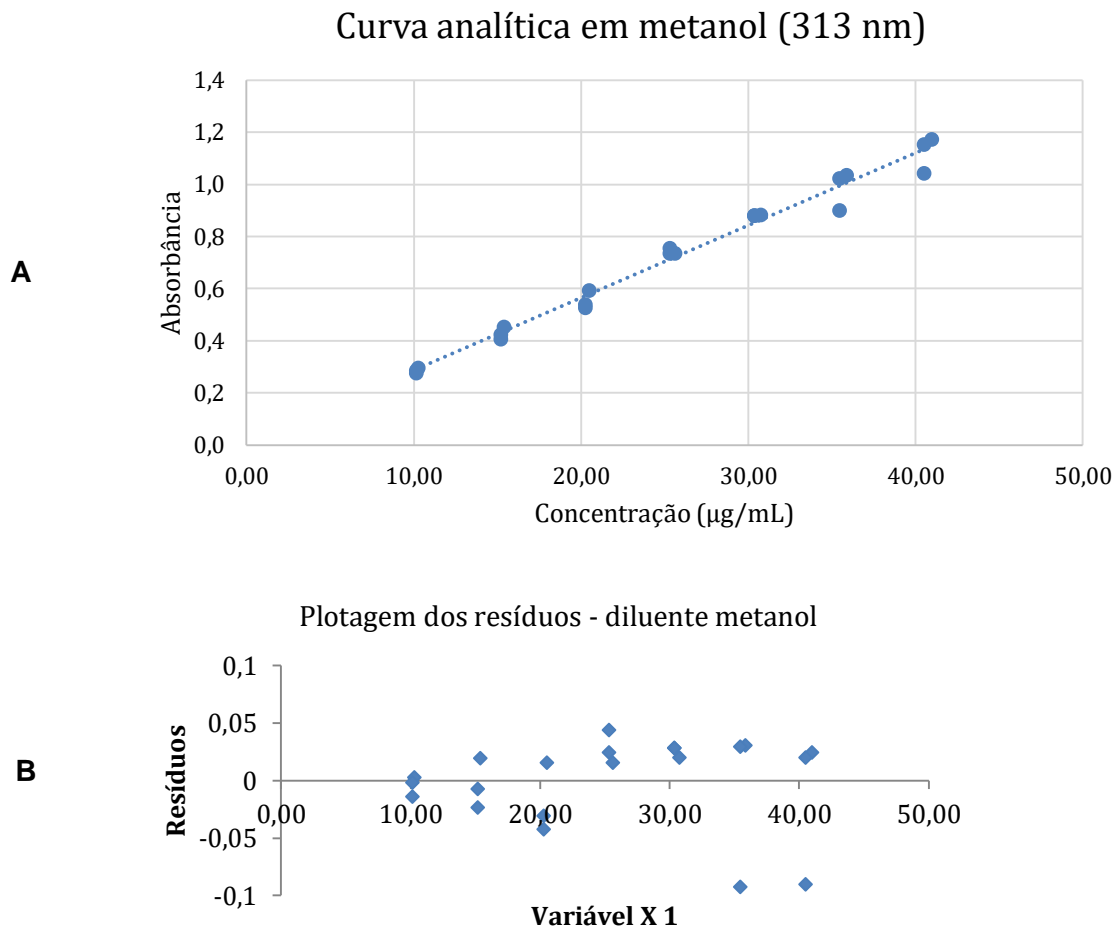


Figura 5. Curva analítica para quantificação da donepezila (a) e gráfico da dispersão dos resíduos (b), nas diluições em metanol (313nm).
Fonte: Da autora.

A equação de reta em metanol (313 nm) foi igual a $y = 0,0278 x (\pm 0,0024) + 0,0087 (\pm 0,0433)$. O r foi igual a $0,9955 \pm 0,0055$. A interseção não apresentou resultado estatisticamente diferente de zero ($p = 0,724$), enquanto a inclinação foi significativamente diferente de zero ($p < 0,0001$).

