

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

**CLORIDRATO DE MILNACIPRANA CÁPSULAS:**  
METODOLOGIA ANALÍTICA, ENSAIO DE DISSOLUÇÃO E  
ESTUDO DE ESTABILIDADE

CAROLINA LUPI DIAS

Porto Alegre, 2011



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

**CLORIDRATO DE MILNACIPRANA CÁPSULAS:**  
METODOLOGIA ANALÍTICA, ENSAIO DE DISSOLUÇÃO E  
ESTUDO DE ESTABILIDADE

Tese apresentada por Carolina Lupi Dias  
para obtenção do TÍTULO DE DOUTOR em  
Ciências Farmacêuticas

Orientador: Prof. Dr. Pedro Eduardo Fröhlich

Porto Alegre, 2011

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 08.04.2011, pela Comissão Examinadora constituída por:

Profa. Dra. Clarice Madalena Bueno Rolim

Universidade Federal de Santa Maria - UFSM

Profa. Dra. Edna Sayuri Suyenaga

Universidade FEEVALE

Prof. Dr. Martin Steppe

Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS

#### CIP - Catalogação na Publicação

Dias, Carolina Lupi  
Cloridrato de milnaciprana cápsulas: metodologia analítica, ensaio de dissolução e estudo de estabilidade / Carolina Lupi Dias. -- 2011.  
97 f.

Orientador: Pedro Eduardo Fröhlich.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-RS, 2011.

1. cloridrato de milnaciprana cápsulas. 2. validação de métodos analíticos. 3. teste de dissolução. 4. produtos de degradação. I. Fröhlich, Pedro Eduardo, orient. II. Título.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Química Farmacêutica com apoio do Laboratório de Controle de Qualidade do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da UFRGS, com bolsa de estudos concedida pelo CNPq.



*"Acreditar sempre ...  
desistir jamais"*



## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Pedro Eduardo Fröhlich agradeço a confiança, a disponibilidade e aos esclarecimentos prestados durante a orientação do mestrado e do doutorado.

À Profa. Dra. Ana Maria Bergold, pelo carinho, atenção e aos esclarecimentos prestados.

Ao Laboratório de Química Farmacêutica da Faculdade de Farmácia (UFRGS) que disponibilizou os equipamentos e material necessários para a realização dos experimentos propostos para o desenvolvimento da tese.

Aos professores do Laboratório de Química Farmacêutica: Dr. Jarbas Alves Montanha e Dra. Simone Gnoatto pelo apoio e ótima convivência.

Ao Laboratório da Central Analítica da Faculdade de Farmácia (UFRGS) pela execução das análises de *DSC*.

Ao Laboratório de Controle de Qualidade da Faculdade de Farmácia (UFRGS) por disponibilizar o equipamento de eletroforese capilar (EC), especialmente ao colega e amigo Clésio, pelo apoio e disponibilidade constantes no auxílio para o desenvolvimento e validação do método.

Aos queridos amigos e colegas do Laboratório de Química Farmacêutica: Rochele, Lisiane, Ana Paula, Marcella, Pâmela, Tamara, César, Leonardo, Sirlei, Luiz (*in memoriam*), Marquinho, Andréia L., Andréa P., Cristiane e Fernanda, pelo apoio, convivência (quase diária) e principalmente pela amizade.

Um agradecimento especial à Pâmela, pelo apoio e auxílio na execução de experimentos práticos no desenvolvimento e na validação do método EC.

À minha família, pelo apoio, compreensão e amor incondicionais!!!



## SUMÁRIO

<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	xv
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	xix
<b>LISTA DE QUADROS</b> .....	xxi
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	xxiii
<b>RESUMO</b> .....	xxv
<b>ABSTRACT</b> .....	xxvii
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	5
2.1. <i>Objetivos gerais</i> .....	7
2.2. <i>Objetivos específicos</i> .....	7
<b>3. REVISÃO</b> .....	9
3.1 <i>Aspectos gerais</i> .....	11
3.1.1 Transtorno depressivo maior.....	11
3.1.2 Fibromialgia.....	15
3.2 <i>Antidepressivos</i> .....	17
3.2.1 Cloridrato de milnaciprana.....	18
3.2.1.1 Descrição.....	19
3.2.1.2 Apresentação, dosagem e administração.....	22
3.2.1.3 Características farmacológicas.....	23
3.2.1.4 Farmacocinética.....	24
3.3 <i>Métodos analíticos</i> .....	26
3.4 <i>Dissolução de medicamentos</i> .....	27
3.5 <i>Validação de método analítico</i> .....	30
3.6 <i>Estudo de degradação forçada</i> .....	31
3.6.1 Cinética de degradação.....	33

<b>4. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>35</b>
4.1. <i>Matéria-prima e produto farmacêutico.....</i>	37
4.2. <i>Caracterização da substância química de referência (SQR).....</i>	37
4.2.1. Caracteres físicos.....	37
4.2.2. Solubilidade.....	37
4.2.3. Determinação de umidade.....	37
4.2.4 Ponto de fusão.....	37
4.2.5 Calorimetria exploratória diferencial (DSC).....	38
4.2.6 Rotação específica.....	38
4.2.7 Espectrofotometria na região do infravermelho (IV).....	39
4.3 <i>Análise quantitativa do produto acabado.....</i>	39
4.3.1 Espectrofotometria derivada na região do ultravioleta (UV-D).....	39
4.3.1.1 Validação do método UV-D <sup>2</sup> para determinação do MNC na forma farmacêutica cápsula.....	39
4.3.1.1.1 Especificidade.....	39
4.3.1.1.2 Linearidade.....	40
4.3.1.1.3 Precisão.....	41
4.3.1.1.4 Exatidão.....	42
4.3.2. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	43
4.3.2.1 Equipamento e condições cromatográficas.....	43
4.3.2.2 Validação do método CLAE para determinação do MNC na forma farmacêutica cápsula.....	44
4.3.2.2.1 Especificidade.....	44
4.3.2.2.1.1 Avaliação da interferência dos excipientes da formulação.....	44
4.3.2.2.1.2 Avaliação da interferência dos potenciais produtos de degradação.....	45
4.3.2.2.2 Linearidade.....	46
4.3.2.2.3 Precisão.....	46
4.3.2.2.4 Exatidão.....	47
4.3.2.2.5 Robustez.....	48
4.3.3 Eletroforese capilar (EC).....	49
4.3.3.1 Equipamento e condições de análise eletroforética.....	49

4.3.3.2 Validação do método EC para determinação do MNC na forma farmacêutica cápsula.....	50
4.3.3.2.1 Especificidade.....	50
4.3.3.2.1.1 Avaliação da interferência dos excipientes da formulação.....	51
4.3.3.2.1.2 Avaliação da interferência dos potenciais produtos de degradação.....	52
4.3.3.2.2 Linearidade.....	52
4.3.3.2.3 Precisão.....	53
4.3.3.2.4 Exatidão.....	54
4.3.3 Comparação estatística entre os métodos UV-D <sup>2</sup> , CLAE e EC.....	55
4.4 <i>Ensaio de dissolução</i> .....	55
4.4.1 Teste de solubilidade.....	56
4.4.2 Condições do ensaio de dissolução.....	56
4.4.3 Estabilidade do fármaco no meio de dissolução.....	57
4.4.4 Validação do método de dissolução.....	57
4.4.4.1 Validação do método UV-D <sup>2</sup> e CLAE para determinação do MNC no ensaio de dissolução.....	57
4.4.4.1.1 Solução MNC SQR.....	57
4.4.4.1.2 Especificidade.....	57
4.4.4.1.3 Linearidade.....	58
4.4.4.1.4 Exatidão e precisão.....	58
4.4.5 Comparação dos perfis de dissolução.....	59
4.4.6 Cinética de dissolução.....	59
4.4.7 Influência das condições de armazenamento no perfil de dissolução.....	60
4.5 <i>Estudos de degradação forçada para o cloridrato de milnaciprana</i> .....	60
4.5.1 Fotodegradação.....	61
4.5.1.1 Cinética da fotodegradação.....	61
4.5.2 Degradação por oxidação.....	62
4.5.2.1 Cinética da oxidação.....	62
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	63
5.1. <i>Caracterização da substância química de referência (SQR)</i> .....	65
5.1.1. Caracteres físicos.....	65

5.1.2. Solubilidade.....	65
5.1.3. Determinação de umidade.....	65
5.1.4 Ponto de fusão.....	65
5.1.5 Calorimetria exploratória diferencial ( <i>DSC</i> ).....	66
5.1.6 Rotação específica.....	67
5.1.7 Espectrofotometria na região do infravermelho (IV).....	68
5.2 <i>Análise quantitativa do produto acabado</i> .....	70
5.2.1 Espectrofotometria derivada na região do ultravioleta (UV-D).....	70
5.2.1.1 Validação do método UV-D <sup>2</sup> para a forma farmacêutica cápsula.....	71
5.2.1.1.1 Especificidade.....	72
5.2.1.1.2 Linearidade.....	73
5.2.1.1.3 Precisão.....	75
5.2.1.1.4 Exatidão.....	76
5.2.2 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	77
5.2.2.1 Validação do método CLAE para a forma farmacêutica cápsula.....	78
5.2.2.1.1 Especificidade.....	78
5.2.2.1.2 Linearidade.....	80
5.2.2.1.3 Precisão.....	81
5.2.2.1.4 Exatidão.....	82
5.2.2.1.5 Robustez.....	82
5.2.3 Eletroforese capilar (EC).....	83
5.2.3.1 Validação do método EC para a forma farmacêutica cápsula.....	85
5.2.3.1.1 Especificidade.....	85
5.2.3.1.2 Linearidade.....	88
5.2.3.1.3 Precisão.....	89
5.2.3.1.4 Exatidão.....	90
5.2.4 Análise comparativa dos métodos propostos para determinação do cloridrato de milnaciprana em cápsulas.....	90
5.3 <i>Ensaio de dissolução</i> .....	92
5.3.1 Teste de solubilidade.....	92
5.3.2 Estabilidade do fármaco no meio de dissolução.....	93

5.3.3 Validação do método UV-D <sup>2</sup> e CLAE para determinação do MNC no ensaio de dissolução.....	93
5.3.3.1 Especificidade.....	93
5.3.3.2 Linearidade.....	95
5.3.3.3 Exatidão e precisão.....	96
5.3.4 Comparação e cinética dos perfis de dissolução.....	97
5.3.5 Influência das condições de armazenamento no perfil de dissolução.....	99
5.4 <i>Estudos de degradação forçada para o cloridrato de milnaciprana</i> .....	100
5.4.1 Fotodegradação.....	101
5.4.1.1 Cinética da fotodegradação.....	102
5.4.2 Degradação por oxidação.....	104
5.4.2.1 Cinética da oxidação.....	105
<b>6. CONCLUSÕES</b> .....	107
<b>7. REFERÊNCIAS</b> .....	113
<b>8. ANEXOS</b> .....	127



## LISTA DE ABREVIATURAS

5-HTT – transportador de serotonina

ANOVA – análise de variância

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ATR – acessório de refletância atenuada

AVC – acidente vascular cerebral

CAS – *chemical abstracts service*

CEC – *capillary electrochromatography*

CIVIV – correlação *in vivo-in vitro*

CLAE – cromatografia líquida de alta eficiência

$C_{m\acute{a}x}$  – concentração plasmática máxima

CYP / CYP450 – enzimas citocromo P<sub>450</sub>

CYP2D6 / CYP2C19 – isoenzimas do grupo CYP

DAD – detector de arranjo de fotodiodos

DCB – denominação comum brasileira

DPR – desvio padrão relativo

DSC – calorimetria exploratória diferencial

EC – eletroforese capilar

ECT – terapia eletroconvulsiva / eletroconvulsoterapia

ED – eficiência da dissolução

FFSOLI – formas farmacêuticas orais sólidas de liberação imediata

FL – fluorescência (detector)

ICH - International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use

IMAO – inibidores de monoaminoxidase

IRSN – inibidor de recaptção de serotonina e noradrenalina

ISRS – inibidor seletivo de recaptção de serotonina

IV – espectrofotometria na região do infravermelho

MAO – monoaminoxidase

MECK – *micellar electrokinetic capillary chromatography*

MNC – cloridrato de milnaciprana

MS – espectrometria de massas (detector)

NET – transportador de norepinefrina

NMDA – ácido N-metil-D-aspártico

OMS – organização mundial da saúde

PD1 / PD2 – produtos da fotodegradação do MNC

PD<sub>ox</sub> – produto da oxidação do MNC

REA – relação estrutura-atividade

RMN - ressonância magnética nuclear

SCB – sistema de classificação biofarmacêutica

SNC – sistema nervoso central

SQR – substância química de referência

t<sub>80%</sub> - tempo para dissolução de 80% do fármaco

TDM – transtorno depressivo maior

$T_{\text{máx}}$  – tempo para alcance da  $C_{\text{máx}}$

UV – espectrofotometria na região do ultravioleta

UV-D – ultravioleta derivada

UV-D<sup>2</sup> – ultravioleta derivada de segunda ordem



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fórmula estrutural do cloridrato de milnaciprana.....	19
Figura 2 – Estereoisômeros estruturais da milnaciprana.....	20
Figura 3 – Produtos da síntese estereoseletiva:(±) – milnaciprana, seus análogos restritos conformacionalmente e seus.....	21
Figura 4 – Derivados da milnaciprana avaliados quanto a REA na inibição do transporte de monoaminas.....	21
Figura 5 – Resumo do estudo de RMN da milnaciprana e simulação computacional da conformação requerida para inibição do transportador de membrana celular específico para norepinefrina.....	22
Figura 6 – Perfil farmacocinético da milnaciprana após dose oral única de 50 mg.....	29
Figura 7 - Calorimetria exploratória diferencial do cloridrato de milnaciprana SQR.....	67
Figura 8 - Espectro de absorção na região do IV para o cloridrato de milnaciprana.....	69
Figura 9 - Espectros na região do UV em HCl 0,1M (60µg/mL): ordem zero, 2ª derivada: solução cápsulas; solução de MNC SQR; solução placebo.....	72
Figura 10 - Representação gráfica da curva padrão média do MNC SQR (UV-D <sup>2</sup> ).....	73
Figura 11 – Espectro UV-ordem zero e espectro UV-D <sup>2</sup> para soluções de MNC SQR de 20 a 100 µg/mL em HCl 0,1M.....	74
Figura 12 - Cromatograma da solução de MNC SQR (60 µg/mL), cromatograma da solução placebo, cromatograma da solução de MNC cápsulas .....	78
Figura 13 - Cromatogramas dos potenciais produtos de degradação. Oxidação e hidrólise alcalina - MNC SQR e MNC nas cápsulas.....	79
Figura 14 - Representação gráfica da curva padrão média do MNC SQR (CLAE).....	81
Figura 15 – Eletroferogramas obtidos através da análise por EC das soluções em ácido bórico (pH 8,0): MNC SQR (25 µg/mL), placebo, MNC cápsulas (50 µg/mL).....	86
Figura 16 - Eletroferograma da solução MNC SQR (50 µg/mL em ácido bórico pH 8,0): oxidação H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 3% (V/V) por 24 horas.....	87
Figura 17 - Eletroferograma da solução MNC SQR (50 µg/mL em ácido bórico pH 8,0): fotólise UV 254 nm por 2 horas.....	87
Figura 18 - Representação gráfica da curva padrão média do MNC SQR (EC).....	88

Figura 19 – Especificidade após teste de dissolução: espectro UV-ordem zero para solução MNC SQR e solução placebo em HCl 0,01M. Espectro UV-2ª ordem.....	94
Figura 20 – Especificidade após teste de dissolução em HCl 0,01M (37 °C): cromatogramas do placebo e do MNC SQR.....	94
Figura 21 – Perfil de dissolução das cápsulas de MNC 50 mg. Cestas (50 rpm), 900 mL HCl 0,01M (37 °C ± 0,5). Os valores são correspondentes à média de 12 determinações (± desvio padrão) por UV-D <sup>2</sup> e CLAE.....	98
Figura 22 – Alterações no perfil de dissolução das cápsulas de MNC após armazenamento. As curvas representam as taxas de dissolução após armazenamento em condição ambiente, armazenamento em condição ambiente, mas com prazo de validade vencido e após armazenamento a 40 °C e 75% U.R. por 2, e 4. semanas.....	100
Figura 23 – Cromatogramas das soluções MNC SQR (1 mg/mL): após degradação sob radiação UV 254 nm por 1 hora e 40 minutos e controle (não degradada).....	102
Figura 24 – Formação dos produtos de degradação majoritários, PD1 e PD2, do MNC exposto em placa de Petri à radiação UV 254 nm por 1 h e 40 min. Cada ponto representa a área percentual de cada produto de degradação formado, analisados por CLAE.....	102
Figura 25 – Representação gráfica da degradação por fotólise (UV 254 nm) do MNC analisado por CLAE: MNC SQR no estado sólido em placa de Petri, solução de MNC SQR em cubetas e solução do conteúdo das cápsulas de MNC em cubetas.....	103
Figura 26 – Cromatogramas das soluções MNC SQR após oxidação com peróxido de hidrogênio por 24 horas, com formação do produto de degradação (PDox.). Cromatogramas das soluções MNC SQR não degradada e do branco no estudo de oxidação do fármaco.....	104
Figura 27 – Influência da concentração do agente oxidante. Formação do produto de degradação majoritário PDox, após oxidação do MNC SQR 1 mg/mL por 24 horas.....	105
Figura 28 – Representação gráfica da degradação por oxidação do MNC analisado por CLAE.....	106

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Adaptação posológica para milnaciprana em caso de insuficiência renal..	25
Quadro 2 - Determinação de antidepressivos por CLAE.....	27
Quadro 3 - Ensaio necessários para a validação do método analítico, segundo sua finalidade.....	31
Quadro 4 - Soluções para o teste de recuperação por UV-D <sup>2</sup> ( $\lambda=268,5$ nm).....	42
Quadro 5 - Soluções para o teste de recuperação por CLAE.....	48
Quadro 6 – Alterações realizadas no método de CLAE para avaliação da robustez na determinação de MNC nas cápsulas.....	49
Quadro 7 – Condições analíticas utilizadas para a determinação do MNC por EC.....	50
Quadro 8 - Soluções para o teste de recuperação por EC.....	54
Quadro 9 – Modelos matemáticos para representar os perfis de dissolução.....	60



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Valores obtidos para o ponto de fusão (°C) do MNC SQR.....	66
Tabela 2 - Dados obtidos por <i>DSC</i> para o cloridrato de milnaciprana SQR.....	67
Tabela 3 - Frequências de absorção das principais bandas no infravermelho e suas respectivas atribuições para o cloridrato de milnaciprana.....	69
Tabela 4 - Valores de absorvância obtidos para a curva padrão do MNC SQR por UV-D <sup>2</sup> .....	75
Tabela 5 - ANOVA das absorvâncias determinadas para a obtenção da curva padrão do MNC SQR por UV-D <sup>2</sup> .....	75
Tabela 6 - Resultados obtidos na quantificação das amostras de MNC cápsulas por espectrofotometria UV-D <sup>2</sup> ( $\lambda=268,5$ nm) para avaliação da repetibilidade e da precisão intermediária.....	76
Tabela 7 - Resultados obtidos para o teste de recuperação do MNC SQR por espectrofotometria UV-D <sup>2</sup> ( $\lambda=268,5$ nm).....	76
Tabela 8 - Valores de área absoluta obtidos para a curva padrão do MNC SQR por CLAE.....	80
Tabela 9 - ANOVA das áreas absolutas determinadas para a obtenção da curva padrão do cloridrato de milnaciprana por CLAE.....	81
Tabela 10 - Resultados obtidos na quantificação das amostras de MNC cápsulas por CLAE para avaliação da repetibilidade e da precisão intermediária.....	82
Tabela 11 - Resultados obtidos para o teste de recuperação do MNCSQR por CLAE.....	82
Tabela 12 - Avaliação da robustez do método de CLAE para determinação do cloridrato de milnaciprana em fase móvel a 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ .....	83
Tabela 13 - Razão das áreas (MNC/PI) obtidos para a curva padrão do MNC SQR por EC.....	89
Tabela 14 - ANOVA para a curva padrão do cloridrato de milnaciprana por EC.....	89
Tabela 15 - Resultados obtidos na quantificação das amostras de MNC cápsulas por EC para avaliação da repetibilidade e da precisão intermediária.....	90
Tabela 16 - Resultados obtidos para o teste de recuperação do MNC SQR por EC....	90
Tabela 17 - ANOVA para a recuperação de MNC SQR em cápsulas por UV-D <sup>2</sup> , CLAE e EC.....	91

Tabela 18 - ANOVA para a determinação de MNC em cápsulas por UV-D <sup>2</sup> , CLAE e EC.....	91
Tabela 19 – Avaliação das diferenças das médias entre os métodos (teste de <i>Tukey</i> )	91
Tabela 20 - Teste de solubilidade para o cloridrato de milnaciprana.....	92
Tabela 21 – Estabilidade das soluções padrão e amostra após teste de dissolução...	93
Tabela 22 – Valores de área absoluta obtidos por CLAE para a curva padrão na determinação da % MNC liberado após teste de dissolução das cápsulas.....	95
Tabela 23 - Valores de absorvância obtidos por UV-D <sup>2</sup> para a curva padrão na determinação da % MNC liberado após teste de dissolução das cápsulas.....	95
Tabela 24 - ANOVA das áreas absolutas determinadas por CLAE para a obtenção da curva padrão na determinação da % MNC liberado após teste de dissolução das cápsulas.....	96
Tabela 25 - ANOVA das absorvâncias determinadas por UV-D <sup>2</sup> para a obtenção da curva padrão na determinação da % MNC liberado após teste de dissolução das cápsulas.....	96
Tabela 26 - Exatidão do teste de dissolução das cápsulas de MNC.....	97
Tabela 27 - Repetibilidade e precisão intermediária do teste de dissolução das cápsulas de MNC.....	97
Tabela 28 – Coeficiente de determinação ( $R^2$ ) e coeficiente de determinação ajustado ( $R^2_{ajustado}$ ) dos modelos matemáticos.....	99
Tabela 29 – Constantes de velocidade de reação (k) e tempo de vida útil ( $t_{90\%}$ ) para o MNC após fotólise UV254 nm.....	103
Tabela 30 – Resultados da análise por CLAE da quantidade remanescente de MNC SQR (500 µg/mL em etanol) após oxidação com peróxido de hidrogênio (3%, V/V).....	106

## RESUMO

### Cloridrato de milnaciprana cápsulas: metodologia analítica, ensaio de dissolução e estudo de estabilidade

O cloridrato de milnaciprana (MNC) é um inibidor da recaptação da serotonina e noradrenalina (IRSN), produzido na forma farmacêutica cápsula, Ixel<sup>®</sup>, Dalcipran<sup>®</sup> e Toledomin<sup>®</sup>, para o tratamento da depressão, e como comprimido, sob o nome comercial Savella<sup>®</sup>, indicado no manejo da fibromialgia. Levando-se em consideração que não existem métodos oficiais para o doseamento do MNC em produto acabado, faz-se necessário o desenvolvimento e validação de métodos para assegurar a qualidade da forma farmacêutica. Deste modo, o objetivo deste trabalho foi a validação de métodos analíticos para o controle de qualidade do MNC cápsulas e a realização de estudo da degradação forçada do fármaco. A identificação e caracterização do fármaco foram realizadas através da análise do ponto de fusão, DSC, rotação específica e IV. Para a quantificação foram validados, segundo normas da ICH, os métodos UV-D<sup>2</sup>, CLAE e EC. A análise estatística demonstrou equivalência entre os métodos UV-D<sup>2</sup> e CLAE, assim como entre CLAE e EC, para doseamento do MNC cápsulas. O teste de dissolução foi desenvolvido e validado utilizando cestas (50 rpm) em HCl 0,01M como meio de dissolução. A porcentagem de fármaco dissolvido foi determinada por ambos os métodos, CLAE e UV-D<sup>2</sup>. Os parâmetros cinéticos (ED% e  $t_{80\%}$ ) da dissolução foram determinados e o modelo de Hixson-Crowell é o que melhor descreve a cinética de dissolução das cápsulas. A influência das condições de armazenamento da formulação farmacêutica no perfil de dissolução também foi avaliada. No estudo de degradação forçada, o MNC foi submetido à radiação UV (254 nm) e à oxidação com peróxido de hidrogênio. A CLAE foi o método empregado na análise do teor e pureza das amostras submetidas às degradações. Os resultados demonstraram a sensibilidade do fármaco nas condições testadas, havendo redução significativa de seu teor e a formação de produtos de degradação. A fotodegradação do MNC demonstrou cinética de 1ª ordem para o fármaco no estado sólido e para a solução das cápsulas, enquanto para o fármaco em solução demonstrou cinética de ordem zero.

**Palavras-chaves:** cloridrato de milnaciprana cápsulas, CLAE, UV-D<sup>2</sup>, EC, teste de dissolução, validação de métodos analíticos, produtos de degradação.



## ABSTRACT

### **Milnacipran hydrochloride capsules: analytical methodology, dissolution test and study of stability**

Milnacipran hydrochloride (MNC) is a serotonin and noradrenaline reuptake inhibitor (SNRI), produced as capsules, Ixel<sup>®</sup>, Dalcipran<sup>®</sup> and Toledomin<sup>®</sup>, for the treatment of depression, and as tablets, under the trade name Savella<sup>®</sup>, indicated in the management of fibromyalgia. Considering that there are no official methods for the determination of the MNC capsules, it is necessary to develop and validate methods to ensure the quality of pharmaceutical formulation. Thus, the objective of this study was the validation of analytical methods for quality control of the MNC capsules and the forced degradation studies of the drug. The identification and characterization of the drug were performed by analyzing the melting point, DSC, specific rotation and IR. For the quantification were validated a second-derivative UV spectrophotometric (UV-D<sup>2</sup>), HPLC and a CE methods, according to ICH guide. Statistical analysis showed that the methods UV-D<sup>2</sup> / HPLC, and HPLC / CE were equivalent to assay MNC capsules. The dissolution test was developed and validated using baskets (50 rpm) in 0.01N HCl as dissolution medium. The percentage of dissolved drug was determined by both methods (HPLC and UV-D<sup>2</sup>). The kinetic parameters (dissolution efficiency% and t<sub>80%</sub>) of drug release were determined and the Hixson-Crowell model is which best describes the dissolution kinetics of the capsules. The influence of storage conditions of the pharmaceutical formulation in the dissolution rate was also evaluated. In forced degradation study, the MNC was subjected to UV (254nm) and oxidation with hydrogen peroxide. The HPLC method was employed to analyze the assay and purity of samples subjected to degradation. The results showed levels of the drug decreased significantly and the presence of its degradation products. The photodegradation of MNC showed first order kinetics of reaction to the drug at solid state and to capsules solution, but the drug solution presented zero order kinetics.

**Keywords:** Milnacipran hydrochloride capsules, HPLC, UV-D<sup>2</sup>, CE, dissolution test, validation of analytical methods, degradation products.



## 1. INTRODUÇÃO

---



De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), a depressão é um dos transtornos psiquiátricos mais comuns em serviços de atenção primária à saúde. No entanto, muitas vezes, não é diagnosticada e, quando o é, pode não receber manejo terapêutico adequado, pois o episódio depressivo caracteriza-se por apresentar, além dos sintomas emocionais, sintomas somáticos que acabam por se tornar o foco do diagnóstico e tratamento (DEL PORTO, 1999; BALDESSARINI, 2001; OPAS, 2004).

Cada vez mais o manejo da depressão deve ser feito no âmbito da atenção primária à saúde. O objetivo do tratamento antidepressivo é eliminar sintomas, recuperar a capacidade funcional e social e impedir a recorrência. O tratamento de primeira escolha para a maioria dos casos de depressão consiste de antidepressivos, psicoterapia ou uma combinação de ambos. Para formas mais leves de depressão, tratamentos psicológicos estão indicados. Nas formas mais graves, recomenda-se farmacoterapia, coadjuvada por abordagens psicológicas e, com frequência, nos casos de resistência ao tratamento, os pacientes respondem à terapia eletroconvulsiva (ECT) (OPAS, 2004; BALDESSARINI, 2006; WHO, 2006).

A farmacoterapia inclui antidepressivos específicos e inespecíficos. Os de uso corrente têm eficácia e velocidade de início de resposta clínica similares, mas diferem quanto à incidência de efeitos indesejáveis, que se apresenta menor para fármacos mais novos. Deste modo, a escolha dos antidepressivos não se baseia apenas na eficácia, mas em critérios como: segurança, tolerabilidade, toxicidade e superdosagem, resposta prévia de um paciente ou experiência do médico no manejo de um determinado fármaco, situações que exijam isenção ou menor grau de alguns efeitos adversos, além do custo (OPAS, 2004).

A serotonina e a noradrenalina são neurotransmissores responsáveis pelo equilíbrio das emoções e da percepção a estímulos dolorosos relacionados à depressão. O cloridrato de milnaciprana é um fármaco antidepressivo da classe dos inibidores não seletivos de recaptção de serotonina e noradrenalina (IRSN), considerado uma opção medicamentosa para o tratamento de estados depressivos em adultos (depressão maior em adultos) (ROCHE, 2001, 2008).

A utilização do cloridrato de milnaciprana no tratamento da fibromialgia foi pesquisada e estudos clínicos demonstraram efeitos terapêuticos significativos do fármaco para o tratamento da síndrome, que se caracteriza por um estado crônico e debilitante de dor e rigidez ao longo do corpo, acompanhado por fadiga severa, insônia e sintomas de humor. Estima-se que os efeitos da síndrome da fibromialgia afetam mais de seis milhões de pessoas somente nos Estados Unidos, sendo que, após a osteoartrite, é o segundo diagnóstico mais frequente na reumatologia clínica (FOREST LABORATORIES, 2009; MEDSCAPE, 2009).

O cloridrato de milnaciprana consta no *European Product Index*, que inclui os medicamentos aprovados pelos Estados membros da União Européia, sendo comercializado em países da Europa, América do Sul e Ásia para o tratamento da depressão e, recentemente, vem sendo utilizado nos EUA para o tratamento da síndrome da fibromialgia.

Considerando-se a crescente importância terapêutica deste medicamento, o presente trabalho propõe o desenvolvimento e validação de metodologia analítica para determinação quantitativa do cloridrato de milnaciprana em sua forma farmacêutica cápsula, visto não existirem métodos oficiais para o controle de qualidade do MNC matéria-prima e produto acabado.

O estudo da estabilidade do fármaco frente a diferentes fatores promotores de degradação também é proposto. Uma vez que a presença de produtos de degradação pode estar relacionada, não somente à perda da eficácia terapêutica, mas também à toxicidade do produto farmacêutico, torna-se relevante a pesquisa e a identificação de potenciais produtos de degradação do cloridrato de milnaciprana matéria-prima e cápsulas.

## 2. OBJETIVOS

---



## 2.1 Objetivo geral

Desenvolver e validar métodos analíticos e de dissolução para o controle de qualidade do cloridrato de milnaciprana na forma farmacêutica cápsula e realizar estudo para avaliação da estabilidade do fármaco, de acordo com as normas oficiais vigentes.

## 2.2 Objetivos específicos

- Caracterizar a substância química de referência através dos seguintes métodos: determinação da umidade, ponto de fusão, rotação específica, espectrofotometria na região do infravermelho (IV) e espectrofotometria na região do ultravioleta (UV);
- Identificar o cloridrato de milnaciprana no produto acabado, através da espectrofotometria na região do UV e IV, cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e eletroforese capilar (EC);
- Desenvolver e validar método quantitativo por espectrofotometria na região do UV, CLAE e EC para determinação do cloridrato de milnaciprana no produto acabado, comparando estatisticamente os métodos quantitativos propostos;
- Desenvolver e validar método de dissolução para as cápsulas e realizar estudo acelerado de estabilidade para a forma farmacêutica, a fim de avaliar a influência das condições de armazenamento no perfil de dissolução do fármaco;
- Desenvolver estudo de degradação forçada, submetendo a matéria-prima e o conteúdo das cápsulas a condições de estresse e avaliar a interferência do(s) potencial(is) produto(s) de degradação sobre os métodos de análise propostos;
- Determinar a cinética de degradação do fármaco, na matéria-prima e no conteúdo das cápsulas.



### 3. REVISÃO

---



### **3.1 Aspectos gerais**

#### **3.1.1 Transtorno depressivo maior (TDM)**

A depressão, reconhecida como a doença do final do século XX, acompanha muitos distúrbios físicos, mentais e emocionais de modo crônico ou recorrente. A depressão maior representa um espectro de transtornos, cuja gravidade varia da doença branda e autolimitada às doenças psicóticas e melancólicas incapacitantes graves. Consiste em distúrbio de humor persistente, com no mínimo duas semanas de evolução, caracterizada necessariamente por vários dos sintomas, tais como redução do humor, perda de energia e diminuição da atividade, de forma marcante e angustiante, tipicamente com perda da auto-estima e idéias de desvalia ou culpa. As idéias e os atos suicidas são comuns e observa-se em geral uma série de sintomas somáticos: insônia ou hipersonolência, alterações nos hábitos alimentares, redução do vigor e da libido, alterações dos ritmos circadiano e ultradiano normais de atividade, da temperatura corporal e de algumas funções endócrinas (CID, 2006; BALDESSARINI, 2006; KOROLKOVAS, 2008).

Os transtornos de humor e ansiedade são as doenças mentais mais comuns e cada qual acomete até 10% da população geral em algum período de suas vidas. No Brasil, cerca de 3.600.000 pessoas apresentam quadros depressivos. Algumas das manifestações das doenças depressivas também são encontradas nos transtornos de ansiedade, incluindo-se a síndrome do pânico-agorafobia, as fobias graves, o transtorno de ansiedade generalizada, o da ansiedade social, o do estresse pós-traumático e o obsessivo-compulsivo, sendo que os extremos de humor podem estar associados à psicose. De acordo com sua etiologia, os sintomas depressivos podem ser reativos ou neuróticos, quando precipitados por um choque na vida do paciente, e psicóticos ou endógenos, frequentemente relacionados com alterações involuntárias após os 40 anos, podendo ocorrer em ciclos. A superposição de transtornos mentais pode gerar erros diagnósticos e resultar em tratamento inadequado do paciente (BALDESSARINI, 2006; KOROLKOVAS, 2008).

Dentre as várias teorias para explicar as causas bioquímicas dos distúrbios afetivos, a hipótese catecolamínica, ou seja, a deficiência ou excesso de catecolaminas, especialmente a noradrenalina (levarterenol), foi a proposta mais

aceita até recentemente. De modo alternativo, a teoria serotoninica atribui à depressão e à mania a deficiência e o excesso de serotonina, respectivamente. Em hipótese mais recente, tanto a depressão quanto a mania resultariam da deficiência de indolaminas no SNC, mas com atividade adrenérgica diminuída na depressão e intensificada na mania; e, de fato, experiências recentes relacionam a depressão a sistemas triptaminérgicos (KOROLKOVAS, 2008).

Uma revisão do conceito de depressão e da nosologia contemporânea dos estados depressivos e seus diferentes subtipos foi apresentada por DEL PORTO (1999), assim como SPANEMBERG e JURUENA (2004) analisaram os principais aspectos da distimia (depressão crônica de gravidade moderada) e sua relação com o transtorno depressivo maior.

WONG e LICINIO (2004) apresentaram as diferentes fases da descoberta de fármacos antidepressivos e comentaram os desafios e oportunidades na pesquisa de novos fármacos, na busca por compostos que sejam eficazes para mais de 60-70% da população, numa confluência de conhecimentos em genômica, neurociência, farmacologia e investigações clínicas necessários para integrar o vasto conhecimento subjacente a este tipo de exploração. O estudo da neurobiologia molecular da depressão apresentada em revisão por KRISHNAN e NESTLER (2008) corrobora o trabalho anterior quanto ao desafio na busca da compreensão dos mecanismos patofisiológicos da depressão, combinando técnicas e modelos comportamentais, moleculares e eletrofisiológicos no desenvolvimento de tratamentos antidepressivos fundamentalmente novos.

Estudos comparativos entre o MNC e outros antidepressivos utilizados no tratamento do TDM avaliaram os efeitos, eficácia, segurança e manejo de dose destes fármacos (MORISHITA & ARITA, 2003a, 2004; SECHTER *et al.*, 2004; SHINKAI *et al.*, 2004). De modo geral, os resultados servem como parâmetro para a seleção de antidepressivos de acordo com os fatores analisados, tais como, gênero dos pacientes, presença de retardo psicomotor, recorrência dos episódios depressivos e ocorrência de efeitos adversos, entre outros.

O uso clínico de milnaciprana no tratamento da depressão foi investigado por MORISHITA e ARITA (2003b), que procuraram determinar a duração mais

adequada e predizer as respostas ao uso do fármaco na depressão. A idade dos pacientes e a frequência dos episódios depressivos foram fatores considerados no prognóstico do tratamento com milnaciprana.

O resultado do tratamento com milnaciprana combinada com risperidona foi avaliado por TANI e colaboradores (2004), apresentando-se como estratégia útil para pacientes que respondem apenas parcialmente aos diferentes tipos de antidepressivos, e especialmente aqueles que apresentam resistência aos tratamentos.

YOSHIDA e colaboradores (2004) procuraram determinar se polimorfismos nos genes para os transportadores de norepinefrina (NET) e de serotonina (5-HTT) estão associados com a resposta antidepressiva da milnaciprana. Os resultados sugeriram que polimorfismos em NET, e não em 5-HTT determinam, em parte, a resposta antidepressiva do fármaco. Entretanto, estudo comparativo realizado por PAPAKOSTAS e colaboradores (2007), entre as respostas alcançadas para o tratamento da depressão maior com fármacos inibidores de recaptação da serotonina e noradrenalina (IRSN) e fármacos inibidores seletivos de recaptação de serotonina (ISRS), sugeriu que não houve diferença significativa na eficácia dos tratamentos com ambas as classes de antidepressivos.

YAMAKAWA e colaboradores (2005) avaliaram a eficácia e segurança da milnaciprana no tratamento da depressão pós-isquemia cerebral em 126 pacientes em reabilitação hospitalar. Os resultados mostraram melhora significativa na gravidade da depressão, sem efeitos colaterais nem influência nas atividades diárias. No entanto, estudos posteriores tornam-se necessários para determinar a melhor combinação de terapia farmacológica e apoio psicossocial a estes pacientes. Já SATO e colaboradores (2006) avaliaram a eficácia terapêutica da milnaciprana tanto no comprometimento cognitivo quanto na depressão em pacientes pós-AVC. Os resultados do estudo demonstraram que o IRSN foi eficaz na melhoria da disfunção cognitiva, mas não na gravidade da depressão, sugerindo a necessidade de outros estudos para determinar a relação entre a depressão e o déficit cognitivo em pacientes pós-AVC tratados com milnaciprana.

As consequências na qualidade de vida, em parâmetros como o sono, o emocional, a comunicação, a mobilidade, a recreação, o estado de alerta, a assistência domiciliar e o social, foram medidas em diferentes escores durante o tratamento e na prevenção de episódios recorrentes de depressão com o uso de milnaciprana (ROUILLON *et al.*, 2000). O uso de milnaciprana proporcionando efeito antidepressivo eficaz em pacientes com depressão maior grave e moderada foi sugerido por SUGAWARA e colaboradores (2006). Mais especificamente, o tratamento da depressão com milnaciprana foi observado em pacientes acima de 60 anos (LATALOVA e PIDRMAN, 2008) e no tratamento do estado depressivo em pacientes com a doença de Alzheimer (MIZUKAMI *et al.*, 2006).

MATSUMOTO e colaboradores (2005) avaliaram a interação funcional entre a alteração da plasticidade sináptica induzida pelo estresse em ratos e os efeitos terapêuticos ansiolíticos no tratamento crônico com milnaciprana. Os dados indicaram a correspondência entre o comportamento relacionado ao medo e à plasticidade sináptica no hipocampo.

A interação funcional entre os mecanismos serotoninérgicos e noradrenérgicos em ratos foi elucidada por TACHIBANA e colaboradores (2006), através da caracterização eletrofisiológica e neuroquímica do efeito de tratamento repetido com milnaciprana. Os resultados sugeriram que a interação dos mecanismos apresentou papel importante na modulação da plasticidade sináptica causada pelo tratamento repetido com o fármaco em estudo, o que deve implicar nos efeitos terapêuticos dos inibidores de recaptção de serotonina e noradrenalina nos distúrbios psiquiátricos.

KITAICHI e colaboradores (2008) estudaram o efeito na concentração extracelular de monoaminas (dopamina, noradrenalina e serotonina) em ratos, após co-administração de milnaciprana e um agonista dopaminérgico (cabergolina) e seus resultados indicaram que a influência nos efeitos antidepressivos foi devida ao aumento na concentração de noradrenalina reforçada pela cabergolina.

Os índices de remissão durante o tratamento com duas doses diferentes de milnaciprana, 100 e 150 mg/dia, foram determinados, assim como os efeitos da terapia com o fármaco, durante o período de um ano, para a manutenção da remissão clínica e tolerabilidade em pacientes ambulatoriais com depressão maior

(OKUMURA e FURUKAWA, 2006). Os resultados deste estudo demonstraram que ambas as dosagens foram eficazes e bem toleradas no tratamento a longo prazo de pacientes ambulatoriais com depressão maior, e indicaram que uma dose de 150 mg/dia é uma opção terapêutica eficaz para a depressão quando a dosagem de 100 mg/dia não forneceu uma resposta satisfatória.

Guias de recomendações baseadas em evidências apresentam um compêndio da utilização de antidepressivos, entre estes os IRSN, além de alternativas terapêuticas, como a terapia comportamental e psicológica, a ECT e o uso de fitomedicamentos, como o extrato de *Hypericum*, para o manejo no tratamento da depressão (MORET, 2003; ANDERSON *et al.*, 2008; CIPRIANI *et al.*, 2009; KROENKE *et al.*, 2009).

### 3.1.2 Fibromialgia

Além da ampla utilização de antidepressivos para tratar a depressão associada às doenças clínicas em geral, vários transtornos psicossomáticos, que podem ter alguma relação psicobiológica com os transtornos do humor ou de ansiedade, podem melhorar com o tratamento a base de antidepressivos. Isso inclui transtornos dolorosos crônicos, como as síndromes neuropáticas diabéticas e outras neuropatias periféricas, fibromialgia, úlcera péptica e síndrome do cólon irritável, fogachos da menopausa, fadiga crônica, cataplexia, tiques nervosos, enxaqueca, e apnéia do sono (BALDESSARINI, 2006).

Segundo o *American College of Rheumatology*, a fibromialgia é um transtorno geralmente mal compreendido e pouco reconhecido, associado com fadiga, transtornos do sono e problemas de memória. Apresenta-se como uma síndrome crônica caracterizada por queixas dolorosas músculo-esqueléticas difusas e pela presença de pontos dolorosos em regiões anatomicamente bem determinadas (WEIDEBACH, 2002).

A fibromialgia é a segunda doença mais comum observada por reumatologistas após a osteoartrite. O diagnóstico de fibromialgia, de acordo com os critérios de classificação do *American College of Rheumatology*, fornecem uma sensibilidade e especificidade de 85%, aproximadamente, na diferenciação de outras formas de dor

músculo-esqueléticas crônicas. Pacientes com fibromialgia apresentam anormalidades quantitativas na percepção da dor em condições experimentais, sob as formas de alodinia, a partir de um estímulo não-doloroso, como um leve toque; ou hiperalgesia, ou seja, o aumento do processamento da dor por um estímulo doloroso, percebido com maior intensidade do que seria por um voluntário normal. Estes dados sugerem um estado sensibilizado de percepção da dor, que, em teoria, pode resultar de alterações generalizadas no âmbito dos órgãos alvo (pele, músculos, etc.), a partir de alterações no processamento nociceptivo no sistema nervoso central, ou alguma combinação de ambos os processos (GOLDENBERG *et al.*, 2004; RAO *et al.*, 2008).

Estudos em clínicas gerais revelam que 5% a 6% dos doentes apresentam fibromialgia. Nos EUA manifesta-se em 5,7% dos pacientes atendidos em clínicas gerais. A frequência eleva-se em clínicas especializadas em doenças reumáticas, onde acomete 22% dos indivíduos, sendo diagnosticada em até 30% dos doentes com menos de 50 anos que frequentam clínicas reumatológicas. A fibromialgia ocorre em 9 mulheres para 1 homem e é mais comum na faixa etária de 45 a 64 anos. Nas mulheres, a frequência eleva-se de 1% nas idades de 18 a 29 anos, para 7% aos 70 a 89 anos havendo discreto aumento nas idades mais avançadas. Nos homens, existe discreto aumento com o avanço das idades havendo pico de 1% entre 70 e 79 anos (TEIXEIRA, 2001).

HARRIS e colaboradores (2005) realizaram estudo em pacientes com fibromialgia e buscaram caracterizar a variabilidade da dor e suas implicações ao longo do tempo. Observaram que os indivíduos com maiores flutuações de dor foram mais propensos a responder ao placebo. Entretanto, não está claro se estes resultados são aplicáveis apenas aos pacientes com fibromialgia, ou se eles também podem ser observados em pacientes com outras condições de dor crônica. Os resultados deste estudo têm implicações diretas na triagem de fármacos para a fibromialgia e talvez para outras síndromes dolorosas.

HOFFMAN e DUKES (2008) apresentaram uma revisão que descreve o perfil do estado de saúde de pessoas com fibromialgia e o compara ao de pessoas na população em geral e a pacientes com outras condições de saúde. Concluíram que as pessoas com fibromialgia apresentaram um ônus maior no estado geral (físico e

mental) de saúde, do que as pessoas com outras condições de dor específicas e que são amplamente aceitas como prejudicadas.

A eficácia da administração de milnaciprana no alívio da hipersensibilidade táctil e térmica, assim como o efeito diferencial deste fármaco na hiperalgesia cutânea e muscular induzida por estresse foi demonstrada e avaliada em ratos (KING *et al.*, 2006; SUAREZ-ROCA *et al.*, 2006).

A segurança e a eficácia do cloridrato de milnaciprana foram estabelecidas em dois ensaios clínicos de fase III envolvendo mais de 2.000 pacientes com fibromialgia. Os estudos mostraram estatisticamente que doses de 100 e 200 mg/dia proporcionaram melhoras clínicas significativas, simultaneamente, na dor, na avaliação global do paciente e na função física (FOREST LABORATORIES, 2009).

