

Determinação de cloridrato de fluoxetina por espectrofotometria no ultravioleta

Fluoxetine hydrochloride determination by ultraviolet spectrophotometry

Marlene Maria Fregonezi-Nery², Elisabeth Aparecida dos Santos Gianotto², José Carlos Dalmas³, Marcela Maria Baraca², Rubia Casagrande², Hodnei Takashi Machado¹ & Bruna Miglioranza¹.

RESUMO – Um simples, rápido e econômico método espectrofotométrico no ultravioleta foi desenvolvido para determinação de cloridrato de fluoxetina em cápsulas. O cloridrato de fluoxetina foi determinado a 276nm em etanol absoluto. A faixa de linearidade encontrada foi de 100,00 a 300,00mg/mL em etanol absoluto, sendo a equação de regressão $Abs. = -0,00158 + 0,013545 \times Conc.$ e coeficiente de correlação de 0,9999. O método foi validado por meio de vários parâmetros de acordo com a resolução RE 899 (ANVISA) e o *International Conference on Harmonization (ICH)*. Os resultados demonstraram que o método é linear, seletivo, preciso, exato e robusto.

PALAVRAS-CHAVE – Fluoxetina, depressão, validação, espectrofotometria.

SUMMARY – A simple, fast and economical ultraviolet spectrophotometric method has been developed for determination of fluoxetine hydrochloride. The fluoxetine hydrochloride was determined at 276nm on absolute ethanol. The linearity range was found from 100,00 to 300,00mg/mL on absolute ethanol, the regression equation is $Abs. = -0,00158 + 0,013545 \times Conc.$ and the coefficient of correlation is 0,9999. The method was tested and validated by many parameters according to resolution RE 899 (ANVISA) and the International Conference on Harmonization (ICH). The results have shown that the procedure is linear, selective, precise, exact and robust.

KEYWORDS – Fluoxetine, depression, validation, spectrophotometry.

INTRODUÇÃO

Nos últimos anos vários antidepressivos foram introduzidos na terapêutica, principalmente os inibidores seletivos da recaptção da serotonina (ISRSs). Esses fármacos alteraram radicalmente o tratamento da depressão por serem mais aceitáveis em termos de tolerabilidade e toxicidade. Os 5 ISRSs atualmente disponíveis no mercado são: a fluoxetina, a sertralina, a paroxetina, o citalopram e a fluoroxamina (Lafer *et al*, 2001).

O cloridrato de fluoxetina (cloridrato de N-metil- γ -[4-(trifluorometil)fenoxi]-ben-zenopropanamina) é o antidepressivo mais utilizado no mundo (WHO, 1998), comercialmente conhecido como Prozac[®] e disponível na forma de cápsulas, comprimidos, comprimidos revestidos e solução oral.

A literatura apresenta uma série de métodos para determinação de fluoxetina em medicamentos. O método oficial descrito pela Farmacopéia Americana 29^a ed. utiliza a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). A mesma técnica foi descrita por Eldawy *et al* (2002), Bertholdi *et al* (2001), Bueno *et al* (2000) e Raggi (1998). a espectrofotometria no visível foi empregada por Onal *et al* (2006), (Starczewska *et al*, 2003), Starczewska (2001), Prabhakar *et al*, (1999) e

Bebawy *et al* (1999) e no ultravioleta por Sujatha *et al* (2004). Outros métodos alternativos para determinação de fluoxetina em cápsulas foram: espectrofluorimetria e a eletroforese capilar (Mandrioli *et al*, 2002), cromatografia gasosa (Berzas *et al*, 2000) e espectrofotometria derivada (Raggi *et al*, 1998).

O objetivo do presente estudo foi desenvolver e validar um método analítico alternativo, simples, sensível, rápido e de baixo custo quando comparado ao método oficial (CLAE) para análise de rotina do cloridrato de fluoxetina.

MATERIAIS E MÉTODOS

Reagentes e amostras

Empregou-se como substância química de referência de cloridrato de fluoxetina USP (lote: F2C132). Etanol absoluto p.a. de três fornecedores (A, B e C), cápsulas comerciais de cloridrato de fluoxetina 20mg (amostra 1 e 2) e cloridrato de fluoxetina matéria-prima (amostra 3).

