

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**Duloxetina: desenvolvimento e validação de métodos analíticos e  
estudos da estabilidade**

PATRÍCIA GOMES

PORTO ALEGRE, 2009



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**Duloxetina: desenvolvimento e validação de métodos analíticos e estudos da estabilidade**

Tese apresentada por **Patrícia Gomes** para obtenção do TÍTULO DE DOUTOR em Ciências Farmacêuticas

Orientador: Prof. Dr. Martin Steppe

Co-orientador: Prof. Dr. Leandro Machado de Carvalho

Porto Alegre, 2009

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Doutorado da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 18.09.2009, pela Banca Examinadora constituída por:

Profa. Dr. Flavia Valladão Thiesen  
Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

Profa. Dr. Nádia Maria Volpato  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dr. Solange Cristina Garcia  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

G633d Gomes, Patrícia  
Duloxetina: desenvolvimento e validação de métodos analíticos e estudos da estabilidade / Patrícia Gomes – Porto Alegre: UFRGS, 2009. – xxii, 129 p. : il.

Tese (doutorado). UFRGS. Faculdade de Farmácia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

1. Duloxetina. 2. Validação: métodos de análise de fármacos. 3. Estabilidade. I. Steppe, Martin. II. Carvalho, Leandro Machado de. III. Título.

CDU: 615.2.07

Bibliotecária responsável:

Margarida Maria Cordeiro Fonseca Ferreira – CRB 10/480

Este trabalho foi desenvolvido no  
Laboratório de Ensino e Pesquisa em  
Controle de Qualidade (LEPCQ) da  
Faculdade de Farmácia da Universidade  
Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e no  
Laboratório de Análises Químicas  
(LACHEM) do Departamento de Química da  
Universidade Federal de Santa Maria  
(UFSM).



## **O AMOR**

Quando encontrar alguém e esse alguém fizer seu coração parar de funcionar por alguns segundos, preste atenção. Pode ser a pessoa mais importante da sua vida.

Se os olhares se cruzarem e neste momento houver o mesmo brilho intenso entre eles, fique alerta: pode ser a pessoa que você está esperando desde o dia em que nasceu.

Se um dia tiver que pedir perdão um ao outro por algum motivo e em troca receber um abraço, um sorriso, um afago nos cabelos e os gestos valerem mais que mil palavras, entregue-se: vocês foram feitos um pro outro.

Se por algum motivo você estiver triste, se a vida te deu uma rasteira e a outra pessoa sofrer o seu sentimento, chorar as suas lágrimas e enxugá-las com ternura, que coisa maravilhosa: você poderá contar com ela em qualquer momento da sua vida!

Carlos Drummond de Andrade

**Ao meu querido Rafael, pelo amor,  
carinho, companheirismo,  
compreensão pelos inúmeros  
momentos de minha ausência e,  
principalmente, pelo incentivo que  
foi fundamental para a realização  
desta importante etapa de minha  
vida. Minha eterna gratidão!**





## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Martin Steppe pela orientação, confiança, amizade e, acima de tudo, pelos exemplos de profissionalismo, dignidade e humanidade compartilhados durante os anos de nossa convivência.

À Profa. Dr. Elfrides Eva Scherman Schapoval pela importante colaboração no desenvolvimento deste trabalho, além dos exemplos pessoal e profissional marcados pela competência, dignidade e ética inerentes à sua pessoa, a qual inspira todos aqueles com quem compartilha os seus momentos.

Ao Prof. Dr. Leandro Machado de Carvalho pela co-orientação e pela recepção no Laboratório de Análises Químicas (LACHEM), do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFRGS, pela oportunidade pessoal de aprimoramento científico.

Ao Laboratório de Ensino e Pesquisa em Controle de Qualidade (LEPCQ) da Faculdade de Farmácia da UFRGS e ao LACHEM do Departamento de Química da UFSM pela possibilidade de realização deste trabalho.

Aos professores Dr. Célia M. G. Chaves, Dr. Tércio P. Oppe e Dr. Nádia M. Volpato pelo apoio. Aos amigos do LEPCQ: Aline, Alini, Amanda, Clésio, Diogo, Gabriela, Heloísa, Juliana, Letícia, Mariana, Marcelo, Maximiliano, Rúbia e Vitor pelo convívio e amizade. Em especial à bolsista de iniciação científica Nathalie Ribeiro Wingert pelo seu incansável auxílio, dedicação e principalmente, pela amizade. À Cássia Virgínia Garcia pela amizade e pelo seu auxílio na realização deste trabalho.

As amigas do LACHEM: Cristiane, Cláudia e Cibele pela compreensão e colaboração com este trabalho. Em especial à amiga Daiane pelo seu incansável auxílio e pelas discussões nas análises voltamétricas.

Ao Prof. Dr. Oscar Endrigo Dorneles Rodrigues, do Departamento de Química da UFSM pelo auxílio com os espectros de RMN.

Aos colegas do Centro Universitário Franciscano (UNIFRA), em especial: Cláudio G. Herbst, Flávio P. Júnior, Juliana Fleck, Luciane V. Laporta, Marcos R. dos Santos, Marta P. Alves, Sérgio Mortari, Roberto C. V. Santos e Rosimar L. da Silveira.

Aos meus pais João e Shirley, e à minha irmã Letícia, pelo constante apoio e especial acolhida na realização desta etapa de minha vida.

Aos meus amigos Aline S. Sousa, Letícia L. Eschiletti, Sabrina S. Marczak, Paulo e Marta Duarte pela amizade e constante apoio nesta etapa de minha vida.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, participaram e colaboraram com a realização deste trabalho.

Motivação é o combustível dos fortes,  
daqueles que determinam a vitória,  
seja em que campo for, e não desistem,  
mesmo com o sol intenso, com o frio que queima,  
mesmo diante da montanha mais alta,  
porque sabem que basta seguir em frente,  
dar sempre um passo adiante, para vencê-la.

Paulo Roberto Gaefke



## RESUMO

### **Duloxetina: desenvolvimento e validação de métodos analíticos e estudos da estabilidade**

A duloxetina (DLX) é um duplo inibidor seletivo balanceado da recaptação de serotonina e norepinefrina empregado para o tratamento do transtorno depressivo maior e para o manejo da dor neuropática diabética periférica. O objetivo deste estudo foi desenvolver e validar métodos analíticos para determinação de DLX em cápsulas e realizar estudos da estabilidade do fármaco. A substância usada como padrão de referência nas análises foi caracterizada por espectroscopia no infravermelho, ressonância magnética nuclear (RMN), calorimetria diferencial de varredura e espectrometria de massas. As análises qualitativas foram realizadas por cromatografia em camada delgada (CCD), espectrofotometria na região do ultravioleta (UV) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) permitindo a identificação do fármaco no produto farmacêutico. A espectrofotometria UV, CLAE e voltametria de redissolução catódica (CSV) foram validadas para determinação quantitativa de DLX em cápsulas. Estes métodos propostos foram específicos, robustos, lineares, precisos e exatos para determinação de DLX em microgrânulos de revestimento entérico. Estudos preliminares da estabilidade da DLX durante o desenvolvimento do método indicativo de estabilidade por CLAE demonstraram que o fármaco foi rapidamente degradado em meio ácido, na presença de peróxido de hidrogênio e de radiação a luz UVC, enquanto que este foi mais estável em meio alcalino. A cinética de degradação descreveu as mudanças na concentração da DLX em condição ácida e sob fotodegradação. A degradação ácida da DLX, em solução de HCl 0,1 M, mostrou cinética aparente de zero ordem e a fotodegradação demonstrou uma cinética aparente de primeira ordem. O produto de degradação principal observado na hidrólise ácida (PDA-14) foi analisado e isolado por CCD preparativa. Espectros de RMN-<sup>1</sup>H, RMN-<sup>13</sup>C e COSY foram avaliados e a estrutura do PDA-14 foi confirmada como 1-naftol. Esta substância produz efeitos citotóxicos e conseqüentemente o produto farmacêutico é uma cápsula de gelatina contendo microgrânulos com revestimento entérico para evitar a degradação ácida da DLX no estômago.

**Palavras-chave:** duloxetina, validação, estudo de estabilidade, voltametria adsorviva de redissolução catódica, 1-naftol.



## ABSTRACT

### **Duloxetine: development and validation of analytical methods and stability studies**

The duloxetine (DLX) is a double balanced selective serotonin and norepinephrine-reuptake inhibitor employed for the treatment of major depressive disorder and for the management of diabetic peripheral neuropathic pain. The aim of this study was to develop and validate analytical methods to the determination of DLX in capsules and accomplish studies of this drug stability. The substance used as reference standard in the analysis was characterized by infrared spectroscopy, nuclear magnetic resonance (NMR), differential scanning calorimetry, and mass spectrometry. The qualitative analyses were performed by thin layer chromatography (TLC), ultraviolet spectrophotometry (UV), and high performance liquid chromatography (HPLC) allowing the identification of the drug in pharmaceutical dosage form. The UV spectrophotometry, HPLC, and cathodic stripping voltammetry (CSV) were validated for quantitative determination of the DLX in capsules. These proposed methods were specific, robust, linear, precise, and accurate to the determination of DLX in enteric-coated pellets. Preliminary studies of DLX stability during the development of stability-indicating HPLC method demonstrated that the drug was rapidly degraded in acid medium, in the presence of hydrogen peroxide and light UVC radiation, while it was more stable in alkali medium. The kinetics of degradation described the concentration changes of DLX in acid condition and on photodegradation. The acid degradation of DLX in 0.1M HCl solution showed apparent zero-order kinetics and the photodegradation demonstrated apparent first-order kinetics. The main degradation product observed in acid hydrolysis (DP-14) was analyzed and isolated by TLC preparative.  $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR and COSY spectra were evaluated and the structure of DP-14 was confirmed as 1-naphthol. This substance produces cytotoxic effects and consequently the finished pharmaceutical dosage form is a gelatin capsule containing enteric-coated pellets to avoid the acid degradation of DLX in the stomach.

**Keywords:** duloxetine, validation, stability study, adsorptive cathodic stripping voltammetry, 1-naphthol.





## LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Revisão bibliográfica: determinação de DLX por CLAE.....	11
Tabela 2- Frequências de absorção das principais bandas de infravermelho características para DLX SQR.....	27
Tabela 3 – Valores de Rf obtidos das amostras através da CCD.....	30
Tabela 4 – Condições cromatográficas empregadas para análise de DLX por CLAE.....	35
Tabela 5 – Composição da ASE.....	43
Tabela 6 – Preparo das soluções para realização do teste de recuperação utilizando o método de espectrofotometria por UV.....	46
Tabela 7– Valores de absorvância da DLX SQR obtidos através da espectrofotometria na região do UV para a construção da curva padrão.....	49
Tabela 8 – ANOVA das absorvâncias obtidas para a obtenção da curva padrão de DLX através da espectrofotometria na região do UV.....	50
Tabela 9 – Avaliação interdia e intradia para determinação de DLX em cápsulas por espectrofotometria na região do UV.....	51
Tabela 10 – Resultados experimentais referentes ao teste de recuperação por espectrofotometria na região do UV.....	51
Tabela 11 – Preparo das soluções para realização do teste de recuperação utilizando o método de CLAE.....	58
Tabela 12– Áreas absolutas de DLX SQR obtidas através de CLAE para a construção da curva padrão.....	63
Tabela 13 – ANOVA das áreas absolutas determinadas para a obtenção da curva padrão de DLX através de CLAE.....	64
Tabela 14 – Avaliação interdia e intradia para determinação de DLX em cápsulas por CLAE.....	65
Tabela 15 – Resultados experimentais referentes ao teste de recuperação por CLAE.....	65
Tabela 16 - Avaliação da robustez do método de CLAE através da determinação de DLX em cápsulas.....	66
Tabela 17- Preparo das soluções para realização do teste de recuperação utilizando o método de CSV.....	74
Tabela 18- Correntes de pico da DLX.....	77
Tabela 19- ANOVA das correntes determinadas para a obtenção da curva padrão de DLX através de CSV.....	78
Tabela 20- Avaliação interdia e intradia para determinação de DLX em cápsulas por CSV.....	79

Tabela 21- Resultados experimentais referentes ao teste de recuperação por CSV.....	79
Tabela 22- Avaliação da robustez do método de CSV através da determinação de DLX em cápsulas.....	80
Tabela 23- Resultados obtidos na determinação de DLX em cápsulas por espectrofotometria na região do UV, CLAE e CSV.....	83
Tabela 24- ANOVA dos valores obtidos na determinação de DLX em cápsulas por espectrofotometria na região do UV, CLAE e CSV.....	84
Tabela 25- Estudo da cinética ácida de degradação.....	93
Tabela 26- Estudo da cinética de fotodegradação.....	97
Tabela 27- Atribuições para o espectro de RMN- <sup>1</sup> H do PDA-14.....	107
Tabela 28- atribuições para o espectro de RMN- <sup>13</sup> C do PDA-14.....	109

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química do cloridrato de DLX.....	3
Figura 2- Domínios funcionais mediados pela 5-HT e NE.....	7
Figura 3- Estrutura química da fluoxetina e da DLX.....	14
Figura 4- Estrutura química numerada da DLX.....	20
Figura 5- Espectro de RMN- <sup>1</sup> H da DLX.....	21
Figura 6- Espectro de RMN- <sup>13</sup> C da DLX.....	23
Figura 7- Curva de aquecimento obtida por DSC para DLX SQR.....	24
Figura 8- Espectro na região do IV da DLX.....	26
Figura 9- Espectro de massas de DLX SQR.....	28
Figura 10 – Cromatoplaça obtida através da análise de DLX SQR, cápsula de DLX e citalopram SQR.....	30
Figura 11- Estrutura química do citalopram.....	31
Figura 12– Espectros de absorção na região do UV da solução das cápsulas de DLX e de DLX SQR em ACN.....	32
Figura 13– Espectros de absorção na região do UV da solução das cápsulas de DLX e de DLX SQR em H <sub>2</sub> O.....	33
Figura 14– Espectros de absorção na região do UV da solução das cápsulas de DLX e de DLX SQR em MeOH.....	33
Figura 15 – Cromatogramas deslocados para análise por CLAE das soluções de DLX SQR e de cápsulas de DLX.....	36
Figura 16 - Sobreposição dos espectros de absorção obtidos por espectrofotometria UV para as soluções de DLX SQR e de ASE.....	48
Figura 17 – Representação gráfica da curva padrão de DLX obtida por espectrofotometria na região do UV.....	50
Figura 18 a–h Cromatogramas obtidos da solução de DLX.....	61
Figura 19 – Representação gráfica da curva padrão de DLX por CLAE.....	64
Figura 20- Estudo da potencial de deposição no HMDE para análise de DLX por CSV.....	75
Figura 21- Estudo do tempo de deposição no HMDE para análise de DLX por CSV.....	75
Figura 22- Sinais voltamétricos da solução de DLX SQR e de ASE.....	76
Figura 23- Representação gráfica da curva padrão de DLX obtida por CSV....	78
Figura 24- Representação gráfica da cinética de ordem zero para degradação ácida de DLX.....	94
Figura 25- Representação gráfica da cinética de primeira ordem para degradação ácida de DLX.....	94

Figura 26- Representação gráfica da cinética de segunda ordem para degradação ácida de DLX.....	95
Figura 27- Estudo da cinética de degradação ácida das soluções de DLX nos tempos: zero, 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos.....	96
Figura 28- Representação gráfica da cinética de ordem zero para fotodegradação de DLX.....	97
Figura 29- Representação gráfica da cinética de primeira ordem para fotodegradação de DLX.....	97
Figura 30- Representação gráfica da cinética de segunda ordem para fotodegradação de DLX.....	97
Figura 31- Estudo da cinética de fotodegradação das soluções de DLX nos tempos: zero, 2, 4, 6, 8, 10 e 12 minutos.....	99
Figura 32- Cromatograma do produto de degradação ácida (PDA14) isolado em CC preparativa.....	102
Figura 33- Caminho de degradação de DLX.....	104
Figura 34- Espectro de RMN-1H do PDA-14.....	106
Figura 35- Estrutura química numerada do PDA-14.....	107
Figura 36- Espectro de RMN-13C do PDA-14.....	108
Figura 37- Espectro COSY do PDA-14.....	109
Figura 38 a-c- Cromatogramas obtidos para o PDA-14, 1-naftol e 2-naftol.....	110
Figura 39- Cromatoplaca obtida através da análise DLX SQR, 1-naftol e DLX submetida ao HCl 0,1 M a 70 °C por 1 hora .....	111

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	5
<b>2.1 Aspectos gerais</b> .....	7
<b>2.2 Duloxetina</b> .....	8
2.2.1 Aspectos farmacológicos.....	8
2.2.2 Características físico-químicas.....	9
2.2.2.1 Duloxetina.....	9
2.2.2.2 Cloridrato de DLX.....	9
<b>2.3 Métodos analíticos</b> .....	9
2.3.1 Espectrofotometria na região do ultravioleta.....	9
2.3.2 Cromatografia líquida de alta eficiência.....	10
2.3.3 Voltametria.....	12
<b>2.4 Estudo da estabilidade</b> .....	13
<b>3. MÉTODOS PARA IDENTIFICAÇÃO DA DULOXETINA</b> .....	15
<b>3.1 Introdução</b> .....	17
<b>3.2 Objetivos específicos</b> .....	18
<b>3.3 Materiais e métodos</b> .....	18
3.3.1 Substância química de referência.....	18
3.3.2 Produto farmacêutico.....	19
<b>3.4 Caracterização da SQR</b> .....	19
3.4.1 Ressonância magnética nuclear.....	19
3.4.1.1 Materiais e métodos.....	19
3.4.1.2 Resultados e discussão.....	19
3.4.2 Calorimetria exploratória diferencial.....	24
3.4.2.1 Materiais e métodos.....	24
3.4.2.2 Resultado e discussão.....	24
3.4.3 Espectroscopia na região do infravermelho.....	25
3.4.3.1 Materiais e métodos.....	25
3.4.3.2 Resultado e discussão.....	25
3.4.4 Espectrometria de massas.....	28
3.4.4.1 Materiais e métodos.....	28
3.4.4.2 Resultado e discussão.....	28
<b>3.5 Métodos de identificação de DLX em cápsulas</b> .....	29
3.5.1 Cromatografia em camada delgada (CCD).....	29
3.5.1.1 Materiais e métodos.....	29
3.5.1.2 Resultados.....	30

3.5.1.3 Discussão.....	31
3.5.2 Espectrofotometria na região do ultravioleta.....	31
3.5.2.1 Materiais e métodos.....	31
3.5.2.2 Resultados.....	32
3.5.2.3 Discussão.....	34
3.5.3 Cromatografia líquida de alta eficiência.....	34
3.5.3.1 Materiais e métodos.....	34
3.5.3.2 Resultados.....	35
3.5.3.3 Discussão.....	36
<b>3.6 Conclusões.....</b>	<b>36</b>
<b>4. VALIDAÇÃO DOS MÉTODOS ANALÍTICOS.....</b>	<b>39</b>
<b>4.1 Introdução.....</b>	<b>41</b>
<b>4.2 Objetivos específicos.....</b>	<b>42</b>
<b>4.3 Espectrofotometria na região do ultravioleta.....</b>	<b>42</b>
4.3.1 Instrumental e condições de análise.....	42
4.3.2 Avaliação da especificidade.....	42
4.3.2.1 Amostra simulada de excipientes .....	43
4.3.3 Linearidade.....	43
4.3.4 Precisão.....	44
4.3.4.1 Preparação da amostra de DLX SQR.....	44
4.3.4.2 Determinação de DLX em cápsulas.....	44
4.3.5 Exatidão.....	46
4.3.6 Resultados.....	47
4.3.6.1 Especificidade.....	47
4.3.6.1.1 Amostra simulada de excipientes.....	47
4.3.6.2 Linearidade.....	48
4.3.6.3 Precisão.....	50
4.3.6.4 Exatidão.....	51
4.3.7 Discussão.....	51
<b>4.4 Cromatografia em fase líquida .....</b>	<b>53</b>
4.4.1 Instrumental e condições cromatográficas.....	53
4.4.2 Avaliação da especificidade.....	53
4.4.2.1 Amostra simulada de excipientes .....	53
4.4.2.2 Degradação alcalina.....	54
4.4.2.3 Degradação ácida.....	54
4.4.2.3 Degradação oxidativa.....	55
4.4.2.4 Degradação fotolítica.....	55
4.4.3 Adequabilidade do sistema.....	56

4.4.4 Linearidade.....	56
4.4.5 Precisão.....	57
4.4.5.1 Preparação da solução de DLX SQR.....	57
4.4.5.2 Determinação de DLX em cápsulas.....	57
4.4.6 Exatidão.....	58
4.4.7 Avaliação da robustez.....	59
4.4.8 Resultados.....	59
4.4.8.1 Especificidade.....	59
4.4.8.1.1 Amostra simulada dos excipientes.....	59
4.4.8.1.2 Degradação alcalina, ácida, oxidativa e fotolítica.....	60
4.4.8.2 Adequabilidade do sistema.....	62
4.4.8.3 Linearidade.....	62
4.4.8.4 Precisão.....	64
4.4.8.5 Exatidão.....	65
4.4.8.6 Avaliação da robustez.....	65
4.4.9 Discussão.....	66
<b>4.5 Voltametria de redissolução catódica.....</b>	<b>70</b>
<b>4.5.1 Instrumental e condições voltamétricas.....</b>	<b>70</b>
<b>4.5.2 Otimização das condições voltamétricas.....</b>	<b>70</b>
4.5.2.1 Preparação da solução de DLX SQR.....	70
4.5.2.2 Estudo do potencial de deposição.....	70
4.5.2.3 Estudo do tempo de deposição.....	71
<b>4.5.3 Validação do método voltamétrico.....</b>	<b>71</b>
4.5.3.1 Especificidade.....	71
4.5.3.2 Linearidade.....	71
4.5.3.3 Precisão.....	72
4.5.3.3.1 Preparação das soluções.....	72
4.5.3.2.1.1 Preparo da solução de DLX SQR.....	72
4.5.3.2.1.2 Determinação de DLX em cápsulas.....	72
4.5.3.4 Exatidão.....	73
4.5.3.5 Avaliação da robustez.....	74
<b>4.5.4 Resultados.....</b>	<b>75</b>
4.5.4.1 Otimização das condições voltamétricas.....	75
4.5.4.2 Linearidade.....	75
4.5.4.3 Precisão.....	78
4.5.4.4 Exatidão.....	79
4.5.4.5 Robustez.....	79
<b>4.5.5 Discussão.....</b>	<b>80</b>

<b>4.6 Análise comparativa dos métodos analíticos</b> .....	83
4.6.1 Resultados.....	83
4.6.2 Discussão.....	84
<b>4.7 Conclusões</b> .....	85
<b>5. ESTUDO DA ESTABILIDADE</b> .....	87
<b>5.1 Introdução</b> .....	89
<b>5.2 Objetivos específicos</b> .....	90
<b>5.3 Estudo da cinética de degradação ácida</b> .....	90
5.3.1 Cinética de degradação ácida.....	90
5.3.1.1 Materiais e métodos.....	90
5.3.1.2 Preparação da solução de DLX SQR.....	90
5.3.1.3 Preparação da solução amostra de DLX.....	91
5.3.2 Estudo da cinética de fotodegradação.....	91
5.3.2.1 Materiais e métodos.....	91
5.3.2.2 Preparação da solução de DLX SQR.....	92
5.3.2.3 Preparação da solução amostra de DLX.....	92
5.3.3 Cálculos cinéticos.....	92
5.3.4 Resultados.....	93
5.3.5 Discussão.....	100
<b>5.4 Isolamento do produto de degradação majoritário ácido (PDA-14)</b> .....	101
5.4.1 Preparação da amostra de DLX.....	101
5.4.2 Cromatografia em camada delgada preparativa.....	101
5.4.3 Resultados.....	102
5.4.4 Discussão.....	103
<b>5.5 Identificação do PDA-14</b> .....	104
5.5.1 Materiais e métodos.....	104
5.5.1.1 Ressonância magnética nuclear.....	104
5.5.1.2 Cromatografia líquida de alta eficiência.....	104
5.5.1.3 Cromatografia em camada delgada.....	105
5.5.2 Resultados.....	105
5.5.3 Discussão.....	111
<b>5.6 Conclusões</b> .....	112
<b>6. CONCLUSÕES GERAIS</b> .....	115
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	119
<b>ANEXOS: ARTIGO ACEITO</b> .....	129



---

## 1. INTRODUÇÃO

---



A depressão é uma condição psiquiátrica extremamente comum, para a qual existe uma série de teorias neuroquímicas e uma variedade correspondente de diferentes tipos de fármacos usados em seu tratamento. Pesquisas sugerem que desequilíbrios apresentados em dois neurotransmissores, serotonina (5-hidroxitriptamina, 5-HT) e norepinefrina (NE), possuem importante papel, não somente nos sintomas emocionais da depressão, mas também nos sintomas físicos dolorosos, frequentemente associados com a doença (STAHL, 2002).

O cloridrato de duloxetina (Figura 1) é um antidepressivo utilizado na terapêutica atual devido a sua eficácia no tratamento do transtorno depressivo maior (TDM) e para o manejo da dor neuropática diabética periférica. Este fármaco é um duplo inibidor balanceado da recaptação de 5-HT e NE (BYMASTER et al., 2001).

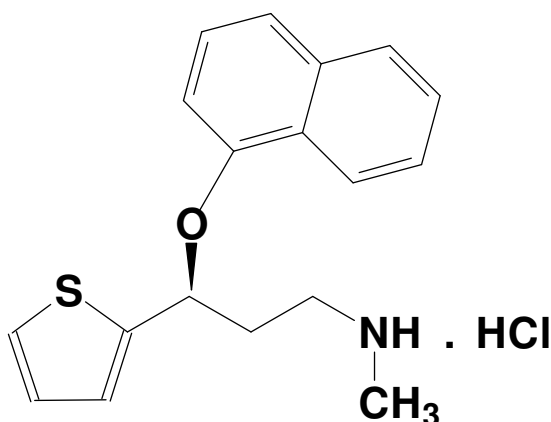


Figura 1 - Estrutura química do cloridrato de DLX.

A duloxetina (DLX) foi aprovada para uso clínico em agosto de 2004 pela *Food and Drug Administration* (FDA). No Brasil, a DLX foi introduzida no mercado a partir de 2005 com o nome comercial de Cymbalta<sup>®</sup> sob apresentação de cápsulas contendo microgrânulos de cobertura entérica. O desenvolvimento e a comercialização do produto são de responsabilidade das indústrias farmacêuticas *Eli Lilly and Company* e *Boehringer Ingelheim*.

A literatura apresenta vários trabalhos que empregam a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) na determinação de DLX em fluidos biológicos (SILVA et al., 2008; WALDSCHIMITT et al., 2007; MA et al., 2007; MALFARÁ et al., 2007; MERCOLINI et al., 2007; SATONIN et al., 2007; SELVAN et al., 2007; JOHNSON et al., 1996) e na análise de impurezas relacionadas (SONI, MARIAPPAN e BANERJEE, 2005; OLSEN e ARGENTINE, 1996). A separação enantiomérica do fármaco foi proposta por técnicas de CLAE (RANE e SHINDE, 2008; YANG et al., 2007) e de eletroforese capilar (LIU e NUSSBAUM, 1999; RICKARD e BOPP, 1994).

A espectrofotometria na região do ultravioleta foi utilizada para desenvolvimento e validação de um método para determinação quantitativa de DLX, empregando a matéria-prima e um produto acabado comercializado somente na Índia (KAMILA, MONDAL e GHOSH, 2007). Recentemente, a determinação quantitativa de DLX por CLAE foi descrita na literatura para análise da matéria-prima (SRINIVASULU et al., 2009).

O cloridrato de DLX é instável e degrada rapidamente, aproximadamente 15% por hora, quando exposto às condições ácidas (WELLS e LOSIN, 2008), porém a literatura não apresenta estudos mais detalhados sobre a estabilidade do fármaco. Portanto, neste trabalho foram realizados estudos da sua estabilidade, isolando e elucidando o produto de degradação majoritário gerado na hidrólise ácida. Além disso, foram desenvolvidos e validados métodos analíticos para análise de DLX no produto farmacêutico comercializado mundialmente (Cymbalta®). Desta forma, este trabalho contribuirá para o controle de qualidade do medicamento em questão, disponibilizando dados importantes, principalmente, sobre a sua estabilidade e transmitindo, assim, uma maior segurança para os pacientes que utilizam a DLX em seu tratamento.

---

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

---



## 2.1 Aspectos gerais

A depressão é o mais comum dos distúrbios afetivos, podendo variar desde uma condição muito branda, limítrofe da normalidade, até uma depressão severa (psicótica) acompanhada de alucinações e delírios (RANG et al., 2004).

A teoria bioquímica da depressão está baseada na compreensão do papel dos neurotransmissores em todo o corpo. A hipótese monoaminérgica sugere uma base biológica para depressão, isto é, uma deficiência de 5-HT e/ou NE no sistema nervoso central (HIRSCHFIELD, 2000). Supõe-se que certos sintomas da depressão sejam mediados pela 5-HT, como agressividade, apetite e libido. Por outro lado, supõe-se que a concentração, o interesse e a motivação sejam mediados pela NE. Entretanto, os principais sintomas da depressão incluem: humor depressivo, ansiedade, dores, perda de energia e prejuízo da função cognitiva, sendo que estes não estão claramente identificados com um ou com outro neurotransmissor (Figura 2).

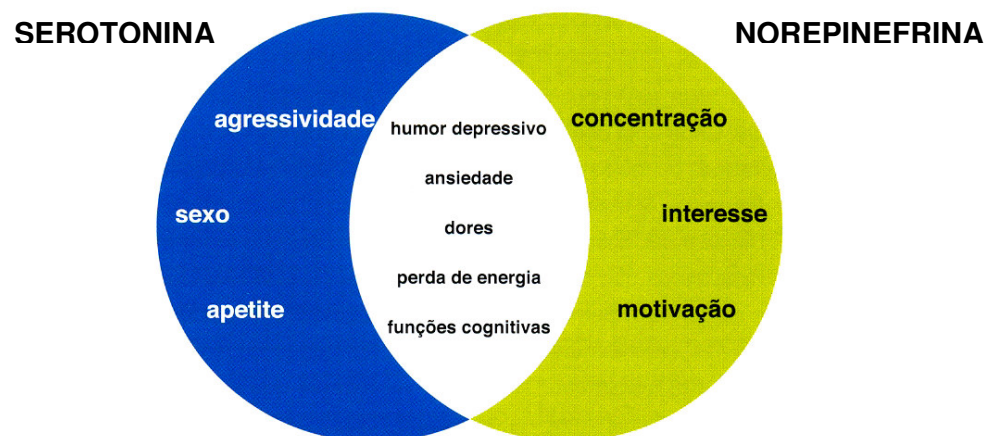


Figura 2- Domínios funcionais mediados pela 5-HT e NE (ELI LILLY, 2005).

Há uma grande sobreposição dos sintomas mediados por estes dois neurotransmissores, tornando impossível determinar clinicamente se um paciente

deprimido responderá melhor a um inibidor de recaptção de 5-HT ou de NE. Além disso, pelo fato de muitos pacientes apresentarem tanto os sintomas emocionais quanto físicos da depressão, usar um antidepressivo que atue tanto na 5-HT como na NE pode aumentar a chance de melhora de todos os sintomas dos pacientes (WECKER e CATALANO, 2006).

A DLX é um duplo inibidor potente e balanceado da recaptção de 5-HT e NE. A ação do fármaco potencializa a neurotransmissão serotoninérgica e noradrenérgica ao bloquear a recaptção de 5-HT e NE na sinapse. A DLX não tem afinidade significativa à maioria dos receptores de outros neurotransmissores (colinérgicos e histaminérgicos) e também não inibe a enzima monoamino oxidase (MAO) (FRAY et al., 2006).

No Brasil, a DLX é comercializada sob nome de Cymbalta<sup>®</sup>, sendo produto controlado da lista “C1” pela resolução RDC n°15/2007. O produto é produzido e embalado pela indústria farmacêutica Eli Lilly and Company (Indianápolis, EUA) e distribuído pela Eli Lilly do Brasil (São Paulo, Brasil).

## 2.2 Duloxetina

### 2.2.1 Aspectos farmacológicos

O FDA aprovou o uso de DLX em doses entre 40-60 mg/dia para o tratamento do TDM. A dose recomendada de DLX é de 60 mg, em dose única diária. Estudos demonstraram que a dose única de 60 mg de DLX é mais efetiva no tratamento do TDM, do que o uso de 20 mg duas vezes ao dia (MALLINCKRODT et al., 2006).

Análises farmacocinéticas demonstraram que as concentrações plasmáticas máximas ocorrem 6 horas após a ingestão de uma dose de DLX. Além disso, esta substância apresenta um alto grau de ligação às proteínas plasmáticas (> 90%), sendo metabolizada pelas isoenzimas 2D6 e 1A2 do sistema citocromo P450 (CYP) e os principais metabólitos circulantes parecem não contribuir significativamente para atividade farmacológica da DLX. A meia-vida de eliminação é de 12 horas, sendo eliminado na urina (72%) e nas fezes (19%) (LANTZ et al., 2003).



As reações adversas geralmente observadas estão relacionadas à constipação, diarreia, xerostomia, náusea, fadiga, tontura e insônia (NEMEROFF et al., 2002). Existem várias interações que devem ser observadas com o uso de DLX e demais substâncias, tais como: fármacos metabolizados pela CYP1A2 (teofilina), inibidores da CYP1A2, metabolizados pela CYP2D6 (desipramina, tolterodina), inibidores da CYP2D6 (paroxetina), metabolizados pela CYP3A (hormônios anticoncepcionais orais), fármacos altamente ligados às proteínas plasmáticas, álcool, lorazepam e inibidores da MAO (HUNZIKER et al., 2005).

## 2.2.2 Características físico-químicas

### 2.2.2.1 Duloxetina (THE MERCK, 2001)

- Nome químico: (+)-(S)-*N*-metil- $\gamma$ -(1-naftaleniloxy)-2-tiofenopropanamina
- CAS: 116539-59-4
- Fórmula molecular: C<sub>18</sub>H<sub>19</sub>NOS
- Peso molecular: 297,42

### 2.2.2.2 Cloridrato de duloxetina (EMEA, 2005; ELI LILLY, 2005)

- CAS: 136434-34-9
- DCB: 03263
- Fórmula molecular: C<sub>18</sub>H<sub>19</sub>NOS. HCl
- Peso molecular: 333,88
- Solubilidade: levemente solúvel em água e sua solubilidade não é pH dependente

## 2.3 Métodos Analíticos

### 2.3.1 Espectrofotometria na região do ultravioleta

KAMILA, MONDAL e GHOSH (2007) apresentaram um método espectrofotométrico UV para determinação de DLX, na matéria-prima e no produto acabado (Duzela<sup>®</sup>, Sun Pharmaceutical Industries, Índia). O trabalho empregou água

para o preparo das soluções e o comprimento de onda utilizado para análise foi de 290 nm.

### **2.3.2 Cromatografia líquida de alta eficiência**

A CLAE é uma das técnicas analíticas mais utilizadas na determinação quantitativa de fármacos. A maioria dos códigos oficiais preconiza a utilização desta técnica em função de suas inúmeras vantagens como: precisão, exatidão, seletividade e capacidade de automação.

A DLX é um antidepressivo relativamente novo no mercado, mas já apresenta um crescente número de trabalhos publicados envolvendo a determinação deste fármaco por CLAE. Estes trabalhos relatam a aplicação de CLAE na análise deste fármaco em fluidos biológicos, matéria-prima e na determinação de suas impurezas, empregando diferentes condições cromatográficas, conforme Tabela 1.

Tabela 1 – Revisão bibliográfica apresentando métodos de análise empregados para determinação de DLX por CLAE em diferentes condições cromatográficas.

