

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

**CITALOPRAM: DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS  
ANALÍTICOS, PERFIL DE DISSOLUÇÃO, SEPARAÇÃO ENANTIOMÉRICA E  
ESTUDO PRELIMINAR DE FOTOESTABILIDADE PARA A FORMA  
FARMACÊUTICA COMPRIMIDO**

JÚLIA MENEGOLA

PORTO ALEGRE, 2007

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

**CITALOPRAM: DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS  
ANALÍTICOS, PERFIL DE DISSOLUÇÃO, SEPARAÇÃO ENANTIOMÉRICA E  
ESTUDO PRELIMINAR DE FOTOESTABILIDADE PARA A FORMA  
FARMACÊUTICA COMPRIMIDO**

Dissertação apresentada por  
**Júlia Menegola**  
para obtenção do GRAU DE MESTRE  
em Ciências Farmacêuticas

Orientador: Profa. Dr. Elfrides Eva Scherman Schapoval

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 04 de maio de 2007 pela Banca Examinadora constituída por:

Prof. Dr. Pedro Eduardo Fröhlich

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Helder Ferreira Teixeira

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Anil Kumar Singh

Universidade de São Paulo

M541c Menegola, Júlia

Citalopram: desenvolvimento e validação de métodos analíticos, perfil de dissolução, separação enantiomérica e estudo preliminar de fotoestabilidade para a forma farmacêutica comprimido / Júlia Menegola – Porto Alegre: UFRGS, 2007. – xxv, 151p: il.

Dissertação (mestrado). UFRGS. Faculdade de Farmácia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

1.Validação: métodos de análise de fármacos. 2.Citalopram 3. Dissolução. 4.Separação enantiomérica. 5.Comprimidos. 6. Fotoestabilidade. I. Schapoval, Elfrides Eva Scherman. II. Título.

CDU : 615.2.07

Bibliotecárias responsáveis:

Margarida Maria Cordeiro Fonseca Ferreira, CRB 10/480

Heloísa do Canto Canabarro, CRB 10/1036

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Ensino e Pesquisa em Controle de Qualidade da Faculdade de Farmácia, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e no Laboratório de Controle Físico e Químico de Qualidade de Medicamentos e Cosméticos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.



“Todo mundo tem oportunidade de ser tão grande quanto deseja”

Pai



Aos meus pais João e Laurinda e aos meus irmãos Bruno e Afonso por serem a  
base das minhas conquistas.





## **AGRADECIMENTOS**

A elaboração deste trabalho envolveu a colaboração de várias pessoas sem as quais a sua realização teria sido prejudicada. Quero agradecer especialmente:

Aos meus pais, João Menegola Sobrinho e Laurinda Menegola, pelo amor, dedicação, incentivo e exemplo de vida. Aos meus irmãos, Bruno Menegola, pela ajuda na formatação desta dissertação e outros auxílios de informática, e ao Afonso Menegola, pela torcida e companheirismo. Ao meu namorado, Fernando Henrique Accacio, pelo amor, paciência e, principalmente, pela amizade e companheirismo.

À minha orientadora, professora, mentora e amiga Profa. Dr. Elfrides Eva Scherman Schapoval, pela oportunidade, ensinamentos, exemplo de profissionalismo e por estar sempre acompanhando meu desenvolvimento profissional.

Aos professores do Laboratório de Ensino e Pesquisa em Controle de Qualidade (LEPCQ), Prof. MSc. Tércio P. Oppe, Profa. Dr. Nádia Volpato e em especial ao Prof. Dr. Martin Steppe pela dedicação e auxílio a esta dissertação. Ao Prof. Dr. Anil K. Singh pela amizade e colaboração a este trabalho.

Aos meus amigos do LEPCQ: Cristiane de Bona, Vanessa Weisheimer, Cássia Virgínia Garcia, Ana Rita Breier, Juliana Sippel, Clésio S. Paim, Marcelo D. Malesuik, Magda T. Martins, Andréas L. Mendez, Lauren C. Vaucher, Juliana Roman, Alini Dall, Heloísa Gonçalves, Letícia Sfair, Mariana Sönksen, pela amizade, acolhimento, auxílio e, principalmente, pelos conhecimentos adquiridos.

