

PREPARO DE PADRÃO SECUNDÁRIO DE FLUOXETINA

SECONDARY FLUOXETINE STANDARD PREPARATION

FLUOXETINA – PADRÃO SECUNDÁRIO

FLUOXETINE - SECONDARY STANDARD

Fernanda Christina Tumeo¹
Maria Madalena Gabriel²
Ricardo Wagner³

RESUMO

O inibidor seletivo da recaptação de serotonina, fluoxetina, é comercializado na forma de cloridrato de fluoxetina. Este medicamento é mundialmente utilizado e seu estudo e quantificação têm grande aplicabilidade na toxicologia no desenvolvimento de novas técnicas laboratoriais e padronização de métodos. Com isso, este artigo tem por objetivo a realização de análises toxicológicas precisas e sensíveis na determinação da pureza de cápsulas de cloridrato de fluoxetina para a obtenção de um padrão secundário. Utilizou-se, além da amostra, um padrão primário de fluoxetina USP e foram realizadas técnicas de cromatografia líquida de alta eficiência com detecção UV-Vis/arranjo de fotodiodos e fluorescência (HPLC-DAD-FL), cromatografia em camada delgada, espectrometria no infravermelho (IR) e no ultravioleta-visível (UV-Vis), além de doseamento com verde de bromocresol e ensaio para a obtenção da faixa de fusão da amostra. Concluiu-se que esses métodos podem ser realizados para a obtenção de padrão secundário de fluoxetina e o grau de pureza obtido foi elevado, apesar dos resultados demonstrarem a presença de interferentes provenientes de excipientes das cápsulas.

Descritores: toxicologia, pureza, padrão secundário, cromatografia, espectrometria.

ABSTRACT

The selective serotonin reuptake inhibitor, fluoxetine, is marketed in the form of fluoxetine hydrochloride. This drug is used worldwide and its study and quantification have great applicability in toxicology in the development of new laboratory techniques and standardization of methods. Therefore, this article aims to perform accurate and sensitive toxicological analyzes in the purity determination of fluoxetine hydrochloride capsules to obtain a secondary standard. In addition to the sample, a primary fluoxetine USP standard was used. The techniques used was high-performance liquid chromatography with UV-Vis/photodiode array and fluorescence detection (HPLC-DAD-FL),

¹ Acadêmica de Farmácia - Universidade Federal do Paraná

² Mestre - Professora de Toxicologia da Universidade Federal do Paraná

³ Doutor - Professor de Toxicologia da Universidade Federal do Paraná - UFPR

thin-layer chromatography, spectrometry infrared (IR) and ultraviolet-visible (UV-Vis), dosing with bromocresol green and assay to obtain the sample melting range It was concluded that these methods can be performed to obtain a secondary fluoxetine standard and the degree of purity obtained was high despite although the results demonstrate the presence of interferents from capsule excipients.

Descriptors: toxicology, purity, secondary standard, chromatography, spectrometry.

INTRODUÇÃO

A Fluoxetina, inibidor seletivo da recaptação da serotonina, é um medicamento utilizado mundialmente no tratamento de depressão maior, síndrome do pânico, bulimia nervosa e transtornos obsessivos compulsivos ⁽¹⁾. (Kanwal *et al.*, 2013). Esta substância possui uma constante de dissociação (pKa) de 9,8, massa molar de 309,32g/mol e, segundo a Farmacopéia Brasileira 5ª edição, 2010, é comercializada na forma de Cloridrato de Fluoxetina, o qual possui fórmula molecular $C_{17}H_{18}F_3NO.HCl$ e massa molar de 345,79g/mol. É um pó cristalino branco, inodoro, ligeiramente solúvel em água, solúvel em etanol e metanol e praticamente insolúvel em éter etílico. Sua faixa de fusão é de 158,4°C a 158,9°C. A cada 22,40mg de cloridrato de fluoxetina equivale à 20mg de fluoxetina base ⁽²⁾. (Brasil, 2015).

Em toxicologia, os ensaios toxicológicos têm como finalidade a detecção do agente químico, bem como sua exposição, para monitorar ou diagnosticar intoxicações. As pesquisas com medicamentos também são utilizadas no âmbito forense para fins médico-legais. O monitoramento terapêutico, a exposição ocupacional e a detecção de metabólitos em material biológico têm grande aplicabilidade em todas as outras áreas da Toxicologia ⁽³⁾. (Oga e Siqueira, 2014). Estas análises utilizam métodos precisos e sensíveis e seu estudo ajuda no aprimoramento e desenvolvimento de novas técnicas laboratoriais. Neste contexto, é de fundamental importância a utilização de padrões em todas as análises toxicológicas. Muitas vezes, estas análises tornam-se muito dispendiosas pelo alto custo na aquisição destas substâncias.