Referência	Amostra	Fase móvel	Coluna	Deteção
SRINIVASULU et al., 2009	Matéria-prima	Ácido trifluoroacético 0,1%, MeOH e tetrahidrofurano (60:20:20, v/v/v)	Zorabax XDB C <sub>18</sub> (50 x 4,6 mm, 5µm)	UV λ=230 nm
SILVA et al., 2008	Fluido biológico	Tampão fosfato 50mM pH 3,8 e ACN (53:47, v/v)	LiChrospher® 60 RP (250 x 4,0 mm, 5µm)	UV λ=230 nm
WALDSCHMITT et al., 2007	Fluido biológico	ACN, água e tampão fosfato pH 6,4 (50:50, v/v)	LiChrospher® 100 CN (250 x 4,6 mm, 5µm)	UV λ=218 nm
MA et al., 2007	Fluido biológico	ACN, MeOH e acetato de amônia 20mM pH 3,5 (42:20:38, v/v/v)	Hypersil Hypurity® -C <sub>18</sub> (150 x 2,1 mm, 5µm)	Espectrometria de massa
MALFARÁ et al., 2007	Fluido biológico	A: ACN e MeOH (92:8, v/v), 35% B: Tampão acetato de sódio 25mM pH 4,5, 65%	LiChrospher® 60 RP (250 x 4,0 mm, 5µm)	UV λ=230 nm
MERCOLINI et al., 2007	Fluido biológico	ACN e tampão fosfato 20 mM contendo 0,3% de trietilamina pH 3,0 (40:60, v/v)	Genesis®-C <sub>8</sub> (150 x 4,6 mm, 5µm,)	UV λ=230 nm
SATONIN et al., 2007	Fluido biológico	- Água, ACN e ácido fórmico (80:20:0,1, v/v/v) - Água, ACN e ácido acético (70:30:0,05, v/v/v)	Aquasil®-C <sub>18</sub> (150 x 2,0 mm, 5µm)	Espectrometria de massa
SELVAN et al., 2007	Fluido biológico	ACN e tampão acetato de amônio 5mM (45:55, v/v pH 3,5)	Gemini®-C <sub>18</sub> (50 x 4,6 mm, 3µm)	Espectrometria de massa
SONI, MARIAPPAN e BANERJEE, 2005	Impurezas	Tampão fosfato 20 mM (pH 7,0) e ACN contendo 0,02% dietilamina (85:15, v/v)	LichroCART RP-18® (250 x 4,6 mm, 5µm)	UV λ=241 nm
JASEN et al., 1998	Impurezas	A: KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 25 mM (pH 3,0) e ACN (80:20, v/v) B: KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 25 mM (pH 3,0): CAN (25:75, v/v)	Zorbax SB – CN® (250 x 4,6 mm, 5µm)	Espectrometria de massa
JOHNSON et al., 1996	Fluido biológico	Tampão acetato de amônia 50 mM e ACN (21:79, v/v)	Primesphere 5C <sub>18</sub> HC® (250 x 4,6 mm, 5µm)	λ <sub>emis.</sub> = 525 nm λ <sub>excit.</sub> = 285 nm
OLSEN e ARGENTINE, 1996	Impurezas	ACN, MeOH e Tetraidrofurano	Zorbax RX-C <sub>18</sub> ® (5µm, 250 x 4,6 mm)	UV λ=230 nm

Os trabalhos envolvendo fluidos biológicos visam desenvolver e validar um método de análise para a determinação quantitativa da DLX e seus metabólitos através de CLAE, possibilitando a sua aplicação na análise de rotina e servindo também de subsídio para a aplicação em estudos farmacocinéticos (SILVA et al., 2008; WALDSCHIMITT et al., 2007; MA et al., 2007; MALFARÁ et al., 2007; MERCOLINI et al., 2007; SATONIN et al., 2007; SELVAN et al., 2007; JOHNSON et al., 1996).

A determinação de DLX e suas impurezas através do método de CLAE foram propostas por SONI, MARIAPPAN e BANERJEE (2005) e também por OLSEN e ARGENTINE (1996). Os trabalhos procuraram desenvolver e validar um método cromatográfico seletivo, sensível e preciso para determinação de DLX com a presença de impurezas relacionadas.

A detecção de impurezas formadas pela interação do cloridrato de DLX com polímeros entéricos (acetato succinato de hidroxipropilmetilcelulose e ftalato de hidroxipropilmetilcelulose) foi avaliada no trabalho de JANSEN e colaboradores (1998) aplicando a CLAE com detecção UV. As impurezas formadas também foram caracterizadas por espectrometria de massa, ressonância magnética nuclear e espectrofotometria de infravermelho.

A enantioseparação da DLX e de seu *R*-enantiômero por CLAE foi proposta usando amilose como fase estacionária (RANE e SHINDE, 2008) e hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina, como seletor quiral (YANG et al., 2007).

### **2.3.3 Voltametria**

A voltametria é um dos mais difundidos métodos eletroanalíticos. Este método permite a determinação de um grande número de íons metálicos e compostos orgânicos. A técnica se baseia no estudo das relações entre voltagem, corrente e tempo, durante a eletrólise numa célula. O potencial aplicado entre dois eletrodos proporciona a redução ou oxidação de uma espécie química, aplicando-se em análises qualitativas e quantitativas (SINKO, 2006).

A literatura apresenta algumas publicações envolvendo a determinação voltamétrica para análise de substâncias antidepressivas (NOUWS et al., 2005; USLU e ÖZKAN, 2002; FARGHALY, 2000; FERANCOVÁ et al., 2000; SILVA et al., 1999; BIRYOL, USLU e KÜÇÜKYAVUZ, 1996).

O emprego do eletrodo gotejante de mercúrio (*Hanging Mercury Drop Electrode*, HMDE) foi proposto para análise de comprimidos de sertralina (NOUWS et al., 2005) e também para os comprimidos de sulpirida (FARGHALY, 2000). O antidepressivo nefazodona foi estudado eletroquimicamente através da investigação de vários sistemas tampões com diferentes valores de pH e empregando eletrodo de carbono (USLU e ÖZKAN, 2002). FERANCOVÁ e colaboradores (2000) e BIRYOL, USLU e KÜÇÜKYAVUZ (1996) realizaram a análise voltamétrica em preparações farmacêuticas contendo amitriptilina e imipramina utilizando um eletrodo de pasta de carbono. Para análise de cápsulas de fluoxetina foi desenvolvido um método eletroquímico através do HMDE (SILVA et al., 1999).

## **2.4 Estudo da estabilidade**

Os parâmetros de estabilidade de um produto farmacêutico podem ser influenciados por condições ambientais, tais como temperatura, luz, ar e umidade, bem como o tipo de componente utilizado no recipiente de armazenamento (USP 31, 2008). Para verificar o impacto destes fatores sobre a estabilidade de fármacos ou medicamentos são realizados testes de estabilidade com o propósito de monitorar reações de degradação e avaliar a cinética de degradação do produto farmacêutico.

O cloridrato de DLX é instável e degrada rapidamente, aproximadamente 15% por hora, quando exposto às condições ácidas e conseqüentemente, a sua forma farmacêutica é uma cápsula de gelatina contendo microgrânulos com cobertura entérica (WELLS e LOSIN, 2008). Na literatura não existem estudos completos sobre a estabilidade da DLX, no entanto, são descritos alguns trabalhos sobre outros antidepressivos, como a fluoxetina. A DLX e a fluoxetina compartilham algumas semelhanças estruturais, como o éter e a amina secundária presentes nas moléculas (Figura 3).

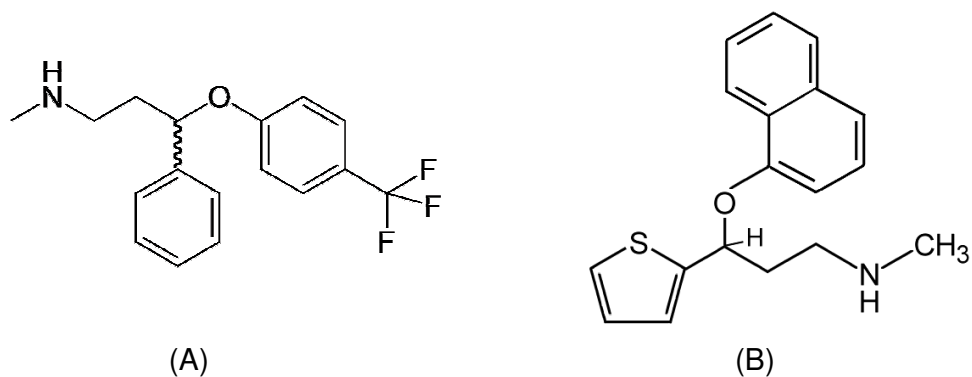


Figura 3- Estrutura química da fluoxetina (A) e da DLX (B).

A fluoxetina apresenta trabalhos na literatura que demonstram a formação de produtos de degradação através de estudos de fotoestabilidade, sendo estes conduzidos em meio aquoso (PETROVIC e BARCELÓ, 2007; LAM, YOUNG e MABURY, 2005). Em ambos os estudos, a fluoxetina mostrou ser fotoreativa e os produtos de fotodegradação foram identificados por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massa (CLAE-EM).

---

### **3. MÉTODOS PARA IDENTIFICAÇÃO DA DULOXETINA**

---





### 3.1 Introdução

A ressonância magnética nuclear é uma das técnicas empregadas para elucidação estrutural, fornecendo informações fundamentais para propor a estrutura de moléculas desconhecidas. A espectrometria de massas auxilia na identificação das substâncias, pois proporciona conhecer a massa da molécula, bem como fragmentos importantes devido às quebras da mesma (PRETSCH et al., 2000; PAIVA et al., 2001).

A análise espectrofotométrica no infravermelho (IV) é um dos métodos mais empregados para identificação de fármacos, pois é capaz de diferenciar substâncias por menores que sejam as diferenças estruturais, com exceção dos isômeros ópticos. Com isso, através da análise de um espectro obtido no infravermelho é possível visualizar as bandas características de grupos funcionais que permitem a obtenção de informações estruturais úteis para a identificação de substâncias (CIENFUGOS; VAITSMAN, 2000). Apesar de fornecer informações muito importantes, o espectro de IV deve ser utilizado em conjunto com outros dados espectrais para uma análise qualitativa completa (SILVERSTEIN e WEBSTER, 2000).

A análise térmica, calorimetria diferencial exploratória, é uma técnica sensível que permite avaliar as propriedades físico-químicas das substâncias em função da temperatura, podendo indicar a pureza e a identidade de fármacos (USP 31, 2008).

A cromatografia em camada delgada (CCD) é uma técnica de fácil execução e compreensão, versátil e de baixo custo. Este método permite identificar o fármaco quando este é cromatografado juntamente com a substância de referência, através da comparação dos valores obtidos de fator de retenção (Rf). A utilização de CCD permite também verificar a presença de impurezas e produtos de degradação na amostra.

A absorção de radiação ultravioleta (UV) por muitos compostos ocorre numa faixa muito reduzida de comprimento de onda. Em consequência, a absorção UV oferece possibilidade menor para identificação de grupos funcionais do que outros métodos espectroscópicos, como o infravermelho e ressonância magnética nuclear (CIENFUGOS; VAITSMAN, 2000). Mesmo assim, a espectrofotometria na região do UV é muito utilizada na identificação de substâncias por ser um método simples, de fácil execução e de baixo custo no que diz respeito a reagentes.

A CLAE, quando utilizada para identificação de compostos, realiza a comparação entre os tempos de retenção obtidos para a solução amostra e para a solução padrão do fármaco em estudo. A utilização de um detector de arranjo de fotodiodos permite, além da comparação do tempo de retenção, verificar a similaridade entre os espectros obtidos.

### **3.2 Objetivos específicos**

- Caracterizar a substância química de referência através das análises por ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN-<sup>1</sup>H) e de carbono (RMN-<sup>13</sup>C), calorimetria exploratória diferencial (DSC), espectroscopia na região do infravermelho (IV) e espectrometria de massas.
- Desenvolver métodos para identificação de DLX em cápsulas utilizando a cromatografia em camada delgada (CCD), espectrofotometria na região do UV e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

### **3.3 Materiais e métodos**

#### **3.3.1 Substância química de referência (SQR)**

Na realização deste trabalho foi utilizado cloridrato de DLX SQR gentilmente cedido pela Indústria Farmacêutica Eli Lilly (Brasil) e também adquirido junto à empresa Ecochem (Dinamarca).

As características das SQRs são as seguintes:

- Eli Lilly: teor declarado de 89,1% (base livre) e lote 032JD0.
- Ecochem: teor declarado 87,1% (base livre) e lote 061211.

### **3.3.2 Produto farmacêutico**

Cápsulas contendo 60 mg de DLX, em microgrânulos de cobertura entérica, foram adquiridas no mercado sob o nome de Cymbalta® (Eli Lilly).

Cada cápsula contém:

- Cloridrato de DLX (equivalente a 60 mg de DLX);
- Excipientes: hidroxipropilmetilcelulose, acetato succinato de hidroxipropilmetilcelulose, sacarose, esferas de açúcar, talco, dióxido de titânio e citrato de trietila.

## **3.4 Caracterização da SQR**

### **3.4.1 Ressonância magnética nuclear**

#### **3.4.1.1 Materiais e métodos**

As análises foram realizadas em espectrômetro BRUKER (DPX400), no Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear, Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). A DLX SQR foi solubilizada em clorofórmio deuterado para obtenção dos espectros de RMN-<sup>1</sup>H e de RMN-<sup>13</sup>C.

#### **3.4.1.2 Resultados e discussão**

A estrutura química da DLX foi numerada para facilitar a atribuição dos sinais obtidos nos espectros (Figura 4).

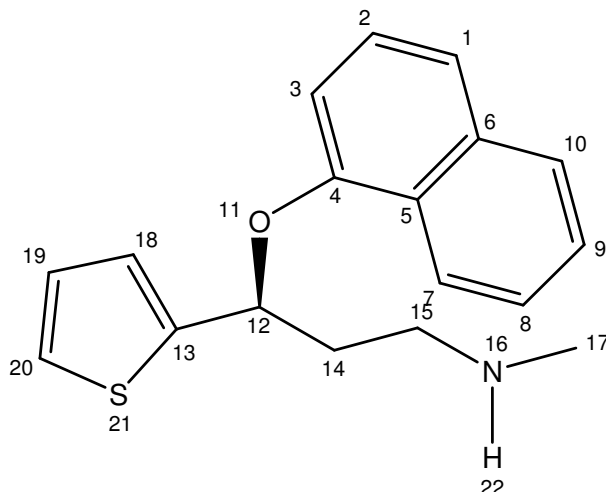


Figura 4- Estrutura química numerada da DLX.

A análise do espectro de RMN-<sup>1</sup>H (Figura 5) apresenta um multipeto na região entre 2,60 – 2,65 ppm, com integral relativa a 4 hidrogênios, referentes aos hidrogênios do grupamento CH<sub>3</sub> (17) ligado ao nitrogênio (16) e a um dos hidrogênios ligados ao carbono 14. Estes hidrogênios do C14 apresentam um desdobramento de sinal devido a serem prótons diastereotópicos. Na região compreendida entre 2,70 – 2,80 ppm é possível observar um multipeto, com integral relativa de 1H, referente ao segundo hidrogênio do C14. Entre 3,10 – 3,20 ppm, observamos um novo multipeto, com integral relativa a 2H, referente aos hidrogênios ligados ao C15, que apresentam uma maior desblindagem, deslocando este sinal para campo mais baixo. Em 5,91 ppm, podemos observar um tripleto, com integral relativa de 1H com constante de acoplamento de 2,4 Hz, referente ao hidrogênio do C12.

Na região compreendida entre 6,82 – 6,92 ppm, observamos um multipeto, com integral relativa de 2H, referente aos hidrogênios ligados aos carbonos 18 e 19 do anel tiofeno.

Na região compreendida entre 7,10 – 8,30 ppm, observamos os hidrogênios do sistema aromático do anel naftaleno e ligados ao carbono 20 do anel tiofeno, que aparecem como uma série de multipetos, com integral relativa de 8H.

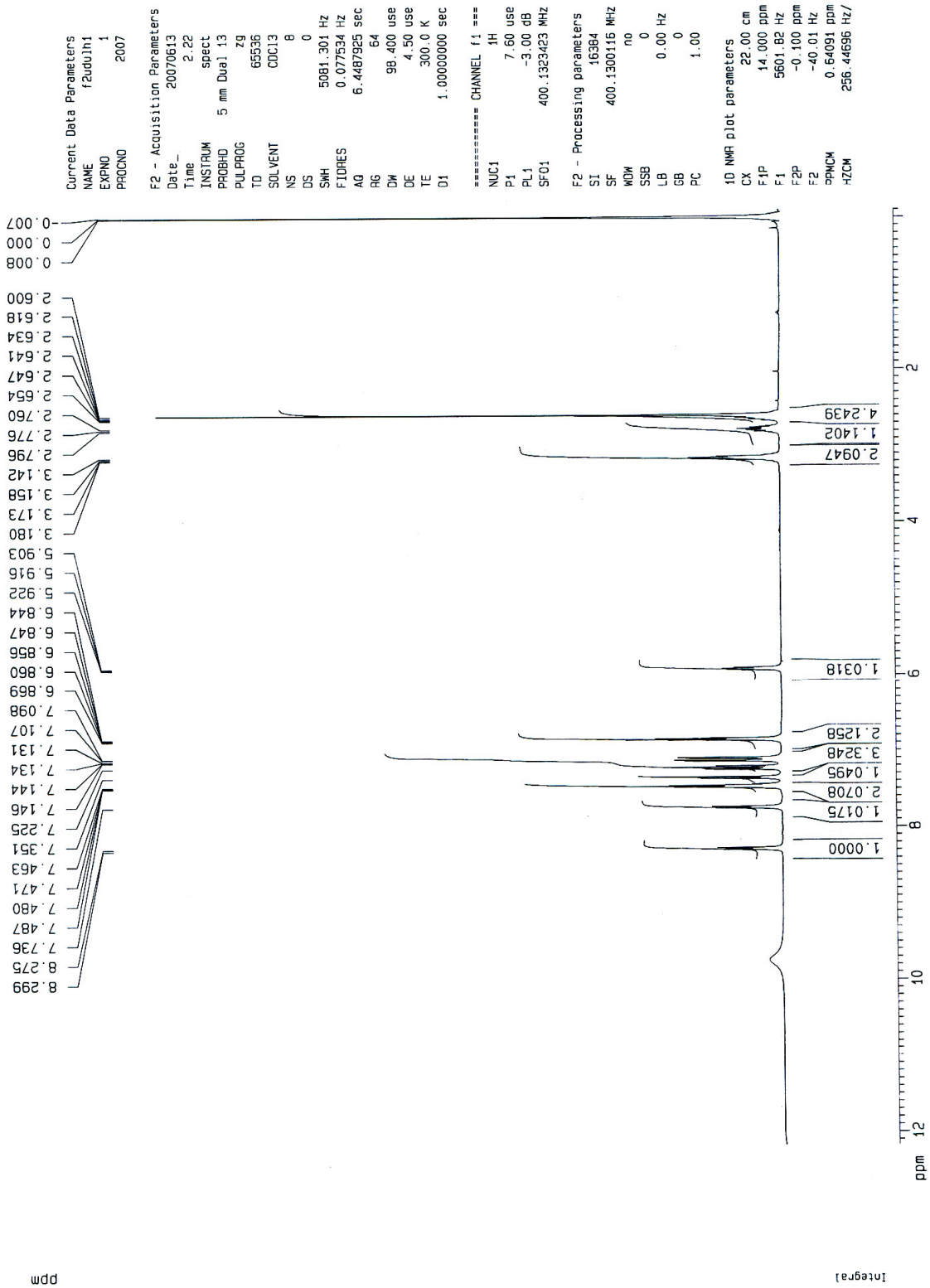


Figura 5- Espectro de RMN-<sup>1</sup>H da DLX empregando clorofórmio deuterado.

Na análise do espectro de RMN-<sup>13</sup>C (Figura 6), podemos observar um sinal na região de 32,94 ppm, referente ao carbono 14. Em 34,78 e 46,02 ppm, podemos observar os sinais referentes aos carbonos 17 e 15 respectivamente. Em 73,14 ppm, observamos um sinal referente ao C quiral 12.

Os sinais referentes aos carbonos do sistema aromático e do anel tiofeno podem ser observados em 107,23; 121,07; 121,86; 125,32; 125,46; 125,58; 125,62; 125,81; 126,39; 126,76; 127,50 e 134,48 ppm. Podemos destacar nestes sistemas, os sinais em 142,92 e 152,45 ppm que são referentes aos carbonos quaternários 12 e 13 respectivamente.

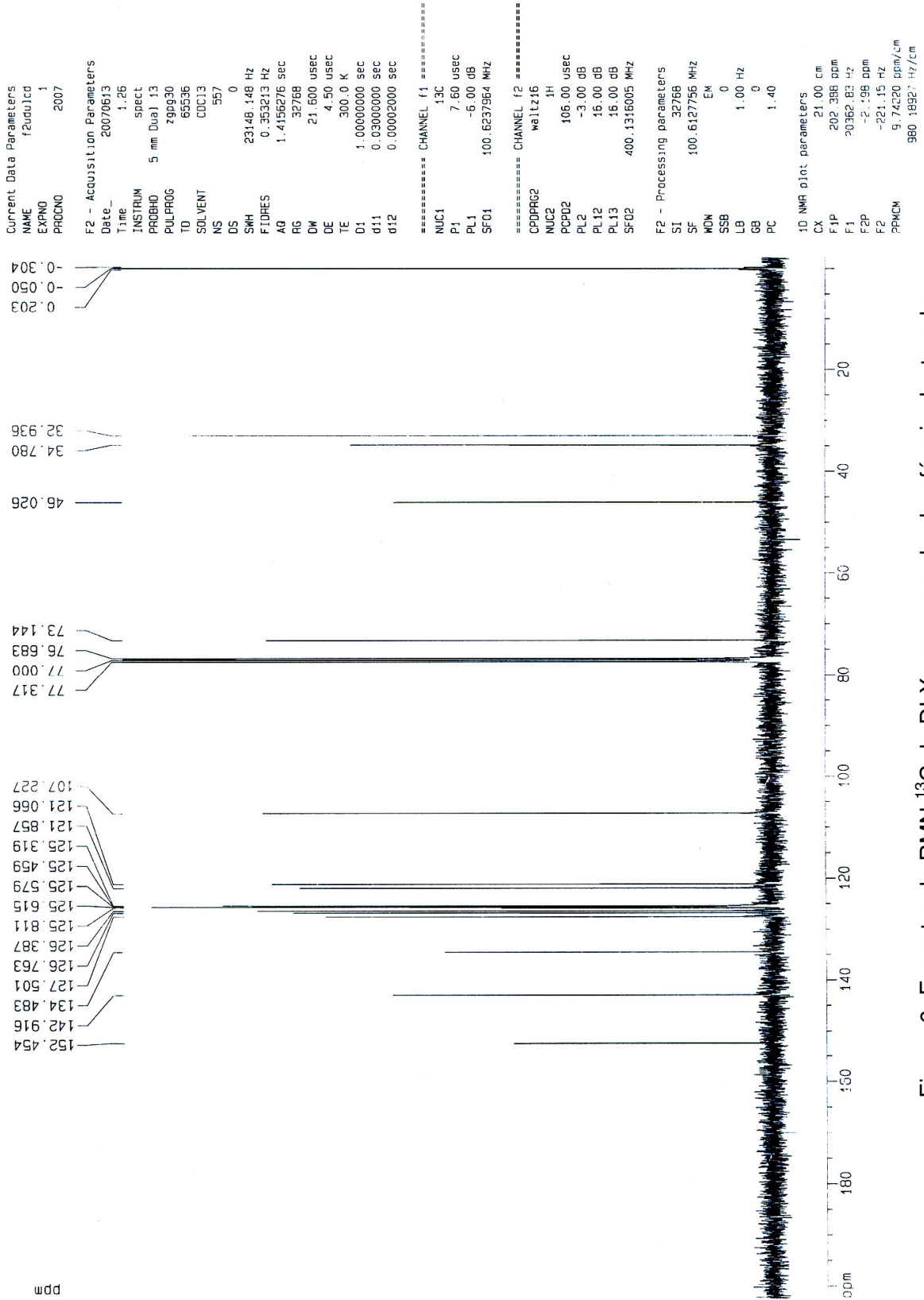


Figura 6- Espectro de RMN-<sup>13</sup>C da DLX empregando cloroformio deuterado.

### 3.4.2 Calorimetria exploratória diferencial

#### 3.4.2.1 Materiais e métodos

A análise da DLX SQR foi realizada em calorímetro diferencial exploratório por fluxo de calor, SHIMADZU DSC-60, dotado de controlador de fluxo para gás de purga (N<sub>2</sub>) FC-60-A, integrador TA-60WS e *software* de controle e análise TA-60 versão 2.0. A velocidade de aquecimento foi de 10 °C/min.

#### 3.4.2.2 Resultado e discussão

A Figura 7 apresenta a curva de aquecimento obtida por DSC para a DLX SQR.

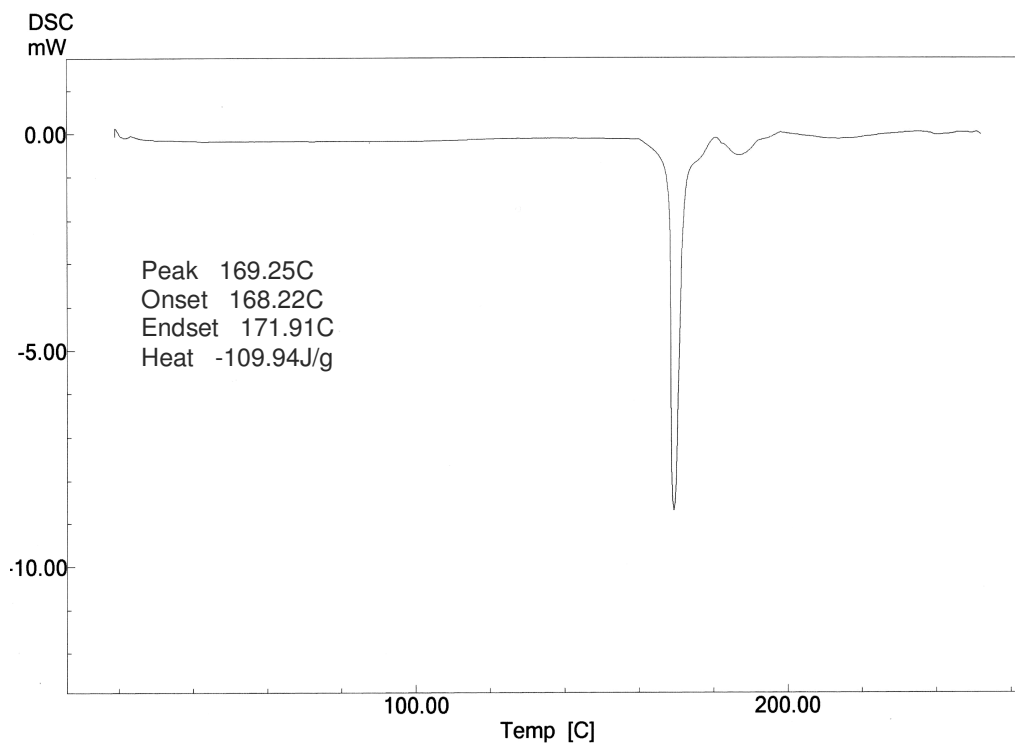


Figura 7- Curva de aquecimento obtida por DSC para DLX SQR.

Na literatura pesquisada não há descrição da faixa ou do ponto de fusão para o cloridrato de DLX. No laudo de análise da indústria farmacêutica Elli Lilly, enviado juntamente com a SQR, apresenta o valor do ponto de fusão de 171 °C determinado através de análise térmica diferencial (DTA).



A chamada temperatura *onset* ( $T_{onset}$ ) ou temperatura de extrapolação da linha de base representa a temperatura em que o evento térmico começa a ser observado e é a medida mais confiável do que a temperatura máxima, a qual sofre uma grande influência dos fatores experimentais, como a velocidade de aquecimento (ARMIJO et al., 2004). A  $T_{onset}$  encontrada para a DLX SQR foi de 168,22 °C e a faixa de fusão obtida foi de 168,22 °C a 171,91 °C, estando próximo ao ponto de fusão indicado na literatura (171 °C) e sendo um indicativo da pureza da amostra. Além disso, a pureza também é confirmada pela curva de DSC realizada para DLX SQR (Figura 7), onde se observa um pico estreito e a temperatura de fusão foi determinada facilmente.

### **3.4.3 Espectroscopia na região do infravermelho**

#### **3.4.3.1 Materiais e métodos**

O espectro de absorção na região do infravermelho foi obtido em espectrofotômetro SHIMADZU, modelo FITR8300, utilizando pastilhas de brometo de potássio contendo DLX SQR. As análises foram realizadas no Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

#### **3.4.3.2 Resultados e discussão**

O espectro de absorção da DLX SQR obtido por espectroscopia na região do IV está representado na Figura 8.

As atribuições das principais frequências características da DLX SQR estão apresentadas na Tabela 2.

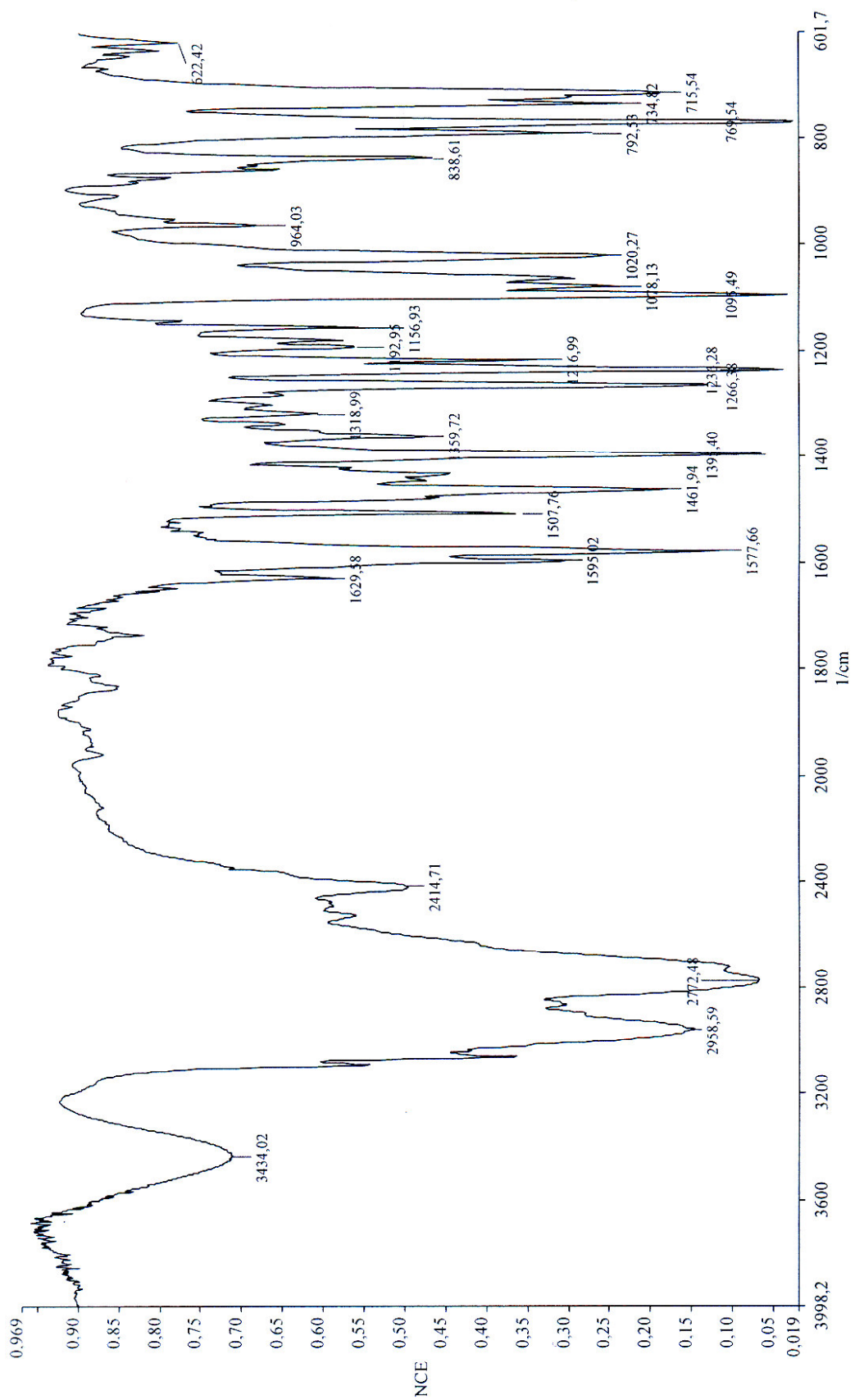


Figura 8- Espectro na região do IV da DLX.

Tabela 2- Frequências de absorção das principais bandas de IV características para DLX SQR e suas respectivas atribuições.

<b>Número de onda (cm<sup>-1</sup>)</b>	<b>Atribuição</b>
3434	Deformação axial N-H
2958	Deformação axial assimétrica da ligação C-H aromático
2772	Deformação axial simétrica da ligação C-H da metila
2414	Deformação axial dos cloridratos de aminas secundárias
1577	Deformação axial da ligação C=C do tiofeno
1395	Deformação axial da ligação C=C do naftaleno
1266	Deformação axial assimétrica =C-O-C
1020	Deformação axial C-N
600-800	Deformação axial da ligação C-S

A atribuição de algumas bandas características da molécula de DLX foi realizada com base na literatura pertinente (SILVERSTEIN; WEBSTER, 2000; BARBOSA, 2007). A amina secundária presente na molécula de DLX (Figura 1) é caracterizada pelas bandas: 3434 cm<sup>-1</sup> (deformação axial N-H), 2772 cm<sup>-1</sup> (deformação simétrica da ligação C-H da metila) e 1020 cm<sup>-1</sup> (deformação axial C-N). A banda de absorção acentuada em 1266 cm<sup>-1</sup> caracteriza a ligação do éter presente na estrutura da molécula de DLX através da deformação assimétrica =C-O-C. O composto heterocíclico tiofeno é caracterizado pelas bandas: 1577 cm<sup>-1</sup> (deformação axial da ligação C=C) e de 600-800 cm<sup>-1</sup> (deformação axial da ligação C-S). Em 1395 cm<sup>-1</sup> a banda de absorção acentuada é resultante da deformação axial da ligação C=C presente no composto aromático naftaleno.

A análise do espectro de IV demonstrou as bandas características do cloridrato de DLX permitindo a obtenção de informações estruturais úteis, através de grupos funcionais, para a sua identificação.

### 3.4.4 Espectrometria de massas

#### 3.4.4.1 Materiais e métodos

O espectro de massas da DLX SQR foi obtido através da injeção direta da amostra pelo método de EM-EM. As análises foram realizadas na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (USP).

A detecção do fármaco foi realizada por detector de espectrometria de massas com interface de ionização por *electrospray*, operado no modo positivo ( $ES^+$ ). A temperatura da fonte de íons e de dessolvatação foram 80 °C e 150 °C, respectivamente. A voltagem do cone utilizada para análise foi de 8 V. O equipamento foi controlado pelo *software* MassLynx 4.1 para aquisição e tratamento dos dados.

#### 3.4.4.1 Resultado e discussão

A Figura 9 apresenta o espectro de massas da DLX SQR.

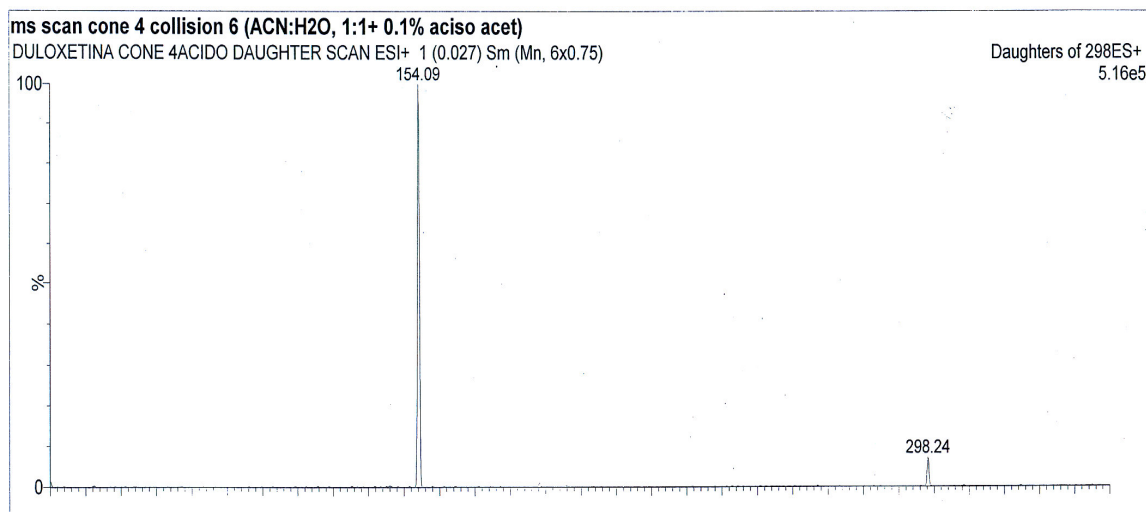


Figura 9- Espectro de massas da DLX SQR.

