

DOSAGEM EXPERIMENTAL DE CLORIDRATO DE FLUOXETINA UTILIZANDO ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA

Cleber Ricachenevsky¹, Fábio Vieira Lacerda², Lúcia Codognoto de Oliveira³, Hueder Paulo Moisés de Oliveira³, Máira Regina Rodrigues Magini³

1-Faculdade de Saúde Ibituruna- FASI/Santa Casa, Montes Claros-MG, cleber@fasi.edu.br

2-Universitas- Centro Universitário de Itajubá , Itajubá-MG, doc_fabio2004@yahoo.com.br

3-Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento , Laboratório de Biopolímeros e Fotoquímica - Universidade do Vale da Paraíba, mrr@univap.br

Resumo: A fluoxetina é um fármaco que pertence a classe dos Inibidores Seletivos da Recaptação da Serotonina (ISRS), com a introdução dessa classe obteve-se uma melhora significativa na segurança e tolerabilidade dos antidepressivos. O amplo uso de Cloridrato de Fluoxetina nos últimos anos tem requerido o desenvolvimento de métodos de análise, não somente destinados para controle de qualidade nas preparações farmacêuticas, mas também para fluídos biológicos. Este trabalho propõe o desenvolvimento de uma metodologia para determinação de cloridrato de fluoxetina por espectroscopia de fluorescência em medicamentos. A método proposto apresentou um comportamento linear para o cloridrato de fluoxetina no intervalo de concentração de 50 a 500 ng mL⁻¹ com linearidade de 0,995 e sensibilidade de 262 u.a. / ng mL⁻¹. Testes preliminares indicaram a possibilidade da quantificação de cloridrato de fluoxetina em amostras de medicamentos (cápsulas).

Palavras-chave: Fluoxetina, cloridrato de fluoxetina, espectroscopia de fluorescência, Inibidores Seletivos da Recaptação da Serotonina (ISRS)

Área do Conhecimento: Ciências da Saúde

Introdução

A fluoxetina é um fármaco que pertence a classe dos Inibidores Seletivos da Recaptação da Serotonina. Com a introdução dessa classe de fármaco obteve-se uma melhora significativa na segurança e tolerabilidade dos antidepressivos. A fluoxetina está envolvida no aumento da neurotransmissão serotoninérgica em algumas áreas do cérebro, por meio de aumento da liberação de serotonina, como resultado da dessensibilização dos autoreceptores 5-HT somatodendríticos e terminais, os quais, normalmente, exercem efeito negativo sobre neurônios serotoninérgicos (SZABOT et al., 1999).

A fluoxetina é um dos fármacos da classe dos ISRSs, que surgiu como resultado de pesquisa racional para encontrar medicamentos tão eficazes quanto os Antidepressivos Tricíclicos (ADTs), com mínimos problemas de tolerabilidade e segurança. A potência da inibição de recaptação da serotonina é variada, assim como a seletividade por noradrenalina e dopamina (GOODNICK et al., 1998). A fluoxetina é o protótipo dos fármacos antidepressivos que inibem seletivamente a captura de serotonina de forma potente, o que resulta uma potencialização da neurotransmissão serotoninérgica (HARVEY et al., 2001).

O amplo uso de cloridrato de fluoxetina nos últimos anos tem requerido o desenvolvimento de métodos de análise, não somente destinados para o controle de qualidade nas preparações

farmacêuticas, mas também para fluídos biológicos. A determinação de cloridrato de fluoxetina em fluídos biológicos surge para atender às necessidades tanto clínicas quanto toxicológicas, sendo de grande importância para o estabelecimento de dosagens adequadas, para a identificação de níveis tóxicos e para melhorar o entendimento farmacocinético e farmacodinâmico. Existem diversas metodologias analíticas para a determinação do cloridrato de fluoxetina em produtos comerciais, tais como espectrofotometria (DARWISH, 2005), eletroforese capilar (HIMMELSBACH, et al., 2005) e os métodos cromatográficos (NEVADO, et al., 2006). Para a análise de matrizes biológicas, os métodos mais recomendados são os que empregam a cromatografia líquida de alta eficiência com detectores UV/VIS (SABBIONI, et al., 2004C), fluorescência (ATTA-POLITOU, et al., 2004) e o espectrômetro de massa (MASSAROTI, et al., 2005).