Recomendações baseadas em evidências (estudos clínicos aleatorizados) indicam a utilização de antidepressivos, entre eles os IRSN, além de outras classes farmacológicas e alternativas terapêuticas (exercícios físicos, homeopatia, acupuntura, fisioterapia, etc.) para o controle da dor no manejo da síndrome da fibromialgia. No entanto, a falta de compreensão da fisiopatologia da fibromialgia e do seu diagnóstico, devido à variabilidade na intensidade das dores e sintomas não dolorosos, além das co-morbidades presentes, limita a concepção racional de abordagens no tratamento farmacológico (GOLDENBERG *et al.*, 2004; CARVILLE *et al.*, 2007; ROOKS, 2007; CAZZOLA *et al.*, 2007; LAWSON, 2007; CROFFORD, 2008; HARTEN, 2008; CLAUW *et al.*, 2008; KROENKE *et al.*, 2009).

### **3.2 Antidepressivos**

Agentes antidepressivos, também conhecidos como antidepressores, restauram pacientes mentalmente deprimidos, diminuindo a intensidade dos sintomas, reduzindo a tendência ao suicídio, acelerando a velocidade de normalização e promovendo o bem estar mental. A maioria dos antidepressivos tem ações importantes no metabolismo das monoaminas neurotransmissoras e seus receptores. As principais classes de antidepressivos são: os *inibidores da monoaminoxidase* (IMAO), que impedem a desaminação oxidativa das aminas biogênicas, mas cuja ação não é restrita à inibição da MAO, afetando também outras

enzimas suscetíveis e produzindo efeitos colaterais graves; os *antidepressivos tricíclicos*, mais eficazes e menos perigosos que os IMAO, inibem, de modo relativamente seletivo, a recaptação da norepinefrina, visto que, dependendo da estrutura da cadeia lateral (amino-terciária), inibem também, de modo variável, a recaptação de serotonina; e os *inibidores seletivos de recaptação de serotonina* (ISRS), entre eles a fluoxetina, um dos primeiros fármacos da classe utilizados amplamente (KOROLKOVAS, 2008).

No entanto, alguns antidepressivos exercem efeitos tanto na neurotransmissão noradrenérgica quanto na serotoninérgica. A eficácia clínica da venlafaxina, um antagonista misto do transporte de serotonina e norepinefrina, e as interessantes propriedades benéficas de um agente semelhante mais antigo, a clomipramina, estimularam uma exploração maior do princípio de potencialização aminérgica mista, estratégia que levou ao desenvolvimento de fármacos como a duloxetina, a milnaciprana e análogos da bupropiona. Esses progressos surgiram, conceitualmente, da procura das atividades bloqueadoras de transporte dos antidepressivos tricíclicos originais, com esforços visando evitar suas propriedades tóxicas comuns, incluindo potentes atividades antimuscarínicas e cardiopressoras, visto os antidepressivos tricíclicos manterem interações variáveis com os receptores adrenérgicos (BALDESSARINI, 2001 e 2006).

### **3.2.1 Cloridrato de milnaciprana**

O cloridrato de milnaciprana (D.C.B. 05960) é um fármaco antidepressivo que age no sistema nervoso central (SNC) como um inibidor da recaptação de serotonina e noradrenalina (IRSN). Não está relacionado quimicamente a outros IRSN, tricíclicos, tetracíclicos ou outros fármacos eficazes disponíveis no tratamento do transtorno depressivo maior (TDM). Produzido pelo laboratório Pierre Fabre Medicament (Boulogne, França), é comercializado sob os nomes comerciais Ixel<sup>®</sup>, Dalcipran<sup>®</sup> e Toledomin<sup>®</sup> na forma farmacêutica cápsula, para o tratamento do TDM, e sob o nome comercial Savella<sup>®</sup> na forma farmacêutica comprimido, indicado no tratamento da fibromialgia.

### 3.2.1.1 Descrição

O cloridrato de milnaciprana (Figura 1) apresenta-se como um sólido branco, ligeiramente solúvel em água (19 mg/mL) (SIGMA ALDRICH, 2008). Comercializado como mistura racêmica de dois enantiômeros, ou seja, quatro estereoisômeros (Figura 2) se apresenta como uma molécula hidrofílica ( $\log D = 1,2$ ), diferindo dos demais inibidores do transporte de monoaminas, como a duloxetina ( $\log D = 3,3$ ) (CACCIA, 1998; PUOZZO *et al.*, 2005; CHEN *et al.*, 2008; WIKIMEDIA, 2010).

*Nome químico* (NLM, 2008):

cloridrato de ( $\pm$ )-[1RS, 2SR]-2-(aminometil)-N,N-dietil-1-fenil-ciclopropano carboxamida

*Fórmula empírica*:  $C_{15}H_{22}N_2O \cdot HCl$

*Massa molecular*: 282,8127

*Chemical Abstracts Service* (CAS): 101152-94-7

$pK_a = 10,36 \pm 0,29$  (ACD, 2009)

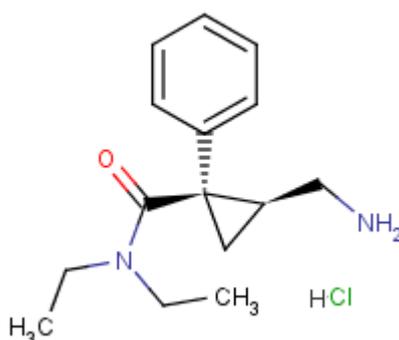


Figura 1 – Fórmula estrutural do cloridrato de milnaciprana (NLM, 2008).

PEREZ e colaboradores (1998) realizaram a hibridação das moléculas da família do aminopropanol (pindolol, propranolol e pen-butolol) com moléculas de fluoxetina, paroxetina e milnaciprana com o objetivo de obter novas moléculas e potencializar a ação sobre os receptores de recaptção da serotonina.

A síntese das formas (+) e (-) da milnaciprana, de seus análogos conformacionalmente restritos e seus enantiômeros (Figura 3) é relatada, e a atividade biológica destes análogos é avaliada como antagonistas dos receptores do ácido *N*-metil-D-aspartico (NMDA) envolvidos em distúrbios neurodegenerativos agudos e crônicos (SHUTO *et al.*, 1996a, 1996b, 1998; ONO *et al.*, 2002; KAZUTA *et al.*, 2002a, 2002b, 2002c; OHMORI *et al.*, 2003).

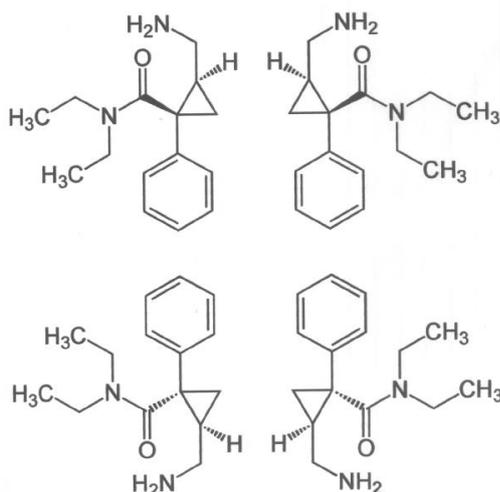


Figura 2 – Estereoisômeros estruturais da milnaciprana (WIKIMEDIA, 2010).

No desenvolvimento de antagonistas potentes dos receptores  $H_3$  e  $H_4$  da histamina também foi aplicada a estratégia estereoquímica de restrição conformacional orientada, baseada na estrutura do imidazolil-ciclopropano (WATANABE *et al.*, 2006). DYCK e colaboradores (2008) apresentaram a síntese e caracterização de análogos tienil do IRSN com potência superior, mas mantendo o baixo peso molecular e a lipofilicidade moderada, que são as características importantes para as propriedades farmacológicas e farmacocinéticas da milnaciprana. No mesmo ano, foram publicados estudos de métodos aplicados na obtenção de moléculas análogas do haloperidol baseadas no ciclopropano e conformacionalmente restritas, buscando compostos biologicamente ativos de maior potência (YAMAGUCHI *et al.*, 2008).

Derivados da milnaciprana (Figura 4) e sua relação estrutura-atividade (REA) na inibição do transporte de monoaminas (norepinefrina, serotonina e dopamina) foram estudados. Além disso, um modelo de farmacóforo para os análogos da milnaciprana foi estabelecido, baseado na análise conformacional por RMN em

solução aquosa e simulação computacional (Figura 5), direcionando o desenvolvimento de novos e potentes inibidores no transporte de monoaminas com propriedades farmacocinéticas ideais (CHEN *et al.*, 2008; TAMIYA *et al.*, 2008; VICKERS *et al.*, 2008).

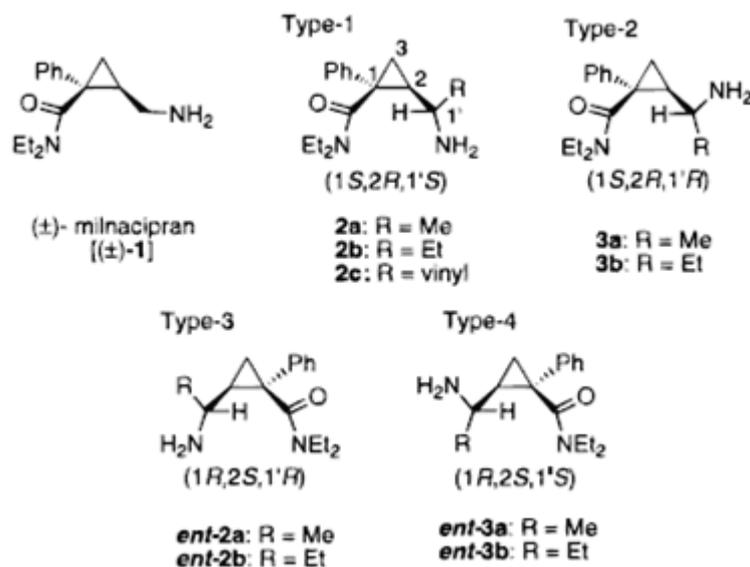


Figura 3 – Produtos da síntese estereoseletiva:(±) – milnaciprana, seus análogos restritos conformacionalmente (*Type-1* e *2*) e seus enantiômeros (*Type-3* e *4*) (SHUTO *et al.*,1998).

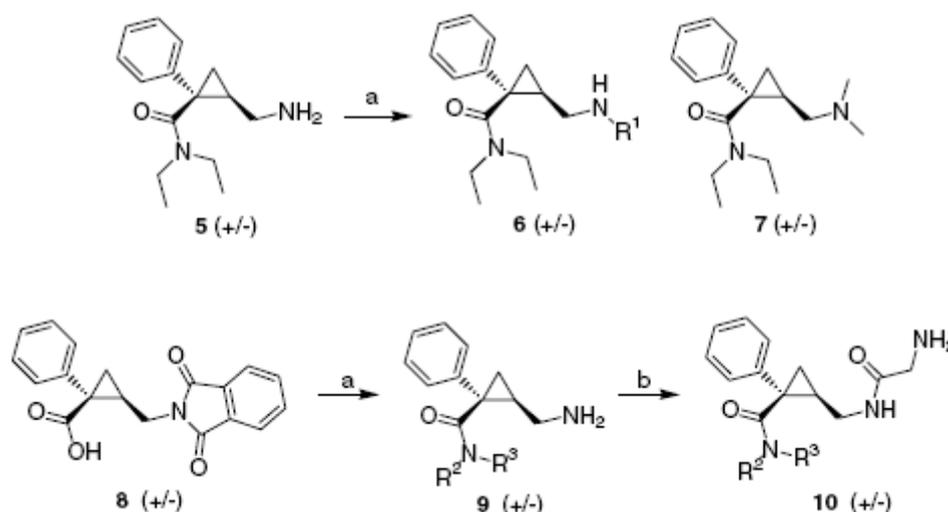


Figura 4 – Derivados da milnaciprana avaliados quanto a REA na inibição do transporte de monoaminas (CHEN *et al.*,2008).

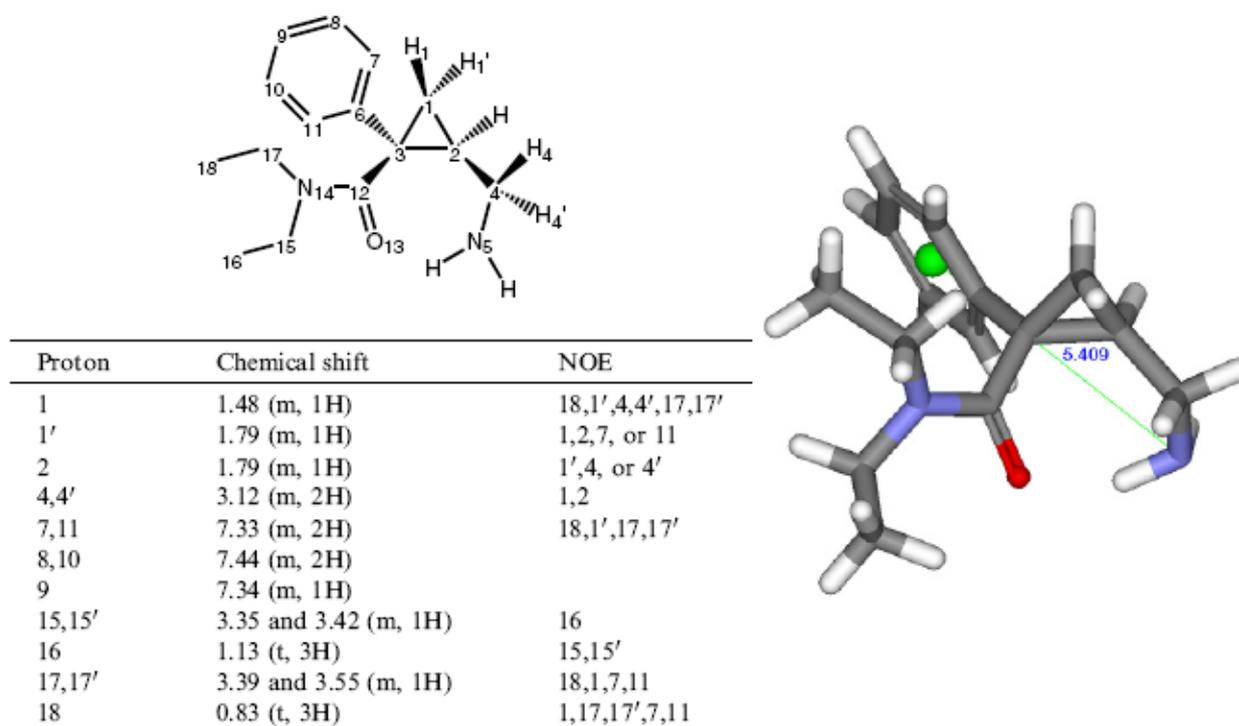


Figura 5 – Resumo do estudo de RMN da milnaciprana e simulação computacional da conformação requerida para inibição do transportador de membrana celular específico para norepinefrina (CHEN *et al.*,2008).

### 3.2.1.2 Apresentação, dosagem e administração

Apresenta-se nas formas de cápsulas de gelatina dura para administração de cloridrato de milnaciprana 25 e 50 mg (equivalentes a 21,77 e 43,55 mg de milnaciprana base, respectivamente), em embalagens com 14 ou 28 cápsulas, indicadas no tratamento do TDM em adultos, e, atualmente, apresenta-se também na forma de comprimido revestido contendo 12,5; 25; 50 e 100 mg de cloridrato de milnaciprana indicados no tratamento da síndrome da fibromialgia (ROCHE, 2001, 2008; CYPRESS, 2009).

A dose recomendada é de 100 mg/dia, no tratamento do TDM, fracionada em duas administrações de 50 mg, pela manhã e à noite, de preferência às refeições. No manejo da fibromialgia, baseado na resposta individual do paciente, a dose pode chegar a 200 mg/dia, fracionada em duas administrações de 100 mg (ROCHE, 2001, 2008; CYPRESS, 2009).

### 3.2.1.3 Características farmacológicas

O mecanismo de ação da milnaciprana no tratamento da depressão está ligado à inibição da recaptação neuronal de serotonina e noradrenalina, resultando em um aumento na neurotransmissão destas substâncias no sistema nervoso central. Ao contrário dos antidepressivos tricíclicos, a milnaciprana não tem afinidade por receptores colinérgicos (muscarínicos),  $\alpha$ 1-adrenérgicos ou histaminérgicos H1. A milnaciprana também não tem afinidade por receptores dopaminérgicos D1 e D2 ou receptores benzodiazepínicos e opióides (ROCHE, 2001; PUOZZO *et al.*, 2005; ROCHE, 2008; CHEN *et al.*, 2008; CYPRESS, 2009).

Em humanos, a dose terapêutica e as concentrações plasmáticas da milnaciprana produzem, consistentemente, um nível de inibição de 50% a 90% da recaptação de noradrenalina e serotonina, sendo que a inibição da recaptação da noradrenalina, *in vitro*, é três vezes mais potente do que a serotonina, sem afetar diretamente a recaptação da dopamina e outros neurotransmissores (ROCHE, 2001; PUOZZO *et al.*, 2005; ROCHE, 2008; CHEN *et al.*, 2008; CYPRESS, 2009).

Os efeitos farmacológicos observados nos tratos gastrointestinal e gênito-urinário parecem estar relacionados à inibição da recaptação de noradrenalina, o que pode exercer um efeito antagônico na acetilcolina (efeito anticolinérgico indireto) (ROCHE, 2001; PUOZZO *et al.*, 2005; ROCHE, 2008; CHEN *et al.*, 2008; CYPRESS, 2009).

A milnaciprana não induz modificações de repolarização ou condução cardíacas, não afeta a função cognitiva e tem pouco efeito sedativo. Distúrbios do sono melhoram em pacientes deprimidos tratados com milnaciprana. O tempo de latência para iniciar o sono é diminuído e o número de despertares noturnos e a latência para o início de sono paradoxal são aumentados (ROCHE, 2001; PUOZZO *et al.*, 2005; ROCHE, 2008; CHEN *et al.*, 2008; CYPRESS, 2009).

Dados pré-clínicos de segurança indicam, após ingestão repetida, o fígado como órgão alvo em todas as espécies animais estudadas. Os primeiros efeitos tóxicos observados aparecem em doses elevadas, aproximadamente 10 vezes a dose terapêutica em humanos e são reversíveis. Milnaciprana não é mutagênica

nem carcinogênica. Dados experimentais não revelam nenhum potencial teratogênico ou fetotóxico. A eficácia e tolerabilidade foram avaliadas em diferentes estudos clínicos com amplo número de pacientes (ROCHE, 2001; PUOZZO *et al.*, 2005; ROCHE, 2008; CHEN *et al.*, 2008; CYPRESS, 2009).

#### 3.2.1.4 Farmacocinética

*Absorção* — A milnaciprana é rapidamente bem absorvida após administração por via oral. Sua biodisponibilidade é da ordem de 85 a 90%, não sendo modificada pela alimentação. A concentração plasmática máxima (C<sub>máx</sub>) é atingida por volta de 2 a 4 horas (t<sub>máx</sub>) após a ingestão oral. Esta concentração é da ordem de 120 ng/mL após uma ingestão única de 50 mg. O aumento da concentração plasmática é proporcional à dose até a concentração de 200 mg por dose. Após ingestões repetidas, o nível plasmático do estado de equilíbrio é atingido em 2 a 3 dias. A variação individual é pequena (CACCIA, 1998; ROCHE, 2001; PUOZZO *et al.*, 2005; ROCHE, 2008; CYPRESS, 2009).

*Distribuição* — A taxa de ligação a proteínas plasmáticas é baixa (13%) e insaturável. A milnaciprana é rápida e extensivamente distribuída através do corpo, sendo o seu volume de distribuição de aproximadamente 5,3 L/kg (CACCIA, 1998; ROCHE, 2001; PUOZZO *et al.*, 2005; ROCHE, 2008; CYPRESS, 2009).

*Biotransformação* — A biotransformação da milnaciprana é simples, limitando-se essencialmente a conjugação com ácido glicurônico, aproximadamente 30%, e apenas cerca de 20% sofre biotransformação oxidativa. Dois metabólitos N-dealquilados e um metabólito hidroxilado foram identificados. Apenas o metabólito da oxidação apresentou atividade farmacológica comparável ao fármaco inalterado, mas representa somente uma pequena quantidade da dose administrada (CACCIA, 1998; ROCHE, 2001; PUOZZO *et al.*, 2005; ROCHE, 2008; CYPRESS, 2009).

Entre as enzimas envolvidas no metabolismo de fármacos, os representantes CYP são o grupo principal. Estas enzimas exibem uma ampla variabilidade interindividual em seus níveis de expressão, que podem resultar em diferenças marcantes na resposta à terapia farmacológica. PUOZZO e colaboradores (2005) estudaram e avaliaram a influência da milnaciprana na atividade das principais

isoenzimas CYP450 envolvidas no metabolismo de antidepressivos. Os resultados apresentados demonstraram que, comparado ao impacto de outros antidepressivos nestas isoenzimas, a milnaciprana apresentaria um risco farmacocinético negligenciável para interações entre fármacos quando administrada em tratamentos combinados com outros antidepressivos ou em pacientes metabolizadores “fracos” para CYP2D6 e CYP2C19 (CACCIA, 1998; ROCHE, 2001; PUOZZO *et al.*, 2005; ROCHE, 2008; CYPRESS, 2009).

*Eliminação* — A milnaciprana tem uma depuração total da ordem de 40 L/h. Sua meia-vida de eliminação plasmática é de aproximadamente 8 horas. O enantiômero ativo, *d*-milnaciprana, tem um tempo de meia-vida maior (8-10 horas) que o *l*-enantiômero (4–6 horas) e não há interconversão entre os enantiômeros. A eliminação é essencialmente por via urinária (90% da dose ingerida), com secreção tubular do produto na forma inalterada (50-60%), 24% de *l*-milnaciprana e 31% como *d*-milnaciprana. Após ingestões repetidas, a milnaciprana é totalmente eliminada 2 a 3 dias após a interrupção do tratamento (CACCIA, 1998; ROCHE, 2001; PUOZZO *et al.*, 2005; ROCHE, 2008; CYPRESS, 2009).

Não há modificação significativa dos parâmetros farmacocinéticos da milnaciprana em pacientes com insuficiência hepática. Para os pacientes com mais de 65 anos os parâmetros farmacocinéticos da milnaciprana não são significativamente alterados, o ajuste da dose não é necessário, se a função renal for normal. Convém, no entanto, levar em conta as alterações fisiológicas, decorrentes da idade e da função renal. As concentrações plasmáticas podem alcançar níveis mais elevados que no adulto jovem, com doses equivalentes, em razão da redução da depuração renal (CACCIA, 1998; ROCHE, 2001; PUOZZO *et al.*, 2005; ROCHE, 2008; CYPRESS, 2009).

Quadro 1 – Adaptação posológica para milnaciprana em caso de insuficiência renal

Clcr (mL/min)	Posologia/24h
Clcr ≥ 60	50 mg x 2
60 > Clcr ≥ 30	25 mg x 2
30 > Clcr ≥ 10	25 mg

Clcr: depuração da creatinina

Com o retardo da eliminação da milnaciprana (que é essencialmente renal) em pacientes com insuficiência renal (cerca de 9 a 25 horas), ocorre o aumento das concentrações plasmáticas, proporcional ao grau de alteração da função renal e o ajuste da dose e frequência de administração se torna necessário (Quadro 1). Recomenda-se reduzir a dose diária para 50 mg ou 25 mg, de acordo com o grau de alteração da função renal. Nesse caso, são utilizadas as cápsulas de 25 mg (CACCIA, 1998; ROCHE, 2001; PUOZZO *et al.*, 2005; ROCHE, 2008; CYPRESS, 2009).

### 3.3 Métodos analíticos

A literatura científica apresenta trabalhos que utilizaram a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e métodos eletrocinéticos para determinação simultânea de antidepressivos e seus metabólitos em fluidos biológicos com o objetivo de monitoramento clínico e para a separação quiral do fármaco derivatizado (Quadro 2).

A cromatografia capilar eletrocinética micelar (*micellar electrokinetic capillary chromatography* - MEKC) foi utilizada na separação e determinação simultânea de onze antidepressivos em sangue e urina por LABAT e colaboradores (2002).

MANDRIOLI e RAGGI (2006) utilizaram técnicas eletrocinéticas, tais como a eletroforese capilar (EC), a eletrocromatografia capilar (*capillary electrochromatography* – CEC) e a MEKC na enantioseparação de antidepressivos contendo um ou mais centros quirais.

Recentemente, SAFAK e UÇAKTÜRK (2010) desenvolveram método por cromatografia à gás (CG) com detecção por espectrômetro de massas (MS) para determinação de milnaciprana em plasma. No entanto, não foram encontrados métodos oficiais ou estudos publicados para o controle de qualidade do cloridrato de milnaciprana no produto farmacêutico.

Quadro 2 - Determinação de antidepressivos por CLAE

COLUNA	FASE MÓVEL	DETECÇÃO	AMOSTRA	REFERÊNCIA
Coluna baseada em carbono grafítico poroso (fase estacionária não quiral)	Metanol / tampão fosfato	Dicroísmo circular	enantiômeros da milnaciprana	LECOEUR-LORIN <i>et al.</i> , 2008
Chiralcel OD e OD-H Chiralcel OJ (fase normal) Chiralpak IB	-----	UV FL	enantiômeros da milnaciprana	PATTI <i>et al.</i> , 2008
-----	-----	MS / MS	urina e plasma	MIYAGI <i>et al.</i> , 2007 (resumo)
Inertsil OD 150x2,0 mm D.I. (5 µm dp)	metanol, acetato de amônio 10 Mm (pH 5,0) e acetonitrila (70 : 20 : 10, V/V)	MS	plasma	SHINOZUKA <i>et al.</i> , 2006
Zorbax ODS 150x4.6 mm D.I. (5 µm dp) Pré-coluna Zorbax ODS 20x4.6 mm D.I. (5 µm dp)	tampão fosfato de sódio 6,67 M (pH 7,0) e metanol (37 : 63, V/V)	FL / MS	plasma	PUOZZO <i>et al.</i> , 2004
Beckman (50 °C) ODS 250x4.6 mm D.I. (5 µm dp) Pré-coluna ultrasphere ODS 4,5 cmx4.6 mm D.I. (5 µm dp)	tampão fosfato de sódio 0,05 M (pH 3,8) e acetonitrila (50 : 50, V/V)	UV	plasma	TOURNEL <i>et al.</i> , 2001
Hypersil® ODS 150x4.6 mm D.I. (3 µm dp)	Tampão acetato de sódio 0,005 M (pH 4,5) e metanol (30 : 70, V/V)	FL	plasma	LACASSIE <i>et al.</i> , 2000

*detector por absorção no ultravioleta (UV); de fluorescência (FL) e massas (MS)*

### 3.4 Dissolução de medicamentos

A absorção de fármacos a partir de formas farmacêuticas sólidas administradas por via oral depende da sua liberação, dissolução e solubilização em condições fisiológicas e de sua permeabilidade através das membranas do trato gastrointestinal. Devido à natureza crítica dos dois primeiros processos, a dissolução *in vitro* pode ser relevante para prever o desempenho *in vivo* da formulação farmacêutica. Com base nestas considerações gerais, os ensaios de dissolução *in vitro* para formas farmacêuticas orais sólidas de liberação imediata (FFSOLI), tais como comprimidos e cápsulas, são utilizados para garantir a qualidade lote-a-lote, orientar o

desenvolvimento de novas formulações e assegurar a uniformidade da qualidade e do desempenho do medicamento após determinadas alterações (FDA, 1997).

O teste de dissolução determina a porcentagem da dose do fármaco, declarada no rótulo do produto, liberada no meio de dissolução dentro do período de tempo especificado na monografia de cada produto, quando o mesmo é submetido à ação de equipamento específico, sob condições experimentais específicas (F. BRAS. IV, 1988).

MARQUES e BROWN (2002) abordam as principais normas regulatórias nos Estados Unidos (USP e FDA) e os requisitos para o desenvolvimento e validação de métodos de dissolução. A seleção do equipamento mais adequado à formulação em estudo e as condições de teste, tais como meio de dissolução, volume de meio, velocidade de agitação, especificações, tempo para amostragem e perfis de dissolução são os maiores desafios encontrados no desenvolvimento de um método de dissolução apropriado para um determinado produto.

As etapas envolvidas no desenvolvimento e validação de testes de dissolução são discutidas na USP 32 (2009) no capítulo geral <1092> *The Dissolution Procedure: Development and Validation*.

O sistema de classificação biofarmacêutica (SCB) é baseado na solubilidade e permeabilidade de fármacos. Esta classificação pode ser utilizada para determinar especificações de dissolução *in vitro* e pode fornecer as bases para prever quando a correlação *in vivo-in vitro* (CIVIV) pode ser obtida com sucesso (FDA, 1997; BRASIL, 2004). De acordo com esta classificação os fármacos são divididos em quatro categorias (AMIDON *et al.*, 1995): classe I (alta solubilidade e alta permeabilidade), classe II (baixa solubilidade e alta permeabilidade), classe III (alta solubilidade e baixa permeabilidade) e classe IV (baixa solubilidade e baixa permeabilidade).

Para formulações de liberação imediata contendo fármacos altamente solúveis, a porcentagem dissolvida de fármaco é determinada após um único tempo de coleta. Já, para fármacos pouco solúveis em água é recomendado que o ensaio de dissolução seja realizado com mais de um ponto de coleta de amostra e o perfil de dissolução pode ser utilizado como alternativa. A comparação de perfis de

dissolução pode ser realizada para evitar a exigência de estudo de bioequivalência das formas farmacêuticas de liberação imediata de menor dosagem com a mesma formulação, sendo empregados métodos modelo independentes e modelo dependentes nesta comparação (FDA, 1997). A guia que regulamenta a comparação de perfis de dissolução no país estabelece o uso do método modelo independente que emprega um fator de diferença ( $f_1$ ) e um fator de semelhança ( $f_2$ ) (BRASIL, 2004).

O valor da dissolução como ensaio de controle de qualidade preditivo do desempenho *in vivo* de um medicamento aumenta significativamente quando uma relação entre dados *in vitro* e *in vivo* é estabelecida. A possibilidade de se encontrar CIVIV para fármacos pouco solúveis em água (classe II do SCB) é bastante alta, enquanto para fármacos altamente solúveis em água (classe I e III do SCB), presentes em FFSOLI, a CIVIV nem sempre é obtida (FDA, 1997).

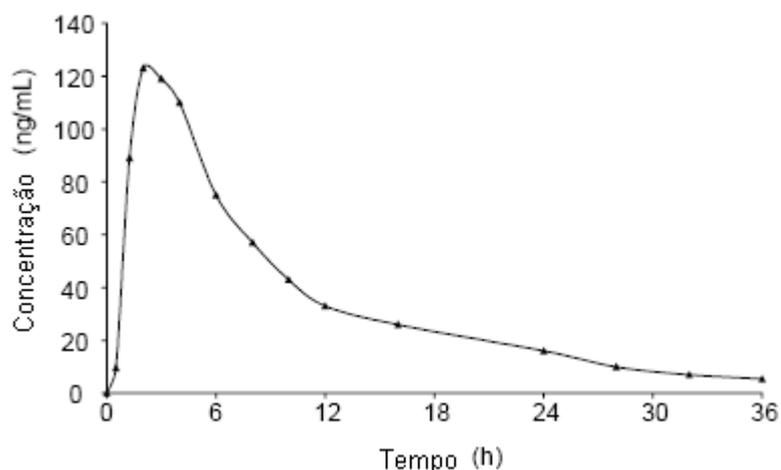


Figura 6 – Perfil farmacocinético da milnaciprana após dose oral única de 50 mg (PUOZZO *et al.*, 2004)

Os dados da biodisponibilidade *in vivo* podem ser utilizados na seleção das melhores condições para o ensaio de dissolução. PUOZZO *et al.* (2002) *apud* PUOZZO *et al.* (2004), p. 227, apresentam o perfil farmacocinético obtido com dados plasmáticos após administração oral de 50 mg de milnaciprana. A concentração plasmática máxima ( $C_{máx}$ ) obtida foi de 150 ng/mL, em cerca de 2 horas ( $t_{máx}$ ), com tempo de meia-vida aproximado de 8 h (Figura 6).

### 3.5 Validação de método analítico

A validação de um método estabelece, através de estudos sistemáticos de laboratório, que o método é adequado à finalidade, isto é, que suas características de desempenho são capazes de produzir resultados correspondentes às necessidades do problema analítico (CITAC/EURACHEM, 2002).

O padrão de validação aplicado aos procedimentos analíticos na indústria farmacêutica é bastante elevado, pois o produto será ingerido por uma pessoa geralmente enfraquecida pela doença e, portanto, mais susceptível às impurezas; e o valor terapêutico da substância ativa está associado a uma estreita variação nas suas concentrações (CLURCZAK, 1998).

O planejamento dos estudos de validação é um aspecto fundamental para garantir que os resultados obtidos reflitam a operação dos procedimentos analíticos e que o método forneça informações confiáveis, visto que a validação da metodologia analítica é considerada um dos requisitos essenciais no registro de medicamentos (BRITAIN, 1998).

Os laboratórios de análise devem realizar a validação de métodos para atender às diretrizes de qualidade dos órgãos regulamentadores, sendo que os dados obtidos devem fazer parte do conjunto de informações apresentado (SWARTZ e KRULL, 1998).

No Brasil o processo de validação é regulamentado pela ANVISA e regido pela Resolução específica: *Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos* (BRASIL, 2003), que segue as diretrizes da *International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use* (ICH), atualizadas na versão Q2(R1) (2005), também incorporadas pela *United States Pharmacopeia* (USP 32, 2009).

TAVERNIERS e colaboradores (2004) compilam informações sobre validação de métodos analíticos e garantia da qualidade em laboratórios, discutindo as principais guias internacionais e os diferentes aspectos abordados. Apresentam os parâmetros de desempenho do método a ser validado, sua definição, as formas de

avaliação prática, de expressão dos resultados e as especificações ou critérios de aceitação requeridos.

As características de validação para os diferentes tipos de procedimentos analíticos são estabelecidas por guias oficiais (CDER, 1994; BRASIL, 2003; ICH, 2005). As principais características para determinação quantitativa da substância ativa na matéria-prima ou no produto acabado (Categoria I) e para testes de performance, como ensaios de dissolução (Categoria III), estão indicadas abaixo no Quadro 3.

Quadro 3 -Ensaio necessários para a validação do método analítico, segundo sua finalidade:

Parâmetro	Categoria I	Categoria III
Especificidade	sim	*
Linearidade	sim	*
Intervalo	sim	*
Precisão Repetibilidade	sim	sim
Intermediária	**	**
Limite de detecção	não	*
Limite de quantificação	não	*
Exatidão	sim	*
Robustez	sim	não

\* pode ser necessário, dependendo da natureza do teste específico.

\*\* se houver comprovação da reprodutibilidade não é necessária a comprovação da Precisão Intermediária.

Adaptado de BRASIL (2003)

### 3.6 Estudo de degradação forçada

Não foram encontrados dados publicados relativos à estabilidade do cloridrato de milnaciprana matéria-prima ou no produto farmacêutico.

A exigência legal de que as características de identidade, eficácia, potência, pureza e segurança dos medicamentos devam ser mantidas, desde sua produção e período em que se encontram no mercado até o momento de seu uso, proporcionando a administração de produtos estáveis e seguros ao paciente, são algumas das razões para a realização de estudos de estabilidade de medicamentos. Também devem ser considerados os aspectos econômicos, relacionados à imagem

do produto, assim como a expectativa de eficácia do paciente quanto ao mesmo (NUDELMAN, 1975).

A estabilidade de um produto farmacêutico pode ser definida como a capacidade de uma formulação particular, em uma embalagem específica, de manter suas especificações físicas, químicas, microbiológicas, terapêuticas e toxicológicas. Quanto ao teor do fármaco, por exemplo, se aceita um mínimo de 90% do valor rotulado (VADAS, 2000).

Estudos preliminares de estabilidade têm o objetivo de determinar quais os principais fatores que interferem no teor do fármaco, na toxicidade, na eficácia e nas características farmacotécnicas e organolépticas. Nestes testes o fármaco ou o produto farmacêutico é submetido a condições extremas de degradação, pois se pretende determinar os parâmetros que os degradam de forma eficaz (NUDELMAN, 1975).

O protocolo do estudo de estabilidade deve contemplar avaliações físicas, químicas, físico-químicas e microbiológicas, quando for o caso. Deve-se avaliar, também, a presença ou formação qualitativa e quantitativa de subprodutos e/ou produtos de degradação, utilizando-se metodologia adequada e validada (BRASIL, 2005).

A realização dos testes de estresse, assim como o desenvolvimento do método analítico para a identificação e quantificação dos produtos de degradação é de extrema importância para as indústrias farmacêuticas, pois no momento do registro, pós-registro e renovação, o estudo de estresse, acompanhado de sua análise crítica deverá ser contemplada (SILVA *et al.*, 2009).

Problemas potenciais durante processos de armazenamento e transporte são avaliados através de testes de estresse, além de fornecer uma estimativa do período de validade do produto farmacêutico (FDA, 1987). Os testes de estresse fornecem informações úteis sobre os potenciais mecanismos e produtos de degradação e a estabilidade intrínseca da molécula do fármaco, assim como para validar métodos analíticos indicadores de estabilidade (BAKSHI e SINGH, 2002; ICH Q1A, 2003; KLINK *et al.*, 2005).

A capacidade de separação e detecção do fármaco de seus potenciais produtos de degradação, mesmo em baixas concentrações, faz da CLAE o método analítico indicador de estabilidade mais amplamente empregado, pois apresenta alta capacidade de resolução, sensibilidade e especificidade se comparado aos métodos convencionais de análise (BAKSHI e SINGH, 2002).

### **3.6.1 Cinética de degradação**

O estudo da cinética de degradação para produtos farmacêuticos tem como objetivos prever e entender a taxa e o mecanismo da reação. A compreensão dessas reações nos fornece informações importantes quanto aos potenciais produtos de degradação que também precisam ser monitorados. De modo geral, as reações de degradação de fármacos ocorrem em taxas finitas. Estas reações são afetadas por condições, tais como concentração de solvente, de reagentes, temperatura, pH do meio, energia de radiação e presença de catalisadores. A ordem de degradação é descrita pelo modo com o qual a taxa de reação depende da concentração do fármaco. A degradação da maior parte dos produtos farmacêuticos pode ser classificada como de ordem zero, primeira ordem, ou pseudo primeira ordem, embora a degradação também possa ocorrer por mecanismos mais complexos, expressos por uma ordem de reação superior (AHUJA, 1998).

A partir de resultados experimentais (valores de concentração do fármaco a cada tempo de exposição), são obtidos dados sobre a cinética de degradação frente ao fator estudado. Deste modo, a ordem de degradação que melhor descreve a redução de concentração do fármaco em função do tempo, a velocidade de reação ( $k$ ) e o período de vida útil  $t_{90\%}$  (tempo no qual 90% da concentração do fármaco encontra-se inalterada) são determinados (NUDELMAN, 1975; AHUJA, 1998).



## 4. MATERIAL E MÉTODOS

---



#### **4.1 Matéria-prima e produto farmacêutico**

O cloridrato de milnaciprana (MNC) foi adquirido através da empresa SynFine Research Inc. e os medicamentos Ixel® e Dalcipran®, na forma farmacêutica cápsula 25 e 50 mg, foram adquiridos no mercado.

A matéria-prima foi submetida a diferentes ensaios de caracterização a fim de utilizá-la como substância química de referência no desenvolvimento e validação dos métodos analíticos propostos para o produto farmacêutico.

As cápsulas são armazenadas à temperatura ambiente (15 a 30 °C), ao abrigo da luz e umidade (ROCHE, 2001, 2008). Os excipientes são: fosfato de cálcio dibásico, povidona, carboximetilcelulose cálcica, sílica coloidal anidra, estearato de magnésio e talco.

#### **4.2 Caracterização da substância química de referência (SQR)**

##### **4.2.1 Caracteres físicos**

Foram avaliadas características organolépticas, tais como aspecto, cor e odor da matéria-prima.

##### **4.2.2 Solubilidade**

O ensaio foi realizado conforme descrito em *Generalidades* (IV.-2), na Farmacopéia Brasileira IV ed. (1988).

##### **4.2.3 Determinação de umidade**

A determinação de umidade na matéria-prima do fármaco foi realizada por meio da perda por dessecação em estufa a 105 °C até peso constante.

##### **4.2.4 Ponto de fusão**

O ponto de fusão do cloridrato de milnaciprana SQR foi determinado por dois equipamentos:

- ❖ Equipamento segundo Koffler (REICHERT): pequena quantidade do fármaco foi adicionada entre lâmina e lamínula e estas colocadas sobre um bloco

metálico. A temperatura é controlada por um reostato e a amostra é observada através de um microscópio. A temperatura de fusão é então determinada pela observação simultânea da amostra e do termômetro acoplado ao bloco metálico aquecido. Para a calibração foi utilizado o salofeno (Mettler ME-18555 A.8.92 Calibration Substance com ponto de fusão 191 °C), SQR que acompanha o equipamento. Foram realizadas três determinações do cloridrato de milnaciprana.

- ❖ Equipamento automático METTLER TOLEDO FP90: o fármaco foi adicionado em tubos capilares com 1 mm de espessura e 6 cm de comprimento e introduzido verticalmente no equipamento, sendo possível a determinação simultânea de até 3 amostras. Para a calibração foi utilizado o salofeno (ponto de fusão 191 °C) como SQR.

Os resultados foram comparados aos valores obtidos através da análise por calorimetria exploratória diferencial.

#### **4.2.5 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)**

O experimento de calorimetria exploratória diferencial para o cloridrato de milnaciprana foi realizado no Laboratório da Central Analítica da Faculdade de Farmácia (UFRGS). Empregou-se equipamento SHIMADZU DSC-60 acoplado ao integrador THERMAL ANALYZER TA-60WS (*Collection Monitor* versão 2.0, 1997-2003) e ao controlador de fluxo FC-60A, sob atmosfera inerte de nitrogênio com fluxo de 50 mL/min e velocidade de aquecimento de 10 °C/min até 200 °C.

#### **4.2.6 Rotação específica**

A análise foi realizada em polarímetro PERKIN ELMER 341, utilizando cubetas de 1 dm de percurso óptico e comprimento de onda de raia D de sódio (589,3 nm) a 20 °C ± 0,5 °C. Foram preparadas soluções de cloridrato de milnaciprana (2%, p/V) em água e o procedimento ocorreu conforme descrito em *Determinação do poder rotatório e do poder rotatório específico* (V.2.8) (F. Bras. IV, 1988), auxiliando na identificação e indicando a pureza do fármaco analisado.

#### **4.2.7 Espectrofotometria na região do infravermelho (IV)**

O espectro de absorção na região do infravermelho foi obtido utilizando acessório de refletância atenuada (ATR) para análise direta. A amostra, cerca de 1 mg do fármaco, foi analisada em espectrofotômetro PERKIN ELMER FT-IR Spectrum BX, no laboratório da Central Analítica da Faculdade de Farmácia - LASOM (UFRGS).

### **4.3 Análise quantitativa do produto acabado**

#### **4.3.1 Espectrofotometria derivada na região do ultravioleta (UV-D)**

Os espectros de UV (200 a 400 nm) foram obtidos em espectrofotômetro SHIMADZU UV-1601 PC, utilizando-se cubetas de quartzo com 1 cm de percurso óptico. As soluções do MNC SQR e das cápsulas foram preparadas em HCl 0,1 M e submetidas à análise por UV (2ª derivada), com leitura das absorvâncias no comprimentos de onda de 268,5 nm,  $\Delta\lambda = 4$  e fator de escala = 200 para a validação do método.

##### **4.3.1.1 Validação do método UV-D<sup>2</sup> para determinação do MNC na forma farmacêutica cápsula**

###### **4.3.1.1.1 Especificidade**

A avaliação da interferência dos excipientes da formulação no método UV-D<sup>2</sup> para quantificação do cloridrato de milnaciprana foi realizada através da análise do placebo do conteúdo das cápsulas. A concentração dos excipientes da formulação, utilizada no preparo da solução placebo, foi baseada na especificação máxima de cada um, obtida na literatura (KIBBE *et al.*, 2000). A partir do peso médio das cápsulas (110 mg) foi determinado o conteúdo referente aos excipientes.

Foram utilizados, aproximadamente: povidona (5%), carboximetilcelulose sódica (15%), Aerosil® (0,5%), estearato de magnésio (5%), talco (30%) e fosfato de sódio (21,5%), como proporção dos excipientes para uma cápsula de MNC 25 mg. Uma mistura destes excipientes, equivalente ao conteúdo de 5 cápsulas, foi então preparada.

A solução de MNC SQR foi preparada dissolvendo-se, exatamente, cerca de 10 mg do fármaco em balão volumétrico de 20 mL com etanol (500,0 µg/mL), homogeneizando-se e diluindo-se alíquota de 3,0 mL desta solução em balão volumétrico de 25 mL com HCl 0,1M (60,0 µg/mL).

No preparo da solução das cápsulas, dissolveu-se o equivalente a 10 mg do fármaco em balão volumétrico de 20 mL com etanol, a partir da mistura do conteúdo de 10 cápsulas. Agitou-se mecanicamente por cerca de 10 minutos, deixou-se em banho de ultrassom por aproximadamente 5 minutos e filtrou-se (500,0 µg/mL). Diluiu-se 3,0 mL desta solução em balão volumétrico de 25 mL com HCl 0,1M, obtendo-se concentração final de 60,0 µg/mL.

Para a solução placebo, dissolveu-se quantidade, da mistura dos excipientes, equivalente a 10 mg de MNC em balão volumétrico de 20 mL com etanol. Agitou-se mecanicamente por cerca de 10 minutos, deixou-se em banho de ultrassom por cerca de 5 minutos, filtrou-se e diluiu-se 3,0 mL desta solução em balão volumétrico de 25 mL com HCl 0,1M, correspondendo à solução de 60,0 µg/mL do fármaco.

As soluções de MNC SQR, das cápsulas e dos excipientes foram analisadas separadamente para posterior sobreposição e análise dos respectivos espectros.

#### **4.3.1.1.2 Linearidade**

Cinco níveis de concentração foram avaliados em três diferentes dias no intervalo de 20 a 100 µg/mL. A curva padrão foi obtida a partir dos valores das absorvâncias em função das concentrações de MNC SQR nas soluções correspondentes. Foram realizadas três leituras para cada ponto da curva. A equação da reta e o coeficiente de correlação (r) foram calculados pelo método dos mínimos quadrados, a partir das três curvas padrão. A linearidade do método foi verificada através da análise de variância (ANOVA) com confiabilidade de 95%.