À minha amiga Paula Pierozan, pela amizade e companheirismo. Ao Osvaldo P. Accacio e Ethel C. Janos pelo auxílio e incentivo.

Aos meus colegas do REBLAS Lorena Frattini, Leila Ferreira e Ana Carolina Piñeyro pela colaboração.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, participaram da realização desta importante etapa da minha vida.



## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	xv
LISTA DE TABELAS .....	xix
LISTA DE ABREVIATURAS .....	xxi
RESUMO.....	xxiii
ABSTRACT .....	xxv
1. Introdução.....	1
1.1. Objetivos.....	4
1.1.1. Objetivo geral .....	4
1.1.2. Objetivos específicos.....	4
2. Revisão.....	5
2.1. Considerações gerais.....	5
2.1.1. Depressão .....	5
2.1.2. Ansiedade.....	7
2.1.3. Antidepressivos .....	8
2.2. Farmacocinética .....	9
2.3. Mecanismo de ação.....	10
2.4. Interações e reações adversas.....	11
2.5. Contra indicações.....	12
2.6. Descrição.....	12
3. CAPÍTULO I – CARACTERIZAÇÃO DA SUBSTÂNCIA QUÍMICA DE REFERÊNCIA (SQR) E ANÁLISE QUALITATIVA DO CITALOPRAM EM COMPRIMIDOS .....	15
3.1. Introdução.....	15
3.2. Caracterização da SQR.....	16
3.2.1. Substância química de referência .....	16
3.2.2. Espectroscopia na região do infravermelho.....	16
3.2.3. Determinação do ponto de fusão.....	18
3.2.4. Espectrofotometria na região do ultravioleta .....	20
3.3. Identificação da amostra.....	22
3.3.1. Produto farmacêutico.....	22
3.3.2. Cromatografia em camada delgada .....	22

3.3.3. Espectrofotometria na região do ultravioleta .....	24
3.3.4. Cromatografia líquida .....	25
4. CAPÍTULO II – DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA DE ANÁLISE QUANTITATIVA.....	27
4.1. Introdução.....	27
4.2. Produto farmacêutico.....	30
4.3. Solventes e reagentes.....	30
4.4. Equipamentos e acessórios.....	31
4.5. Espectrofotometria no ultravioleta .....	32
4.5.1. Validação do método analítico.....	32
4.5.2. Resultados e discussão.....	36
4.6. Cromatografia líquida (CL) .....	41
4.6.1. Validação de método analítico.....	42
4.6.2. Resultados e discussão.....	48
4.7. Comparação dos métodos propostos.....	59
5. CAPÍTULO III – DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA DE SEPARAÇÃO ENANTIOMÉRICA PARA O CITALOPRAM.....	61
5.1. Introdução.....	61
5.2. Materiais e Métodos .....	65
5.2.1. Produtos farmacêuticos .....	65
5.2.2. Solventes e reagentes .....	66
5.2.3. Equipamentos e acessórios.....	66
5.2.4. Desenvolvimento do método de separação dos enantiômeros .....	67
5.2.5. Resultados e discussão.....	69
6. CAPÍTULO IV – DESENVOLVIMENTO e VALIDAÇÃO DE MÉTODO DE DISSOLUÇÃO PARA COMPRIMIDOS .....	85
6.1. Introdução.....	85
6.1.1. Ensaio de dissolução.....	85
6.1.2. Comparação de perfis de dissolução.....	88
6.2. Materiais e Métodos .....	91
6.2.1. Produto farmacêutico.....	91
6.2.2. Solventes e reagentes .....	91
6.2.3. Equipamentos e acessórios.....	91
6.3. Desenvolvimento do método para o teste de dissolução.....	92
6.3.1. Avaliação da influência do filtro .....	93