Por definição, um padrão primário é ultrapuro e é utilizado como material de referência para métodos de análise titulométricos volumétricos ou de massa. Os métodos de confirmação de sua pureza devem estar estabelecidos e disponíveis, deve possuir estabilidade à atmosfera, ausência de água de hidratação, solubilidade razoável e massa molar elevada, fatores que

elevam o custo destas substâncias. Já um padrão secundário é utilizado como material de referência para métodos titulométricos de análise e sua pureza pode ser estabelecida por análise química ⁽⁴⁾. (Skoog *et al.*, 2006). Quando se obtém um padrão secundário, o grau de pureza é o fator mais incerto quando comparado ao padrão primário, porém poucas substâncias de referência estão disponíveis comercialmente com estes requisitos e, normalmente, seu custo é elevado, além de ocorrer dificuldades de importação das mesmas ⁽⁴⁾. (Skoog *et al.*, 2006).

Em vista disso, o objetivo deste trabalho foi à obtenção de um padrão secundário de Fluoxetina para sua utilização em aulas práticas laboratoriais de Toxicologia Clínica, na Universidade Federal do Paraná (UFPR), com o intuito de realizar estudos toxicológicos conectados aos conteúdos programáticos ministrados na disciplina. Depois da extração da substância, sua detecção e determinação de pureza, foram feitas análises espectrofotométricas e cromatográficas, as quais possuem baixo custo de instrumentos, fáceis manuseio e preparo de reagentes, sensibilidade, precisão e rapidez.

MATERIAL E MÉTODOS

Equipamentos

Para a realização dos métodos foi utilizado um espectrofotômetro UV-Vis Shimadzu, modelo UV-1601PC, com cubetas de quartzo de 1cm. Um cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE) Varian ProStar, com coluna C18 Pursuit XRS Ultra (2,8µm, 150x20mm) e um espectrômetro infravermelho Thermo Scientific, modelo Nicolet iS10. O liofilizador utilizado foi Bechtel Pro 8L XL-70 (Virtis SP Scientific). Todos os solventes utilizados em processos para a análise cromatográfica foram grau analítico (PA) e grau HPLC.

Extração da Fluoxetina

Para a extração da fluoxetina foram utilizadas 56 cápsulas comerciais de cloridrato de fluoxetina 20mg, perfazendo um total de 1120mg. O conteúdo das cápsulas foi transferido para um tubo Falcon de 50 mL e foram adicionados 40 mL de metanol PA. A mistura foi agitada em vórtex por 2 minutos e centrifugada a 2500rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi filtrado por papel de filtro para um copo de béquer. Realizou-se uma nova extração no

precipitado e novamente o sobrenadante foi filtrado para o mesmo copo de béquer. O metanol foi evaporado em banho-maria a 60°C até secura. O material residual foi ressuspenso em água e liofilizado e, em seguida, foi pesado e calculou-se o rendimento obtido.

Cromatografia em camada delgada

Para uma análise preliminar, preparou-se uma solução a 1mg mL⁻¹ de fluoxetina em metanol. Esta solução foi cromatografada em placa de sílica gel 300µm de espessura em base de alumínio (Merck), utilizando como fase móvel metanol:hidróxido de amônio (100:1,5). A corrida foi de 9 cm. A revelação foi realizada com o reativo iodo platinado e com reativo de Dragendorff e posterior pulverização com ácido sulfúrico 20%.

Faixa de fusão

Para verificar o ponto de fusão do padrão secundário procedeu-se a leitura da faixa de fusão utilizando tubo capilar preso a um termômetro submerso em banho de óleo. Para um aquecimento uniforme, utilizou-se um agitador magnético com aquecimento. A faixa de fusão dos cristais foi anotada.

Espectrometria UV-Vis

Preparo dos padrões de fluoxetina

Para a análise do espectro de UV-Vis, uma solução padrão primário de cloridrato de fluoxetina 0,1mg mL⁻¹ (padrão USP – lote 518) foi preparada em metanol. A amostra a ser testada também foi preparada em metanol a 1mg mL⁻¹, tomando-se o cuidado para evitar qualquer precipitado presente. Esta solução foi filtrada em filtro Millex 0,22µm. O padrão secundário extraído das cápsulas também foi avaliado por UV-Vis. Uma solução de 0,1mg mL⁻¹ foi preparada em metanol, filtrada em Millex 0,22µm e realizou-se uma varredura entre 600 e 200nm.