A partir de uma solução de MNC SQR em etanol na concentração de 500,0 µg/mL, alíquotas de 1,0; 2,0; 3,0 e 4,0 mL foram transferidas, para balões volumétricos de 5 mL, completando-se os volumes com etanol e obtendo-se, respectivamente, concentrações de 100,0; 200,0; 300,0 e 400,0 µg/mL. Alíquotas de 4,0 mL destas soluções e também da solução inicial foram diluídas,

respectivamente, em balões volumétricos de 20 mL com HCl 0,1M para as concentrações finais de 20,0; 40,0; 60,0; 80,0 e 100,0 µg/mL.

#### 4.3.1.1.3 Precisão

A repetibilidade foi testada pela análise de seis soluções amostra (cápsulas) contendo 60,0 µg/mL de MNC preparadas em HCl 0,1M, a partir da solução inicial de 500,0 µg/mL em etanol, de acordo com o descrito no item 4.3.1.1.1. Foram realizadas três leituras para cada solução de análise no mesmo dia. A precisão intermediária foi testada pela repetição deste estudo em três diferentes dias (n = 18). Os resultados do estudo de precisão do método foram expressos em termos de desvio padrão relativo (DPR).

A solução de MNC SQR (60,0 µg/mL) foi preparada a partir de solução inicial de 500,0 µg/mL, de acordo com o descrito no item 4.3.1.1.1.

A concentração ( $C_a$ ) em µg/mL das soluções das cápsulas, foi determinada a partir da equação abaixo.

$$C_a = (A_a \cdot C_{SQR}) / A_{SQR}$$

Onde:

$A_a$  = absorvância da solução das cápsulas de MNC

$C_{SQR}$  = concentração da solução de MNC SQR

$A_{SQR}$  = absorvância da solução de MNC SQR

O teor (C%) de MNC nas cápsulas foi calculado de acordo com a seguinte equação:

$$C\% = (C_a \cdot 100) / C_t$$

Onde:

$C_a$  = concentração da solução das cápsulas de MNC

$C_t$  = concentração teórica da solução das cápsulas de MNC

#### 4.3.1.1.4 Exatidão

A exatidão do método foi avaliada através do teste de recuperação. Quantidades conhecidas de MNC SQR foram adicionadas em solução das cápsulas, em três diferentes concentrações, no intervalo de 75 a 125% da concentração de trabalho conforme Quadro 4.

Preparou-se solução de MNC SQR a 300,0 µg/mL em etanol. Para isso, foram pesados e dissolvidos, quantitativamente, 10 mg da SQR em etanol e diluídos em balão volumétrico de 20 mL (500,0 µg/mL). Transferiu-se alíquota de 6,0 mL para balão volumétrico de 10 mL e completou-se o volume com o mesmo solvente.

A solução amostra foi preparada pesando-se e dissolvendo-se quantidade da mistura do conteúdo das cápsulas, equivalente a 10 mg do fármaco, para balão volumétrico de 20 mL, completando-se o volume com etanol (500,0 µg/mL). Agitou-se mecanicamente por aproximadamente 10 minutos, deixou-se em banho de ultrassom por aproximadamente 5 minutos e filtrou-se. Diluiu-se 6,0 mL desta solução para balão volumétrico de 10 mL com o mesmo solvente (300,0 µg/mL).

Para o preparo das soluções finais, R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> e R<sub>3</sub>, foram transferidos para balões volumétricos de 20 mL, alíquotas de 2,0 mL da solução amostra (cápsulas) e alíquotas de 1,0; 2,0 e 3,0 mL da solução padrão (MNC SQR), diluindo-se com HCl 0,1M e obtendo-se soluções com concentração total do fármaco de 45,0; 60,0 e 75,0 µg/mL, respectivamente, em triplicata. Soluções do padrão (SQR) e amostra (A) a 30,0 µg/mL foram preparadas, separadamente, em balões volumétricos de 20 mL.

Quadro 4 - Soluções para o teste de recuperação por UV-D<sup>2</sup> (λ = 268,5 nm)

	Volume da solução amostra (mL)*	Volume da solução padrão (mL)*	Concentração final em balão vol. 20 mL (µg/mL)
A	2,0	–	30,0
R <sub>1</sub>	2,0	1,0	45,0
R <sub>2</sub>	2,0	2,0	60,0
R <sub>3</sub>	2,0	3,0	75,0
SQR	–	2,0	30,0

\* Solução a 300,0 µg/mL

O percentual de recuperação do método foi calculado a partir da equação abaixo:

$$R\% = [(C_R - C_A) / C_{SQR}] \cdot 100$$

Onde:

$C_R$  = concentração da solução final  $R_n$ , contendo MNC SQR e amostra ( $\mu\text{g/mL}$ )

$C_A$  = concentração da solução amostra ( $\mu\text{g/mL}$ )

$C_{SQR}$  = concentração da solução padrão ( $\mu\text{g/mL}$ )

### **4.3.2 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)**

#### **4.3.2.1 Equipamento e condições cromatográficas**

Para quantificação do cloridrato de milnaciprana em cápsulas foi utilizado cromatógrafo a líquido SHIMADZU LC-10AD, equipado com detector UV SPD-M10AV<sub>VP</sub> com arranjo de fotodiodos (DAD), degaseificador DGU-14A, central de controle SCL-10A<sub>VP</sub> e injetor manual RHEODYNE. A aquisição e a análise dos dados foram realizadas através do aplicativo CLASS-VP.

Após ensaios preliminares para a determinação da MNC nas cápsulas, os melhores parâmetros foram selecionados para a validação do método. As análises cromatográficas foram realizadas à temperatura ambiente, utilizando coluna Macherey-Nagel (MN) Nucleosil® C8 ec (150 x 4,6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ) e pré-coluna C18 (4,0 x 3,0 mm, Phenomenex®). A fase móvel foi constituída da mistura de acetonitrila, água e trietilamina (70:30:0,085), V/V/V), com ajuste do pH da fase aquosa com ácido fosfórico 20% (V/V) para pH 7,5. A eluição ocorreu em sistema isocrático. A vazão foi de 1,2 mL/min e o detector de DAD foi ajustado em 210 nm.

### **4.3.2.2 Validação do método CLAE para determinação do MNC na forma farmacêutica cápsula**

#### **4.3.2.2.1 Especificidade**

A especificidade do método foi estabelecida pela determinação da pureza dos picos cromatográficos utilizando detector de arranjo de diodos, após injeção de soluções do placebo e de potenciais produtos de degradação, obtidos através de testes de degradação forçada do fármaco.

##### **4.3.2.2.1.1 Avaliação da interferência dos excipientes da formulação**

A avaliação da interferência dos excipientes das cápsulas no método CLAE para quantificação do cloridrato de milnaciprana foi realizada através da análise do placebo do conteúdo das cápsulas.

A concentração dos excipientes da formulação, utilizada no preparo da solução placebo, foi baseada na especificação máxima de cada um, obtida na literatura (KIBBE *et al.*, 2000), de acordo com o descrito no item 4.3.1.1.1.

A solução de MNC SQR foi preparada dissolvendo-se, exatamente, cerca de 10 mg do fármaco em balão volumétrico de 20 mL com metanol (500,0 µg/mL), homogeneizando-se e diluindo-se alíquota de 3,0 mL desta solução em balão volumétrico de 25 mL com a fase móvel (60,0 µg/mL).

No preparo da solução das cápsulas, dissolveu-se quantidade, da mistura do conteúdo de 10 cápsulas, equivalente a 10 mg do fármaco em balão volumétrico de 20 mL com metanol. Agitou-se mecanicamente por cerca de 10 minutos, deixou-se em banho de ultrassom por aproximadamente 5 minutos e filtrou-se (500,0 µg/mL). Diluiu-se 3,0 mL desta solução em balão volumétrico de 25 mL na fase móvel, obtendo-se concentração final de 60,0 µg/mL.

Para a solução placebo, dissolveu-se quantidade, da mistura dos excipientes, equivalente a 10 mg de MNC em balão volumétrico de 20 mL com metanol. Agitou-se mecanicamente por aproximadamente 10 minutos, deixou-se em banho de ultrassom por cerca de 5 minutos, filtrou-se e diluiu-se 3,0 mL desta solução em

balão volumétrico de 25 mL em fase móvel, correspondendo à solução 60,0 µg/mL do fármaco.

Foram analisadas, separadamente, as soluções de MNC SQR, das cápsulas e dos excipientes para posterior avaliação dos respectivos cromatogramas.

#### **4.3.2.2.1.2 Avaliação da interferência dos potenciais produtos de degradação**

A interferência de potenciais produtos de degradação no método de CLAE para quantificação do cloridrato de milnaciprana também foi investigada através de testes de degradação forçada. Soluções do MNC SQR e das cápsulas foram expostas à degradação térmica, fotólise, oxidação e condições hidrolíticas para avaliação de cada condição de estresse.

- *Degradação térmica*: aquecimento da solução metanólica de MNC SQR (500 µg/mL) em estufa a 80 °C por 24 horas. Após este período, a solução foi diluída (50 µg/mL) em fase móvel antes da injeção no equipamento.
- *Fotólise*: exposição da solução metanólica do padrão e amostra (500 µg/mL), separadamente, em placas de Petri acondicionadas em câmara espelhada (100x16x16 cm) sob lâmpada de radiação UV 352 nm por aproximadamente 20 horas. O fármaco foi recuperado e dissolvido novamente em metanol e diluído (100 µg/mL) em fase móvel antes da injeção. Soluções do padrão e das cápsulas em metanol (500 µg/mL) também foram analisadas após exposição sob radiação UV 254 nm, em cubetas de quartzo (UV-CUVETTE MICRO-BRAND) por até 10 horas.
- *Oxidação*: exposição da solução metanólica do padrão e amostra (500 µg/mL), separadamente, ao peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3%, V/V) em temperatura ambiente (± 25 °C) por cerca de 20 horas e, em seguida, as soluções foram diluídas (100 µg/mL) em fase móvel.
- *Condições hidrolíticas*: exposição da solução metanólica do padrão e amostra (500 µg/mL), separadamente, ao HCl 1M e ao NaOH 1M (10:1, V/V) em temperatura ambiente (± 25 °C) por até 24 horas. Para a hidrólise neutra, as soluções foram diluídas em água (10:3, V/V) e aquecidas a 60 °C em banho-

maria por 4 horas. Posteriormente, as soluções foram neutralizadas, diluídas (100 µg/mL) em fase móvel e filtradas antes da análise.

Dados do detector de arranjo de fotodiodos (DAD) foram coletados com o propósito de avaliar a pureza do pico do cloridrato de milnaciprana e os resultados foram comparados com os cromatogramas obtidos das soluções do branco, do MNC SQR e das cápsulas, respectivamente, não expostas às condições de estresse.

#### **4.3.2.2.2 Linearidade**

Cinco níveis de concentração foram avaliados em três diferentes dias no intervalo de 20 a 100 µg/mL. A curva padrão foi obtida a partir dos valores das áreas médias dos picos dos cromatogramas obtidos, em função das concentrações de MNC SQR nas soluções correspondentes. Foram realizadas injeções em triplicata para cada ponto da curva. A equação da reta e o coeficiente de correlação (r) foram calculados pelo método dos mínimos quadrados, a partir das três curvas padrão. A linearidade do método foi verificada através da análise de variância (ANOVA) com confiabilidade de 95%.

A partir de uma solução metanólica de MNC SQR (500,0 µg/mL), alíquotas de 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 e 5,0 mL foram transferidas, para balões volumétricos de 25 mL, completando-se os volumes com a fase móvel e obtendo-se, respectivamente, concentrações finais de 20,0; 40,0; 60,0; 80,0 e 100,0 µg/mL.

#### **4.3.2.2.3 Precisão**

A repetibilidade foi testada pela análise de seis soluções amostra (cápsulas) contendo 60,0 µg/mL de MNC preparadas em fase móvel, a partir da solução metanólica inicial (500,0 µg/mL), de acordo com o descrito no item 4.3.2.2.1.1. Foram realizadas três injeções para cada solução de análise no mesmo dia. A precisão intermediária foi testada pela repetição deste estudo em três diferentes dias (n = 18). Os resultados do estudo de precisão do método foram expressos em termos de desvio padrão relativo (DPR).

A solução de MNC SQR (60,0 µg/mL) foi preparada a partir de solução metanólica inicial (500,0 µg/mL), de acordo com o descrito no item 4.3.2.2.1.1.

A concentração ( $C_a$ ) em  $\mu\text{g/mL}$  das soluções das cápsulas, foi determinada a partir da equação abaixo.

$$C_a = (A_a \cdot C_{\text{SQR}}) / A_{\text{SQR}}$$

Onde:

$A_a$  = área absoluta do pico para a solução das cápsulas de MNC

$C_{\text{SQR}}$  = concentração da solução de MNC SQR

$A_{\text{SQR}}$  = área absoluta do pico para a solução de MNC SQR

O teor (C%) de MNC nas cápsulas foi calculado de acordo com a seguinte equação:

$$\text{C\%} = (C_a \cdot 100) / C_t$$

Onde:

$C_a$  = concentração da solução das cápsulas de MNC

$C_t$  = concentração teórica da solução das cápsulas de MNC

#### 4.3.2.2.4 Exatidão

A exatidão do método foi avaliada através do teste de recuperação. Quantidades conhecidas de MNC SQR foram adicionadas em solução das cápsulas, em três diferentes concentrações, no intervalo de 75 a 125% da concentração de trabalho conforme Quadro 5.

Preparou-se solução de MNC SQR a 300,0  $\mu\text{g/mL}$  em metanol. Para isso, foram pesados e dissolvidos, quantitativamente, 10 mg da SQR em metanol e diluídos em balão volumétrico de 20 mL (500,0  $\mu\text{g/mL}$ ). Transferiu-se alíquota de 6,0 mL para balão volumétrico de 10 mL e completou-se o volume com o mesmo solvente.

A solução amostra foi preparada pesando-se e dissolvendo-se quantidade da mistura do conteúdo das cápsulas, equivalente a 10 mg do fármaco, para balão volumétrico de 20 mL, completando-se o volume com metanol (500,0  $\mu\text{g/mL}$ ).

Agitou-se mecanicamente por aproximadamente 10 minutos, deixou-se em banho de ultrassom por cerca de 5 minutos e filtrou-se. Diluiu-se 6,0 mL desta solução para balão volumétrico de 10 mL com o mesmo solvente (300,0 µg/mL).

Para o preparo das soluções finais, R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> e R<sub>3</sub>, foram transferidos para balões volumétricos de 20 mL, alíquotas de 2,0 mL da solução amostra (cápsulas) e alíquotas de 1,0; 2,0 e 3,0 mL da solução padrão (MNC SQR), diluindo-se com a fase móvel e obtendo-se soluções com concentração total do fármaco de 45,0; 60,0 e 75,0 µg/mL, respectivamente, em triplicata. Soluções do padrão (SQR) e amostra (A) a 30,0 µg/mL foram preparadas, separadamente, em balões volumétricos de 20 mL.

Quadro 5 - Soluções para o teste de recuperação por CLAE

	Volume da solução amostra (mL)*	Volume da solução padrão (mL)*	Concentração final em balão vol. 20 mL (µg/mL)
A	2,0	–	30,0
R <sub>1</sub>	2,0	1,0	45,0
R <sub>2</sub>	2,0	2,0	60,0
R <sub>3</sub>	2,0	3,0	75,0
SQR	–	2,0	30,0

\* Solução a 300,0 µg/mL

A recuperação percentual do método foi calculada a partir da equação abaixo:

$$R\% = [(C_R - C_A) / C_{SQR}] \cdot 100$$

Onde:

C<sub>R</sub> = concentração da solução final R<sub>n</sub>, contendo MNC SQR e amostra (µg/mL)

C<sub>A</sub> = concentração da solução amostra (µg/mL)

C<sub>SQR</sub> = concentração da solução padrão (µg/mL)

#### 4.3.2.2.5 Robustez

A robustez do método foi verificada através das alterações nos parâmetros de validação, tais como, tempo de retenção, número de pratos teóricos, assimetria,

área absoluta do pico cromatográfico e teor do fármaco, após mudanças nas condições cromatográficas apresentadas no Quadro 6.

Quadro 6 – Alterações realizadas no método por CLAE para avaliação da robustez na determinação de MNC nas cápsulas.

*pH da fase móvel:	pH 7,0 e pH 8,0
vazão da fase móvel:	1,0 mL/minuto
**coluna analítica:	Merck LiChrocart®/LiChrospher® C8 (125 x 4,6 mm, 5 µm)

\*correção do valor de pH da fase aquosa anterior à mistura com a fase orgânica.

\*\*a vazão utilizada para análise nesta coluna foi de 1,0 mL/minuto.

### 4.3.3 Eletroforese capilar (EC)

#### 4.3.3.1 Equipamento e condições de análise eletroforética

Para quantificação do cloridrato de milnaciprana em cápsulas por eletroforese capilar foi utilizado equipamento Agilent 3D CE (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany), equipado com amostrador automático, detector UV com arranjo de diodos e *software* CE ChemStation para controle do equipamento, aquisição e análise de dados. A separação eletroforética foi realizada em capilar de sílica fundida com 48,5 cm de comprimento (40,0 cm de comprimento efetivo) e 50 µm de diâmetro interno (Polymicro Technologies). As condições eletroforéticas empregadas estão descritas no Quadro 7.

O eletrólito de corrida foi preparado dissolvendo-se 3,09 g de ácido bórico em água ultrapura. A solução foi transferida para balão volumétrico de 500 mL, completando-se o volume com o mesmo diluente. A solução de dodecil sulfato de sódio (SDS) foi preparada dissolvendo-se 1,44 g de SDS em água ultrapura, transferindo-se para balão volumétrico de 100 mL e completando-se o volume com o mesmo diluente. Uma alíquota de 5 mL da solução de ácido bórico (100 mM) e outra de 10 mL da solução de SDS (50 mM) foram transferidas para balão volumétrico de 25 mL, diluindo-se com água ultrapura para a concentração final de 20 mM. O ajuste do pH 8,8 foi realizado com NaOH 0,1 M.

As soluções de MNC SQR e do conteúdo das cápsulas, preparadas em água ultrapura a cada dia de análise, foram acrescidas de uma alíquota da solução de

padrão interno (PI) de ácido salicílico solubilizado em metanol. As diluições finais foram realizadas em ácido bórico 20 mM (pH 8,0).

Quadro 7 – Condições analíticas utilizadas para a determinação do MNC por EC

<i>Parâmetro:</i>	<i>Descrição:</i>
Eletrólito de corrida	Ácido bórico + SDS (20 mM) pH 8,8
Tensão aplicada	30 kV
Injeção por pressão	50 mBar
Tempo de injeção	5 segundos
Comprimento de onda de detecção	210 nm
Temperatura de análise	30 °C ± 1 °C
Ativação do capilar	NaOH 1 M (30 minutos) NaOH 0,1 M (20 min)
Condicionamento diário	água (20 min) eletrólito de corrida (30 min) NaOH 0,1 M (1,5 min)
Condicionamento entre as injeções	água (1,5 min) eletrólito de corrida (2 min)

Antes da injeção no equipamento EC, todas as soluções preparadas (padrões, amostras, NaOH 0,1 M e eletrólito de corrida) foram filtradas por membrana de *nylon* de 0,45 µm de diâmetro de poro (MILLIPORE).

A identificação do fármaco no produto acabado foi realizada pela comparação dos tempos de migração, e espectros UV-DAD, apresentados pelos picos eletroforéticos obtidos para as injeções das soluções amostra e MNC SQR respectivamente.

#### **4.3.3.2 Validação do método EC para determinação do MNC na forma farmacêutica cápsula**

##### **4.3.3.2.1 Especificidade**

A especificidade do método foi estabelecida pela determinação da pureza dos picos eletroforéticos utilizando detector de arranjo de diodos, após injeção de

soluções do placebo e de potenciais produtos de degradação, obtidos através de testes de degradação forçada do fármaco, de acordo com procedimentos descritos anteriormente no item 4.3.2.2.1.2.

#### **4.3.3.2.1.1 Avaliação da interferência dos excipientes da formulação**

A avaliação da interferência dos excipientes das cápsulas no método EC para quantificação do cloridrato de milnaciprana foi realizada através da análise do placebo do conteúdo das cápsulas.

A concentração dos excipientes da formulação, utilizada no preparo da solução placebo, foi baseada na especificação máxima de cada um, obtida na literatura (KIBBE *et al.*, 2000), de acordo com o descrito no item 4.3.1.1.1.

A solução do padrão interno (PI) foi preparada dissolvendo-se, exatamente, cerca de 4,0 mg de ácido salicílico em balão volumétrico de 20 mL com metanol (200,0 µg/mL), homogeneizando-se e completando-se o volume com o mesmo solvente.

A solução de MNC SQR foi preparada dissolvendo-se, exatamente, cerca de 10 mg do fármaco em balão volumétrico de 10 mL com água (1,0 mg/mL), homogeneizando-se e diluindo-se alíquota de 250,0 µl desta solução, juntamente com 1,0 mL da solução do PI, em balão volumétrico de 10 mL com ácido bórico 20 mM pH 8,0 (25,0 µg/mL MNC SQR + 20 µg/mL PI).

No preparo da solução das cápsulas, dissolveu-se quantidade, da mistura do conteúdo de 20 cápsulas, equivalente a 10 mg do fármaco em balão volumétrico de 10 mL com água. Agitou-se mecanicamente por cerca de 10 minutos, deixou-se em banho de ultrassom por aproximadamente 5 minutos, completou-se o volume com água e filtrou-se (1,0 mg/mL). Diluiu-se 500,0 µl desta solução, juntamente com 1,0 mL da solução do PI, em balão volumétrico de 10 mL com ácido bórico 20 mM pH 8,0, obtendo-se concentração final de 50,0 µg/mL do fármaco e 20 µg/mL do PI.

Para a solução placebo, dissolveu-se quantidade, da mistura dos excipientes, equivalente a 10 mg de MNC em balão volumétrico de 10 mL com água. Agitou-se mecanicamente por aproximadamente 10 minutos, deixou-se em banho de ultrassom por cerca de 5 minutos, filtrou-se e diluiu-se 500,0 µl desta solução em

balão volumétrico de 10 mL em ácido bórico 20 mM pH 8,0, correspondendo à solução 50,0 µg/mL do fármaco.

Foram analisadas, separadamente, as soluções de MNC SQR, das cápsulas e dos excipientes para posterior avaliação dos respectivos eletroferogramas.

#### **4.3.3.2.1.2 Avaliação da interferência dos potenciais produtos de degradação**

Testes de degradação forçada por fotólise, sob UV 254 nm por 2 horas, e oxidação com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% (V/V) por 24 horas, foram realizados para investigação de possíveis interferências dos produtos de degradação no método de quantificação do cloridrato de milnaciprana por EC.

As soluções submetidas às condições de estresse foram diluídas em ácido bórico 20 mM pH 8,0 e filtradas antes de serem injetadas no equipamento de EC. Dados do detector de arranjo de fotodiodos (DAD) foram coletados com o propósito de avaliar a pureza do pico do cloridrato de milnaciprana e os resultados foram comparados com os eletroferogramas obtidos das soluções do branco, do MNC SQR e das cápsulas, respectivamente, não expostas às condições de estresse.

#### **4.3.3.2.2 Linearidade**

Cinco níveis de concentração foram avaliados em três diferentes dias no intervalo de 20 a 60 µg/mL. A curva padrão foi obtida a partir dos valores da razão das áreas dos picos dos eletroferogramas obtidos para o fármaco e o padrão interno ácido salicílico ( $A_{MNC}/A_{PI}$ ), em função das concentrações de MNC SQR nas soluções correspondentes. Foram realizadas injeções em triplicata para cada ponto da curva. A equação da reta e o coeficiente de correlação ( $r$ ) foram calculados pelo método dos mínimos quadrados, a partir das três curvas padrão. A linearidade do método foi verificada através da análise de variância (ANOVA) com confiabilidade de 95%.

A partir de uma solução aquosa de MNC SQR (1 mg/mL), alíquotas de 200,0; 300,0; 400,0; 500,0 e 600,0 µl foram transferidas, para balões volumétricos de 10 mL. Adicionou-se 1 mL da solução do padrão interno em cada balão volumétrico e os volumes foram completados com ácido bórico 20 mM pH 8,0 obtendo-se, respectivamente, concentrações finais de 20,0; 30,0; 40,0; 50,0 e 60,0 µg/mL.

#### 4.3.3.2.3 Precisão

A repetibilidade foi testada pela análise de seis soluções amostra (cápsulas) contendo 40,0 µg/mL de MNC, e 20,0 µg/mL de PI, preparadas em ácido bórico 20 mM pH 8,0, a partir da solução (1,0 mg/mL), de acordo com o descrito no item 4.3.3.2.1.1. Foram realizadas três injeções para cada solução de análise no mesmo dia. A precisão intermediária foi testada pela repetição deste estudo em dois diferentes dias (n = 12). Os resultados do estudo de precisão do método foram expressos em termos de desvio padrão relativo (DPR).

A solução de MNC SQR (40,0 µg/mL) e PI (20,0 µg/mL) foi preparada a partir de solução inicial (1 mg/mL), de acordo com o descrito no item 4.3.3.2.1.1.

A concentração ( $C_a$ ) em µg/mL das soluções das cápsulas foi determinada a partir da equação abaixo.

$$C_a = (A_a/A_{PI} \cdot C_{SQR}) / A_{SQR}/A_{PI}$$

Onde:

$A_a/A_{PI}$  = razão das áreas dos picos para a solução das cápsulas de MNC / solução de ácido salicílico (PI)

$C_{SQR}$  = concentração da solução de MNC SQR

$A_{SQR}/A_{PI}$  = razão das áreas dos picos para a solução de MNC SQR / solução de ácido salicílico (PI)

O teor (C%) de MNC nas cápsulas foi calculado de acordo com a seguinte equação:

$$C\% = (C_a \cdot 100) / C_t$$

Onde:

$C_a$  = concentração da solução das cápsulas de MNC

$C_t$  = concentração teórica da solução das cápsulas de MNC

#### 4.3.3.2.4 Exatidão

A exatidão do método foi avaliada através do teste de recuperação. Quantidades conhecidas de MNC SQR foram adicionadas em solução das cápsulas, em três diferentes concentrações, no intervalo de 75 a 125% da concentração de trabalho conforme Quadro 8.

Preparou-se solução de MNC SQR a 1 mg/mL. Para isso, foram pesados e dissolvidos, quantitativamente, 10 mg da SQR em água e diluídos em balão volumétrico de 10 mL com o mesmo solvente.

A solução amostra foi preparada pesando-se e dissolvendo-se quantidade da mistura do conteúdo das cápsulas, equivalente a 10 mg do fármaco, em balão volumétrico de 10 mL com água. Agitou-se mecanicamente por aproximadamente 10 minutos, deixou-se em banho de ultrassom por cerca de 5 minutos, completou-se o volume com água e filtrou-se.

Para o preparo das soluções finais, R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> e R<sub>3</sub>, foram transferidos para balões volumétricos de 10 mL, alíquotas de 200,0 µl da solução amostra (cápsulas) e alíquotas de 100,0; 200,0 e 300,0 µl da solução padrão (MNC SQR) respectivamente. Acrescentou-se 1 mL da solução metanólica de PI (200,0 µg/mL) em cada balão volumétrico e diluiu-se com solução de ácido bórico 20 mM pH 8,0, obtendo-se soluções com concentração total do fármaco de 30,0; 40,0 e 50,0 µg/mL, respectivamente, em triplicata. Soluções do padrão (SQR) e amostra (A) a 20,0 µg/mL foram preparadas, separadamente, em balões volumétricos de 10 mL. A concentração final de ácido salicílico (PI) em todas as soluções foi de 20 µg/mL.

Quadro 8 - Soluções para o teste de recuperação por EC

	Volume da solução amostra (µl)*	Volume da solução padrão (µl)*	Concentração final em balão vol. 10 mL (µg/mL)
A	200,0	–	20,0 + 20,0
R <sub>1</sub>	200,0	100,0	30,0 + 20,0
R <sub>2</sub>	200,0	200,0	40,0 + 20,0
R <sub>3</sub>	200,0	300,0	50,0 + 20,0
SQR	–	200,0	20,0 + 20,0

\* Solução a 1,0 mg/mL

A recuperação percentual do método foi calculada a partir da equação abaixo:

$$R\% = [(C_R - C_A) / C_{SQR}] \cdot 100$$

Onde:

$C_R$  = concentração da solução final  $R_n$ , contendo MNC SQR e amostra ( $\mu\text{g/mL}$ )

$C_A$  = concentração da solução amostra ( $\mu\text{g/mL}$ )

$C_{SQR}$  = concentração da solução padrão ( $\mu\text{g/mL}$ )

#### 4.3.4 Comparação estatística entre os métodos UV-D<sup>2</sup>, CLAE e EC

Os resultados dos métodos quantitativos desenvolvidos, UV-D<sup>2</sup>, CLAE e EC para determinação do cloridrato de milnaciprana em cápsulas foram avaliados através de análise estatística.

Os teores médios obtidos por meio dos respectivos métodos foram comparados por ANOVA e teste de *Tukey* com o objetivo de determinar equivalência ou diferença significativa entre eles.

#### 4.4 Ensaio de dissolução

O desenvolvimento e a validação do método de dissolução específico para as cápsulas de cloridrato de milnaciprana 50 mg foram realizados em equipamento VANKEL<sup>®</sup> VK 8000, bomba peristáltica bidirecional VK, circulador/aquecedor VK 750D controlado digitalmente e multi-banho (n = 8) VK 7010.

O método de dissolução foi desenvolvido e validado com base nos dados farmacocinéticos do MNC disponíveis na literatura. O meio de dissolução foi determinado conforme as características físico-químicas e a estabilidade do fármaco no meio selecionado. Os parâmetros: cestas / pás, velocidade de agitação (50 / 100 rpm), volume de meio (500 / 900 mL) e tempo de amostragem foram testados e determinados experimentalmente.

O perfil de dissolução foi obtido através de várias coletas do meio de dissolução, determinando-se a quantidade do fármaco dissolvido a cada tempo. As amostras coletadas foram filtradas e quantificadas pelos métodos UV-D<sup>2</sup> e CLAE,

previamente desenvolvidos, mas revalidados para determinação do fármaco em meio de dissolução.

Os equipamentos utilizados para quantificação do MNC nos testes de dissolução foram:

- ❖ cromatógrafo a líquido SHIMADZU composto de bomba LC-20AT, controladora CBM-20A, detector UV SPD-M10AV<sub>VP</sub> (DAD), injetor automático SIL-20<sup>a</sup> e aquisição e análise dos dados realizadas através do aplicativo CLASS-VP. A vazão da fase móvel utilizada nas análises, após o procedimento de dissolução, foi de 1,5 mL/min.
- ❖ espectrofotômetro SHIMADZU UV-1601 PC, utilizando-se cubetas de quartzo com 1 cm de percurso óptico. As soluções do MNC SQR e das cápsulas foram analisadas diretamente em meio de dissolução (HCl 0,01M) sob derivação de segunda ordem em comprimento de onda de 268,5 nm,  $\Delta\lambda = 4$  e fator de escala = 200.

#### 4.4.1 Teste de solubilidade

A solubilidade do cloridrato de milnaciprana foi testada utilizando uma quantidade equivalente a maior dose de fármaco presente na formulação em 250 mL de meio, na faixa de pH fisiológico de 1,2 a 7,5 (USP 32, 2009).

Foram testados os seguintes meios: HCl 0,1M (pH 1,0), tampão acetato (pH 4,1) e tampão fosfato (pH 7,4). Pesou-se cerca de 10 mg de MNC SQR e transferiu-se quantitativamente para béquer contendo 50 mL do meio (37 °C) com agitação magnética lenta. Alíquotas de 1 mL foram retiradas após 15 minutos, diluídas em balão volumétrico de 10 mL com a fase móvel e quantificadas através do método CLAE para cada condição.

#### 4.4.2 Condições do ensaio de dissolução

O ensaio de dissolução das cápsulas de milnaciprana foi desenvolvido utilizando sistema de cestas (50 rpm) em 900 mL de meio de dissolução (HCl 0,01M) a 37 °C  $\pm$  0,5. Alíquotas de 5 mL foram coletadas manualmente, utilizando seringas

acopladas a filtros de 35  $\mu\text{m}$ , sem reposição do volume do meio de dissolução retirado, nos tempos 5, 10, 15, 30 e 60 minutos.

#### **4.4.3 Estabilidade do fármaco no meio de dissolução**

Soluções do MNC SQR em HCl 0,01M e das cápsulas, após ensaio de dissolução, foram imediatamente quantificadas a temperatura ambiente ( $23\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1,0$ ) e após 72 h sob refrigeração ( $8\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2,0$ ).

#### **4.4.4 Validação do método de dissolução**

A validação do método de dissolução desenvolvido para as cápsulas de cloridrato de milnaciprana foi realizada segundo as diretrizes oficiais vigentes (FDA, 1997; BRASIL, 2004; USP 32, 2009).

##### **4.4.4.1 Validação do método UV-D<sup>2</sup> e CLAE para determinação do MNC no ensaio de dissolução**

O percentual de fármaco dissolvido no meio de dissolução foi determinado através de ambos os métodos, UV-D<sup>2</sup> e CLAE, previamente desenvolvidos para a determinação do fármaco no produto acabado. Especificidade, linearidade, exatidão e precisão foram os parâmetros avaliados.

##### **4.4.4.1.1 Solução MNC SQR**

A solução padrão foi preparada dissolvendo-se, exatamente, cerca de 10 mg do MNC SQR em balão volumétrico de 10 mL com o meio de dissolução (HCl 0,01M) e diluindo-se alíquota de 3,0 mL desta solução em balão volumétrico de 50 mL com o mesmo solvente (60  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).

##### **4.4.4.1.2 Especificidade**

A especificidade do método foi avaliada através da análise do placebo, ou seja, mistura dos excipientes contidos na formulação, mais o invólucro da cápsula. A concentração de cada excipiente foi calculada de acordo com o descrito no item 4.3.1.1.1.

A análise do placebo foi realizada em triplicata. A mistura de excipientes do conteúdo da formulação e uma cápsula vazia foram adicionadas às cubas contendo os 900 mL de meio de dissolução ( $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5$ ), mantendo-se as cestas a 50 rpm por 1 hora. Após este período foram coletadas alíquotas para análise por UV-D<sup>2</sup> e CLAE.

#### 4.4.4.1.3 Linearidade

Alíquotas da solução padrão (200 µg/mL) em HCl 0,01M foram transferidas para balões volumétricos de 20 mL e diluídas com o meio de dissolução para as respectivas concentrações finais: 1,0; 30,0; 60,0, 90,0 e 120,0 µg/mL (CLAE) e 5,0; 30,0; 60,0, 90,0 e 120,0 µg/mL (UV-D<sup>2</sup>). As soluções foram analisadas, simultaneamente por ambos os métodos, em duplicata, durante três dias consecutivos. A linearidade foi determinada através da análise de regressão linear calculada pelo método dos mínimos quadrados e análise de variância (ANOVA).

Os limites de detecção e quantificação, para os métodos propostos para a determinação da porcentagem de fármaco dissolvido após o teste de dissolução, foram determinados com base nas equações abaixo, indicadas pela RDC 899 (BRASIL, 2003):

$$LD = DP_a \times 3 / IC$$

$$LQ = DP_a \times 10 / IC$$

Onde: DP<sub>a</sub> é o desvio padrão do intercepto com o eixo do y de, no mínimo, 3 curvas padrão construídas contendo concentrações do fármaco próximas aos supostos limites de detecção ou quantificação, respectivamente, e IC é a inclinação da curva de calibração.

#### 4.4.4.1.4 Exatidão e precisão

A exatidão do método foi determinada através do teste de recuperação de quantidades conhecidas de MNC SQR adicionadas ao placebo. Alíquotas de 0,45; 5,4 e 9,0 mL da solução padrão (10 mg/mL), mais o placebo de uma cápsula, foram adicionadas às cubas contendo os 900 mL de meio de dissolução ( $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5$ ), mantendo-se as cestas a 50rpm por 1 hora. Após este período foram coletadas alíquotas para análise por UV-D<sup>2</sup> e CLAE. As concentrações finais foram de 5,0;

60,0 e 100,0 µg/mL. As análises foram realizadas em duplicata durante três dias. A repetibilidade e a precisão intermediária foram avaliadas com base no DPR dos dados de recuperação.

#### 4.4.5 Comparação dos perfis de dissolução

A análise estatística através do teste *t* de *Student* foi realizada para verificar se os dois métodos (UV-D<sup>2</sup> e CLAE) aplicados são equivalentes na determinação da porcentagem de fármaco dissolvido no meio de dissolução. Além disso, realizou-se o cálculo do *fator de diferença* ( $f_1$ ) e do *fator de similaridade* ( $f_2$ ), também utilizados na comparação dos perfis de dissolução obtidos, sendo necessário considerar um deles como referência:

$$f_1 = \{ [\sum_{t=1}^n | R_t - T_t | ] / [\sum_{t=1}^n R_t ] \} \times 100$$

$$f_2 = 50 \times \log \{ [1 + (1/n) \sum_{t=1}^n (R_t - T_t)^2]^{-0.5} \} \times 100$$

Onde:

$n$  é o número de tempos de coleta,

$R_t$  é o valor da porcentagem dissolvida obtida através do método de referência no tempo  $t$ ,

$T_t$  é o valor da porcentagem dissolvida obtida através do novo método no tempo  $t$ .

#### 4.4.6 Cinética de dissolução

Quatro modelos matemáticos foram aplicados na avaliação da cinética de liberação do fármaco: Ordem zero, primeira ordem, Higuchi e Hixon-Croweel, cujas equações estão representadas no Quadro 9. As curvas foram construídas aplicando-se os modelos cinéticos citados, considerando apenas um ponto acima de 80% de fármaco liberado. O modelo matemático que melhor expressou o perfil de liberação das cápsulas de MNC foi selecionado com base nos valores do coeficiente de determinação ( $R^2$ ) ou no coeficiente de determinação ajustado ( $R^2_{\text{ajustado}}$ ), onde modelos com diferentes números de parâmetros são comparados. A eficiência de dissolução (ED%) e o tempo de amostragem  $\geq 80\%$  da dissolução do fármaco ( $t_{80\%}$ ) foram utilizados para caracterizar o perfil de liberação do fármaco. Frequentemente,

as farmacopéias utilizam estes parâmetros como um critério de aceitação para a quantidade de substância ativa dissolvida, expressa como uma porcentagem da quantidade rotulada (Q) (COSTA e LOBO, 2001; USP 32, 2009).

Quadro 9 – Modelos matemáticos para representar os perfis de dissolução.

Cinética de ordem zero	$Q_t = Q_0 + K_0 t$
Cinética de primeira ordem	$\log Q_t = \log Q_0 + (K_1 t) / 2.303$
Modelo de Higuchi	$f_t = K_H t^{1/2}$
Modelo de Hixson-Crowell	$W_0^{1/3} - W_t^{1/3} = K_s t$

$Q_t$  = quantidade de fármaco dissolvido no tempo  $t$ ;  $Q_0$  = quantidade inicial de fármaco na solução;  $K_0$  and  $K_1$  = constantes de zero e primeira ordens, respectivamente

$f_t$  = quantidade de fármaco liberado no tempo  $t$  por unidade de superfície;  $K_H$  = constante de dissolução de Higuchi

$W_0$  = quantidade inicial de fármaco na forma farmacêutica;  $W_t$  = quantidade remanescente de fármaco na forma farmacêutica no tempo  $t$ ;  $K_s$  = constante de integração da relação superfície-volume

#### 4.4.7 Influência das condições de armazenamento no perfil de dissolução

A análise da influência das condições de armazenamento na estabilidade química e/ou física das cápsulas foi verificada através da alteração no perfil de dissolução de cápsulas expostas a 40 °C e 75% de umidade relativa, durante 15 a 30 dias, além de analisar-se a alteração na taxa de liberação para cápsulas mantidas em condição ambiente, mas com prazo de validade vencido.

#### 4.5 Estudos de degradação forçada para o cloridrato de milnaciprana

Amostras de cloridrato de milnaciprana (matéria-prima) foram submetidas ao processo de fotólise e oxidação, após avaliação dos fatores mais relevantes para a degradação do fármaco e observação da formação dos potenciais produtos de degradação conforme descrito no item 4.3.2.2.1.2. O monitoramento da degradação do fármaco foi acompanhado por CLAE. A partir do decréscimo no teor do fármaco em função do tempo, determinou-se a ordem de degradação do fármaco através do método gráfico: concentração remanescente em função do tempo (ordem zero), logaritmo da concentração em função do tempo (1ª ordem) e inverso da concentração em função do tempo (2ª ordem). O coeficiente de correlação obtido mais próximo da unidade indicou a ordem da reação.

O modelo cinético pode ser representado pelas seguintes equações:

Reação de ordem zero:  $C = C_0 - kt$   $t_{90\%} = (0,1 \times C_0)/k$

Reação de 1ª ordem:  $\ln C = \ln C_0 - kt$   $t_{90\%} = 0,106/k$

Reação de 2ª ordem:  $1/C = 1/C_0 + kt$   $t_{90\%} = 1/(9k \times C_0)$

Onde:  $C_0$ : concentração do fármaco no tempo zero;

$C$ : concentração após reação no tempo  $t$ ;

$k$ : constante de reação

#### 4.5.1 Fotodegradação

Alíquotas da solução do fármaco em diferentes concentrações foram expostas à lâmpada de radiação UV 254 nm em câmara espelhada (100x16x16 cm). Inicialmente, de modo preliminar, alíquotas (63,0; 125,0; 250,0; 500,0 e 1000,0 µl) da solução concentrada do fármaco (2 mg/mL) em metanol foram aplicadas, separadamente, sobre placas de Petri ( $n = 2$ ) e expostas à luz durante 1 hora e 40 minutos, havendo completa evaporação do solvente durante a exposição. Logo, durante o processo de estresse, o fármaco encontrava-se na forma de um finíssimo filme sobre a placa de Petri. A recuperação do fármaco na placa foi realizada com um volume de 2,0 mL de fase móvel. As amostras nas concentrações finais de 63,0; 125,0; 250,0; 500,0 e 1000,0 µg/mL foram analisadas no CLAE em equipamento descrito no item 4.4 e condições cromatográficas descritas no item 4.3.2.1.

Em um segundo momento, a fotólise, sob radiação UV 254 nm, também foi avaliada nas soluções etanólicas do fármaco expostas em cubetas de quartzo (Plastibrand®, UV-Cuvette Macro, 2,5 mL) fechadas com películas plásticas (Parafilm®), de modo a evitar sua evaporação.

##### 4.5.1.1 Cinética da fotodegradação

A princípio, a exposição foi realizada adicionando-se alíquotas de 1,0 mL da solução metanólica do MNC SQR (500 µg/mL) em placas de Petri ( $n = 2$ ). Dentro de um período de 3 horas, as amostras foram analisadas aos 60, 90, 120, 150 e 180 minutos. Para o preparo das amostras, recuperou-se o fármaco nas placas com 1,0 mL de fase móvel, e volumes de 5 µl destas soluções foram injetados no CLAE.

As soluções da matéria-prima e conteúdo das cápsulas, em etanol (100 µg/mL) acondicionadas em cubetas (n = 3), também permaneceram sob radiação pelo período de 3 horas e foram analisadas nos mesmos períodos de 60, 90, 120, 150 e 180 minutos. Após os tempos de exposição à radiação UV 254 nm, as soluções foram filtradas e transferidas p/ os tubos (*vials*) de análise por CLAE.

#### **4.5.2 Degradação por oxidação**

Alíquotas de 1,25; 2,5; 5,0 e 7,5 mL da solução concentrada de MNC SQR (2 mg/mL) em metanol foram adicionadas a balões volumétricos de 10 mL (n = 2). Acrescentou-se 500 µl de peróxido de hidrogênio 30% (V/V) em cada balão volumétrico e agitou-se. A mistura foi mantida em repouso ao abrigo da luz por 24 horas. Após este período realizou-se diluição com fase móvel e a análise por CLAE foi realizada com injeções de 5 µl de cada solução em equipamento descrito no item 4.4 e condições cromatográficas descritas no item 4.3.2.1.

A influência da concentração do agente oxidante também foi analisada. Alíquotas de 2,0 mL da solução MNC SQR (1 mg/mL) em metanol foram adicionadas a balões volumétricos de 5 mL, e diferentes volumes (0,1; 0,25; 0,5; 0,75 e 1,0 mL) de peróxido de hidrogênio 30% (V/V) foram acrescentados (n = 2), diluindo-se ao volume final com a fase móvel, após 24 horas.

##### **4.5.2.1 Cinética da oxidação**

O fator tempo também foi avaliado com o objetivo de determinar a cinética de oxidação, visto esta ter sido mais uma das condições de degradação acelerada, cujo resultado proporcionou o aparecimento de um produto de degradação majoritário. Para tanto, foram transferidos volumes de 1,0 mL da solução metanólica de MNC SQR (500,0 µg/mL) para balões volumétricos de 10 mL, juntamente com alíquotas de 500 µl de peróxido de hidrogênio 30% (V/V), homogeneizando-se manualmente. A mistura foi mantida em repouso ao abrigo da luz por 2, 4, 20, 24 e 48 horas. Após cada período, diluiu-se com a fase móvel e a análise por CLAE foi realizada para cada solução, preparadas em triplicata para cada tempo de análise.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

---



## 5.1 Caracterização da substância química de referência

Os testes de caracterização do MNC SQR e as informações referentes à descrição da substância se destinam à avaliação preliminar de sua integridade.

### 5.1.1 Caracteres físicos

O fármaco apresenta-se como pó cristalino branco, indicando conformidade com a especificação (SIGMA ALDRICH, 2008; CYPRESS, 2009).

### 5.1.2 Solubilidade

A solubilidade foi testada conforme descrito em *Material e Métodos* no item 4.2.2. O fármaco apresentou-se muito solúvel em água, facilmente solúvel em solução diluída de ácido clorídrico, metanol e etanol, e pouco solúvel em acetonitrila. Esse resultado auxiliou o desenvolvimento dos métodos de quantificação do cloridrato de milnaciprana na forma farmacêutica cápsula.