Equipamentos

Espectrofotômetro UV-Vis, marca Shimadzu, Modelo 160-A, com duplo feixe e detector de 190 a 1100 nm. Balança analítica AE 200. Ultra-som Thorton.

Recebido em 08/01/2007

¹Aluno do 3º ano de Farmácia - UEL; Bolsista PIBIC/CNPq do projeto Metodologia para Determinação do Cloridrato de Fluoxetina em Cápsulas;

²Docente do Departamento de Ciências Farmacêuticas - Centro de Ciências da Saúde da UEL;

³Docente do Departamento de Estatística - Centro de Ciências Exatas da UEL

Metodologia

O método foi validado de acordo com a *Guidelines International Conference on Harmonization (ICH)* para procedimentos de validação analítica e Resolução RE 899 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) publicada em março de 2003.

Linearidade

Uma solução estoque de 625,00 µg/mL de cloridrato de fluoxetina padrão de referência em etanol absoluto foi preparada e diluída para obter concentrações de 100,00, 150,00, 200,00, 250,00 e 300,00 µg/mL. As soluções foram preparadas em triplicata e as leituras foram efetuadas a 276nm, sendo o espectrofotômetro calibrado com etanol absoluto. Calculou-se a equação da reta através do método dos mínimos quadrados e o coeficiente de correlação de Pearson.

Precisão

A repetibilidade foi determinada partindo-se de 6 tomadas de ensaio equivalente a 14,00mg de cloridrato de fluoxetina (amostra 1) e diluída para 50mL de etanol absoluto, obtendo-se soluções na concentração de 280,00 µg/mL. A partir dos resultados obtidos foi calculado o desvio-padrão relativo e o coeficiente de variação (CV). A reprodutibilidade (precisão intermediária) foi realizada no mesmo laboratório, utilizando o mesmo equipamento em diferentes dias e com analistas diferentes.

Exatidão

A exatidão foi determinada pela recuperação de quantidades conhecidas de cloridrato de fluoxetina - padrão de referência adicionada à amostra comercial (amostra 1).

Para a determinação foram preparadas soluções em triplicata contendo mistura de solução amostra de 100,00 µg/mL e soluções-padrão de 100,00, 150,00 e 200,00 µg/mL de cloridrato de fluoxetina. As leituras das soluções foram efetuadas a 276nm e as quantidades recuperadas de cloridrato de fluoxetina-padrão, expressas em µg/mL, foram obtidas a partir da curva de calibração traçada pelo respectivo programa do equipamento.

Especificidade

A especificidade do método foi avaliada, comparando-se os sinais obtidos pela varredura de 220nm a 350nm da solução-padrão de cloridrato de fluoxetina, 250,00 µg/mL e das soluções-placebo, preparadas individualmente com celulose microcristalina, manitol, lactose, amido de milho, estearato de magnésio e dióxido de silício na concentração correspondente a 100% da quantidade declarada de analito na formulação.

Robustez

Foi determinada, comparando-se soluções da amostra 1 preparadas com três fabricantes de etanol absoluto. As soluções foram preparadas na concentração correspondente a 280,00 µg/mL de cloridrato de fluoxetina em triplicata. As concentrações, expressas em µg/mL, foram obtidas a partir da curva de calibração traçada pelo respectivo programa do equipamento. Os resultados foram analisados estatisticamente empregando a análise de variância (ANOVA) ao nível de 95% de confiança.

Aplicação do método em amostras

O método foi aplicado em amostras comerciais de dois fabricantes (amostra 1 e 2) e matéria-prima (amostra 3). As soluções foram preparadas na concentração de 280,00 e 250,00 µg/mL de cloridrato de fluoxetina em etanol absoluto para cápsulas e matéria-prima, respectivamente.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da especificidade comprovam que os excipientes testados não interferem na análise do cloridrato de fluoxetina, por não apresentarem absorção na faixa de 220nm a 300nm, demonstrando a especificidade do método.

A curva de calibração foi construída com a média dos resultados de três curvas de calibração plotando-se a concentração (X) versus a absorvância (Y). A equação da reta, $Abs. = -0,00158 + 0,013545 \times Conc.$ com coeficiente de regressão de $r = 0,9999$ foram obtidos pelo método dos mínimos quadrados, comprovando a linearidade do método. A validade da regressão linear e a significância estatística da curva ajustada foi testada por meio de análise da variância onde se verificou que o modelo linear está bem ajustado na faixa de concentração estudada com $p = 6,158 \times 10^{-17}$.