Tabela 2. Curva analítica com diluição das soluções de trabalho em metanol e análise em 313 nm (n=3).

Concentração teórica média (µg/mL)	Concentração experimental média (µg/mL)	Precisão (DPR, %)	Recuperação ± desvio padrão (%)
10,16	9,97	7,4	98,11 ± 7,32
15,24	15,09	0,4	99,02 ± 0,35
20,32	19,63	1,8	96,59 ± 1,77
25,40	26,43	1,9	104,08 ± 1,84
30,48	31,48	5,2	103,29 ± 5,16
35,56	35,12	3,5	98,76 ± 3,52
40,64	40,08	0,9	98,61 ± 0,86

Fonte: Da autora.

Na análise dos resíduos (**Figura 5 b**), inferiu-se que os resíduos seguem uma distribuição normal na faixa de concentração de 10 a 40 µg/mL, pois no teste de Breush-Pagan calculou-se $p=0,94$, indicando a homocedasticidade dos resultados. Para alcançar este resultado realiza-se análise de regressão linear a partir da plotagem no eixo x a concentração (em µg/mL) *versus* o quadrado dos resíduos no eixo y , seguido de análise de variância.

A análise espectrofotométrica em FGSSE no comprimento de onda selecionado de 316 nm indicou os resultados apresentados a seguir.