Preparo dos reagentes para análise espectrofotométrica

Solução tampão Britton-Robinson

Primeiramente, foi preparada uma solução tampão Britton-Robinson 0,4M em pH 4, considerado pH ótimo para a complexação entre a fluoxetina e o corante Verde de Bromocresol. Para este tampão foram preparados 100 mL de soluções 0,4M dos ácidos bórico, acético glacial e fosfórico. As três soluções foram reunidas e o pH acertado em pHmetro com solução de NaOH 20%.

Corante Verde de Bromocresol

Foram preparados 200 mL de uma solução de Verde de Bromocresol (VBC) de concentração 10^{-3} M. Portanto, pesou-se 0,14g de VBC em béquer e adicionou-se 50 mL de água e 50 mL de etanol. Foram adicionados 20 mg de NaOH para completa solubilização do VBC e, após homogeneização, completou-se o volume com água em balão volumétrico de 200 mL.

Curva de calibração

Para a realização da curva de calibração utilizou-se um tubo branco contendo 3 mL de água, como tomada de amostra, e cinco tubos de ensaio com concentrações crescentes do padrão USP de 2 mg mL^{-1} (20, 40, 80, 100 e 200 ug mL^{-1}) que foram completadas com água para 2 mL. O tubo da amostra de fluoxetina de 1 mg mL^{-1} foi preparado para uma concentração dentro do limite de detecção da curva (80 ug mL^{-1}). Aos tubos foram adicionados 3 mL de tampão pH 4 e 4 mL de VBC. Os tubos foram agitados em vórtex e extraídos em duplicata com 4 mL de clorofórmio. A fase orgânica foi recolhida em béquer, filtrada por sulfato de sódio anidro e transferida para balão volumétrico de 10 mL. O Volume do balão foi completado com clorofórmio e homogeneizado. Em seguida, procedeu-se a leitura em espectrofotômetro em 412nm (5).

Espectrometria Infravermelho (IR)

As leituras no infravermelho foram realizadas com as soluções de fluoxetina 1 mg mL^{-1} (padrão USP e amostra) as quais foram acondicionadas no equipamento e realizadas as leituras. O espectro da amostra gerado foi comparado ao espectro do padrão.

Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC-UV-FL)

A análise por HPLC-UV-FL foi realizada em equipamento Varian ProStar utilizando uma coluna C18 analítica (Pursuit XRS Ultra, Agilent) com um fluxo isocrático de 0,5 mL min⁻¹. A detecção ultravioleta (UV) foi feita em um comprimento de onda de 235nm e a fluorescência (FL) em um comprimento de onda de excitação de 230nm e de emissão de 290nm. Foram injetados 20 uL do padrão e da amostra, ambos em concentração de 40 µg mL⁻¹. A fase móvel foi constituída de acetonitrila e água (90:10), ajustada para pH 3 com uma solução de ácido fosfórico 0,1%, baseado no trabalho de Shukla et al., 2010 ⁽⁶⁾.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Extração da fluoxetina

O conteúdo de 56 cápsulas do medicamento cloridrato de fluoxetina 20mg, (rendimento teórico de 1120mg) foi extraído em tubo Falcon e o rendimento prático foi de 1277mg de Fluoxetina, ou seja, houve um rendimento de 114%. Este resultado demonstra a presença de interferentes extraídos juntamente com a Fluoxetina, possivelmente algum excipiente presente na formulação que foi co-extraído com a fluoxetina.

Cromatografia em camada delgada

Na análise por cromatografia em camada delgada as amostras foram aplicadas em três pontos com quantidades diferentes do padrão secundário e submetidas ao sistema de solvente metanol:hidróxido de amônio (100:1,5) e utilizado o revelador iodo platinado. Neste sistema foram obtidas manchas visíveis e escuras com coloração violeta. Os Rfs calculados foram 0,31. O revelador iodo platinado tem afinidade por moléculas básicas e, por esse motivo, foi utilizado para revelar a Fluoxetina. A segunda placa submetida à revelação com reativo de Dragendorff e posterior pulverização com ácido sulfúrico, obteve valores de Rf de 0,31. As manchas permaneceram brancas contra o fundo amarelado proporcionado pelo Dragendorff (Figura 1).