6.3.2. Avaliação da estabilidade de soluções da SQR e amostras no meio de dissolução.....	94
6.3.3. Condições do ensaio de dissolução .....	95
6.4. Validação do método de dissolução .....	96
6.4.1. Especificidade .....	97
6.4.2. Linearidade.....	97
6.4.3. Exatidão.....	98
6.4.4. Precisão.....	98
6.4.5. Robustez .....	99
6.5. Comparação de perfis de dissolução .....	99
6.5.1. Amostras utilizadas no estudo.....	99
6.5.2. Perfil de dissolução.....	100
6.5.3. Uniformidade de doses unitárias das amostras.....	100
6.6. Resultados e discussão.....	100
7. CAPÍTULO V – ESTUDO PRELIMINAR DE ESTABILIDADE .....	123
7.1. Introdução.....	123
7.2. Produtos farmacêuticos .....	125
7.3. Solventes e reagentes.....	125
7.4. Equipamentos e acessórios.....	125
7.5. Desenvolvimento do estudo de degradação.....	126
7.6. Cálculos da cinética de degradação.....	127
7.7. Resultados e discussão.....	127
8. DISCUSSÃO GERAL .....	133
9. CONCLUSÕES .....	139
10. REFERÊNCIAS .....	141



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 - Estrutura química do citalopram.....	2
Figura 2.1 - Estrutura química da serotonina.....	6
Figura 2.2 - Local de ação dos ISRS.....	10
Figura 2.3 - Estrutura química da fluoxetina.....	13
Figura 3.1 – Espectro na região do infravermelho da SQR do citalopram.....	17
Figura 3.2 – Curva de DSC da SQR do citalopram, obtida em atmosfera de nitrogênio com fluxo de 50,0 ml/min, razão de aquecimento = 10°C/min, porta amostra de alumínio selado.....	20
Figura 3.3 – Espectros na região do ultravioleta da SQR do citalopram, na concentração de 10,0 µg/ml, utilizando como solvente água (A), etanol (B) e ácido clorídrico 0,1 M (C).....	21
Figura 3.4 – Cromatogramas obtidos por cromatografia em camada delgada (CCD) na análise do citalopram SQR (SQR), citalopram em comprimidos (A) e fluoxetina SQR (FLUO), utilizando como reveladores a luz UV em 254 nm e o vapor de iodo, respectivamente.....	24
Figura 3.5 – Espectros de absorção na região do ultravioleta da solução SQR de citalopram (A) e solução amostra de citalopram em comprimidos (B), ambas na concentração de 10,0 µg/ml. ....	25
Figura 3.6 – Cromatogramas obtidos com a solução SQR do citalopram (A) e solução amostra de citalopram em comprimidos (B), ambas na concentração de 40,0 µg/ml. Condições cromatográficas: Coluna ACE <sup>®</sup> C <sub>18</sub> (250 x 4,6 mm); fase móvel: solução de trietilamina 0,3%:acetonitrila (55:45, v/v), pH 6,60; fluxo: 1,0 ml/min; detecção: 239 nm; temperatura de 25 °C. CIT: citalopram. ....	26
Figura 4.1 – Sobreposição dos espectros de absorção obtidos por espectrofotometria no ultravioleta das soluções de SQR (CIT) e solução placebo (PLA) obtidos em ácido clorídrico 0,1 M, na concentração teórica de 10,0 µg/ml. ...	37
Figura 4.2 - Representação gráfica da curva padrão do citalopram obtida através do método espectrofotométrico na região do ultravioleta. ....	38
Figura 4.3 - Cromatogramas obtidos com a solução amostra de citalopram na concentração de 40,0 µg/ml (CIT) e com a solução placebo (PLA). Condições cromatográficas: Coluna ACE <sup>®</sup> C <sub>18</sub> (250 x 4,6 mm); fase móvel: solução de trietilamina 0,3%:acetonitrila (55:45, v/v), pH 6,60; fluxo: 1,0 ml/min; detecção: 239 nm; temperatura de 25 °C. ....	52
Figura 4.4 - Cromatograma obtido com a solução SQR na concentração de 40,0 µg/ml (CIT) no tempo zero. Condições cromatográficas: Coluna ACE <sup>®</sup> C <sub>18</sub> (250 x 4,6 mm); fase móvel: solução de trietilamina 0,3%:acetonitrila (55:45, v/v), pH 6,60; fluxo: 1,0 ml/min; detecção: 239 nm; temperatura de 25 °C.....	52