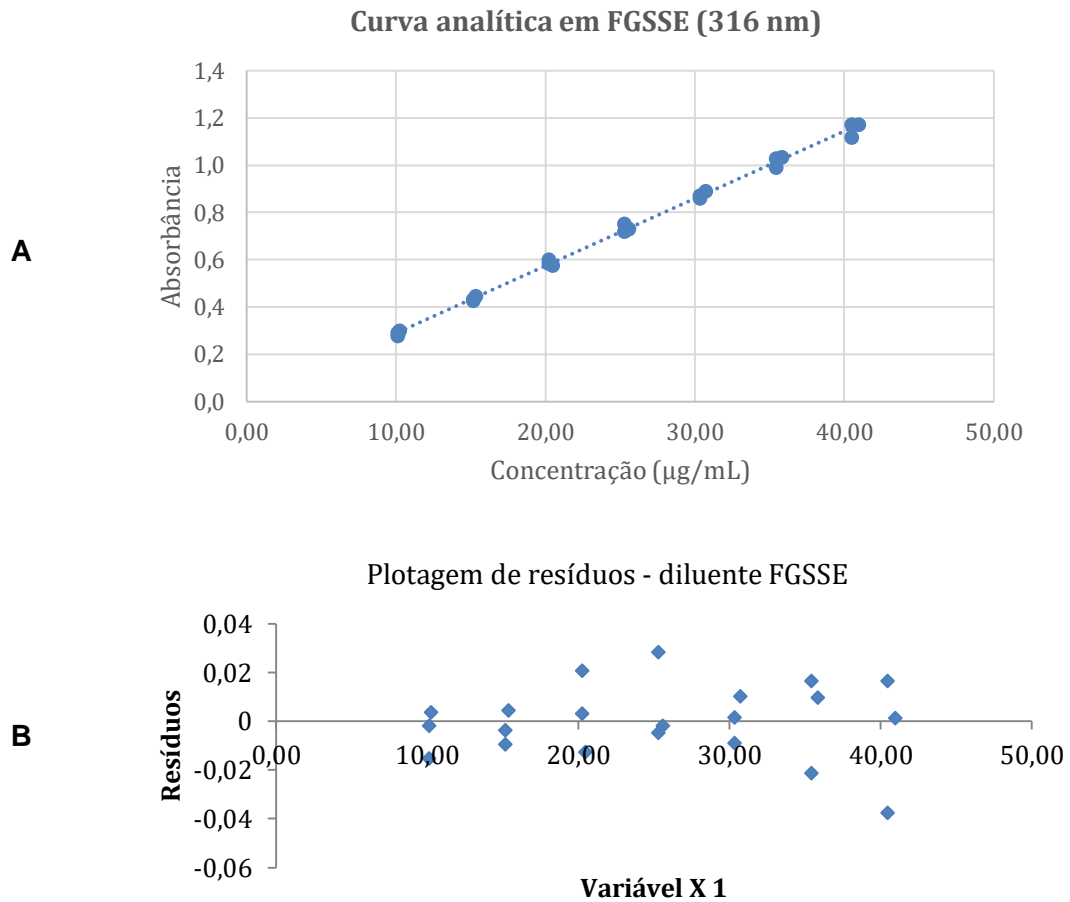


Figura 6. Curva analítica para quantificação da donepezila (a) e gráfico da dispersão dos resíduos (b), nas diluições em FGSSE (316 nm).
Fonte: Da autora.

A equação de reta em metanol (316 nm) foi igual a $y = 0,0284 (\pm 0,0009) + 0,0052 (\pm 0,0129)$. O r foi igual a $0,9995 \pm 0,0003$. A interseção não apresentou resultado estatisticamente diferente de zero ($p = 0,573$), enquanto a inclinação foi significativamente diferente de zero ($p < 0,0001$).

Tabela 3. Curva analítica com diluição das soluções de trabalho em FGSSE e análise em 316 nm (n=3).

Concentração teórica média (µg/mL)	Concentração experimental média (µg/mL)	Precisão (DPR, %)	Recuperação ± desvio padrão (%)
10,16	10,01	1,4	98,48 ± 1,44
15,24	15,14	0,7	99,32 ± 0,65
20,32	20,45	0,7	100,67 ± 0,66
25,40	25,65	1,1	101,00 ± 1,13
30,48	30,52	1,6	100,13 ± 1,60
35,56	35,62	0,1	100,17 ± 0,10
40,64	40,41	0,4	99,43 ± 0,37

Fonte: Da autora.

Na análise dos resíduos (**Figura 6 b**), inferiu-se que os resíduos seguem uma distribuição normal na faixa de concentração de 10 a 40 µg/mL, pois no teste de Breush-Pagan calculou-se $p=0,95$, indicando a homocedasticidade dos resultados. Para alcançar este resultado realizou-se análise de regressão linear a partir da plotagem no eixo x a concentração (em µg/mL) *versus* o quadrado dos resíduos no eixo y , seguido de análise de variância.

Realizou-se o doseamento das formulações de liberação modificada de donepezila, de modo a verificar a homogeneidade da incorporação do fármaco na preparação com aspecto de gel de alta consistência. Os resultados das análises das amostras analisadas por diferentes técnicas estão apresentados a seguir. É importante destacar que para análise das formulações por espectrofotometria no UV-vis, realizou-se a subtração da absorbância da amostra preparada com placebo da amostra da formulação, de modo a reduzir a interferência do efeito de matriz. Esta subtração foi feita considerando os dados obtidos com soluções amostra e placebo nos mesmos diluentes e com leituras nos mesmos comprimentos de onda no UV. Considerando o efeito de matriz, verificou-se que a absorbância dos placebos diluídos em metanol foi em média 2,8% do resultado da solução padrão na concentração de 20,0 µg/mL. Entretanto, a absorbância dos placebos diluído em FGSSE foi em média 20,2% do resultado da solução padrão na concentração de 20,0 µg/mL. Nota-se que a interferência do placebo evidenciada pela sua absorbância quando em solução diluída foi maior para formulações contendo o tensoativo polissorbato 80.

Tabela 4. Doseamento das formulações de liberação modificada de donepezila (n=2)

Formulação	Técnica analítica	Concentração teórica média (µg/mL)	Concentração experimental média (µg/mL)	Doseamento (%)
1	UV a 313 nm	20,16	20,08	97,0 ± 0,6
2			20,16	106,2 ± 0,8
1	UV a 316 nm	20,16	20,08	99,1 ± 0,8
2			20,16	100,9 ± 1,4
1	CLAE-UV a 268 nm	19,83	19,00	95,8 ± 0,6
2			26,35	105,3 ± 0,1

UV, espectrofotometria no UV; CLAE-UV, cromatografia líquida de alta eficiência com detecção UV

Fonte: Da autora.