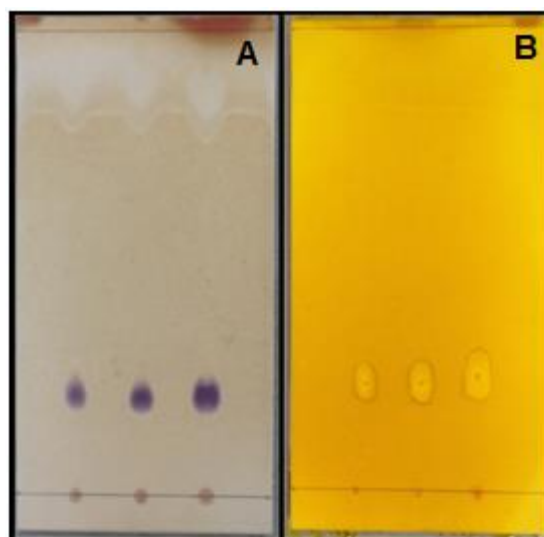


Figura 1. Placas cromatográficas fluoxetina. Em (A) revelação com iodo platinado e em (B) revelação com Dragendorff.

Faixa de fusão

A temperatura na qual a Fluoxetina começou a fundir, ou seja, passou do estado sólido para o líquido, foi de 142°C. E a temperatura final de fusão completa foi de 148°C. Portanto, a faixa de fusão da Fluoxetina foi de 142 a 148°C. O resultado apresentou-se um pouco abaixo do descrito na Farmacopéia Brasileira 5ª edição ⁽²⁾, o qual está entre 158,4°C e 158,9°C. Portanto, provavelmente a amostra de Fluoxetina analisada apresenta-se parcialmente pura.

Espectrometria UV-Vis

A análise por varredura no UV-vis mostra um pico máximo de absorção em 276nm, conforme relatado em literatura ⁽⁷⁾. (Fregonezi-Nery *et al.*, 2008).

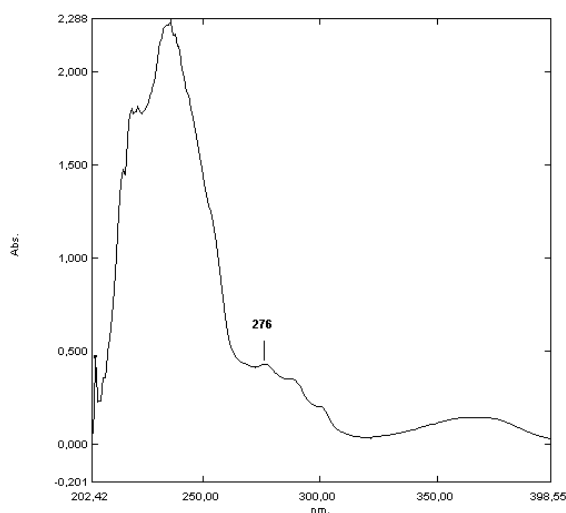


Figura 2. Espectro UV-Vis da fluoxetina em varredura entre 200 e 400nm.

Doseamento com Verde de Bromocresol

Foram realizadas cinco curvas de calibração de acordo com a metodologia descrita, as quais obtiveram resultados com altos valores de Coeficiente de Correlação Linear (r^2), utilizando-se padrão primário de cloridrato de fluoxetina USP. De acordo com o aumento das concentrações das soluções de Fluoxetina padrão USP foram mensuradas as absorvâncias e realizou-se o cálculo da média das absorvâncias em cada concentração e seu desvio padrão.

Tabela 1. Resultados absorvância da curva de calibração.

Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Média das Absorvâncias	Desvio Padrão (%)
20	0,0542	0,013
40	0,1506	0,010
80	0,3352	0,036
100	0,4454	0,044
200	0,967	0,101

Pela análise da figura 3 percebe-se que os desvios padrões aumentam com o aumento da concentração da solução de Fluoxetina, porém são desvios pequenos e aceitáveis. O experimento demonstrou alta reprodutibilidade nos resultados. O Coeficiente de Correlação Linear Total (r^2) apresentou um resultado elevado de 0,9992.