O espectro de massas da DLX SQR (Figura 9) apresenta o íon molecular em  $m/z$  298,24, conferindo com o peso molecular da DLX. Além disso, no espectro foi possível evidenciar o pico base em  $m/z$  154,09.

### **3.5 Métodos para identificação de duloxetina em cápsulas**

Para as análises utilizando o produto farmacêutico primeiramente foi realizada extração da substância de interesse, eliminando assim possíveis interferentes, para que posteriormente fossem efetuadas as análises de identificação da substância ativa.

#### **3.5.1 Cromatografia em camada delgada**

##### **3.5.1.1 Materiais e métodos**

Para análise por cromatografia em camada delgada foram utilizadas as amostras de DLX SQR e de cápsulas de DLX descritas nos itens 3.3.1 e 3.3.2, respectivamente. O citalopram SQR foi empregado para determinação do Rx.

A migração cromatográfica foi realizada em cromatoplasas aluminizadas de gel-sílica 60 F<sub>254</sub> (Merck) com 12 cm de comprimento, 5 cm de largura e 0,25 mm de espessura de camada absorvente. A identificação foi realizada através da lâmpada de ultravioleta (UV) a 254 nm.

Foram preparadas, isoladamente, soluções em acetonitrila com DLX SQR, cápsulas de DLX e de citalopram SQR na concentração final de 1000 µg/ml. As soluções foram colocadas em banho de ultra-som por 15 minutos, sendo que a solução preparada com o produto farmacêutico foi posteriormente filtrada com papel de filtro.

O sistema eluente foi composto por acetato de etila, metanol e hidróxido de amônio, na proporção 85:10:5 (v/v/v), respectivamente. Os solventes empregados foram adquiridos da Merck.

A aplicação das soluções descritas acima ocorreu com o auxílio de tubos capilares a uma distância de 1 cm da borda inferior da placa. A migração cromatográfica percorreu 10 cm a partir do ponto de aplicação. A visualização das manchas foi realizada após a evaporação do solvente residual através da exposição à lâmpada UV a 254 nm, sendo posteriormente determinados os respectivos fatores de retenção (Rf) e o Rx.

### 3.5.1.2 Resultados

O sistema eluente composto pela mistura de acetato de etila, metanol e hidróxido de amônio, na proporção de 85:10:5 (v/v/v) e permitiu a identificação através das manchas das amostras (DLX SQR, cápsulas de DLX e citalopram SQR). Os valores de Rf estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3 – Valores de Rf obtidos das amostras através da CCD.

Amostra	Rf	Rx*
DLX SQR	0,49	
Cápsulas de DLX	0,50	0,82
Citalopram SQR	0,60	

\*  $R_{f_{DLX\ SQR}}/R_{f_{Citalopram\ SQR}}$ .

O perfil cromatográfico das amostras após revelação com luz ultravioleta a 254 nm pode ser visualizado na Figura 10.

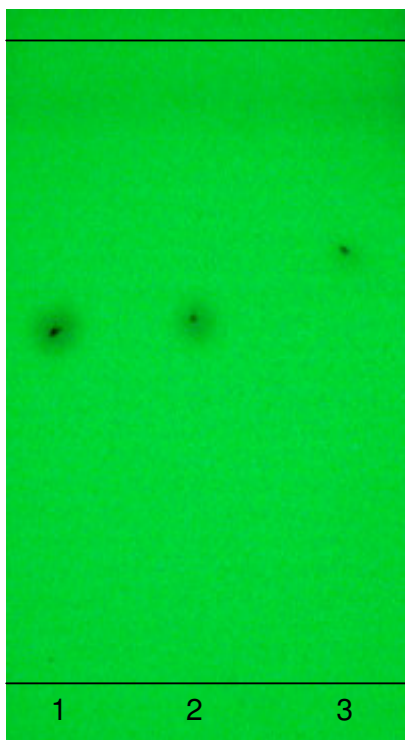


Figura 10 – Cromatoplaça obtida através da análise das soluções de 1000 µg/ml de DLX SQR (1), cápsula de DLX (2) e citalopram SQR (3) utilizando a luz UV (254 nm) para visualização.

### 3.5.1.3 Discussão

Para o desenvolvimento de um método destinado à identificação de DLX através da CCD foi realizado um estudo inicial com a combinação de alguns solventes orgânicos (acetato de etila, clorofórmio, metanol e hidróxido de amônio), a fim de verificar qual o melhor sistema eluente a ser empregado na análise. Após os testes, o sistema acetato de etila, metanol e hidróxido de amônio (85:10:5 v/v/v) mostrou ser o mais adequado devido ao bom desempenho apresentando valor de Rf 0,5; aproximadamente e sem observação de formação de cauda.

Os resultados obtidos sugerem a mesma identidade das amostras de DLX SQR e de cápsulas de DLX devido à similaridade no perfil cromatográfico demonstrado com a utilização do revelador luz UV (254 nm). A proximidade entre os valores de Rf é um indicativo da presença do fármaco nas amostras, verificando, assim, a eficiência do sistema cromatográfico avaliado na identificação do antidepressivo em estudo. Além disso, os resultados demonstraram a capacidade do método desenvolvido em separar outra substância antidepressiva inibidora da recaptação da 5-HT, o citalopram (Figura 11). Assim sendo, os resultados obtidos na cromatoplaça demonstraram a seletividade adequada entre os antidepressivos empregados neste estudo, conforme verificado pelo valor de Rx obtido.

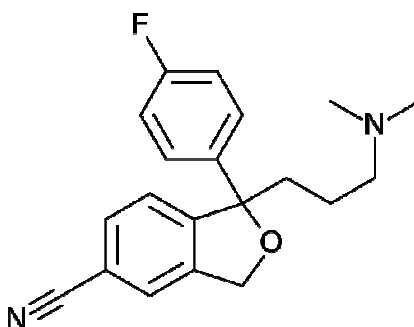


Figura 11- Estrutura química do citalopram.

## 3.5.2 Espectrofotometria na região do ultravioleta

### 3.5.2.1 Materiais e métodos

As amostras de DLX SQR e de cápsulas de DLX foram utilizadas para análise, sendo estas descritas nos itens 3.3.1 e 3.3.2, respectivamente.

Foram empregados acetonitrila de grau analítico (Merck) e papel de filtro (Framex) para o preparo das amostras.

O método foi desenvolvido em espectrofotômetro UV/VIS SHIMADZU modelo UV 160A equipado com cubetas de quartzo de 10 mm de caminho óptico.

As amostras foram preparadas em acetonitrila a uma concentração final de 20 µg/ml. As soluções foram colocadas em banho de ultra-som por 15 minutos, sendo que a solução preparada com o produto farmacêutico foi posteriormente filtrada com papel de filtro.

Os espectros foram obtidos a partir de leituras na faixa de comprimento de onda entre 200 e 400 nm, utilizando o acetonitrila como branco. Estes espectros foram sobrepostos e comparados quanto a seus perfis característicos.

### 3.5.2.2 Resultados

Os espectros de absorção na região do ultravioleta das soluções de DLX SQR e de cápsulas de DLX em diferentes solventes estão representados nas Figuras 12, 13 e 14.

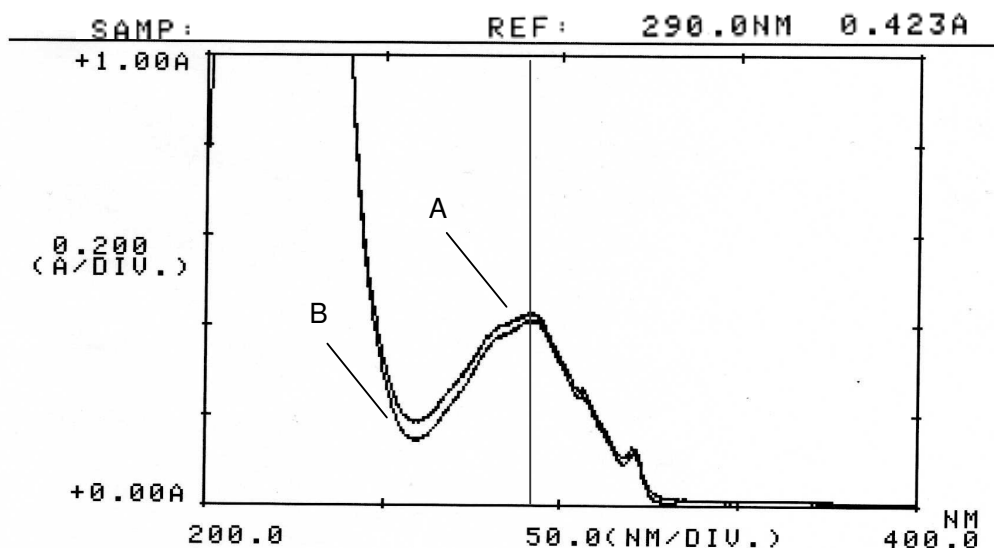


Figura 12– Perfil comparativo dos espectros de absorção na região do UV referentes às soluções de cápsulas de DLX (A) e DLX SQR (B) preparadas em acetonitrila, ambas à concentração de 20 µg/ml.



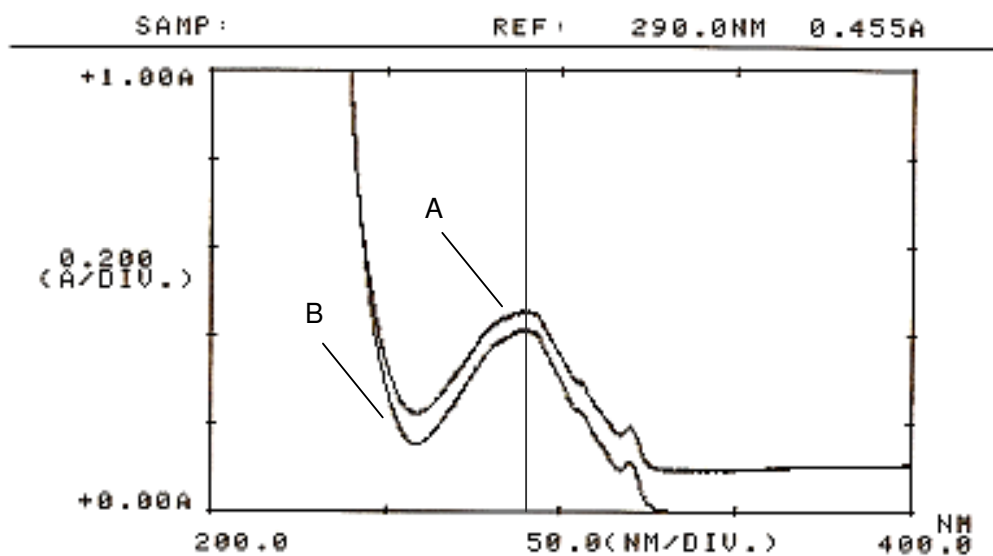


Figura 13– Perfil comparativo dos espectros de absorção na região do UV referentes às soluções de cápsulas de DLX (A) e DLX SQR (B) preparadas em água, ambas à concentração de 20 µg/ml.

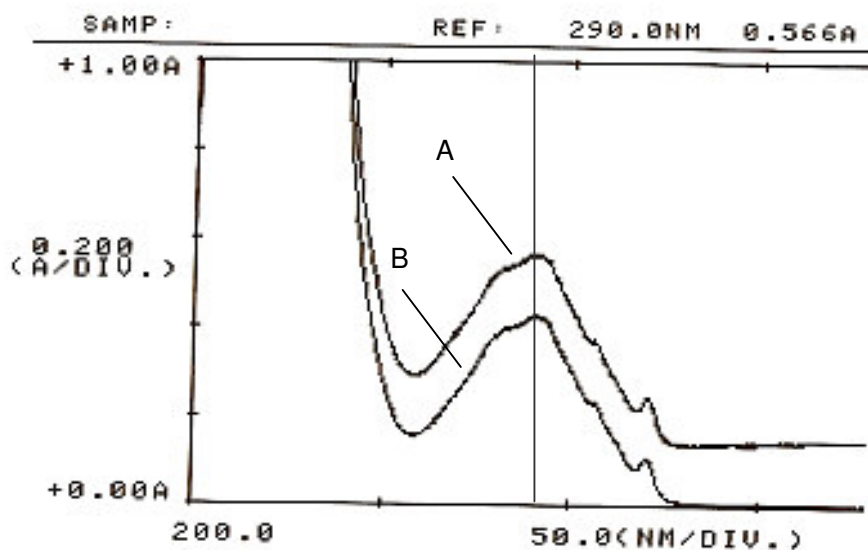


Figura 14– Perfil comparativo dos espectros de absorção na região do UV referentes às soluções de cápsulas de DLX (A) e DLX SQR (B) preparadas em metanol, ambas à concentração de 20 µg/ml.

### 3.5.2.3 Discussão

Para o desenvolvimento do método espectrofotométrico, foram traçados os espectros de absorção na região do UV da solução de cápsulas de DLX e de DLX SQR em diferentes solventes (acetonitrila, água e metanol) na faixa de comprimento de onda de 200 a 400 nm (Figuras 12, 13 e 14). Observou-se que o comprimento de onda de máxima absorção para o fármaco foi de 290 nm nos diferentes solventes estudados. KAMILA, MONDAL e GHOSH (2007) desenvolveram um método espectrofotométrico UV para análise de DLX (matéria-prima e produto acabado) e também utilizaram para determinação do fármaco o comprimento de onda de 290 nm, empregando a água como solvente.

As soluções preparadas com o produto farmacêutico que utilizaram água e metanol, como solventes, apresentaram maior absorção no espectro do que as soluções obtidas com a DLX SQR (Figuras 13 e 14). Isto pode ser devido à influência da absorção dos excipientes presentes na cápsula de DLX através do emprego destes solventes para o preparo das soluções. Portanto, o solvente utilizado para o preparo das amostras foi a acetonitrila devido à similaridade dos espectros obtidos na análise de DLX SQR e de cápsulas de DLX (Figura 12).

Os resultados obtidos indicam que a espectrofotometria UV é útil para identificação da DLX, porém não é um método analítico específico para este fármaco. A falta de especificidade pode ser compensada pela análise paralela através de outras técnicas.

### 3.5.3 Cromatografia líquida de alta eficiência

#### 3.5.3.1 Materiais e métodos

As análises cromatográficas foram conduzidas em cromatógrafo a líquido de alta eficiência AGILENT 1200 operado pelo programa *ChemStation*, B0201-SR1[260]. O equipamento é composto de sistema quaternário de bombas (G1311A), detector de UV (DAD G1315B), forno (G1316A) e auto-injetor (G1329A). A coluna cromatográfica ACE<sup>®</sup> C18 (250 mm X 4,0 mm, 5 µm) foi utilizada nas análises descritas neste estudo.

A fase móvel foi preparada a partir da mistura de tampão fosfato de potássio monobásico 50 mM (pH 6,0; contendo 0,3% de trietilamina) e acetonitrila (ACN) na proporção de 60:40 (v/v). A fase móvel foi filtrada através de membrana de *nylon* (47 mm x 0,45 µm).

As condições cromatográficas para análise estão descritas na Tabela 4.

Tabela 4 – Condições cromatográficas empregadas para análise de DLX por CLAE.

<b>Característica</b>	<b>Descrição</b>
Coluna	ACE <sup>®</sup> 5 C18 (250 mm x 4,0 mm, 5 µm)
Fase Móvel	Tampão fosfato monobásico 50 mM (pH 6,0; contendo 0,3% de trietilamina) e ACN (60:40, v/v)
Fluxo da fase móvel	1,0 ml/min
Volume de injeção	20 µl
Comprimento de onda	230 nm
Temperatura de análise	25 °C

As amostras foram preparadas em acetonitrila e colocadas em banho de ultrassom por 15 minutos. Posteriormente, as soluções foram diluídas com a fase móvel para uma concentração final de 10 µg/ml. A filtração em membrana de *nylon* precedeu a injeção das amostras no equipamento.

A DLX foi identificada no produto farmacêutico através da comparação entre o tempo de retenção obtido na solução amostra e o verificado na solução de DLX SQR.

### 3.5.3.2 Resultados

Os cromatogramas obtidos a partir da análise de DLX SQR e das cápsulas de DLX podem ser visualizados na Figura 15, onde são demonstrados seus respectivos tempos de retenção.

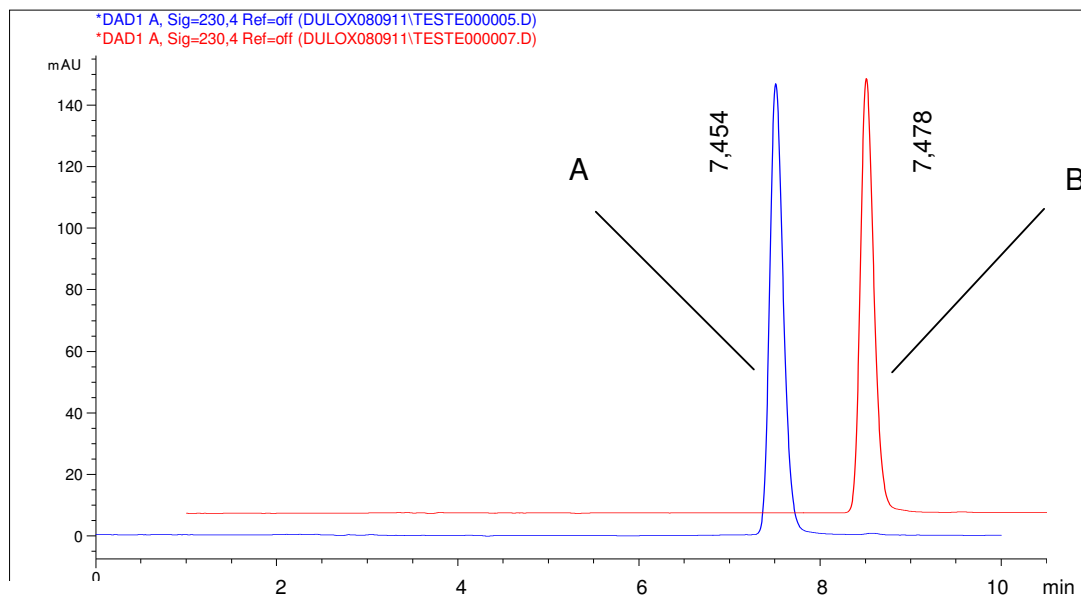


Figura 15 – Cromatogramas deslocados para a análise por CLAE das soluções de DLX SQR (A) e de cápsulas de DLX (B) ambas à concentração de 10 µg/ml. Condições cromatográficas: coluna ACE<sup>®</sup> 5 C18 (250 mm x 4,0 mm, 5µm); fase móvel tampão fosfato de potássio monobásico 50 mM (pH 6,0; contendo 0,3% de trietilamina) e acetonitrila (60:40, v/v); fluxo 1,0 ml/min; detecção UV λ 230 nm; temperatura de análise 25 °C.

### 3.5.3.3 Discussão

A fase móvel composta por uma mistura de tampão fosfato 50 mM (pH 6,0; contendo 0,3% de trietilamina) e acetonitrila (60:40, v/v) proporcionou uma análise rápida com tempo de retenção semelhante para a DLX SQR e para solução amostra das cápsulas, sendo este 7,4 minutos, aproximadamente. Além disso, um pico simétrico foi obtido, o que demonstra a eficácia do sistema empregado.

### 3.6 Conclusões

- A interpretação do espectro de RMN-<sup>1</sup>H e RMN-<sup>13</sup>C demonstrou que os sinais obtidos estão de acordo com as atribuições esperadas para a molécula de DLX;
- Na curva de DSC a DLX SQR demonstrou um pico estreito e um valor de ponto de fusão semelhante ao preconizado na literatura, indicando a pureza da substância;

- A espectroscopia no IV permitiu a caracterização da DLX SQR através da análise das principais bandas apresentadas pelos grupos funcionais da molécula do fármaco;
- A análise por espectrometria de massas permitiu a identificação da DLX através da verificação da sua massa molecular;
- O método desenvolvido por CCD mostrou-se adequado para a identificação de DLX nas cápsulas e seletivo diferenciando outro fármaco antidepressivo;
- A similaridade entre os espectros da solução de DLX SQR e das cápsulas de DLX demonstraram a viabilidade da utilização do método por espectrofotometria no UV para identificação de DLX no produto farmacêutico empregando a acetonitrila como solvente;
- Os tempos de retenção semelhantes obtidos entre as soluções do padrão e da amostra de DLX permitiram a utilização do método de CLAE para a identificação de DLX nas cápsulas.



---

## **4. VALIDAÇÃO DOS MÉTODOS ANALÍTICOS**

---





#### 4.1 Introdução

O crescente avanço tecnológico aplicado na indústria farmacêutica faz com que ela opere no mercado mundial como uma grande potência, produzindo novos medicamentos para atender às necessidades de uma grande parcela da população.

Devido à complexidade envolvida na obtenção de um produto farmacêutico, faz-se necessária a implementação e a execução de um rígido controle de qualidade para que o consumidor receba o produto em condições adequadas e padronizadas.

O controle de qualidade é fundamental no processo de desenvolvimento de novos fármacos e de formas farmacêuticas associado ao controle aplicado nos processos de produção destes medicamentos, visando assim produzir, manter e assegurar a qualidade e a eficácia para cada unidade do produto farmacêutico (AVENDAÑO, 1993).

Para que um medicamento apresente o efeito terapêutico desejado, o mesmo deve conter o teor declarado do fármaco. Para isto é imprescindível a utilização de métodos analíticos sensíveis e específicos à forma farmacêutica e às propriedades físico-químicas do fármaco.

A credibilidade nos procedimentos aplicados no controle de qualidade de medicamentos é um fator essencial na indústria farmacêutica, para isto é necessário que o método analítico empregado seja validado, assegurando, assim, a confiabilidade dos resultados obtidos.

A validação de um método analítico é o processo pelo qual se estabelece, através de estudos laboratoriais, que as características de desempenho do método satisfazem as exigências para a aplicação analítica pretendida (USP 31, 2008). As características de execução de um método são expressas em termos de parâmetros analíticos que devem ser determinados durante a validação do mesmo. Estes parâmetros visam verificar a linearidade, a precisão, a exatidão, a especificidade, os limites de detecção e de quantificação e a robustez do método de análise proposto

(ICH, 2005; USP 31, 2008; BRASIL, 2003). A USP 31 (2008) e o ICH, *International Conference on Harmonization*, (2005) reconhecem a não necessidade da avaliação de todos os parâmetros analíticos para a validação de um método. O tipo de método e seu respectivo uso determinam quais são os parâmetros a serem investigados (SWARTZ; KRULL, 1998). É de responsabilidade do analista identificar os parâmetros que são relevantes para o desempenho do processo analítico (ERMER, 2001).

#### **4.2 Objetivos específicos**

- Desenvolver e validar método por espectrofotometria na região do UV para análise quantitativa de DLX no produto farmacêutico;
- Desenvolver e validar método através da CLAE para determinação quantitativa de DLX em cápsulas;
- Desenvolver e validar método aplicando a voltametria de redissolução catódica para determinação quantitativa no produto farmacêutico;
- Analisar comparativamente os métodos propostos, neste trabalho, para análise quantitativa de DLX em cápsulas;

#### **4.3 Espectrofotometria na região do ultravioleta**

##### **4.3.1 Instrumental e condições de análise**

O método foi desenvolvido em espectrofotômetro descrito no item 3.5.2.1.

As soluções da DLX SQR e do produto farmacêutico foram preparadas em acetonitrila e as leituras foram realizadas no comprimento de onda de 290 nm.

##### **4.3.2 Avaliação da especificidade**

A especificidade do método foi avaliada através da investigação da possível interferência dos excipientes contidos no produto farmacêutico (Cymbalta®).

#### 4.3.2.1 Amostra simulada de excipientes

Foram preparadas soluções de DLX SQR e da amostra simulada de excipientes (ASE) em acetonitrila na concentração de 20 µg/ml, para avaliação da especificidade do método por espectrofotometria na região do UV. A composição de ASE está apresentada na Tabela 5.

As soluções preparadas para o teste foram colocadas em banho de ultra-som por 15 minutos, sendo que a solução elaborada com a ASE foi posteriormente filtrada com papel de filtro.

Os espectros obtidos das soluções foram comparados, verificando a possível interferência dos excipientes na determinação do teor de DLX.

Tabela 5 – Composição da ASE.

<b>Excipiente</b>	<b>Concentração (%)*</b>
Sacarose	65,0
Hidroxipropilmetilcelulose (HPMC)	10,0
Acetato succinato de HPMC	4,0
Talco	1,0
Dióxido de titânio	0,5
Citrato de trietila	1,0

\* Determinadas de acordo com as especificações de concentrações percentuais médias descritas para cada excipiente em q.s.p 100% do fármaco (KIBBE, 2000; SHIN-ETSU, 2008).

#### 4.3.3 Linearidade

A linearidade do método analítico foi avaliada através da construção de três curvas padrão, contendo sete níveis de concentrações em cada uma delas. Para construção da curva padrão foi preparada uma solução de DLX SQR de 100 µg/ml, em acetonitrila. A partir desta solução foram transferidas alíquotas de 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0 e 7,0 ml, com auxílio de bureta, para balões volumétricos de 20 ml. Foram completados os volumes com a acetonitrila para a obtenção de soluções em concentrações de 5,0; 10,0; 15,0; 20,0; 25,0; 30,0 e 35,0 µg/ml, respectivamente.

Para cada concentração de análise foram preparadas soluções em triplicata, sendo realizadas três determinações por solução.

As médias das absorvâncias de DLX SQR, correspondentes a cada diluição, foram utilizadas para obtenção da curva padrão através da construção de um gráfico de absorvância *versus* concentração.

A equação da reta e o coeficiente de correlação ( $r$ ) da curva padrão foram calculados e os resultados foram avaliados estatisticamente, através da análise de variância (ANOVA).

#### **4.3.4 Precisão**

A precisão do método analítico foi expressa através da repetibilidade e da precisão intermediária do método, sendo calculado o desvio padrão relativo (DPR) obtido na determinação quantitativa de DLX em cápsulas. A repetibilidade foi avaliada através da determinação do DPR obtido para análise de seis amostras de cápsulas de DLX, sendo conduzidas as análises durante o mesmo dia. Além disso, também foi determinada a precisão intermediária do método através de avaliação intradia e interdia do DPR apresentado em três dias diferentes de análise.

##### **4.3.4.1 Preparação da solução de duloxetina SQR**

Pesou-se, exatamente, o equivalente a 10 mg de DLX SQR, transferiu-se quantitativamente para balão volumétrico de 100 ml com auxílio de um pequeno volume de acetonitrila. O balão volumétrico foi colocado em banho de ultra-som por 15 minutos, posteriormente o volume foi completado com mesmo solvente. Uma alíquota de 5,0 ml dessa solução (100  $\mu\text{g/ml}$ ) foi transferida para balão volumétrico de 25 ml e o volume foi completado com a acetonitrila. A concentração final obtida da solução foi de 20  $\mu\text{g/ml}$  de DLX SQR.

##### **4.3.4.2 Determinação de duloxetina em cápsulas**

A partir do peso médio de 20 cápsulas de DLX, foi pesado, exatamente, o equivalente a 10 mg de DLX da mistura dos microgrânulos, sendo triturado o

material diretamente no recipiente de pesagem. Posteriormente, transferiu-se o material, quantitativamente, para balão volumétrico de 100 ml com auxílio de um pequeno volume de acetonitrila. O balão volumétrico foi colocado em banho de ultrassom por 15 minutos e, posteriormente, foi completado o volume com o mesmo solvente e filtrado o seu conteúdo com papel filtro. Foram transferidas alíquotas de 5,0 ml do filtrado para balão volumétrico de 25 ml, onde o volume foi completado com acetonitrila. A concentração final obtida foi de 20 µg/ml de DLX, sendo realizada análise em triplicata.

A concentração ( $C_A$ ) em µg/ml das soluções de DLX em cápsulas foi determinada pelo Esquema 1.

$$C_A = \frac{A_A \cdot C_{SQR}}{A_{SQR}}$$

Esquema 1

Onde:

$A_A$  = absorvância da solução de DLX em cápsulas;

$C_{SQR}$  = concentração da solução DLX SQR (µg/ml);

$A_{SQR}$  = absorvância da solução DLX SQR.

As percentagens de DLX nas amostras das cápsulas ( $C_A\%$ ) foram calculadas segundo Esquema 2.

$$C_A\% = \frac{C_A \cdot 100}{C_T}$$

Esquema 2

Onde:

$C_A$  = concentração da solução de DLX em cápsulas determinada neste método (µg/ml);

$C_T$  = concentração teórica da solução de DLX em cápsula (µg/ml).

### 4.3.5 Exatidão

A exatidão foi avaliada através do teste de recuperação. Soluções de DLX SQR e de cápsulas de DLX foram preparadas em acetonitrila, ambas em concentração equivalente a 125 µg/ml de DLX.

Para a análise foram transferidas, com auxílio de bureta, alíquotas de 2,0 ml da solução de cápsulas de DLX para balões volumétricos de 25 ml e estes foram denominados amostra (A) e recuperação (R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> e R<sub>3</sub>). Foram adicionadas alíquotas de 1,0; 2,0 e 3,0 ml da solução de DLX SQR aos balões R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> e R<sub>3</sub>, respectivamente. Posteriormente, uma alíquota de 2,0 ml da solução de DLX SQR foi transferida para balão volumétrico de 25 ml, denominado de padrão (P). A acetonitrila foi utilizada para completar o volume dos balões, sendo obtidas soluções com concentrações finais de 10,0; 15,0; 20,0; 25,0 e 10,0 µg/ml, para os balões denominados A, R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> e P, respectivamente.

A Tabela 6 representa, esquematicamente, o preparo das soluções para o teste de recuperação da DLX SQR.

Tabela 6 – Preparo das soluções para realização do teste de recuperação utilizando o método de espectrofotometria por UV.

Balão volumétrico	Volume da solução de	Volume da solução de	Concentração final* (µg/ml)
	cápsulas de DLX 125 µg/ml (ml)	DLX SQR 125 µg/ml (ml)	
A	2,0	-	10,0
R <sub>1</sub>	2,0	1,0	15,0
R <sub>2</sub>	2,0	2,0	20,0
R <sub>3</sub>	2,0	3,0	25,0
P	-	2,0	10,0

\*Concentração de DLX.

As soluções dos balões denominados A, P, R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> e R<sub>3</sub> foram preparadas em triplicata. Para cada solução foram realizadas três determinações.

As percentagens de recuperação (R%) de DLX SQR foram calculadas pelo esquema 3 (AOAC, 1990).

$$R\% = \frac{[(C_F - C_A)]}{C_P} \cdot 100$$

Esquema 3

Onde:

$C_F$  = concentração da solução contendo DLX SQR e de DLX das cápsulas determinada neste método ( $\mu\text{g/ml}$ );

$C_A$  = concentração da solução de DLX das cápsulas determinada neste método ( $\mu\text{g/ml}$ );

$C_P$  = concentração de DLX SQR adicionada da solução resultante ( $\mu\text{g/ml}$ ).

#### **4.3.6 Resultados**

##### **4.3.6.1 Especificidade**

###### **4.3.6.1.1 Amostra simulada de excipientes**

A Figura 16 apresenta a comparação dos espectros de absorção da solução de DLX SQR e da ASE.

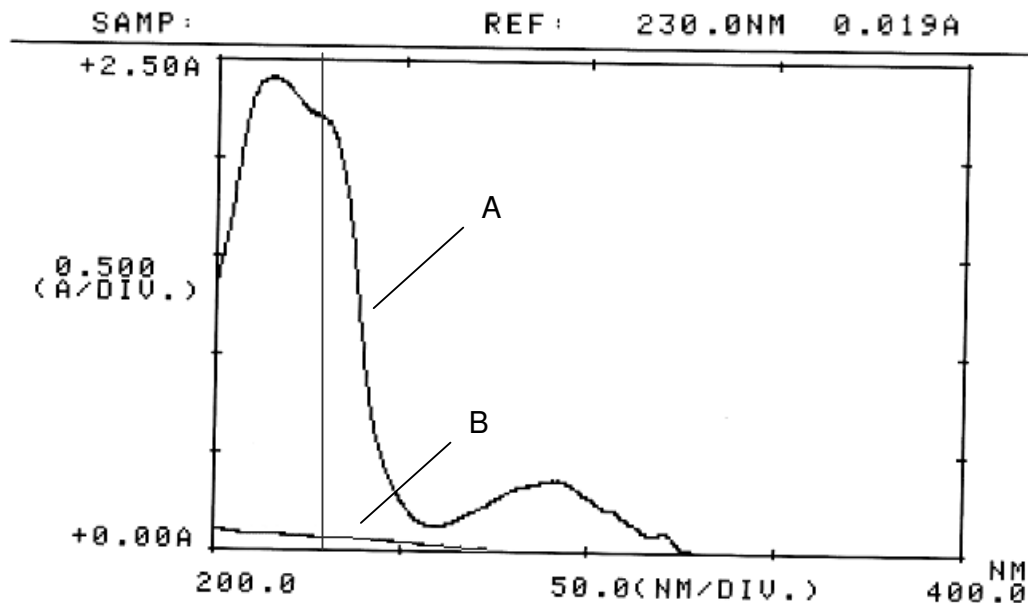


Figura 16- Sobreposição dos espectros de absorção obtidos por espectrofotometria UV para as soluções de DLX SQR (A) e de ASE (B) preparadas em acetonitrila na concentração de 20 µg/ml.

#### 4.3.6.2 Linearidade

Os valores de absorvância obtidos para cada concentração analisada da curva padrão estão apresentados na Tabela 7.

A Figura 17 ilustra a representação gráfica da curva padrão, bem como a equação da reta e coeficiente de correlação obtidos através do método.

A Tabela 8 apresenta os valores da ANOVA realizada para avaliação da linearidade do método.



Tabela 7– Valores de absorvância da DLX SQR obtidos através da espectrofotometria na região do UV para a construção da curva padrão.

Concentração ( $\mu\text{g/ml}$ )	Absorvância*	Absorvância média	DPR
5,0	0,105	0,105	0,95
	0,104		
	0,106		
10,0	0,202	0,204	0,75
	0,204		
	0,205		
15,0	0,307	0,306	0,37
	0,307		
	0,305		
20,0	0,411	0,411	0,37
	0,412		
	0,409		
25,0	0,515	0,513	0,41
	0,511		
	0,512		
30,0	0,612	0,612	0,16
	0,613		
	0,611		
35,0	0,715	0,714	0,24
	0,712		
	0,715		

\* Cada valor é a média de três determinações.

DPR – desvio padrão relativo

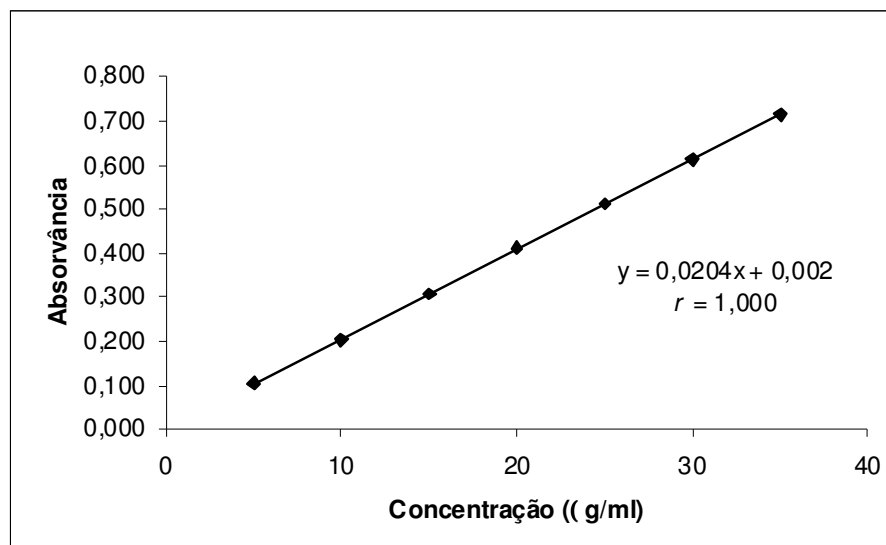


Figura 17 – Representação gráfica da curva padrão de DLX obtida por espectrofotometria na região do UV.

Tabela 8 – ANOVA das absorvâncias obtidas para a obtenção da curva padrão de DLX através da espectrofotometria na região do UV.