### 5.1.3 Determinação de umidade

A matéria-prima foi submetida ao ensaio de acordo com o descrito no item 4.2.3. O resultado obtido (0,2%), média de três determinações, demonstra que a matéria-prima analisada apresentou um teor baixo de substâncias voláteis.

### 5.1.4. Ponto de fusão

O ponto de fusão do cloridrato de milnaciprana foi determinado em dois equipamentos de acordo com o descrito no item 4.2.4. Os valores obtidos em três determinações do ponto de fusão do fármaco são apresentados na Tabela 1. Utilizou-se o salofeno (191 °C) para calibração. De acordo com BUDAVARI (2001), MNC cristalizado em mistura de etanol e éter etílico apresenta faixa de fusão 179 a 181 °C.

O valor mais baixo encontrado por meio do equipamento automático pode refletir a interferência sofrida, devido à formação da coloração caramelo adquirida pelo fármaco, impedindo a passagem do feixe de luz através do capilar no momento da fusão.

Tabela 1 – Valores obtidos para o ponto de fusão (°C) do MNC SQR.

Substância:	Equipamento:	
	Koffler (microscopia)*	Mettler Toledo FP 90*
cloridrato de milnaciprana	176	166
salofeno	188	189

\*média de 3 determinações

### 5.1.5 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

A calorimetria exploratória diferencial (DSC – *differential scanning calorimetry*) é o método de análise térmica mais amplamente utilizado, no qual as diferenças no fluxo de calor na substância amostra e referência são medidas como uma função da temperatura da amostra, enquanto estas são submetidas a um programa de temperatura controlada. Trata-se de um método calorimétrico no qual são medidas diferenças em energia (BRITAIN *et al.*, 1991; SKOOG *et al.*, 2002).

A DSC é, frequentemente, a técnica de análise térmica preferida devido à capacidade de fornecer informações detalhadas sobre as propriedades físicas e energéticas de uma substância. A DSC fornece a temperatura de fusão com a exatidão que métodos clássicos, ocasionalmente, não permitem, além de fornecer a entalpia de fusão, indicar a pureza de uma amostra, determinando se esta sofreu alguma degradação, decomposição ou conversão polimórfica durante o processo de fusão. A natureza cristalina da substância também pode ser observada através da DSC como uma transição exotérmica, entre outros comportamentos térmicos, auxiliando na determinação da qualidade de fármacos durante sua produção (CLAS *et al.*, 1999).

O ensaio de DSC foi realizado a fim de verificar o comportamento térmico da SQR, de acordo com o descrito no item 4.2.5.

A Figura 7 ilustra a curva de DSC do cloridrato de milnaciprana SQR. A fusão do fármaco é observada através do pico endotérmico apresentado no termograma. Os resultados obtidos para MNC SQR é apresentado na Tabela 2.

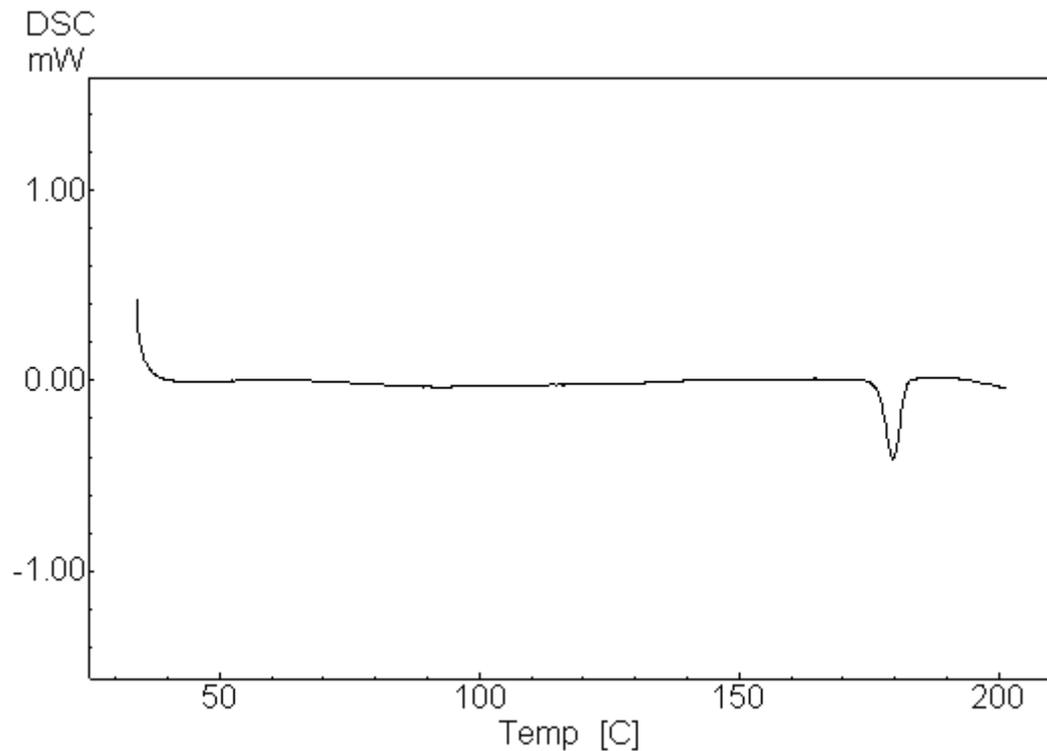


Figura 7 - Calorimetria exploratória diferencial do cloridrato de milnaciprana SQR realizada no equipamento SHIMADZU DSC-60 acoplado ao integrador THERMAL ANALYZER TA-60WS (Collection Monitor versão 2.0, 1997-2003) e ao controlador de fluxo FC-60A sob atmosfera inerte de nitrogênio com fluxo de 50 mL/min. Velocidade de aquecimento de 10 °C/min.

Tabela 2 - Dados obtidos por DSC para o cloridrato de milnaciprana SQR

	<i>Peak</i> (°C) <sup>1</sup>	<i>Onset</i> (°C) <sup>2</sup>	<i>Heat</i> (J/g) <sup>3</sup>
cloridrato de milnaciprana SQR	179,77	176,77	-4,44

1 – Fim da fusão, 2 – Início da fusão, 3 – Valor de entalpia ( $\Delta H$ ).

Os resultados obtidos por meio da DSC corroboram com os valores apresentados na análise por microscopia (176 °C). No entanto, o valor obtido apresentou-se abaixo da faixa de fusão indicada por BUDAVARI (2001), o que pode ser justificado, se considerarmos que, provavelmente, o processo de obtenção dos cristais da amostra analisada não foi o mesmo indicado na referência.

### 5.1.6 Rotação específica

O ensaio foi realizado conforme descrito no item 4.2.6. Não foram encontrados valores de referência para a análise de rotação específica do MNC. O resultado

encontrado,  $\pm 0,002^\circ$ , média de cinco determinações, serve como auxiliar na identificação e indicador de pureza da matéria-prima analisada.

### 5.1.7 Espectrofotometria na região do infravermelho (IV)

A técnica espectrofotométrica na região do infravermelho mostra-se bastante útil na caracterização física de fármacos (BRITTAIN *et al.*, 1991). A espectroscopia no infravermelho é uma técnica baseada nas vibrações dos átomos de uma molécula. Um espectro de infravermelho é comumente obtido pela passagem da radiação infravermelha através de uma amostra e determina qual fração da radiação incidente é absorvida com uma determinada energia. A energia com a qual a banda no espectro de absorção aparece, corresponde à frequência de vibração de uma parte da molécula (STUART, 2004). A presença de bandas características (que ocorrem mais ou menos na mesma frequência) para certos grupos de átomos permite a obtenção de informações úteis na identificação de estruturas moleculares, através do exame do espectro e consultas a tabelas (SILVERSTEIN *et al.*, 2007).

A análise espectrofotométrica da matéria-prima na região do infravermelho foi realizada de acordo com o descrito no item 4.2.7 e o espectro está ilustrado na Figura 8. As possíveis atribuições, com base em bibliografia de referência (PAVIA *et al.*, 2001; SILVERSTEIN *et al.*, 2007), encontram-se na Tabela 3.

Apesar de uma correlação banda a banda ser uma excelente evidência para a identificação da amostra, na ausência de um espectro de IV do cloridrato de milnaciprana para fins de comparação, a atribuição foi efetuada considerando a região de absorção, o formato e a intensidade das bandas, correlacionando a dados de literatura tabelados para os respectivos grupos funcionais (PRETSCH *et al.*, 2000; SILVERSTEIN *et al.*, 2007).

O espectro obtido para o cloridrato de milnaciprana apresenta bandas de absorção características dos grupamentos presentes na estrutura química da molécula. O espectro de infravermelho é único para cada substância, sendo pouco provável que duas substâncias que não sejam enantiômeras apresentem o mesmo perfil espectral (SILVERSTEIN *et al.*, 2007).

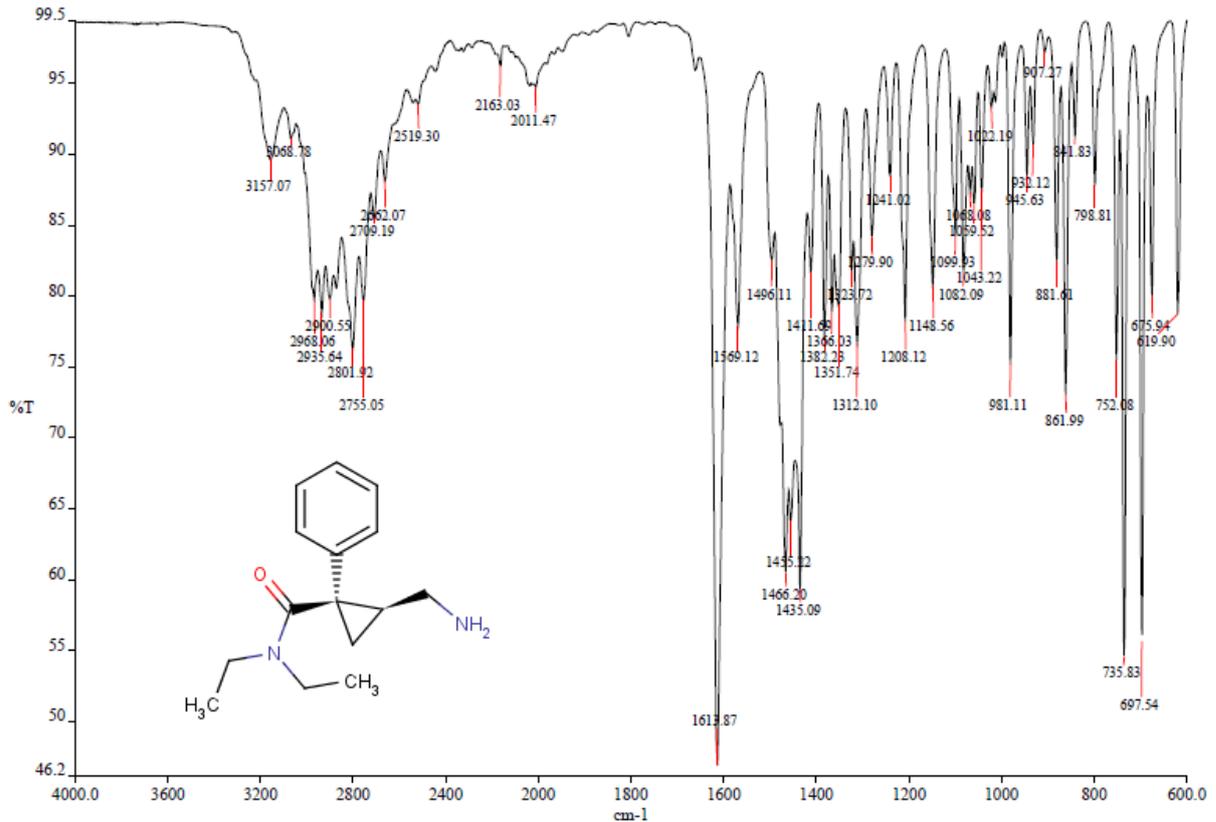


Figura 8 - Espectro de absorção na região do IV para o cloridrato de milnaciprana por ATR (4000 a 600  $\text{cm}^{-1}$ ).

Tabela 3 - Frequências de absorção das principais bandas no infravermelho e suas respectivas atribuições para o cloridrato de milnaciprana.

Frequência ( $\text{cm}^{-1}$ )	Atribuições *
3157,07	Deformação axial N-H de amina
3068,78	Deformação axial C-H do anel aromático
2968,06 – 2801,92	Deformação axial C-H de metila e metileno
2011,47	Harmônicas ou frequências de combinação
1613,87	Deformação axial C=O da carbonila de amida
1569,12	Deformação axial C=C do anel aromático Deformação angular N-H de amina
1496,11 – 1312,10	Deformação angular C-H de ciclopropano, de metila e metileno
1351,74 – 1022,19	Deformação axial de C-N de amina
1208,12 – 798,81	Deformação axial C-C de alcanos
907,27 – 675,94	Deformação angular C-H fora do plano do anel aromático

\*PAVIA *et al.*, 2001; SILVERSTEIN *et al.*, 2007.

## 5.2 Análise quantitativa do produto acabado

### 5.2.1 Espectrofotometria derivada na região do ultravioleta (UV-D)

Este método apresenta propriedades e características que o tornam muito útil na análise de fármacos em produtos farmacêuticos como comprimidos, pastilhas, cremes, entre outros, sem a necessidade de separações prévias. Trata-se de um método alternativo menos dispendioso e também eficiente se comparado ao método por CLAE, mostrando-se preciso, sensível, seletivo, reprodutivo e de baixo custo (PASCHOAL *et al.*, 2003).

A diferenciação não aumenta o conteúdo de informação do espectro original, mas, geralmente, proporciona perfil característico, em que mudanças sutis de inclinação e curvatura se tornam mais evidentes. A supressão de bandas largas, o realce das bandas estreitas ou a resolução de um “ombro” para uma banda, facilitam a caracterização de um composto e eliminam a deformação da curva causada pela presença de substâncias interferentes. Desta forma, ocorre a individualização dos constituintes de misturas complexas e a eliminação da interferência de excipientes e de produtos de degradação (TALSKY *et al.*, 1978; HACKMANN *et al.*, 1991; PASCHOAL *et al.*, 2003).

A espectrofotometria derivada consiste na representação das derivadas da absorvância em relação ao comprimento de onda, em função do comprimento de onda. A diferenciação da Lei de Lambert-Beer permite obter as equações I, II e III, que mostram que as derivadas  $d^n A/d\lambda^n$  são sempre proporcionais às concentrações do analito, sendo as aplicações analíticas baseadas neste fato (ROCHA e TEIXEIRA, 2004).

$$dA/d\lambda = c \cdot b \cdot (d\varepsilon/d\lambda) \quad (I)$$

$$d^2A/d\lambda^2 = c \cdot b \cdot (d^2\varepsilon/d\lambda^2) \quad (II)$$

$$d^n A/d\lambda^n = c \cdot b \cdot (d^n \varepsilon/d\lambda^n) \quad (III)$$

Onde:

A = absorvância da solução do analito,

$\lambda$  = comprimento de onda do feixe de luz,

$c$  = concentração do analito absorvente,  
 $b$  = distância percorrida pela radiação,  
 $\varepsilon$  = coeficiente de absorção ou absortividade molar do analito.

A ordem da derivada deve ser cuidadosamente selecionada, visto que, usualmente, verifica-se um aumento do nível de ruído com o aumento da ordem da derivação (O'HAVER e BEGLEY, 1981; ROJAS *et al.*, 1988; ROCHA e TEIXEIRA, 2004).

A sensibilidade em métodos derivativos depende não somente dos fatores instrumentais e da forma de medida do sinal (método da tangente, pico-pico ou zero-pico), como também das características do espectro de absorção original (ordem zero). No presente trabalho utilizou-se o método do ponto de anulação (*zero crossing*), implícito ao método zero-pico, em que a medição do valor absoluto da amplitude da derivada de uma curva composta (soma da absorção de mais de uma substância), ocorre em comprimento de onda correspondente ao ponto de anulação da derivada do interferente (TALSKY *et al.*, 1978; HACKMANN *et al.*, 1991; PASCHOAL *et al.*, 2003).

#### **5.2.1.1 Validação do método UV-D<sup>2</sup> para a forma farmacêutica cápsula**

Após observação da interferência dos excipientes da formulação no método UV (ordem zero) para quantificação do cloridrato de milnaciprana no produto acabado, verificou-se a necessidade de derivação dos espectros na tentativa de eliminar a absorção interferente. As condições espectrofotométricas para o doseamento das cápsulas através do método de UV-D foram determinadas a partir de ensaios preliminares (dados não apresentados) com soluções do MNC SQR, das cápsulas e dos excipientes em HCl 0,1M, separadamente. A partir disto, determinou-se que a 2ª derivada seria a ordem de derivação mais adequada, visto a possibilidade de seleção de dois comprimentos de onda (268,5 e 274,9 nm) para a leitura das absorvâncias, utilizando os parâmetros  $\Delta\lambda=4$  e fator de escala = 200 na validação do método.

### 5.2.1.1.1 Especificidade

Soluções de MNC SQR, das cápsulas e do placebo foram analisadas para selecionar a ordem de derivação mais conveniente, o comprimento de onda analítico mais adequado, o delta lambda com a melhor relação sinal/ruído e o fator de escala em que seriam registradas as derivadas. A linha de base foi corrigida para o solvente utilizado (HCl 0,1M) e os espectros da derivada segunda foram calculados e visualizados a partir de seus espectros de ordem zero utilizando-se o programa do equipamento.

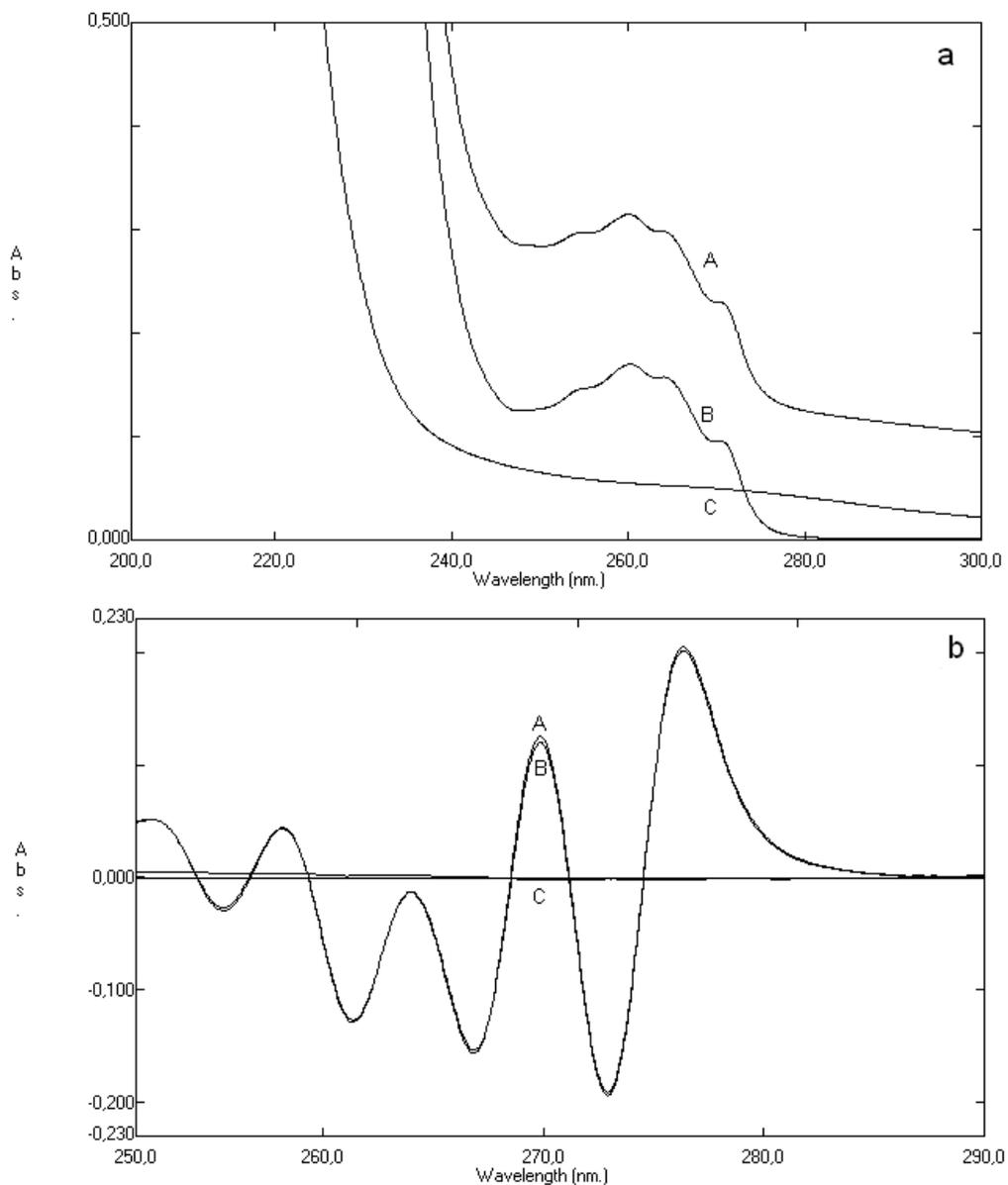


Figura 9 - Espectros na região do UV em HCl 0,1M (60µg/mL): ordem zero (a), 2ª derivada (b). A: solução cápsulas; B: solução de MNC SQR; C: solução placebo.

A partir da avaliação dos espectros ilustrados (Figura 9) foi confirmada a especificidade para o fármaco frente aos excipientes, o que tornou possível a quantificação do cloridrato de milnaciprana na forma farmacêutica cápsula.

O espectro do placebo apresenta absorção significativa na região de 300-200 nm em ordem zero (Figura 9a). Na segunda derivada, em 268,5 e 274,9 nm, o espectro para os excipientes têm absorvância praticamente nula (Figura 9b), o que permite a determinação quantitativa do cloridrato de milnaciprana na formulação farmacêutica sem interferências. Após análise dos resultados de precisão, verificou-se que a reprodutibilidade das absorvâncias obtidas a 268,5 nm foi maior, com valores de DPR mais baixos, quando comparados aos dados obtidos (não apresentados) a 274,9 nm, justificando, deste modo, a escolha do comprimento de onda para a validação do método.

#### 5.2.1.1.2 Linearidade

Curvas padrão do MNC SQR no intervalo de 20 a 100 µg/mL em HCl 0,1M, juntamente com a equação da reta e o coeficiente de correlação (Figura 10), foram construídas de acordo com o descrito no item 4.3.1.1.2.

A Tabela 4 apresenta os valores de absorvância obtidos para cada concentração da curva padrão. A curva padrão para o método UV-D<sup>2</sup> a 268,5 nm foi construída a partir das cinco concentrações analisadas em três dias diferentes e está representada na Figura 11.

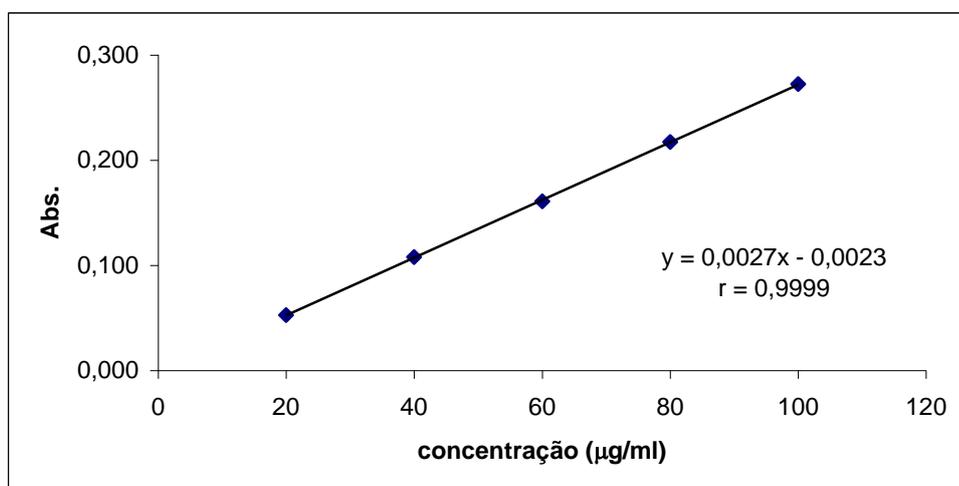


Figura 10 - Representação gráfica da curva padrão média do MNC SQR (UV-D<sup>2</sup>).

A análise de variância (ANOVA) dos resultados obtidos por UV-D<sup>2</sup> a 268,5 nm (Tabela 5) indica que a curva padrão obtida apresenta regressão linear significativa ( $p = 0,05$ ) e não apresenta desvio de linearidade. O coeficiente de correlação ( $r = 0,9999$ ) está de acordo com as especificações e indica correlação entre as absorvâncias e a concentração do fármaco.

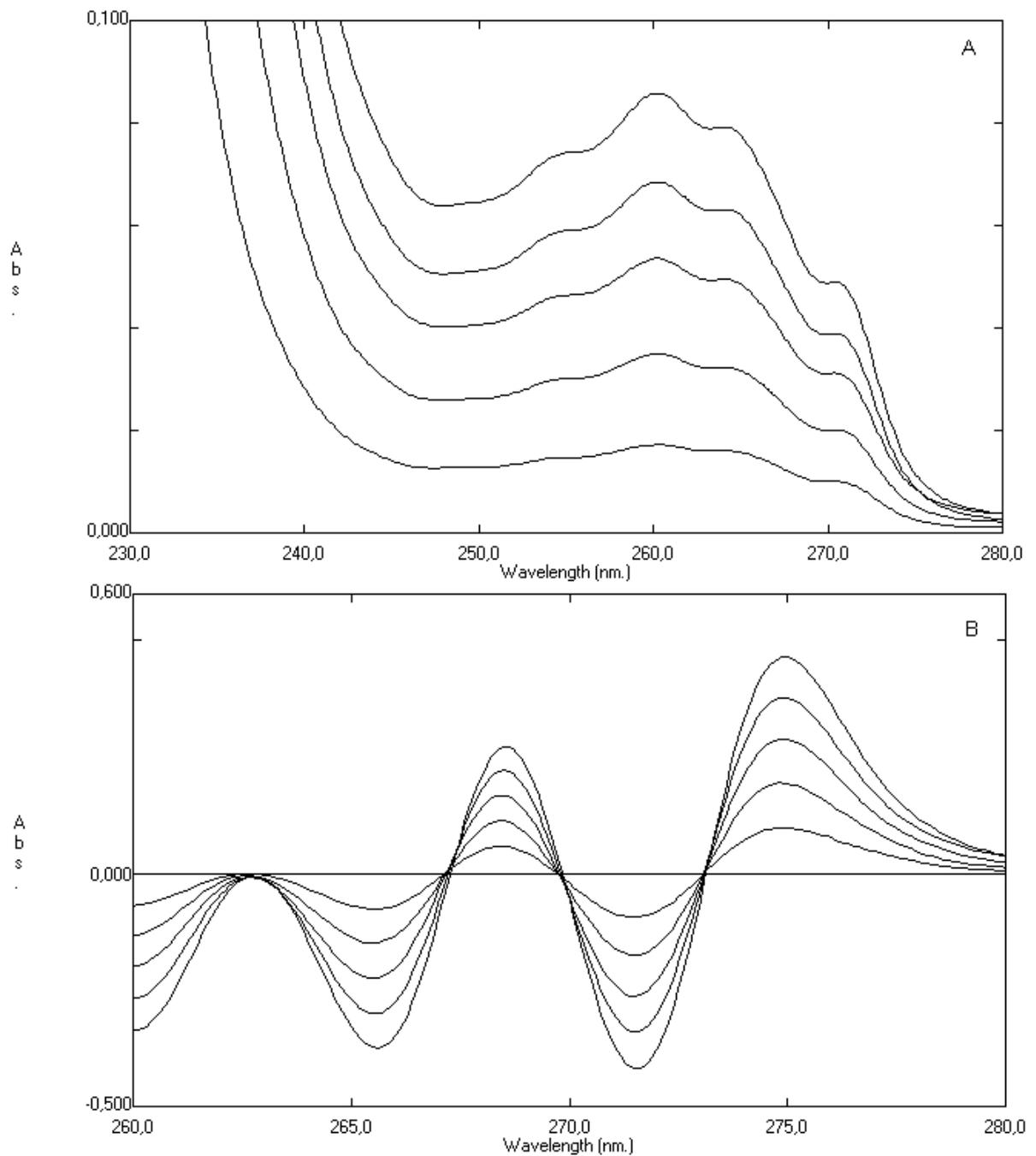


Figura 11 – Espectro UV-ordem zero (A) e espectro UV-D<sup>2</sup> (B) para soluções de MNC SQR de 20 a 100  $\mu\text{g/mL}$  em HCl 0,1M.

Tabela 4 - Valores de absorvância obtidos para a curva padrão do MNC SQR por UV-D<sup>2</sup>

Concentração (µg/mL)	Absorvância*	Absorvância média ± e.p.m.
20,0	0,0498	0,0527 ± 0,0015
	0,0550	
	0,0534	
40,0	0,1042	0,1079 ± 0,0019
	0,1103	
	0,1092	
60,0	0,1541	0,1610 ± 0,0039
	0,1675	
	0,1613	
80,0	0,2068	0,2172 ± 0,0055
	0,2255	
	0,2193	
100,0	0,2626	0,2723 ± 0,0051
	0,2796	
	0,2748	

\* Resultado de três determinações  
e.p.m. – erro padrão da média

Tabela 5 - ANOVA das absorvâncias determinadas para a obtenção da curva padrão do MNC SQR por UV-D<sup>2</sup>

Fontes de variação	gl	Soma dos Quadrados.	Variância	F (calculado)	F (tabelado)
ENTRE	4	0,0903	0,0226	490,17*	3,48
regressão linear	1	0,0903	0,0903	1960,55*	4,96
desvio da linearidade	3	$0,63 \times 10^{-5}$	$0,21 \times 10^{-5}$	0,0453	3,71
DENTRO (resíduo)	10	$0,46 \times 10^{-3}$	$0,46 \times 10^{-4}$		
Total	14				

\* Significativo para  $p = 0,05$ .

### 5.2.1.1.3 Precisão

A determinação do teor de cloridrato de milnaciprana nas cápsulas através da espectrofotometria UV-D<sup>2</sup> a 268,5 nm foi realizada conforme descrito no item 4.3.1.1.3. Os resultados encontram-se na Tabela 6 e os valores dos DPR para a repetibilidade e precisão intermediária indicam que o método é preciso.

Tabela 6 - Resultados obtidos na quantificação das amostras de MNC cápsulas por espectrofotometria UV-D<sup>2</sup> ( $\lambda=268,5$  nm) para avaliação da repetibilidade e da precisão intermediária.

	Teor (%) das soluções de MNC cápsulas (60 $\mu\text{g/mL}$ )*						Teor Intradia (%) $\pm$ e.p.m.	DPR
dia I	100,4	100,7	100,9	99,8	100,6	100,9	100,6 $\pm$ 0,17	0,41
dia II	101,8	99,9	100,7	102,6	100,9	101,4	101,2 $\pm$ 0,38	0,93
dia III	101,2	100,8	100,4	101,0	101,3	101,5	101,0 $\pm$ 0,16	0,39
Teor médio interdias (%)							100,9 $\pm$ 0,20	
DPR							0,34	

\* Resultado de três determinações  
e.p.m. – erro padrão da média  
DPR – desvio padrão relativo

#### 5.2.1.1.4 Exatidão

A exatidão do método foi avaliada através do teste de recuperação do cloridrato de milnaciprana SQR de acordo com a descrição do item 4.3.1.1.4. A recuperação média foi de 100,17% e os resultados encontram-se na Tabela 7.

Tabela 7 -. Resultados obtidos para o teste de recuperação do MNC SQR por espectrofotometria UV-D<sup>2</sup> ( $\lambda=268,5$  nm).

	Concentração adicionada ( $\mu\text{g/mL}$ )	Concentração recuperada ( $\mu\text{g/mL}$ )	Recuperação (%)	Média (%)
R <sub>1</sub>	15,0	14,77	98,47	99,72
		15,03	100,17	
		15,08	100,51	
R <sub>2</sub>	30,0	29,62	98,74	100,06
		30,02	100,04	
		30,42	101,40	
R <sub>3</sub>	45,0	44,84	99,65	100,74
		45,71	101,58	
		45,45	100,99	
Recuperação média (%) = 100,17 DPR = 1,09				

DPR: desvio padrão relativo

O método espectrofotométrico derivativo UV-D<sup>2</sup> validado para análise do cloridrato de milnaciprana em cápsulas mostrou-se simples e rápido, tornando-se uma alternativa quando métodos instrumentais mais avançados (CLAE) não estão à disposição na rotina de análises do laboratório ou no controle de qualidade em processo (lote a lote) na indústria farmacêutica.

### 5.2.2 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

A escolha dos parâmetros utilizados para a determinação do cloridrato de milnaciprana em cápsulas foi realizada conforme descrito no item 4.3.2.1. As melhores condições foram selecionadas de acordo com o desempenho do método, através dos valores obtidos para os respectivos parâmetros do pico cromatográfico, tais como assimetria, número de pratos teóricos, fator de capacidade, resolução e tempo de retenção.

Diferentes marcas e tamanhos de colunas cromatográficas de fase reversa, C8 e C18, foram avaliadas durante o desenvolvimento do método. A maior parte das colunas utilizadas precisou de aquecimento (50 °C), com o objetivo de ajuste da simetria e número de pratos teóricos do pico cromatográfico do fármaco, enquanto a coluna analítica selecionada apresentou desempenho adequado à temperatura ambiente ( $\pm 25$  °C).

Proporções variadas de solventes orgânicos, acetonitrila e metanol, também foram testadas na busca do melhor eluente para a análise do fármaco em estudo. Considerando o valor de pKa da milnaciprana de  $10,36 \pm 0,29$  (ACD, 2009), o pH 7,5 foi utilizado para garantir a completa ionização do fármaco, além disso verificou-se que o tempo de retenção e a assimetria foram afetados de modo significativo de acordo com a quantidade de trietilamina na fase móvel. Deste modo, as melhores condições de eluição cromatográfica foram alcançadas utilizando-se a mistura de acetonitrila e água com adição de uma alíquota de trietilamina (70:30:0,085%, V/V/V) e pH corrigido com ácido fosfórico 20% (V/V) antes da mistura com a fase orgânica.

O tempo de corrida para o método de doseamento proposto foi de 10 minutos sob eluição isocrática. Após injeção da solução padrão, o tempo de retenção obtido para o cloridrato de milnaciprana foi de, aproximadamente, 7,5 minutos. Os cromatogramas obtidos das soluções de MNC SQR e das cápsulas (Ixel<sup>®</sup> 25 mg) a 60 µg/mL em fase móvel, de acordo com as condições utilizadas são apresentados na Figura 12.

### 5.2.2.1 Validação do método CLAE para a forma farmacêutica cápsula

#### 5.2.2.1.1 Especificidade

A avaliação do método por CLAE quanto a sua especificidade para o cloridrato de milnaciprana foi realizada frente aos excipientes da formulação e aos potenciais produtos de degradação térmica, fotólise, hidrólise ácida, alcalina e oxidação, de acordo com o procedimento descrito nos itens 4.3.2.2.1.1 e 4.3.2.2.1.2.

A Figura 12 apresenta os cromatogramas das soluções de MNC SQR, cápsulas e placebo. O cromatograma referente aos excipientes comprova ausência de qualquer pico interferente no tempo de retenção do fármaco analisado.

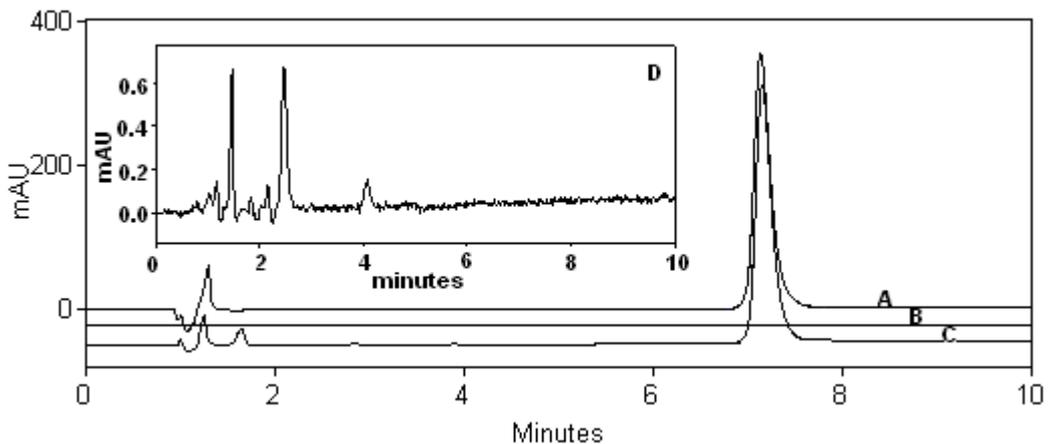


Figura 12 - (A) cromatograma da solução de MNC SQR (60 µg/mL), (B e D) cromatograma da solução placebo, (C) cromatograma da solução de MNC cápsulas (60 µg/mL). Condições cromatográficas: fase móvel acetonitrila:água:TEA (70:30:0,085, V/V/V), vazão de 1,2 mL/minuto, coluna MN Nucleosil® C8 ec (150 x 4,6 mm, 5 µm) e pré-coluna C18 (4 x 3,0 mm, Phenomenex®, detecção em 210 nm, volume de injeção 20 µL, análise à temperatura ambiente.

Um pico secundário, relativo a um potencial produto de degradação foi observado tanto no cromatograma da solução MNC SQR submetida à oxidação (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3%) como também na solução exposta à hidrólise alcalina (NaOH 1M). Este produto apresentou tempo de retenção de 8,3 minutos (Figura 13) com resolução de 2,2 em relação ao pico principal. Os picos extras com baixo tempo de retenção são relativos ao “branco”, no caso da degradação oxidativa, e possivelmente são devidos

ao conservante do peróxido de hidrogênio. A ausência de um pico secundário no cromatograma, obtido após a hidrólise da solução das cápsulas, pode ser explicada por uma possível “proteção” do fármaco, devido à presença dos excipientes da formulação.

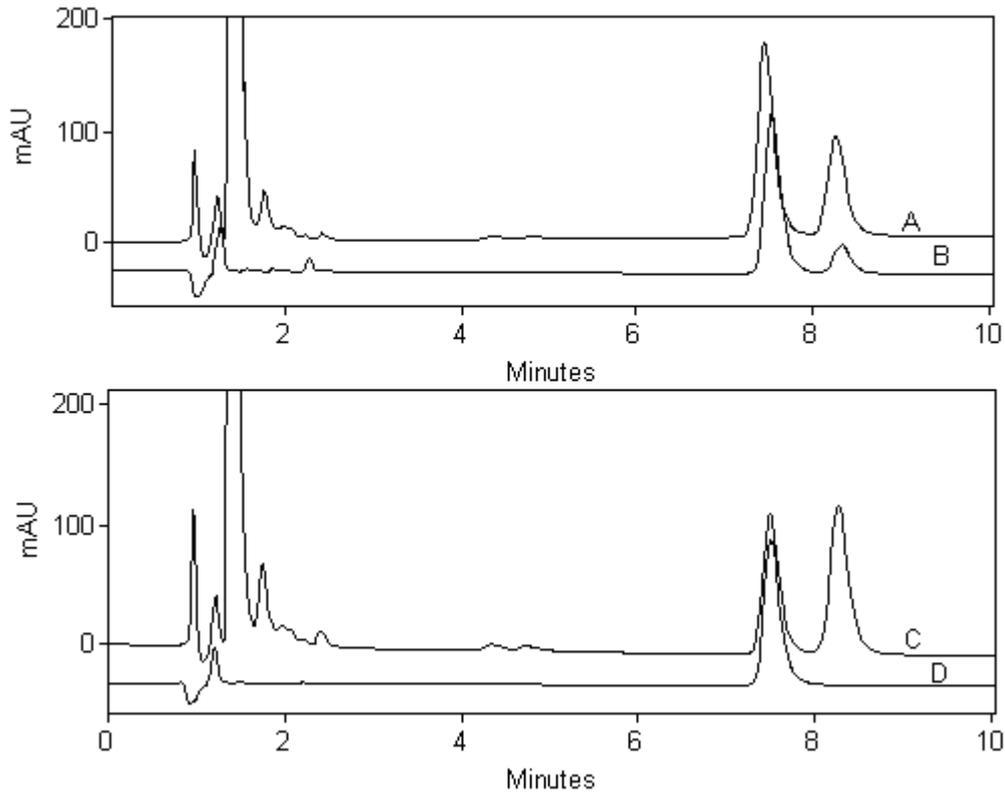


Figura 13 - Cromatogramas dos potenciais produtos de degradação. (A) oxidação - MNC SQR, (B) oxidação - MNC nas cápsulas, (C) hidrólise alcalina - MNC SQR e (D) hidrólise alcalina - MNC nas cápsulas. Condições cromatográficas: fase móvel acetonitrila:água:TEA (70:30:0,085, V/V/V), vazão de 1,2 mL/minuto, coluna MN Nucleosil® C8 ec (150 x 4,6 mm, 5  $\mu$ m) e pré-coluna C18 (4 x 3,0 mm, Phenomenex®, detecção em 210 nm, volume de injeção 20  $\mu$ L, análise à temperatura ambiente.

Os testes de estresse por fotólise (352 nm), hidrólise ácida (HCl 1 M) e degradação térmica (80 °C) não apresentaram picos secundários em seus cromatogramas, apesar da área do pico principal apresentar alguma redução, indicando que o fármaco possa ter sofrido certa degradação, e a ausência de picos relativos a potenciais produtos de degradação, neste caso, pode ser justificada por não haver grupamento(s) cromóforo(s) nos mesmos.

A exposição à radiação UV 254 nm proporcionou o aparecimento de picos secundários, mais polares que o MNC SQR, nos cromatogramas do fármaco

submetido à fotólise como solução metanólica em cubetas de quartzo. Tanto a fotólise (254 nm), como a oxidação, foram condições de estresse exploradas posteriormente, conforme descrito nos itens 4.5.1 e 4.5.2.

O DAD comprovou que nenhum dos picos dos potenciais produtos de degradação interferiu com o pico do cloridrato de milnaciprana após os testes de degradação acelerada, indicando que o método por CLAE é seletivo para o fármaco a ser determinado na forma farmacêutica cápsula.

#### 5.2.2.1.2 Linearidade

A partir de soluções de MNC SQR nas concentrações de 20,0 a 100,0 µg/mL em fase-móvel, foram construídas três curvas padrão de acordo com o item 4.3.2.2.2.

A Tabela 8 apresenta os valores de área absoluta obtidos para cada concentração da curva padrão.

Tabela 8 - Valores de área absoluta obtidos para a curva padrão do MNC SQR por CLAE.

Concentração (µg/mL)	Área*	Média das Áreas ± e.p.m.
20,0	934651	933312 ± 1943,3
	935803	
	929483	
40,0	1875113	1866339 ± 5049,9
	1866285	
	1857620	
60,0	2801360	2787077 ± 7555,8
	2775662	
	2784208	
80,0	3714203	3705095 ± 6416,4
	3708370	
	3692712	
100,0	4664285	4664079 ± 11778,1
	4684375	
	4643576	

\* Resultado de três determinações  
e.p.m. – erro padrão da média

A curva padrão para o método CLAE foi construída a partir das cinco concentrações analisadas em três dias diferentes e está representada na Figura 14 juntamente com a equação da reta e o coeficiente de correlação (r).

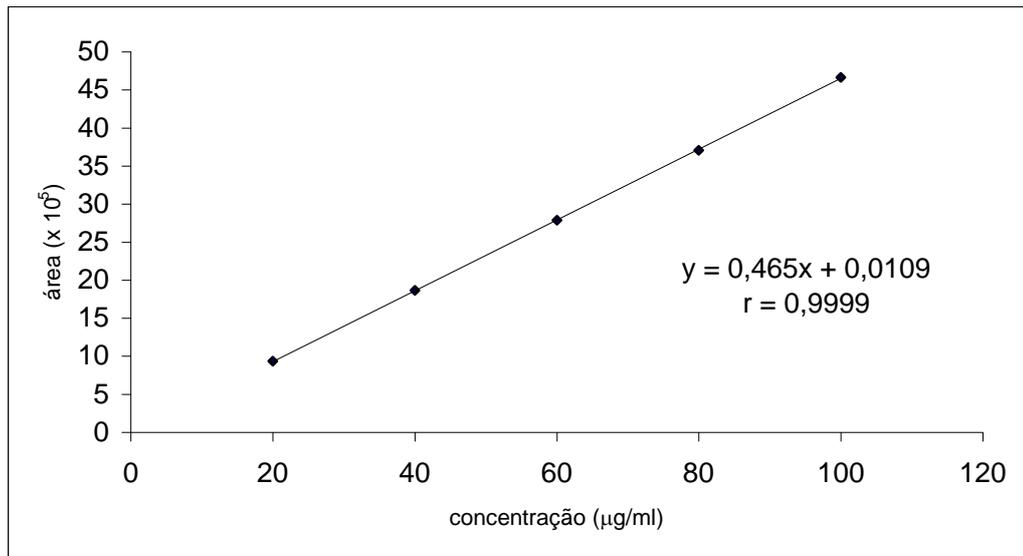


Figura 14 - Representação gráfica da curva padrão média do MNC SQR (CLAE).

A análise de variância (ANOVA) dos resultados obtidos por CLAE (Tabela 9) indica que a curva padrão obtida apresenta regressão linear significativa ( $p = 0,05$ ) e não apresenta desvio de linearidade. O coeficiente de correlação ( $r = 0,9999$ ) está de acordo com as especificações e indica correlação entre as áreas absolutas e a concentração do fármaco.

Tabela 9 - ANOVA das áreas absolutas determinadas para a obtenção da curva padrão do cloridrato de milnaciprana por CLAE.

Fontes de variação	GL	Soma dos Quadrados.	Variância	F (calculado)	F (tabelado)
ENTRE	4	$2,5 \times 10^{13}$	$6,4 \times 10^{12}$	40609*	3,48
regressão linear	1	$2,5 \times 10^{13}$	$2,5 \times 10^{13}$	162426*	4,96
desvio da linearidade	3	$1,4 \times 10^9$	$4,7 \times 10^8$	2,96	3,71
DENTRO (resíduo)	10	$1,5 \times 10^9$	$1,5 \times 10^8$		
Total	14				

\* Significativo para  $p = 0,05$ .