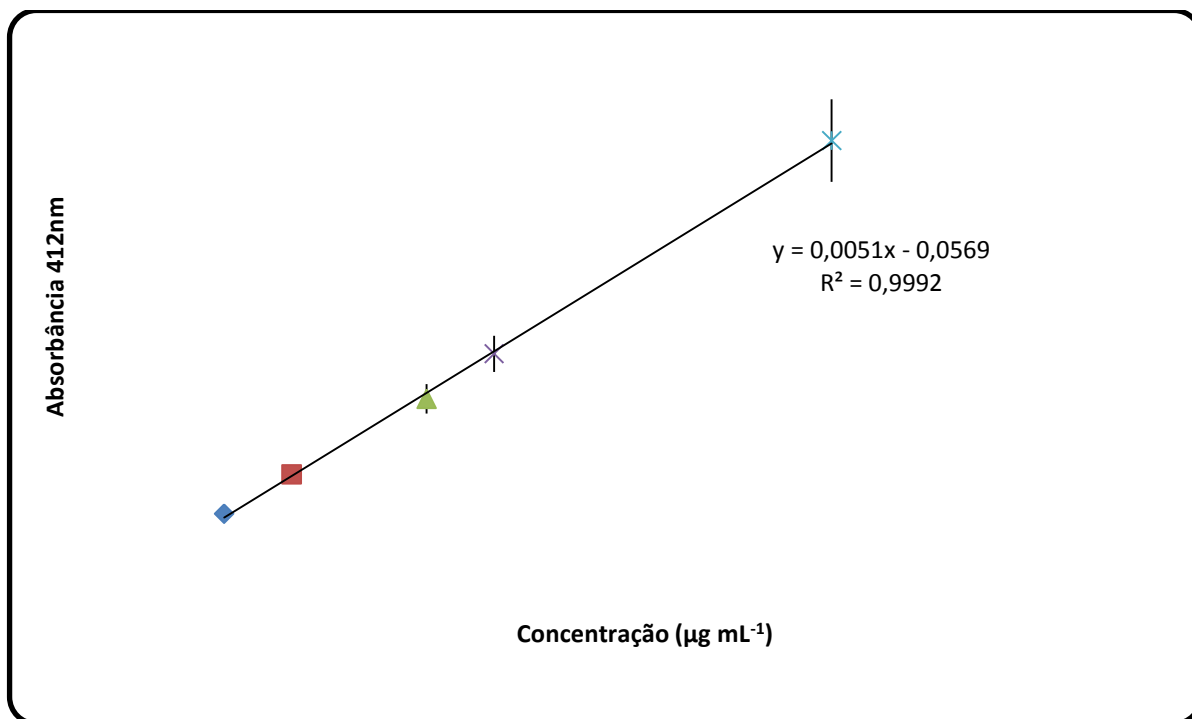


Figura 3. Curva de calibração com padrão primário de cloridrato de fluoxetina USP.

Cálculo das amostras

As medidas do padrão secundário foram mensuradas em triplicata. Foram preparadas três soluções com concentração de $80 \mu\text{g mL}^{-1}$, que foram submetidas ao processo de dosagem espectrofotométrica com verde de bromocresol. Os valores de absorbância foram aplicados na equação da reta e as concentrações calculadas: Amostra 1: 106,79

Amostra 2: 72,84

Amostra 3: 66,48

A média foi de $82,0367 \mu\text{g mL}^{-1}$ e o desvio padrão amostral de 21,67%. O desvio padrão para a análise do padrão secundário, mais uma vez, reforça a presença de contaminantes que foram co-extraídos com a substância de interesse.

Espectrometria infravermelho (IR)

A análise de IR (Figura 3 e 4) mostra picos referentes às ligações químicas presentes na molécula. As bandas próximas a 3000cm^{-1} referem-se ao estiramento da ligação C-H. No padrão secundário a presença de uma banda larga característica de alcoóis (3300cm^{-1} , figura 4 e 5) pode ser provenientes da hidratação do composto no momento da análise. Já as próximas a 1600cm^{-1} referem-se as ligações de anel aromático e, também, bandas próximas a 680cm^{-1} de média-forte intensidade identificam ligação C-H aromático. As bandas próximas a 1300cm^{-1} identificam ligações $\text{O}-\text{O}-\text{R}$. (Skoog *et al.*, 2005). O grupo CF_3 absorve fortemente na região $1350-1120\text{cm}^{-1}$ ⁽⁸⁾. (Silverstein, Webster e Kiemble, 2006). As figuras 4 e 5 mostram a banda larga em torno de 3300cm^{-1} , a qual corresponde a amina secundária presente na molécula de fluoxetina ⁽⁸⁾. (Silverstein, Webster e Kiemble, 2006). O padrão secundário (Figura 5) apresentou as bandas características da molécula.