Houve diferença estatística significativa entre os resultados a partir da ANOVA ($p=0,0001$). Observou-se que ao realizar a comparação das médias pelo teste de Scott-Knott, não houve diferença significativa entre a formulação 1 analisada pelos métodos por espectrofotometria no UV a 313 nm (diluyente metanol) e CLAE-UV a 268 nm. Também não houve diferença entre a formulação 2 analisada pelos métodos por espectrofotometria no UV a 313 nm (diluyente metanol) e CLAE-UV a 268 nm. Entretanto, houve diferença significativa a partir dos resultados das duas amostras (formulações 1 e 2) analisadas por espectrofotometria no UV a 316 nm (diluyente FGSSE) em comparação aos resultados obtidos por CLAE-UV.

5 DISCUSSÃO

Um bom solvente utilizado em análises espectroscópicas deve ser efetivo para a substância a ser determinada, não interagir com o soluto e não deve absorver de forma significativa no comprimento de onda no doseamento. Deve ter características físico-químicas de grau apropriado, como espectroscópico ou cromatográfico ou ser de fácil purificação, como também deve ser capaz de dissolver a amostra sem que a degrade. (VOGEL, 2022). Neste trabalho foram avaliados dois solventes (metanol e FGSSE) como diluentes para análise espectrofotométrica na região do UV, no intuito de avaliar o comportamento dos parâmetros que podem ser variados, e quais as interferências que estas variações podem acarretar no doseamento do fármaco, como mostrado nos resultados item (4).

As técnicas analíticas instrumentais utilizadas para a validação do método analítico já citadas: espectrofotometria no UV-vis e a CLAE permitiram a quantificação da donepezila nas novas formulações testadas, de modo a caracterizar o doseamento. A CLAE possui alta eficiência na separação dos compostos presentes na amostra, mostrando elevada sensibilidade, mas, por outro lado é uma técnica mais demorada e com custo mais elevado em comparação a espectrofotometria no UV- vis. Logo, a espectrofotometria no UV- vis tem um custo mais baixo, sendo uma técnica mais rápida e simples, podendo alcançar resultados com exatidão e precisão. Mas deve-se considerar por outro lado que a espectrofotometria no UV-vis é mais sujeita ao efeito de matriz na amostra, havendo maior potencial para interferências.

Ruela et al. (2014) descreveu uma metodologia analítica para determinação da DP na presença dos seus produtos de degradação em meio ácido e alcalino usando RP-CLAE. Foram detectados produtos de degradação da DP nas condições de estresse forçado em ácido clorídrico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e hidróxido de sódio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. O método apresentou precisão intradia ($n=6$) de 102,04% e precisão interdias em três dias diferentes ($n=6$, para cada dia) de 102,91%. O limite de quantificação foi de $0,1 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$, avaliado experimentalmente por injeções sucessivas de soluções padrão diluídas. Os resultados foram satisfatórios (RUELA et al., 2014).