Figura 4.5 - Cromatogramas das degradações forçadas da SQR do citalopram após ser submetido à temperatura de 80 °C por 24 horas (A) e à hidrólise ácida em banho-maria a 70 °C por 4 horas (B). Condições cromatográficas: Coluna ACE <sup>®</sup> C <sub>18</sub> (250 x 4,6 mm); fase móvel: solução de trietilamina 0,3%:acetonitrila (55:45, v/v), pH 6,60; fluxo: 1,0 ml/min; detecção: 239 nm; temperatura de 25 °C. CIT: citalopram. ....	53
Figura 4.6 - Cromatogramas das degradações forçadas da SQR do citalopram após ser submetido à oxidação em banho-maria a 70 °C por 4 horas (A) e à hidrólise básica à temperatura ambiente (B). Condições cromatográficas: Coluna ACE <sup>®</sup> C <sub>18</sub> (250 x 4,6 mm); fase móvel: solução de trietilamina 0,3%:acetonitrila (55:45, v/v), pH 6,60; fluxo: 1,0 ml/min; detecção: 239 nm; temperatura de 25 °C. CIT: citalopram. ....	53
Figura 4.7 - Cromatogramas da degradação forçada da SQR do citalopram após exposição a luz UV por 4 horas. Condições cromatográficas: Coluna ACE <sup>®</sup> C <sub>18</sub> (250 x 4,6 mm); fase móvel: solução de trietilamina 0,3%:acetonitrila (55:45, v/v), pH 6,60; fluxo: 1,0 ml/min; detecção: 239 nm; temperatura de 25 °C. CIT: citalopram. ....	54
Figura 4.8 – Curva de pureza apresentada para a SQR do citalopram após degradação sob a luz UV por 4 horas, indicando a pureza total do pico do fármaco de 0,999997, obtido por CL com comprimento de onda de 239 nm, utilizando a fase móvel: solução de trietilamina 0,3%:acetonitrila (55:45, v/v), pH 6,60; fluxo: 1,0 ml/min; temperatura de 25 °C. ....	54
Figura 4.9 - Representação gráfica da curva padrão do citalopram obtida através do método por cromatografia líquida. ....	55
Figura 4.10 - Cromatogramas obtidos na determinação das concentrações do limite de detecção (A) e do limite de quantificação (B). Condições cromatográficas: Coluna ACE <sup>®</sup> C <sub>18</sub> (250 x 4,6 mm); fase móvel: solução de trietilamina 0,3%:acetonitrila (55:45, v/v), pH 6,60; fluxo: 1,0 ml/min; detecção: 239 nm; temperatura de 25 °C. ....	59
Figura 5.1 – Cromatograma da separação enantiomérica do citalopram utilizando fase móvel constituída por tampão acetato de amônio 50 mM, pH 5,0, com fluxo de 0,8 ml/min. ....	77
Figura 5.2 – Cromatograma da separação enantiomérica do citalopram utilizando fase móvel constituída por tampão acetato de amônio 50 mM: metanol (99:01, v/v), pH 5,0, com fluxo de 0,4 ml/min (A) e 0,8 ml/min (B). ....	78
Figura 5.3 - Cromatograma da separação enantiomérica do citalopram utilizando fase móvel constituída por tampão acetato de amônio 50 mM, pH 5,6, com fluxo de 0,8 ml/min. ....	78
Figura 5.4 - Cromatograma da separação enantiomérica do citalopram utilizando fase móvel constituída por tampão acetato de amônio 60 mM, pH 5,6, com fluxo de 0,6 ml/min. ....	79
Figura 5.5 - Cromatograma da separação enantiomérica do citalopram utilizando fase móvel constituída por tampão acetato de amônio 40 mM, pH 5,6, com fluxo de 0,8 ml/min. ....	79