### 5.2.2.1.3 Precisão

A determinação do teor de cloridrato de milnaciprana nas cápsulas através de CLAE foi realizada conforme descrito no item 4.3.2.2.3. Os resultados encontram-se nas Tabela 10 e os valores dos DPR para a precisão intra e interdias indicam que o método é preciso.

Tabela 10 - Resultados obtidos na quantificação das amostras de MNC cápsulas por CLAE para avaliação da repetibilidade e da precisão intermediária.

	Teor (%) das soluções de MNC cápsulas (60 µg/mL)*						Teor Intradia (%) ± e.p.m.	DPR
dia I	102,8	101,7	102,1	100,2	100,3	101,2	101,4 ± 0,42	1,01
dia II	101,5	100,5	100,3	100,6	101,2	100,8	100,8 ± 0,19	0,45
dia III	102,5	102,0	102,3	102,0	100,8	101,7	101,9 ± 0,24	0,59
Teor médio interdias (%)							101,4 ± 0,31	
DPR							0,53	

\* Resultado de três determinações  
e.p.m. – erro padrão da média  
DPR – desvio padrão relativo

#### 5.2.2.1.4 Exatidão

A exatidão do método foi avaliada através do teste de recuperação do cloridrato de milnaciprana SQR de acordo com a descrição do item 4.3.2.2.4. A recuperação média foi de 99,7% e os resultados encontram-se abaixo na Tabela 11.

Tabela 11 - Resultados obtidos para o teste de recuperação do MNC SQR por CLAE.

	Concentração adicionada (µg/mL)	Concentração recuperada (µg/mL)	Recuperação (%)	Média (%)
R <sub>1</sub>	15,0	15,18	101,2	101,0
		15,05	100,3	
		15,21	101,4	
R <sub>2</sub>	30,0	29,73	99,1	99,1
		29,55	98,5	
		29,91	99,7	
R <sub>3</sub>	45,0	44,64	99,2	99,0
		44,37	98,6	
		44,64	99,2	
Recuperação média (%) = 99,69 DPR = 1,06				

DPR: desvio padrão relativo

#### 5.2.2.1.5 Robustez

A avaliação da robustez do método por CLAE foi realizada de acordo com o item 4.3.2.2.5. Variações típicas nas condições analíticas foram testadas e as análises cromatográficas foram realizadas separadamente (Tabela 12).

A influência da variação de pH da fase móvel foi avaliada na robustez do método na faixa de 7,0 a 8,0 durante a seleção das condições cromatográficas com resultados similares para os parâmetros do pico do fármaco. O aumento no valor de

pH da fase móvel elevou o tempo de retenção, mas o número de pratos teóricos e a assimetria do pico apresentaram pouca alteração, enquanto, a redução no valor do pH da fase móvel provocou uma leve diminuição no tempo de retenção do fármaco na coluna, mantendo-se estáveis os demais parâmetros. A vazão de 1,0 mL/minuto foi testada e mostrou-se adequada, mantendo o fator de cauda, elevando o número de pratos teóricos, justamente como consequência do aumento no tempo de retenção. A coluna analítica Merck aumentou significativamente a assimetria do pico, embora tenha se mantido dentro das especificações preconizadas e, por se tratar de uma coluna com características diferentes (marca, tamanho e fase estacionária) da coluna originalmente utilizada no método, o tempo de retenção e a eficiência tiveram seus valores reduzidos de modo esperado. Além disso, devido ao menor comprimento, optou-se por trabalhar com uma vazão também reduzida. Embora os valores tenham apresentado alguma alteração, permanecem garantindo a validade do procedimento analítico, pois as modificações no método não influenciaram a determinação quantitativa do cloridrato de milnaciprana na formulação.

Tabela 12 - Avaliação da robustez do método por CLAE para determinação do cloridrato de milnaciprana em fase móvel a 50 µg/mL.

	Tempo de retenção (min) <sup>c</sup>	Número de pratos teóricos ( $N > 2000$ ) <sup>b, c</sup>	Assimetria ( $T \leq 2$ ) <sup>b, c</sup>	Área Absoluta <sup>c</sup>	Teor (%) <sup>c</sup>
Método proposto <sup>a</sup>	7,6	8367	1,4	2797695	100,8
pH 7,0	7,2	8369	1,4	2774283	99,2
pH 8,0	8,1	8088	1,4	2553206	99,1
1,0 mL/ min	8,8	8937	1,4	3224030	100,7
Coluna Merck C8 (125x4.6 mm) *1,0 mL/min	3,7	2702	2,0	3184068	100,6
				DPR	0,85

<sup>a</sup>Fase móvel: ACN/H<sub>2</sub>O/TEA (70:30:0,085, V/V/V) e pH 7,5, coluna analítica C8 ec(150X4,6 mm; 5 µm) MN Nucleosil®, vazão de 1,2 mL/min.

<sup>b</sup>Recomendações CDER (1994)

<sup>c</sup>Média de três determinações

DPR: desvio padrão relativo

### 5.2.3 Eletroforese capilar (EC)

A eletroforese é um método de separação baseado na diferença de velocidade de migração dos íons em uma solução tampão através da qual tenha sido aplicado um campo elétrico de corrente contínua. Ao contrário da cromatografia, somente

uma fase está envolvida em uma separação eletroforética. Para íons de mesmo tamanho quanto maior a carga, maior a velocidade de migração, enquanto para íons de mesma carga, quanto menor o íon, menor o atrito e maior a velocidade de migração (SKOOG, 2002).

A principal vantagem da EC em relação às técnicas cromatográficas tradicionais é sua capacidade de produzir um maior número de pratos teóricos em uma separação de fase líquida. Ao contrário da CLAE, na EC o número de pratos teóricos não aumenta com o comprimento da coluna. A separação eficiente proporcionada pela EC é resultado da aplicação de potenciais altos, o que é possível devido ao comprimento longo e a seção transversal pequena do capilar, ou seja sua alta relação superfície/volume, tornando a resistência da solução excepcionalmente alta e proporcionando, conseqüentemente, uma dissipação baixa de energia e resfriamento eficiente. Adicionalmente, o perfil plano laminar do fluxo eletroosmótico, ao contrário do perfil parabólico causado pela pressão na CLAE, minimiza o alargamento da banda. O eletroferograma resultante apresenta-se como um cromatograma, porém com picos mais estreitos (SKOOG, 2002; GUZMAN e SHAW, 2002; WATSON, 2005).

Sua limitação estaria relacionada à robustez, mais complexa para ser executada, e sua sensibilidade em relação ao método por CLAE. Entretanto, sua simplicidade para o desenvolvimento e otimização do método, o tempo de análise mais rápido, o uso de pequenos volumes para reagentes caros, reduzida geração de resíduos orgânicos tóxicos, e um custo de operação relativamente baixo, torna o método por EC bastante útil na quantificação, identificação e caracterização de diferentes substâncias em uma ampla faixa de concentração (GUZMAN e SHAW, 2002; WATSON, 2005).

A eletroforese capilar desenvolvida na presença de micelas é chamada cromatografia eletrocínética capilar micelar (MECC ou MEKC). Nesta técnica, surfactantes são adicionados ao eletrólito de corrida em uma quantidade que excede a concentração micelar crítica. Dependendo da polaridade dos solutos, estes se distribuirão entre a fase aquosa e a fase de hidrocarboneto no interior das micelas, de modo similar ao sistema de partição em uma coluna de CLAE. Considerando-se, no entanto, que a “fase estacionária” (micelas) estará se deslocando ao longo da

coluna, mas numa velocidade inferior a da “fase móvel” (eletrólito de corrida), já que a superfície de uma micela aniônica (carregada negativamente) apresenta uma tendência de deslocamento em direção ao eletrodo positivo, e, no entanto, é carregada para o eletrodo negativo devido a alta velocidade do fluxo eletroosmótico (SKOOG, 2002).

. A utilização de micelas no eletrólito de corrida por LABAT e colaboradores (2002) para a determinação de antidepressivos orientou o desenvolvimento do presente método. A partir da teoria da MEKC, descrita acima, utilizou-se a formação de micelas, por meio da mistura de uma solução de dodecil sulfato de sódio (SDS) à solução do ácido bórico na composição do eletrólito de corrida.

A escolha dos parâmetros utilizados para a determinação do cloridrato de milnaciprana em cápsulas por EC foi realizada conforme descrito no item 4.3.3.1. As melhores condições foram estabelecidas de acordo com o desempenho do método, através do perfil eletroforético obtido. Inicialmente, foram testados diferentes valores de pH para o eletrólito de corrida. Soluções de ácido bórico / SDS 20 mM com valores de pH 7,0 e 8,0 proporcionaram um tempo de migração do fármaco entre 5,2 e 5,3 minutos. Já para o eletrólito de corrida com pH 10,0 o tempo de migração reduziu para 3,5 minutos, mas o pico apresentou-se alargado e com intensidade de absorção (mAU) reduzida. Logo, o pH 8,8 demonstrou ser o mais adequado, fornecendo um eletroferograma com tempo total de corrida curto, mas suficiente para apresentar seletividade, e um pico com parâmetros adequados de simetria, pratos teóricos e resolução em relação ao pico do padrão interno.

### **5.2.3.1 Validação do método EC para a forma farmacêutica cápsula**

#### **5.2.3.1.1 Especificidade**

A avaliação do método por EC quanto a sua especificidade para o cloridrato de milnaciprana foi realizada frente aos excipientes da formulação e aos potenciais produtos de degradação de acordo com o procedimento descrito nos itens 4.3.3.2.1.1 e 4.3.3.2.1.2. As condições de estresse selecionadas (fotólise e oxidação), dentre outras, foram aquelas que, anteriormente, apresentaram a formação de picos secundários na análise por CLAE referentes a potenciais produtos de degradação.

A Figura 15 apresenta os eletroferogramas das soluções de MNC SQR, cápsulas e placebo. O eletroferograma referente aos excipientes comprova ausência de qualquer interferência no tempo de migração do fármaco analisado (3,5 minutos). O tempo de migração para o ácido salicílico (PI) foi de 2,4 minutos.

As Figuras 16 e 17 apresentam os eletroferogramas das soluções de MNC SQR após exposição às condições de oxidação e fotólise (UV 254 nm), respectivamente, de acordo com o procedimento descrito no item 4.3.3.2.1.2.

A análise por DAD comprovou que não houve interferência dos potenciais produtos de degradação no tempo de migração do MNC SQR após os testes de degradação acelerada, indicando que o método por EC é seletivo para o fármaco a ser determinado na forma farmacêutica cápsula.

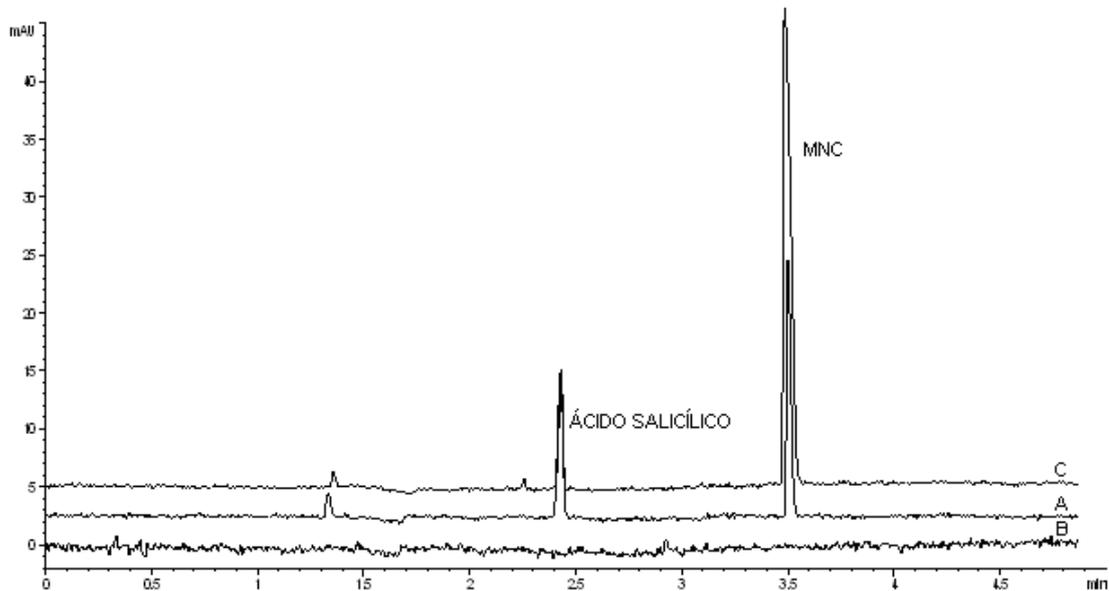


Figura 15 – Eletroferogramas obtidos através da análise por EC das soluções em ácido bórico (pH 8,0): (A) MNC SQR (25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), (B) placebo, (C) MNC cápsulas (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). PI: ácido salicílico (20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Condições eletroforéticas: capilar de sílica fundida, com 48,5 cm de comprimento (40,0 cm de comprimento efetivo) e 50  $\mu\text{m}$  de diâmetro interno (Polymicro Technologies), eletrólito ácido bórico / SDS 20 mM (pH 8,8), voltagem 30 kV, injeção hidrodinâmica 50 mBar, detecção 210 nm, temperatura 30  $^{\circ}\text{C}$ .

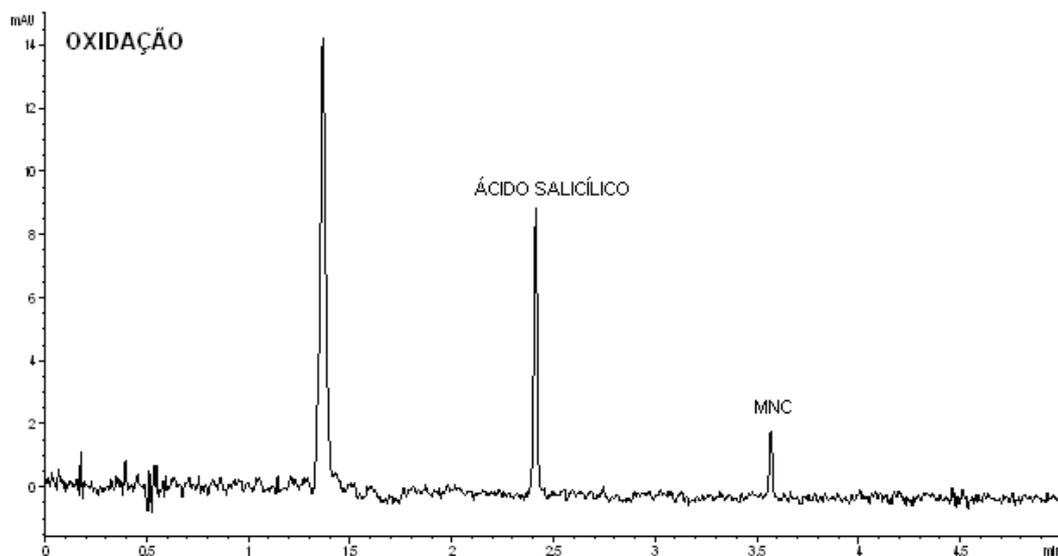


Figura 16 - Eletroferograma da solução MNC SQR (50  $\mu\text{g/mL}$  em ácido bórico pH 8,0): oxidação  $\text{H}_2\text{O}_2$  3% (V/V) por 24 horas. PI: ácido salicílico (20  $\mu\text{g/mL}$ ). Condições eletroforéticas: capilar de sílica fundida, com 48,5 cm de comprimento (40,0 cm de comprimento efetivo) e 50  $\mu\text{m}$  de diâmetro interno (Polymicro Technologies), eletrólito ácido bórico / SDS 20 mM (pH 8,8), voltagem 30 kV, injeção hidrodinâmica 50 mBar, detecção 210 nm, temperatura 30  $^\circ\text{C}$ .

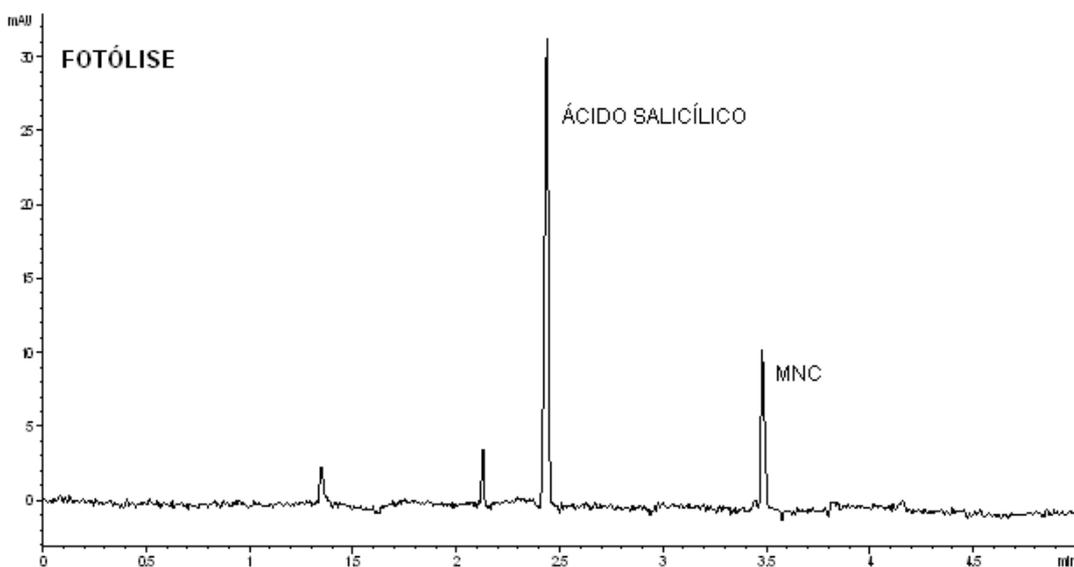


Figura 17 - Eletroferograma da solução MNC SQR (50  $\mu\text{g/mL}$  em ácido bórico pH 8,0): fotólise UV 254 nm por 2 horas. PI: ácido salicílico (30  $\mu\text{g/mL}$ ). Condições eletroforéticas: capilar de sílica fundida, com 48,5 cm de comprimento (40,0 cm de comprimento efetivo) e 50  $\mu\text{m}$  de diâmetro interno (Polymicro Technologies), eletrólito ácido bórico / SDS 20 mM (pH 8,8), voltagem 30 kV, injeção hidrodinâmica 50 mBar, detecção 210 nm, temperatura 30  $^\circ\text{C}$ .

### 5.2.3.1.2 Linearidade

A partir de soluções de MNC SQR nas concentrações de 20,0 a 60,0 µg/mL em ácido bórico 20 mM pH 8,0, foram construídas três curvas padrão de acordo com o item 4.3.3.2.2.

A Tabela 13 apresenta os valores de razão das áreas (MNC/PI) obtidos para cada concentração de MNC SQR da curva padrão.

A curva padrão para o método EC foi construída a partir das cinco concentrações analisadas em três dias diferentes e está representada na Figura 18 juntamente com a equação da reta e o coeficiente de correlação (r).

A análise de variância (ANOVA) dos resultados obtidos por EC (Tabela 14) indica que a curva padrão obtida apresenta regressão linear significativa ( $p = 0,05$ ) e não apresenta desvio de linearidade. O coeficiente de correlação ( $r = 0,999$ ) está de acordo com as especificações e indica correlação entre as áreas absolutas e a concentração do fármaco.

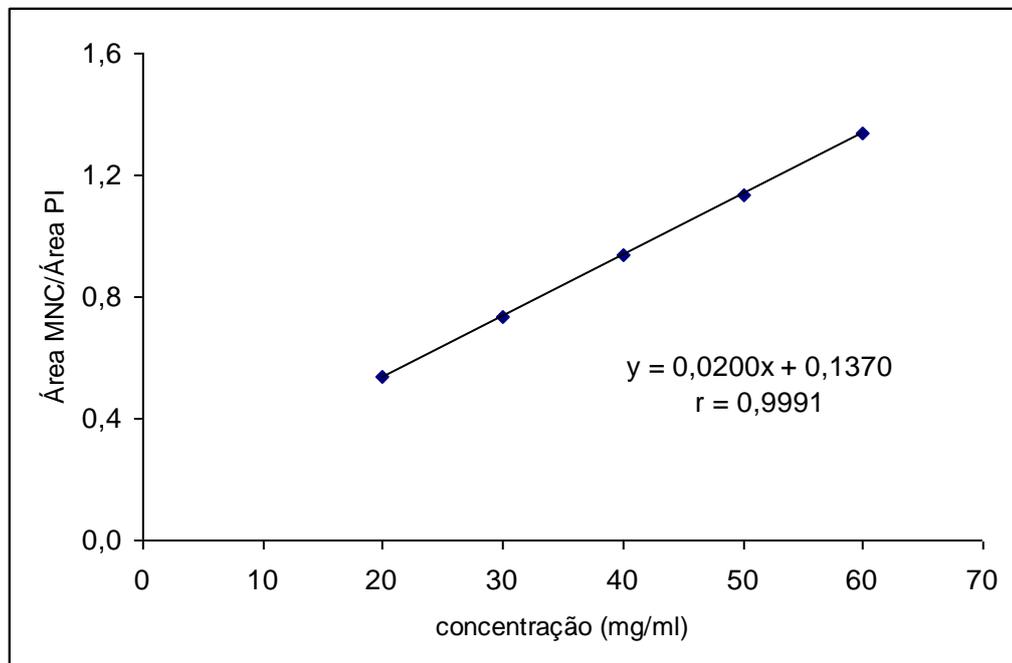


Figura 18 - Representação gráfica da curva padrão média do MNC SQR (EC).

Tabela 13 - Razão das áreas (MNC/PI) obtidos para a curva padrão do MNC SQR por EC.

Concentração ( $\mu\text{g/mL}$ )	Razão das Áreas*	Razão Média das Áreas $\pm$ e.p.m.
20,0	0,5777	0,5469 $\pm$ 0,0179
	0,5474	
	0,5156	
30,0	0,7737	0,7259 $\pm$ 0,0242
	0,7086	
	0,6955	
40,0	0,9988	0,9380 $\pm$ 0,0389
	0,8655	
	0,9498	
50,0	1,1402	1,1181 $\pm$ 0,0138
	1,1213	
	1,0928	
60,0	1,3834	1,3491 $\pm$ 0,0314
	1,3776	
	1,2863	

\* Resultado de três determinações  
e.p.m. – erro padrão da média

Tabela 14 - ANOVA para a curva padrão do cloridrato de milnaciprana por EC.

Fontes de variação	GL	Soma dos Quadrados.	Variância	F (calculado)	F (tabelado)
ENTRE	4	1,19803	0,29951	138,66*	3,48
regressão linear	1	1,19588	1,19588	553,64*	4,96
desvio da linearidade	3	$2,14 \times 10^{-3}$	$0,71 \times 10^{-3}$	0,3307	3,71
DENTRO (resíduo)	10	$21,60 \times 10^{-3}$	$2,16 \times 10^{-3}$		
Total	14				

\* Significativo para  $p = 0,05$ .

### 5.2.3.1.3 Precisão

A determinação do teor de cloridrato de milnaciprana nas cápsulas por EC foi realizada conforme descrito no item 4.3.3.2.3. Os resultados encontram-se na Tabela 15 e os valores dos DPR para a precisão intra e interdias indicam que o método é preciso.

Tabela 15 - Resultados obtidos na quantificação das amostras de MNC cápsulas por EC para avaliação da repetibilidade e da precisão intermediária.

	Teor (%) das soluções de MNC cápsulas (40 µg/mL)*						Teor Intradia (%) ± e.p.m.	DPR
dia I	102,39	101,35	103,13	101,49	105,40	103,68	102,9 ± 0,62	1,48
dia II	103,52	101,23	101,37	101,45	102,21	101,57	101,9 ± 0,36	0,85
Teor médio interdias (%)							102,4 ± 0,37	
DPR							1,26	

\* Resultado de três determinações  
e.p.m. – erro padrão da média  
DPR – desvio padrão relativo

#### 5.2.3.1.4 Exatidão

A exatidão do método foi avaliada através do teste de recuperação do cloridrato de milnaciprana SQR de acordo com a descrição do item 4.3.3.2.4. A recuperação média foi de 100,9% e os resultados encontram-se abaixo na Tabela 16.

Tabela 16 - Resultados obtidos para o teste de recuperação do MNC SQR por EC.

	Concentração adicionada (µg/mL)	Concentração recuperada (µg/mL)	Recuperação (%)	Média (%)
R <sub>1</sub>	10,0	10,17	101,7	100,3
		9,95	99,4	
		10,00	100,0	
R <sub>2</sub>	20,0	20,37	101,8	101,2
		20,21	101,0	
		20,18	100,9	
R <sub>3</sub>	30,0	29,77	99,2	101,1
		30,54	101,8	
		30,65	102,2	
Recuperação média (%) = 100,9 DPR = 1,08				

DPR: desvio padrão relativo

#### 5.2.4 Análise comparativa dos métodos propostos para determinação do cloridrato de milnaciprana em cápsulas

As avaliações estatísticas, através da análise de variância (ANOVA), das determinações do cloridrato de milnaciprana em cápsulas pelos métodos desenvolvidos estão demonstradas nas Tabelas 17 e 18.

De acordo com os valores obtidos, verifica-se que não houve diferença significativa para os resultados de exatidão entre os três métodos propostos. No

entanto, quando os dados de dois dias de precisão foram comparados, verificou-se alguma diferença entre seus resultados para um nível de confiabilidade de 95%, sendo necessária uma avaliação estatística, capaz de indicar quais dos métodos se diferenciavam significativamente.

Tabela 17 - ANOVA para a recuperação de MNC SQR em cápsulas por UV-D<sup>2</sup>, CLAE e EC

Fontes de variação	GL	Soma dos Quadrados.	Variância	F	F (5%)	F(1%)
ENTRE	2	6,70	3,35	2,85	3,40	5,61
DENTRO (resíduo)	24	28,16	1,17	0,88		
Total	26	34,86	1,34			

Tabela 18 - ANOVA para a precisão na determinação de MNC em cápsulas por UV-D<sup>2</sup>, CLAE e EC

Fontes de variação	GL	Soma dos Quadrados.	Variância	F	F (5%)	F (1%)
ENTRE	2	10,14	5,07	5,30*	3,29	5,31
DENTRO (resíduo)	33	31,58	0,96	0,80		
Total	35	41,72	1,19			

\* Significativo para  $p = 0,05$ .

O teste *de Tukey* foi o tratamento estatístico aplicado para a comparação dos resultados apresentados pelos métodos analíticos quantitativos UV-D<sup>2</sup>, CLAE e EC, utilizando-se os respectivos valores de exatidão e precisão, para avaliação da magnitude das diferenças encontradas por meio do teste F.

Tabela 19 – Avaliação das diferenças das médias entre os métodos (teste de *Tukey*)

Método*	Média (DPR) exatidão (n=9)		Média (DPR) precisão (n=12)		
UV-D <sup>2</sup>	100,17 (1,09)	A	101,11 (0,69)	A	
CLAE	99,69 (1,06)	A	101,64 (0,83)	A	B
EC	100,90 (1,08)	A	102,40 (1,26)		B

\*Letras iguais não diferem significativamente ( $\alpha = 0,05$ )

O resultado do teste de *Tukey* demonstrou não haver diferença significativa para as médias apresentadas na avaliação da exatidão dos métodos desenvolvidos. No entanto, comparando-se as médias dos teores obtidos para dois dias de análise, observa-se que os métodos UV-D<sup>2</sup> e EC foram aqueles que se diferenciaram, apesar de ambos se apresentarem equivalentes ao CLAE (Tabela 19).

### 5.3 Ensaio de dissolução

O teste de dissolução deve ser realizado, a princípio, o mais próximo possível das condições fisiológicas, permitindo relacionar e interpretar os dados de dissolução ao desempenho *in vivo* da formulação farmacêutica testada. É fundamental desenvolver um método de dissolução que forneça resultados consistentes, confiáveis e que também avalie as características do produto (tamanho de partícula, forma polimórfica e excipientes) sensíveis à formulação e às mudanças no processo de fabricação. Em geral, para fins de controle de qualidade, sempre que possível, será preferido o uso do meio de dissolução mais simples, independentemente da forma farmacêutica (FDA, 1997; LEE *et al.*, 2008).

#### 5.3.1 Teste de solubilidade

A análise das condições *sink* mostrou que o fármaco apresentou-se solúvel em todos os três meios testados: HCl 0,1M e soluções tampão USP pH 4,1 e 7,4 (Tabela 20). O que já era esperado, de acordo com dado prévio de solubilidade do MNC indicado no item 3.2.1.1. Os resultados obtidos sugerem que qualquer meio de dissolução, no intervalo de pH testado, poderia ser utilizado no teste de dissolução.

Tabela 20 - Teste de solubilidade para o cloridrato de milnaciprana

Meio de dissolução (37 °C)	pH	% dissolvida <sup>1,2</sup> (15 min)	DPR
HCl 0,1M	1,0	101,2	0,55
tampão acetato	4,1	101,4	0,55
tampão fosfato	7,4	101,9	0,69

<sup>1</sup> 10 mg do fármaco em 50 mL de meio com agitação magnética

<sup>2</sup> determinado por CLAE (n=2)

DPR: desvio padrão relativo

Uma vez que o MNC apresentou alta solubilidade, torna-se evidente que poderá exibir alta taxa de dissolução em qualquer dos meios selecionados para o teste. Portanto, optou-se por testar as cápsulas em 900 mL de HCl 0,01M (pH 2,0), levando-se em consideração um meio com valor de pH próximo às condições fisiológicas do estômago que seria, possivelmente, o sítio de dissolução para uma forma de dosagem oral sólida de liberação imediata.

### 5.3.2 Estabilidade do fármaco no meio de dissolução

As soluções padrão (MNC SQR) e amostra (cápsulas) em HCl 0,01M, submetidas ao teste de estabilidade no meio de dissolução, demonstraram que o fármaco permaneceu estável sob refrigeração por até 72 horas. Todos os resultados de quantificação (Tabela 21) apresentaram-se com valores adequados de DPR com relação ao valor inicial, à temperatura ambiente, e nenhum produto de degradação foi observado através da análise com DAD.

Tabela 21 – Estabilidade das soluções padrão e amostra após teste de dissolução.

Soluções em HCl 0,01 M:	Análise por CLAE - área absoluta do pico principal:		
	dia do ensaio de dissolução*	após 72 horas* (sob refrigeração)	DPR
MNC SQR	2440802	2441667	0,24
cápsulas	2282062	2286041	0,19

\*média de três determinações  
DPR: desvio padrão relativo

### 5.3.3 Validação do método UV-D<sup>2</sup> e CLAE para determinação de MNC no ensaio de dissolução

#### 5.3.3.1 Especificidade

Os resultados de especificidade para o método UV-D<sup>2</sup> sugerem que o método espectrofotométrico pode ser usado na determinação de MNC liberado após o processo de dissolução das cápsulas, uma vez que os excipientes da formulação não interferiram na análise (Figura 19). As análises por CLAE, com o auxílio do DAD, também apresentaram resultados de especificidade adequados, visto não ter ocorrido o aparecimento de picos secundários durante a corrida cromatográfica após a injeção do placebo, constituído pelo invólucro da cápsula e seus excipientes no meio de dissolução (Figura 20).

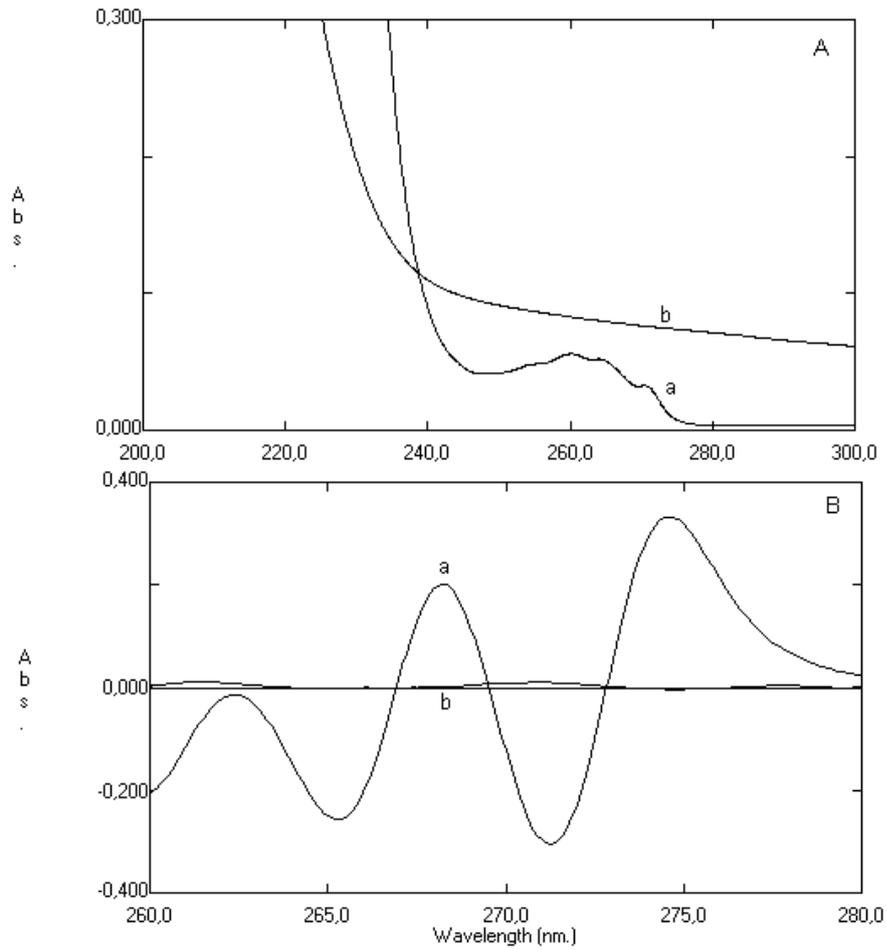


Figura 19 – Especificidade após teste de dissolução: (A) espectro UV-ordem zero para (a) solução MNC SQR (60  $\mu\text{g/mL}$ ) e (b) solução placebo em HCl 0,01M. (B) espectro UV-2ª ordem, respectivamente.

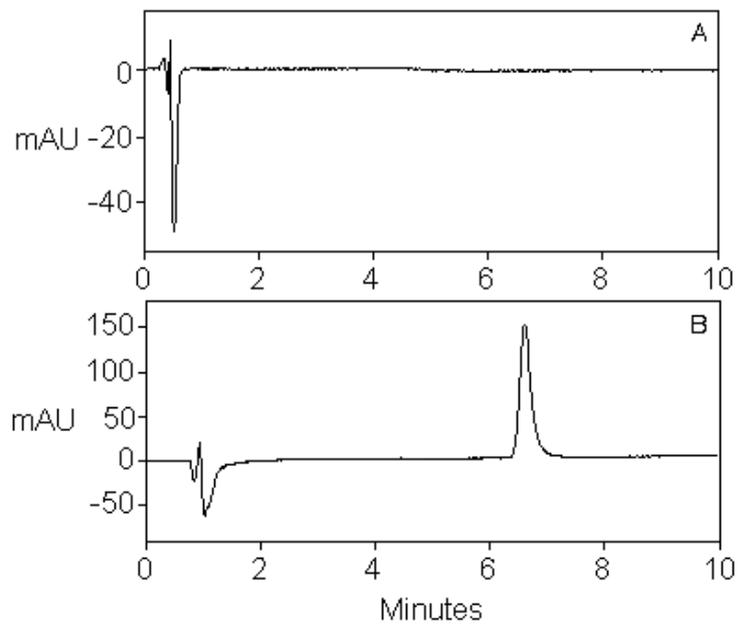


Figura 20 – Especificidade após teste de dissolução em HCl 0,01M (37 °C): cromatogramas do placebo (A) e do MNC SQR (B).

### 5.3.3.2 Linearidade

A linearidade foi adequada para ambos os métodos, no intervalo de concentração de 1-120 µg/mL (CLAE) e de 5-120 µg/mL (UV-D<sup>2</sup>). O coeficiente de correlação (*r*) foi 0,9999 para ambos os métodos. A equação média para três curvas padrão foi:  $y = 36153x + 8059$  (CLAE), e  $y = 0,0032x - 0,0016$  (UV-D<sup>2</sup>).

Tabela 22 – Valores de área absoluta obtidos por CLAE para a curva padrão na determinação da % MNC liberado após teste de dissolução das cápsulas.

Concentração (µg/mL)	Área*	Média das Áreas ± e.p.m.
1,0	38391	36650 ± 932,8
	35199	
	36359	
30,0	1096447	1098914 ± 1235,0
	1100041	
	1100254	
60,0	2173950	2186732 ± 6588,8
	2195898	
	2190348	
90,0	3237565	3253962 ± 13723,0
	3243099	
	3281221	
120,0	4304914	4346007 ± 20842,7
	4360489	
	4372618	

\* Resultado de três determinações e.p.m. – erro padrão da média

Tabela 23 - Valores de absorvância obtidos por UV-D<sup>2</sup> para a curva padrão na determinação da % MNC liberado após teste de dissolução das cápsulas.

Concentração (µg/mL)	Absorvância*	Absorvância média ± e.p.m.
5,0	0,0138	0,0141 ± 1,5 x 10 <sup>-4</sup>
	0,0143	
	0,0141	
30,0	0,0923	0,0935 ± 6,2 x 10 <sup>-4</sup>
	0,0943	
	0,0940	
60,0	0,1872	0,1875 ± 1,7 x 10 <sup>-4</sup>
	0,1877	
	0,1877	
90,0	0,2829	0,2832 ± 1,7 x 10 <sup>-4</sup>
	0,2832	
	0,2835	
120,0	0,3769	0,3773 ± 1,9 x 10 <sup>-4</sup>
	0,3774	
	0,3775	

\* Resultado de três determinações e.p.m. – erro padrão da média

A análise por ANOVA mostrou regressão linear significativa e não houve desvio de linearidade para um nível de confiabilidade de 95%.

Tabela 24 - ANOVA das áreas absolutas determinadas por CLAE para a obtenção da curva padrão na determinação da % MNC liberado após teste de dissolução das cápsulas.

Fontes de variação	GL	Soma dos Quadrados.	Variância	F (calculado)	F (tabelado)
ENTRE	4	$3,4 \times 10^{13}$	$8,7 \times 10^{12}$	21703*	3,48
regressão linear	1	$3,4 \times 10^{13}$	$3,4 \times 10^{13}$	86811*	4,96
desvio da linearidade	3	$7,4 \times 10^8$	$2,5 \times 10^8$	0,6198	3,71
DENTRO (resíduo)	10	$4,0 \times 10^9$	$4,0 \times 10^8$		
Total	14				

\* Significativo para  $p = 0,05$ .

Tabela 25 - ANOVA das absorvâncias determinadas por UV-D<sup>2</sup> para a obtenção da curva padrão na determinação da % MNC liberado após teste de dissolução das cápsulas.

Fontes de variação	gl	Soma dos Quadrados.	Variância	F (calculado)	F (tabelado)
ENTRE	4	0,25204	0,06301	209567,3*	3,48
regressão linear	1	0,25204	0,25204	838263,3*	4,96
desvio da linearidade	3	$1,8 \times 10^{-6}$	$6,0 \times 10^{-7}$	1,98	3,71
DENTRO (resíduo)	10	$3,0 \times 10^{-6}$	$3,0 \times 10^{-7}$		
Total	14				

\* Significativo para  $p = 0,05$ .

Após construção das três curvas padrão para cada um dos métodos propostos, os limites de detecção e quantificação, para CLAE e UV-D<sup>2</sup>, aplicados após teste de dissolução das cápsulas de MNC, foram calculados com base nas equações indicadas no item 4.4.4.1.3: LD = 0,44 µg/mL e LQ = 1,48 µg/mL para o CLAE e LD = 0,59 µg/mL e LQ = 1,95 µg/mL para o UV-D<sup>2</sup>.

### 5.3.3.3 Exatidão e precisão

A recuperação típica para testes de dissolução é de 95% a 105% da quantidade adicionada (USP 32, 2009). A exatidão dos métodos foi considerada adequada no intervalo de 95,53% a 104,51% para o MNC (Tabela 22). A repetibilidade e a precisão intermediária foram determinadas em três níveis de concentração (5,0; 60,0 e 100,0 µg/mL) por três dias. O baixo valor de DPR ( $\leq 5\%$ ) demonstrou boa precisão para ambos os métodos (Tabela 23).

Tabela 26 - Exatidão do teste de dissolução das cápsulas de MNC

Solução padrão (µg/mL)	Recuperação % (n=6)	
	CLAE	UV-D <sup>2</sup>
5,0	97,3	99,5
60,0	98,2	97,9
100,0	98,0	97,9
Recuperação média (%) ± e.p.m. (n=18)	97,8 ± 0,32 (95,53 – 99,70)	98,4 ± 0,50 (95,96 – 104,51)

e.p.m.: erro padrão da média

Tabela 27 - Repetibilidade e precisão intermediária do teste de dissolução das cápsulas de MNC

Intradia (n=6)	Teor médio observado (%) ± e.p.m.		DPR (%)	
	CLAE	UV-D <sup>2</sup>	CLAE	UV-D <sup>2</sup>
dia I	97,2 ± 0,48	98,1 ± 0,93	1,22	2,33
dia II	97,4 ± 0,47	98,9 ± 1,19	1,19	2,94
dia III	98,9 ± 0,48	98,3 ± 0,39	1,16	0,98
Interdias(n=3)	97,8 ± 0,53	98,4 ± 0,25	0,94	0,45

e.p.m.: erro padrão da média

DPR: desvio padrão relativo

### 5.3.4 Comparação e cinética dos perfis de dissolução

A cinética de liberação foi avaliada através dos perfis de dissolução (Figura 21). De acordo com os valores do coeficiente de determinação ( $R^2$ ) ou do coeficiente de determinação ajustado ( $R^2_{ajustado}$ ), os perfis de dissolução foram melhor descritos através do modelo de Hixson-Crowell (Tabela 24). Este modelo assume que a taxa de liberação é limitada pela taxa de dissolução das partículas do fármaco, e não pelo processo de difusão, que deve ocorrer por meio da matriz polimérica (COSTA e LOBO, 2001).

O modelo de Hixson-Crowell foi usado para calcular o tempo de amostragem para dissolução  $\geq 80\%$  do fármaco ( $t_{80\%}$ ): 13,3 minutos ( $K_S=0,1449$ ) por CLAE e 12,9 minutos ( $K_S=0,1488$ ) pelo método UV-D<sup>2</sup>. Os resultados revelaram uma liberação maior do que 80%, de acordo com os limites de aceitação para fármacos que se dissolvem rapidamente e são altamente solúveis,  $Q=80\%$  em 60 minutos ou menos é suficiente para um teste de controle de qualidade de rotina (FDA, 1997; USP 32, 2009). A eficiência da dissolução ( $ED\% \pm e.p.$ ) das cápsulas, definida como a área sob a curva de dissolução por um período determinado de tempo e expresso como

uma porcentagem da área do retângulo descrito por 100% de dissolução no mesmo tempo (COSTA e LOBO, 2001), foi de 79,8% ( $\pm 1,06$ ) pelo método CLAE e de 80,5% ( $\pm 1,25$ ) pelo método UV-D<sup>2</sup>.

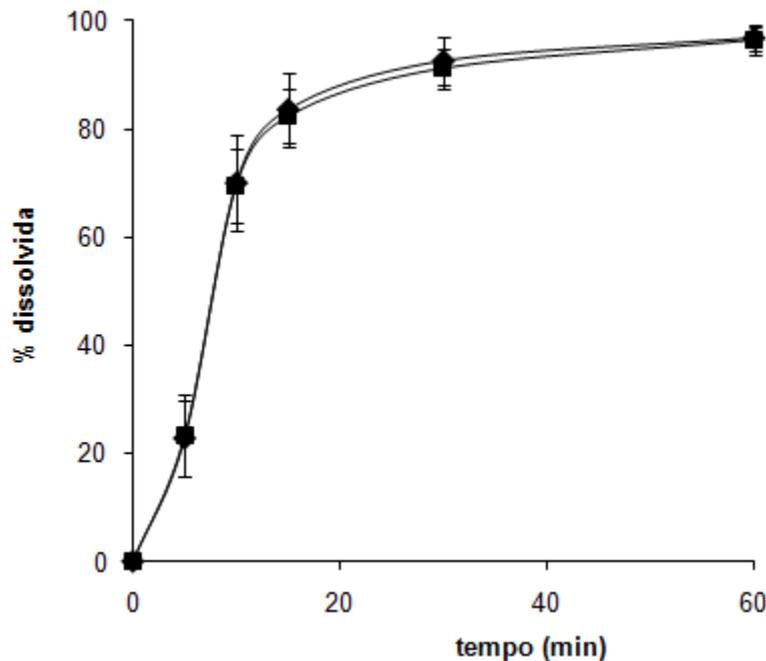


Figura 21 – Perfil de dissolução das cápsulas de MNC 50 mg (Dalcipran®). Cestas (50 rpm), 900 mL HCl 0,01M (37 °C  $\pm$  0,5). Os valores são correspondentes à média de 12 determinações ( $\pm$  desvio padrão) por UV-D<sup>2</sup> (◆) e CLAE (■).

O teste *t* de *Student* foi usado (*t* tabelado=2,03 para 34 graus de liberdade) para comparar o método espectrofotométrico UV-D<sup>2</sup> com o método CLAE na determinação quantitativa do MNC após o teste de dissolução das cápsulas. Os dados de precisão obtidos para os dois métodos não apresentaram diferença significativa (*t* calculado=1,06) para um nível de confiança de 95%. Os perfis de liberação obtidos por CLAE e UV-D<sup>2</sup>, também foram comparados através do *fator de diferença* ( $f_1 = 0,67$ ) e do *fator de similaridade* ( $f_2 = 92,52$ ). Os resultados indicam que os perfis podem ser considerados similares, pois o valor de  $f_1$  foi próximo a zero e o valor de  $f_2$  foi próximo de 100.

Tabela 28 – Coeficiente de determinação ( $R^2$ ) e coeficiente de determinação ajustado ( $R^2_{ajustado}$ ) dos modelos matemáticos.