Os resultados das figuras de mérito que foram avaliadas neste estudo atenderam à legislação vigente, a resolução RDC 166/17 da Anvisa. A linearidade do método foi demonstrada a partir dos dados obtidos na Figura 5 A e Figura 6 A (curva analítica), em que o eixo Y representa a área do pico no cromatograma obtido e o eixo X a concentração, obtendo-se o coeficiente de correlação (r) igual ou maior que 0,99, confirmando a linearidade do método no intervalo de 10,0 a 40,0 $\mu\text{g/mL}$. A precisão do método foi determinada pela precisão intradia. Tendo os valores de r dentro do que preconiza a resolução, a maioria dos valores de DPR esteve dentro dos limites de variação aceitáveis neste estudo, que foram de até 5%. Ou seja, os valores da precisão obtidos com valores de DPR menores que 5% encontram-se dentro dos valores satisfatórios, utilizando como referência o trabalho de Ruela et al. (2014). Exceções para os resultados usando o metanol como diluente, com quantificação a 313 nm, em que 2 pontos apresentaram DPR maior que 5%, necessitando repetições das análises para confirmação dos resultados, uma vez que podem estar relacionados a erros aleatórios e sistemáticos na etapa analítica. A recuperação obtida estava dentro dos limites aceitáveis, de 95-105% conforme as tabelas 2 e 3. Ou seja, estes resultados demonstram a concordância dos resultados experimentais obtidos usando a quantificação a partir da curva analítica em comparativo com a concentração teórica das soluções padrões. A sensibilidade dos métodos espectrofotométricos, usando metanol ou FGSSE como diluente foi menor do que o método por CLAE descrito por Ruela e

colaboradores (2014), visto que a menor concentração quantificada por espectrofotometria foi 10,0 µg/mL, em comparativo a 0,1 µg/mL determinada por CLAE.

O efeito matriz na análise espectrofotométrica pode ser minimizado ou mesmo eliminado usando métodos matemáticos e ou estatísticos. Na tentativa de reduzir o efeito matriz na análise espectrofotométrica, neste trabalho subtraiu-se a absorbância da solução preparada com placebo da formulação da amostra preparada com formulação contendo DP. A subtração da absorbância do placebo da absorbância da amostra contendo DP foi feita no respectivo diluente. Considerando o efeito matriz, a absorbância dos placebos diluído em FGSSE na mesma concentração que a amostra preparada com a formulação contendo o fármaco, indicou em média uma absorbância de 20% da leitura de uma solução padrão na concentração de 20,0 µg/mL. Assim, demonstra-se uma interferência significativa do placebo diluído em FGSSE pela medida da sua absorbância. Esta interferência foi maior para o placebo da formulação contendo o tensoativo polissorbato 80 do que para o placebo da formulação preparada com o tensoativo monoleína.

Os resultados da análise das amostras das duas formulações testadas indicam que a donepezila foi incorporada de modo homogêneo nas preparações. Utilizou-se como critério a especificação de 90-110% descrita na *United States Pharmacopeia* (USP, 2013) na monografia de comprimidos de cloridrato de donepezila. Logo, os resultados variaram de 95 a 106%, mostrando-se satisfatórios. Os resultados do doseamento das amostras das formulações contendo DP foram avaliados por análise estatística (ANOVA a 5% de significância). Após realizar a ANOVA, realizou-se o teste de Scott-Knott para comparação das médias dos resultados encontrados no doseamento e estes resultados indicaram diferenças significativas. Os resultados por espectrofotometria no UV-vis e CLAE indicaram uma diferença significativa entre as duas amostras (formulações 1 e 2) analisadas por espectrofotometria no UV a 316 nm (diluente FGSSE) em comparação aos resultados obtidos por CLAE-UV. Logo, percebe-se que a interferência dos componentes da formulação (efeito matriz) ainda pode ser significativa no solvente FGSSE. Entretanto, mais análises devem ser realizadas, visto que as amostras para doseamento das formulações contendo DP foram preparadas apenas em duplicata.

A maior interferência (efeito matriz) dos componentes da formulação usando o diluente FGSSE na metodologia por espectrofotometria no UV a 316 nm possivelmente está relacionada a uma maior solubilização dos componentes da formulação em FGSSE, em comparativo a análise pela mesma técnica analítica usando o metanol como diluente. Outra possibilidade é uma mudança nas características de absorção na região do UV-vis desta solução preparada com

placebo e diluída em FGSSE em comparativo aos resultados usando metanol como diluente, o que pode ser verificado pelas Figuras 3c e 3d.