Fontes de variação	gl	Soma dos quadrados	Variância	F
ENTRE	6	0,8703	0,1451	66220*
- Regressão linear	1	0,1021	0,1021	267979*
- Desvio da linearidade	5	0,0000003067	0,61378	0,36
RESÍDUO	14	0,00003067	0,000002190	
TOTAL	20	0,8703		

\* significativo para  $p < 0,05$ .

#### 4.3.6.3 Precisão

A Tabela 9 apresenta os resultados da avaliação interdia e intradia para determinação de DLX em cápsulas através do método analítico por espectrofotometria na região do UV.

Tabela 9 – Avaliação interdia e intradia para determinação de DLX em cápsulas por espectrofotometria na região do UV.

Amostra	Avaliação intradia		
	Dia 1 (%)	Dia 2 (%)	Dia 3 (%)
1	99,35	100,63	100,16
2	101,78	100,16	99,84
3	101,54	99,29	100,65
4	100,49	101,27	100,08
5	101,46	100,40	99,11
6	100,97	101,03	99,52
Média (%)	100,93	100,46	99,89
DPR	0,89	0,70	0,54
Avaliação interdia			
Média (%)	100,43		
DPR	0,52		

#### 4.3.6.4 Exatidão

As percentagens de recuperação obtidas a partir do teste de recuperação da DLX SQR estão apresentadas na Tabela 10.

Tabela 10 – Resultados experimentais referentes ao teste de recuperação por espectrofotometria na região do UV.

	Concentração		Recuperação (%)	Média (%)
	Adicionada (µg/ml)	Recuperada (µg/ml)*		
R <sub>1</sub>	5,0	4,99	99,88	
R <sub>2</sub>	10,0	9,80	98,04	99,87
R <sub>3</sub>	15,0	15,25	101,68	

\* Cada valor representa a média de nove determinações.

#### 4.3.7 Discussão

A DLX apresenta dois comprimentos de onda característicos em 230 nm e 290 nm, aproximadamente (Figura 16). Em 230 nm foi possível verificar a absorção

dos excipientes contidos no produto farmacêutico. Portanto, o método espectrofotométrico UV foi validado no comprimento de onda de 290 nm com a utilização da acetonitrila como solvente, conforme demonstrado no item 3.5.2.3.

A linearidade do método foi avaliada através da construção de curva padrão na faixa de concentração de 5,0 a 35,0 µg/ml. Foram desenvolvidas três curvas, sendo calculadas as absorvâncias médias obtidas para traçar uma curva padrão, conforme Figura 17. Os resultados demonstram uma correlação linear entre as absorvâncias obtidas e a concentração de DLX SQR, apresentando a equação da reta  $y = 0,0204x + 0,002$  e coeficiente de correlação ( $r$ ) de 1,000 determinado através do estudo de regressão linear. A análise da variância (ANOVA) das absorvâncias obtida pela curva padrão demonstra que existe regressão linear e não há desvio da linearidade, apresentado na Tabela 8. Os resultados obtidos conferem a validade do método desenvolvido em termos de linearidade.

A precisão do método na determinação de DLX em cápsulas foi expressa através da repetibilidade e da precisão intermediária, sendo esta realizada em três dias diferentes. O valor percentual médio encontrado no doseamento das amostras durante os três dias foi de 100,93%, 100,46% e 99,89% do teor declarado de DLX. O valor apresentado de desvio padrão relativo (DPR) máximo na avaliação intradia foi de 0,89%, conforme Tabela 9. Este resultado corresponde à repetibilidade do método, onde foram realizadas determinações em uma mesma amostra homogênea em condições idênticas e durante um curto intervalo de tempo de um dia. A precisão intermediária exibe valores percentuais médios de três dias diferentes de análise, indicando os desvios padrões relativos obtidos interdia. A Tabela 9 indica estes valores, onde se verifica um teor médio de 100,43% (DPR= 0,52%) observado interdia nas análises das amostras. Os baixos valores de DPR obtidos neste estudo caracterizam o método como preciso.

A exatidão do método proposto foi determinada através do teste de recuperação da DLX SQR, cujos resultados podem ser observados na Tabela 10. O método desenvolvido demonstrou exatidão através dos resultados obtidos, exibindo percentagem de recuperação média de 99,87%.

Com base na avaliação dos resultados obtidos através dos parâmetros analíticos verificados no método por espectrofotometria UV para análise de DLX, pode-se afirmar que o método foi validado de maneira satisfatória e, portanto, é adequado para o controle de qualidade deste antidepressivo.

#### **4.4 Cromatografia líquida de alta eficiência**

##### **4.4.1 Instrumental e condições cromatográficas**

O instrumental e o procedimento para análise cromatográfica foram descritos no 3.5.3.1, bem como as condições analíticas empregadas para determinação de DLX por CLAE foram apresentadas na Tabela 4.

##### **4.4.2 Avaliação da especificidade**

Avaliou-se a especificidade do método analítico através da investigação da possível interferência dos excipientes, contidos no produto farmacêutico e dos produtos de degradação gerados em condições ácida, alcalina, oxidativa e fotolítica para a determinação quantitativa de DLX. A pureza do pico do fármaco foi verificada através do detector de arranjo de fotodiodos, empregando ferramentas disponíveis no *software ChemStation*, B0201-SR1[260].

###### **4.4.2.1 Amostra simulada de excipientes**

Foram preparadas soluções de DLX SQR e de cápsulas de DLX em fase móvel na concentração de 10 µg/ml, para avaliação da especificidade do método por CLAE. Paralelamente, uma solução de ASE foi preparada em fase móvel na diluição equivalente as soluções de DLX SQR e do produto farmacêutico. A composição de ASE está apresentada na Tabela 5.

As soluções preparadas para o teste foram colocadas em banho de ultra-som por 15 minutos, sendo que as soluções elaboradas com o produto farmacêutico e a ASE foram posteriormente filtradas com papel de filtro. A filtração em membrana de

nylon com 0,45 µm de diâmetro de poro precedeu a injeção de todas as amostras no equipamento.

Os cromatogramas obtidos das soluções foram comparados, verificando a possível interferência dos excipientes na determinação do teor de DLX.

#### **4.4.2.2 Degradação alcalina**

A hidrólise alcalina foi conduzida através da preparação de uma solução de DLX SQR (1 mg/ml) em acetonitrila. Posteriormente, transferiu-se uma alíquota de 2,0 ml dessa solução para balão volumétrico de 20 ml e completou-se o volume com uma solução de NaOH 1 M, obtendo uma solução de DLX 100 µg/ml. Essa solução foi dividida em duas alíquotas de 10 ml, sendo que uma foi empregada para diluição e avaliação da hidrólise alcalina em tempo zero, empregando solução de HCl 1 M para neutralização. Já, a outra alíquota dessa solução foi colocada em banho-maria em temperatura de 70 °C, sendo retirada uma alíquota após 1 hora e depois de 2 horas de análise. Posteriormente, transferiu-se 2,0 ml da solução de DLX 100 µg/ml (tempo= zero, 1h e 2h) para balão volumétrico de 20 ml, adicionou-se também 2,0 ml de uma solução de HCl 1 M e completou-se o volume com a fase móvel. Portanto, a concentração final da solução obtida foi de DLX 10 µg/ml.

#### **4.4.2.3 Degradação ácida**

O estudo de degradação ácida foi conduzido através do emprego de uma solução de HCl 0,1 M (hidrólise ácida A) e de HCl 0,01 M (hidrólise ácida B). Primeiramente, pesou-se o equivalente a 10 mg de DLX SQR, transferiu-se para balão volumétrico de 10 ml e completou-se o volume com acetonitrila, obtendo uma solução de DLX de 1 mg/ml. Posteriormente, transferiu-se uma alíquota de 2,0 ml dessa solução para balão volumétrico de 20 ml e completou-se o volume com a solução de HCl 0,1 M (hidrólise ácida A) e de HCl 0,01 M (hidrólise ácida B), obtendo duas soluções de DLX 100 µg/ml. Essas soluções foram divididas em duas alíquotas de 10 ml, sendo que uma foi empregada para diluição e avaliação da hidrólise ácida (A e B) em tempo zero. Já, a outra alíquota dessas soluções foi colocada em banho-maria em temperatura de 70 °C, sendo retiradas alíquotas após 15 e 30 minutos

(hidrólise ácida A) e 15, 30 e 60 minutos (hidrólise ácida B). Para obter uma solução de DLX 10 µg/ml, transferiu-se 2,0 ml da solução de DLX 100 µg/ml, nos intervalos de tempo determinados anteriormente e também 2,0 ml de uma solução de NaOH 0,1 M e de NaOH 0,01 M, afim de neutralizar a hidrólise ácida A e B, respectivamente. As alíquotas foram transferidas para balão volumétrico de 20 ml e completou-se o volume com a fase móvel.

#### **4.4.2.4 Degradação oxidativa**

A degradação oxidativa foi conduzida através do emprego de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% (degradação oxidativa A) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% (degradação oxidativa B). O estudo foi conduzido através da preparação de uma solução de DLX SQR (1 mg/ml) em acetonitrila. Posteriormente, transferiu-se uma alíquota de 2,0 ml dessa solução para balão volumétrico de 20 ml e completou-se o volume com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% (degradação oxidativa A) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% (degradação oxidativa B), obtendo duas soluções de DLX 100 µg/ml. Essas soluções foram divididas em duas alíquotas de 10 ml, sendo que uma foi empregada para diluição e avaliação da degradação oxidativa (A e B) em tempo zero. Já, a outra alíquota dessas soluções foi colocada em banho-maria em temperatura de 70 °C, sendo retirada alíquotas durante 15, 30 e 60 minutos (degradação oxidativa A) e 1 hora e 2 horas (degradação oxidativa B). Para obter uma solução de DLX 10 µg/ml, transferiu-se 2,0 ml da solução de DLX 100 µg/ml, nos intervalos de tempo determinados anteriormente, para balão volumétrico de 20 ml e completou-se o volume com a fase móvel.

#### **4.4.2.5 Degradação fotolítica**

A avaliação da degradação fotolítica foi desenvolvida em câmara de vidro espelhada internamente (10 x 17 x 17 cm) contendo lâmpada emissora da radiação UVC (254 nm) (Ecolume ZW<sup>®</sup>, 254 nm, 15 W) e com monitoramento de temperatura interna durante o experimento. Solução de DLX SQR (1 mg/ml) foi preparada em acetonitrila, sendo retiradas alíquotas e acondicionadas em cubetas descartáveis (Ultra Vette<sup>®</sup>) colocadas a uma distância de 10 cm da lâmpada emissora de radiação ultravioleta. Os tempos avaliados de exposição das soluções foram zero e 30 minutos. Posteriormente, para obter uma solução de DLX 10 µg/ml, transferiu-se

200 µl da solução de DLX 1 mg/ml, nos intervalos de tempo determinados anteriormente, para balão volumétrico de 20 ml e completou-se o volume com a fase móvel. A verificação da interferência do calor, dentro da câmara de vidro, foi realizada através da colocação de uma cubeta contendo a amostra nas mesmas condições, porém protegida com papel laminado.

#### **4.4.3 Adequabilidade do sistema**

A adequabilidade do sistema foi verificada durante a validação do método através dos seguintes parâmetros: tempo de retenção, número de pratos teóricos (N), fator de retenção ( $k'$ ) e repetibilidade das injeções.

#### **4.4.4 Linearidade**

A linearidade do método analítico foi avaliada através da construção de três curvas padrão, contendo seis níveis de concentrações em cada uma delas. Para construção da curva padrão foi preparada uma solução de DLX SQR de 50 µg/ml, em acetonitrila. A partir desta solução foram transferidas alíquotas de 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0 e 7,0 ml, com auxílio de bureta, para balões volumétricos de 25 ml. Foram completados os volumes com a fase móvel para a obtenção de soluções em concentrações de 4,0; 6,0; 8,0; 10,0; 12,0 e 14,0 µg/ml, respectivamente. Para cada concentração de análise, foram preparadas soluções em triplicata, sendo realizadas três determinações por solução.

As médias das áreas absolutas de DLX SQR, correspondentes a cada diluição, foram utilizadas para obtenção da curva padrão através da construção de um gráfico de área *versus* concentração.

A equação da reta e o coeficiente de correlação ( $r$ ) da curva padrão foram calculados e os resultados foram avaliados estatisticamente, através da análise de variância (ANOVA).



#### **4.4.5 Precisão**

A precisão do método analítico foi expressa através da repetibilidade e da precisão intermediária do método, sendo calculado o desvio padrão relativo (DPR) obtido na determinação quantitativa de DLX em cápsulas. A repetibilidade foi avaliada através da determinação do DPR obtido para análise de seis amostras de cápsulas de DLX, sendo conduzidas as análises durante o mesmo dia. Além disso, também foi determinada a precisão intermediária do método através de avaliação intradia e interdía do DPR apresentado em três dias diferentes de análise.

##### **4.4.5.1 Preparação da solução de duloxetina SQR**

Pesou-se, exatamente, o equivalente a 10 mg de DLX SQR, transferiu-se quantitativamente para balão volumétrico de 100 ml com auxílio de um pequeno volume de acetonitrila. O balão volumétrico foi colocado em banho de ultra-som por 15 minutos. Foi transferida alíquota de 2,5 ml dessa solução para balão volumétrico de 25 ml, onde o volume foi completado com a fase móvel. A concentração final obtida da solução foi de 10 µg/ml de DLX SQR.

##### **4.4.5.2 Determinação de duloxetina em cápsulas**

A partir do peso médio de 20 cápsulas de DLX, foi pesado, exatamente, o equivalente a 5 mg de DLX da mistura dos microgrânulos, sendo triturado o material diretamente no recipiente de pesagem. Posteriormente, transferiu-se o material, quantitativamente, para balão volumétrico de 50 ml com auxílio de um pequeno volume de acetonitrila. O balão volumétrico foi colocado em banho de ultra-som por 15 minutos e, posteriormente, foi filtrado o seu conteúdo. Foram transferidas alíquotas de 2,5 ml do filtrado para balão volumétrico de 25 ml, onde o volume foi completado com a fase móvel. A concentração final obtida foi de 10 µg/ml de DLX, sendo realizada análise em triplicata.

A concentração ( $C_A$ ) em µg/ml das soluções de DLX em cápsulas foi determinada pelo esquema 1 descrito no item 4.3.4.2.

As percentagens de DLX nas cápsulas ( $C_A\%$ ) foram calculadas pelo esquema 2 descrito no item 4.3.4.2.

#### 4.4.6 Exatidão

Para a elaboração do teste de recuperação foram preparadas soluções de DLX SQR e de cápsulas de DLX diluídas em acetonitrila, ambas em concentração equivalente a 50 µg/ml de DLX.

Para a análise foram transferidas, com auxílio de bureta, alíquotas de 2,0 ml da solução de cápsulas de DLX para balões volumétricos de 25 ml e estes foram denominados amostra (A) e recuperação ( $R_1$ ,  $R_2$  e  $R_3$ ). Foram adicionadas alíquotas de 1,0; 2,0 e 3,0 ml da solução de DLX SQR aos balões  $R_1$ ,  $R_2$  e  $R_3$ , respectivamente. Posteriormente, uma alíquota de 2,0 ml da solução de DLX SQR foi transferida para balão volumétrico de 25 ml, denominado de padrão (P). A fase móvel foi utilizada para levar ao volume final dos balões, sendo obtidas soluções com concentrações finais de 4,0; 6,0; 8,0; 10,0 e 4,0 µg/ml, para os balões denominados A,  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$  e P, respectivamente.

A Tabela 11 representa, esquematicamente, o preparo das soluções para o teste de recuperação da DLX SQR.

Tabela 11 – Preparo das soluções para realização do teste de recuperação utilizando o método de CLAE.

Balão volumétrico	Volume da solução de cápsulas de DLX 50 µg/ml (ml)	Volume da solução de DLX SQR 50 µg/ml (ml)	Concentração final* (µg/ml)
A	2,0	-	4,0
$R_1$	2,0	1,0	6,0
$R_2$	2,0	2,0	8,0
$R_3$	2,0	3,0	10,0
P	-	2,0	4,0

\* Concentração de DLX.

As soluções dos balões denominados A, P, R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> e R<sub>3</sub> foram preparadas em triplicata. Para cada solução foram realizadas três determinações.

As percentagens de recuperação (R%) de DLX SQR foram calculadas através do esquema 3 descrito no item 4.3.5.

#### **4.4.7 Avaliação da robustez**

A robustez do método foi avaliada através da constatação de suscetibilidade a variações nas condições cromatográficas, tais como: comprimento de onda, temperatura da coluna e alterações na fase móvel (fluxo, proporção dos componentes e pH da solução tampão). Para a realização deste ensaio foram preparadas soluções de DLX SQR e de cápsulas de DLX em fase móvel equivalente a 10 µg/ml de DLX, para ambas. As soluções foram preparadas em triplicata, sendo realizadas três determinações. Os parâmetros cromatográficos avaliados foram: tempo de retenção, número de pratos teóricos (*N*), simetria (*T*) fator de retenção (*k*) e concentração de DLX.

A fase móvel foi preparada conforme descrito em 3.5.3.1 e avaliada a mudança no comprimento de onda, empregando para as análises 225 e 235 nm. Além disso, foram investigadas alterações na temperatura da coluna (20 e 30 °C) e também a variação no fluxo da fase móvel (0,8 e 1,2 ml/min). Para a avaliação da proporção dos constituintes da fase móvel foram empregadas concentrações de 45 e 50% de acetonitrila. O pH da solução tampão fosfato de potássio monobásico 50 mM também foi investigado, empregando valores de pH de 5,5 e 6,5.

#### **4.4.8 Resultados**

##### **4.4.8.1 Especificidade**

###### **4.4.8.1.1 Amostra simulada de excipientes**

A especificidade do método foi avaliada através da verificação de interferência dos excipientes na determinação do teor de DLX no produto farmacêutico.

Os cromatogramas obtidos na análise das soluções de DLX SQR, de cápsulas de DLX e da amostra simulada dos excipientes podem ser visualizados na Figura 18 a-b.

#### **4.4.8.1.2 Degradação alcalina, ácida, oxidativa e fotolítica**

A Figura 18 c-h apresenta os cromatogramas da degradação de DLX SQR em diversas condições de degradação.

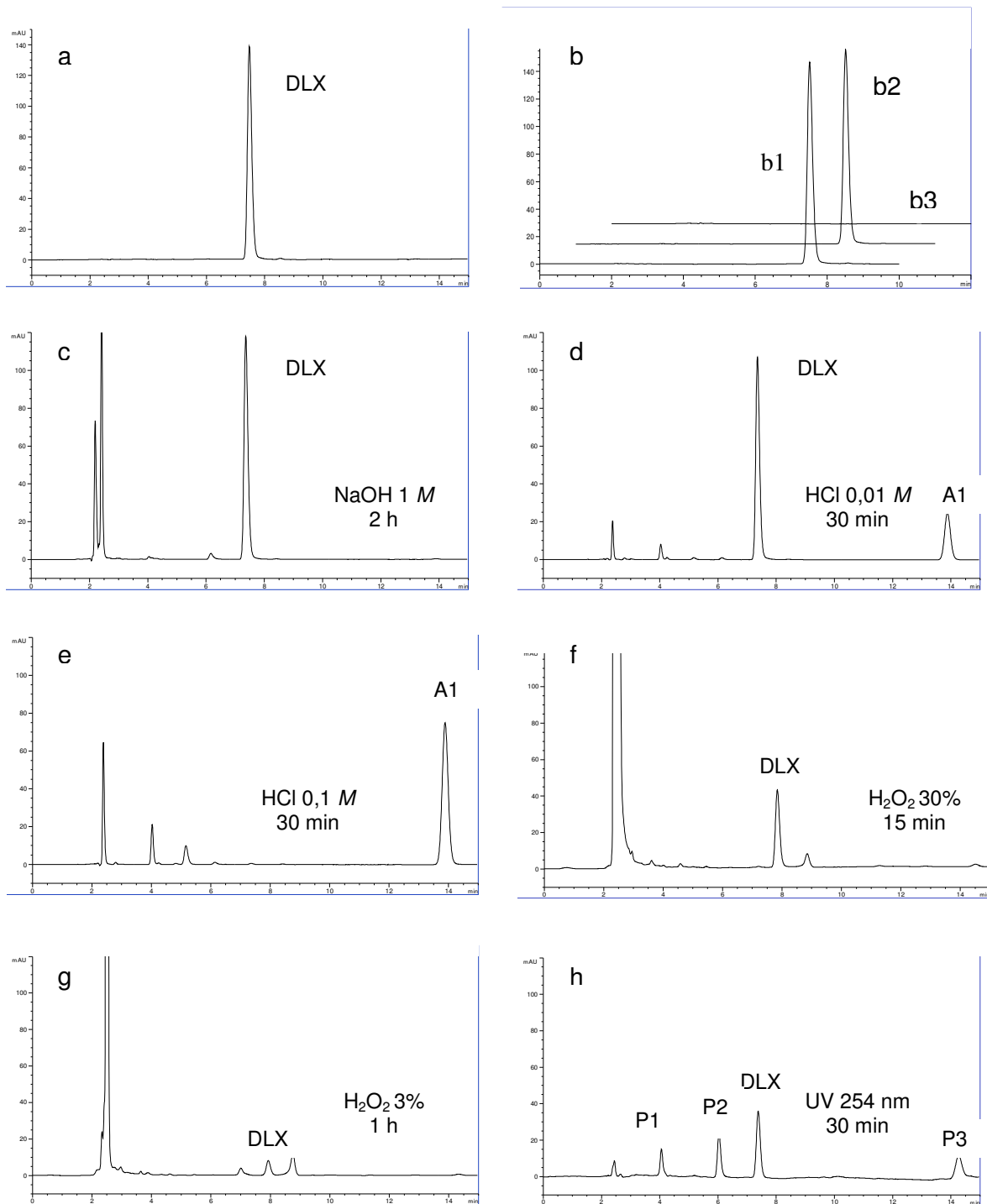


Figura 18 a–h. Cromatogramas obtidos da solução de DLX (10  $\mu\text{g/ml}$ ): DLX SQR (a, b1); DLX cápsulas (b2), ASE (b3); NaOH 1 M por 2 horas (c); HCl 0,01 M por 30 minutos (d); HCl 0,1 M por 30 minutos (e);  $\text{H}_2\text{O}_2$  30% por 15 minutos (f);  $\text{H}_2\text{O}_2$  3% por 1 hora (g); fotodegradação por 30 minutos e os produtos de degradação P1, P2 e P3 (h). Condições cromatográficas: coluna ACE<sup>®</sup> 5 C18 (250 mm x 4,0 mm, 5 $\mu\text{m}$ ); fase móvel tampão fosfato de potássio monobásico 50 mM (pH 6,0; contendo 0,3% de trietilamina) e acetonitrila (60:40, v/v); fluxo 1,0 ml/min; detecção UV  $\lambda$  230 nm; temperatura de análise 25 °C.

#### **4.4.8.2 Adequabilidade do sistema**

Os parâmetros de adequabilidade do sistema obtidos pelo método cromatográfico mostraram o pico da DLX em 7,3 min, aproximadamente (Figura 18), simetria ( $T= 1,35$ ) e número de pratos teóricos ( $N\cong 13000$ ), bem como a repetibilidade entre as injeções (DPR= 0,8, n=6).

#### **4.4.8.3 Linearidade**

Os valores das áreas absolutas referentes às concentrações analisadas na curva padrão por CLAE estão descritos na Tabela 12.

A Figura 19 demonstra a representação gráfica da curva padrão obtida e também a equação da reta e o coeficiente de correlação ( $r$ ) determinados por regressão linear.

A Tabela 13 apresenta os valores encontrados na análise de variância (ANOVA) para avaliação da linearidade do método desenvolvido.

Tabela 12– Áreas absolutas de DLX SQR obtidas através de CLAE para a construção da curva padrão.

<b>Concentração (µg/ml)</b>	<b>Área absoluta*</b>	<b>Área média</b>	<b>DPR</b>
4	622,91	620,55	0,42
	617,72		
	621,03		
6	955,22	965,63	0,93
	970,40		
	971,28		
8	1308,76	1303,46	0,51
	1296,09		
	1305,52		
10	1642,22	1642,54	0,06
	1643,66		
	1641,73		
12	1944,21	1944,08	0,19
	1940,32		
	1947,71		
14	2283,28	2283,66	0,44
	2273,90		
	2293,81		

\* Cada valor é a média de três determinações.  
DPR – desvio padrão relativo

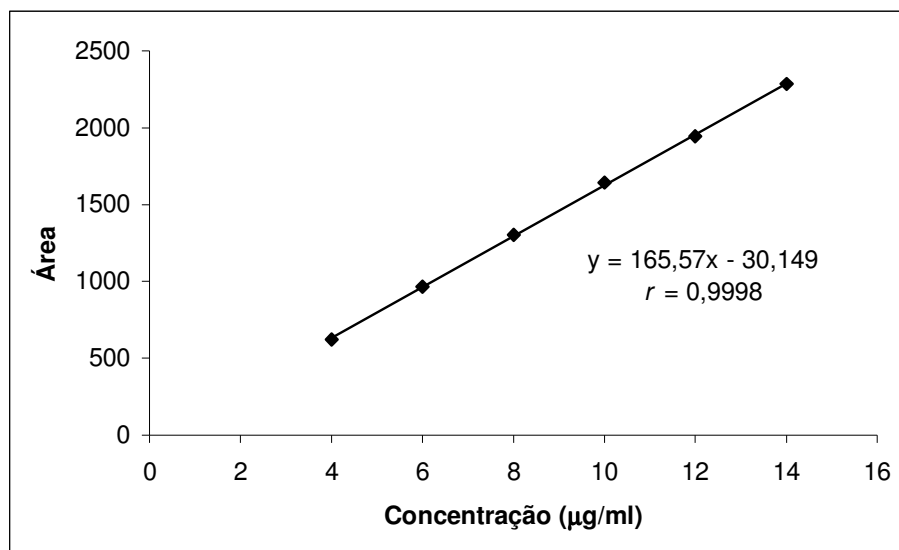


Figura 19 – Representação gráfica da curva padrão de DLX obtida por CLAE.

Tabela 13 – ANOVA das áreas absolutas determinadas para a obtenção da curva padrão de DLX através de CLAE.

Fontes de variação	gl	Soma dos quadrados	Variância	F
ENTRE	5	6064486,176	1212897,235	13983*
- Regressão linear	1	6064114,232	6064114,232	69911,34*
- Desvio da linearidade	4	371,9440	92,9860	1,07
RESÍDUO	12	10040,881	86,741	
TOTAL	17	6065527,056		

\* significativo para  $p < 0,05$ .

#### 4.4.8.4 Precisão

Os resultados encontrados na avaliação interdia e intradia para determinação de DLX estão indicados na Tabela 14.



Tabela 14 – Avaliação interdia e intradia para determinação de DLX em cápsulas por CLAE.

Amostra	Avaliação intradia		
	Dia 1 (%)	Dia 2 (%)	Dia 3 (%)
1	100,12	101,20	99,48
2	100,67	100,56	99,52
3	102,60	100,48	99,17
4	101,01	100,48	99,87
5	102,85	98,73	99,28
6	101,20	99,44	101,31
Média (%)	101,41	100,15	99,77
DPR	1,07	0,89	0,79
Avaliação interdia			
Média(%)	100,44		
DPR	0,85		

#### 4.4.8.5 Exatidão

As percentagens de recuperação obtidas a partir do teste de recuperação da DLX SQR estão apresentadas na Tabela 15.

Tabela 15 – Resultados experimentais referentes ao teste de recuperação por CLAE.

	Concentração		Recuperação (%)	Média (%)
	Adicionada (µg/ml)	Recuperada (µg/ml)*		
R <sub>1</sub>	2,0	2,01	100,50	
R <sub>2</sub>	4,0	4,00	100,00	100,56
R <sub>3</sub>	6,0	6,07	101,17	

\* Cada valor representa a média de nove determinações.

#### 4.4.8.6 Avaliação da robustez

Os resultados obtidos na determinação de DLX em cápsulas através de pequenas alterações nas condições cromatográficas otimizadas estão demonstrados na Tabela 16.

Tabela 16 - Avaliação da robustez do método de CLAE através da determinação de DLX em cápsulas.

Parâmetro cromatográfico	Condição	DLX (%)	$t_r^a$ DLX (min)	$N^b$	$T^c$	$k^d$
Comprimento de onda (nm)	225	99,32	7,117	11598	1,08	1,86
	235	99,23	7,133	11650	1,12	1,86
Temperatura (°C)	20	99,99	7,153	11714	1,35	1,87
	30	99,47	6,100	11542	1,33	1,85
Fluxo (ml/min)	0,8	100,38	9,183	14781	1,37	1,95
	1,2	100,65	6,187	12764	1,33	1,98
Acetonitrila (%)	45	100,95	5,305	12631	1,34	1,13
	50	100,87	6,285	12867	1,31	1,91
pH da solução tampão	5,5	100,20	7,138	13956	1,33	1,86
	6,5	99,95	7,841	12998	1,41	2,15
	Normal <sup>e</sup>	100,22	7,305	13382	1,35	1,92

<sup>a</sup> $t_r$ : tempo de retenção, <sup>b</sup> $N$ : número de pratos teóricos, <sup>c</sup> $T$ : simetria, <sup>d</sup> $k$ : fator de retenção, <sup>e</sup>Condição normal: coluna ACE<sup>®</sup> C18 (250 x 4,6 mm, 5 $\mu$ m); fase móvel tampão fosfato de potássio monobásico 50 mM (pH 6,0, acrescido de 0,3% trietilamina) e acetonitrila (60:40, v/v); fluxo 1,0 ml/min; detecção UV  $\lambda$  230 nm; temperatura de análise 25 °C.

#### 4.4.9 Discussão

A otimização das condições cromatográficas empregadas na análise quantitativa de DLX foi realizada, principalmente, através da escolha de um sistema eluente adequado, uma vez que a composição da fase móvel influencia significativamente o desempenho e a resolução dos componentes de uma mistura (USP 31, 2008). A fim de separar a DLX dos seus produtos de degradação formados sob condições forçadas, diferentes fases móveis foram utilizadas para obter um método simples e rápido com um razoável tempo de análise. Proporções distintas de solvente orgânico, como metanol e acetonitrila, foram avaliadas para constituir a fase móvel. A acetonitrila mostrou-se adequada porque proporcionou simetria no pico do fármaco com um tempo de retenção adequado, aproximadamente 7 minutos.

O pH do tampão desempenhou o maior papel na separação dos produtos de degradação. Quando o pH do tampão foi ajustado para 3,0 com uma solução de

ácido fosfórico (10%), a simetria do pico de DLX foi de 0,7 e o tempo de retenção próximo a 4 minutos. Além disso, alguns dos produtos de degradação co-eluíram. Quando o pH foi elevado para 6,0 e a trietilamina foi adicionada na fase móvel, a simetria do pico da DLX e o tempo de retenção se mostraram adequados, melhorando também a resolução entre todos os seus produtos de degradação. Assim sendo, a fase móvel estabelecida foi a mistura de tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 6,0, contendo 0,3% de trietilamina) e acetonitrila (60:40, v/v). A literatura demonstrou um método indicativo de estabilidade para determinação de DLX usando uma mistura complexa contendo 0,1% de ácido trifluoroacético, metanol e tetrahidrofurano (60:20:20, v/v/v) como fase móvel (SRINIVASULU et al., 2009).

Os estudos de degradação demonstram a especificidade quando o método é desenvolvido como indicativo de estabilidade, principalmente quando poucas informações estão disponíveis sobre os seus potenciais produtos de degradação. O ICH recomenda a realização de teste de degradação para elucidar a característica de estabilidade dos fármacos (ICH, 2005). O teste de degradação forçada pode ajudar a identificar rapidamente os produtos de degradação, estabelecer vias para degradação e determinar a estabilidade intrínseca da molécula. A estabilidade hidrolítica e fotolítica, bem como a suscetibilidade para oxidação, são requeridos nos estudos de degradação.

O cloridrato de DLX é instável e degrada rapidamente, aproximadamente 15% por hora, quando exposto às condições ácidas e conseqüentemente a sua forma farmacêutica é uma cápsula de gelatina contendo microgrânulos com cobertura entérica (WELLS e LOSIN, 2008). A DLX foi rapidamente degradada em meio ácido e um principal produto de degradação (A1) foi observado, sendo este simétrico ( $T=1,1$ ) e bem resolvido entre o pico do fármaco ( $R=17,6$ ). O aumento da concentração do ácido elevou a formação do produto de degradação principal (A1) e a área da DLX caiu rapidamente (Figura 18 d-e). A oxidação química da DLX com  $H_2O_2$  3% ou  $H_2O_2$  30% foi drasticamente observada (Figura 18 f-g) e com a fotodegradação (Figura 18 h) foi evidenciada a geração de três produtos de degradação (P1, P2 e P3). Entretanto, SRINIVASULU e colaboradores (2009) observaram a degradação de DLX somente sobre condições de hidrólise ácida e também determinaram que sobre outras condições de degradação forçadas este fármaco foi estável.

O método desenvolvido neste trabalho por CLAE foi validado através da avaliação dos seguintes parâmetros analíticos: robustez, especificidade, linearidade, precisão e exatidão.

Na robustez do método de CLAE foram verificadas pequenas alterações nos parâmetros cromatográficos, tais como: tempo de retenção, número de pratos teóricos ( $N$ ), fator de retenção ( $k$ ), simetria ( $T$ ) e concentração de DLX. Os valores calculados de simetria para cada condição cromatográfica foram aceitáveis, pois se encontram na faixa de  $0,8 \leq T \leq 1,5$  (USP, 2008). O fator de retenção deve estar na faixa de  $0,5 < k < 10$  (SNYDER, 1997). Os valores de  $k$  obtidos estão próximos de 2,0 indicando uma adequada retenção e o número de pratos teóricos demonstrou a medida da eficiência da coluna em diferentes condições. O fluxo (0,8 e 1,2 ml/min) e o percentual de acetonitrila (45 e 50%) resultaram em mudanças no tempo de retenção em comparação com a condição proposta normal. Entretanto, nenhuma mudança significativa foi observada a respeito na determinação quantitativa de DLX (Tabela 16).

A pesquisa de possível interferência na determinação quantitativa de DLX foi avaliada através do teste de especificidade realizado a partir da investigação dos excipientes utilizados na cápsula e dos produtos de degradação formados em solução, a partir de condições de degradação ácida, alcalina, oxidativa e fotolítica. A solução de amostra simulada dos excipientes (Figura 18 b) não interferiu na análise quantitativa de DLX, visto que o cromatograma não apresentou nenhum pico com retenção similar ao antidepressivo em estudo. A pureza do pico cromatográfico para DLX demonstrou que este foi puro em todos os casos indicando que não havia moléculas adicionais que estavam co-eluindo com a DLX e evidenciando a disponibilidade do método em estimar evidentemente o fármaco de interesse na presença de potenciais interferentes. Portanto, pode-se considerar o método específico, uma vez que, este demonstrou a capacidade de separar e de quantificar o fármaco sem a interferência dos seus produtos de degradação e dos excipientes contidos no produto farmacêutico.

A linearidade do método foi avaliada através da construção de uma curva padrão com faixa de concentração entre 4,0 e 14,0  $\mu\text{g/ml}$ . Foram desenvolvidas três curvas, sendo evidenciada uma correlação linear entre as áreas médias obtidas e a

concentração de DLX SQR. A curva padrão está apresentada na Figura 15. O estudo de regressão linear permitiu obter a equação da reta  $y = 165,57x - 30,149$  e um coeficiente de correlação ( $r$ ) de 0,9998. A linearidade do método foi comprovada através dos dados da ANOVA, onde foi verificada regressão linear significativa ( $p < 0,05$ ) e não foi demonstrado desvio da linearidade na faixa de concentração estudada (4,0 – 14,0  $\mu\text{g/ml}$ ), conforme Tabela 13. Os resultados obtidos demonstram a validade do método em relação à linearidade.

A precisão do método para determinação de DLX em cápsulas foi investigada através da repetibilidade e da precisão intermediária, sendo esta última realizada em três dias diferentes. Os valores percentuais médios encontrados no doseamento das amostras, durante os três dias de análise, foram de 101,41% (DPR= 1,07%), 100,15% (DPR= 0,89%) e 99,77% (DPR=0,79%), conforme Tabela 14. Os baixos valores de DPR obtidos durante a análise de repetibilidade indicam a precisão do método e demonstram que é possível realizar determinações de DLX nas mesmas condições para uma amostra homogênea durante o curto intervalo de tempo de um dia. A precisão intermediária exibiu valores percentuais médios de três dias diferentes de análise, indicando os desvios padrões relativos obtidos intradia e interdía. O teor médio observado interdía nas análises das amostras foi de 100,44% com DPR de 0,85. Os baixos valores de DPR obtidos neste estudo caracterizam a precisão do método.