Modelos de cinética	CLAE		UV-D <sup>2</sup>	
	$R^2$	$R^2_{ajustado}$	$R^2$	$R^2_{ajustado}$
Ordem zero	0,9581	0,8953	0,9590	0,8975
1ª ordem	0,8181	0,5453	0,8230	0,5575
Higuchi	0,8947	0,8245	0,8899	0,8165
Hixson-Crowell	0,9651	0,9128	0,9652	0,9130

### 5.3.5 Influência das condições de armazenamento no perfil de dissolução

As formulações farmacêuticas são sistemas complexos, compostos não apenas pelo fármaco, mas também por vários excipientes. Estes produtos estão sujeitos a sofrer degradação química e física. Geralmente, se aceita que a estabilidade da taxa de dissolução durante o armazenamento à temperatura ambiente não poderia ser prevista a partir do armazenamento a curto prazo sob condições aceleradas de alta temperatura e umidade. Por outro lado, alguns exemplos sugerem que a avaliação da estabilidade por testes acelerados pode ser possível em alguns casos. É difícil descrever as alterações na dissolução ou na taxa de liberação do fármaco após seu armazenamento, por meio de equações cinéticas devido aos complicados e variados mecanismos envolvidos. No entanto, algumas tentativas têm sido feitas, e várias relações empíricas foram observadas (YOSHIOKA e STELLA, 2002).

Grandes alterações nas características de dissolução do fármaco, observadas após armazenamento por longos períodos, indicariam que mudanças funcionais estariam ocorrendo no medicamento e poderiam comprometer seu desempenho *in vivo* (YOSHIOKA e STELLA, 2002). Com o objetivo de demonstrar as possíveis modificações no comportamento de dissolução do produto farmacêutico, de acordo com as condições de temperatura, umidade e tempo de exposição, cápsulas de cloridrato de milnaciprana, em sua embalagem original, foram armazenadas e analisadas posteriormente. A quantificação por CLAE, após ensaio de dissolução, das unidades acondicionadas sob 40 °C e 75% de umidade relativa por até 30 dias (Dalcipran®), assim como daquelas armazenadas à temperatura ambiente, mas com o prazo de validade vencido (Ixel®), demonstrou que todas exibiram um decréscimo

em sua taxa de dissolução. A Figura 22 apresenta os resultados obtidos, comparando-os ao perfil demonstrado por cápsulas dentro do prazo de validade, mantidas sob temperatura ambiente ( $\pm 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) e umidade controlada.

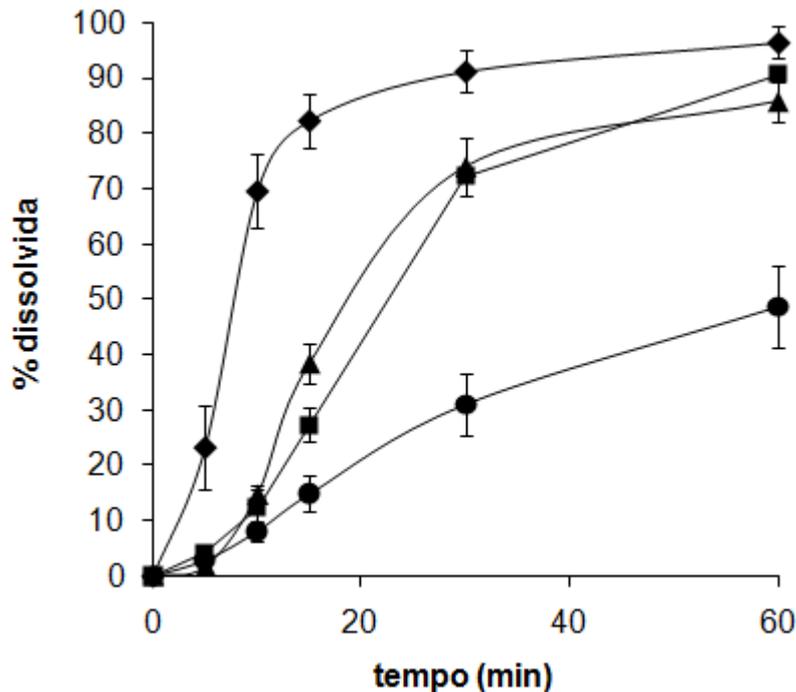


Figura 22 – Alterações no perfil de dissolução das cápsulas de MNC após armazenamento (quantificação por CLAE,  $n = 4$ ). As curvas representam as taxas de dissolução após armazenamento em condição ambiente - Dalcipran® (◆), armazenamento em condição ambiente, mas com prazo de validade vencido - Ixel® (●) e após armazenamento a  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$  e 75% U.R. por 2 (▲), e 4 (■) semanas - Dalcipran®.

#### 5.4 Estudos de degradação forçada para o cloridrato de milnaciprana

A estabilidade de produtos farmacêuticos depende de fatores ambientais como temperatura, umidade e luz e de outros relacionados ao próprio produto como propriedades físicas e químicas de substâncias ativas e excipientes farmacêuticos, forma farmacêutica e sua composição, processo de fabricação, tipo e propriedades dos materiais de embalagem (BRASIL, 2005).

Teste de estabilidade é o conjunto de testes projetados para obter informações sobre a estabilidade de produtos farmacêuticos visando definir seu prazo de

validade e período de utilização em embalagem e condições de armazenamento especificadas (BRASIL, 2005).

As condições experimentais devem ser realistas e conduzir à formação de produtos de degradação relevantes, não havendo necessidade de exceder a exposição do fármaco pelo período de três meses e/ou não os degradando mais que 5 a 15% (KLICK *et al.*, 2005).

Não foram encontrados dados publicados relativos à estabilidade do cloridrato de milnaciprana. Devido a isto, o estudo preliminar realizado neste trabalho procurou avaliar a estabilidade da matéria-prima e do conteúdo das cápsulas, submetendo-as a condições extremas, como à radiação UV 254 nm e à oxidação com solução de peróxido de hidrogênio.

Os resultados foram comparados com a solução de MNC não degradada. Dados do detector UV com arranjo de fotodiodos (DAD) foram coletados com o propósito de avaliar a pureza do pico do cloridrato de milnaciprana remanescente e dos potenciais produtos de degradação majoritários.

#### **5.4.1 Fotodegradação**

Os resultados preliminares obtidos nas análises por CLAE após degradação do fármaco, em placa de Petri, sob radiação UV 254 nm por 1 hora e 40 minutos encontram-se na Figura 23. Os cromatogramas apresentaram picos referentes a potenciais produtos de degradação nas condições estabelecidas para a avaliação da fotólise. Todos os picos, inclusive os majoritários PD1 e PD2, apresentaram tempo de retenção anterior ao pico principal, ou seja, são compostos mais polares que o MNC.

A formação dos produtos de degradação majoritários, PD1 e PD2, de acordo com a quantidade de fármaco exposto à fotodegradação é apresentada na Figura 24. Observa-se, que nas condições estabelecidas, as áreas de PD1 e PD2 chegam a alcançar em média de 3,6% a 4,5%, respectivamente, da área relativa ao pico principal do fármaco não degradado.

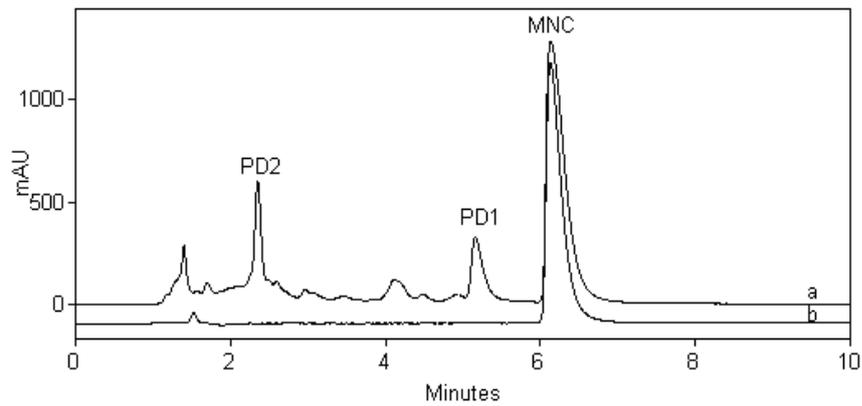


Figura 23 – Cromatogramas das soluções MNC SQR (1 mg/mL) em placa de Petri: (a) após degradação sob radiação UV 254 nm por 1 hora e 40 minutos e (b) controle (não degradada).

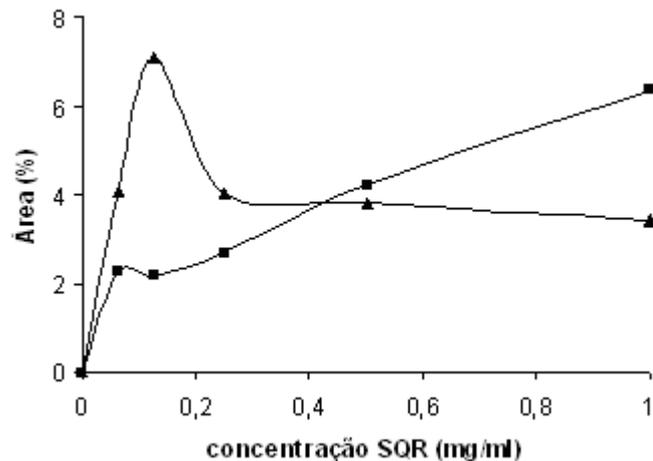


Figura 24 – Formação dos produtos de degradação majoritários, (■) PD1 e (▲) PD2, do MNC exposto em placa de Petri à radiação UV 254 nm por 1 h e 40 min. Cada ponto representa a área percentual de cada produto de degradação formado, analisados por CLAE.

#### 5.4.1.1 Cinética da fotodegradação

As concentrações remanescentes do cloridrato de milnaciprana, matéria-prima e conteúdo das cápsulas, após fotólise, foram analisadas por CLAE nos diferentes tempos e nas diferentes condições de exposição. A Figura 25 apresenta os gráficos da área percentual, relativa à concentração residual do fármaco em função do tempo (reação de ordem zero), do logaritmo da área percentual em função do tempo (reação de primeira ordem) e da recíproca da área percentual em função do tempo (reação de segunda ordem).

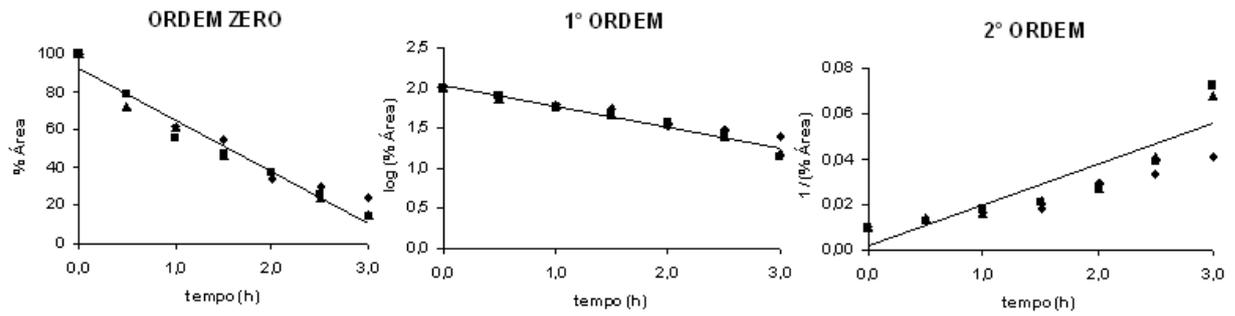


Figura 25 – Representação gráfica da degradação por fotólise (UV 254 nm) do MNC analisado por CLAE: (◆) MNC SQR no estado sólido em placa de Petri (n=2), (■) solução de MNC SQR em cubetas (n=3) e (▲) solução do conteúdo das cápsulas de MNC em cubetas (n=3)

A definição da ordem de reação, as respectivas equações e seus coeficientes de regressão ( $r$ ), as constantes de velocidade ( $k$ ), bem como os resultados de  $t_{90\%}$  para o cloridrato de milnaciprana após fotodegradação são apresentados na Tabela 25.

Tabela 29 – Cinética da fotodegradação: coeficientes de correlação ( $r$ ), constantes de velocidade de reação ( $k$ ) e prazo de validade ( $t_{90\%}$ ) para o MNC após fotólise UV 254 nm.

Condição de exposição	Ordem da reação	Equação da reta	$r$	$k$ (horas <sup>-1</sup> )	$t_{90\%}$ (min)
MNC SQR (sólido)	1ª Ordem	$y=2,0026-0,2087x$	0,9904	0,2087	30,47
MNC SQR (solução)	Ordem zero	$y=92,401-27,384x$	0,9844	27,384	20,25
MNC CÁP (solução)	1ª Ordem	$y=2,0257-0,2614x$	0,9865	0,2614	24,33

Os resultados obtidos demonstraram que o cloridrato de milnaciprana apresentou significativa fotodegradação, na faixa de 75 a 86%, nas condições estabelecidas. Observou-se a formação de produtos de degradação minoritários, além dos majoritários PD1 e PD2, e a formação de coloração amarela conforme aumento no tempo de exposição. A cinética de primeira ordem de reação foi atribuída à fotodegradação do MNC, quando a matéria-prima (SQR) foi exposta na forma sólida e o conteúdo das cápsulas foi exposto como solução em etanol. Já a solução da matéria-prima (SQR) em solução etanólica apresentou cinética de ordem

zero, estabelecendo-se o melhor coeficiente de correlação, a partir do método gráfico.

#### 5.4.2 Degradação por oxidação

Os resultados obtidos nas análises por CLAE após oxidação do fármaco nas condições estabelecidas encontram-se na Figura 26. O pico majoritário (PDox.), com tempo de retenção posterior ao pico principal, apresenta o produto da degradação oxidativa como um composto mais lipofílico que o MNC. Os cromatogramas apresentam picos referentes a potenciais produtos de degradação minoritários após oxidação, além do pico referente ao branco.

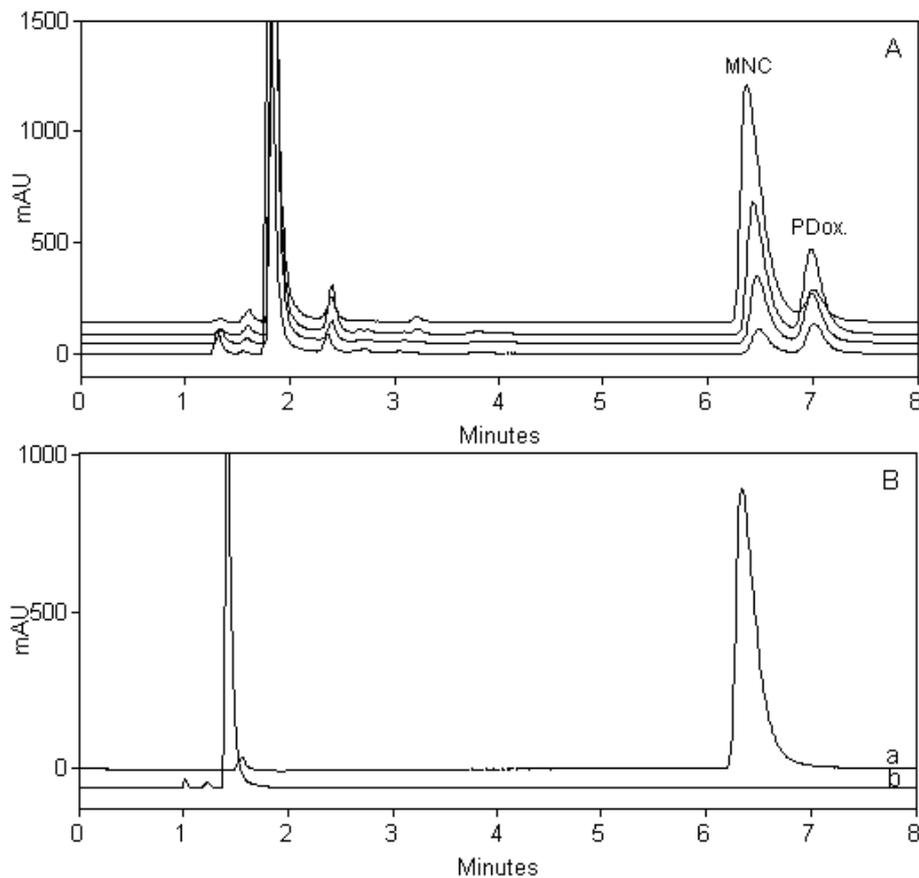


Figura 26 – (A) Cromatogramas das soluções MNC SQR (0,25; 0,5; 1,0 e 1,5 mg/mL) após oxidação com peróxido de hidrogênio (9, 5, 3 e 2% V/V, respectivamente) por 24 horas, com formação do produto de degradação (PDox.). (B) Cromatogramas das soluções MNC SQR não degradada (a) e do branco (b) no estudo de oxidação do fármaco.

A influência da concentração do agente oxidante foi avaliada e o resultado é apresentado na Figura 27. No intervalo de concentração avaliado, observa-se que 500 µl do peróxido de hidrogênio foi o volume que propiciou a formação de uma maior concentração do PDox. para uma mesma quantidade de fármaco testada (2 mg).

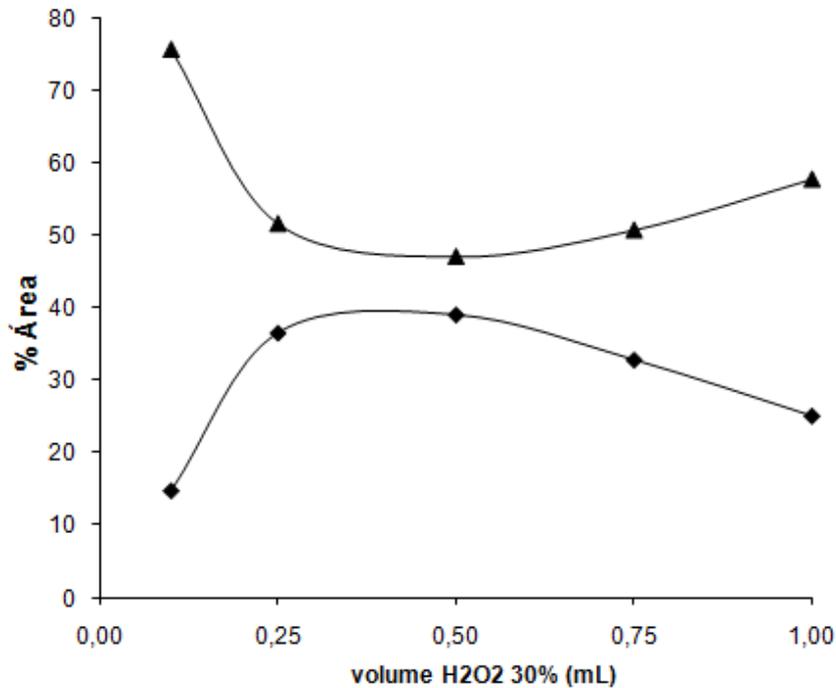


Figura 27 – Influência da concentração do agente oxidante. Formação do produto de degradação majoritário PDox. (◆), após oxidação do MNC SQR 1 mg/mL (▲) por 24 horas. Cada ponto representa a média para a área (%) analisada por CLAE.

#### 5.4.2.1 Cinética da oxidação

De acordo com os resultados preliminares obtidos na oxidação do fármaco com peróxido de hidrogênio, estabeleceu-se que para a determinação da cinética de degradação seriam utilizadas as soluções MNC SQR (500 µg/mL) e alíquota de 500 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30%. No entanto, a reação de oxidação, de acordo com as condições previamente estabelecidas, não apresentou uma relação de decaimento da concentração do fármaco em função do tempo, logo, a ordem de reação não pôde ser estimada. Os resultados obtidos são mostrados abaixo (Tabela 26).

Tabela 30 – Resultados da análise por CLAE da quantidade remanescente de MNC SQR (500 µg/mL em metanol) após oxidação com peróxido de hidrogênio (10%, V/V).

Tempo (h)	Área média do pico (n=3)	DRP (%)	% degradação
0	6222339	0,02	----
2	2229273	4,7	64,17
4	2378857	2,6	61,77
20	2135427	2,3	65,68
24	2316774	1,7	62,77
48	2257884	2,6	63,71

Avaliando-se o resultado apresentado, verifica-se que o período de tempo estipulado foi equivocado, visto que a reação parece ter se esgotado já no primeiro ponto de observação (Figura 28). Por uma questão de prazos, não houve prosseguimento nesta etapa do estudo, entretanto, o próximo passo deveria ser a avaliação da reação numa faixa reduzida de tempo, dentro das duas primeiras horas de oxidação do MNC.

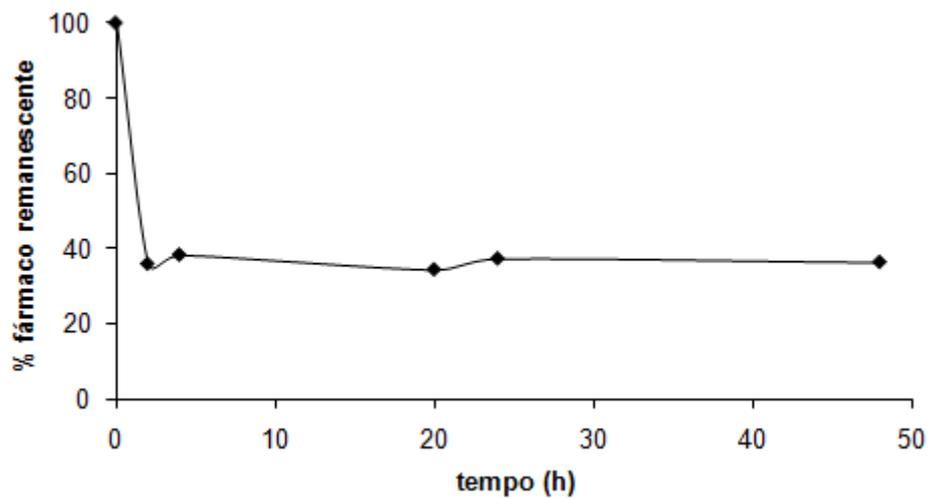


Figura 28 – Representação gráfica da degradação por oxidação do MNC analisado por CLAE.

## 6. CONCLUSÕES

---



- ✓ A avaliação da solubilidade da matéria-prima, determinação do ponto de fusão, termoanálise, poder rotatório específico e espectros na região do IV permitiram a caracterização do MNC SQR.
- ✓ A perda por dessecação do MNC SQR está de acordo com a especificação preconizada em farmacopeias para matérias-primas com baixo teor de umidade.
- ✓ A presença do fármaco na forma farmacêutica cápsula foi assegurada através da identificação do MNC pelos métodos desenvolvidos por CLAE, UV-D<sup>2</sup> e EC.
- ✓ O método desenvolvido por espectrofotometria derivada na região do ultravioleta (UV-D<sup>2</sup>) foi validado dentro das condições estabelecidas, demonstrando ser linear, específico, preciso e exato para a análise quantitativa do MNC na forma farmacêutica cápsula.
- ✓ O método espectrofotométrico UV-D<sup>2</sup> apresenta especificidade na determinação do MNC na presença dos excipientes da formulação farmacêutica, mas não na presença de potenciais produtos de degradação.
- ✓ O método desenvolvido por CLAE para a determinação quantitativa do MNC na forma farmacêutica cápsula foi validado, demonstrando ser linear, específico, preciso, exato e robusto.
- ✓ A análise preliminar da degradação do MNC SQR, frente a diferentes condições de estresse, demonstra que o fármaco em solução foi estável à temperatura, hidrólise ácida e neutra, e também à radiação UV 352 nm.
- ✓ O MNC SQR se mostrou sensível à oxidação e hidrólise alcalina, com o aparecimento de um pico relativo a um produto de degradação majoritário com mesmo tempo de retenção para ambas as condições testadas.
- ✓ A análise preliminar da degradação do MNC na formulação farmacêutica, frente a diferentes condições de estresse, demonstra que o fármaco em solução das cápsulas foi estável à temperatura, hidrólise ácida, alcalina e neutra, e

- também à radiação UV 352 nm, sem redução significativa do teor e sem aparecimento de picos relativos a potenciais produtos de degradação.
- ✓ O MNC na formulação farmacêutica apresentou-se sensível à oxidação, com o aparecimento de um pico relativo a um produto de degradação majoritário.
  - ✓ O método desenvolvido por eletroforese capilar (EC) foi validado dentro das condições estabelecidas, demonstrando ser linear, específico, preciso e exato para a análise quantitativa do MNC na forma farmacêutica cápsula.
  - ✓ A análise comparativa entre os métodos propostos CLAE / UV-D<sup>2</sup> e CLAE / EC não demonstrou haver diferença estatística significativa entre eles, indicando a equivalência entre os mesmos para a determinação quantitativa do MNC nas cápsulas, nas condições estabelecidas.
  - ✓ Os métodos UV-D<sup>2</sup> e CLAE foram revalidados para determinação do MNC no ensaio de dissolução desenvolvido para cápsulas e demonstraram especificidade, linearidade, exatidão e precisão.
  - ✓ A comparação estatística, através do teste *t* de *Student*, do *fator de diferença* ( $f_1$ ) e do *fator de similaridade* ( $f_2$ ), entre os perfis de dissolução obtidos por UV-D<sup>2</sup> e CLAE demonstrou não haver diferença significativa entre os métodos.
  - ✓ Não foi possível estabelecer uma correlação *in vitro* – *in vivo* para MNC cápsulas, tendo em vista as altas solubilidade e provável permeabilidade apresentadas pelo fármaco, podendo ser considerado Classe I, de acordo com o Sistema de Classificação Biofarmacêutico.
  - ✓ A dissolução do MNC cápsulas demonstrou seguir o modelo cinético de Hixson-Crowell e os demais parâmetros cinéticos (ED% e  $t_{80\%}$ ) apresentaram resultados de acordo com as especificações preconizadas para FFSOLI.
  - ✓ O estudo preliminar da influência das condições de armazenamento sobre o perfil de dissolução das cápsulas de MNC demonstrou que tanto o fator tempo, quanto temperatura e umidade podem alterar as características de dissolução do produto acabado.

- ✓ O estudo da fotodegradação para a matéria-prima, exposta à radiação UV 254 nm nas condições estabelecidas, demonstrou que o MNC foi sensível e sofreu degradação, de acordo com os resultados obtidos por CLAE, com redução significativa no teor do fármaco e presença de potenciais produtos de degradação.
- ✓ A reação de fotodegradação do MNC nas condições estabelecidas apresentou cinética de primeira ordem, para exposição do fármaco no estado sólido e solução do conteúdo das cápsulas, enquanto a exposição da solução do fármaco à radiação UV 254 nm demonstrou cinética de ordem zero.
- ✓ O estudo da degradação por oxidação da matéria-prima na presença de peróxido de hidrogênio, nas condições estabelecidas, demonstrou que o MNC, foi sensível e sofreu degradação, de acordo com os resultados obtidos por CLAE, com redução significativa no teor do fármaco e presença de potencial produto de degradação majoritário.
- ✓ Nas condições propostas, não foi possível estabelecer a ordem de reação para a degradação do MNC por oxidação.



## 7. REFERÊNCIAS

---



ACD/Labs Online, version 8.0. Disponível em: <<http://ilab.acdlabs.com>> Acesso em 2009.

AHUJA, S. *Impurities Evaluation of Pharmaceuticals*. New York: Marcel Dekker, 1998.

AMIDON, G.L.; LENNERNÄS, H.; SHAH, V.; CRISON, J.R. A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of *in vitro* drug product dissolution and *in vivo* bioavailability. *Pharmaceutical Research*. v. 12(3), p. 413-419, 1995.

ANDERSON, I.M.; FERRIER, I.N.; BALDWIN, R.C.; COWEN, P.J.; HOWARD, L.; LEWIS, G.; MATTHEWS, K.; MCALLISTER-WILLIAMS, R.H.; PEVELER, R.C.; SCOTT, J. e TYLEE, A. Evidence-based guidelines for treating depressive disorders with antidepressants: A revision of the 2000 British Association for Psychopharmacology guidelines. *Journal of Psychopharmacology*. v. 22(4), pp 343-396, 2008. DOI: 10.1177/0269881107088441

BAKSHI, M. & SINGH, S. Development of validated stability-indicating assay methods-critical review. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 28, pp 1011-1040, 2002.

BALDESSARINI, R.J. Fármacos com ações no sistema nervoso central – Tratamento farmacológico da depressão e dos transtornos da ansiedade In: GOODMAN & GILMAN. *As Bases Farmacológicas da Terapêutica*. 11° ed. Rio de Janeiro: Mcgraw-Hill, cap.17, 2006.

BALDESSARINI, R.J. Fármacos e o Tratamento dos Distúrbios Psiquiátricos – Depressão e distúrbios de ansiedade In: GOODMAN & GILMAN. *As Bases Farmacológicas da Terapêutica*. 10° ed. Rio de Janeiro: Mcgraw-Hill, cap.19, 2001.

BRASIL Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Diário Oficial da União, Brasília, 02 jun. 2003.

BRASIL Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 310, de 01 de setembro de 2004. Guia para realização do estudo e elaboração do relatório de equivalência farmacêutica e perfil de dissolução. Diário Oficial da União, Brasília, 03 set. 2004.

BRASIL Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 1, de 29 de julho de 2005. Guia para a realização de estudos de estabilidade. Diário Oficial da União, Brasília, 01 agosto de 2005.

BRITAIN, H.G. Validação de métodos analíticos não cromatográficos. *Pharmaceutical Thechnology*. v. 2, pp 4-9, junho 1998.

BRITAIN, H.G.; BOGDANOWICH, S.J.; BUGAY, D.E.; DEVICENTIS, J.; LEWEN, G.; NEWMAN, A.W. Physical characterization of pharmaceutical solids. *Pharmaceutical Research*, v. 8(8), pp 963-973, 1991.

BUDAVARI, S. *The Merck Index*. 13° ed. Rahway: Merck Research Laboratories, p 6220, 2001.

CACCIA, S. Metabolism of the Newer Antidepressants an Overview of the Pharmacological and Pharmacokinetic Implications. *Clinical Pharmacokinetics*. v. 34(4), pp 281-302, 1998.

CARVILLE, S.F.; ARENDT-NIELSEN, S.; BLIDDAL, H.; BLOTMAN, F.; BRANCO, J.C.; BUSKILLA, D.; DA SILVA, J.A.P.; DANNESKIOLD-SAMSØE, B.; DINCER, F.; HENRIKSSON, C.; HENRIKSSON, K.; KOSEK, E.; LONGLEY, K.; MCCARTHY, G.M.; PERROT, S.; PUSZCZEWICZ, M.J.; SARZI-PUTTINI, P., SILMAN, A.; SPÄTH, M.; CHOY, E.H. EULAR evidence based recommendations for the management of fibromyalgia syndrome. *Ann Rheum Dis*. published online 17 Sep 2007. DOI:10.1136/ard.2007.071522

CAZZOLA, M. ; SARZI-PUTTINI, P.; BUSKILA, D.; ATZENI, F. La terapia farmacologica della fibromialgia. *Reumatismo*. v. 59(4), pp 280-291, 2007.

CDER. Center for Drug Evaluation and Research. Reviewer Guidance: Validation of Chromatographic Methods, 1994. Disponível em: <<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM134409.pdf>> Acesso em janeiro de 2010.

CHEN, C.; DYCK, B.; FLECK, B.A.; FOSTER, A.C.; GREY, J.; JOVIC, F.; MESLEH, M.; PHAN, K.; TAMIYA, J.; VICKERS, T.; ZHANG, M. Studies on the SAR and pharmacophore of milnacipran derivatives as monoamine transporter inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. v. 18, pp 1346–1349, 2008.

CID – Classificação Estatística Internacional de Doenças e Problemas Relacionados à Saúde. 10º Rev. v 1. Centro Colaborador da OMS para a Classificação de Doenças em Português (Centro Brasileiro de Classificação de Doenças). Disponível em <<http://www.datasus.gov.br/cid10/webhelp/cid10.htm> > Acesso em abril de 2008.

CIPRIANI, A.; FURUKAWA, T.A.; SALANTI, G.; GEDDES, J.R.; HIGGINS, J.P.T.; CHURCHILL, R.; WATANABE, N.; NAKAGAWA, A.; OMORI, I.M.; MCGUIRE, H.; TANSELLA, M.; BARBUI, C. Comparative efficacy and acceptability of 12 new-generation antidepressants: a multiple-treatments meta-analysis. *Lancet*, v. 373, pp 746–58, 2009. DOI:10.1016/S0140-6736(09)60046-5

CITAC/EURACHEM. *Guia para Qualidade em Química Analítica*. UNESCO/ANVISA. edição 2002.

CLAS, S.D.; DALTON, C.R.; HANCOCK, B.C. Differential scanning calorimetry: applications in drug development. *Pharmaceutical Science & Technology Today*, v. 2(8), pp 311-320, 1999.

CLAUW, D.J.; MEASE, P.; PALMER, R.H.; GENDREAU, R.M. e WANG, Y. Milnacipran for the treatment of fibromyalgia in adults: a 15-week, multicenter, randomized, double blind, placebo-controlled, multiple-dose clinical trial. *Clinical Therapeutics*. v. 30(11), pp 1988-2004, 2008. DOI:10.1016/J.clinthera.2008.11.009 0149-2918/\$32.00

CLURCZAK, E.W. Validação de métodos em espectroscopia para análises farmacêuticas. *Pharmaceutical Technology*. V. 2, pp 22-28, 1998.

COSTA, P. e LOBO, J.M.S. Modeling and comparison of dissolution profiles. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. v. 13, pp 123-133, 2001.

CROFFORD, L.J. Pain management in fibromyalgia. *Current Opinion in Rheumatology*. v. 20, pp 246–250, 2008.

CYPRESS Bioscience, Inc. Savella™ Prescribing Information. San Diego, CA USA, 2009. Disponível em: <[http://www.frx.com/pi/Savella\\_pi.pdf](http://www.frx.com/pi/Savella_pi.pdf)> Acesso em janeiro de 2010.

DEL PORTO, J.A. Depressão - Conceito e diagnóstico. *Revista Brasileira de Psiquiatria*. v. 21, 1999.

DYCK, B.; TAMIYA, J.; JOVIC, F.; PICK, R.R.; BRADBURY, M.J.; O'BRIEN, J.; WEN, J.; JOHNS, M.; MADAN, A.; FLECK, B.A.; FOSTER, A.C.; LI, B.; ZHANG, M.; TRAN, J.A.; VICKERS, T.; GREY, J.; SAUNDERS, J. e CHEN, C. Characterization of thien-2-yl 1S,2R-milnacipran analogues as potent norepinephrine/serotonin transporter inhibitors for the treatment of neuropathic pain. *Journal of Medicinal Chemistry*. v. 51(22), pp 7265-7272, 2008. DOI: 10.1021/jm8009537

F. Bras. IV. FARMACOPÉIA BRASILEIRA. Parte I. 4 ed. São Paulo: Atheneu, 1988.

FDA. Guidance for Industry: Dissolution testing of immediate release solid oral dosage forms. Rockville, MD, 1997.

FDA. Guidance for Industry: Submitting Documentation for the Stability of Human Drugs and Biologics. Rockville, MD, 1987.

FOREST LABORATORIES. Disponível em: <<http://www.frx.com/news/PressRelease.aspx?ID=1244788>> Acesso em janeiro de 2009.

GOLDENBERG, D.L.; BURCKHARDT, C.; CROFFORD, L. Management of Fibromyalgia Syndrome. *JAMA*, v. 292(19), pp 2388-2395, 2004.

HACKMANN, E.R.M.; BENETON, S.A.; SANTORO, M.I.R.M. Espectrofotometria derivada na análise de fármacos em medicamentos. *Revista Portuguesa de Farmácia*, v. XLI (1), pp 7-13, 1991.

HARRIS, R.E.; WILLIAMS, D.A.; MCLEAN, S.A.; SEN, A.; HUFFORD, M.; GENDREAU, R.M.; GRACEY, R.H. e CLAUW, D.J. Characterization and consequences of pain variability in individuals with fibromyalgia. *Arthritis & Rheumatism*. v. 52(11), pp 3670–3674, 2005. DOI 10.1002/art.21407

HARTEN, P. Fibromyalgiesyndrom. *Zeitschrift für Rheumatologie*. v. 67, pp 75–82, 2008. DOI 10.1007/s00393-007-0216-y

HOFFMAN, D.L. & DUKES, E. M. The health status burden of people with fibromyalgia: a review of studies that assessed health status with the SF-36 or the SF-12. *International Journal of Clinical Practice*. v. 62(1), pp 115-126, 2008.

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.

ICH – Harmonised Tripartite Guideline. Validation of Analytical Procedures: Text And Methodology, Q2(R1), 2005.

KAZUTA, Y.; TSUJITA, R.; OGAWA, K.; HOKONOHARA, T.; YAMASHITA, K.; MORINO, K.; MATSUDA, A. e SHUTO, S. Synthesis of (1S,2R)-1-phenyl-2-[(S)-1-aminopropyl]-N,N-diethylcyclopropanecarboxamide (PPDC) derivatives modified at the carbamoyl moiety as a new class of NMDA receptor antagonists. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. v. 10, pp 1777–1791, 2002b.

KAZUTA, Y.; TSUJITA, R.; UCHINO, S.; KAMIYAMA, N.; MOCHIZUKI, D.; YAMASHITA, K.; OHMORI, Y.; YAMASHITA, A.; YAMAMOTO, T.; KOHSAKA, S.; MATSUDA, A. e SHUTO, S. Synthesis of (1S,2R)-1-phenyl-2-[(S)-1-aminoalkyl]-N,N-diethylcyclopropanecarboxamides as novel NMDA receptor antagonists having a unique NMDA receptor subtype selectivity. *Journal of the Chemical Society Perkin Transactions*, v. 1, pp 1199–1212, 2002c. DOI: 10.1039/b111540p

KAZUTA, Y.; TSUJITA, R.; YAMASHITA, K.; UCHINO, S.; KOHSAKA, S.; MATSUDA, A. e SHUTO, S. Synthesis of derivatives of (1S,2R)-1-phenyl-2-[(S)-1-aminopropyl]-N,N-diethylcyclopropanecarboxamide (PPDC) modified at the 1-aromatic moiety as novel NMDA receptor antagonists: the aromatic group is essential for the activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. v. 10, pp 3829–3848, 2002a.

KIBBE, A.H.; WADE, A.; WELLER, P.J. (eds) *Handbook of Pharmaceutical Excipients*, 3<sup>rd</sup> ed, Washington London: American Pharmaceutical Association: Pharmaceutical Press, p. 665, 2000.

KING, T.; RAO, S.; VANDERAH, T.; CHEN, Q.; VARDANYAN, A.; PORRECA, F. Differential blockade of nerve injury–induced shift in weight bearing and thermal and tactile hypersensitivity by milnacipran. *The Journal of Pain*, v. 7(7) pp 513-520, 2006.

KITAICHI, Y.; INOUE, T.; IZUMI, T.; NAKAGAWA, S.; TANAKA, T.; MASUI, T.; KOYAMA, T. Effect of co-administration of a serotonin noradrenaline reuptake inhibitor and a dopamine agonist on extracellular monoamine concentrations in rats. *European Journal of Pharmacology* 584, pp 285–290, 2008. DOI:10.1016/j.ejphar.2008.02.019

KLICK, S.; MUIJSELAAR, P.G.; WATERVAL, J.; EICHINGER, T.; KORN, C.; GERDING, T.K.; DEBETS, A.J.; SÄNGER-VAN DE GRIEND, C.; VAN DEN BELD, C.; SOMSEN, G.W.; DE JONG, G.J. Toward a Generic Approach for Stress Testing of Drug Substances and Drug Products. *Pharmaceutical Technology*, pp 48-66, 2005.

KOROLKOVAS, A. & BURCKHALTER, J.H. *Química Farmacêutica*, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 792, 2008.

KRISHNAN, V. & NESTLER, E.J. The molecular neurobiology of depression. *Nature*. v. 455, pp 894-902, 2008. DOI:10.1038/nature07455

- KROENKE, K.; BAIR, M.J.; DAMUSH, T.M.; WU, J.; HOKE, S.; SUTHERLAND, J.; TU, W. Optimized Antidepressant Therapy and Pain Self-management in Primary Care Patients With Depression and Musculoskeletal Pain A Randomized Controlled Trial. *JAMA*. v. 301(20), pp 2099-2110, 2009. DOI:10.1001/jama.2009.723
- LABAT, L.; DEVEAUX, M.; DALLET, P.; DUBOST, J.P. Separation of new antidepressants and their metabolites by micellar electrokinetic capillary chromatography. *Journal of Chromatography B*. v. 773, pp 17–23, 2002.
- LACASSIE, E.; GAULIER, J.M.; MARQUET, P.; RABATEL, J.F.; LACHÂTRE, G. Methods for the determination of seven selective serotonin reuptake inhibitors and three active metabolites in human serum using high-performance liquid chromatography and gas chromatography. *Journal of Chromatography B*, v. 742, pp 229–238, 2000.
- LATALOVA, K. & PIDRMAN, V. Milnacipran in the treatment of depressive patients older 60 years. *Abstracts for Poster Session II / European Psychiatry*. v. 23, pp S192-S303, 2008.
- LAWSON, K. Are complex therapies required as pharmacological treatments of fibromyalgia? *Future Rheumatology*. v. 2(6), pp 599-605, 2007.
- LECOEUR-LORIN, M.; DELÉPÉE, R.; RIBET, J.-P. E MORIN, P. Chiral analysis of milnacipran by a nonchiral HPLC - circular dichroism: improvement of the linearity of dichroic response by temperature control *Journal of Separation Science*. v. 31(16-17), pp 3009-3014, 2008. DOI: 10.1002/jssc.200800291
- LEE, S.L.; RAW, A.S.; YU, L. Dissolution Testing. In *Biopharmaceutics Applications in Drug Development*, edited by Krishna, R. and Yu, L. USA, Springer, XXII, p 396, 2008.
- MANDRIOLI, R. & RAGGI, M.A. Advances in the enantioseparation of second-generation antidepressant drugs by electrodriven methods. *Electrophoresis*. v. 27(1), pp 213-221, 2006. DOI: 10.1002/elps.200500297
- MARQUES, M.R.C. e BROWN, W. Desenvolvimento e validação de métodos de dissolução para formas farmacêuticas sólidas orais. *Revista Analytica*. v. 1, pp 48-51, 2002.
- MATSUMOTO, M.; TACHIBANA, K.; TOGASHI, H.; TAHARA, K.; KOJIMA, T.; YAMAGUCHI, T.; YOSHIOKA, M. Chronic treatment with milnacipran reverses the impairment of synaptic plasticity induced by conditioned fear stress. *Psychopharmacology*. v. 179, pp 606–612, 2005. DOI 10.1007/s00213-004-2094-1
- MEDSCAPE CME. Disponível em: <<http://cme.medscape.com/viewarticle/587170>> Acesso em janeiro de 2009.
- MIYAGI, H.; KAJIWARA, M.; ONISHI, H.; YAMAGUCHI, Y.; WATANABE, T. Improvement of a multi-target screening analysis for drugs using a QTRAP liquid chromatography/tandem mass spectrometry system. *Rinsho Byori (The Japanese journal of clinical pathology)*. v. 55(4), pp 309-18, 2007. NCBI – PubMed – Medline, 2008. Resumo.

MIZUKAMI, K.; TANAKA, Y. e ASADA, T. Efficacy of milnacipran on the depressive state in patients with Alzheimer's disease. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*. v. 30, pp 1342–1346, 2006. DOI:10.1016/j.pnpbp.2006.03.004

MORET, C. Current therapy and future treatment strategies for depression. *Journal of Psychopharmacology*. v. 17(3), pp 337-341, 2003. DOI: 10.1177/02698811030173017

MORISHITA, S.; ARITA, S. Differential effects of milnacipran, fluvoxamine and paroxetine for depression, especially in gender. *European Psychiatry*. v. 18, pp 418-420, 2003a.

MORISHITA, S.; ARITA, S. Differential effects of milnacipran, fluvoxamine and paroxetine for inhibited and agitated depression. *European Psychiatry*. v. 19, pp 450–451, 2004.

MORISHITA, S.; ARITA, S. The clinical use of milnacipran for depression. *European Psychiatry*. v. 18, pp 34–35, 2003b.

NLM – ChemIDPlus Advanced. Disponível em:  
<<http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/>> Acesso em abril de 2008.

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

O'HAVER, T.C. e BEGLEY, T. Signal-to-noise ratio in higher order derivative spectrometry. *Analytical Chemistry*, v. 53(12), pp 1876-1878, 1981.

OHMORI, Y.; YAMASHITA, A.; TSUJITA, R.; YAMAMOTO, T.; TANIUCHI, K.; MATSUDA, A. e SHUTO, S. A method for designing conformationally restricted analogues based on allylic strain: synthesis of a novel class of noncompetitive NMDA receptor antagonists having the acrylamide structure. *Journal of Medicinal Chemistry*. v. 46(25), pp 5326-5333, 2003.

OKUMURA, K. & FURUKAWA, T.A. Remission Rates with Milnacipran 100 Mg/Day and 150 Mg/Day in the Long-Term Treatment of Major Depression. *Clinical Drug Investigation*. v. 26 (3), pp 135-142, 2006

ONO, S.; OGAWA, K.; YAMASHITA, K.; YAMAMOTO, T.; KAZUTA, Y.; MATSUDA, A. e SHUTO, S. Conformational analysis of the NMDA receptor antagonist (1S,2R)-1-phenyl-2-[(S)-1-aminopropyl]-N,N-diethylcyclopropanecarboxamide (PPDC) designed by a novel conformational restriction method based on the structural feature of cyclopropane ring. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*. v. 50(7), pp 966—968, 2002.

OPAS / OMS / Brasil – 2004. Disponível em  
<[http://www.opas.org.br/medicamentos/site/UploadArq/HSE\\_URM\\_DEP\\_0404.pdf](http://www.opas.org.br/medicamentos/site/UploadArq/HSE_URM_DEP_0404.pdf)>  
Acesso em novembro de 2006.