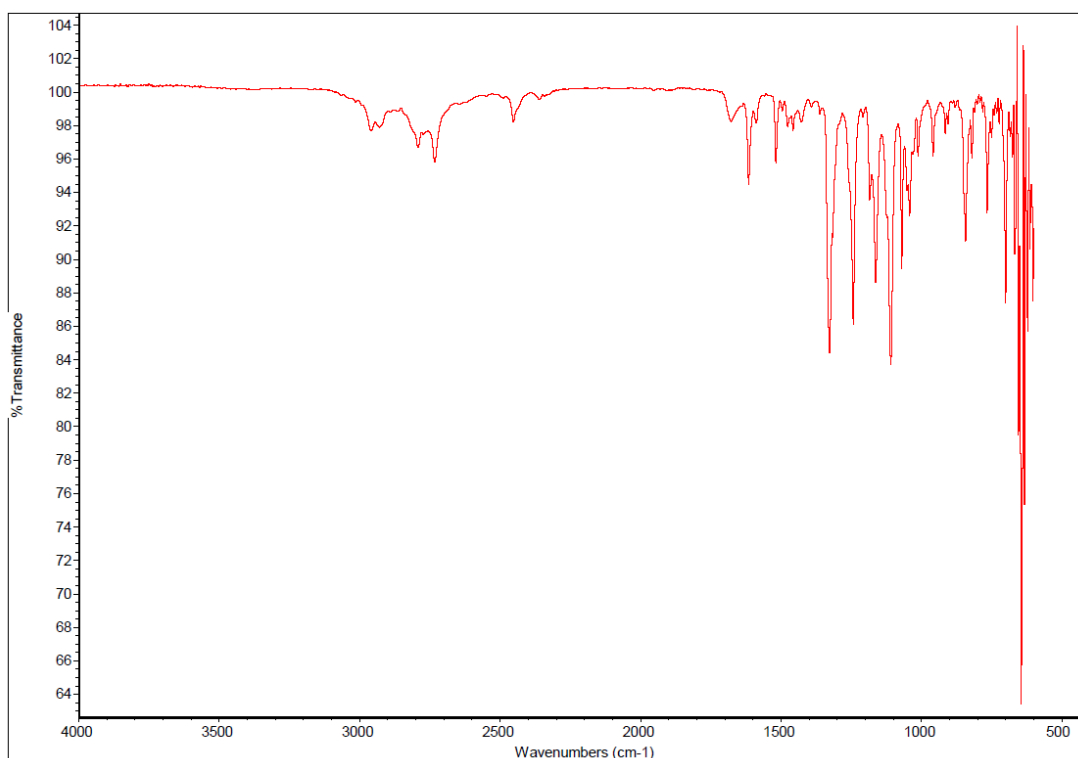


Figura 3. Espectro infravermelho do padrão primário de fluoxetina USP.