O interesse no desenvolvimento de uma metodologia simples e de baixo custo para a determinação de cloridrato de fluoxetina é de grande interesse. Desta forma o objetivo deste trabalho foi utilizar a espectroscopia de fluorescência para dosagem de cloridrato de fluoxetina em formulações farmacêuticas.

Metodologia

Materiais e Métodos

Materiais:

Balança analítica.
Balões volumétricos: 50 e 100 mL.
Pipetas automáticas 0-1000 μ L e 0-200 μ L.
Aparelhagem: Espectrofluorímetro, marca SHIMADZU, modelo RF-5301 PC.
Cubeta de quartzo de 1 cm de caminho óptico.
Padrão analítico de Cloridrato de Fluoxetina USP

Método:

Curva analítica- Segundo RAGGI et al.(1998), preparou-se uma solução estoque metanólica de cloridrato de fluoxetina de concentração 1 μ g/mL e as demais soluções para leitura fluorimétricas foram preparadas a partir da solução estoque conforme o especificado na **Tabela 1**, de forma que o volume final da diluição fosse sempre 2 mL.

A curva analítica foi obtida em triplicada, fixando-se a excitação em 230nm e a emissão em 290nm. O intervalo de concentração avaliado foi de 50 a 500 ng mL⁻¹.

Tabela 1. Volumes necessários e concentrações (C) de cloridrato de fluoxetina, utilizadas para a construção da curva analítica.

C (ng/mL)	Volumes (solução/metanol)
50	0,1ml/1,9ml
100	0,2ml/1,8ml
250	0,5ml/1,5ml
400	0,8ml/1,2ml
500	1,0ml/1,0ml

Para a obtenção dos valores dos comprimentos de onda de emissão e excitação, foi utilizada uma solução de cloridrato de fluoxetina na concentração de 250 ng / mL e efetuou-se uma varredura espectral fixando-se o comprimento de onde de excitação em 230nm e emissão entre 250 a 450nm.

Preparação das amostras

Determinou-se o peso médio do conteúdo de 10 cápsulas do medicamento. Em seguida pesou-se o equivalente a um peso médio e transferiu-se para um balão volumétrico de 50 mL, completando-se o volume com metanol (solução estoque). Após sucessivas diluições desta, a leitura no fluorímetro foi feita fixando-se o comprimento de onde de excitação em 230nm e emissão entre em 290nm.

A determinação da quantidade de cloridrato de fluoxetina contida nas cápsulas, dada em miligramas, foi utilizando calibração externa e as medidas foram realizadas em triplicata para cada amostra.

Resultados Preliminares

Na **Figura 1** encontra-se o espectro de fluorescência obtido para o padrão de cloridrato de fluoxetina, de onde foram retirados os valores de excitação (230nm) e emissão (290nm), que foram utilizados para a construção da curva analítica.

A curva analítica obtida para o padrão de cloridrato de fluoxetina está apresentada na **Figura 2**. Observa-se que a concentração é diretamente proporcional a intensidade de fluorescência de cloridrato de fluoxetina no intervalo de concentração avaliado.

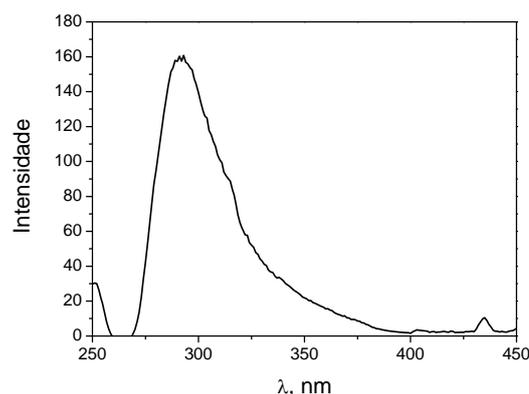


Figura 1. Espectro de fluorescência para o padrão de cloridrato de fluoxetina na concentração de 250 ng/mL (excitação em 230nm e emissão entre 250 a 450nm).