A exatidão do método foi expressa em porcentagem de recuperação de cloridrato de fluoxetina-padrão adicionado à amostra 1. Os resultados obtidos na faixa de 98,89% a 101,10% confirmam a exatidão do método (**Tabela I**).

A repetibilidade do método foi expressa como coeficiente de variação de 6 determinações de cloridrato de fluoxetina em cápsulas (amostra 1). Os resultados estão apresentados na **Tabela II** e podemos concluir que o método tem uma boa repetibilidade, visto que o coeficiente de variação com valor igual a 1,19 é inferior a 5% do especificado na resolução vigente, RE 899 ANVISA (2003).

Os resultados da precisão intermediária estão agrupados na **Tabela III**. Através da análise de variância com dois fatores, verifica-se que não existe diferença estatística significativa para o nível de 0,05 entre analistas e dias (**Tabela IV**).

Os resultados do estudo da robustez do método estão expostos na **Tabela V**. Observa-se através da análise estatística, empregando ANOVA fator único, que não há diferença significativa entre os fornecedores de etanol absoluto ($p = 0,077$) (**Tabela VI**).

Os resultados obtidos na análise das amostras pela aplicação da espectrofotometria no ultravioleta apresentaram valores dentro da especificação farmacopéica de 90,0 a 110,0% de cloridrato de fluoxetina em cápsulas e 98,0 a 102,0% em matéria-prima.

CONCLUSÃO

O método atende às exigências da Resolução RE N° 899, por apresentar sensibilidade, reprodutibilidade, precisão, robustez, linearidade e confiabilidade requeridos para um método analítico. Pode ser considerado um método alternativo ao método oficial (CLAE), pois, a espectrofotometria é um método simples, rápido e de baixo custo, podendo ser empregado para análise de

TABELA I
Resultados obtidos no teste de recuperação do cloridrato de fluoxetina aplicado na amostra 1 pelo método espectrofotométrico (n = 9)

Quantidade adicionada (mg/mL)	Quantidade recuperada (mg/mL)	Media recuperada % (±DP)
100	100,12	100,12 (±0,0025)
150	148,34	98,89 (±0,0017)
200	202,21	101,10 (±0,0035)

DP – desvio-padrão

TABELA III
Resultados da precisão intermediária inter-dia e intra-dia do método utilizando solução de cloridrato de fluoxetina (amostra 1)

Analistas	Dias	Concentração (n=6) µg/mL	Desvio-padrão	CV(%)
Analista 1	Dia 1	290,13	0,76	0,25
	Dia 2	288,36	3,32	1,11
Analista 2	Dia 1	289,67	6,42	2,14
	Dia 2	290,97	6,54	2,17

CV - coeficiente de variação

TABELA V
Resultados da avaliação da robustez do método utilizando solução de 280,00 µg/mL de cloridrato de fluoxetina (amostra 1) variando-se o fornecedor de etanol absoluto

Fornecedor de etanol absoluto	Concentração µg/mL			Média
	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	
A	276,84	280,66	282,09	279,86
B	272,99	279,19	277,76	276,65
C	277,43	276,23	275,37	284,69

rotina em controle de qualidade de cloridrato de fluoxetina para matéria-prima e cápsulas comerciais.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao CNPq pelo apoio financeiro e bolsa; PIBIC e ao laboratório Biosintética Ltda. pelo fornecimento de matéria-prima.

REFERÊNCIAS

- Brasil. Resolução RE N° 899, de 29 de Maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Poder Executivo, Brasília, D.O.U. 02 jun 2003.
- Bebawy, L. I.; El-Kousy, N.; Suddik, J. K.; Shokry, M. Spectrophotometric determination of fluoxetine and sertraline using chloranil, 2, 3 dichloro-5,6 dicyano benzoquinone and iodine. J. Pharm. Biomed. Anal. 1999 (21): 133-2.
- Bertholdi, K. G.; Bueno, F.; Bergold, A. M. Determination of fluoxetine content in different formulations by HPLC. Acta Farm. Bonaerense 2001 (20): 209-14.
- Berzas, N. J. J.; Villasenor, L.M.J.; Contento, S.A.M.; Aguas Nuevo, E. Determination of fluoxetine, fluvoxamine and clomipramine in pharmaceutical formulations by capillary gas chromatography. J. Chromatogr. Sci 2000 (38): 200-6.