Figura 5.6 - Cromatograma da separação enantiomérica do citalopram utilizando fase móvel constituída por tampão acetato de amônio 100 mM, pH 5,47, com fluxo de 0,8 ml/min. ....	80
Figura 5.7 - Cromatograma da separação enantiomérica do citalopram utilizando fase móvel constituída por tampão acetato de amônio 100 mM: 2 mM de TEA (A) ou 3 mM de TEA (B) ou 4 mM de TEA (C), pH 5,47, com fluxo de 0,8 ml/min. ....	81
Figura 5.8 - Cromatograma da separação enantiomérica da SQR do citalopram (A) e do citalopram em comprimido (B), utilizando fase móvel constituída por tampão acetato de amônio 100 mM: TEA 4 mM, pH 5,47, com fluxo de 0,8 ml/min. ....	82
Figura 5.9 - Cromatograma da separação enantiomérica da SQR do citalopram e da solução placebo (PLA), utilizando fase móvel constituída por tampão acetato de amônio 100 mM: TEA 4 mM, pH 5,47, com fluxo de 0,8 ml/min. ....	82
Figura 5.10 - Cromatograma da separação enantiomérica do escitalopram (isômero S) em comprimido, utilizando fase móvel constituída por tampão acetato de amônio 100 mM: TEA 4 mM, pH 5,47, com fluxo de 0,8 ml/min. ....	83
Figura 6.1 – Espectros de absorção na região do ultravioleta obtidos com a SQR e amostra simulada de excipientes (ASE) após filtração com papel filtro quantitativo (A) e membrana de 0,45 µm (B) para o teste de dissolução em ácido clorídrico 0,01 M a 37,0 ± 0,5 °C e rotação de 150 rpm, com aparato 2. ....	104
Figura 6.2 – Cromatogramas obtidos com a SQR e amostra simulada de excipientes (ASE) após dissolução em ácido clorídrico 0,01 M a 37,0 ± 0,5 °C e rotação de 150 rpm, com aparato 2. ....	104
Figura 6.3 – Espectros de absorção na região do ultravioleta obtidos com a SQR e amostra simulada de excipientes (ASE) após filtração com papel filtro quantitativo (A) e membrana de 0,45 µm (B) para o teste de dissolução em ácido clorídrico 0,1 M a 37,0 ± 0,5 °C e rotação de 150 rpm, com aparato 2. ....	105
Figura 6.4 – Cromatogramas obtidos com a SQR e amostra simulada de excipientes (ASE) após dissolução em ácido clorídrico 0,1 M a 37,0 ± 0,5 °C e rotação de 150 rpm, com aparato 2. ....	105
Figura 6.5 – Espectros de absorção na região do ultravioleta obtidos com a SQR e amostra simulada de excipientes (ASE) após filtração com papel filtro quantitativo (A) e membrana de 0,45 µm (B) para o teste de dissolução em tampão fosfato (pH 6,8) a 37,0 ± 0,5 °C e rotação de 150 rpm, com aparato 2. ....	106
Figura 6.6 – Cromatogramas obtidos com a SQR e amostra simulada de excipientes (ASE) após dissolução em tampão fosfato (pH 6,8) a 37,0 ± 0,5 °C e rotação de 150 rpm, com aparato 2. ....	106
Figura 6.7 – Perfil de dissolução obtido para o citalopram em comprimidos utilizando aparato 2, 900 ml de meio ácido clorídrico 0,01 M a 37,0 ± 0,5 °C e rotação de 50 rpm. ....	108
Figura 6.8 – Perfil de dissolução obtido para o citalopram em comprimidos utilizando aparato 2, 900 ml de meio tampão acetato (pH 4,1) a 37,0 ± 0,5 °C e rotação de 50 rpm. ....	108