6. CONCLUSÃO

A homogeneidade da DP incorporada nas formulações foi caracterizada, com resultados dentro da especificação proposta, indicando que as metodologias por espectrofotometria no UV podem ser ferramentas úteis nesta etapa de desenvolvimento farmacotécnico. Os resultados foram estatisticamente iguais entre as metodologias analíticas por CLAE-UV e espectrofotometria no UV a 313 (diluente metanol), porém diferentes da metodologia analítica por espectrofotometria no UV a 316 (diluente FGSSE). Possivelmente, este resultado está relacionado à maiores interferências do placebo (efeito matriz) quando as amostras da formulação contendo DP foram preparadas no diluente FGSSE. Assim, mais estudos são necessários para validação das metodologias analíticas propostas, e poder estabelecer um melhor comparativo entre a quantificação da DP por espectrofotometria no UV usando metanol como diluente como uma alternativa ao método para doseamento das formulações contendo DP por CLAE-UV.

REFERÊNCIAS

ALLEN JUNIOR, Loyd V.; POPOVICH, Nicholas G.; ANSEL, Howard C. **Formas Farmacêuticas e Sistemas de Liberação de Fármacos**. 9. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013.

ANVISA. AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução da diretoria colegiada- RDC nº 166, de 24 de julho de 2017. Disponível em: www.anvisa.gov.br/legis Acessado em: 15 de ago 2023.

BARNER, Erica L.; GRAY, Shelly L. Donepezil use in Alzheimer disease. **Annals of Pharmacotherapy**, v. 32, n. 1, p. 70-77, 1998. Disponível em: <https://journals.sagepub.com/doi/pdf/10.1345/aph.17150>. Acesso em: 10. mar. 2023.

BIRKS, Jacqueline S.; HARVEY, Richard J. Donepezil for dementia due to Alzheimer's disease. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, n. 6, 2018. Disponível em: <https://www.cochranelibrary.com/cdsr/doi/10.1002/14651858.CD001190.pub3/abstract>. Acesso em: 10. mar. 2023.

BRYSON, Harriet M.; BENFIELD, Paul. Donepezil. **Drugs & Aging**, v. 10, n. 3, p. 234-9; discussion 240, 1997. Disponível em: <https://europepmc.org/article/med/9108896>. Acesso em: 10. mar. 2023.

COLLINS, Carol Hollingworth; BRAGA, Gilberto Leite; BONATO, Pierina Sueli. **Introdução a métodos cromatográficos**. 5. ed. Campinas: Editora da Unicamp, 1993.

DEARDORFF, William James; GROSSBERG, George T. A fixed-dose combination of memantine extended-release and donepezil in the treatment of moderate-to-severe Alzheimer's disease. **Drug Design, Development and Therapy**, p. 3267-3279, 2016. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.2147/DDDT.S86463>. Acesso em: 10. mar. 2023.

EHAB, A. et al. Alzheimer's disease and its current treatments; Is there a possibility for a cure. **Open Journal of Chemistry**, v. 5, n. 1, p. 013-019, 2019. Disponível em: https://www.researchgate.net/profile/Rania-Hathout/publication/333942236_Alzheimer's_disease_and_its_current_treatments_Is_there_a_possibility_for_a_cure/links/5d0d7ad7a6fdcc24629a3c5b/Alzheimers-disease-and-its-current-treatments-Is-there-a-possibility-for-a-cure.pdf. Acesso em: 10. mar. 2023.

FALCO, Anna de et al. Doença de Alzheimer: hipóteses etiológicas e perspectivas de tratamento. **Química Nova**, v. 39, p. 63-80, 2016. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/qn/a/6QpByS45Z7qYdBDtD5MTNcP/abstract/?lang=pt>. Acesso em: 10. mar. 2023.

FORLENZA, Orestes V. Tratamento farmacológico da doença de Alzheimer. **Archives of Clinical Psychiatry (São Paulo)**, v. 32, p. 137-148, 2005. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rpc/a/RtsYhwfHPBmSvpXgJHzdVWs/abstract/?lang=pt>. Acesso em: 10. mar. 2023.