A exatidão do método proposto foi determinada através do teste de recuperação da DLX SQR, cujos resultados podem ser observados na Tabela 15. O método desenvolvido demonstrou exatidão através dos resultados obtidos, exibindo percentagem de recuperação média de 100,56%.

Com base na avaliação dos resultados obtidos através dos parâmetros analíticos verificados no método de cromatografia líquida de alta eficiência para análise de DLX, é possível afirmar que o método foi validado de maneira satisfatória e, portanto, é adequado para o controle de qualidade deste antidepressivo.

## 4.5 Voltametria de redissolução catódica

### 4.5.1 Instrumental e condições voltamétricas

As medidas voltamétricas foram realizadas em polarógrafo 675VA (Methrom, Suíça), empregando o eletrodo de referência Ag/AgCl/KCl 3 M, eletrodo auxiliar de platina e eletrodo de trabalho de mercúrio de gota pendente (HMDE). As análises foram realizadas pela voltametria de redissolução catódica (CSV).

O eletrólito suporte utilizado foi o tampão Ringer pH 12 contendo 1% de acetonitrila. O tampão Ringer foi constituído da mistura da solução de NaOH 0,1 M e do tampão fosfato de sódio bibásico 0,1 M (60:40, v/v). A purga com nitrogênio foi realizada na célula voltamétrica durante 300 segundos, o tempo de deposição 15 segundos no potencial de -1,1 V. A varredura catódica foi realizada entre -1,1 a -1,6 V com velocidade de 6,6 mV/s.

### 4.5.2 Otimização das condições voltamétricas

#### 4.5.2.1 Preparação da solução de duloxetina SQR

Pesou-se, exatamente, o equivalente a 10 mg de DLX SQR, transferiu-se quantitativamente para balão volumétrico de 10 ml com auxílio de um pequeno volume de acetonitrila. O balão volumétrico foi colocado em banho de ultra-som por 15 minutos e o volume foi completado com acetonitrila. Foi transferida alíquota de 1,0 ml dessa solução para balão volumétrico de 10 ml completando o volume com a acetonitrila. A concentração final obtida da solução foi de 100 µg/ml de DLX SQR.

A otimização das condições voltamétricas ocorreu através da transferência de 10 ml do eletrólito suporte e 200 µl da solução de DLX SQR 100 µg/ml para a célula voltamétrica. A concentração final de DLX SQR na célula foi de 2 µg/ml.

#### 4.5.2.2 Estudo do potencial de deposição

Avaliou-se o efeito do potencial de deposição no sinal voltamétrico da DLX. O potencial estudado foi de 0,0 V até -1,3 V com a solução de DLX SQR na concentração de 2 µg/ml.

#### 4.5.2.3 Estudo do tempo de deposição

Neste estudo observou-se a influência do tempo de deposição na corrente gerada. O tempo de deposição estudado foi de 0,0 segundos até 300 segundos com a solução de DLX SQR na concentração de 2 µg/ml.

#### 4.5.3 Validação do método voltamétrico

##### 4.5.3.1 Especificidade

A especificidade do método de CSV foi avaliada através da verificação de interferência dos excipientes na determinação do teor de DLX no produto farmacêutico.

Foi preparada solução de 100 µg/ml de DLX SQR em acetonitrila. Paralelamente, uma solução de ASE foi preparada em acetonitrila na diluição equivalente a solução de DLX SQR. A composição de ASE está apresentada na Tabela 5.

As soluções preparadas para o teste foram colocadas em banho de ultra-som por 15 minutos, sendo que a solução elaborada com a ASE foi posteriormente filtrada com papel de filtro. A filtração em membrana de *nylon* com 0,45 µm de diâmetro de poro precedeu a introdução de 200 µl da solução de ASE para a célula voltamétrica contendo 10 ml do eletrólito suporte.

Os voltamogramas obtidos das soluções foram comparados, verificando a possível interferência dos excipientes na determinação do teor de DLX.

##### 4.5.3.2 Linearidade

A linearidade do método analítico foi avaliada através da construção de três curvas padrão, contendo cinco níveis de concentrações em cada uma delas. Para construção da curva padrão foi preparada uma solução de DLX SQR de 100 µg/ml, em acetonitrila. A partir desta solução foram transferidas alíquotas de 100,0; 200,0; 300,0; 400,0 e 500,0 µl, com auxílio de micropipeta automática de volume variável para cada célula voltamétrica contendo 10 ml do eletrólito suporte. As soluções

obtidas na célula voltamétrica foram das seguintes concentrações de 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 e 5,0 µg/ml, respectivamente. Para cada concentração de análise foram realizadas três determinações por solução.

As médias das correntes de DLX SQR, correspondentes a cada diluição, foram utilizadas para obtenção da curva padrão através da construção de um gráfico de corrente *versus* concentração.

A equação da reta e o coeficiente de correlação ( $r$ ) da curva padrão foram calculados e os resultados foram avaliados estatisticamente, através da análise de variância (ANOVA).

#### **4.5.3.3 Precisão**

A precisão do método analítico foi expressa através da repetibilidade e da precisão intermediária do método, sendo calculado o desvio padrão relativo (DPR) obtido na determinação quantitativa de DLX em cápsulas. A repetibilidade foi avaliada através da determinação do DPR obtido para análise de seis amostras de cápsulas de DLX, sendo conduzida as análises durante o mesmo dia. Além disso, também foi determinada a precisão intermediária do método através de avaliação intradia e interdía do DPR apresentado em três dias diferentes de análise.

##### **4.5.3.3.1 Preparação das soluções**

###### **4.5.3.3.1.1 Preparação da solução de duloxetina SQR**

Descrito no item 4.5.2.1.

###### **4.5.3.3.1.2 Determinação de duloxetina em cápsulas**

A partir do peso médio de 20 cápsulas de DLX, foi pesado, exatamente, o equivalente a 2,5 mg de DLX da mistura dos microgrânulos, sendo triturado o material diretamente no recipiente de pesagem. Posteriormente, transferiu-se o material, quantitativamente, para balão volumétrico de 25 ml com auxílio de um pequeno volume de acetonitrila. O balão volumétrico foi colocado em banho de ultra-



som por 15 minutos e, posteriormente, foi completado o volume com acetonitrila e o seu conteúdo foi filtrado com papel de filtro. A concentração final obtida da solução foi de 100 µg/ml de DLX. Posteriormente, foi transferida alíquota de 200 µl dessa solução, previamente filtrada em membrana de *nylon* com 0,45 µm de diâmetro de poro, para célula voltamétrica contendo 10 ml do eletrólito suporte. A concentração teórica final de DLX na célula foi de 2 µg/ml, sendo a análise realizada em triplicata.

A concentração ( $C_A$ ) em µg/ml das soluções de DLX em cápsulas foi determinada pelo esquema 1 descrito no item 4.3.4.2.

As percentagens de DLX nas cápsulas ( $C_A\%$ ) foram calculadas pelo esquema 2 descrito no item 4.3.4.2.

#### **4.5.3.4 Exatidão**

Para a elaboração do teste de recuperação foram preparadas soluções de DLX SQR e de cápsulas de DLX diluídas em acetonitrila, ambas em concentração equivalente a 100 µg/ml de DLX.

Para a análise foram transferidas, com auxílio micropipeta automática de volume variável, alíquotas de 200,0 µl da solução de cápsulas de DLX para célula voltamétrica. Além disso, foram adicionadas alíquotas de 50,0; 100,0 e 200,0 µl da solução de DLX SQR na célula. As soluções com concentrações finais de 2,5; 3,0 e 4,0 µg/ml foram denominados recuperação ( $R_1$ ,  $R_2$  e  $R_3$ ), respectivamente. Posteriormente, uma alíquota de 200,0 µl da solução de DLX SQR e das cápsulas de DLX foram transferidas para célula voltamétrica, sendo denominados de padrão (P) e amostra (A), respectivamente.

A Tabela 17 representa, esquematicamente, o preparo das soluções para o teste de recuperação da DLX SQR.

Tabela 17 – Preparo das soluções para realização do teste de recuperação utilizando o método de CSV.

Célula voltamétrica	Volume da solução de cápsulas de DLX 100 µg/ml (µl)	Volume da solução de DLX SQR 100 µg/ml (µl)	Concentração final de DLX (µg/ml)
A	200,0	-	2,0
R <sub>1</sub>	200,0	50,0	2,5
R <sub>2</sub>	200,0	100,0	3,0
R <sub>3</sub>	200,0	200,0	4,0
P	-	200,0	2,0

As soluções obtidas na célula voltamétrica denominados A, P, R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> e R<sub>3</sub> foram preparadas em duplicata. Para cada solução foram realizadas três determinações.

As percentagens de recuperação (R%) de DLX SQR foram calculadas através do esquema 3 descrito no item 4.3.5.

#### 4.5.3.5 Avaliação da robustez

A robustez do método foi avaliada através da constatação de suscetibilidade a variações nas condições voltamétricas, tais como: potencial de deposição, pH e concentração de acetonitrila no eletrólito suporte.

Para a realização deste ensaio foram preparadas soluções de DLX SQR e de cápsulas de DLX em acetonitrila equivalente a 100 µg/ml de DLX, para ambas. As soluções foram preparadas em duplicata, sendo realizadas três determinações. Avaliou-se a concentração de DLX através da análise voltamétrica.

O potencial de deposição foi otimizado conforme descrito em 4.5.2.2 e foram avaliadas mudanças de -1,0 e -1,2 V na determinação quantitativa de DLX em cápsulas. Para a avaliação da proporção dos constituintes do eletrólito suporte foram empregadas concentrações de 0,5 e 1,5% de acetonitrila. O pH do eletrólito suporte também foi investigado, empregando valores de pH de 11,5 e 12,5.

#### 4.5.4 Resultados

##### 4.5.4.1 Otimização das condições voltamétricas

As Figuras 20 e 21 demonstram o estudo para otimização das condições de análise do método voltamétrico.

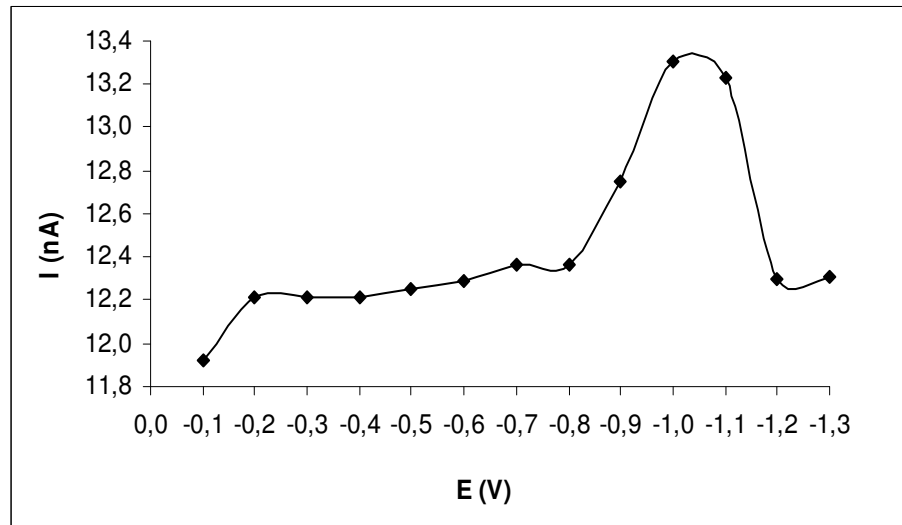


Figura 20- Efeito do potencial de deposição no HMDE para análise de DLX por CSV. Condições voltamétricas: eletrólito suporte tampão Ringer (pH 12, 1% de acetonitrila), purga N<sub>2</sub> 300 segundos, tempo de deposição 15 segundos, velocidade 6,6 mV/s.

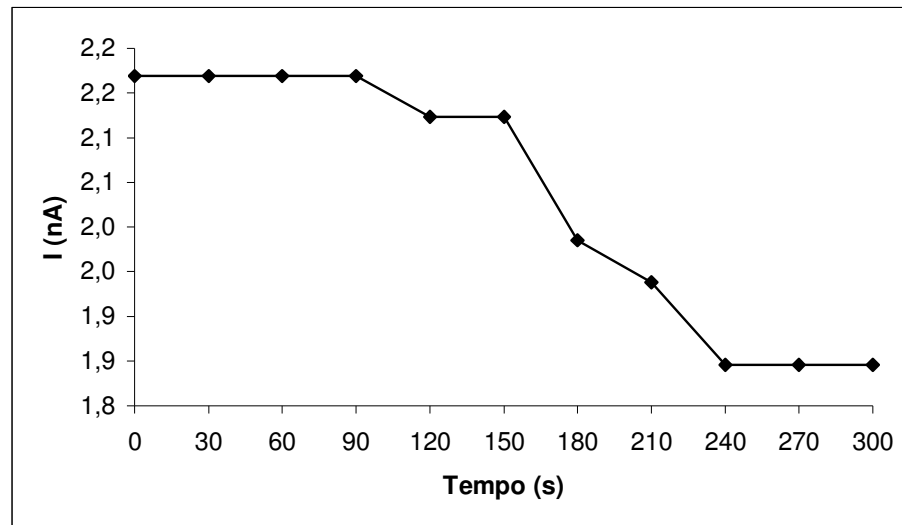


Figura 21- Efeito do tempo de deposição no HMDE para análise de DLX por CSV. Condições voltamétricas: eletrólito suporte tampão Ringer (pH 12, 1% de acetonitrila), purga N<sub>2</sub> 300 segundos, potencial de deposição -1,1 V, velocidade 6,6 mV/s.

#### 4.5.4.2 Especificidade

Os voltamogramas obtidos na análise das soluções de DLX SQR e da amostra simulada de excipientes podem ser visualizados na Figura 22.

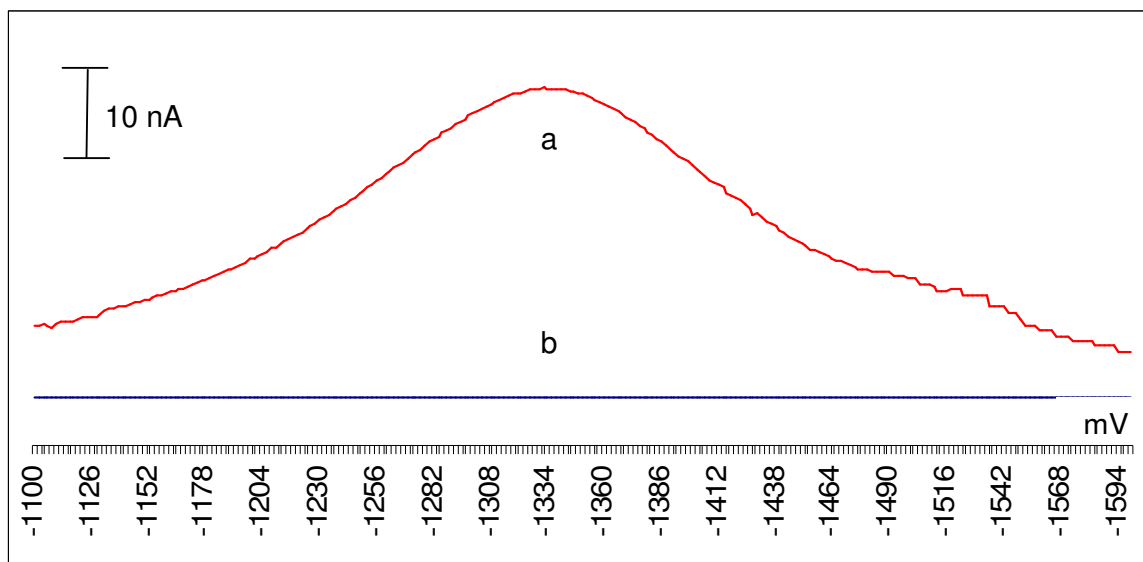


Figura 22- Sinais voltamétricos da solução de DLX SQR (a) e de ASE (b) na concentração de 2 µg/ml. Condições voltamétricas: eletrólito suporte tampão Ringer (pH 12, 1% de acetonitrila), purga N<sub>2</sub> 300 segundos, potencial de deposição -1,1 V, tempo de deposição 15 s, velocidade 6,6 mV/s.

#### 4.5.4.3 Linearidade

Os valores de correntes de picos referentes às concentrações analisadas na curva padrão por CSV estão descritos na Tabela 18.

A Figura 23 demonstra a representação gráfica da curva padrão obtida e também a equação da reta e o coeficiente de correlação ( $r$ ) determinados por regressão linear. A Figura 24 representa o voltamograma obtido para o estudo de linearidade.

A Tabela 19 apresenta os valores encontrados na análise de variância (ANOVA) para avaliação da linearidade do método desenvolvido.

Tabela 18– Correntes de pico para DLX SQR obtidas através de CSV para a construção da curva padrão.

Concentração ( $\mu\text{g/ml}$ )	I (nA)*	Corrente média	DPR
1	11,34	11,29	1,17
	11,14		
	11,39		
2	17,35	17,67	1,55
	17,84		
	17,81		
3	29,57	29,29	1,28
	28,86		
	29,43		
4	41,23	40,94	0,61
	40,84		
	40,76		
5	48,53	48,35	0,33
	48,26		
	48,25		

\* Cada valor é a média de três determinações.  
DPR – desvio padrão relativo

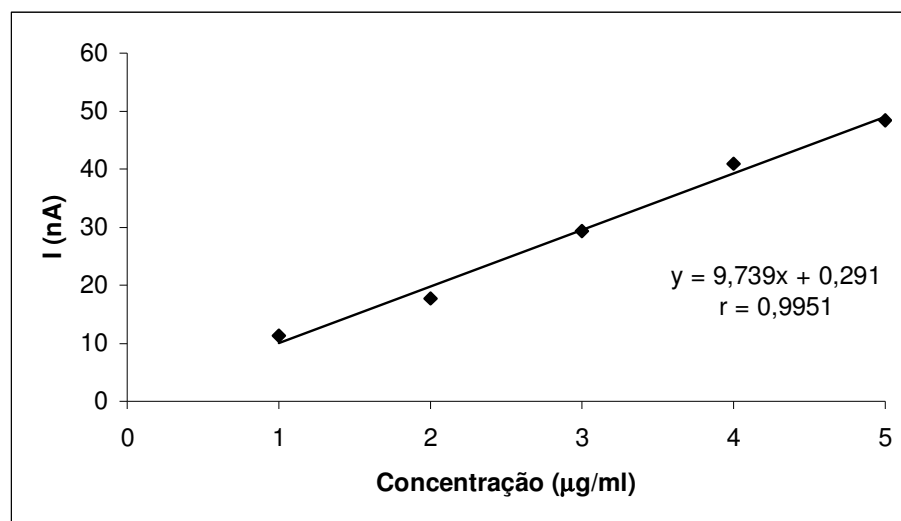


Figura 23 – Representação gráfica da curva padrão de DLX obtida por CSV.

Tabela 19 – ANOVA das correntes determinadas para a obtenção da curva padrão de DLX através de CSV.

Fontes de variação	gl	Soma dos quadrados	Variância	F
ENTRE	4	2873,00	718,4	11130*
- Regressão linear	1	765,0	456,9	2390*
- Desvio da linearidade	3	0,078	0,089	0,54
RESÍDUO	10	0,6457	0,06457	
TOTAL	14	2874,00		

\* significativo para  $p < 0,05$ .

#### 4.5.4.4 Precisão

Os resultados encontrados na avaliação interdia e intradia para determinação de DLX estão indicados na Tabela 20.

Tabela 20 – Avaliação interdia e intradia para determinação de DLX em cápsulas por CSV.

Amostra	Avaliação intradia		
	Dia 1 (%)	Dia 2 (%)	Dia 3 (%)
1	103,88	101,06	100,12
2	99,60	99,49	100,16
3	101,66	99,57	99,98
4	99,84	100,45	99,53
5	102,58	100,60	99,64
6	100,26	101,27	101,11
Média (%)	101,30	100,41	100,09
DPR	1,68	0,74	0,56
Avaliação interdia			
Média(%)	100,60		
DPR	1,17		

#### 4.5.4.5 Exatidão

As percentagens de recuperação obtidas a partir do teste de recuperação da DLX SQR estão apresentadas na Tabela 21.

Tabela 21 – Resultados experimentais referentes ao teste de recuperação por CSV.

	Concentração		Recuperação (%)	Média (%)
	Adicionada (µg/ml)	Recuperada (µg/ml)*		
R <sub>1</sub>	0,5	0,503	100,58	
R <sub>2</sub>	1,0	1,004	100,37	100,45
R <sub>3</sub>	2,0	2,008	100,41	

\* Cada valor representa a média de seis determinações.

#### 4.5.4.6 Avaliação da robustez

Os resultados obtidos na determinação de DLX em cápsulas através de pequenas alterações nas condições voltamétricas otimizadas estão demonstrados na Tabela 22.

Tabela 22 - Avaliação da robustez do método voltamétrico através da determinação de DLX em cápsulas.

Variável	Condição	DLX (%)
Potencial de deposição (E)		
- 1,0 V	pH = 12	100,51
- 1,1 V	T <sub>d</sub> = 15 s	100,10
- 1,2 V		99,09
pH		
11,5	E = -1,1V	99,71
12,0	T <sub>d</sub> = 15 s	100,10
12,5		101,08
Acetonitrila (%)		
0,5	E = -1,1V	100,14
1,0	T <sub>d</sub> = 15 s	100,10
1,5		101,16

Td: tempo de deposição; E: potencial de deposição

#### 4.5.5 Discussão

A voltametria estuda as relações entre a voltagem, a corrente e o tempo, durante a eletrólise numa célula voltamétrica. Assim, nessa técnica, as informações sobre o analito são obtidas por meio da medição da magnitude da corrente elétrica que surge no eletrodo de trabalho ao se aplicar um potencial entre este eletrodo e um eletrodo auxiliar. O parâmetro ajustado é o potencial (E) e o parâmetro medido é a corrente resultante (I). O registro da corrente em função do potencial é denominado voltamograma. A magnitude da corrente obtida pela transferência de elétrons durante um processo de oxi-redução pode ser relacionada com a quantidade de analito presente na interface do eletrodo/solução e conseqüentemente, na célula eletroquímica (VOGEL, 1992).

Com relação ao eletrodo de trabalho, existem diversos tipos, variando-se desde o material empregado na sua construção, até sua morfologia e dimensões. O eletrodo mais empregado em voltametria é o eletrodo de mercúrio de gota pendente (HMDE). Esse apresenta como vantagem o fato de que cada gota nova pode ser facilmente formada e este processo de renovação remove problemas que possam



ser causados por contaminação de uma análise prévia. A Figura 20 demonstra o comportamento voltamétrico da DLX no HMDE na faixa de potenciais de -1,1 a -1,6 V, empregando o tampão Ringer (pH 12) contendo 1% de acetonitrila como eletrólito suporte.

A escolha da técnica voltamétrica a ser utilizada está relacionada com o tipo e a qualidade de informação qualitativa/quantitativa que se quer obter a respeito do analito ou do processo que envolve a interação entre o analito e o eletrodo de trabalho. Existem diversas técnicas voltamétricas: voltametria de pulso normal (NPV), voltametria de pulso diferencial (DPV), voltametria de pulso reverso (RPV), voltametria de onda quadrada (SW), voltametria de corrente alternada (AC) e voltametria cíclica (CV). A escolha de cada uma delas depende do analito e da concentração do mesmo, entre outros fatores.

A voltametria de redissolução catódica (CSV) tem sido empregada em uma grande variedade de compostos orgânicos de interesse químico e farmacêutico devido à forte tendência que essas substâncias possuem de adsorverem na superfície do eletrodo de mercúrio (EL-MAALI, 2004). A CSV é caracterizada por ser realizada em duas etapas diferentes: a etapa da deposição e a etapa da redissolução. A etapa de deposição é feita eletroanaliticamente aplicando-se o potencial de deposição ( $E_d$ ) durante um determinado tempo e com agitação da solução. O tempo de deposição ( $T_d$ ) é escolhido em função da espécie eletroativa durante o qual a espécie de interesse será adsorvida sobre a superfície do eletrodo de trabalho. A Figura 21 demonstra que no tempo 0,0 até 90 segundos a corrente permanece constante, portanto foi empregado o tempo de 15 segundos de deposição. Após o término da etapa de deposição, procede-se a etapa de redissolução, em que, as espécies que foram adsorvidas na superfície do eletrodo são reduzidas gerando um sinal analítico. Esse sinal é a corrente originada no processo de redissolução a qual é usada para a determinação da concentração da espécie (SKOOG, 2007).

A varredura catódica entre -1,1 a -1,6 V demonstrou que a DLX possui um sinal voltamétrico característico no potencial de -1,3 V, aproximadamente (Figura 22). Neste potencial foi possível verificar que não existe sinal voltamétrico dos excipientes contidos no produto farmacêutico. Portanto, poderá ser realizada a

determinação quantitativa de DLX no potencial de -1,3 V sem a interferência dos excipientes, assim demonstrando a especificidade do método.

A linearidade do método foi avaliada através da construção de curva padrão, na faixa de concentração de 1,0 a 5,0 µg/ml. Foram desenvolvidas três curvas, sendo calculadas as correntes médias obtidas para traçar uma curva padrão, conforme Figura 23. Os resultados demonstram uma correlação linear entre as correntes obtidas e a concentração de DLX SQR, apresentando a equação da reta  $y = 9,739x + 0,291$  e coeficiente de correlação ( $r$ ) de 0,9951 determinado através do estudo de regressão linear. A análise da variância (ANOVA) das correntes obtidas pela curva padrão demonstra que existe regressão linear e não há desvio da linearidade, apresentado na Tabela 19. Os resultados obtidos conferem a validade do método desenvolvido em termos de linearidade.

A precisão do método na determinação de DLX em cápsulas foi expressa através da repetibilidade e da precisão intermediária, sendo esta realizada em três dias diferentes. O valor percentual médio encontrado no doseamento das amostras durante os três dias foi de 101,30%, 100,41% e 100,09% do teor declarado de DLX. O valor apresentado de desvio padrão relativo (DPR) máximo na avaliação intradia foi de 1,68, conforme Tabela 20. Este resultado corresponde à repetibilidade do método, onde foram realizadas determinações em uma mesma amostra homogênea em condições idênticas e durante um curto intervalo de tempo de um dia. A precisão intermediária exibe valores percentuais médios de três dias diferentes de análise, indicando os desvios padrões relativos obtidos interdia. A Tabela 20 indica estes valores, onde se verifica um teor médio de 100,60% (DPR= 1,17) observado interdia nas análises das amostras. Os baixos valores de DPR obtidos neste estudo caracterizam o método como preciso.

A exatidão do método proposto foi determinada através do teste de recuperação da DLX SQR, cujos resultados podem ser observados na Tabela 21. O método desenvolvido demonstrou exatidão através dos resultados obtidos, exibindo percentagem de recuperação média de 100,45%.

A robustez do método por CSV foi avaliada por pequenas modificações nas condições voltamétricas. Entretanto, nenhuma mudança significativa foi observada na determinação quantitativa de DLX (Tabela 22).

Com base na avaliação dos resultados obtidos através dos parâmetros analíticos verificados no método voltamétrico para análise de DLX, pode-se afirmar que o método foi validado de maneira satisfatória e, portanto, é adequado para o controle de qualidade deste antidepressivo.

#### 4.6 Análise comparativa dos métodos analíticos

A análise da variância (ANOVA) foi o tratamento estatístico aplicado para a comparação entre os resultados obtidos pelos métodos analíticos validados neste trabalho. Para este teste foram utilizados os valores alcançados na determinação de DLX em cápsulas através de espectrofotometria na região do UV, CLAE e CSV.

##### 4.6.1 Resultados

A Tabela 23 apresenta os resultados obtidos na determinação quantitativa de DLX em cápsulas pelos métodos analíticos validados neste trabalho.

O tratamento estatístico dos valores obtidos pelos diferentes métodos quantitativos propostos neste trabalho está demonstrado na Tabela 24.

Tabela 23 – Resultados obtidos na determinação de DLX em cápsulas por espectrofotometria na região do UV, CLAE e CSV.

	<b>Espectrofotometria UV</b>	<b>CLAE</b>	<b>CSV</b>
Teor (%)*	100,43	100,44	100,60
DPR	0,52	0,85	1,17

\* Cada valor representa a média de dezoito determinações.

Tabela 24 – ANOVA dos valores obtidos na determinação de DLX em cápsulas por espectrofotometria na região do UV, CLAE e CSV.

Fontes de Variação	GL	Soma de Quadrados	Variância	F
ENTRE	2	4,325	2,163	2,055
RESÍDUO	51	53,67	1,052	
TOTAL	53	58,00		

p = 0,1386

#### 4.6.2 Discussão

O resultado da ANOVA demonstrou que não há diferença significativa entre os métodos desenvolvidos, em um nível de significância de 5%, conforme apresentado na Tabela 24. Estes resultados comprovam que os métodos desenvolvidos são intercambiáveis, sendo adequados para a determinação quantitativa de DLX no produto farmacêutico.

A escolha da espectrofotometria na região do UV, CLAE ou CSV para ser aplicada como um método de controle de qualidade na determinação quantitativa de DLX em cápsulas deverá ser em função, principalmente, das vantagens que cada técnica proporciona. Assim sendo, a espectrofotometria na região do UV é uma técnica simples e, no entanto, se a amostra apresentar algum produto de degradação da DLX esta técnica não seria capaz de discriminá-los devido a falta de seletividade deste método. Já, o método cromatográfico foi desenvolvido como indicativo da estabilidade da DLX, sendo possível determinar quantitativamente o fármaco, no produto farmacêutico, na presença dos seus produtos de degradação gerados em diferentes condições (ácida, alcalina, oxidativa e fotolítica). Por fim, se salienta as vantagens que a técnica voltamétrica pode proporcionar como um método de controle de qualidade na determinação quantitativa de DLX em cápsulas, tais como: rapidez na análise, consumo reduzido de solventes e geração de resíduos.

#### 4.7 Conclusões

- A determinação de DLX em cápsulas por espectrofotometria na região do UV empregando o comprimento de onda de 290 nm e acetonitrila como solvente demonstrou ser específica, linear, precisa e exata;
- A CLAE, nas condições experimentais estabelecidas, demonstrou especificidade, linearidade, precisão, exatidão e robustez para a determinação quantitativa de DLX na sua forma farmacêutica;
- O método desenvolvido por CSV foi validado adequadamente, demonstrando ser específico, linear, preciso, exato e robusto para análise quantitativa de DLX em cápsulas;
- Análise comparativa entre os métodos propostos (espectrofotometria na região do UV, CLAE e CSV) para a determinação quantitativa de DLX demonstrou não haver diferença estatisticamente significativa entre eles.



---

## **5. ESTUDO DA ESTABILIDADE**

---





## 5.1 Introdução

A degradação compreende uma ou mais reações químicas, cuja velocidade pode ser calculada através de equações cinéticas. O estudo da cinética de degradação é fundamental para o estudo da estabilidade de preparações farmacêuticas. Apresenta como objetivos obter, experimentalmente, os dados cinéticos e correlacioná-los, por equações matemáticas, além de propor mecanismos para as reações de degradação e estabelecer condições para acelerar ou diminuir a velocidade das reações (NUDELMAN, 1975).

As velocidades de reação podem classificar-se como de ordem zero, primeira ordem ou segunda ordem, de acordo com os expoentes que afetam as concentrações dos reagentes. A ordem da reação é uma grandeza experimental, determinada a partir da lei de velocidade da reação química, verificando-se a concentração de amostras retiradas no decorrer do tempo (NUDELMAN, 1975).

A reação de ordem zero ocorre quando a velocidade de reação é independente da concentração da substância ativa. Nesse caso, um gráfico de concentração ( $C$ ) em função do tempo ( $t$ ) dá origem a uma reta, cuja inclinação corresponde à constante de velocidade da reação ( $k$ ). Quando a velocidade da reação depende da concentração do reagente, a reação segue uma cinética de primeira ordem, obtendo-se uma reta com a representação do logaritmo da concentração ( $\log C$ ) em função do tempo ( $t$ ). A cinética de segunda ordem ocorre quando a velocidade de reação depende da concentração de dois reagentes, ou a segunda potência da concentração de um deles. Para esse tipo de reação, a representação do inverso da concentração ( $1/C$ ) em função do tempo ( $t$ ) fornece uma reta (NUDELMAN, 1975; LACHMAN et al., 2001).

O estudo preliminar da estabilidade da DLX foi realizado em condições hidrolíticas (ácida ou básica), oxidativa e fotolítica empregando a SQR, conforme apresentado no capítulo 4. Considerando a instabilidade da DLX frente à condição ácida e também frente à luz, realizou-se a cinética de degradação nestas duas

condições em soluções do produto farmacêutico para definir a ordem de reação e a velocidade da reação de degradação da DLX. Além disso, neste capítulo também foram descritos o isolamento e a identificação do produto de degradação majoritário formado em condição ácida.

## **5.2 Objetivos específicos**

- Realizar estudo da cinética de degradação da DLX frente à hidrólise ácida e à luz UVC, empregando a solução do produto farmacêutico;
- Isolar o produto de degradação majoritário gerado na hidrólise ácida da DLX (PDA-14) através de cromatografia em camada delgada preparativa;
- Identificar e caracterizar o PDA-14 através de RMN-<sup>1</sup>H, RMN-<sup>13</sup>C, COSY, CLAE e CCD.

## **5.3 Estudo da cinética de degradação**

### **5.3.1 Cinética de degradação ácida**

#### **5.3.1.1 Materiais e métodos**

O estudo da cinética de degradação ácida foi conduzido em solução do conteúdo das cápsulas de DLX através do emprego da solução de HCl 0,1 M. Para realização da determinação quantitativa foram utilizadas as condições cromatográficas descritas na Tabela 4, usando o método validado e indicativo de estabilidade proposto no capítulo 4.

#### **5.3.1.2 Preparação da solução de duloxetine SQR**

Pesou-se, exatamente, o equivalente a 10 mg de DLX SQR, transferiu-se quantitativamente para balão volumétrico de 100 ml com auxílio de um pequeno volume de acetonitrila. O balão volumétrico foi colocado em banho de ultra-som por 15 minutos e o volume completado com acetonitrila. Foi transferida alíquota de 1,0

ml dessa solução para balão volumétrico de 10 ml, e o volume foi completado com a fase móvel. A concentração final obtida da solução foi de 10 µg/ml de DLX SQR.

### 5.3.1.3 Preparação da solução amostra de DLX

A partir do peso médio de 20 cápsulas de DLX, foi pesado, exatamente, o equivalente a 25 mg de DLX da mistura dos microgrânulos, sendo triturado o material diretamente no recipiente de pesagem. Posteriormente, transferiu-se o material, quantitativamente, para balão volumétrico de 100 ml e procedeu-se a diluição com acetonitrila. O balão volumétrico foi colocado em banho de ultra-som por 15 minutos e, posteriormente, o volume foi completado com mesmo solvente, obtendo-se uma suspensão de DLX de 250 µg/ml. A suspensão foi filtrada e uma alíquota de 20,0 ml dessa solução foi transferida para balão volumétrico de 50 ml, completando-se o volume com solução de HCl 0,1 M, (100 µg/ml). Esta solução foi dividida, posteriormente, em duas alíquotas: a primeira foi submetida à hidrólise ácida em tempo zero, empregando uma solução de NaOH 0,1 M para neutralização e a segunda alíquota foi colocada em banho-maria em temperatura de 70 °C, sendo retirada alíquotas após 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos.

Para obter uma solução de DLX 10 µg/ml, transferiu-se 1,0 ml da solução de DLX 100 µg/ml, nos intervalos de tempo determinados anteriormente e também 1,0 ml de uma solução de NaOH 0,1 M. A alíquota foi transferida para balão volumétrico de 10 ml e completou-se o volume com a fase móvel.

## 5.3.2 Estudo da cinética de fotodegradação

### 5.3.2.1 Materiais e métodos

A avaliação da cinética de fotodegradação foi desenvolvida em câmara de vidro espelhada internamente (10 x 17 x 17 cm) contendo lâmpada emissora da radiação UVC (254 nm) (Ecolume ZW<sup>®</sup>, 254 nm, 15 W) e com monitoramento de temperatura interna durante o experimento. A verificação da interferência do calor, dentro da câmara de vidro, foi realizada através da colocação de uma cubeta contendo a amostra nas mesmas condições, porém protegida com papel laminado.