Figura 6.9 – Perfil de dissolução obtido para o citalopram em comprimidos utilizando aparato 2, 900 ml de meio tampão fosfato (pH 6,8) a $37,0 \pm 0,5$ °C e rotação de 50 rpm. ....	109
Figura 6.10 – Comparação dos perfis de dissolução obtido para o citalopram em comprimidos utilizando aparato 2, 900 ml de meio: ácido clorídrico 0,01 M, tampão acetato (pH 4,1) e tampão fosfato (pH 6,8) a $37,0 \pm 0,5$ °C e rotação de 50 rpm. ....	109
Figura 6.11 – Perfil de dissolução obtido para o citalopram em comprimidos utilizando aparato 2, 500 ml de tampão acetato (pH 4,1) a $37,0 \pm 0,5$ °C e rotação de 50 rpm. ....	110
Figura 6.12 – Perfil de dissolução obtido para o citalopram em comprimidos utilizando aparato 2, 900 ml de meio tampão acetato (pH 4,1) a $37,0 \pm 0,5$ °C, rotação de 50 rpm e diferentes tempos de coleta.....	111
Figura 6.13 – Perfil de dissolução obtido para o citalopram em comprimidos utilizando aparato 1, 900 ml de meio tampão acetato (pH 4,1) a $37,0 \pm 0,5$ °C, rotação de 50 rpm. ....	111
Figura 6.14 – Perfil de dissolução obtido para o citalopram em comprimidos utilizando aparato 1, 900 ml de meio ácido clorídrico 0,01 M (A) e 900 ml de tampão fosfato (pH 6,8) (B) a $37,0 \pm 0,5$ °C, rotação de 50 rpm. ....	112
Figura 6.15 – Perfil de dissolução obtido para o citalopram em comprimidos utilizando aparato 1, 900 ml de meio de dissolução ácido clorídrico 0,1 M a $37,0 \pm 0,5$ °C e rotação de 50 rpm.....	112
Figura 6.16 – Perfil de dissolução obtido para o citalopram em comprimidos utilizando aparato 1, 900 ml de meio ácido clorídrico 0,1 M a $37,0 \pm 0,5$ °C, rotação de 50 rpm e tempos de coleta de 5, 9, 12, 15, 20, 25 e 30 minutos. ....	113
Figura 6.17 – Comparação dos perfis de dissolução obtidos para o citalopram em comprimidos utilizando aparato 1, 900 ml de meio: ácido clorídrico 0,01 M e 0,1 M, tampão acetato (pH 4,1) e tampão fosfato (pH 6,8) a $37,0 \pm 0,5$ °C, rotação de 50 rpm. ....	113
Figura 6.18 – Representação gráfica da curva padrão do citalopram obtida através de cromatografia líquida. ....	115
Figura 6.19 – Representação gráfica das percentagens dissolvidas de citalopram nos comprimidos em 900 ml de meio ácido clorídrico 0,1 M a $37,0 \pm 0,5$ °C, aparato 1 com rotação de 50 rpm,.....	119
Figura 7.1 – Cromatogramas obtidos para a amostra de citalopram no tempo zero (A) e para a amostra de citalopram em comprimidos degradada após 7 horas de exposição à luz UV (B). CIT: citalopram. ....	129
Figura 7.2 - Cromatogramas obtidos com a solução amostra de citalopram na concentração de 50,0 µg/ml (CIT) e solução placebo (PLA). ....	130
Figura 7.3 – Gráficos da concentração (A) – cinética de ordem zero, log da concentração (B) – cinética de primeira ordem e inverso da concentração (C) – cinética de segunda ordem do citalopram <i>versus</i> tempo.....	131

## LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1 - Sistemas cromatográficos desenvolvidos para a quantificação do citalopram, em fluidos biológicos referenciados na literatura. ....	28
Tabela 4.2 - Métodos por cromatografia líquida e espectrofotometria no ultravioleta desenvolvidos para a quantificação do citalopram, na forma farmacêutica comprimido, referenciados na literatura. ....	30
Tabela 4.3 - Condições otimizadas para execução do método por espectrofotometria na região do ultravioleta. ....	32
Tabela 4.4 - Preparo das soluções para o teste de recuperação do citalopram por espectrofotometria no ultravioleta. ....	35
Tabela 4.5 - Valores de absorvâncias obtidas na determinação da curva padrão do citalopram por espectrofotometria no ultravioleta. ....	38
Tabela 4.6 - Resultados da curva padrão, obtidos pelo método dos mínimos quadrados, para o método por espectrofotometria no ultravioleta. ....	39
Tabela 4.7 – Análise de variância das absorvâncias obtidas na curva padrão do citalopram por espectrofotometria no ultravioleta. ....	39
Tabela 4.8 – Valores experimentais referentes à determinação de citalopram por espectrofotometria no ultravioleta. ....	40
Tabela 4.9 – Valores experimentais do teste de recuperação realizado por espectrofotometria no ultravioleta. ....	40
Tabela 4.10 - Condições otimizadas para execução do método por cromatografia líquida. ....	41
Tabela 4.11 - Preparo das soluções para o teste de recuperação do citalopram por cromatografia líquida. ....	46
Tabela 4.12 – Valores experimentais dos parâmetros cromatográficos obtidos durante o desenvolvimento do método analítico por cromatografia líquida. ....	49
Tabela 4.13 - Áreas absolutas obtidas na determinação da curva padrão do citalopram por cromatografia líquida. ....	55
Tabela 4.14 - Resultados da curva padrão, obtidos pelo método dos mínimos quadrados, para o método por cromatografia líquida. ....	56
Tabela 4.15 – Análise de variância das áreas absolutas determinadas para obtenção da curva padrão do citalopram por cromatografia líquida. ....	56
Tabela 4.16 – Valores experimentais referentes à determinação de citalopram por cromatografia líquida, para a avaliação da precisão intra e interdia. ....	57
Tabela 4.17 – Valores experimentais do teste de recuperação realizado por cromatografia líquida. ....	58
Tabela 4.18 – Valores experimentais obtidos no estudo da robustez do método por cromatografia líquida. ....	58

Tabela 4.19 – Resultados obtidos na determinação do citalopram em comprimidos por espectrofotometria na região do ultravioleta e cromatografia líquida.....	60
Tabela 5.1 - Separações do citalopram por CL segundo a literatura.....	64
Tabela 5.2 - Separações do citalopram por EC segundo a literatura. ....	65
Tabela 5.3 - Ensaios preliminares para a separação enantiomérica do citalopram utilizando a coluna tipo Pirkle Whelk-O 1 <sup>®</sup> .....	71
Tabela 5.4 - Ensaios preliminares para a separação enantiomérica do citalopram utilizando a coluna Chiral - AGP <sup>TM®</sup> .....	75
Tabela 6.1 – Valores experimentais obtidos nas avaliações dos filtros utilizados para filtração de SQR e amostras por espectrofotometria no ultravioleta em ácido clorídrico 0,01 e 0,1 M. ....	102
Tabela 6.2 – Valores experimentais obtidos nas avaliações dos filtros utilizados para filtração de SQR e amostras por espectrofotometria no ultravioleta em tampão acetato (pH 4,1) e tampão fosfato (pH 6,8). ....	102
Tabela 6.3 - Valores experimentais obtidos na determinação da estabilidade da SQR e amostra de comprimido por cromatografia líquida.....	103
Tabela 6.4 – Leituras de absorvâncias obtidas na avaliação da especificidade do método por espectrofotometria no UV nos diferentes meios de dissolução. ....	107
Tabela 6.5 – Áreas absolutas obtidas na determinação da curva padrão do citalopram por cromatografia líquida. ....	114
Tabela 6.6 – Resultados da curva padrão, obtidos pelo método dos mínimos quadrados, para o método por cromatografia líquida. ....	115
Tabela 6.7 – Análise de variância das áreas absolutas determinadas para obtenção da curva padrão do citalopram por cromatografia líquida. ....	115
Tabela 6.8 – Valores experimentais do teste de recuperação realizado nas amostras simuladas de excipientes de comprimidos de citalopram por cromatografia líquida. ....	116
Tabela 6.9 – Valores experimentais referentes à determinação de citalopram por cromatografia líquida, para a avaliação da precisão intra e interdia.....	117
Tabela 6.10 – Valores das percentagens dissolvidas (%) dos comprimidos de citalopram obtidas por cromatografia líquida. ....	118
Tabela 6.11 – Comparação dos perfis de dissolução dos comprimidos de dissolução através da eficiência de dissolução (ED), fator de diferença ( $f_1$ ) e fator de semelhança ( $f_2$ ). ....	120
Tabela 6.12 - Análise de variância dos resultados experimentais obtidos para eficiência de dissolução dos comprimidos de citalopram. ....	120
Tabela 6.13 – Teste de Tukey aplicado aos valores de eficiência de dissolução encontradas para comprimidos. ....	120
Tabela 7.1 – Resultados da concentração residual do citalopram em água pH 1,85 após as amostras serem submetidas à fotodegradação, utilizando o método por cromatografia líquida.....	128