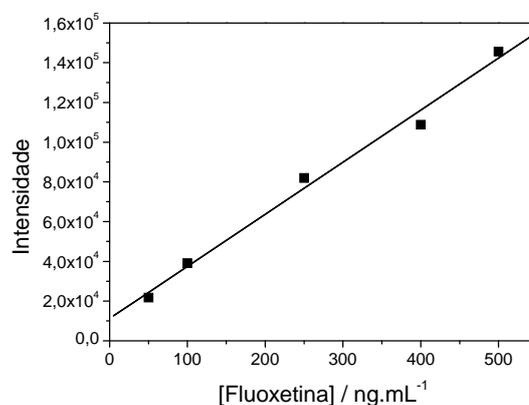


Figura 2. Curva analítica obtida para o padrão de cloridrato de fluoxetina no intervalo de concentração de 50 a 500 ng mL⁻¹ (excitação de 230 nm e emissão de 290 nm).

Para garantir a confiabilidade do método analítico proposto para quantificar cloridrato de fluoxetina em medicamentos, foram avaliados alguns parâmetros tendo como referência o guia para validação de métodos analíticos da ANVISA

e as recomendações de Shabir (SHABIR, 2003), que reúne as informações do FDA (*US Food and Drug Administration*), da USP (*US Pharmacopoeia*) e do ICH (*International Conference on Harmonization*), para validação de métodos para análises farmacêuticas utilizando a HPLC. Até o momento, os parâmetros avaliados foram: faixa linear, linearidade, sensibilidade, limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ). Os resultados obtidos encontram-se reunidos na **Tabela 2**.

Os valores de sensibilidade, faixa linear e linearidade foram obtidos da curva analítica. O limite de detecção (LOD) e o limite de quantificação (LOQ) foram calculados, também a partir da curva analítica, pelas seguintes expressões:

$$LOD = 3 \frac{S_{y/x}}{b} \quad \text{e} \quad LOQ = 10 \frac{S_{y/x}}{b}$$

onde $S_{y/x}$ é a estimativa do desvio padrão da curva analítica e b o coeficiente angular da curva analítica.

Tabela 2: Figuras de mérito, para o cloridrato de fluoxetina, obtidas utilizando-se a espectroscopia de fluorescência.

Parâmetros	Resultados
Faixa linear (ng mL ⁻¹)	50 a 500
Linearidade (r)	0,995
Sensibilidade (b) (u.a. / ng mL ⁻¹)	262
LOD (ng mL ⁻¹)	15
LOQ (ng mL ⁻¹)	48

Após a avaliação dos parâmetros analíticos, o método proposto foi avaliado na determinação de cloridrato de fluoxetina em 3 amostras de medicamentos. Os valores de cloridrato de fluoxetina no medicamento foram obtidos utilizando calibração externa. Os valores médios (n = 3) de cloridrato de fluoxetina, encontrados nas amostras, encontram-se na **Tabela 3**.

Tabela 3. Concentração de cloridrato de fluoxetina encontrada nas amostras avaliadas utilizando-se a espectroscopia de fluorescência. Valor nominal de cloridrato de fluoxetina nas amostras comerciais: 20mg.