Para realização da determinação quantitativa foram utilizadas as condições cromatográficas descritas na Tabela 4, usando o método validado e indicativo de estabilidade proposto no capítulo 4.

### 5.3.2.2 Preparação da solução de duloxetina SQR

A preparação da solução de DLX SQR utilizada nesse estudo foi preparada de acordo com o descrito no item 5.2.1.2.

### 5.3.2.3 Preparação da solução amostra de DLX

Para realização do estudo de fotodegradação, a solução de amostra de DLX (250 µg/ml) foi preparada conforme item 5.2.1.3. Alíquotas foram acondicionadas em cubetas descartáveis (Ultra Vette<sup>®</sup>) e colocadas inclinadas a uma distância de 10 cm da lâmpada emissora de radiação ultravioleta. Os tempos avaliados de exposição das soluções foram zero, 2, 4, 6, 8, 10 e 12 minutos. Posteriormente, para obter uma solução de DLX 10 µg/ml, transferiu-se 1,0 ml da solução de DLX 250 µg/ml, nos intervalos de tempo determinados anteriormente, para balão volumétrico de 25 ml e completou-se o volume com a fase móvel.

### 5.3.3 Cálculos cinéticos

A ordem da reação para a cinética de degradação ácida e da fotodegradação da DLX foi determinada representando a concentração residual do fármaco em função do tempo (reação de ordem zero),  $\ln$  da concentração em função do tempo (reação de primeira ordem) e inverso da concentração em função do tempo (reação de segunda ordem). Os coeficientes de regressão linear ( $r$ ) foram obtidos, sendo que o coeficiente mais próximo da unidade indica a ordem da reação. Os parâmetros cinéticos da constante de velocidade de reação ( $k$ ), período de vida útil 90% ( $t_{90\%}$ ), tempo de meia-vida ( $t_{1/2}$ ) foram obtidos.

O modelo cinético pode ser representado pelos seguintes esquemas:

$$C = C_0 - kt \text{ (reação de ordem zero)}$$

Esquema 4

$$\ln C = \ln C_0 - kt \text{ (reação de primeira ordem)}$$

Esquema 5

$$1/C = 1/C_0 + kt \text{ (reação de segunda ordem)}$$

Esquema 6

Onde:

 $C_0$ = concentração de DLX no tempo zero; $C$ = concentração de DLX após a reação no tempo  $t$ ; $k$ = constante de reação.

### 5.3.4 Resultados

A Tabela 25 apresenta os valores de concentrações de DLX, logaritmo natural da concentração ( $\ln C$ ) e o inverso da concentração ( $1/C$ ), utilizados para construção dos gráficos e definição da ordem da reação no estudo de degradação da cinética ácida.

Tabela 25- Estudo da cinética de degradação ácida da DLX.

Tempo (min)	Concentração de DLX ( $\mu\text{g/ml}$ )	$\ln C$	$1/C$
0	10,25	2,327	0,098
5	9,36	2,236	0,107
10	8,51	2,141	0,118
15	7,64	2,034	0,131
20	6,71	1,904	0,149
25	5,70	1,741	0,175
30	4,99	1,608	0,200

As Figuras 24, 25 e 26 apresentam as representações gráficas das cinéticas de degradação ácida de ordem zero, primeira ordem e segunda ordem, respectivamente.

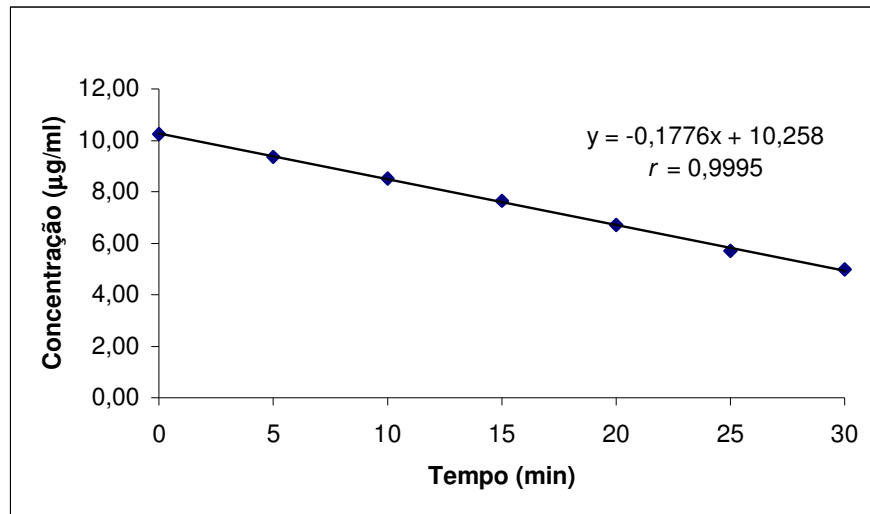


Figura 24- Representação gráfica da cinética de ordem zero para degradação ácida de DLX.

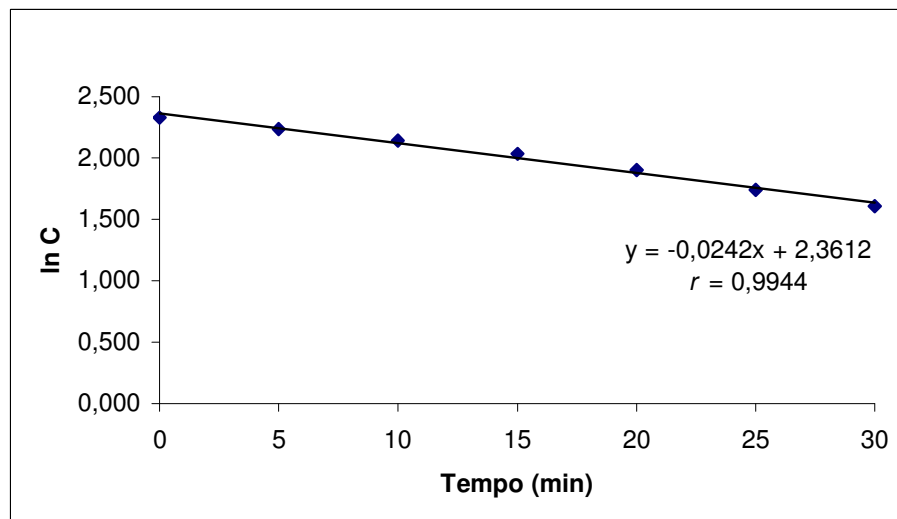


Figura 25- Representação gráfica da cinética de primeira ordem para degradação ácida de DLX.

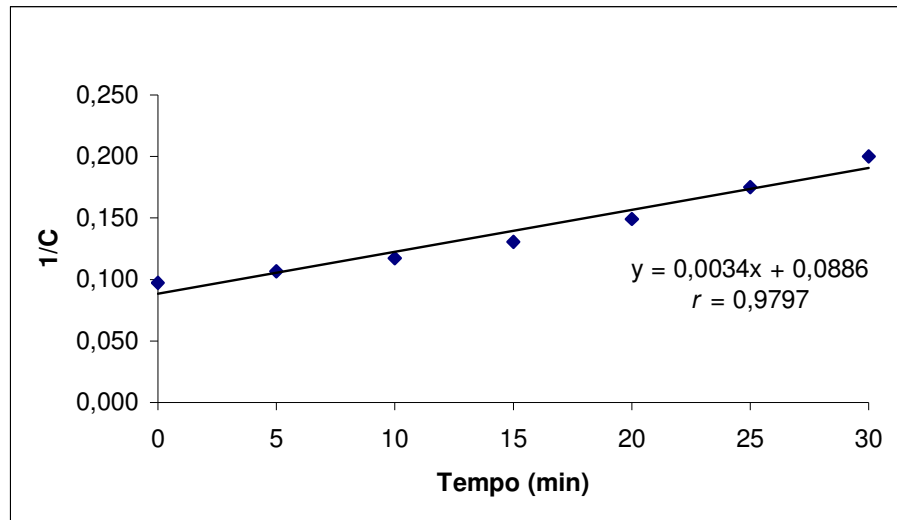


Figura 26- Representação gráfica da cinética de segunda ordem para degradação ácida de DLX.

De acordo com os valores encontrados dos coeficientes de correlação, verificou-se que a degradação da amostra das cápsulas de DLX em condição ácida obedece a uma cinética de ordem zero.

A partir da definição da ordem da reação, calculou-se a constante da velocidade de degradação ( $k$ ), valor de  $t_{90\%}$  e  $t_{1/2}$ .

Os valores de  $k$  em cada tempo foram calculados a partir da equação de ordem zero descrita no esquema 4. O valor médio foi obtido a partir da média aritmética dos valores de  $k$  para cada tempo de exposição ao ácido. O valor de  $k$  médio foi de  $0,1766 \mu\text{g ml}^{-1}\text{min}^{-1}$ .

Os valores de  $t_{90\%}$  e  $t_{1/2}$  foram calculados a partir dos seguintes esquemas:

$$t_{90\%} = 0,1C_0/k$$

Esquema 7

$$t_{1/2} = C_0/2k$$

Esquema 8

O valor de  $t_{90\%}$  foi de 5,8019 minutos, ou seja, tempo na qual 90% da concentração do fármaco se encontra inalterada. O valor de  $t_{1/2}$  foi de 29,0096

minutos, ou seja, tempo necessário para a concentração do fármaco decair a 50% da concentração inicial.

Os cromatogramas obtidos no estudo da cinética de degradação ácida estão apresentados na Figura 27.

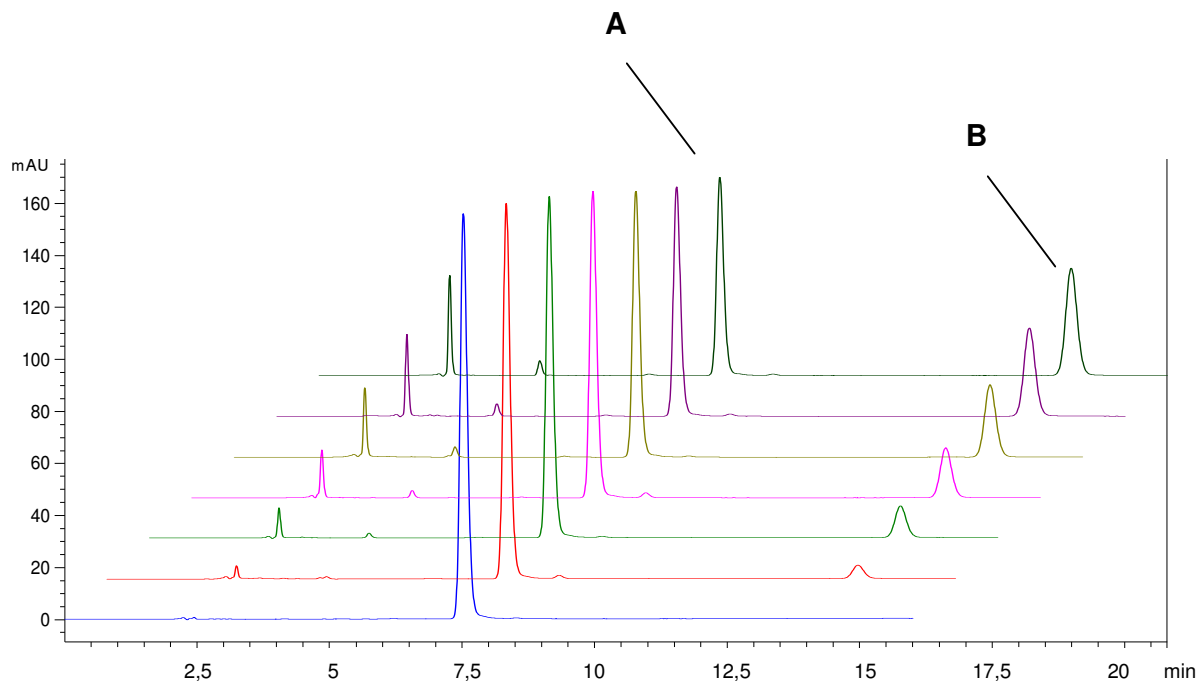


Figura 27 – Estudo da cinética de degradação ácida das soluções de DLX (10  $\mu\text{g/ml}$ ) nos tempos: zero, 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos, onde (A) DLX e (B) produto de degradação majoritário. Condições cromatográficas: coluna ACE<sup>®</sup> C18 (250 x 4,6 mm, 5 $\mu\text{m}$ ); fase móvel tampão fosfato de potássio monobásico 50 mM (pH 6,0, acrescido de 0,3% trietilamina) e acetonitrila (60:40, v/v); fluxo 1,0 ml/min; detecção UV  $\lambda$  230 nm; temperatura de análise 25 °C.

A Tabela 26 apresenta os valores de concentrações de DLX, logaritmo natural da concentração ( $\ln C$ ) e o inverso da concentração ( $1/C$ ), utilizados para construção dos gráficos e definição da ordem da reação no estudo da fotodegradação da DLX.



Tabela 26- Estudo da cinética de fotodegradação da DLX.

Tempo (min)	Concentração de DLX ( $\mu\text{g/ml}$ )	In C	1/C
0	10,31	2,333	0,997
2	8,65	2,158	0,116
4	7,47	2,010	0,134
6	6,07	1,803	0,165
8	5,55	1,714	0,180
10	4,43	1,488	0,226
12	4,32	1,463	0,231

As Figuras 28, 29 e 30 apresentam as representações gráficas das cinéticas de fotodegradação de ordem zero, primeira ordem e segunda ordem, respectivamente.

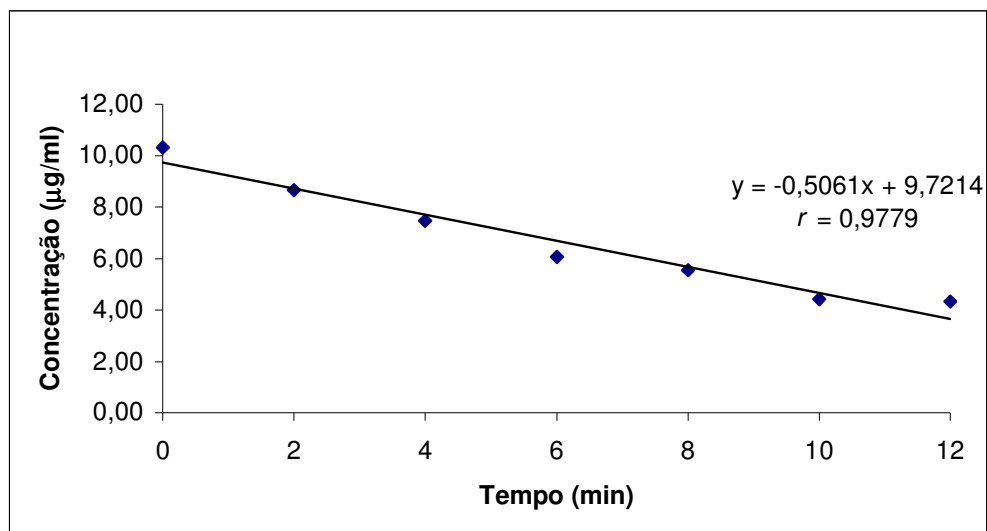


Figura 28- Representação gráfica da cinética de ordem zero para fotodegradação de DLX.

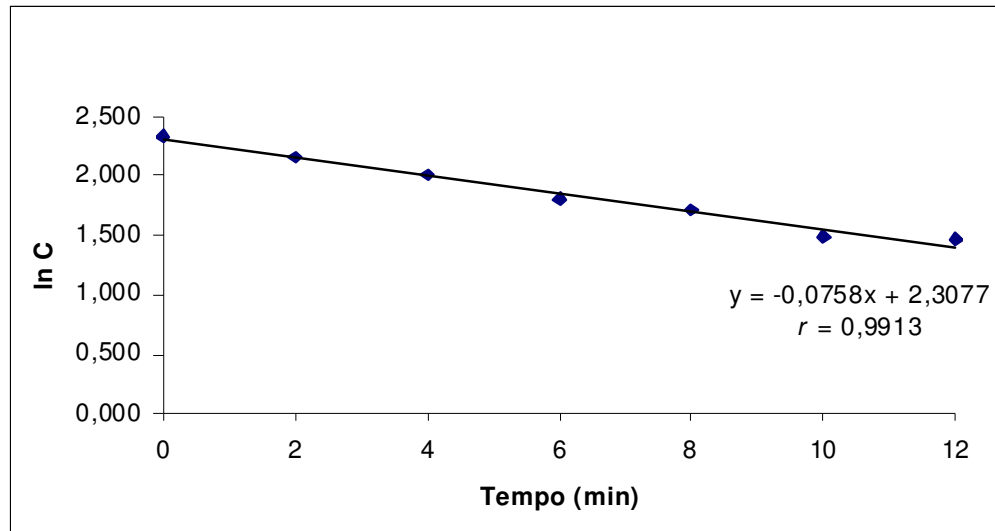


Figura 29- Representação gráfica da cinética de primeira ordem para fotodegradação de DLX.

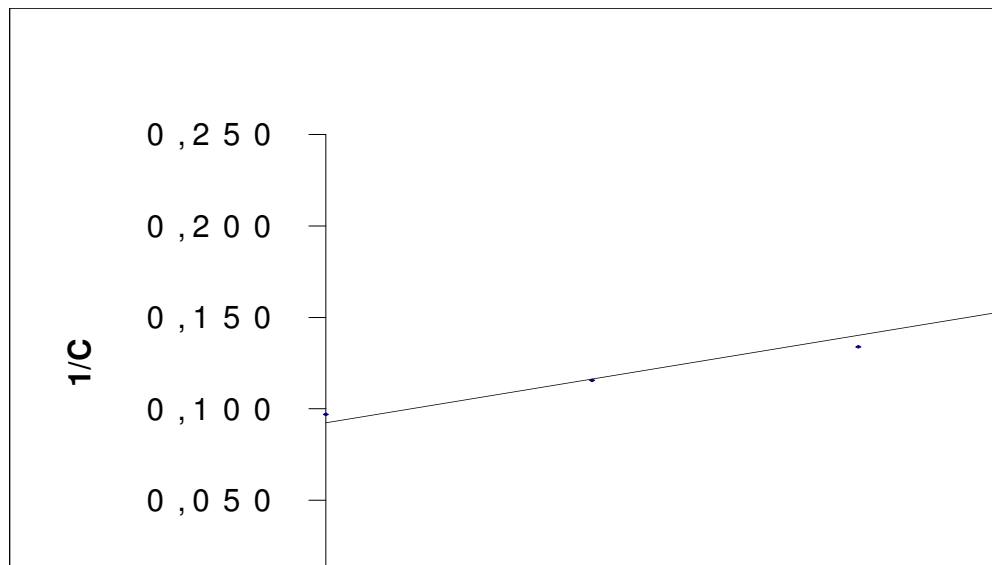


Figura 30- Representação gráfica da cinética de segunda ordem para fotodegradação de DLX.

De acordo com os valores encontrados dos coeficientes de correlação, verificou-se que a degradação da amostra das cápsulas de DLX sob exposição a luz UVC obedece a uma cinética de primeira ordem.

A partir da definição da ordem da reação, calculou-se a constante da velocidade de degradação ( $k$ ), valor de  $t_{90\%}$  e  $t_{1/2}$ .

Os valores de  $k$  em cada tempo foram calculados a partir da equação de primeira ordem descrita no esquema 4. O valor médio foi obtido a partir da média aritmética dos valores de  $k$  para cada tempo de exposição frente a luz UVC. O valor de  $k$  médio foi de  $0,0819 \text{ min}^{-1}$ .

Os valores de  $t_{90\%}$  e  $t_{1/2}$  foram calculados a partir dos esquemas 9 e 10.

$$t_{90\%} = 0,106/k$$

Esquema 9

$$t_{1/2} = \ln 2/k$$

Esquema 10

O valor de  $t_{90\%}$  foi de 1,2943 minutos e o valor de  $t_{1/2}$  foi de 8,4636 minutos.

Os cromatogramas obtidos no estudo da cinética de fotodegradação estão apresentados na Figura 31.

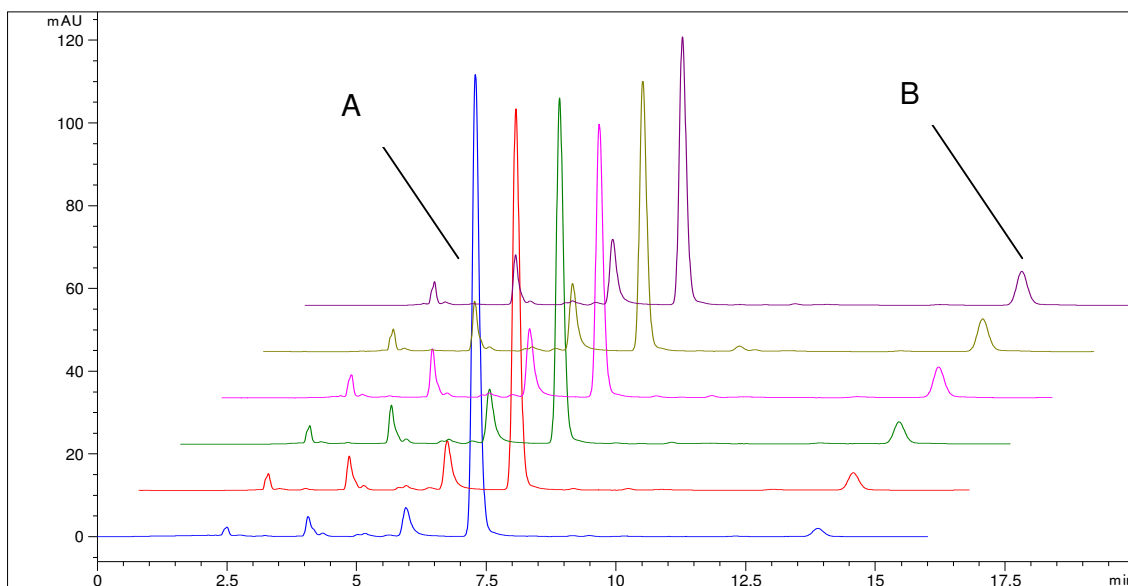


Figura 31 – Estudo da cinética de fotodegradação das soluções de DLX ( $10 \mu\text{g/ml}$ ) nos tempos: zero, 2, 4, 6, 8, 10 e 12 minutos, onde (A) DLX e (B) produto de degradação majoritário. Condições cromatográficas: coluna ACE<sup>®</sup> C18 (250 x 4,6 mm,  $5\mu\text{m}$ ); fase móvel tampão fosfato de potássio monobásico 50 mM (pH 6,0, acrescido de 0,3% trietilamina) e acetonitrila (60:40, v/v); fluxo 1,0 ml/min; detecção UV  $\lambda$  230 nm; temperatura de análise  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ .

### 5.3.5 Discussão

No estudo de cinética de degradação foi empregado o método validado e indicativo da estabilidade apresentado no capítulo 4, já que esse permitiu realizar a determinação quantitativa de DLX frente aos produtos de degradação formados nas condições ácida e fotolítica conduzidas neste estudo. A resolução entre os picos dos produtos de degradação gerados e o pico do fármaco foi adequada (Figuras 27 e 31). Além disso, a pureza do pico de DLX não demonstrou interferência dos produtos de degradação formados para a determinação quantitativa deste fármaco.

Na condição ácida a avaliação dos resultados obtidos através das Figuras 24, 25 e 26 permitiu determinar o melhor coeficiente de correlação ( $r= 0,9995$ ), sugerindo que a degradação da amostra obedece a uma cinética de ordem zero nas condições utilizadas neste estudo, ou seja, a velocidade de decomposição do fármaco independe da concentração dos reativos (LACHMAN et al., 2001). Neste tipo de reação o fator limitante pode ser, por exemplo, a solubilidade do fármaco no meio ácido. Portanto, somente a quantidade do fármaco que se encontra em solução se degrada. À medida que o fármaco é consumido na reação de degradação, a sua concentração na solução reduz progressivamente e o restante se dissolve até que todo o fármaco tenha reagido. Portanto, a reação de degradação não depende da concentração total do fármaco, mas somente da fração que se encontra em solução.

A avaliação dos resultados através das Figuras 28, 29 e 30 permitiu determinar o melhor coeficiente de correlação ( $r= 0,9913$ ), sugerindo que a degradação da amostra segue uma cinética de primeira ordem nas condições de fotodegradação utilizadas neste estudo, ou seja, a velocidade de decomposição do fármaco é diretamente proporcional a concentração de um dos reagentes (LACHMAN et al., 2001). A temperatura interna da câmara de vidro manteve-se estável e a análise da solução amostra protegida com papel laminado mostrou-se também estável durante o período de tempo do estudo, indicando que a temperatura não influenciou na degradação do fármaco e que esta ocorreu apenas pela exposição a radiação UV.

Os estudos de cinética de degradação indicaram que, sob exposição à luz UV, a DLX degrada rapidamente, sendo a constante de velocidade de degradação

(*k*) média de  $0,0819 \text{ min}^{-1}$ ,  $t_{90\%}$  de 1,2943 minutos e  $t_{1/2}$  de 8,4636 minutos. Na condição ácida, o valor de *k* médio foi de  $0,1766 \mu\text{g ml}^{-1}\text{min}^{-1}$ ,  $t_{90\%}$  de 5,8019 minutos e  $t_{1/2}$  de 29,0096 minutos.

As análises dos cromatogramas obtidos demonstraram a labilidade da DLX em solução frente à condição ácida e fotolítica realizadas neste estudo cinético (Figuras 27 e 31). Além disso, foi possível visualizar a formação de um produto de degradação majoritário com tempo de retenção aproximado de 14 minutos, em ambas as condições. O produto farmacêutico contendo a DLX é comercializado na apresentação de cápsulas contendo microgrânulos com revestimento entérico, o que demonstra a preocupação da indústria farmacêutica Elli Lilly na proteção do fármaco frente à luz e também na exposição deste ao meio ácido. Portanto, realizou-se a escolha da condição ácida para prosseguir com os estudos de estabilidade, já que é possível verificar a rápida e elevada formação do produto de degradação majoritário (PDA-14, Figura 27), diferentemente do que é observado na condição de fotodegradação (Figura 31).

#### **5.4 Isolamento do produto de degradação majoritário ácido (PDA-14)**

##### **5.4.1 Preparação da amostra de DLX**

A suspensão de amostra de DLX (1 mg/ml) foi preparada em acetonitrila. Posteriormente, transferiu-se uma alíquota de 25,0 ml dessa suspensão para balão volumétrico de 50 ml e completou-se o volume com HCl 0,1 M, obtendo uma solução de DLX 500  $\mu\text{g/ml}$ . A solução foi colocada em banho-maria em temperatura de 70 °C por 1 hora. Após este período a solução foi neutralizada com uma quantidade adequada da solução de NaOH 0,1 M e concentrada em evaporador rotatório até a redução de 47% do volume inicial, aproximadamente.

##### **5.4.2 Cromatografia em camada delgada preparativa**

Foram preparadas no laboratório placas de sílica gel 60 GF<sub>254</sub> (Merck), com espessura de 0,5 mm e dimensão 20 x 20 cm. O sistema eluente foi constituído de clorofórmio e metanol (80:20, v/v).

A solução da amostra degradada em condição ácida foi posteriormente concentrada em evaporador rotatório e aplicada nas placas. Estas foram transferidas para cubas previamente saturadas com o sistema eluente proposto. As manchas foram visualizadas através da luz UVC (254 nm), sendo posteriormente marcadas e raspadas com auxílio de espátula. O material foi extraído da sílica com metanol (Merck) e filtrado a vácuo, através de vidro sinterizado. A solução resultante foi concentrada em evaporador rotatório até a secura e mantida em dessecador até ser realizada a verificação da pureza do produto de degradação isolado empregando o método de CLAE desenvolvido neste trabalho e descrito no item 4.4. Após ser constatada a pureza do produto de degradação isolado de diversas placas, estas frações foram reunidas para elucidação estrutural do PDA-14.

### 5.4.3 Resultados

O cromatograma obtido após a purificação do PDA-14 por CCD preparativa encontra-se na Figura 32.

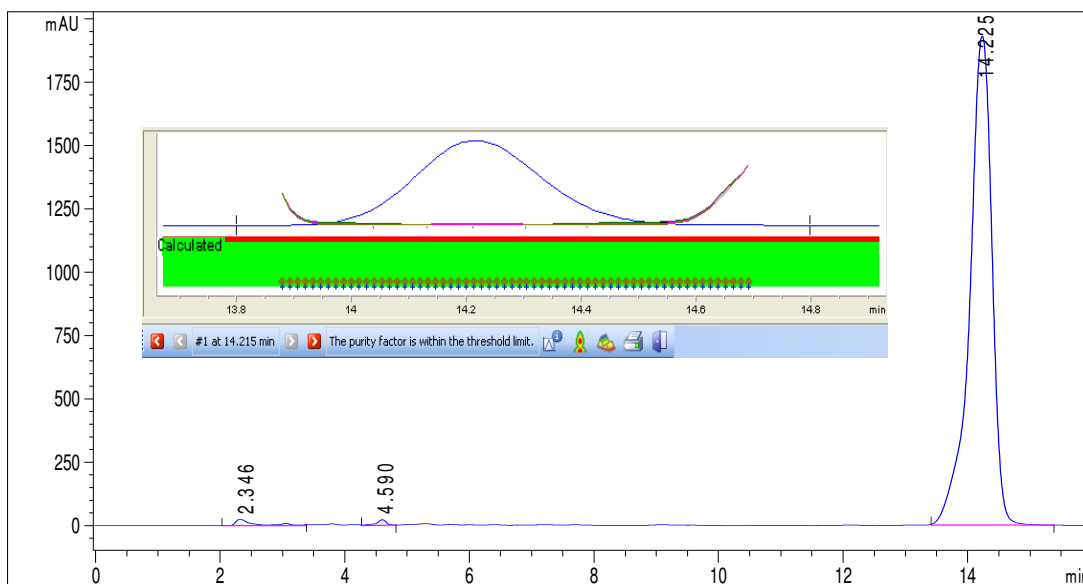


Figura 32- Cromatograma do produto de degradação ácida (PDA-14) isolado em CCD preparativa e sua respectiva curva de pureza do pico. Condições cromatográficas: coluna ACE<sup>®</sup> 5 C18 (250 mm x 4,0 mm, 5 $\mu$ m); fase móvel tampão fosfato de potássio monobásico 50 mM (pH 6,0; contendo 0,3% de trietilamnia) e acetonitrila (60:40, v/v); fluxo 1,0 ml/min; detecção UV  $\lambda$  230 nm; temperatura de análise 25 °C.

#### 5.4.4 Discussão

As condições utilizadas para realização da cromatografia em camada delgada preparativa foram estabelecidas após testes preliminares, os quais incluíram diferentes sistemas eluentes. Primeiramente foi testado o sistema eluente constituído de acetato de etila, metanol e hidróxido de amônio (85:10:5 v/v/v). Neste sistema foi verificado que o PDA-14 apresentou um valor de  $R_f$  elevado e na avaliação através do CLAE se mostrou muito impuro. Portanto, o uso de clorofórmio e metanol (80:20, v/v) mostrou ser mais adequado para o isolamento do PDA-14.

A purificação do produto de degradação foi verificada por CLAE. Através dos cromatograma obtido foi possível observar que o PDA-14 se encontra puro (Figura 32), não havendo outros picos referentes a impurezas. O rendimento obtido na etapa de isolamento do PDA-14 de DLX foi de 15 mg, aproximadamente.

A molécula de DLX apresenta em sua estrutura um oxigênio (Figura 33.1), sendo este protonado sob condições ácidas e proporcionando a geração de um produto intermediário (Figura 33.2). Posteriormente, ocorre a cissão da molécula original formando um outro produto intermediário (Figura 33.3). Além disso, também ocorre a formação do 1-naftol (Figura 33.4) e este pode ser o caminho mais favorável da hidrólise ácida da DLX. Isto se deve à elevada estabilidade do carbocátion formado, (vizinho do anel aromático), quando o 1-naftol deixa a molécula DLX (Figura 33.3). Esta estrutura é mais estável do que o produto intermediário formado inicialmente (Figura 33.2) devido à localização da carga positiva num átomo menos eletronegativo (carbono). Subsequentemente, o produto intermediário (Figura 33.3) reage para formar novas espécies e o 1-naftol (Figura 33.4) é obtido como um produto de degradação estável, permitindo uma análise direta por RMN-<sup>1</sup>H e de RMN-<sup>13</sup>C.

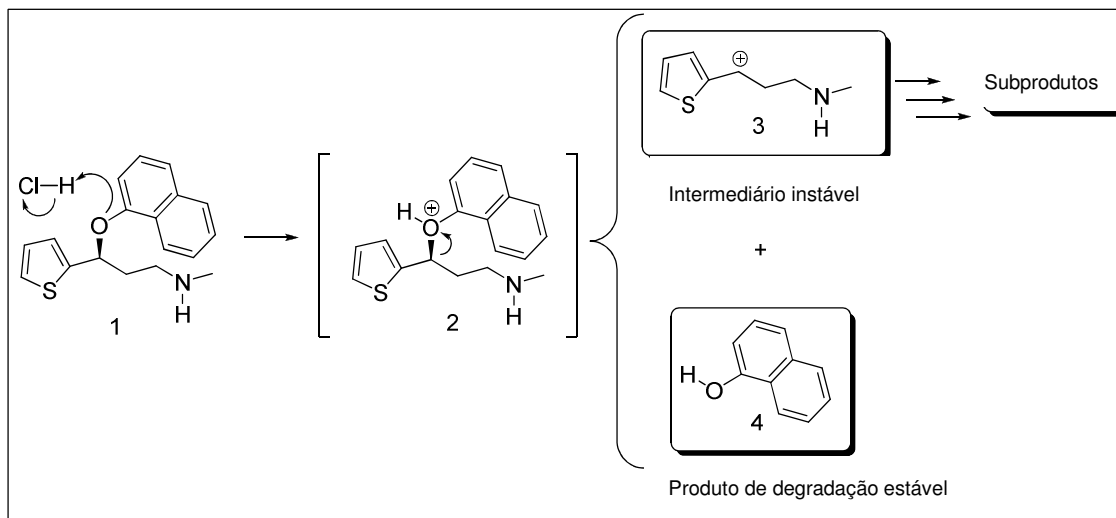


Figura 33- Caminho de degradação da molécula de DLX.

## 5.5 Identificação do PDA-14

### 5.5.1 Materiais e métodos

#### 5.5.1.1 Ressonância magnética nuclear

A elucidação estrutural do PDA-14 foi realizada através da análise por RMN-<sup>1</sup>H, RMN-<sup>13</sup>C e bidimensional, COSY. As análises foram realizadas em espectrômetro BRUKER (DPX400), no Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear, Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). O PDA-14 foi solubilizado em clorofórmio deuterado para obtenção dos espectros.

#### 5.5.1.2 Cromatografia líquida de alta eficiência

O equipamento e as condições de análise foram descritos previamente no item 3.5.3.1.

As amostras de 1-naftol e 2-naftol foram preparadas com acetonitrila e colocadas em banho de ultra-som por 15 minutos. Posteriormente, as soluções foram diluídas com a fase móvel para uma concentração final de 10 µg/ml. Uma



pequena quantidade de PDA-14 foi solubilizada em acetonitrila, realizando a filtração em membrana de *nylon* e precedendo a injeção das amostras no equipamento.

Foi realizada uma comparação entre o tempo de retenção e o espectro obtido em detector de arranjo de fotiodo nas soluções contendo PDA-14, 1-naftol e 2-naftol.

### 5.5.1.3 Cromatografia em camada delgada

Para análise por cromatografia em camada delgada foram utilizadas DLX SQR, PDA-14 e 1-naftol.

A migração cromatográfica foi realizada em cromatoplasas aluminizadas de gel-sílica 60 F<sub>254</sub> (Merck) com 12 cm de comprimento, 5 cm de largura e 0,25 mm de espessura de camada absorvente. O sistema eluente foi constituído de clorofórmio e metanol (80:20, v/v). A identificação foi realizada através da visualização das manchas obtidas sob a luz de UV a 254 nm.

Foram preparadas, isoladamente, soluções em acetonitrila contendo DLX SQR e 1-naftol na concentração final de 500 µg/ml. As soluções foram colocadas em banho de ultra-som por 15 minutos. Uma pequena quantidade da solução amostra de DLX, submetida ao HCl 0,1 M a 70 °C por 1 hora, foi aplicada diretamente na cromatoplasca.