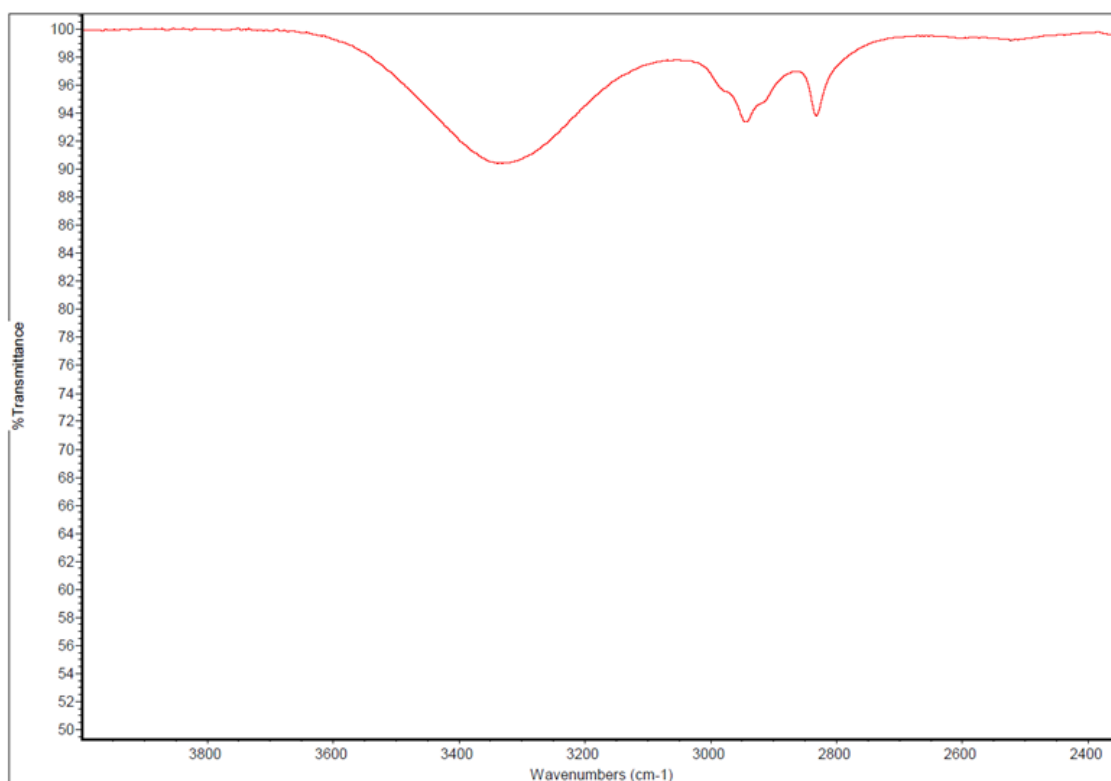


Figura 4. Espectro infravermelho do padrão primário de fluoxetina USP, região ampliada.

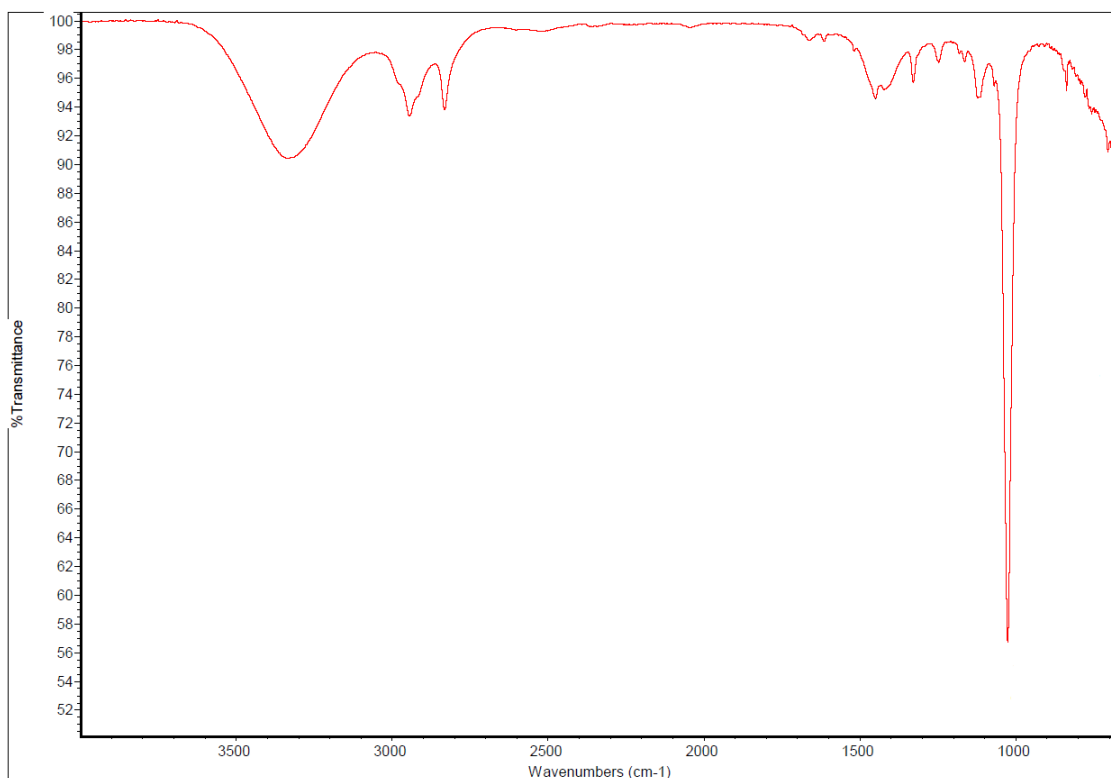


Figura 5. Espectro infravermelho da fluoxetina padrão secundário.

Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

O cromatograma (Figura 6) obtido para o padrão primário tem tempo de retenção de 0,976. A análise do padrão secundário mostra um ombro à direita em relação ao padrão primário, o que pode ser proveniente de algum contaminante presente na amostra.