Amostra	Quantidade Fluoxetina,HCl encontrada (mg)*	s**
A	16,1	0,3
B	14,5	0,4

C	12,7	0,3
---	------	-----

*valores médios (n = 3)

** estimativa do desvio padrão absoluto

Discussão

O desenvolvimento da metodologia para a determinação de cloridrato de fluoxetina em medicamentos utilizando a espectroscopia de fluorescência, foi possível em função das propriedades intrínsecas da molécula de fluoxetina como a emissão de fluorescência (excitação de 230 nm e emissão de 290 nm). Após a otimização dos parâmetros experimentais uma curva analítica foi obtida para o cloridrato de fluoxetina, que apresentou linearidade no intervalo de concentração de 50 a 500 ng mL⁻¹ com valores de LOD e LOQ de 15 ng mL⁻¹ e 48 ng mL⁻¹, respectivamente. Estes resultados indicam que o método proposto tem potencialidade para a determinação de cloridrato de fluoxetina e poderá ser aplicado na análise de medicamentos que possuem o cloridrato de fluoxetina como princípio ativo. Testes preliminares utilizando-se amostras de medicamentos (cápsulas) a base de cloridrato de fluoxetina mostraram que a utilização da espectroscopia de fluorescência poderá ser viável para a quantificação de cloridrato de fluoxetina nestas amostras, sendo que a estimativa do desvio padrão absoluto para cada amostra analisada ficou em torno de 0,3. Adicionalmente, estudos complementares estão sendo realizados para avaliar a exatidão do método, para tal estão sendo realizados estudos comparativos das amostras utilizando o método proposto e o método recomendado pela farmacopéia (HPLC) (USP - The United States Pharmacopoeia. The National Formulary. 28th edn. 2005).

Conclusão

Os resultados obtidos demonstram a potencialidade do método proposto para a determinação de cloridrato de fluoxetina em medicamentos. Adicionalmente, após completa validação esta poderá ser convenientemente utilizada para controle de qualidade de preparações farmacêuticas de cloridrato de fluoxetina, não somente pela indústria farmacêutica, mas também em farmácias de manipulação, pois se apresenta como uma alternativa simples, de alta sensibilidade e de baixo custo.

Referências

- ATTA-POLITOU, J.; FRASKOU, P.; KOUPPARIS, M.; Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies 27 p. 2957-2972, 2005.
- DARWISH, I. A.; Journal of Aoac International 88. p. 38-45, 2005.
- GOODNICK P.J.; GOLDSTEIN B.J.; Selective serotonin reuptake inhibitors in affective disorders – I: Basic pharmacology. J Psychopharmacol;12 (3 suppl B): S3-S20, 1998.
- HARVEY,RICHARD A., et al. ;Farmacologia Ilustrada 2ª edição, Artmed, p.31-32 ;119-24, 2001.
- HIMMELSBACH, M.; KLAMPFL, C.W.; BUCHBERGER, W.; Journal of separation Science 28. p1735-1741,2005.
- MASSAROTI, P.; CASSIANO, N. M.; DUARTE, L. F.; CAMPOS, D. R.; MARCHIORETTO, M. A. M.; BERNASCONI, G.; CALAFATTI, S.; BARROS, F. A. P.; MEURER, E. C.; PEDRAZZOLI, J.; Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences 8, p. 340-347, 2005.
- NEVADO, J.J.B.; LLERENA, M.J.V.; CABANILLAS, C.G.; ROBLEDO, V.R.; BUITRAGO. S.; Journal of Separation Science 29.p.103-113, 2006.
- RAGGI, M.A.; MANDRIOLI, R.; CASAMENTI, G.; BUGAMELLI, F.; VOLTERRA, V.; Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 18. p.193–199,1998.
- SABBIONI, C.; BUGAMELLI, F.; VARANI, G.; MERCOLINI, L.; MUSENGA, A.; SARACINO, M. A.; FANALI, S.; RAGGI, M. A.; Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 36, p. 351-356, 2004.
- SHABIR, G A.; Journal of Chromatography A, 987, p. 57-66, 2003.
- USP - The United States Pharmacopoeia. The National Formulary. 28th edn. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, pp 853-856, 2005.
- SZABO, S. T.; MONTIGNY, C. DE; BLIER, P.; BR. J.;Pharmacol. 568, p.126, ,1999.