### 5.5.2 Resultados

O espectro de RMN-<sup>1</sup>H do PDA-14 encontra-se apresentado na Figura 34. Os deslocamentos químicos ( $\delta$ ), multiplicidade, constante de acoplamento ( $J$ ) e o número de hidrogênios dos sinais observados no espectro estão apresentados na Tabela 27.

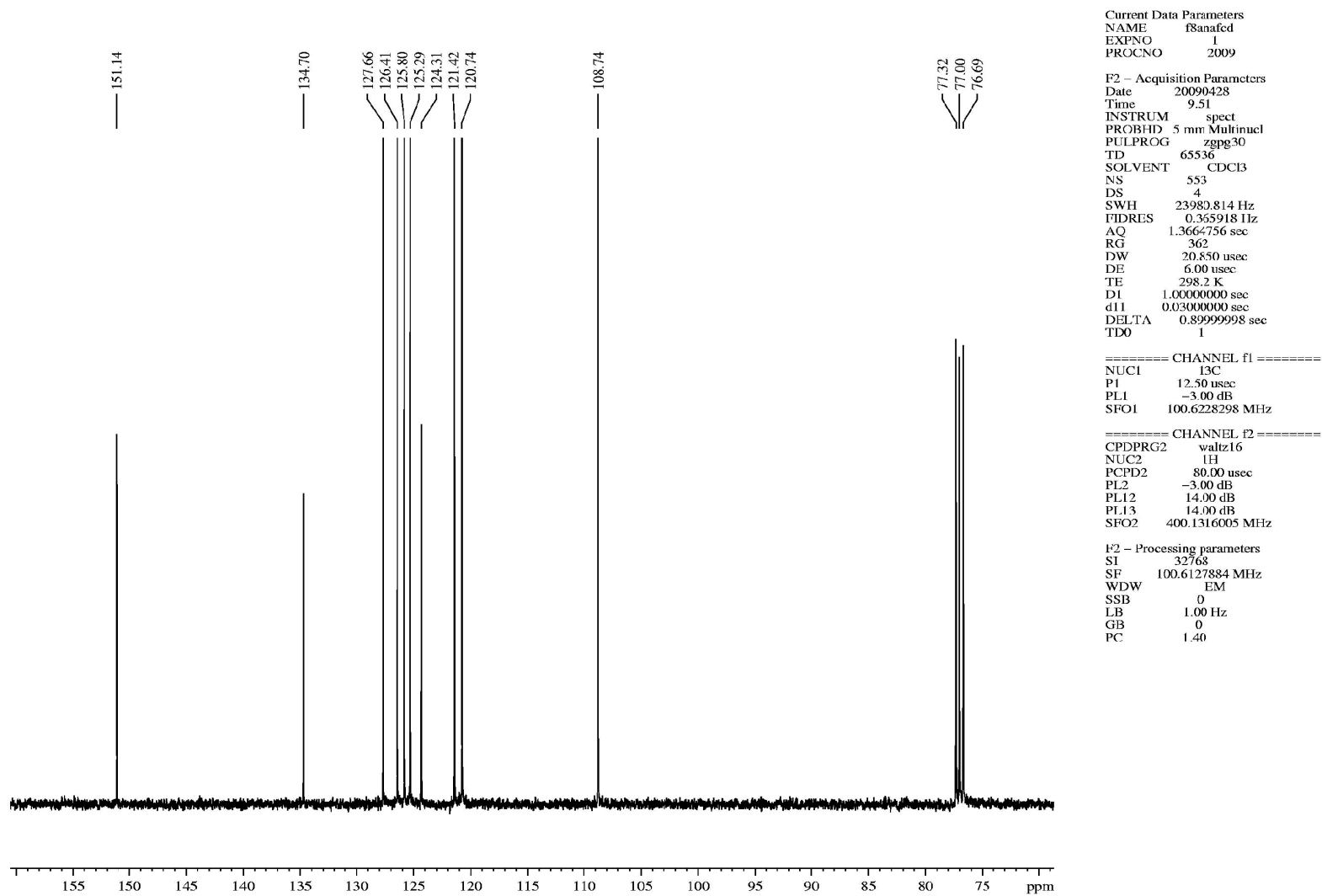


Figura 34- Espectro de RMN-<sup>1</sup>H do PDA-14 empregando cloróformio deuterado.

A estrutura química do PDA-14 foi numerada para facilitar a atribuição dos sinais obtidos nos espectros (Figura 35).

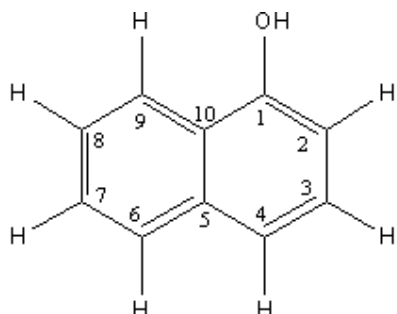


Figura 35- Estrutura química do PDA-14 numerada.

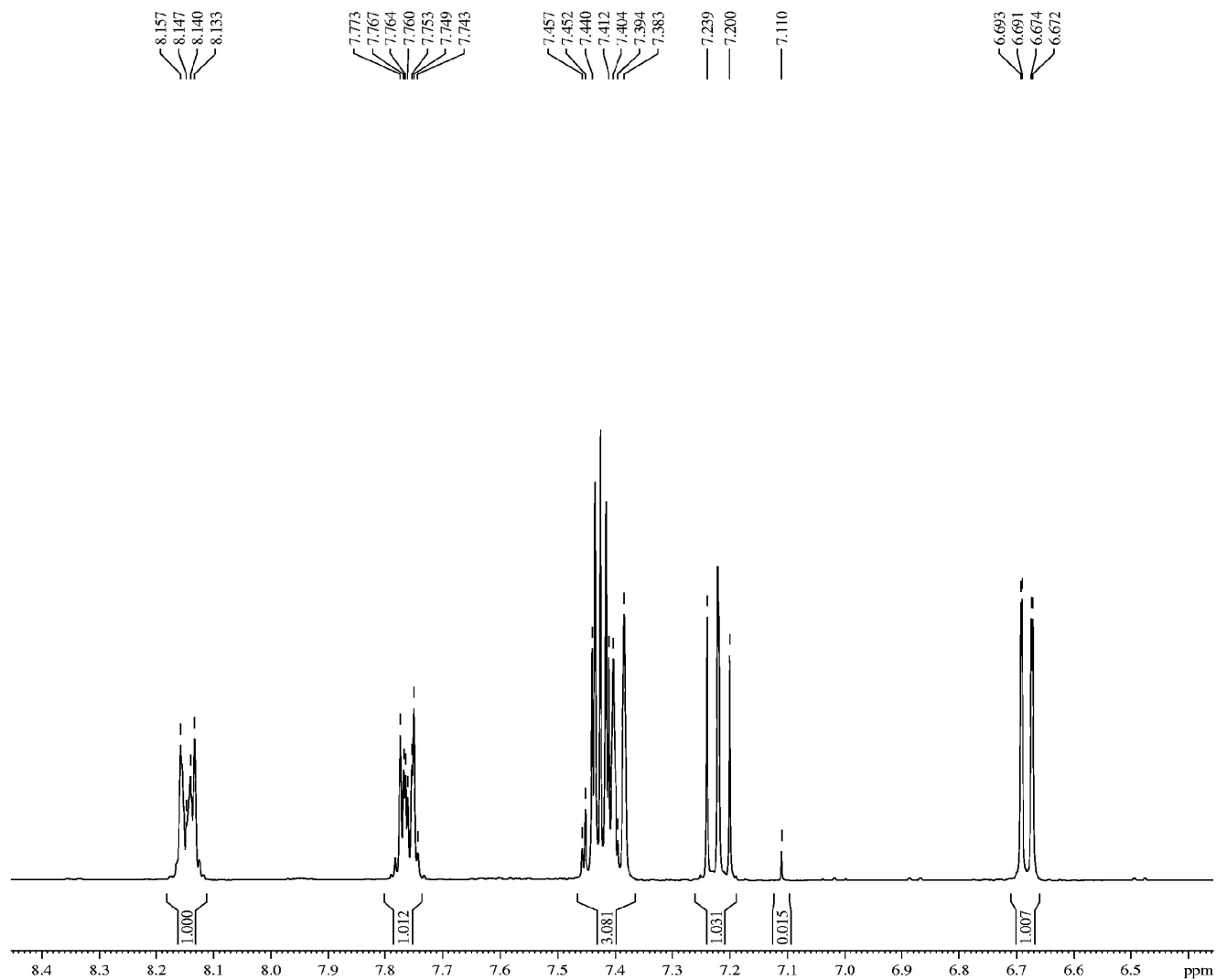
Tabela 27- Valores de deslocamentos químicos (ppm), multiplicidade, constante de acoplamento ( $J$ ), número de hidrogênios e as atribuições para o espectro de RMN- $^1\text{H}$  do PDA-14.

$\delta$ (ppm)	Multiplicidade <sup>a</sup> e constante de acoplamento ( $J$ )	Número de hidrogênios	Atribuição <sup>b</sup>
5,53	s	1	1
6,68	d (6,8 Hz)	1	2
7,22	t (7,8 Hz)	1	3
7,38-7,45	m	1	4, 7 e 8
7,74-7,77	m	1	6
8,13-8,16	m	1	9

<sup>a</sup> s= singleto, d= dubleto, m= multipeto.

<sup>b</sup> Figura 35.

A Figura 36 e a Tabela 28 apresentam o espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  do PDA-14 e as atribuições realizadas para os sinais observados.



Current Data Parameters  
 NAME f8anafh1  
 EXPNO 2  
 PROCNO 2009

F2 - Acquisition Parameters  
 Date\_ 20090430  
 Time 10.07  
 INSTRUM spect  
 PROBHD 5 mm Multinucl  
 PULPROG zg  
 TD 32768  
 SOLVENT CDCl3  
 NS 8  
 DS 0  
 SWH 4789.272 Hz  
 FIDRES 0.146157 Hz  
 AQ 3.4210291 sec  
 RG 359  
 DW 104.400 usec  
 DE 6.00 usec  
 TF 298.2 K  
 D1 1.0000000 sec  
 TD0 1

===== CHANNEL f1 =====

NUC1 1H  
 P1 8.50 usec  
 PL1 -3.00 dB  
 SF01 400.1320007 MHz

F2 - Processing parameters  
 SI 32768  
 SF 400.1300691 MHz  
 WDW no  
 SSB 0  
 LB 0.00 Hz  
 GB 0  
 PC 1.00

Figura 36- Espectro de RMN-<sup>13</sup>C do PDA-14 empregando clorofórmio deuterado.

Tabela 28- Valores de deslocamentos químicos (ppm) e atribuição dos carbonos para o espectro de RMN-<sup>13</sup>C do PDA-14.

$\delta$ (ppm)	Atribuição <sup>a</sup>
108,74	2
120,74	4
121,42	9
124,31	3
125,29	10
125,80	8
126,41	7
127,66	6
134,70	5
151,14	1

<sup>a</sup> Figura 35.

O espectro COSY do PDA-14 encontra-se demonstrado na Figura 37.

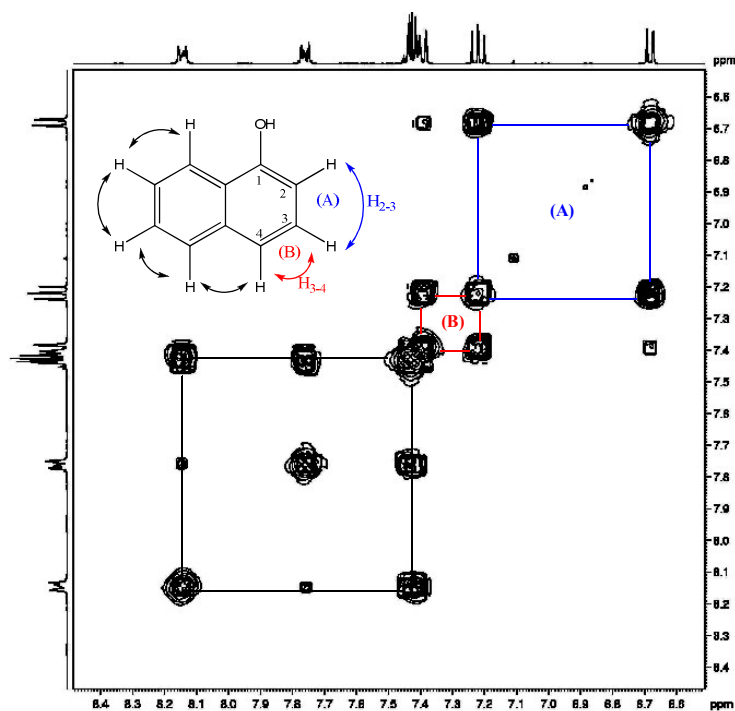


Figura 37- Espectro COSY do PDA-14.

As Figuras 38 a-c representam os cromatogramas e os espectros de absorção na região do UV obtidos em detector de arranjo de diodos para PDA-14, 1-naftol e 2-naftol, respectivamente.

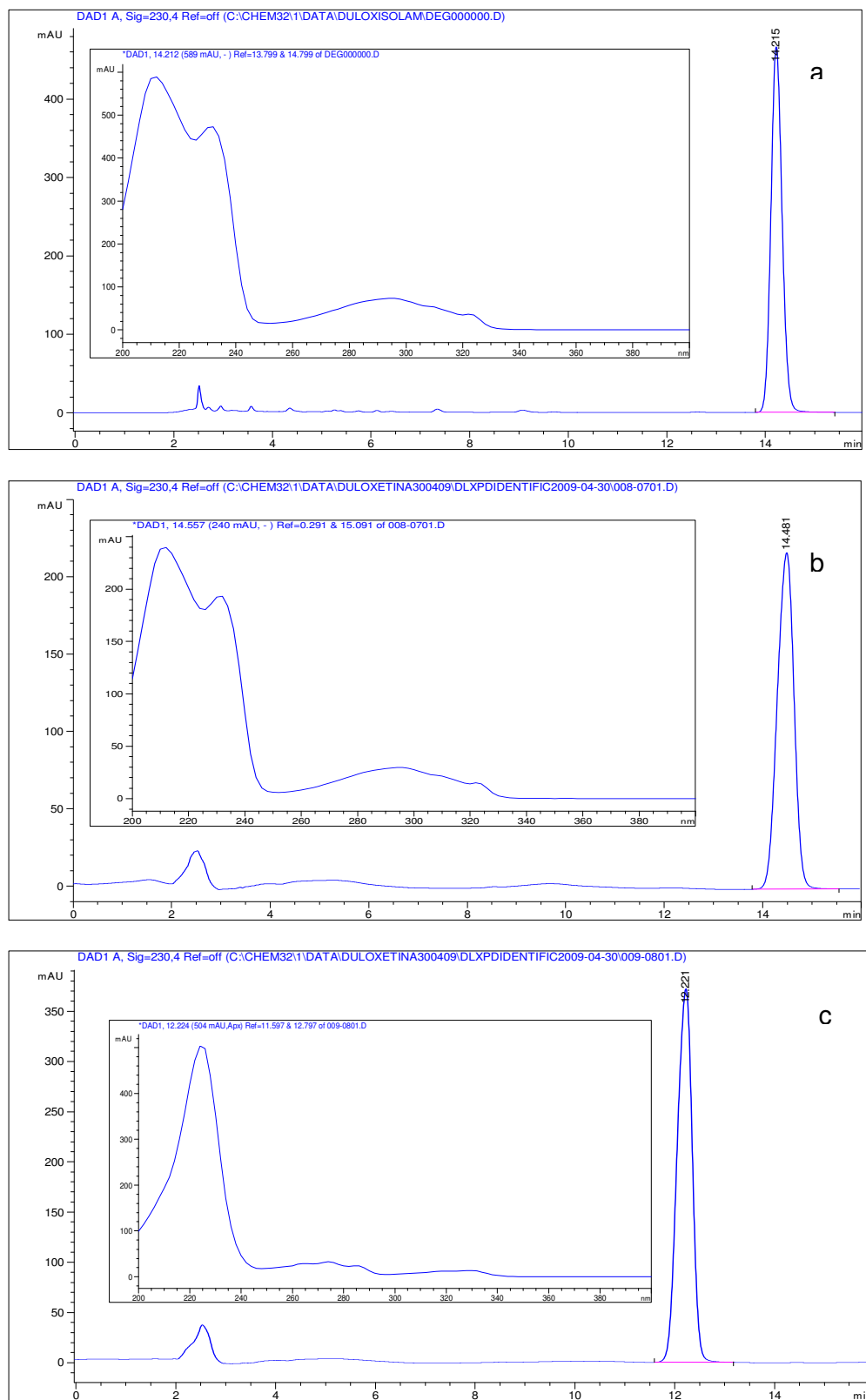


Figura 38 a-c - Cromatogramas obtidos para PDA-14 (a), 1-naftol (b) e 2-naftol (c). Condições cromatográficas: coluna ACE<sup>®</sup> 5 C18 (250 mm x 4,0 mm, 5 $\mu$ m); fase móvel tampão fosfato de potássio monobásico 50 mM (pH 6,0; contendo 0,3% de trietilamnia) e acetonitrila (60:40, v/v); fluxo 1,0 ml/min; detecção UV  $\lambda$  230 nm; temperatura de análise 25 °C.

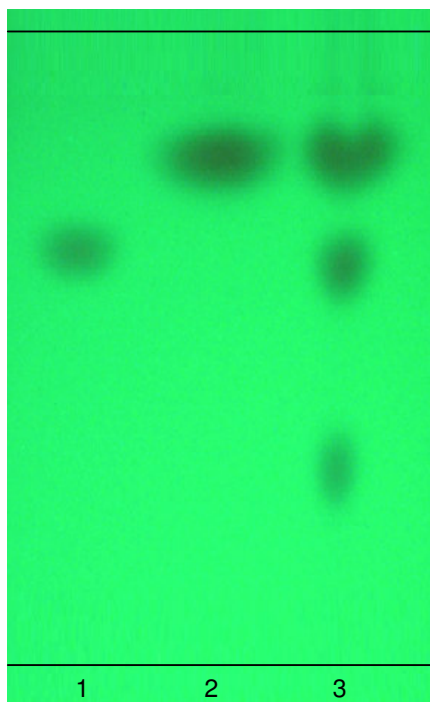


Figura 39- Cromatoplaça obtida pela análise das soluções de DLX SQR (1), e 1-naftol (2) e DLX submetida ao HCl 0,1 M a 70 °C por 1 hora (3), utilizando a luz UV (254 nm).

### 5.5.3 Discussão

A identificação do produto de degradação ácida da DLX, denominado de PDA-14 foi realizada após consideração sobre o caminho de degradação deste fármaco (Figura 33) aliado às análises dos espectros de RMN-<sup>1</sup>H, RMN-<sup>13</sup>C e bidimensional, COSY.

No espectro de RMN-<sup>1</sup>H (Figura 34 e Tabela 27), o hidrogênio ligado ao C2 aparece como um dubleto em 6,68 ppm, referente ao acoplamento entre os hidrogênios do C2,3. Os hidrogênios do C3 estão descritos como um triplete em 7,22 ppm, este fato ocorre devido ao acoplamento entre os hidrogênios do C3,2 e C3,4. Para confirmar estas atribuições, o espectro bidimensional COSY foi realizado mostrando a correlação <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H da molécula proposta (Figura 37). O espectro de COSY permitiu a confirmação do PDA-14 como a estrutura do 1-naftol (Figura 35). A primeira correlação pode ser evidenciada entre os hidrogênios do C2 (d-6,68 ppm) e os hidrogênios do C3 (t-7,22 ppm), permitindo o primeiro sistema spin (Figura 37A).

Os hidrogênios do C3 tem o segundo sistema spin (Figura 37B) formado pela correlação entre os hidrogênios do C2 e do C4.

As análises dos dados estabelecidos pelos experimentos de RMN permitiram a caracterização do PDA-14 como 1-naftol. Para ajudar na confirmação desta estrutura, uma amostra comercial do 1-naftol foi analisada por CLAE e por CCD. O tempo de retenção e o espectro obtido, com auxílio do detector de arranjo de fotodiodos, na CLAE (Figura 38 a-b), bem como o valor de Rf obtido foi o mesmo da solução de DLX submetida ao HCl 0,1 M a 70 °C por 1 hora (Figura 39), confirmando que PDA-14 é o 1-naftol. Além disso, uma análise por CLAE foi conduzida com o 2-naftol (Figura 38 c) demonstrando tempo de retenção e espectro diferenciados do 1-naftol e do PDA-14.

O 1-naftol desempenha papel produzindo efeitos citotóxicos pela formação do 1,2-naftoquinona e/ou 1,4-naftoquinona, quando metabolizado devido a redução de um elétron para radicais naftosemiquinona (DOHERTY et al., 1984). Estes podem covalentemente ligar em macromoléculas celulares importantes ou entrar no ciclo redox com oxigênio molecular por meio disso gerando espécies ativas de oxigênio (CROERA et al., 2008). Portanto, o produto farmacêutico contendo DLX disponível no mercado (Cymbalta®) é apresentado na forma de cápsulas contendo microgrânulos com revestido entérico para evitar a degradação ácida do fármaco no estômago, uma vez que, seu produto de degradação majoritário é o 1-naftol que apresenta efeitos citotóxicos.

## 5.6 Conclusões

- O estudo da cinética de degradação da DLX sugere que a degradação ácida da amostra obedece a uma cinética de ordem zero;
- Os resultados da cinética de fotodegradação da DLX sugerem uma degradação de primeira ordem para amostra;



- O produto majoritário da degradação ácida (PDA-14) foi isolado com pureza adequada através da cromatografia em camada delgada preparativa;
- O PDA-14 foi identificado como 1-naftol através das análises RMN-<sup>1</sup>H, RMN-<sup>13</sup>C, COSY, CLAE e CCD.



---

## **6. CONCLUSÕES GERAIS**

---



- As análises por RMN-<sup>1</sup>H e RMN-<sup>13</sup>C, DSC, espectroscopia na região do IV e espectrometria de massas permitiram a caracterização da DLX SQR.
- Os métodos desenvolvidos através da CCD, espectrofotometria na região do UV e CLAE permitiram a identificação da DLX, assegurando a presença do fármaco no produto farmacêutico.
- Os métodos propostos por espectrofotometria UV, CLAE e voltametria de redissolução catódica foram validados adequadamente e demonstraram especificidade, linearidade, precisão, exatidão e robustez para análise quantitativa de DLX em cápsulas.
- A análise comparativa entre os métodos propostos para a determinação quantitativa de DLX demonstrou não haver diferença estatisticamente significativa entre eles, sendo caracterizada a equivalência dos mesmos.
- Os estudos da cinética de degradação ácida e de fotodegradação demonstraram que a degradação da DLX obedeceu a uma cinética de ordem zero e primeira ordem, respectivamente.
- O produto majoritário formado na degradação ácida, denominado de PDA-14, foi isolado por cromatografia em camada delgada preparativa com pureza adequada.
- As análises por RMN-<sup>1</sup>H, RMN-<sup>13</sup>C, COSY, CLAE e CCD foram analisados e permitiram a elucidação do PDA-14 como 1-naftol.



---

## **7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---





AVEDNO, C. Introducción AL análisis farmacéutico. In: LOPEZ, M. C. A. **Introducción a la Química Farmacéutica**. Madri: Interamericana McGraaw-Hill, 1993, cap.27, p. 843-857.

ARMIJO, C. J. V.; COSTA, I. M.; LONGHINI, R.; PETZHOLD, C. L.; PETROVICK, P. R. Métodos termo-analíticos e suas aplicações nas ciências farmacêuticas. **Caderno de Farmácia**, v. 20, n. 1, p. 29-47, 2004.

AOAC - ASSOCIATION OF OFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis**. 15. ed. Arlington. v. 1, p. 27, 1990.

BARBOSA, L. C. A. **Espectroscopia no infravermelho: na caracterização de compostos orgânicos**. Viçosa: UFV, 2007.

BIRYOL, I.; USLU, B.; KÜÇÜKYAVUZ, Z. Voltammetric determination of imipramine hydrochloride and amitriptyline using a polymer-modified carbon paste electrode. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 15, p. 371-381, 1996.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução n° 899, de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 02 jun. 2003.

BYMASTER, F. P.; DRESHFIELD-AHMAD, L. J.; THRELKELD, P. G.; SHAW, J. L.; THOMPSON, L.; NELSON, D. L. Comparative affinity of duloxetine and venlafaxine for serotonin and norepinephrine transporters in vitro and in vivo, human serotonin receptor subtypes, and other neuronal receptors. **Neuropsychopharmacology**, v. 25, n. 6, p. 871-880, 2001.

CIENFUEGOS, F.; VAISTMAN, D. **Análise Instrumental**. Rio de Janeiro: Interciência, 2000, p. 41, 55, 287.

CROERA, D. F., GRIBALDO, L. In vitro toxicity of naphthalene, 1-naphthol, 2-naphthol and 1,4-naphthoquinone on human CFU-GM from female and male cord blood donors. **Toxicology In Vitro**, v. 22, p.1555-1561, 2008

DOHERTY, M. D.; COHEN, G. M.; SMITH, M. T. Mechanisms of toxic injury to isolated hepatocytes by 1-naphthol. **Biochemical Pharmacology**, v. 33, p. 543-549, 1984.

EL-MAALI, N. A. Voltammetric analysis of drugs. **Bioelectrochemistry**, v. 64, p. 99-1007, 2004.

ELI LILLY. **Cymbalta®: Monografia**. São Paulo, 2005.

EMA. European Medicines Agency. **Scientific discussion**. 2005. Disponível em: <<http://www.emea.europa.eu/humandocs/PDFs/EPAR/cymbalta/19256704en6.pdf>> Acesso em: 30/06/2009.

ERMER, J. Validation in pharmaceutical analysis. Part I: An integrate approach. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 24, p. 755-767, 2001.

FARGHALY, O. A. EI-MOATY. Adsorptive stripping voltammetric determination of antidepressant drug sulphuride. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 23, p. 783-791, 2000.

FERANCOVÁ, A.; KORGOVÁ, E.; MIKÓ, R.; LABUDA, J. Determination of tricyclic antidepressants using a carbon paste electrode modified with  $\beta$ -cyclodextrin. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 492, p. 74-77, 2000.

FRAY, M. J.; BISH, G.; BROWN, A. D.; FISH, P. V.; STOBIE, A.; WAKENHUT, F.; WHITLOCK, G. A. *N*-(1,2-Diphenylethyl)piperazines: a new class of dual serotonin/noradrenaline reuptake inhibitor. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 16, p. 4345-4348, 2006.

HIRSCHFIELD, R. M. History and evolution of the monoamine hypothesis of depression. **Journal Clinical Psychiatry**, n. 61, suppl. 6, p. 4-6, 2000.

HUNZIKER, M. E.; SUEHS, B. T.; BETTINGER, T. L.; CRISMON, M. L. Duloxetine hydrochloride: a new dual-acting medication for the treatment of major depressive disorder. **Clinical Therapeutics**, v. 27, n. 8, p.1126- 1143, 2005.

ICH. Harmonised Tripartite Guideline. Validation of analytical methods text and methodology Q2 (R1). In: **International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use**, 2005.

ICH. Harmonised Tripartite Guideline. Stability testing of new drug substances and products Q1A (R2). In: **International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use**, 2003.

JASEN, P. J.; OREN, P. L.; KEMP, C. A.; MAPLE, S. R.; BAERTSCHI, S. W. Characterization of impurities formed by interaction of duloxetine HCl with enteric polymers hydroxypropyl methylcellulose acetate succinate and hydroxypropyl methylcellulose phthalate. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 87, n.1, p. 81-5, 1998.

JOHNSON, J. T.; OLDHAM, S. W.; LANTZ, R. J.; DELONG, A. F. High performance liquid chromatographic method for the determination of duloxetine and desmethyl duloxetine in human plasma. **Journal Liquid Chromatography & Related Technology**, v.19, n.10, p. 1631-1641, 1996.

KAMILA, M. M.; MONDAL, N.; GHOSH, L. K. A validated UV spectrophotometric method for determination of duloxetine hydrochloride. **Die Pharmazie**, v. 62, p. 414-415, 2007.

KIBBE, A. H. (Ed.) **Handbook of Pharmaceutical Excipients**. Washington: American Pharmaceutical Association, 2000. 665 p.

LACHMAN, L.; DELUCA, P.; AKERS, M. J. Testes de estabilidade e fundamentos de cinética química. In: LACHAMAN, L.; LIEBERMAN, H. A.; KANIG, J. L. **Teoria e prática na indústria farmacêutica**. Lisboa: Calouste Gulben Kian, 2001, v. 2, cap. 26, p. 1277-1355.

LAM, M. W.; YOUNG, C. J.; MABURY, S. C. Aqueous photochemical reaction kinetics and transformations of fluoxetine. **Environmental Science and Technology**, v. 39, p.513-522, 2005.

LANTZ, R. J.; GILLESPIE, T. A.; RASH, T. J. Metabolism, excretion, and pharmacokinetics of duloxetine in healthy human subjects. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 31, p. 1142-1150, 2003.

LIU, L.; NUSSBAUM, M. A. Systematic screening approach for chiral separations of basic compounds by capillary electrophoresis with modified cyclodextrins. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 19, p. 679-694, 1999.

MA, N.; ZHANG, Bi-KUI; LI, HUAN-DE; CHEN, BEN-MEI; XU, P.; WANG, F.; ZHU, RONG-HUA; FENG, S.; XIANG, DA-XIONG; ZHU, YUN-GUI. Determination of duloxetine in human plasma via LC/MS and subsequent application to a pharmacokinetic study in healthy Chinese volunteers. **Clinica Chimica Acta**, v. 380, p. 100-105, 2007.

MALFARÁ, W. R.; BERTUCCI, C.; QUEIROZ, M. E. C.; CARVALHO, S. A. D.; BIANCHI, M. L. P.; CESARINO, E. J.; CRIPPA, J. A.; QUEIROZ, R. H. C. Reliable HPLC method for therapeutic drug monitoring of frequently prescribed tricyclic and nontricyclic antidepressants. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 44, p. 955-962, 2007.

MALLINCKRODT, C. H.; PRAKASH, A.; ANDORN, A. C.; WATKIN, J. G.; WOHLREICH, M. M. Duloxetine for the treatment of major depressive disorder: a closer look at efficacy and safety data across the approved dose range. **Journal of Psychiatric Research**, v. 40, p. 337-348, 2006.

MERCOLINI, L.; MANDRIOLI, R.; CAZZOLLA, R.; AMORE, M.; RAGGI, M. A. HPLC analysis of the novel antidepressant duloxetine in human plasma after an original solid-phase extraction procedure. **Journal of Chromatography B**, v. 856, p.81-87, 2007.

NEMEROFF, C. B.; SCHATZBERG, A. F.; GOLDSTEIN, D. J. Duloxetine for the treatment of major depressive disorder. **Psychopharmacology Bulletin**, v. 36, p. 106-132, 2002.

NOUWS, H. P. A.; DELERUE-MATOS, C.; BARROS, A. A.; RODRIGUES, J. A. Electroanalytical study of antidepressant sertraline. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 39, p. 290-293, 2005.

NUDELMAN, N. E. S. **Estabilidad de medicamentos**. Buenos Aires: El Atheneo, 1975.

OLSEN, B. A.; ARGENTINE, M. D. HPLC method development for duloxetine hydrochloride using a combination of computer-based solvent strength optimization and solvent selectivity mixture design. **Journal Liquid Chromatography & Related Technology**, v.19, n.12, p. 1993-2007, 1996.

PAIVA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S. **Introduction to spectroscopy: a guide for students of organic chemistry**. 3 ed. Melbourne: Brooks/Cole, 2001.

PRETSCH, E.; BÜLMANN, P.; AFFOLTER, C. **Structure determination of organic compounds**. New York: Springer, 2000.

PETROVIC, M.; BARCELÓ, D. LC-MS for identifying photodegradation products of pharmaceutical in the environment. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 26, n. 6, p. 486-493, 2007

RANE, V. P.; SHINDE, D. E. Development and validation of chiral LC method for the enantiomeric separation of duloxetine on amylase based stationary phase. **Journal of Chromatography Science**, n. 46, v. 9, p.772-776, 2008.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; MOORE, P. K. **Farmacologia**. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004.

RICKARD, E. C.; BOPP, R. J. Optimization of a capillary electrophoresis method to determine the chiral purity of a drug. **Journal of Chromatography A**, v. 680, p. 609-621, 1994.

SATONIN, D. K.; MCCULLOCH, J. D.; KUO, F.; KNADLER, M. P. Development and validation of a liquid chromatography—tandem mass spectrometric method for the determination of the major metabolites of duloxetine in human plasma. **Journal of Chromatography B**, v. 852, p. 582-589, 2007.

SELVAN, P. S.; GOWDA, K. V.; MANDAL, U.; SOLOMON, W. D. S.; PAL, T. K.; Determination of duloxetine in human plasma by liquid chromatography with atmospheric pressure ionization—tandem mass spectrometry and its application to pharmacokinetic study. **Journal of Chromatography B**, v. 858, p. 269-275, 2007.

SILVA, B. J. G.; LANÇAS, F. M.; QUEIROZ, M. E. C. In-tube solid-phase microextraction coupled to liquid chromatography (in-tube SPME/LC) analysis of nontricyclic antidepressants in human plasma. **Journal of Chromatography B**, v. 862, n. 1-2, p.181-8, 2008.

SILVA, A. M. S. R. da; LIMA, J. C.; TELES, M. T. O.; BRETT, A. M. O. Electrochemical studies and square wave adsorptive stripping voltammetry of antidepressant fluoxetine. **Talanta**, v. 49, p. 611-617, 1999.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 6. ed. Rio de Janeiro, 2000.

SHIN-ETSU AQUOAT®. **Hypromellose acetate succinate**. Disponível em: <<http://www.shinetsu.co.jp/cellulose/e/pharmaceutical/aquoat.shtml>> Acesso em: 30/01/2007.

SINKO, P. J. **Martin's physical pharmacy and pharmaceutical sciences**. Baltimore: Lippincott Williams and Wilkins, 2006.

SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. M.; CROUCH, S. R. **Fundamentos de Química Analítica**. São Paulo: Thomson, 2007.

SONI, P.; MARIAPPAN, T. T.; BANERJEE, U. C. High-performance liquid chromatographic method for the simultaneous estimation of key intermediates of duloxetine. **Talanta**, v. 67, p. 975-978, 2005.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; GLAJCH, J. L. **Practical HPLC method development**, 2<sup>nd</sup> ed., Hoboken: John Willey & Sons, 1997.

SRINIVASULU, P., SRINIVAS, K.S.V., REDDY, R.S., MUKKANTI, K., BUCHIREDDY, R. A validated stability indicating rapid LC method for duloxetine HCl. **Die Pharmazie**, v. 64, p. 10-13, 2009.

STAHL, S. M. The psychopharmacology of painful physical symptoms in depression. **Journal Clinical Psychiatry**, v. 60, n. 5, p. 382-383, 2002.

SWARTZ, M. E.; KRULL, I. S. Validação de métodos cromatográficos. **Pharmaceutical Technology**, São Paulo, v. 2, n.3, p.12-20, 1998.

THE MERCK Index. **A encyclopedia of chemical, drugs, and biologicals**. 12. ed. Whitehouse Station, New Jersey, Merck Research Laboratories Division of Merck & Co., Inc., 2001, p. 1484.

USLU, B.; ÖZKAN, S. A. Eletrochemical characterisation of nefazodone hydrochloride and voltammetric determination of the drug in pharmaceuticals and human serum. **Analytica Chimica Acta**, v. 462, p. 49-57, 2002.

**USP 31**. THE UNITED STATES Pharmacopoeia. 30<sup>th</sup> ed. Rockville: United States Pharmacopoeial Convention, 2008.

VOGEL, A. **Análise química quantitativa**. Rio de Janeiro: LTC, 1992.

YANG, J.; LU, X.; BI, Y.; QIN, F.; LI, F. Chiral separation of DLX and its *R*-Enantiomer by LC. **Chromatographia**, v. 66, p. 389-393, 2007.

WALDSCHMITT, C.; VOGEL, F.; MAURER, C.; HIEMKE, C. Measurement of duloxetine in blood using high-performance liquid chromatography with spectrophotometric detection and column switching. **Therapeutics Drug Monitoring**, v. 29, n. 6, p.767-772, 2007.

WECKER, L.; CATALANO, G. Tratamento dos transtornos afetivos. In: MINNEMAN, K. P. (Ed.); WECKER, L. (Ed.); LARNER, J. BRODY, T. M. **Brody: Farmacologia Humana**, 4. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006, cap. 23, p. 275-284.