PAPAKOSTAS, G.I.; THASE, M.E.; FAVA, M.; NELSON, J.C. e SHELTON, R.C. Are Antidepressant Drugs That Combine Serotonergic and Noradrenergic Mechanisms of Action More Effective Than the Selective Serotonin Reuptake Inhibitors in Treating Major Depressive Disorder? A Meta-analysis of Studies of Newer Agents. *Biological Psychiatry*, v. 62, pp 1217–1227, 2007. DOI:10.1016/j.biopsych.2007.03.027

- PASCHOAL, L.R.; FERREIRA, W.A.; PRADO, M.R.D.; VILELA, A.P.O. Aplicação do método da espectrofotometria de derivadas na identificação e doseamento simultâneo de sistemas multicomponentes. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 39(1), pp 105-113, 2003.
- PATTI, A.; PEDOTTI, S.; SANFILIPPO, C. Chiral HPLC analysis of milnacipran and its FMOC-derivative on cellulose-based stationary phases. *Chirality*. v. 20(2), pp 63-8, 2008.
- PAVIA, D.L.; LAMPMAN, G.M.; KRIZ, G.S. *Introduction to spectroscopy: a guide for students of organic chemistry*. 3<sup>rd</sup> ed. Melbourne: Brooks/Cole, Cap.2, p. 13-101, 2001.
- PEREZ, M.; PAUWELS, P.J.; PALLARD-SIGOGNEAU, I.; FOURRIER, C.; CHOPIN, P.; PALMIER, C.; COLOVRAY, V. e HALAZY, S. Design and synthesis of new potent, silent 5-HT<sub>1A</sub> antagonists by covalent coupling of aminopropanol derivatives with selective serotonin reuptake inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. v. 8, pp 3423-3428, 1998.
- PRETSCH, E.; BÜHLMANN, P.; AFFOLTER, CH. *Structure Determination of Organic Compounds: Tables of Spectral Data*. 3rd. ed. Springer-Verlag: Berlin, 2000.
- PUOZZO, C.; FILAQUIER, C.; ZORZA, G. Determination of milnacipran, a serotonin and noradrenaline reuptake inhibitor, in human plasma using liquid chromatography with spectrofluorimetric detection. *Journal of Chromatography B*. v. 806, pp 221–228, 2004.
- PUOZZO, C.; LENS, S.; REH, C.; MICHAELIS, K.; ROSILLON, D.; DEROUBAIX, X.; DEPRez, D. Lack of Interaction of Milnacipran with the Cytochrome P450 Isoenzymes Frequently Involved in the Metabolism of Antidepressants. *Clinical Pharmacokinetics*. v. 44(9), pp 977-988, 2005.
- PUOZZO, C.; PANCONI, E.; DEPRez, D. *International Clinical Psychopharmacology*. v. 17(S25), Jun.2002. ISI Web of Knowledge - Web of Science®, 2008, Resumo.
- RAO, S.G.; GENDREAU, J.F.; KRANZLER, J.D. Understanding the Fibromyalgia Syndrome. *Psychopharmacol Bulletin*. v. 40(4), pp 24-56, 2008.
- ROCHA, F.R.P. & TEIXEIRA, L.S.G. Estratégias para aumento de sensibilidade em espectrofotometria UV-VIS. *Química Nova*, v. 27(5), pp 807-812, 2004.
- ROCHE. Dalcipran® Bula. Buenos Aires, Argentina, 2001.
- ROCHE. Ixel® Bula. Rio de Janeiro, Brasil, 2008. 7f. Disponível em: <[http://www.roche.com.br/Products/ixel\\_PT.htm](http://www.roche.com.br/Products/ixel_PT.htm)> Acesso em abril de 2008.
- ROJAS, F.S.; OJEDA, C.B.; CANO PAVON, J.M. Derivative ultraviolet-visible region absorption spectrophotometry and its analytical applications. *Talanta*, v. 35(10), pp 753-761, 1988.

ROOKS, D.S. Fibromyalgia Treatment Update. *Current Opinion in Rheumatology*. v. 19(2), pp 111-117, 2007.

ROUILLON, F.; BERDEAUX, G.; BISSERBE, J.C.; WARNER, B.; MESBAH, M.; SMADJA, C.; CHWALOW, J. Prevention of recurrent depressive episodes with milnacipran: consequences on quality of life. *Journal of Affective Disorders*. v. 58, pp 171–180, 2000.

SAFAK, C.; UÇAKTÜRK, E. Determination of milnacipran in human plasma using GC-MS. *Chromatographia*. v. 72, pp 111-119, 2010.

SATO, S.; YAMAKAWA, Y.; TERASHIMA, Y.; OHTA, H. e ASADA, T. Efficacy of milnacipran on cognitive dysfunction with post-stroke depression: Preliminary open-label study. *Psychiatry and Clinical Neurosciences*. v. 60, pp 584–589, 2006. DOI:10.1111/j.1440-1819.2006.01562.x

SECHTER, D.; VANDEL, P.; WEILLER, E.; PEZOUS, N.; CABANAC, F.; TOURNOUX A. A comparative study of milnacipran and paroxetine in outpatients with major depression. *Journal of Affective Disorders*. v. 83, pp 233–236, 2004.

SHINKAI, K.; YOSHIMURA, R.; UEDA, N.; OKAMOTO, K.; NAKAMURA, J. Associations between baseline plasma MHPG (3-methoxy-4-hydroxyphenylglycol) levels and clinical responses with respect to milnacipran versus paroxetine treatment. *Journal of Clinical Psychopharmacology*. v. 24 (1), pp 11-17, 2004.

SHINOZUKA, T.; TERADA, M.; TANAKA, E. Solid-phase extraction and analysis of 20 antidepressant drugs in human plasma by LC/MS with SSI method. *Forensic Science International*. v. 162, pp 108–112, 2006.

SHUTO, S.; ONO, S.; HASE, Y.; KAMIYAMA, N. e MATSUDA, A. Synthesis of (+)- and (-)-milnaciprans and their conformationally restricted analogs. *Tetrahedron Letters*, v. 37(5), pp 641-644, 1996a.

SHUTO, S.; ONO, S.; HASE, Y.; KAMIYAMA, N.; TAKADA, H.; YAMASHITA, K. e MATSUDA, A. Conformational restriction by repulsion between adjacent substituents on a cyclopropane ring: design and enantioselective synthesis of 1-phenyl-2-(1-aminoalkyl)-*N,N*-diethylcyclopropanecarboxamides as potent NMDA receptor antagonists. *The Journal of Organic Chemistry*. v. 61, pp 915-923, 1996b.

SHUTO, S.; ONO, S.; IMOTO, H.; YOSHII, K.; MATSUDA, A. Synthesis and biological activity of conformationally restricted analogues of milnacipran: (1*S*,2*R*)-1-phenyl-2-[(*R*)-1-amino-2-propynyl]-*N,N*-diethylcyclopropanecarboxamide is a novel class of NMDA receptor channel blocker. *J. Med. Chem.* v. 41, pp 3507-3514, 1998.

SIGMA ALDRICH. Disponível em:

<<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/search/ProductDetail/SIGMA/M1318>> Acesso em abril de 2008.

SILVA, K.E.R.; ALVES, L.D.S.; SOARES, M.F.R.; PASSOS, R.C.S.; FARIA, A.R.; ROLIM NETO, P.J. Modelos de Avaliação da Estabilidade de Fármacos e Medicamentos para a Indústria Farmacêutica. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*. v. 30(2), pp 129-135, 2009.

- SILVERSTEIN, R.M.; WEBSTER, F.X. e KIEMLE, D.J. *Identificação espectrométrica de compostos orgânicos*. 7 ed. Rio de Janeiro: LTC, Cap. 2, p. 70-122, 2007.
- SKOOG, D.A.; HOLLER, F.J.; NIEMAN, T.A.. *Princípios de Análise Instrumental*. 5.ed. Porto Alegre: Bookman, p. 836, 2002.
- SPANEMBERG, L.; JURUENA, M.F. Distímia: características históricas e nosológicas e sua relação com transtorno depressivo maior. *Revista de Psiquiatria do Rio Grande do Sul*. v. 26(3), pp 300-311, 2004.
- STUART, B. *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications*, 1<sup>th</sup> ed., England: John Wiley & Sons, p. 203, 2004.
- SUAREZ-ROCA, H.; QUINTERO, L.; ARCAYA, J.L.; MAIXNER, W.; RAO, S.G. Stress-induced muscle and cutaneous hyperalgesia: differential effect of milnacipran. *Physiology & Behavior*. v. 88, pp 82–87, 2006.
- SUGAWARA, Y.; HIGUCHI, H.; YOSHIDA, K.; TAKAHASHI, H.; KAMATA, M.; NAITO, S.; SATO, K.; SHIMIZU, T. Response Rate Obtained Using Milnacipran Depending on the Severity of Depression in the Treatment of Major Depressive Patients. *Clin Neuropharmacol*. v. 29 (1), pp 6-9, 2006.
- SWARTZ, M.E. & KRULL, I.S. Validação de métodos cromatográficos. *Pharmaceutical Thechnology*. v. 2, pp 12-20, 1998.
- TACHIBANA, K.; MATSUMOTO, M.; KOSEKI, H.; TOGASHI, H.; KOJIMA, T.; MORIMOTO, Y.; YOSHIOKA, M. Electrophysiological and neurochemical characterization of the effect of repeated treatment with milnacipran on the rat serotonergic and noradrenergic systems. *Journal of Psychopharmacology*. v. 20(4), pp 562–569, 2006.
- TALSKY, G.; MAYRING, L.; KREUZER, H. High-resolution, higher-order UV/VIS derivative spectrophotometry. *Angewandte Chemie International Edition in English*, v. 17(11), pp 785-874, 1978.
- TAMIYA, J.; DYCK, B.; ZHANG, M.; PHAN, K.; FLECK, B.A.; APARICIO, A.; JOVIC, F.; TRAN, J.A.; VICKERS, T.; GREY, J.; FOSTER, A.C. e CHEN, C. Identification of 1S,2R-milnacipran analogs as potent norepinephrine and serotonin transporter inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. v. 18, pp 3328–3332, 2008. DOI:10.1016/j.bmcl.2008.04.025
- TANI, K.; TAKEI, N.; KAWAI, M.; SUZUKI, K.; SEKINE, Y.; TOYODA, T.; MINABE, Y.; MORI, N. Augmentation of milnacipran by risperidone in treatment for major depression. *International Journal of Neuropsychopharmacology*. v. 7, pp 55–58, 2004. DOI: 10.1017/S146114570300381X
- TAVERNIERS, I.; DE LOOSE, M.; VAN BOCKSTAELE, E. Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance. *Trends in Analytical Chemistry*. v. 23(8), pp 535-552, 2004.

- TEIXEIRA, M.J.; TEIXEIRA, W.G.J.; SANTOS, F.P.S.; DE ANDRADE, D.C.A.; BEZERRA, S.L.; FIGUEIRÓ, J.B.; OKADA, M. Epidemiologia clínica da dor músculo-esquelética. *Rev. Med.* v. 80(1), pp 1-21, 2001.
- TOURNEL, G.; HOUDRET, N.; HÉDOUIN, V.; DEVEAUX, M.; GOSSET, D.; LHERMITTE, M. High-performance liquid chromatographic method to screen and quantitate seven selective serotonin reuptake inhibitors in human serum. *Journal of Chromatography B.* v. 761, pp 147–158, 2001.
- USP 32. The United States Pharmacopoeia. 32<sup>th</sup> ed. Rockville: United States Pharmacopoeial Convention, 2009.
- VADAS, E.B. Stability of pharmaceutical products. In: GENARO, A.R. (Ed) *Remington. The Science and Practice of Pharmacy.* 20<sup>o</sup> ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, pp 980-985, 2000.
- VICKERS, T.; DYCK, B.; TAMIYA, J.; ZHANG, M.; JOVIC, F.; GREY, J.; FLECK, B.A.; APARICIO, A.; JOHNS, M.; JIN, L.; TANG, H.; FOSTER, A.C. e CHEN, C. Studies on a series of milnacipran analogs containing a heteroaromatic group as potent norepinephrine and serotonin transporter inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters.* v. 18, pp 3230–3235, 2008. DOI:10.1016/j.bmcl.2008.04.045
- WATANABE, M.; KAZUTA, Y.; HAYASHI, H.; YAMADA, S.; MATSUDA, A. e SHUTO, S. Stereochemical diversity-oriented conformational restriction strategy. development of potent histamine H3 and/or H4 receptor antagonists with an imidazolylcyclopropane structure. *Journal of Medicinal Chemistry.* v. 49(18), pp 5587-5596, 2006.
- WATSON, D. G. *Pharmaceutical analysis: a textbook for pharmacy students and pharmaceutical chemists.* 2th. ed., Edinburgh: Elsevier Churchill Livingstone, 2005.
- WEIDEBACH, W.F. Fibromialgia: evidências de um substrato neurofisiológico. *Rev Assoc Med Bras.* v. 48(4), pp 275-96, 2002.
- WHO. Disponível em:  
<[http://www.who.int/mental\\_health/management/depression/definition/en/](http://www.who.int/mental_health/management/depression/definition/en/)> Acesso em novembro de 2006.
- WIKIMEDIA COMMONS. Disponível em:  
<[http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Milnacipran\\_Four\\_Stereoisomers\\_Structural\\_Formulae.png](http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Milnacipran_Four_Stereoisomers_Structural_Formulae.png)> Acesso em janeiro de 2010.
- WONG, M.-L. & LICINIO, J. From monoamines to genomic targets: a paradigm shift for drug discovery in depression. *Nature Reviews Drug Discovery.* v. 3, pp 136-151, 2004. DOI:10.1038/nrd1303
- YAMAGUCHI, K.; KAZUTA, Y.; HIRANO, K.; YAMADA, S.; MATSUDA, A. e SHUTO, S. Synthesis of 1-arylpiperazyl-2-phenylcyclopropanes designed as antidopaminergic agents: cyclopropane-based conformationally restricted analogs of haloperidol. *Bioorganic & Medicinal Chemistry.* v. 16, pp 8875–8881, 2008. DOI:10.1016/j.bmc.2008.08.061

YAMAKAWA, Y.; SATOH, S.; SAWA, S.; OHTA, H.; ASADA, T. Efficacy of milnacipran on poststroke depression on inpatient rehabilitation. *Psychiatry and Clinical Neurosciences*. v. 59, pp 705–710, 2005.

YOSHIDA, K.; TAKAHASHI, H.; HIGUCHI, H.; KAMATA, M.; ITO, K.-I.; SATO, K.; NAITO, S.; SHIMIZU, T.; ITOH, K.; INOUE, K.; SUZUKI, T.; NEMEROFF, C.B. Prediction of Antidepressant Response to Milnacipran by Norepinephrine Transporter Gene Polymorphisms. *The American Journal of Psychiatry*. v. 161, pp 1575–1580, 2004.

YOSHIOKA, S. e STELLA, V.J. *Stability of Drugs and Dosage Forms*. New York, Kluwer Academic Publishers, 2002.



## 8. ANEXOS

---



# Comparative Validation Study to Assay Milnacipran Hydrochloride in Capsules by a Stability-Indicating LC and a Second Order Derivative UV Spectroscopic Methods

Carolina Lupi Dias\*, Lisiane Bajerski, Rochele Cassanta Rossi, Ana Maria Bergold and Pedro Eduardo Fröhlich

Graduate Program in Pharmaceutical Sciences, College of Pharmacy, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Avenida Ipiranga, 2752/704, Porto Alegre / RS CEP 90610-000, Brazil

## Abstract

A selective stability-indicating LC method and a second order derivative UV spectroscopic method (UV-D<sup>2</sup>) were developed to assay milnacipran in pharmaceutical formulation. The LC method was developed with a Nucleosil C8 analytical column and a mobile phase consisting of acetonitrile, water and triethylamine (at 210 nm). The validation of UV-D<sup>2</sup> (zero-crossing method) was based on recording the second-derivative spectra for milnacipran hydrochloride at 268.5 nm of its solutions in 0.1 N HCl and the parameters specificity, linearity, precision, and accuracy were evaluated to both methods. The linear dynamic range was 20–100 µg·mL<sup>-1</sup> (R<sup>2</sup> ≥ 0.999). The validation data showed that both methods are reproducible, providing an accurate (98.5% to 101.6%) and precise (RSD ≤ 1.0%) quantitation of milnacipran in capsules. The methods proposed showed satisfactory results and were statistically equivalent.

**Keywords:** Milnacipran capsules; Stability-indicating liquid chromatography; Derivative UV spectroscopy; Validation; Quality control

## Introduction

Milnacipran is an antidepressant drug and it is available in some European Countries and in Japan for the treatment of depression. Recently, it was approved by the Food and Drug Administration (FDA) for the management of fibromyalgia syndrome, characterized by widespread pain and decreased physical function.

Milnacipran hydrochloride (Figure 1) is a racemic mixture of (±)-[1RS,2SR]-2-(aminomethyl)-N,N-diethyl-1-phenylcyclopropanecarboxamide hydrochloride; CAS 101152-94-7; mol. formula C<sub>15</sub>H<sub>22</sub>N<sub>2</sub>O·HCl; mol. wt. 282.81 [1,2]. This agent is unique among clinically available dual-reuptake inhibitors antidepressants in its preferential blockade of norepinephrine (NE) reuptake over serotonin (SER) reuptake and minimal activity at other receptors or transporters. This profile is in contrast to those of SER-NE reuptake inhibitors (SNRI) (e.g., venlafaxine and duloxetine), where SER reuptake is preferentially blocked, or NE-specific agents (noradrenergic reuptake inhibitors [NARIs]) (e.g., reboxetine) in which the reuptake of NE is blocked almost exclusively [3,4].

Some liquid chromatographic (LC) methods for determination of milnacipran combined with other antidepressants in human plasma have already been published [5-9]. A micellar electrokinetic capillary chromatographic method was developed for separation and determination of antidepressants and their metabolites in biological fluids [10] and LC enantioseparation of milnacipran was investigated on different cellulose-based chiral stationary phases [11]. However, there is no reference for LC determination of milnacipran hydrochloride in pharmaceutical dosage form. The purpose of

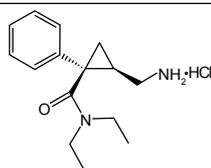


Figure 1: Chemical structure of milnacipran hydrochloride.

this study was to develop and validate a simple and fast stability-indicating LC method according to guidelines [12-14], which require the forced degradation of the active substance under several stress conditions, besides an alternative spectroscopic method, equivalent to the LC method for the quality control of milnacipran in capsules.

## Material and Methods

### Chemicals

Milnacipran hydrochloride was purchased from Synfine Research (Canada). Milnacipran hydrochloride capsules (25 mg) were commercially available and claimed to contain 21,77 mg as milnacipran base and the following inactive ingredients: dibasic calcium phosphate, povidone, carboxymethylcellulose calcium, colloidal silicon dioxide, magnesium stearate and talc (Pierre Fabre Médicament, Boulogne, França). All chemicals used were of analytical grade and all solvents were of LC grade. Methanol and acetonitrile were from J.T. Baker (Phillipsburg, NJ, USA). Hydrochloric acid, sodium hydroxide and 30% hydrogen peroxide were from Nuclear (CAQ-Diadema, SP, Brazil). Phosphoric acid was from Merck (Darmstadt, Germany). Ethanol was from Vetec (Rio de Janeiro, RJ, Brazil). Ultrapure water (Milli-Q Plus, Millipore®, Milford, MA, USA) was used throughout the analysis.

### Chromatographic conditions

The LC system consisted of a Shimadzu (Kyoto, Japan) LC-10AD<sub>vp</sub>

\*Corresponding author: Carolina Lupi Dias, Graduate Program in Pharmaceutical Sciences, College of Pharmacy, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Avenida Ipiranga, 2752/704, Porto Alegre / RS CEP 90610-000, Brazil, E-mail: [carolina.lupi@ufrgs.br](mailto:carolina.lupi@ufrgs.br)

Received August 30, 2010; Accepted September 27, 2010 Published September 30, 2010

Citation: Dias CL, Bajerski L, Rossi RC, Bergold AM, Fröhlich PE (2010) Comparative Validation Study to Assay Milnacipran Hydrochloride in Capsules by a Stability-Indicating LC and a Second Order Derivative UV Spectroscopic Methods. Pharm Anal Acta 1:112. doi:10.4172/2153-2435.1000112

Copyright: © 2010 Dias CL, et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.



liquid chromatograph, SPD-M10A<sub>vp</sub> diode array detector, Rheodyne® manual injection, DGU-14A degasser, SCL-10A<sub>vp</sub> system controller and Class-VP chromatography data system; a reversed phase column Nucleosil C<sub>8</sub> endcapped (150×4.6 mm, 100 Å, 5µm) from Macherey-Nagel (MN) and a guard column Phenomenex were used in the study.

The mobile phase contained a mixture of acetonitrile, water and triethylamine (70:30:0.085, v/v/v), at a constant flow-rate of 1.2 mL·min<sup>-1</sup> and at room temperature (20 ± 2°C). The pH value of the aqueous phase was adjusted to 7.5 with phosphoric acid. Aliquots of 20µL were injected. The detector was operated at a wavelength of 210 nm.

**Standard and sample preparation:** The working standard solutions were obtained by dilution, in the mobile phase, of a 500 µg·mL<sup>-1</sup> solution of milnacipran hydrochloride in methanol.

The average weight of the content of pharmaceutical dosage form (25 mg of milnacipran hydrochloride) was calculated. An amount equivalent to 5 mg of milnacipran hydrochloride was transferred into a 10 mL volumetric flask. An aliquot (5 mL) of methanol was added, sonicated for about 5 min, diluted with the same solvent, mixed and filtered. An aliquot of the filtrate was diluted with mobile phase to yield a final concentration of 60µg·mL<sup>-1</sup>.

#### Validation procedures – LC method

**Specificity:** The interference from inactive ingredients was investigated by the analysis of a blank pharmaceutical formulation. Potential degradation products generated by forced decomposition (stress) of samples were also investigated for interference with the analytical method. The stress conditions used were: hydrolytic studies, oxidative, thermal and photodegradation. All solutions injected (sample and working standard solutions) were analyzed against a control solution stored at room temperature. Peak purity test (photodiode array detector) was useful to show that the chromatographic peak of the analyte did not contain impurities.

**Hydrolytic studies:** Methanolic solutions of milnacipran hydrochloride reference substance and capsules (500µg·mL<sup>-1</sup>) were exposed to 1 N HCl and 1 N NaOH (10:1, v/v), at room temperature for 5 h. For neutral conditions, the solutions were diluted in water (10:3, v/v) and heated at 60°C for 4h, using a water bath. The solutions were neutralized (when necessary) and diluted (100µg·mL<sup>-1</sup>) in mobile phase, before injection.

**Oxidative effect:** Solutions of milnacipran hydrochloride reference substance and capsules (500µg·mL<sup>-1</sup>) in methanol were both exposed to 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> at room temperature for 6 h. The solutions were diluted (100 µg·mL<sup>-1</sup>) in mobile phase before injection.

**Thermal degradation:** Solution of milnacipran hydrochloride reference substance (500µg·mL<sup>-1</sup>) in methanol was kept in an oven at 80°C for 24 h. After this time, the solution was diluted (50µg·mL<sup>-1</sup>) in mobile phase before injection.

**Photolysis test:** Solutions of milnacipran hydrochloride reference substance and capsules (500µg·mL<sup>-1</sup>) in methanol were both exposed in a UV light chamber (352 nm) for about 20 h. The drug was recovered and dissolved again with methanol and diluted (100µg·mL<sup>-1</sup>) in mobile phase before injection.

The conditions which presented some secondary peak were repeated for, at least, 24 h and diluted (60µg·mL<sup>-1</sup>) in mobile phase before injection.

**Linearity:** Milnacipran hydrochloride was accurately weighed (10 mg) and dissolved in a 20 mL volumetric flask with methanol. This solution was diluted appropriately in mobile phase to yield solutions ranging from 20 to 100µg·mL<sup>-1</sup>. For the construction of each calibration curve, five different drug concentrations were analyzed in triplicate. Linearity of three calibration curves was tested by ANOVA and linear regression analysis.

**Precision:** Assay performance was evaluated by intraday and interday (three different days) precision, determined from replicate analysis of samples (60µg·mL<sup>-1</sup>) in three analytical runs. Analysis of six different sample solutions was performed in the same day for intraday precision. The precision was expressed in terms of relative standard deviations (RSD) from mean intra and interday assays.

**Accuracy:** Accuracy (recovery test) of the method was tested by adding a known amount of reference substance (15, 30, 45µg·mL<sup>-1</sup>) in three sample solutions (30µg·mL<sup>-1</sup>) to provide a final concentration of 45, 60, 75µg·mL<sup>-1</sup>, respectively. The accuracy was expressed in terms of recovery (%) of the theoretical concentration of reference substance added.

**Robustness:** Robustness was tested by analysis of variations in analytical condition. Influence of pH values of the aqueous phase, flow rate and different columns were evaluated. The chromatographic parameters monitored were peak retention time, capacity factor, tailing factor and theoretical plate number.

#### UV-D<sup>2</sup> spectroscopic conditions

A double-beam UV-visible spectrophotometer (SHIMADZU, Japan) Model UV-1601 PC was used. The software employed was UVPC personal spectroscopy software, version 3.9. For all the tested solutions the second derivative spectra (D<sup>2</sup>) was recorded over the range 280-250 nm against solvent in a 1-cm quartz cells, fixing Δλ at 4 nm and scaling factor at 200. The amplitude values of D<sup>2</sup> were measured at 268.5 nm for milnacipran hydrochloride, zero crossing of inactive ingredients.

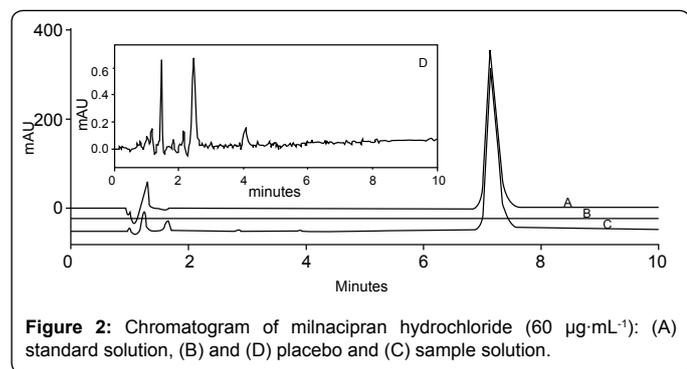
**Standard and sample solutions:** Milnacipran hydrochloride reference substance was accurately weighed (50 mg) and dissolved in a 100 mL volumetric flask with ethanol to generate a stock standard solution containing 500µg·mL<sup>-1</sup> analyte. Working standard solutions were prepared by diluting the stock standard solution with 0.1 N HCl to yield appropriate concentrations.

The average weight of the content of capsules (25 mg) was calculated. An amount equivalent to 5 mg of milnacipran hydrochloride was transferred into a 10 mL volumetric flask. An aliquot (5 mL) of ethanol was added, sonicated for about 5 min, diluted with the same solvent, mixed and filtered. An aliquot of the filtrate was diluted with 0.1 N HCl to yield a final concentration.

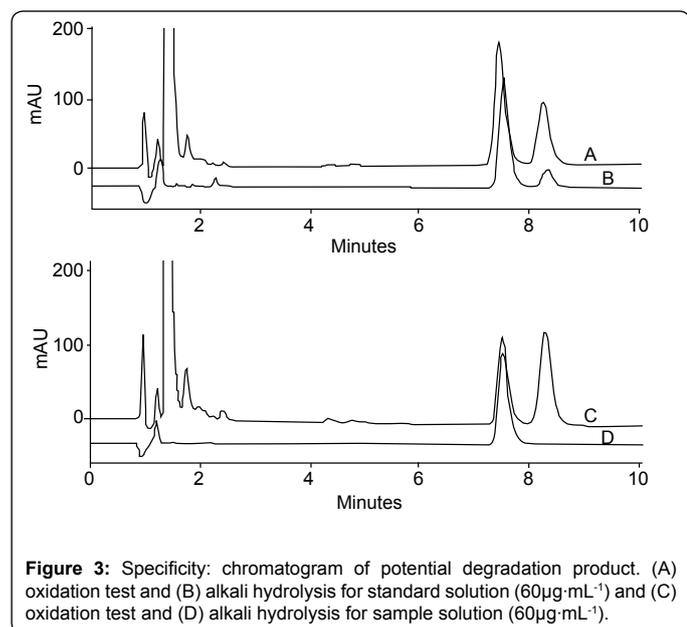
**Validation Procedures – UV-D<sup>2</sup> method:** Preliminary tests were made to select the most convenient parameters (derivative order, analytical wavelength (λ), Δλ and scaling factor).

**Specificity:** The specificity of the analytical method was evaluated with a solution of inactive ingredients (placebo). Their concentrations in pharmaceutical formulation were based in the literature (15) and calculated for the average weight of content (110.0 mg) of the capsules.

**Linearity:** Linearity was tested by analyzing five different milnacipran hydrochloride concentrations in triplicate. Milnacipran hydrochloride reference substance was accurately weighed (10 mg)



**Figure 2:** Chromatogram of milnacipran hydrochloride ( $60 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ): (A) standard solution, (B) and (D) placebo and (C) sample solution.



**Figure 3:** Specificity: chromatogram of potential degradation product. (A) oxidation test and (B) alkali hydrolysis for standard solution ( $60 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) and (C) oxidation test and (D) alkali hydrolysis for sample solution ( $60 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ).

and dissolved in a 20 mL volumetric flask with ethanol ( $500 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). This solution was diluted in ethanol to produce solutions with appropriate concentrations ( $100, 200, 300$  and  $400 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) and, then, dilute them, respectively, in 0.1 N HCl to yield final concentrations, covering the range of  $20\text{-}100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Linearity of three calibration curves was tested by ANOVA and linear regression analysis.

**Precision:** Assay performance was evaluated by repeatability and intermediate precision (three different days), determined from replicate analysis of samples at  $60 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  ( $n=6$ ). The precision was expressed in terms of relative standard deviations (RSD) from mean intra and inter-day assays.

**Accuracy:** Accuracy of the method was evaluated by adding a known amount of milnacipran hydrochloride reference substance ( $15, 30, 45 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) in three sample solutions ( $30 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) to provide a final concentration of  $45, 60, 75 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , respectively. An adequate aliquot of ethanol was added in each volumetric flask to adjust the volume of solvent, before the final dilution with 0.1 N HCl. The accuracy was expressed in terms of recovery (%) of the theoretical concentration of reference substance added.

## Results and Discussion

### Selection of chromatographic conditions

The best conditions were selected based on peak performance and the run time of the proposed assay was 10 min under isocratic

elution. During injection of a standard solution the retention time was about 7.5 minutes for milnacipran hydrochloride (Figure 2A). The chromatogram of the placebo (Figure 2B and Figure 2D) showed no interference of inactive ingredients. The chromatogram obtained from a sample solution ( $60 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) is shown in (Figure 2C).

Different chromatographic columns were evaluated, but parameters for the analyte peak, as asymmetry and theoretical plates, were improved just by controlling temperature ( $50^\circ\text{C}$ ), whereas the column used showed good performance at room temperature. Several mobile phases with different proportions of organic solvent (acetonitrile and methanol) were tested in order to achieve the best condition. A mixture of acetonitrile and water as mobile phase provided the best chromatographic performance. Considering its  $pK_a$  value of  $10.36 \pm 0.29$  (16), a pH of 7.5 was used to ensure complete ionization of the analyte. The pH of aqueous phase with triethylamine was adjusted with phosphoric acid 20% (v/v) before mixing with acetonitrile. Retention time and asymmetry were significantly affected by different amounts of triethylamine and the best results were achieved when using 0.085%.

### LC method validation

**Specificity:** Interference with the analytical method was evaluated with a solution of inactive ingredients (placebo solution). Their concentrations in pharmaceutical formulation were based on the literature [15] and calculated for an average weight of content ( $\approx 110.0$  mg) of the capsules. The chromatogram showed absence of any peak due to inactive ingredients (Figure 2B).

Interferences of potential degradation products were also investigated through forced decomposition tests. Sample solutions were exposed to thermal degradation, photolysis and oxidation test, acidic and alkaline conditions. The solutions subjected to stress (standard and sample solutions) and the control solutions which were stored under normal conditions were used to confront the quantitative results. The aliquots were neutralized (when necessary) and diluted before analysis. The chromatograms showed suitable separation from potential degradation products of milnacipran hydrochloride and photodiode array data was collected to evaluate peak purities.

A potential degradation product was observed in standard solutions exposed to 3% hydrogen peroxide (Figure 3A) and 1 M NaOH (Figure 3B). This degradation peak presented retention time of 8.3 minutes and resolution of 2.2. However, the sample solutions (capsules) showed this secondary peak only with oxidative stress (Figure 3C), whereas under alkaline hydrolysis it was not observed (Figure 3D). The chromatogram of the oxidation test showed some extra peaks from hydrogen peroxide. Under acid and neutral hydrolysis, thermal and photolytic degradation no additional peak was detected.

The most important effect of degradation studies (above 10% of degradation) occurred by effect of oxidation and alkaline hydrolysis. The results suggest that the degradation product observed is the same in both conditions, according to both UV spectra and retention times. Interaction with inactive ingredients could explain the reason why the analyte was more stable than bulk substance under alkaline hydrolysis.

Photodiode array purity test showed no impurity in the milnacipran hydrochloride peak after degradation and the assay was considered selective.

Intraday (n=6)	Mean observed value (%) ± SE		RSD (%)	
	LC	UV-D <sup>2</sup>	LC	UV-D <sup>2</sup>
day I	101.39 ± 0.42	100.55 ± 0.18	1.01	0.43
day II	100.79 ± 0.18	101.20 ± 0.39	0.45	0.94
day III	101.88 ± 0.25	101.01 ± 0.16	0.59	0.40
Interday (n=3)	101.35 ± 0.32	100.92 ± 0.19	0.54	0.33

Table 1: Repeatability and intermediate precision to assay milnacipran capsules.

Sample solution (µg·mL <sup>-1</sup> )	Standard solution (µg·mL <sup>-1</sup> )	Total concentration (µg·mL <sup>-1</sup> )	Recovery %					
			I		II		III	
			LC	UV-D <sup>2</sup>	LC	UV-D <sup>2</sup>	LC	UV-D <sup>2</sup>
30	15	45	101.2	98.5	100.3	100.2	101.4	100.5
30	30	60	99.1	98.7	98.5	100.0	99.7	101.4
30	45	75	99.2	99.6	98.6	101.6	99.2	101.0
Mean absolute recovery (%) ± SE (n=9)			LC		UV-D <sup>2</sup>			
			99.69 ± 0.35		100.2 ± 0.36			

Table 2: Accuracy of the analysis of milnacipran in capsules.

	Retention time (min)	Theoretical plates (N>2000) <sup>b</sup>	Tailing factor (T ≤ 2) <sup>b</sup>	Capacity factor (k' > 2) <sup>b</sup>	Assay (%)
Method proposed <sup>a</sup>	7.6	8367	1.4	5.3	100.8
Mobile phase: pH 7.0	7.2	8369	1.4	5.0	99.2
Mobile phase: pH 8.0	8.1	8088	1.4	5.8	99.1
flow rate: 1.0 mL·min <sup>-1</sup>	8.8	8937	1.4	8.6	100.7
Analytical Column Merck C8 (125×4.6 mm) *1.0 mL·min <sup>-1</sup>	3.7	2702	2.0	2.1	100.6

Table 3: Evaluation of robustness for the milnacipran capsules LC assay.

**Linearity:** Calibration curves proved to be linear over the 20-100µg·mL<sup>-1</sup> range. Standard solutions prepared at five concentrations (20, 40, 60, 80 and 100µg·mL<sup>-1</sup>) were injected in triplicate every day, during three consecutive days. Linear regression of concentration versus peak area ratio plots resulted in an average coefficient of determination (R<sup>2</sup>) greater than 0.999. The average equation for three calibration curves was  $y = 0.0109 + 0.465 x$ . The data was evaluated by ANOVA. It presented linear regression ( $F_{\text{calculated}} = 162715.76 > F_{\text{critical}} = 4.96$ ;  $P = 0.05$ ) and it did not deviate from linearity ( $F_{\text{calculated}} = 2.97 < F_{\text{critical}} = 3.71$ ;  $P = 0.05$ ).

**Precision:** The intraday and interday precision were estimated from the triplicate injections of six sample solutions prepared at 60µg·mL<sup>-1</sup> of milnacipran hydrochloride (test concentration) analyzed in three separate days. Means and relative standard deviations (RSD) were obtained from calculated milnacipran hydrochloride concentrations (Table 1). The variability was low with RSD values ranging from 0.4% to 1.0%. These results indicated that the assay is reproducible.

**Accuracy:** Accuracy was calculated as the percentage of recovery by the assay of known added amounts of milnacipran hydrochloride reference substance in sample solutions using three concentration levels covering the specified range and three replicates of each concentration. The accuracy of the method ranged from 98.5 to 101.4%, indicating that the assay is accurate (Table 2).

**Robustness:** The chromatographic analysis under different analytical conditions was performed and the chromatographic parameters of the main peak were evaluated presenting only few changes. A different brand of analytical column (Merck) was tested, increasing tailing factor and considerably reducing retention time and theoretical plate number. Changes in pH and flow rate were evaluated in robustness and they did not interfere with the analytical parameters. The results of robustness are presented in (Table 3).

**Stability of Standard and Sample Preparation:** Stock solutions of milnacipran hydrochloride reference substance and capsules (500µg·mL<sup>-1</sup>) in methanol were stable for 24 h at room temperature and at 4°C. There was no evidence of degradation of the analyte under these conditions.

## UV-D<sup>2</sup> method validation

**Specificity:** Solutions of standard, sample and inactive ingredients

were evaluated over the range 300-200 nm in the zero (Figure 4-a), first and second UV-derivative orders. Background interferences and overlaps from pharmaceutical formulation were eliminated by selecting the best parameters of the UV-D method for the quantitative determination of milnacipran hydrochloride in capsules.

Results showed that UV-D<sup>2</sup> measurement of milnacipran hydrochloride is possible at 268.5 nm because at this wavelength the influence from excipients was not observed (Figure 4-b).

**Linearity:** The results showed that the UV-D<sup>2</sup> absorbance was proportional to milnacipran hydrochloride concentration (Figure 5). Standard solutions prepared at five concentrations (20, 40, 60, 80 and 100µg·mL<sup>-1</sup>) were measured in triplicate every day, during three consecutive days. The average equation for three calibration curves was  $y = 0.0023 + 0.0027 x$  and the average correlation coefficient (r) obtained was 0.9999. The linearity data were evaluated using ANOVA, this showed that the regression equation was linear ( $F_{\text{calculated}} = 1960.55 > F_{\text{critical}} = 4.96$ ;  $P = 0.05$ ) with no deviation from linearity ( $F_{\text{calculated}} = 0.0453 < F_{\text{critical}} = 3.71$ ;  $P = 0.05$ ).

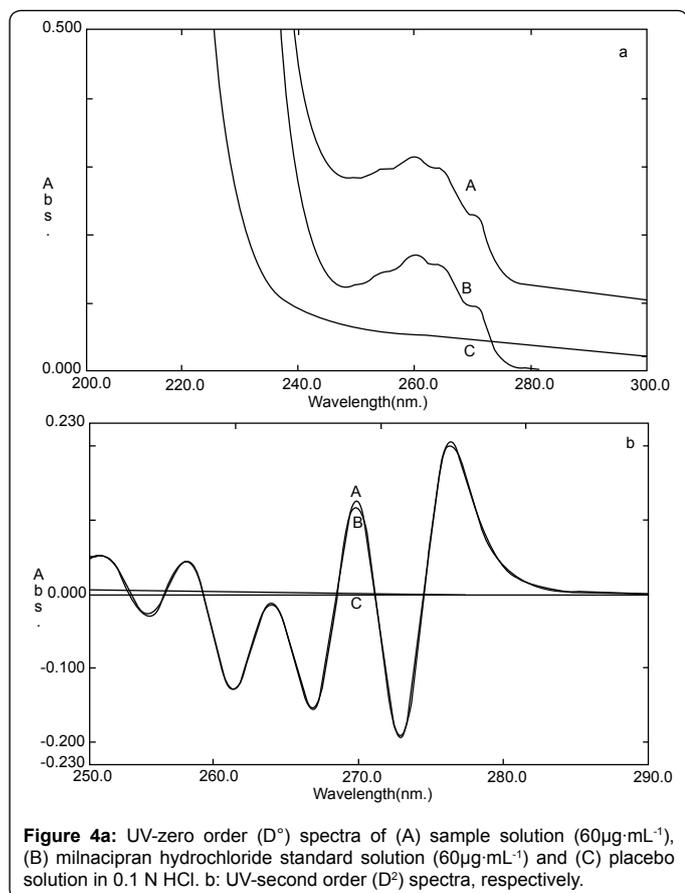
**Precision:** The repeatability and intermediate precision were estimated from the triplicate measurements of six different sample solutions at 60µg·mL<sup>-1</sup> of milnacipran hydrochloride and analyzed for three different days. The results indicated that UV-D<sup>2</sup> assay is reproducible. The RSD were obtained from calculated milnacipran hydrochloride concentrations in capsules over all days, mean intra and inter-day assays. The variability was low with RSD values ranging from 0.07% to 1.00% (Table 1).

**Accuracy:** Accuracy was calculated as the percentage recovery of known added amounts of milnacipran hydrochloride reference substance in the sample solutions using three concentration levels covering the specified range and three replicates of each concentration. The mean accuracy of the method ranged from 98.5% to 101.6% indicating that this assay is reliable (Table 2).

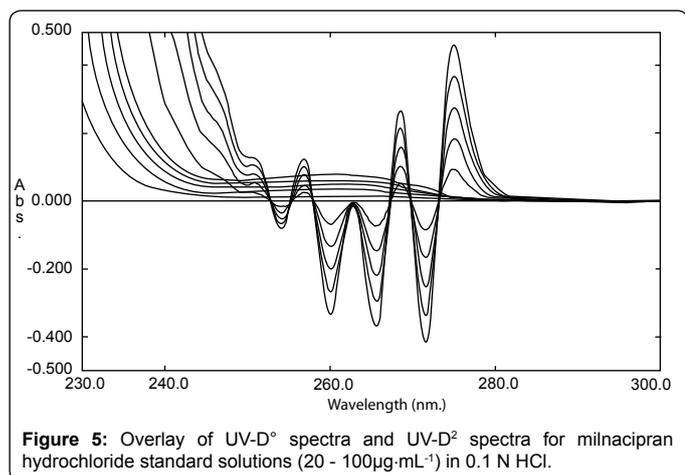
## Statistical comparison of LC and UV-D<sup>2</sup> methods

The t-test was used (t Table value 2.03 for 34 degrees of freedom) to compare the UV-D<sup>2</sup> spectroscopic with the LC method. The assay data obtained from the two methods showed non-significant difference at the confidence level of 95% ( $P = 0.05$ ) with the statistic t (1.73) being smaller than the critical value.





**Figure 4a:** UV-zero order ( $D^{\circ}$ ) spectra of (A) sample solution ( $60\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), (B) milnacipran hydrochloride standard solution ( $60\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) and (C) placebo solution in 0.1 N HCl. b: UV-second order ( $D^2$ ) spectra, respectively.



**Figure 5:** Overlay of UV- $D^{\circ}$  spectra and UV- $D^2$  spectra for milnacipran hydrochloride standard solutions ( $20 - 100\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) in 0.1 N HCl.

## Conclusion

The absence of official methods to quantify milnacipran hydrochloride justifies the need of analytical procedures for assuring the quality of its pharmaceutical dosage form. The LC method developed and validated allows a simple and fast quantitative determination of milnacipran hydrochloride in capsules, ensuring that it is suitable for determining the content of milnacipran

hydrochloride in this dosage form despite the presence of its major degradation products. The proposed UV- $D^2$  spectroscopic method presents itself as an alternative to the LC method, since the statistical analysis by Student's  $t$  test suggests that the two methods are equivalent for the quantitative determination of drug in capsules. Besides, the UV-D method is an analytical technique of great utility, when compared with conventional UV-visible spectroscopic method, offering selectivity against the interference of the excipients, without preliminary separation.

## Acknowledgments

This research was supported by the Medicinal Chemistry Laboratory (UFRGS). The authors would like to thank CNPQ (Brazil), for the financial support.

## References

- Chen C, Dyck B, Fleck BA, Foster AC, Grey, et al. (2008) Identification of 1S, 2R-milnacipran analogs as potent norepinephrine and serotonin transporter inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 18: 3328-3332.
- NLM ChemIDplus Advanced (2009) <http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/chemidheavy.jsp>
- Vaishnavi SN, Nemeroff CB, Plott SJ, Rao SG, Kranzler J, et al. (2004) Milnacipran: a comparative analysis of human monoamine uptake and transporter binding affinity. *Biological Psychiatry* 55: 320-322.
- Rao SG, Gendreau JF, Kranzler JD (2008) Understanding the Fibromyalgia Syndrome. *Psychopharmacology Bulletin* 40: 24-56.
- Lacassie E, Gaulier JM, Marquet P, Rabatel JF, Lachâtre G (2000) Methods for the determination of seven selective serotonin reuptake inhibitors and three active metabolites in human serum using high-performance liquid chromatography and gas chromatography. *Journal of Chromatography B* 742: 229-238.
- Tournel G, Houdret N, Hédouin V, Deveaux M, Gosset D, et al. (2001) High-performance liquid chromatographic method to screen and quantitate seven selective serotonin reuptake inhibitors in human serum. *Journal of Chromatography B* 761:147-158.
- Duverneuil C, Grandmaison GL, Mazancourt P, Alvarez JC (2003) A High-Performance Liquid Chromatography Method with Photodiode-Array UV Detection for Therapeutic Drug Monitoring of the Nontricyclic Antidepressant Drugs. *Therapeutic Drug Monitoring* 25: 565-573.
- Puozzo C, Filaquier C, Zorza G (2004) Determination of milnacipran, a serotonin and noradrenaline reuptake inhibitor, in human plasma using liquid chromatography with spectrofluorimetric detection. *Journal of Chromatography B* 806: 221-228.
- Shinozuka T, Terada M, Tanaka E (2006) Solid-phase extraction and analysis of 20 antidepressant drugs in human plasma by LC/MS with SSI method. *Forensic Science International* 162: 108-112.
- Labat L, Deveaux M, Dallet P, Dubost JP (2002) Separation of new antidepressants and their metabolites by micellar electrokinetic capillary chromatography. *Journal of Chromatography B* 773: 17-23.
- Patti A, Pedotti S, Sanfilippo C (2007) *Chirality* 20: 63-68.
- Reviewer Guidance: Validation of Chromatographic Methods (1994) FDA, CDER, Rockville, MD.
- ICH (2003) 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.
- ICH (2005) Validation of Analytical Procedures: Text And Methodology, Q2(R1). In: International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use.
- Kibbe AH, Wade A, Weller PJ (eds) (2000) Handbook of Pharmaceutical Excipients. (3<sup>rd</sup> ed), Pharmaceutical Press, London.
- ACD/Labs Online, version 8.0. (2009) <http://lab.acdlabs.com>



ACEITE PARA PUBLICAÇÃO - Dissolution Technologies

**Dissolution method for milnacipran hydrochloride capsules:  
development, validation and study of changes in dissolution rate after  
storage**

Carolina Lupi Dias, Rochele Cassanta Rossi, Lisiane Bajerski, Pedro Eduardo Fröhlich

**Data:** Mon, 10 Jan 2011 07:39:49 -0500 [10-01-2011 10:39:49 BRT]

**De:** Vivian Gray <vagray@rcn.com>

**Para:** Carolina Lupi Dias <carolina.lupi@ufrgs.br>

**Assunto:** Re: paper submission

**Anexo(s):**  2 Milnacipran Reviewer 2.doc 24 KB

 3 Minacipran stability Reviewer 1.doc 24 KB

 1 sem nome 0 KB

Dear Carolina, We are pleased to say that the reviewers were very pleased with your article. I have attached their brief comments. Please review the article for grammatical errors and email it along when convenient. The article will be published in the August 2011 issue.