TABELA II
Resultados obtidos no ensaio de repetibilidade do método empregando solução contendo 280,00 µg/mL de cloridrato de fluoxetina (amostra 1)

Amostra	Concentração µg/mL
1	280,97
2	283,27
3	276,23
4	277,43
5	275,37
6	273,13
Média	277,73
DP	3,32
CV (%)	1,19

DP – desvio-padrão CV - coeficiente de variação

TABELA IV
Resultados estatísticos da precisão intermediária

Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrado médio	F calculado	p*
Analistas	1	10	10	0,42	0,52
Dias	1	1	1	0,03	0,86
Resíduo	21	517	25		
Total	23				

* nível de significância p = 5% F de Snedocor

TABELA VI
Resultados estatísticos da robustez do método utilizando ANOVA fator único

Fonte da variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrado médio	F	F crítico	p
Fornecedores	2	98,34	49,17	4,04	5,14	0,077
Resíduo	6	73,04	12,17			
Total	8	171,38				

* nível de significância p = 5% F de Snedocor

- Bueno, F.; Bergold, A. M.; Froehlich, P. E. Assay of fluoxetine hydrochloride by titrimetric and HPLC methods. Bull. Chim. Farm. 2000 (139): 256-9.
- El-Dawy, M. A.; Mabrouk, M. M.; El-Barbary, F. A liquid chromatographic determination of fluoxetine. J. Pharm. Biomed. Anal. 2002 (30): 561-71.
- ICH, International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration on Pharmaceuticals for Human Use Q2A. Text on Validation of Analytical Procedures. March 1995, Geneva.
- Kasper, S. From symptoms to social functioning: differential effects of antidepressant therapy. Int. Clin. Psychopharmacol. 1999 (14): 27-31.
- Lafer, B.; Almeida, O. P.; Fraguas Jr., R.; Miguel, E. C. Depressão no ciclo da vida. Porto Alegre: Artmed Editora, 2001. 271 p.
- Mandrioli, R.; Pucci, V.; Visini, D.; Varani, G.; Raggi, M. A. Rapid methods for determination of fluoxetine in pharmaceutical formulations. J. Pharm. Biomed. Anal. 2002 (29): 1127-34.
- Onal, A.; Kepecki, S.; Evrim, C. M.; Erturk, S. Spectrophotometric determination of certain antidepressants in pharmaceutical preparations. J. AOAC Int. 2006 (89): 966-71.

12. Prabhakar, A .H.; Patel, V.B.; Giridhar, R. Spectrophotometric determination of fluoxetine hydrochloride in bulk and in pharmaceutical formulations. J Pham. Biomed. Anal. 1999 (20): 427-32.
13. Raggi, M. A.; Bugamelli, F.; Casamenti, G.; Mandrioli, R.; De Ronchi, D.; Volterra, V. Analytical methods for quality control of Prozac capsules. J Pham. Biomed. Anal. 1998 (18): 699-706.
14. WHO, Selective serotonin re-uptake inhibitors and withdrawal reactions. WHO Drug Inf. 1998 (12): 136-8.
15. Starczewska, B.; Jasinska, A; Bialous, B. Study and analytical application of ion-pair formation in the system fluoxetine-pyrocatechol violet and fluvoxamine-pyrocatechol violet. Pharmazie. 2003 (58): 245-8.
16. Sujatha, K.; Chitra, K.; Kumar, P. Ashok; Kiranbabu, K.; Vasantha, J. Spectrophotometric determination of fluoxetine hydrochloride Indian J. Pharm. Sci. 2004 (66): 457-9.
17. Sujatha, K.; Chitra, K.; Fatima, G. X.; Swapna, R.; Vasantha, J. Colorimetric determination of fluoxetine hydrochloride from its pharmaceutical preparation. Indian Pharm. 2004 (3): 62-3.
18. Thase, M. E. Long-term nature of depression. J. Clin. Psychiatry, 1999 (60): 3-9.
19. United States Pharmacopeia, 29. Ed., Rockville, United pharmaceutical convention, 2006.

Endereço para correspondência

Marlene Maria Fregonezi Nery
Universidade Estadual de Londrina,
Campus Universitário, Caixa Postal 6001
86.051-990 - Londrina - PR
e-mail nery@uel.br