FORLENZA, O. V. Tratamento farmacológico da doença de Alzheimer. **Revista de Psiquiatria Clínica**, v. 32, n. 3, p. 137-48, 2005.

GOLAN, David et al. **Princípios de Farmacologia**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009.

GROTTO, Denise. **Otimização e validação da quantificação de malondialdeído plasmático por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção visível**. 2007. Dissertação (Mestrado). Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria: UFSM, 2007. Disponível em:

<https://repositorio.ufsm.br/bitstream/handle/1/5998/denise.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 10. mar. 2023.

KASSAB, Nájla Mohamad. **Determinação de hormônios esteroides em contraceptivos orais por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)**. 2001. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas. São Paulo: USP, 2001. Disponível em:

https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/9/9137/tde-17012020-162229/publico/NAJLA_MOHAMAD_KASSAB_MESTRADO.pdf. Acesso em: 10. mar. 2023.

KIM, Kyoung-Ah et al. Pharmacokinetic comparison of orally disintegrating and conventional donepezil formulations in healthy Korean male subjects: a single-dose, randomized, open-label, 2-sequence, 2-period crossover study. **Clinical Therapeutics**, v. 33, n. 7, p. 965-972, 2011. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0149291811003997>. Acesso em: 10. mar. 2023.

MOFFAT, Anthony C.; OSSELTON, M. David; WIDDOP, Brian. **Clarke's analysis of drug and poisons: in pharmaceuticals, body fluids and postmortem material**. 4 ed. London: Pharmaceutical Press, 2011. 2609 p.

PEZZINI, Bianca Ramos; SILVA, Marcos Antônio Segatto; FERRAZ, Humberto Gomes. Formas farmacêuticas sólidas orais de liberação prolongada: sistemas monolíticos e multiparticulados. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 43, n. 4, p. 491-502, dez. 2007.

RANG, Humphrey P.; DALE, Maureen M.; RITTER, J. M.; FLOWER, R. J.; HENDERSON G. **Rang & Dale. Farmacologia**. 9ª edição. Rio de Janeiro, Elsevier, 2020.

ROH, Hyerang; SON, Hankil; LEE, Donghwan; YEON, Kyu Jeong; KIM, Hyun Soo; KIM, Hohyun; PARK, Kyungsoo. Pharmacokinetic Comparison of an Orally Disintegrating Film Formulation with a Film-Coated Tablet Formulation of Sildenafil in Healthy Korean Subjects: a randomized, open-label, single-dose, 2-period crossover study. **Clinical Therapeutics**, [S.L.], v. 35, n. 3, p. 205-214, mar. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.clinthera.2013.02.006>.

ROCHA, Fábio R. P.; TEIXEIRA, Leonardo S. G. Estratégias para aumento de sensibilidade em espectrofotometria UV-VIS. **Química Nova**, v. 27, p. 807-812, 2004. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/qn/a/wLY84pzVXSZ68nnq5pczd5L/?lang=pt>. Acesso em: 10. mar. 2023.

ROCHA, Lizandra Viana Maurat. **Desenvolvimento e caracterização de nanopartículas poliméricas carreadoras de curcuminoides: um potencial teranóstico para alzheimer**. Dissertação (Mestrado). Disponível em: <http://objdig.ufrj.br/64/teses/871627.pdf>. Acesso em: 10. mar. 2023.

RUELA, André Luís Morais Ruela et al. LC-PDA and LC-MS studies of donepezil hydrochloride degradation behaviour in forced stress conditions. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 25, n. 11, 2014. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/jbchs/a/KkCgqJz6csgWfwrFDk6MkL/?lang=en>. Acesso em 01. set. 2023.