WELLS, K.A., LOSIN, W.G. In vitro stability, potency, and dissolution of duloxetine enteric-coated pellets after exposure to applesauce, apple juice, and chocolate pudding. **Clinical Therapeutics**, v. 30, p.1300-1308, 2008.





---

**ANEXOS: ARTIGO ACEITO**

---





**STRESS DEGRADATION STUDIES AND KINETIC  
DETERMINATIONS ON DULOXETINE ENTERIC-COATED  
PELLETS**

Journal:	<i>Journal of AOAC INTERNATIONAL</i>
Manuscript ID:	09-0220.R1
Manuscript Type:	Manuscript
Date Submitted by the Author:	
Complete List of Authors:	Gomes, Patrícia; Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia Wingert, Nathalie; Universidade Federal do Rio Grande do Sul Paim, Clésio Schapoval, Elfrides; UFRGS, Farmacia Steppe, Martin; Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Keyword:	Stability-indicating assay, Stress degradation study, Kinetic degradation, Duloxetine

## STRESS DEGRADATION STUDIES AND KINETIC DETERMINATIONS ON DULOXETINE ENTERIC-COATED PELLETS

Patrícia Gomes<sup>a,b,c,\*</sup>, Nathalie R. Wingert<sup>b</sup>, Clésio S. Paim<sup>a,b</sup>, Elfrides E. S.  
Schapoval<sup>a,b</sup>, Martin Steppe<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia,  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>b</sup> Laboratório de Ensino e Pesquisa em Controle de Qualidade de Medicamentos,  
Faculdade de Farmácia, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>c</sup> Curso de Farmácia, Centro Universitário Franciscano (UNIFRA), Santa Maria, RS,  
Brazil.

\*Corresponding author:

Patrícia Gomes

Av. Ipiranga 2752 Lab. 402, Porto Alegre, RS, Brazil

90610-000

Phone: +55 51 3308-5326

FAX: +55 51 3308-5378

E-mail address: patriciagomes0@yahoo.com.br

## ABSTRACT

A stability-indicating LC assay method was developed for the quantitative determination of duloxetine (DLX) in pharmaceutical dosage form in the presence of its degradation products and kinetic determinations were evaluated in acid conditions and light UVC exposure. Chromatographic separation was achieved by use of ACE<sup>®</sup> C18 column (250 × 4.0 mm, 5 μm). The mobile phase was established by mixing aqueous 50 mM potassium phosphate buffer (pH 6.0 containing 0.3% triethylamine) and acetonitrile (60:40, v/v). DLX was rapidly degraded in acid medium, in the presence of hydrogen peroxide and light UVC radiation, while it was more stable in alkali medium. The described method was linear over a range of 4.0-14.0 μg mL<sup>-1</sup> for determination of DLX ( $r= 0.9998$ ). The precision was demonstrated by relative standard deviation (RSD%) of intra-day (RSD= 0.79 - 1.07%) and inter-day studies (RSD= 0.85%). The mean recovery was found to be 100.56%. The acid degradation of DLX in 0.1M HCl solution showed an apparent zero-order kinetics ( $k= 0.177 \text{ min}^{-1}$ ) and the photodegradation demonstrated an apparent first-order kinetics ( $k = 0.082 \text{ min}^{-1}$ ). The developed method was found to be simple, specific, robust, linear, precise, and accurate for the determination of DLX in enteric-coated pellets.

**KEYWORDS:** duloxetine, stability-indicating assay, stress degradation study, kinetic degradation.

## 1. Introduction

Major depressive disorder (MDD) is a chronic, recurrent illness associated with a broad range of symptoms leading to significant functional impairment, morbidity, and in severe cases, increased risk of mortality (1). The duloxetine hydrochloride [(+)-(S)-N-methyl-3-(1-naphthalenyloxy)-2-thiophenepropanamine hydrochloride] (Fig. 1), has been approved for the treatment of MDD and for the management of diabetic peripheral neuropathic pain (2). It is a balanced selective serotonin and norepinephrine-reuptake inhibitor.

Fig. 1

The LC determination of duloxetine (DLX) in biological fluid studies has been reported in literature with mass spectrometry detection (3-5), fluorescence (6), and UV detection (7-8). Recently, an HPLC method to separate the enantiomers of DLX was reported (9). The simultaneous estimation of the key intermediates for chemical synthesis of DLX was determined by LC methods using UV detection (10-11). Literature has demonstrated that a stability-indicating LC method for determination of DLX in the presence of its impurities and degradation products generated from forced decomposition studies (12) was developed. Nevertheless, this study assayed the DLX in bulk material and employed a complex mobile phase. Thus, the aim of our study was to develop and validate a simple stability-indicating LC method, which allowed the determination of DLX in pharmaceutical dosage form, and to determine the kinetics of degradation describing the concentration changes of DLX in acid condition and on photodegradation.

## **2. EXPERIMENTAL**

### **2.1 MATERIALS**

Duloxetine hydrochloride reference standard (89.1% of DLX free base) was obtained from Eli Lilly (São Paulo, Brazil). Duloxetine capsules (Cymbalta<sup>®</sup> 60 mg) containing enteric-coated pellets were purchased from the market. The excipients contained in the pharmaceutical dosage form (hypromellose, hydroxypropyl methylcellulose acetate succinate, sucrose, talc, titanium dioxide, and triethyl citrate) were all of pharmaceutical grades and acquired from different distributors. Acetonitrile LC grade was purchased from Tedia (Fairfield, CA, USA), and *o*-phosphoric acid, potassium dihydrogen phosphate and triethylamine were obtained from Merck (Darmstadt, Germany).

### **2.2 Apparatus and chromatographic conditions**

The LC system consisted of AGILENT 1200 (Santa Clara, CA, United States) model equipped with a photodiode-array detector (DAD G1315B), degasser (G1322A), pump (G1311A), autosampler (G1329A), and HPLC column compartment

(G1316A). The output signal was monitored and processed using a ChemStation, B0201-SR1[260].

The mobile phase was established by mixing aqueous 50 mM potassium phosphate buffer (pH 6.0 containing 0.3 % triethylamine) and acetonitrile in ratio 60:40 (v/v). Separation was achieved by using ACE<sup>®</sup> C18 column (250 x 4.0 mm, 5  $\mu$ m, Aberdeen, Scotland), and the flow rate was 1.0 mL min<sup>-1</sup>. The HPLC column was maintained at 25 °C and the detector was set at a wavelength of 230 nm. The injection volume was 20  $\mu$ L.

### **2.3 Preparation of standard and sample solutions**

Stock standard solution of DLX (100  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>) was prepared in acetonitrile. An aliquot of this solution was diluted in the mobile phase to obtain the final concentration of 10  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> of DLX.

To prepare a sample solution, twenty weighed capsules of Cymbalta<sup>®</sup> (60 mg of DLX) were ground and an amount of powder equivalent to 10 mg of active compound was diluted with acetonitrile. The sample solution was filtered and the appropriate aliquot was diluted in the mobile phase to obtain a final solution containing 10  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> of DLX.

### **2.4 Method validation**

The validation procedure for the analysis of DLX by LC method followed the International Conference on Harmonization (ICH) guideline and United States Pharmacopoeia (13-15). The performance parameters evaluated in this method were specificity, robustness, linearity, limit of detection (LOD), limit of quantitation (LOQ), precision, and accuracy.

#### **2.4.1 Specificity**

The specificity of the LC method was evaluated to ensure that there was no interference from the excipients contained in pharmaceutical product or from products resulting from forced degradation.

Solutions containing  $1 \text{ mg mL}^{-1}$  of the drug were prepared in acetonitrile for the stress degradation studies. An appropriate aliquot was transferred into a volumetric flask and the volume was completed with 0.1 M NaOH, 0.01 M HCl, 0.1 M HCl, 3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  or 30%  $\text{H}_2\text{O}_2$  to give a final concentration of  $100 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$  of DLX. These solutions were subjected to heating at  $70 \text{ }^\circ\text{C}$ . The hydrolytic study was carried out in 0.1 M NaOH for 2 h, 0.01 M HCl for 60 min and with 0.1 M HCl for 30 min. The oxidative reaction was performed in 3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  for 1 h and with 30%  $\text{H}_2\text{O}_2$  for 15 min. For LC analyses, 2.0 mL aliquots of the above solutions were transferred to 20 mL volumetric flasks, neutralized as needed, and each sample diluted to the mark with mobile phase.

The stress degradation study in direct UV radiation (254 nm) was performed exposing the DLX solution in acetonitrile ( $1 \text{ mg mL}^{-1}$ ) for 30 min at room temperature in a photostability chamber ( $1.0 \times 0.17 \times 0.17 \text{ m}$ ) with mirrors and equipped with UV-C lamps (Ecolume ZW<sup>®</sup>, 254 nm, 15 W), and UV cuvettes (Ultra Vette<sup>®</sup>, São Paulo, Brazil) were used as a container for samples. Samples submitted to identical conditions, but protected from light, were used as a control. Peak purity test performed by photodiode array detector (PDA) was useful to show that the analyzed chromatography peak did not contain more than one substance.

#### **2.4.2 Robustness**

Chromatographic parameters (peak retention time, theoretical plates, tailing factor, retention factor, and repeatability) were evaluated using both samples and reference substance solutions ( $10 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ ) changing wavelength (225 and 235 nm), column temperature (20 and  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ ), flow rate ( $0.8$  and  $1.2 \text{ mL min}^{-1}$ ), acetonitrile concentration (45 and 50%), and buffer pH (5.5 and 6.5).

#### **2.4.3 Linearity, LOD and LOQ**

The linearity was evaluated at seven concentrations in the range of 4.0 -  $14.0 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$  of DLX. Results were analyzed by the linear regression analysis, which was calculated by the least square method.



LOD and LOQ were determined by reducing the concentration of a standard solution until the DLX peak response was approximately three or ten times, greater than the noise, respectively.

#### **2.4.4 Precision**

The precision of the reported method for the determination of DLX was studied using the parameters repeatability (intra-day) and intermediate precision (inter-day). It was expressed as relative standard deviation (RSD) at series of measurements. The repeatability of this method was verified on the same day, at the same concentration and under the same experimental conditions for each of the samples evaluated. The intermediate precision, which is the inter-day variation at the same concentration level, was determined on three consecutive days. In order to evaluate the precision of the method, six solutions were prepared ( $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) and the amount was determined in pharmaceutical dosage form.

#### **2.4.5 Accuracy**

The accuracy of the method was determined through the recovery test of the samples, using known amounts of DLX reference standard. For LC method, aliquots of 1.0, 2.0 and 3.0 mL of a DLX standard solution ( $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) were added to three sample solutions containing a fixed amount of DLX ( $4 \mu\text{g}$ ) in acetonitrile, respectively. Therefore, this recovery study was performed at a final concentration solution of 6.0, 8.0 and  $10.0 \mu\text{g mL}^{-1}$  DLX. All solutions were prepared in triplicate and analyzed.

#### **2.4.6 System suitability test**

System suitability tests were performed to ensure that the LC system and procedure are capable of providing quality data based on USP 31 requirements (15). The system suitability parameters include DLX retention time, tailing factor and number of theoretical plates, as well as the peak area relative-standard deviation (RSD,  $n=6$ ) of reference standard.

## 2.5 Kinetic determinations

The kinetics of acid degradation of DLX was evaluated in 0.1M HCl at 70 °C for different times. Capsules of Cymbalta® containing enteric-coated pellets were ground and an amount of powder equivalent to 25 mg of DLX was dissolved in 100 mL acetonitrile. The solution was filtered and an aliquot was transferred into 50 mL volumetric flask and diluted with 0.1M HCl to 100 µg mL<sup>-1</sup> DLX. This solution was placed at 70 °C and evaluated for time intervals of 0, 5, 10, 15, 20, 25, and 30 min. Three samples were analyzed for each time interval. After the required time, aliquots of 1 mL were transferred to a 10 mL volumetric flask then neutralized with 1 mL 0.1 M NaOH. This solution was diluted with mobile phase to 10 µg mL<sup>-1</sup> for the LC determinations.

Stock solutions (100 µg mL<sup>-1</sup>) of DLX capsules in acetonitrile were prepared. The kinetics of photodegradation was performed exposing the solutions contained in quartz cells in the chamber (Section 2.4.1). The UVC radiation was carried out for 0, 2, 4, 6, 8, 10, and 12 min. Three samples were analyzed for each time interval. After the required time, aliquots of 1 mL were transferred to a 10 mL volumetric flask and diluted with mobile phase to 10 µg mL<sup>-1</sup> for the LC determinations.

The concentrations of the remaining DLX determined at the different time intervals in kinetics determination were used in the plots. The plots were (a) values of concentration against time (zero-order kinetics), (b) ln of concentration versus time (first-order kinetics), and (c) reciprocal of concentration versus time (second-order kinetics). The kinetic parameters such as apparent order degradation rate constant ( $k$ ), half-life ( $t_{1/2}$ ) and  $t_{90}$  were obtained.

## 3. Results and Discussion

### 3.1 Development of LC method

Regulatory agencies recommend the use of stability-indicating methods (16) for the analysis of stability samples (17). Thus, stress studies are required in order to generate the stressed samples, method development and method validation (18). In

order to separate DLX and degradation products produced under stressed conditions, different mobile phases were used and adjusted to obtain a rapid and simple assay method with a reasonable run time, suitable retention time and the sharpness of the peak. Distinct proportions of organic solvent (methanol and acetonitrile) were evaluated and the acetonitrile was chosen because it improved the retention time and symmetry of DLX peak. Buffer pH played a major role in separating all the degradation products of DLX. When the pH of the buffer was adjusted to 3.0 with phosphoric acid solution, the tailing factor of the DLX peak was 0.7 and the retention time of DLX was around 4 min. Besides, some of its degradation products were co-eluted. When pH increased towards basic side (pH 6.0) and triethylamine was added in the mobile phase, the symmetry of the DLX peak and retention time were improved. The resolution among all its degradation products was also improved. Thus, the mobile phase was established by mixing aqueous 50 mM sodium phosphate buffer (pH 6.0 containing 0.3% triethylamine) and acetonitrile (60:40, v/v). The literature has demonstrated a stability-indicating LC method for determination of DLX using the complex mixture of aqueous 0.1% trifluoroacetic acid, methanol, tetrahydrofuran (60:20:20, v/v/v) as mobile phase (12). However, the mobile phase established in our study is very simple.

## **3.2 Method validation**

### **3.2.1 Specificity**

Forced degradation or stress testing is undertaken to demonstrate specificity when developing stability-indicating methods, particularly when little information is available about potential degradation products. The ICH guideline entitled “Stability Testing of New Drug Substances and Products” requires the stress testing to be carried out to elucidate the inherent stability characteristics of the active substances (14). Stress testing of the drug substance can help identify the likely degradation products, which can in turn help establish the degradation pathways and the intrinsic stability of the molecule and validate the stability-indicating power of the analytical procedures used. Hydrolytic and photolytic stabilities as well as susceptibility to oxidation are required. The use of an ideal stability-indicating method quantifies the drug per se and also resolves its degradation products.

Stress degradation studies on DLX revealed the drug behavior, as summarized in chromatograms (Fig. 2a-h). Upon heating the drug in 0.1 M NaOH at 70 °C for 2 h, 20% fall in the original drug peak area was observed and no additional peaks were observed in the chromatograms (Fig. 2c). However, when the drug was exposed to acid, UVC radiation and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> degradation products were obtained (Fig. 2d-h). In acidic conditions (0.01M HCl or 0.1M HCl) the generation of a main degradation product, A1 in 13.8 min (Fig 2 d-e), was observed. Duloxetine hydrochloride is unstable and degrades rapidly (~ 15% per hour) when exposed to acidic conditions and consequently, the finished pharmaceutical dosage form is a gelatin capsule containing enteric-coated pellets (19). DLX was rapidly degraded in acid medium and the main degradation product was observed (A1). It was symmetric (Tailing factor= 1.1) and well resolved from the drug peak (*RS*= 17.6). The increase concentration of acid raised the formation of main degradation product and the area of DLX decreased drastically (Fig. 2e).

Fig. 2a-h

The DLX solution was exposed to chemical oxidation with 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 1h or 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 15 min, the chromatographic peak corresponding to the parent drug diminishes about 90 and 70%, respectively. Besides, no generation of the degradation products could be observed under these experimental conditions (Fig. 2f-g). The exposure of the drug to short-wavelength UVC radiation resulted in its rapid decomposition, and three unidentifiable products, P1, P2 and P3 were obtained (Fig. 2h). Thus, our study demonstrated that DLX was degraded in acid medium, in the presence of hydrogen peroxide and light UVC radiation too (Fig. 2c-g). Nevertheless, Srinivasulu et al. (2009) observed DLX degradation only under acid hydrolysis, and determined that under other stress conditions this drug was found to be stable.

The excipients of Cymbalta<sup>®</sup> capsule did not cause interference in the DLX analysis, which indicated the specificity of the method (Fig. 2b). The peak purity indices of the drug in all stressed solutions, determined with a PDA detector under the optimized chromatographic conditions, were found to be higher than 0.9997. This demonstrated that it was pure in all cases indicating that no additional peaks were

co-eluting with the DLX and evidencing the ability of the method to assess unequivocally the drug of interest in the presence of potential interferences. In order to consider an assay method specific, it should demonstrate that it could separate and quantify the drug from a physical mixture of the drug, degradation products and excipients.

### 3.2.2 Robustness

The robustness of the method was examined by small variations of critical parameters, and percent of DLX, retention time ( $R_t$ ), number of theoretical plates/meter ( $N$ ), tailing factor ( $T$ ), and retention factor ( $k$ ) were evaluated (Table 1).

Table 1

The robustness study has been proved that in every employed condition, the chromatographic parameters agreed with established values and the assay data remained acceptable (14). A tailing factor of 1 refers to a symmetric peak. The calculated values for the tailing factor for each chromatographic condition were in the acceptable range of  $0.8 \leq T \leq 1.5$  (15). The retention factor should be in the range of  $0.5 < k < 10$  (20). The  $k$  values obtained around 2.0 indicating optimum separation and the number of theoretical plates demonstrated the measure the column efficiency in different conditions. Flow rate (0.8 and 1.2 mL min<sup>-1</sup>) and percent of acetonitrile (45 and 50%) resulted in changes in the retention time in comparison with the proposed normal condition. However, no significant changes were observed regarding quantitation of DLX.

### 3.2.3 Linearity, LOD and LOQ

The standard curves for DLX were constructed and demonstrated to be linear in the concentration range of 4-14.0 µg mL<sup>-1</sup>. The representative linear equation was  $y=165.57x-30.1349$ , where  $x$  is the concentration (µg mL<sup>-1</sup>) and  $y$  is the peak area. The standards deviation of slope and intercept were 0.8713 and 8.387, respectively. The correlation coefficient was  $r= 0.9998$ . Linearity data were validated by the analysis of variance (ANOVA), which demonstrated significant linear regression and

no significant linearity deviation ( $p < 0.05$ ). LOD and LOQ were 0.26 and 0.78  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , respectively. These low values obtained were indicative of the high sensitivity of the method.

### **3.2.4 Precision**

Precision values obtained for the determination of DLX in samples with their RSD are shown in Table 2.

Table 2

The variability of the results for determination of DLX was low. RSD values were lower than 1.1% for intra-day, and values for inter-day were 0.85% for DLX in pharmaceutical dosage form, confirming the good precision of the method.

### **3.2.5 Accuracy**

Accuracy was evaluated by the simultaneous determination of the analytes in solutions prepared by the standard addition method. Three different concentrations of DLX standard were added to Cymbalta<sup>®</sup> capsule solution. The mean recovery was found to be 100.56% (Table 3) and this value showed that the method was accurate.

Table 3

### **3.2.6 System suitability test**

The system suitability parameters evaluated, under the experimental conditions, showed a single peak of the drug around 7.3 min (Fig. 2a), tailing factor ( $T= 1.35$ ) and number of theoretical plates ( $N= 13,000$ ), as well as the peak area relative-standard deviation (RSD= 0.8%,  $n = 6$ ).

### 3.3 Kinetic determinations

Most of the degradation reactions of pharmaceuticals occur at finite rates and are chemical in nature. These reactions are affected by conditions such as solvent, concentration of reactants, temperature, pH of the medium, radiation energy, and the presence of catalysts. The order of the reaction is described based on the reaction rate and on the concentration of the reactant. The degradation of most pharmaceuticals can be classified as zero order, first order or pseudo-first order (21). Thus, kinetic studies of decomposition of drugs using stability testing techniques are essential for the quality control of such products. In our study, the kinetic investigation of acid degradation and photodegradation was carried out.

The values of concentration,  $\ln$  of concentration and reciprocal of concentration of the remaining drug versus time for kinetic determination under acid condition are shown in Table 4. Through the evaluation of the correlation coefficients, it could be concluded that the acid degradation of DLX in 0.1M HCl solution showed an apparent zero-order kinetics ( $r= 0.9995$ ) under the experimental conditions applied. The calculated zero-order degradation rate constant was  $k = 0.177 \text{ min}^{-1}$ ,  $t_{1/2}= 29.0 \text{ min}$  and  $t_{90}= 5.8 \text{ min}$  were obtained.

The solutions employed in the kinetic determination of the photodegradation developed a yellow color and were found to be around 57.0% of DLX, degraded in 12 min. The values of concentration,  $\ln$  of concentration and reciprocal of concentration of the remaining drug versus time are shown in Table 5. The correlation coefficient ( $r$ ) observed under the experimental conditions applied in photodegradation study was 0.9913. It was obtained in the course of this kinetic determination when the  $\ln$  of concentration of drug remaining versus time was plotted. Therefore, the kinetic model for first-order degradation process was confirmed. The calculated first-order degradation rate constant was carried out and  $k = 0.082 \text{ min}^{-1}$ ,  $t_{1/2}= 8.5 \text{ min}$  and  $t_{90}= 1.2 \text{ min}$  were obtained.

Table 3 and 4

## 5. Conclusion

This paper has reported for the first time a simple analytical method for quantitative determination of DLX in pharmaceutical dosage form. The developed and validated LC method according to guidelines was simple, specific, linear, precise, accurate, and stability-indicating. DLX was rapidly degraded in acid medium, in the presence of hydrogen peroxide and light UVC radiation, while it was more stable in alkali medium. The acid degradation showed apparent zero-order kinetics and the photodegradation demonstrated apparent first-order kinetics. Kinetic parameters of degradation rate constant,  $t_{1/2}$  and  $t_{90}$  could be predicted. The proposed LC method presented the ability to separate DLX from all its degradation products and therefore can be applied in stability testing of the commercially available DLX capsules.

## ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank CNPq (Brazil) as well as Elli Lilly (Brazil) for supplying the duloxetine hydrochloride reference standard.

## REFERENCES

- [1] Shelton, R.C., Prakash, A., Mallinckrodt, C.H., Wohlrreich, M.M., Raskin, J., Robinson, M.J., Detke, M.J. (2007) *Int J Clin Pract* **61**, 1337-1348.
- [2] Hunziker, M.E., Suehs, B.T., Bettinger, T.L., Crismon, M.L. (2005) *Clin Ther* **27(8)**, 1126-1143.
- [3] Ma, N., Zhang, B.K., Li, H.D., Chen, B.M., Xu, P., Wang, F., Zhu, R.H., Feng, S., Xiang, D.X., Zhu, Y.G. (2007) *Clin Chim Acta* **380**, 100-105.
- [4] Satonin, D.K., Mcculloch, J.D., Kuo, F., Knadler, M.P. (2007) *J Chromatogr B* **852**, 582-589.
- [5] Selvan, P.S., Gowda, K.V., Mandal, U., Solomon, W.D.S., Pal, T.K. (2007) *J Chromatogr B* **858**, 269-275.
- [6] Johnson, J.T., Oldham, S.W., Lantz, R.J., Delong, A.F. (1996) *J Liq Chromatogr Related Technol* **19(10)**, 1631-1641.
- [7] Malfará, W.R., Bertucci, C., Queiroz, M.E.C., Carvalho, S.A.D., Bianchi, M.L.P., Cesarino, E.J., Crippa, J.A., Queiroz, R.H.C. (2007) *J Pharm Biomed Anal* **44**, 955-962.



- [8] Mercolini, L., Mandrioli, R., Cazzolla, R., Amore, M., Raggi, M.A. (2007) *J Chromatogr B* **856**, 81-87.
- [9] Yang, J., Lu, X., Bi, Y., Qin, F., Li, F. (2007) *Chromatographia* **66**, 389-393.
- [10] Soni, P., Mariappan, T.T., Banerjee, U.C. (2005) *Talanta* **67**, 975-978.
- [11] Olsen, B.A., Argentine, M.D. (1996) *J Liq Chromatogr Related Technol* **19(12)**, 1993-2007.
- [12] Srinivasulu, P., Srinivas, K.S.V., Reddy, R.S., Mukkanti, K., Buchireddy, R. (2009) *Die Pharmazie* **64**, 10-13.
- [13] ICH (2005) International Conference on Harmonization. Validation of analytical methods text and methodology Q2 (R1), Switzerland.
- [14] ICH (2003) International Conference on Harmonization. Stability testing of new drug substances and products Q1A (R2), Switzerland.
- [15] The United States Pharmacopeia 31st (2008), Rockville, MD.
- [16] FDA, Center For Drug Evaluation And Research (CDER), Center For Biologics Evaluation And Research (CBER), Guidance For Industry. Analytical Procedures And Methods Validation (Chemistry, Manufacturing, And Controls Documentation), Rockville, USA, 2000.
- [17] Bakshi, M., Singh, S. (2002) *J Pharm Biomed Anal* **28**, 1011–1040.
- [18] Swartz, M., Krull, I. (2005) *LC-GC* **23**, 586–593.
- [19] Wells, K.A., Losin, W.G. (2008) *Clin Ther* **30(7)**, 1300-1308.
- [20] Snyder, L.R., Kirkland, J.J., Glajch, J.L. (1997) *Practical HPLC Method Development*, 2<sup>nd</sup> edition, John Wiley & Sons, Inc.
- [21] Ahuja, S. (2007) *Adv. Drug Del. Rev.* **59**, 3-11.

## Figure legends

Fig. 1. The chemical structure of duloxetine hydrochloride

Fig. 2a–h. Chromatograms obtained from DLX ( $10.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ ): DLX reference substance (a); DLX reference standard (b1), DLX capsule (b2) and excipients simulated sample (b3); basic hydrolysis 0.1 M NaOH 2h (c); acid hydrolysis 0.01 M HCl 30 min and degradation product A1 (d); acid hydrolysis 0.1 M HCl 30 min and degradation product A1 (e); oxidative degradation 30%  $\text{H}_2\text{O}_2$  15 min (f); oxidative degradation 3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  1 h (g); photodegradation 30 min and degradation products P1, P2 and P3 (h). Chromatographic conditions: ACE<sup>®</sup> C18 column (250 × 4.0 mm, 5  $\mu\text{m}$ ); 50 mM potassium phosphate buffer (pH 6.0 containing 0.3% triethylamine) and acetonitrile (60:40, v/v), flow rate  $1.0 \text{ mL min}^{-1}$ ; UV detection at 230 nm.

## Table legends

Table 1. Robustness experiments of LC method for determination of DLX.

Table 2. Inter and intra-day assay variation of DLX by proposed method.

Table 3. Recovery of standard solution added to commercially available sample.

Table 4. Kinetics of acid degradation in 0.1M HCl for DLX solution.

Table 5. Kinetics of photodegradation for DLX solution.

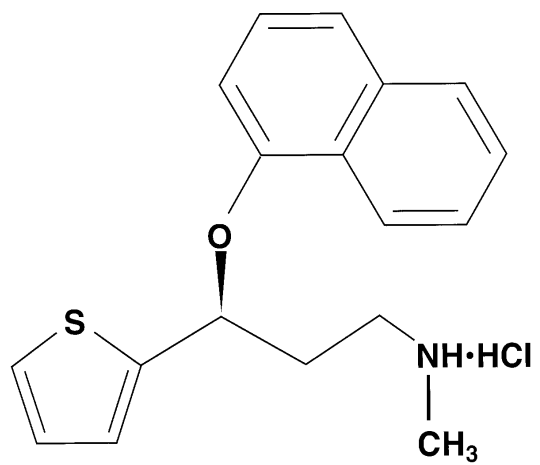


Fig. 1.

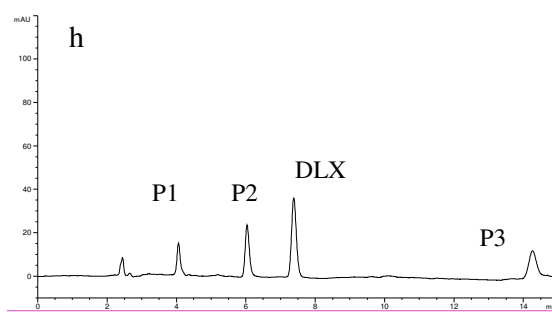
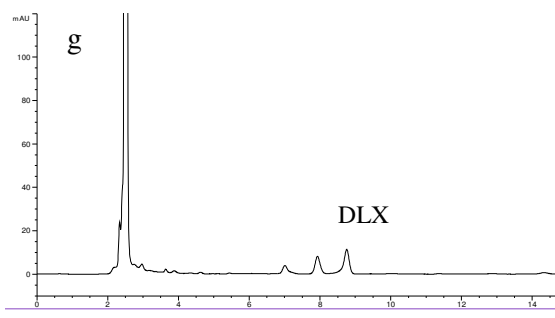
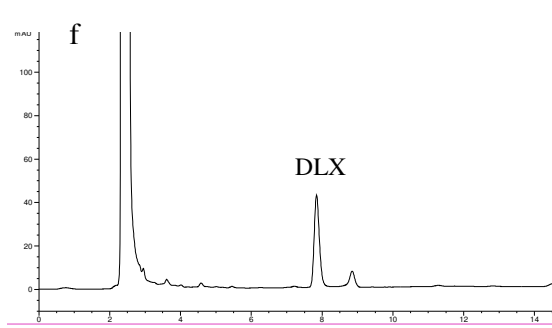
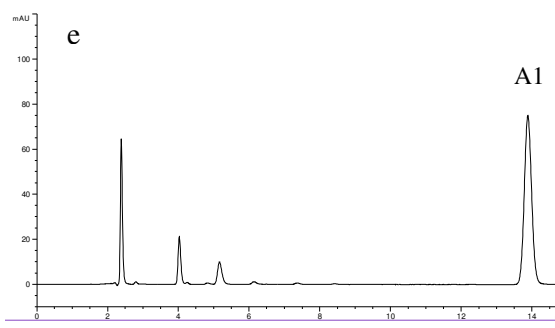
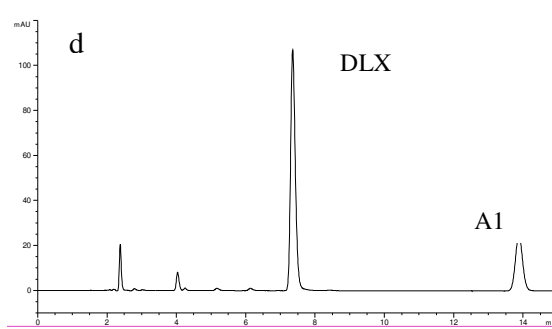
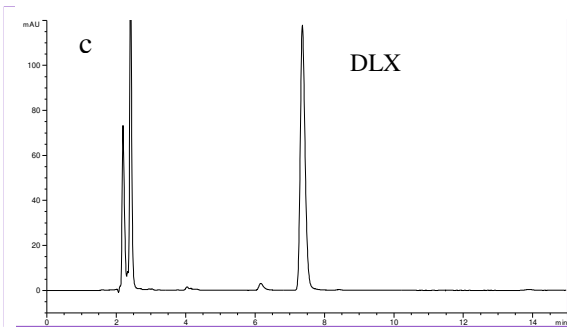
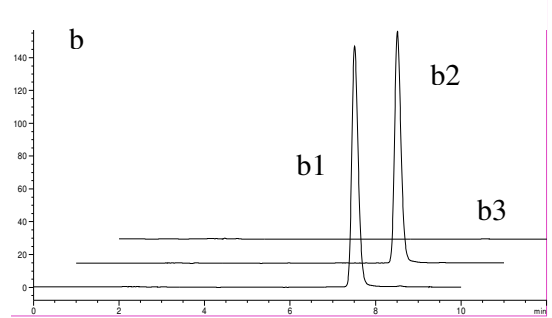
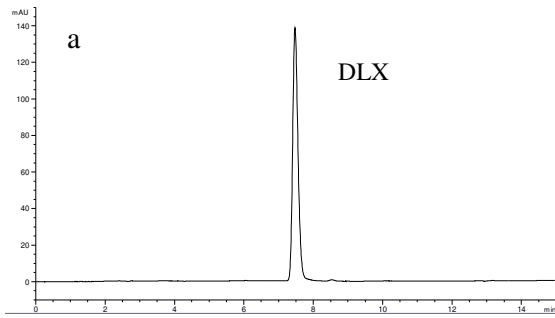


Fig. 2a-h.

Table 1.

Chromatographic parameter	Condition	DLX (%)	$R_t^a$ DLX (min)	$N^b$	$T^c$	$k^d$
Wavelength (nm)	225	99.32	7.117	11,598	1.08	1.86
	235	99.23	7.133	11,650	1.08	1.86
Temperature (°C)	20	99.99	7.153	11,714	1.35	1.87
	30	99.47	7.100	11,542	1.33	1.85
Flow rate (mL min <sup>-1</sup> )	0.8	100.38	9.183	14,781	1.37	1.95
	1.2	100.65	6.187	12,764	1.33	1.98
Acetonitrile (%)	45	100.95	5.305	12,631	1.34	1.13
	50	100.87	6.285	12,867	1.31	1.91
pH buffer solution	5.5	100.20	7.138	13,956	1.33	1.86
	6.5	99.95	7.841	12,998	1.41	2.15
	Normal <sup>e</sup>	100.22	7.305	13,382	1.35	1.92

<sup>a</sup>  $R_t$ : retention time

<sup>b</sup>  $N$ : number of theoretical plates/meter

<sup>c</sup>  $T$ : tailing factor

<sup>d</sup>  $k$ : retention factor

<sup>e</sup> Normal condition (mobile phase): ACE<sup>®</sup> C18 column (250 × 4.0 mm, 5 μm); 50 mM potassium phosphate buffer (pH 6.0 containing 0.3% triethylamine) and acetonitrile (60:40, v/v), flow rate 1.0 mL min<sup>-1</sup>; UV detection at 230 nm

Table 2.

Sample (mg/capsule)	Days	Experimental amount (mg)	Value DLX (%)	RSD <sup>a</sup> Intra-day (%)	RSD <sup>b</sup> Inter-day (%)
60 mg	1	60.85	101.41	1.07	
	2	60.09	100.15	0.89	0.85
	3	59.86	99.77	0.79	

<sup>a</sup> Mean of six samples in triplicate (n=6)

<sup>b</sup> n=18

Table 3.

Amount added ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	Amount found ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	% Recovery <sup>a</sup> $\pm$ RSD%	Mean % Recovery
2.0	2.01	100.50 $\pm$ 1.16	
4.0	4.00	100.00 $\pm$ 0.21	100.56
6.0	6.07	101.17 $\pm$ 0.26	

<sup>a</sup> Each value is a mean of three determinations.



Table 4.

Time (min)	Concentration of DLX ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	In Concentration	1/Concentration
0	10.25	2.327	0.098
5	9.36	2.236	0.107
10	8.51	2.141	0.118
15	7.64	2.034	0.131
20	6.71	1.904	0.149
25	5.70	1.741	0.175
30	4.99	1.608	0.200
<i>r</i>	0.9995*	0.9944	0.9797

\*Zero-order kinetics ( $k = 0.177 \text{ min}^{-1}$ ,  $t_{1/2} = 29.0 \text{ min}$  and  $t_{90} = 5.8 \text{ min}$ )

Table 5.

Time (min)	Concentration of DLX ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	In Concentration	1/Concentration
0	10.31	2.333	0.997
2	8.65	2.158	0.116
4	7.47	2.010	0.134
6	6.07	1.803	0.165
8	5.55	1.714	0.180
10	4.43	1.488	0.226
12	4.32	1.463	0.231
<i>r</i>	0.9779	0.9913	0.9897

\* First-order kinetics ( $k = 0.082 \text{ min}^{-1}$ ,  $t_{1/2} = 8.5 \text{ min}$  and  $t_{90} = 1.2 \text{ min}$ )