Best regards, Vivian Gray  
Research Editor



# Dissolution method for milnacipran hydrochloride capsules: development, validation and study of changes in dissolution rate after storage

Carolina Lupi Dias✉, Rochele Cassanta Rossi, Lisiane Bajerski, Pedro Eduardo Fröhlich

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Av. Ipiranga, 2752/704, Porto Alegre - RS CEP 90610-000, Brasil; E-mail: [carolina.lupi@ufrgs.br](mailto:carolina.lupi@ufrgs.br)

---

## Abstract

A dissolution test for milnacipran hydrochloride capsules was developed and validated according to international guidelines. After selection of the best conditions, the method was validated using USP apparatus 1 (baskets), 50 rpm rotation speed, 900 mL of 0.01N HCl and time test set to 60 min. The drug released was determined through both LC-UV (PDA) and UV-D<sup>2</sup> methods. The kinetic parameters of drug release (mathematical models,  $t_{80\%}$  and dissolution efficiency) were investigated and the stability of dosage form was also evaluated, analyzing changes in dissolution rate of milnacipran hydrochloride capsules during storage at 40 °C and 75% RH for different periods.

Keywords: milnacipran capsules; dissolution test; LC-UV method; UV-D<sup>2</sup> method; validation; pharmaceutical quality control

---

## 1. INTRODUCTION

Dissolution testing not only can provide information regarding the rate and extent of drug absorption in the body; but it can also assess the effects of drug biopharmaceutical properties and formulation principles on the release properties of a pharmaceutical product [1]. Therefore, in vitro dissolution tests are usually used to assess lot to lot quality of a drug product, guide development of new formulations and ensure continuing product quality and performance after certain changes, such as changes in the formulation, the manufacturing process, the site of manufacture, and the scale-up of the manufacturing process [2]. The dissolution procedure requires an apparatus, a dissolution medium, and test conditions that provide a method that is discriminating yet sufficiently rugged and reproducible for day-to-day operation and capable of being transferred between laboratories. With regard to stability, the dissolution test should appropriately reflect relevant changes in the drug product over time that are caused by temperature, humidity, photosensitivity, and other stresses [3].

Milnacipran hydrochloride (MNC), [101152-94-7],  $C_{15}H_{22}N_2O \cdot HCl$ , molecular weight 282.81 g/mol (Fig. 1), is a racemic mixture with the chemical name: ( $\pm$ )-[1R(S),2S(R)]-2-(aminomethyl)-N,N-diethyl-1-phenylcyclopropanecarboxamide hydrochloride, and its solubility in water is  $19 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  [4-6]. MNC is a selective serotonin and norepinephrine reuptake inhibitor (SNRI) indicated as antidepressant and for the management of fibromyalgia. It shows preferential blockade of norepinephrine reuptake over serotonin, and minimal activity at other receptors or transporters [6-8]. MNC is well absorbed after oral administration with maximum concentrations reached within 2 to 4 hours; its absorption is not affected by food and presents an absolute bioavailability of approximately 85% to 90% [9]. According to the data of solubility and absolute bioavailability of this drug, it can be classified as class I (high solubility and high permeability) based on

Biopharmaceutical Classification System. This is the case where the drug is well absorbed and, for immediate release dosage forms that dissolve very rapidly, the absorption rate will be controlled by the gastric emptying rate and some correlation with dissolution rate is expected only if the dissolution is slower than gastric emptying [10].

Methods for quantitation of milnacipran combined with other antidepressants and their metabolites in biological fluids have been proposed [11-17]. However, there is no compendial method to assay milnacipran hydrochloride in pharmaceutical dosage form. A stability-indicating liquid chromatographic method with UV detection (LC-UV) and a second order derivative UV spectroscopic method (UV-D<sup>2</sup>) for quality control of milnacipran in capsules were developed and validated by the authors [18] according to guidelines [19-21]. Therefore, the purpose of this work was to develop and validate a dissolution testing for MNC in capsules (50 mg), based on its physicochemical characteristics, and apply the LC-UV and UV-D<sup>2</sup> methods to quantify the drug released from the capsules during the dissolution procedure. The kinetic parameters of drug release were investigated and the stability of dosage form was also evaluated analyzing changes in dissolution rate of MNC capsules over time and storage conditions.

## 2. EXPERIMENTAL

### 2.1. Chemicals

Milnacipran hydrochloride was purchased from Synfine Research (Canada) and the pharmaceutical dosage form (50 mg) was commercially available and claimed to contain the following inactive ingredients: dibasic calcium phosphate, povidone, carboxymethylcellulose calcium, colloidal silicon dioxide, magnesium stearate and talc (Pierre Fabre Médicament, Boulogne, França). All chemicals used were of analytical grade and all solvents were of LC grade. Ultrapure water was from Millipore<sup>®</sup> system (Milli-Q Plus, Milford, MA, USA).

## 2.2. Apparatus

The development and validation of the dissolution test was performed using a VANKEL<sup>®</sup> VK 8000 dissolution auto-sampling station consisting of a VK type bidirectional peristaltic pump, VK 750D digitally controlled heater/circulator, VK 7010 multi-bath ( $n=8$ ) dissolution testing station with automated sampling manifold.

The LC system consisted of a Shimadzu (Kyoto, Japan) LC-20AT liquid chromatograph, SPD-M10A<sub>VP</sub> photodiode array detector (PDA), SIL-20A auto sampler, DGU-20A<sub>3</sub> degasser, CBM-20A system controller and Class-VP data system; and a reversed phase column Nucleosil C<sub>8</sub> endcapped (150×4.6 mm, 100 Å, 5 μm) from Macherey-Nagel (MN). The mobile phase contained a mixture of acetonitrile, water and triethylamine (70:30:0.085, v/v/v), at a constant flow-rate of 1.5 mL·min<sup>-1</sup> and at room temperature (23±1 °C). The pH value of the aqueous phase was adjusted to 7.5 with phosphoric acid. Aliquots of 20 μL were injected. The detector was set at a wavelength of 210 nm.

An UV-visible spectrophotometer (SHIMADZU, Japan) Model UV-1601 PC was used for spectroscopic measurements. The software employed was UVPC personal spectroscopy software, version 3.9. For all the tested solutions the second derivative spectra ( $D^2$ ) was recorded over the range 280-250 nm in a 1-cm quartz cells, fixing  $\Delta\lambda$  at 4 nm and scaling factor of 200. The amplitude values of  $D^2$  were measured at 268 nm for MNC, zero crossing of inactive ingredients.

An Ultrabasic potentiometer (Denver, Colorado, USA) was used to pH determination and the sample filtration was carried out using filters Vankel<sup>®</sup> (qualitative filter, 35 μm).

## 2.3. Sink conditions

The solubility was determined in 0.1N HCl, pH 4.1 and 7.4 USP buffered solutions at 37 °C, dissolving the highest unit dose of the drug, at this case 50 mg, in 250 mL of each

medium tested [2]. Aliquots of 1 mL were removed after 15 min, transferred into a 10 mL volumetric flasks, diluted with mobile phase ( $20 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) and analyzed ( $n=2$ ) by the LC method previously described.

#### 2.4. Dissolution testing conditions

Dissolution testing was performed in compliance with USP 32 [3] using baskets (apparatus 1) 50 rpm and 900 mL of 0.01N HCl, heated at  $37\pm 0.5$  ° C. Manual sampling aliquots (5 mL) were withdrawn and immediately filtered at 5, 10, 15, 30 and 60 min. No replacement of the medium was done. The percentage of drug dissolved was determined using both LC-UV and UV-D<sup>2</sup> methods over the same samples in order to compare the results, using dissolution medium as blank.

The reference substance solution was prepared using an amount of powder equivalent to 10 mg of MNC that was transferred to a 10 mL volumetric flask with 0.01N HCl ( $1.0 \text{ mg mL}^{-1}$ ). An aliquot of 3.0 mL of this solution was transferred to a 50 mL volumetric flask and diluted with dissolution medium, obtaining the final concentration of  $60 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

#### 2.5. Dissolution method validation

The proposed method was validated using both LC-UV and UV-D<sup>2</sup> methods to assay the dissolved drug. Specificity, linearity, accuracy and precision were evaluated [2,3].

##### 2.5.1. Stability of standard and sample solutions

Stability of MNC reference substance stock solution and capsules solution in dissolution medium were evaluated after preparation/collection ( $n=3$ ) at room temperature ( $23\pm 1$  °C) and after 72 h stored in refrigerator ( $8\pm 2$  °C).

##### 2.5.2. Specificity

The usual concentration of the excipients contained in the pharmaceutical formulation was based on the literature [22]. An amount equivalent to one capsule was transferred to vessels with 900 mL of medium, at  $37\pm 0.5$  °C, and stirred for 1 h at 50 rpm, using USP apparatus 1. Aliquots of this solution were filtered prior to LC and UV-D<sup>2</sup> analysis.

### 2.5.3. Linearity

Aliquots of MNC standard solution ( $200\ \mu\text{g mL}^{-1}$ ) in 0.01N HCl were transferred to 20 mL volumetric flasks and diluted with dissolution medium to achieve five different concentrations: 1.0; 30.0; 60.0; 90.0;  $120.0\ \mu\text{g mL}^{-1}$  (LC) and 5.0; 30.0; 60.0; 90.0;  $120.0\ \mu\text{g mL}^{-1}$  (UV-D<sup>2</sup>). The solutions were analyzed in triplicate every day, during three consecutive days. Linearity was evaluated by linear regression analysis using ANOVA.

### 2.5.4. Accuracy and precision

Accuracy was evaluated by the recovery of known amounts of MNC reference substance added to the placebo. Aliquots of 0.45, 5.4 and 9 mL of the standard solution ( $10\ \text{mg mL}^{-1}$ ), plus an amount equivalent of the excipients contained in a capsule, were added to the vessels (900 mL) containing dissolution medium at  $37\pm 0.5$  °C, and agitated for 60 min with baskets at 50 rpm. The final concentrations were 5.0, 60.0 and  $100.0\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . The analyses were done in duplicate, in three different days. Repeatability (intra-day) and intermediate precision (inter-day) were evaluated based on RSD from the recovery data.

### 2.6. Release profiles comparison

Student's *t* test was used in order to verify whether the two methods (LC-UV and UV-D<sup>2</sup>) are equivalent for the determination of drug release. *Difference factor* ( $f_1$ ) and *similarity factor* ( $f_2$ ) were used to compare the dissolution profiles, using the LC-UV method as the reference:

$$f_1 = \{ [\sum_{t=1}^n | R_t - T_t | ] / [\sum_{t=1}^n R_t ] \} \times 100$$

$$f_2 = 50 \times \log \{ [1 + (1/n) \sum_{t=1}^n (R_t - T_t)^2]^{-0.5} \times 100$$

Where  $n$  is the number of time points,  $R$  is the dissolution value obtained using the *reference method* at time  $t$ , and  $T$  is the dissolution value obtained using the *test method* at the same time.

## 2.7. Kinetic parameters

Four mathematical models were applied to evaluate the kinetic of drug release: zero order, first order, Higuchi and Hixon-Crowell, according to equations described in Table 1. Only one point above 80% of drug released was used. The mathematical model that best expressed the dissolution profile of MNC capsules was selected based on the coefficient of determination ( $R^2$ ) or on the adjusted coefficient of determination ( $R^2_{\text{adjusted}}$ ) values, when comparing models with different number of parameters. The dissolution efficiency (DE%) and sampling time for  $\geq 80\%$  of drug dissolution ( $t_{80\%}$ ) were used to characterize the drug release profile. Frequently, pharmacopoeias use this parameter as an acceptance criteria for the amount of active ingredient dissolved, expressed as a percentage of the labeled content ( $Q$ ) [3,23].

## 2.8. Stability of pharmaceutical dosage form

Drug release from capsules may change due to the reaction of the capsule shells with the contents as well as aging. Capsules prepared from gelatin are physically unstable at water contents outside the range of 12-18%. Excipients and the water content of dosage forms can affect the dissolution characteristics of drug product over time; and can also affect its functional stability. Higher water content generally causes a larger change in dissolution behavior [24].

Changes in dissolution rate of MNC capsules with validity time expired 12 months after its production, during room temperature storage, and also capsules within their validity time, after storage at 40 °C and 75% RH for 2 and 4 weeks were evaluated. In the second case, samples were stored in desiccators, using saline solution (16.7% NaCl) to keep humidity.

### 3. RESULTS AND DISCUSSION

#### 3.1. Dissolution testing conditions

Dissolution testing should be carried out under physiological conditions if possible, allowing interpretation of dissolution data with respect to the *in vivo* performance of a drug product. However, as a quality control (QC) tool it is critical to develop a dissolution method which can consistently deliver a reliable test result and also assess drug product quality attributes (e.g., particle size, polymorphic form, or excipients). In general, for QC purposes, the use of the simplest dissolution medium is preferred whenever it is possible, regardless of the dosage form [1,2].

The results from the solubility test showed that MNC was soluble in all mediums tested: 0.1N HCl, pH 4.1 and 7.4 USP buffered solutions (Table 2), suggesting that sink condition was achieved over the pH range evaluated. Since MNC presented high solubility, it becomes evident that it could exhibit high dissolution rate into any medium selected for dissolution testing. Therefore, the capsules were tested in 900 mL of 0.01N HCl (pH 2.0), a dissolution medium that reflects gastric pH, and the most likely site of dissolution for an immediate release solid oral dosage form.

#### 3.2. Dissolution method validation

Standard and sample solutions, in 0.01N HCl, subjected to stability test demonstrated that MNC remained stable after 2 h at room temperature as well as 72 h under refrigeration. The results ranged from 99.8–100.2% ± 0.22 and 100.0–100.4% ± 0.21 (average±RSD),

respectively. No degradation product was observed and the MNC peak remains pure through PDA analysis.

The specificity of the dissolution test by LC-UV method demonstrated no interference of excipients, using a PDA detector (Fig. 2). The same analysis was done using the UV-D<sup>2</sup> method. The results suggest that the spectroscopic method could also be used for MNC assay in dissolution testing, since the formulation excipients had no interference when using second derivative UV,  $\lambda=268$  nm,  $\Delta\lambda=4$  nm and scaling factor=200 (Fig. 3) and considering the results of the stability test.

Linearity was suitable for both methods, at the concentration ranges of 1-120  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (LC) and 5-120  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (UV-D<sup>2</sup>). Correlation coefficients ( $r$ ) were higher than 0.999 for both methods. The average equations for three calibration curves were:  $y = 36153x + 8059$  (LC), and  $y = 0.0032x - 0.0016$  (UV-D<sup>2</sup>). The analysis by ANOVA showed significant linear regression and no significant deviation from linearity ( $p < 0.05$ ). The measured recovery is typically 95% to 105% of the amount added [3]. The accuracy of the methods was considered adequate in the range of 95.53% to 104.51% for MNC (Table 3). Repeatability and intermediate precision were evaluated at three different concentration levels (5.0, 60.0 and 100.0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) in three days. The low RSD ( $\leq 5\%$ ) demonstrate the good precision of both methods. Results are presented in Table 4.

### 3.3. Kinetic parameters and release profiles comparison

The drug release kinetic was evaluated through the dissolution profiles (Fig. 4). According to the  $R^2$  or  $R^2_{\text{adjusted}}$  values, dissolution profiles were better described by Hixson-Crowell model (Table 5). When this model is used, it is assumed that the release rate is limited by the drug particles dissolution rate [23].

Hixson-Crowell model was used to calculate the sampling time for 80% of drug dissolution ( $t_{80\%}$ ): 13.3 minutes ( $K_S=0.1449$ ) by LC-UV and 12.9 minutes ( $K_S=0.1488$ ) by UV-D<sup>2</sup>. According to the acceptance limits for highly soluble and rapidly dissolving drug products, Q=80% in 60 minutes or less is sufficient as a routine quality control test [2,3]. The dissolution efficiency (%  $\pm$  SE) of the pharmaceutical dosage form, defined as the area under the dissolution curve up to a certain time, expressed as a percentage of the area of the rectangle described by 100% dissolution in the same time [23], was 79.8% ( $\pm 1.06$ ) by LC-UV and 80.5% ( $\pm 1.25$ ) by UV-D<sup>2</sup>.

The *t*-test was used (*t* Table value 2.03 for 34 degrees of freedom) to compare both methods. Non-significant difference was found at the confidence level of 95% ( $P = 0.05$ ), with the statistic *t* (1.06) being smaller than the critical value. The drug release profiles obtained by LC-UV and UV-D<sup>2</sup> were compared using *difference factor* ( $f_1 = 0.67$ ) and *similarity factor* ( $f_2 = 92.52$ ). The results indicate that the curves are similar, because the  $f_1$  value was  $<15$  and  $f_2$  value was  $>50$ .

#### 3.4. Stability of pharmaceutical dosage form

Pharmaceutical dosage forms are complex systems composed not only of active pharmaceutical ingredients but also of various excipients. They may undergo both chemical and physical degradation. It is generally accepted that the stability of dissolution rate during room-temperature storage cannot be predicted from shorter-term storage under accelerated conditions of high temperature and humidity. On the other hand, some examples, suggesting that stability evaluation by accelerated tests may be possible in some cases. It is difficult to describe changes in dissolution or drug release rates during storage by kinetic equations because of the complicated and varied mechanisms involved. However, some attempts have been made, and various empirical relationships noted [24]. MNC capsules exhibited a decrease in dissolution rate during storage at 40 °C and 75%

RH for 2 and 4 weeks, as well as the capsules with the validity time expired (Fig. 5), and their sampling time for 80% of drug dissolution were also calculated, as shown in Table 6. As mentioned before, these changes are well known and have been previously reported. However, if large changes in the drug dissolution characteristics on long-term storage of the dosage form are observed, this would indicate that functional changes are occurring in the drug product and may compromise the *in vivo* performance [24].

#### 4. CONCLUSIONS

A dissolution method for milnacipran hydrochloride capsules was developed and validated as a quality control test.

The best condition for dissolution testing was 0.01N HCl as dissolution medium ( $37 \pm 0.5$  °C) and baskets at 50 rpm. The LC-UV and UV-D<sup>2</sup> methods were used to analyze the percentage of drug dissolved *versus* time and both presented specificity, linearity, precision and accuracy. The kinetic analysis of the dissolution process was best described by the Hixson-Crowell model. The kinetic parameters ( $K_S$  and  $t_{80\%}$ ) estimated by the model and the DE (%) showed that the formulation tested had its performance according to the proposed acceptance criteria.

Dissolution characteristics of milnacipran hydrochloride capsules subjected to different storage conditions were studied in order to observe changes in its dissolution rate, and a slower dissolution profile was observed. Even considering its high solubility and fast absorption, the changes in dissolution profile observed were pronounced and may affect its *in vivo* performance, especially with capsules approaching expiration date. But it is important to notice that the method was sensitive to these changes.

#### ACKNOWLEDGMENTS

This research was supported by the Medicinal Chemistry Laboratory (UFRGS). The authors would like to thank CNPQ (Brazil), for the financial support.

## REFERENCES

- [1] Lee, S. L.; Raw, A. S.; Yu, L. Dissolution Testing. In *Biopharmaceutics Applications in Drug Development*, edited by Krishna, R. and Yu, L. USA, Springer, XXII, 2008; 396 p. ISBN: 978-0-387-72378-5
- [2] *Guidance for Industry: Dissolution Testing of Immediate Release Solid Oral Dosage Forms*. FDA. Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Rockville, MD, 1997.
- [3] *The United States Pharmacopeia*. USP 32. United States Pharmacopeial Convention: Rockville, 2009.
- [4] Chen, C.; Dyck, B.; Fleck, B. A.; Foster, A. C.; Grey, J.; Jovic, F.; Mesleh, M.; Phan, K.; Tamiya, J.; Vickers, T.; Zhang, M. Studies on the SAR and pharmacophore of milnacipran derivatives as monoamine transporter inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, 18, 1346–1349.
- [5] NLM ChemIDplus Advanced (2009)  
<http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/chemidheavy.jsp>
- [6] Sigma-Aldrich (2009)  
[https://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?N4=M1318|SIGMA&N5=SEARCH\\_CONCAT\\_PNO|BRAND\\_KEY&F=SPEC&lang=en\\_US](https://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?N4=M1318|SIGMA&N5=SEARCH_CONCAT_PNO|BRAND_KEY&F=SPEC&lang=en_US)
- [7] Vaishnavi, S. N.; Nemeroff, C. B.; Plott, S. J.; Rao, S. G.; Kranzler, J.; Owens, M. J. Milnacipran: A Comparative Analysis of Human Monoamine Uptake and Transporter Binding Affinity. *Biol. Psychiatry*, **2004**, 55, 320–322.
- [8] Rao, S. G.; Gendreau, J. F.; Kranzler, J. D. Understanding the Fibromyalgia Syndrome. *Psychopharmacol. Bull.* **2008**, 40 (4), 24-56.
- [9] Savella (2009) [http://www.frx.com/pi/Savella\\_pi.pdf](http://www.frx.com/pi/Savella_pi.pdf)
- [10] Amidon, G. L.; Lennernäs, H.; Shah, V. P.; Crison, J. R. A Theoretical Basis for a Biopharmaceutical Drug Classification: The Correlation of in vitro Drug Product Dissolution and in vivo Bioavailability. *Pharm. Res.* **1995**, 12 (3), 413-420.
- [11] Lacassie, E.; Gaulier, J. -M.; Marquet, P.; Rabatel, J. -F.; Lachâtre, G. Methods for the determination of seven selective serotonin reuptake inhibitors and three active metabolites in human serum using high-performance liquid chromatography and gas chromatography. *J. Chromatogr., B.* **2000**, 742, 229–238.
- [12] Tournel, G.; Houdret, N.; Hédouin, V.; Deveaux, M.; Gosset, D.; Lhermitte, M. High-performance liquid chromatographic method to screen and quantitate seven selective serotonin reuptake inhibitors in human serum. *J. Chromatogr., B.* **2001**, 761, 147–158.

- [13] Labat, L.; Deveaux, M.; Dallet, P.; Dubost, J. P. Separation of new antidepressants and their metabolites by micellar electrokinetic capillary chromatography. *J. Chromatogr., B.* **2002**, 773, 17–23.
- [14] Duverneuil, C.; Grandmaison, G. L.; Mazancourt, P.; Alvarez, J. C. A High-Performance Liquid Chromatography Method with Photodiode-Array UV Detection for Therapeutic Drug Monitoring of the Nontricyclic Antidepressant Drugs. *Ther. Drug Monit.* **2003**, 25, 565–573.
- [15] Puozzo, C.; Filaquier, C.; Zorza, G. Determination of milnacipran, a serotonin and noradrenaline reuptake inhibitor, in human plasma using liquid chromatography with spectrofluorimetric detection. *J. Chromatogr., B.* **2004**, 806, 221–228.
- [16] Shinozuka, T.; Terada, M.; Tanaka, E. Solid-phase extraction and analysis of 20 antidepressant drugs in human plasma by LC/MS with SSI method. *Forensic Sci. Int.* **2006**, 162, 108–112.
- [17] Uçaktürk, E.; Safak, C. Determination of Milnacipran in Human Plasma Using CG-MS. *Chromatographia.* **2010**, 72, 111-119.
- [18] Dias, C. L.; Bajerski, L.; Rossi, R. C.; Bergold, A. M.; Fröhlich, P. E. Comparative Validation Study to Assay Milnacipran Hydrochloride in Capsules by a Stability-Indicating LC and a Second Order Derivative UV Spectroscopic Methods. *Pharm. Anal. Acta.* **2010**, 1:112. doi:10.4172/2153-2435.1000112.
- [19] *Reviewer Guidance: Validation of Chromatographic Methods*. FDA. Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Rockville, MD, 1994.
- [20] *Stability Testing of New Drug Substances and Products Q1A(R2)*. ICH. Harmonised Tripartite Guideline. In: International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, 2003.
- [21] *Validation of Analytical Procedures: Text And Methodology, Q2(R1)*. ICH. Harmonised Tripartite Guideline. In: International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, 2005.
- [22] Kibbe, A. H.; Wade, A.; Weller, P. J. (eds). *Handbook of Pharmaceutical Excipients*, 3<sup>rd</sup> ed, American Pharmaceutical Association: Pharmaceutical Press, 2000.
- [23] Costa, P.; Lobo, J. M. S. Modeling and comparison of dissolution profiles. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2001**, 13, 123-133.
- [24] Yoshioka, S.; Stella, V. J. *Stability of Drugs and Dosage Forms*. Kluwer Academic Publishers, New York, 2002.

Figure Captions:

Figure 1. Milnacipran hydrochloride.

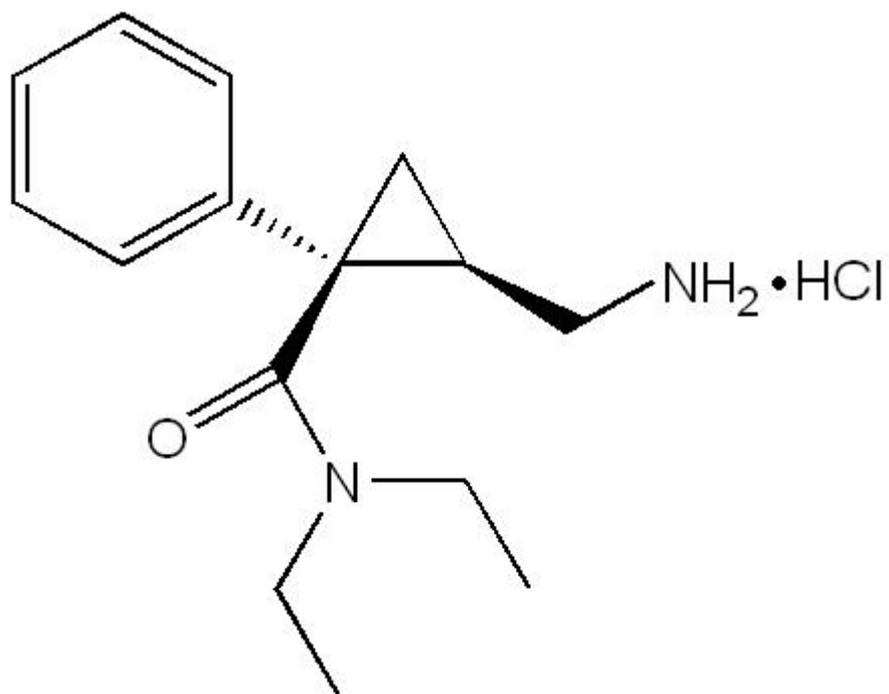
Figure 2. Specificity: chromatogram of milnacipran hydrochloride in dissolution medium (0.01N HCl). (A) placebo and (B) standard solution ( $60 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ).

Figure 3. (A) UV-zero order spectra of: a) milnacipran hydrochloride standard solution ( $60 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) and b) placebo solution in 0.01N HCl. (B) UV-D<sup>2</sup> spectra, respectively.

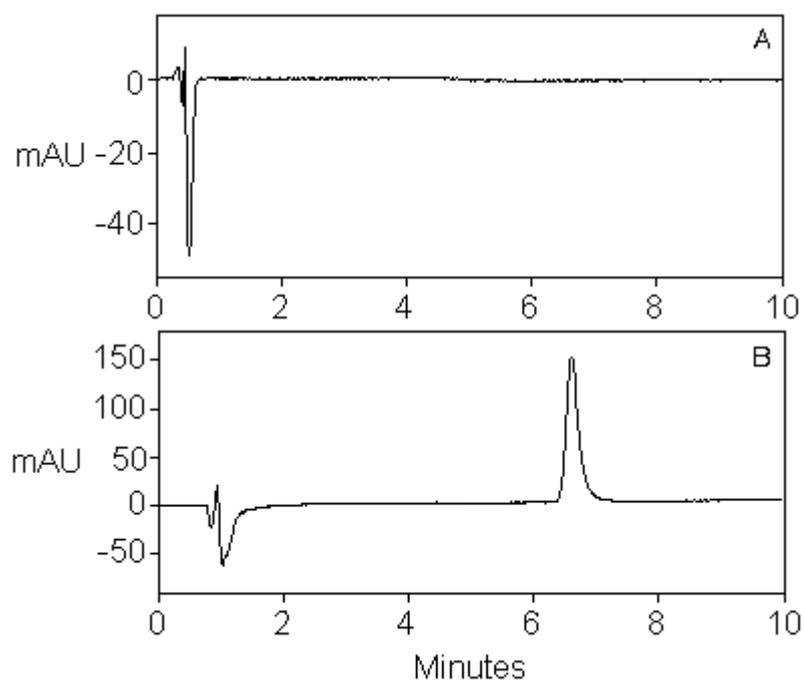
Figure 4. Dissolution profile of milnacipran hydrochloride capsules 50 mg (n=12). Baskets, 50 rpm rotation speed, 900 mL of 0.01N HCl (37 °C). The values are corresponding to average of the 12 determinations ( $\pm$  standard deviation) by UV-D<sup>2</sup> ( $\blacklozenge$ ) and LC-UV ( $\blacksquare$ ).

Figure 5. Changes in the dissolution rate of milnacipran hydrochloride capsules after storage. The curves represent the dissolution rates before storage ( $\blacklozenge$ ), after storage at room temperature and with validity time expired ( $\bullet$ ) and after storage at 40 °C and 75% RH for 2 ( $\blacktriangle$ ), and 4 weeks ( $\blacksquare$ ).

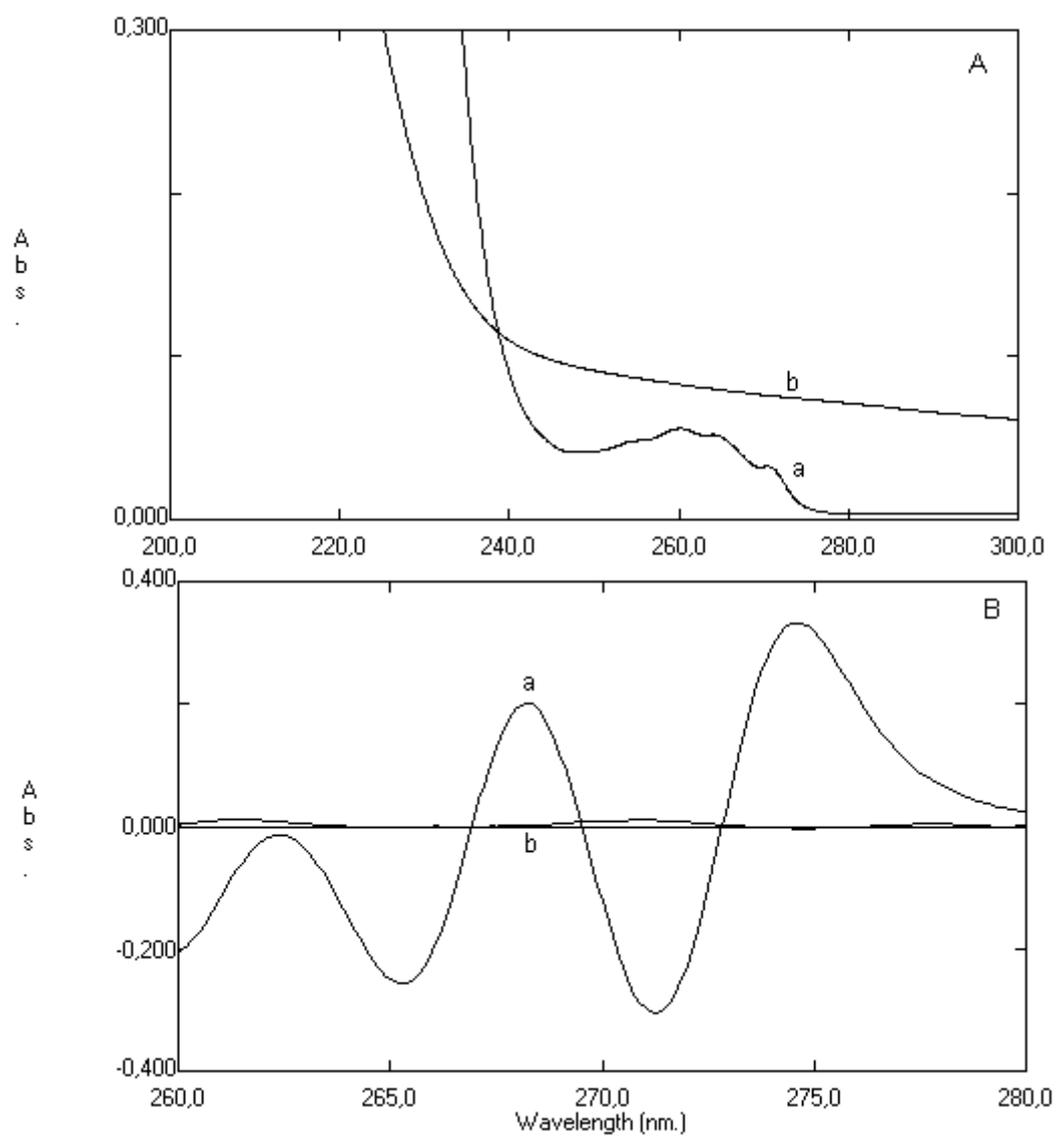
Dias et al.  
Fig. 1



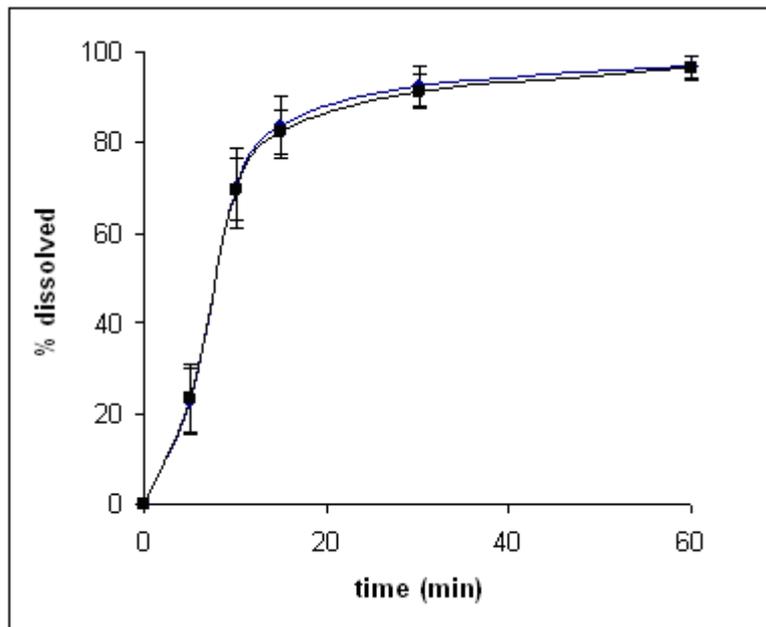
Dias et al.  
Fig. 2



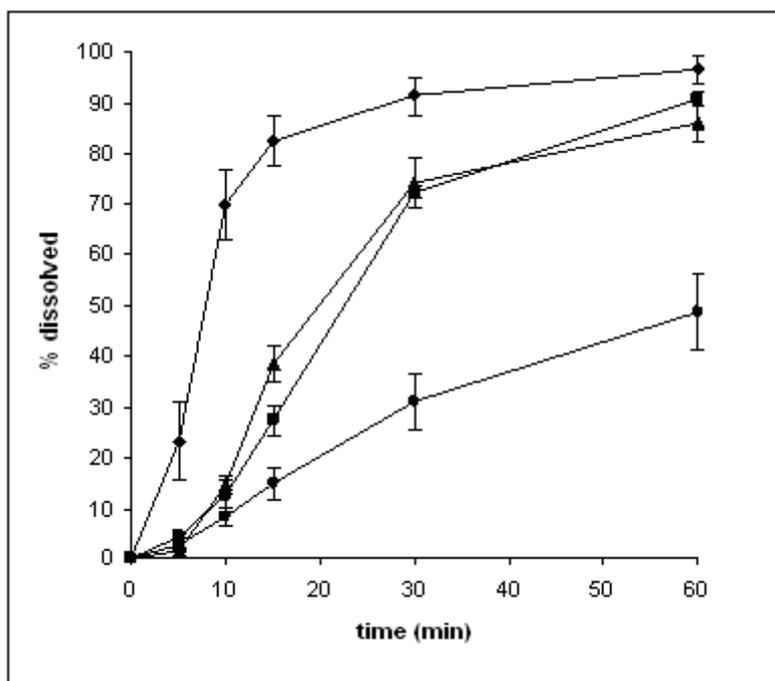
Dias et al.  
Fig. 3



Dias et al.  
Fig. 4



Dias et al.  
Fig. 5



**Table 1.** Mathematical models to represent the drug dissolution profiles

Zero order kinetics	$Q_t = Q_0 + K_0 t$
First order kinetics	$\log Q_t = \log Q_0 + (K_1 t) / 2.303$
Higuchi model	$f_t = K_H t^{1/2}$
Hixson-Crowell model	$W_0^{1/3} - W_t^{1/3} = K_s t$

$Q_t$  = amount of drug dissolved in time  $t$ ;  $Q_0$  = initial amount of drug in the solution;  $K_0$  and  $K_1$  = zero order and first order release constants, respectively

$f_t$  = amount of drug released in time  $t$  by surface unity;  $K_H$  = Higuchi dissolution constant

$W_0$  = initial amount of drug in the pharmaceutical dosage form;  $W_t$  = remaining amount of drug in the pharmaceutical dosage form at time  $t$ ;  $K_s$  = a constant incorporating the surface-volume relation

**Table 2.** Solubility test of milnacipran hydrochloride

Medium (37 °C)	pH	% drug dissolved <sup>1,2</sup> (15 min)	RSD
0.1N HCl	1.0	101.2	0.55
Acetate Buffer	4.1	101.4	0.55
Phosphate Buffer	7.4	101.9	0.69

<sup>1</sup> 10 mg of the drug in 50 ml of medium with magnetic shaking

<sup>2</sup> Analyzed by LC method ( $n=2$ )

**Table 3.** Accuracy of the dissolution of milnacipran in capsules.

Standard solution ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	Mean Recovery % ( $n=6$ )	
	LC method	UV-D <sup>2</sup>
5	97.3	99.5
60	98.2	97.9
100	98.0	97.9
Mean absolute recovery (%) $\pm$ SE ( $n=18$ )	97.8 $\pm$ 0.32	98.4 $\pm$ 0.50

**Table 4.** Repeatability and intermediate precision of the dissolution of milnacipran in capsules.

Intraday ( $n=6$ )	Mean observed value (%) $\pm$ SE		RSD (%)	
	LC	UV-D <sup>2</sup>	LC	UV-D <sup>2</sup>
day I	97.2 $\pm$ 0.48	98.1 $\pm$ 0.93	1.22	2.33
day II	97.4 $\pm$ 0.47	98.9 $\pm$ 1.19	1.19	2.94
day III	98.9 $\pm$ 0.48	98.3 $\pm$ 0.39	1.16	0.98
Interday ( $n=3$ )	97.8 $\pm$ 0.53	98.4 $\pm$ 0.25	0.94	0.45

**Table 5.** Coefficient of determination ( $R^2$ ) and adjusted coefficient of determination ( $R^2_{\text{adjusted}}$ ) of the mathematical models.

	LC-UV		UV-D <sup>2</sup>	
	$R^2$	$R^2_{\text{adjusted}}$	$R^2$	$R^2_{\text{adjusted}}$
Zero order kinetics	0.9581	0.8953	0.9590	0.8975
First order kinetics	0.8181	0.5453	0.8230	0.5575
Higuchi model	0.8947	0.8245	0.8899	0.8165
Hixson-Crowell model	0.9651	0.9128	0.9652	0.9130

**Table 6.** Sampling time for 80% of drug dissolution after stability studies

Storage	Hixson-Crowell model (LC-UV)	
	$t_{80\%}$ (minutes)	$K_s$
40 °C and 75% RH (2 weeks)	42.1	0.0458
40 °C and 75% RH (4 weeks)	62.6	0.0308
room temperature (validity time expired)	119.0	0.0162



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

Nível: Doutorado

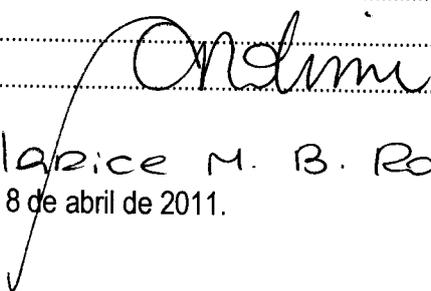
Área de concentração: Ciências Farmacêuticas

Título: "Cloridrato de milnaciprana cápsulas: metodologia analítica, ensaio de dissolução e estudo de estabilidade."

Doutorando: CAROLINA LUPI DIAS

PARECER

O trabalho apresentado por Caroline Lupi Dias para obtenção do título de doutor em Ciências Farmacêuticas abrange inúmeros técnicas analíticas com objetivo de avaliar a qualidade de fármacos e formas farmacêuticas contendo cloridrato de Milnaciprana. O presente trabalho está muito bem fundamentado, o fármaco escolhido é de alta importância terapêutica, as técnicas de análise desenvolvidas apresentam alto rigor analítico baseado em bibliografia atual e pertinente. Os resultados estão apresentados em uma linguagem clara e objetiva e argumentados com discurso relevante baseado em literatura atualizada. Somos de parecer favorável a aprovação.



Prof. Dr. Cláudio M. B. Rolim  
Porto Alegre, 8 de abril de 2011.



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

Nível: Doutorado

Área de concentração: Ciências Farmacêuticas

Título: "Cloridrato de milnaciprana cápsulas: metodologia analítica, ensaio de dissolução e estudo de estabilidade.

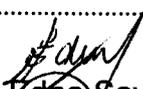
Doutorando: CAROLINA LUPI DIAS

PARECER

A tese apresentada aborda tema de grande relevância no segmento de controle de qualidade de medicamentos. Foram desenvolvidos e validados metodologia analítica, ensaio de dissolução e estabilidade de cloridrato de milnaciprana, em forma farmacêutica cápsulas. O delineamento do estudo foi adequado e devidamente analisado, obtendo-se resultados importantes, os quais permitiram a elaboração de dois manuscritos, sendo um destes, já aceito e publicado.

A defesa foi muito bem conduzida, demonstrando domínio sobre a proposta do estudo.

sendo assim, nesse parecer, é favorável à aprovação da pós-graduada Carolina Lupi Dias.

Profa. Dr.  Edna Sayuri Suyenaga  
Porto Alegre, 08 de abril

de 2011.



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

**Nível: Doutorado**

**Área de concentração: Ciências Farmacêuticas**

**Título: "Cloridrato de milnaciprana cápsulas: metodologia analítica, ensaio de dissolução e estudo de estabilidade."**

**Doutorando: CAROLINA LUPI DIAS**

**P A R E C E R**

A tese apresentada trata do estudo de métodos para determinação de cloridrato de milnaciprana na forma farmacêutica cápsulas, caracterização do perfil de dissolução e avaliação dos fatores que determinam sua degradação.

O tema é relevante dado a importância que o fármaco apresenta no tratamento da depressão e fibromialgia, bem como à falta de informações na área analítica para o efetivo controle de qualidade de formulações contendo minalciprana.

A tese apresenta planejamento experimental adequado e coerente aos propósitos estabelecidos pelo autor, conduzindo a obtenção de resultados para proposição de três métodos validados de quantificação do analito, determinação dos parâmetros relevantes para execução do teste de dissolução e, finalmente, a caracterização do perfil de degradação do fármaco sob luz ultravioleta, meio alcalino e oxidativo, demonstrando a formação de produtos com caráter polar e apolar, respectivamente.

Os resultados obtidos foram devidamente discutidos frente à literatura atualizada e constituem importante subsídio para o controle de qualidade desta substância química.

Assim, baseado no exposto, o parecer é favorável a aprovação da tese e concomitante atribuição do título de doutor a pós-graduanda Carolina Lupi Dias.

  
Prof. Dr. Martin Steppe  
Porto Alegre, 8 de abril de 2011.



## **Formação Acadêmica**

✓ 2007 / 2011

Doutorado em Ciências Farmacêuticas

Título: Cloridrato de milnaciprana cápsulas: metodologia analítica, ensaio de dissolução e estudo de estabilidade.

Orientação: Prof. Dr. Pedro Eduardo Fröhlich.

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

Faculdade de Farmácia – UFRGS, Porto Alegre – RS

✓ 2004 / 2006

Mestrado em Ciências Farmacêuticas

Título: Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para determinação do inibidor de protease ritonavir matéria-prima e cápsulas.

Orientação: Prof. Dr. Pedro Eduardo Fröhlich.

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

Faculdade de Farmácia – UFRGS, Porto Alegre – RS

✓ 2000 / 2003

Ênfase em Farmácia Industrial

Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre – RS

✓ 1996 / 2000

Graduação em Farmácia

Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre – RS

## **Atuação Profissional**

✓ 2010 /

Perita Químico-Forense, atuando no Setor de Toxicologia, em análises toxicológicas de materiais brutos e amostras biológicas. Instituto-Geral de Perícias (IGP), Porto Alegre – RS

✓ 2002 / 2007

Farmacêutica colaboradora da Comissão Permanente de Revisão da Farmacopéia Brasileira - CPRFB, atuando na elaboração de monografias e no desenvolvimento de Substâncias Químicas de Referência.

Faculdade de Farmácia – UFRGS, Porto Alegre – RS

✓ 2000 / 2002

Farmacêutica responsável pelo serviço de farmácia hospitalar, atuando na dispensação interna de medicamentos e insumos médico-hospitalares.

Clínica Psiquiátrica São José, Porto Alegre – RS