SANTO, Simona Gabriella di; PRINELLI, Federica; ADORNI, Fulvio; CALTAGIRONE, Carlo; MUSICCO, Massimo. A Meta-Analysis of the Efficacy of Donepezil, Rivastigmine, Galantamine, and Memantine in Relation to Severity of Alzheimer's Disease. **Journal Of Alzheimer'S Disease**, [S.L.], v. 35, n. 2, p. 349-361, 17 abr. 2013. IOS Press. <http://dx.doi.org/10.3233/jad-122140>.

SCHOTT, Karen Lilian. **Quantificação da glutationa reduzida em eritrócitos humanos por cromatografia líquida de alta eficiência-UV: validação e aplicação**. 2005. Dissertação (Mestrado). Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica. Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria: UFSM, 2007. Disponível em: <https://repositorio.ufsm.br/bitstream/handle/1/11161/KARENSCHOTT.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 10. mar. 2023.

SILVA, Poliane Cristine da. **Medicamentos contendo cloridrato de donepezila para tratamento da doença de Alzheimer**. 2022. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação). Curso de Farmácia. Universidade Federal de Ouro Preto. Ouro Preto: 2022. Disponível em: <http://monografias.ufop.br/handle/35400000/4181>. Acesso em: 10. mar. 2023.

SIQUEIRA, Gilson. Princípios de cromatografia a líquido (HPLC). **2018. Disponível em:** <https://www.linkedin.com/pulse/princ%C3%ADpios-de-cromatografia-l%C3%ADquido-hplc-gilson-siqueira/?originalSubdomain=pt>. **Acessado em: 20. agost. 2023.**

SUTTHAPITAKSAKUL, Lalinthip; DASS, Crispin R.; SRIAMORNSAK, Pornsak. Donepezil—an updated review of challenges in dosage form design. **Journal Of Drug Delivery Science and Technology**, [S.L.], v. 63, p. 102549, jun. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jddst.2021.102549>.

TAN, Chen-Chen; YU, Jin-Tai; WANG, Hui-Fu; TAN, Meng-Shan; MENG, Xiang-Fei; WANG, Chong; JIANG, Teng; ZHU, XI-Chen; TAN, Lan. Efficacy and Safety of Donepezil, Galantamine, Rivastigmine, and Memantine for the Treatment of Alzheimer's Disease: a systematic review and meta-analysis. **Journal of Alzheimer's Disease**, [S.L.], v. 41, n. 2, p. 615-631, 23 jun. 2014. IOS Press. <http://dx.doi.org/10.3233/jad-132690>.

TORREZ, Vitor Rocco. **Administração Intra-hipocampal de Ácido Ocadáico: Um Modelo Animal Similar à Doença de Alzheimer.** 2011. ICBS. Departamento de Bioquímica, UFRGS - Porto Alegre/RS. Disponível em: https://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/47169/Poster_11920.pdf?sequence=2. Acesso em: 10. mar. 2023.

UNITED STATES PHARMACOPEIA, USP 36, **Convenção Farmacopeia dos Estados Unidos:** Rockville, 2013.

WAGNER, Maicon Cauan. **Caracterização físico-química da Lecitina de soja orgânica e perspectivas no uso da Fosfatidilcolina complexada com biopolímeros para o tratamento da doença do mal de alzheimer.** 2018. Monografia (Graduação). Curso de Licenciatura em Química. Universidade Federal da Fronteira. UFFS Sul. Disponível em: <https://rd.uffs.edu.br/handle/prefix/4792>. Acesso em: 10. mar. 2023.

VOGEL, Arthur Israel. **Análise química quantitativa / Vogel;** tradução Júlio Carlos Afonso, Paula Fernandes de Aguiar, Ricardo Bicca de Alencastro. - [Reimpr.]. - Rio de Janeiro: LTC, 2022.

ZHAO, Ze Qiang; CHEN, Bo Zhi; ZHANG, Xiao Peng; ZHENG, Hui; GUO, Xin Dong. An Update on the Routes for the Delivery of Donepezil. **Molecular Pharmaceutics**, [S.L.], v. 18, n. 7, p. 2482-2494, 8 jun. 2021. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.1c00290>.