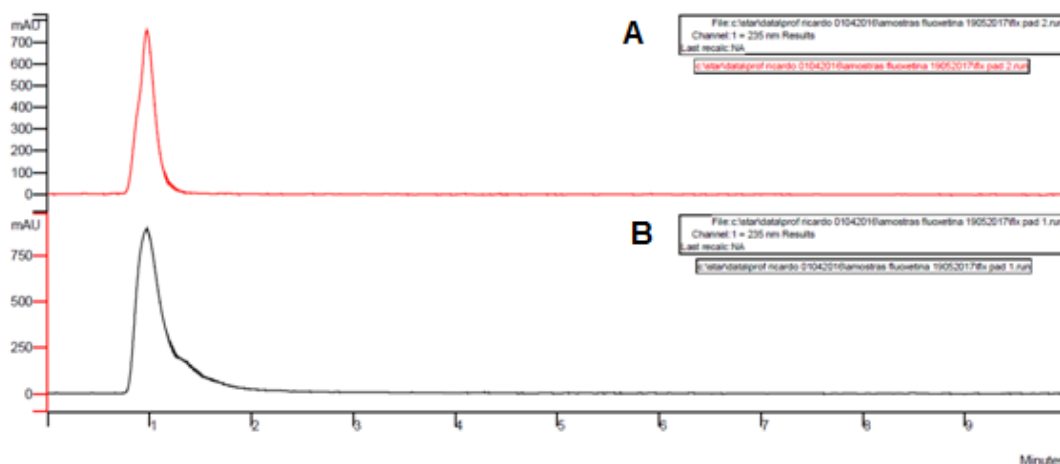


Figura 6. Cromatogramas de HPLC-UV-FL obtidos do padrão primário (A) e do padrão secundário (B).

Grau de pureza

Levando em consideração que $80\mu\text{g mL}^{-1}$ equivale a 100% da concentração, a média das concentrações das amostras ($82,0367\mu\text{g mL}^{-1}$) equivale a 102,55%. Portanto, os dados obtidos mostram que o grau de pureza é maior que 100%, pois possivelmente algum coadjuvante utilizado nas cápsulas do medicamento pode ter sido extraído juntamente com a fluoxetina, dado este corroborado pelo rendimento da extração. As análises por CCD não mostram este contaminante, por não ser revelado pelos sistemas de revelação. A análise por HPLC mostra um pequeno ombro no pico referente à amostra, o qual pode representar o contaminante presente. As análises de UV e IR mostram um grau de pureza adequado para um padrão secundário.

CONCLUSÕES

O método de extração realizado para a fluoxetina pode ser aplicado para a produção de padrões secundários para utilização em aulas práticas demonstrativas durante a graduação, pois o grau de pureza obtido foi elevado e, desta forma, presta-se a métodos cromatográficos por camada delgada ou por HPLC.

AGRADECIMENTOS

A Universidade Federal do Paraná, Departamento de Análises Clínicas e ao programa de voluntariado acadêmico (PVA).

REFERÊNCIAS:

1. Kanwal N., Sahin O., Husaain E. A., Ullahkhan I., Buyukgungor O. Synthesis, crystal structure and antioxidant potential of DI-(TV-cinnamyl) fluoxetine chloride. *Journal of the Chilean Chemical Society* 2013; 58(1): 1509-1512.
2. BRASIL. Farmacopéia Brasileira, vol. 2, 5ª Ed. Agência Nacional de Vigilância Sanitária e Fundação Oswaldo Cruz/Editora. Brasília: ANVISA, 2010.
3. Oga, S.; Siqueira, M. E. P. B. Introdução à toxicologia. In: Oga, S.; Camargo, M. M. A.; Batistuzzo, J. A. O. *Fundamentos de Toxicologia*. São Paulo: Atheneu Editora São Paulo, 2014. p. 1-9.
4. Skoog, D. A; West, D. M.; Holler, F. J.; Crouch, S. R. *Fundamentos de Química Analítica*. Editora Thomson, tradução da 8ª edição, 2006.
5. Amin A.S., Ahmed I.S., Dessouki H.A., Mohamed H.A. Spectrophotometric quantification of fluoxetine hydrochloride: Application to quality control and quality assurance processes. *Chemical Papers* 2010, 64(3): 278–284.

6. Shukla S., Kumar P., Moorthy N.S.H.N., Shrivastava S.K., Trivedi P., Srivastava R.S. RP-HPLC Method Development and Its Validation for Simultaneous Estimation of Alprazolam and Fluoxetine Hydrochloride in Pharmaceutical Dosage Form. Eurasian J Anal Chem 2010, 5(3): 239-245.

7. Fregonezi-Nery M.M., Baracat M.M., Casagrande R., Machado H.T., Miglioranza B., Gianotto E.A.S. Validação de métodos para determinação de fluoxetina em cápsulas. Quim Nova 2008; 31(7): 1665-1669.

8. Silverstein R.M., Webster F.X., Kiemle D.J. Identificação espectrométrica de compostos orgânicos. 7. ed. Rio de Janeiro: LTC; 2006.