## LISTA DE ABREVIATURAS

ACN	Acetonitrila
ANOVA	Análise de variância
ASE	Amostra simulada de excipiente
BPFM	Boas práticas de fabricação de medicamentos
CAS	Chemical Abstracts Service
CCD	Cromatografia em camada delgada
CIT	Citalopram
CL	Cromatografia líquida
DAD	Diode array detector
DPR	Desvio padrão relativo
DSC	Calorimetria exploratória diferencial
EC	Eletroforese capilar
ED	Eficiência de dissolução
FDA	Food and Drug Administration
ICH	International Conference on Harmonization
IMAO	Inibidores da monoamino - oxidase
ISRS	Inibidor seletivo da recaptação de seotonina
IV	Infravermelho
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
PLA	placebo
r	Coefficiente de correlação de Pearson
Rf	Fator de retenção
SQR	Substância química de referência
TEA	Trietilamina
USP	The United States Pharmacopeia
UV / VIS	Ultravioleta / Visível



## RESUMO

Citalopram: desenvolvimento e validação de métodos analíticos, perfil de dissolução, separação enantiomérica e estudo preliminar de fotoestabilidade para a forma farmacêutica comprimido

Neste trabalho foram desenvolvidos ensaios para a análise qualitativa do citalopram utilizando espectrofotometria na região do ultravioleta, cromatografia em camada delgada e cromatografia líquida (CL); caracterização da SQR do citalopram por espectrometria na região do infravermelho, espectrofotometria na região do ultravioleta e determinação do ponto de fusão. Foram validados métodos para determinação quantitativa do citalopram em comprimidos por espectrofotometria no UV e CL. No método espectrofotométrico o fármaco foi dissolvido em ácido clorídrico 0,1 M e sua concentração foi avaliada em 239 nm. O sistema por CL foi conduzido isocraticamente com coluna com fase reversa C<sub>18</sub> (250 x 4,6 mm), usando fase móvel composta de solução de trietilamina 0,3%:acetonitrila (55:45, v/v), pH 6,60, com fluxo de 1,0 ml/min e detecção em 239 nm. Não houve diferença significativa entre os métodos. Desenvolveu-se e validou-se, também, teste de dissolução do fármaco em comprimido, utilizando como meio de dissolução 900 ml de ácido clorídrico 0,1 M a 37 ± 0,5 °C, aparato 1, rotação de 50 rpm e quantificação por CL. Os métodos apresentaram especificidade, linearidade, exatidão, precisão e robustez adequadas. A comparação dos perfis de dissolução com algumas formulações disponíveis no mercado evidenciaram que os produtos não apresentam perfis de dissolução semelhante ao medicamento de referência. Desenvolveu-se método de separação enantiomérica para o citalopram utilizando-se a coluna Chiral - AGP<sup>TM</sup>® e fase móvel contendo tampão acetato de amônio 100 mM:trietilamina 4 mM, pH 5,47, fluxo de 0,8 ml/min e detecção em 239 nm. Este sistema permitiu a separação dos enantiômeros com seletividade e especificidade. A cinética de fotodegradação, utilizando a lâmpada de UV em 254 nm, para os comprimidos de citalopram em solução aquosa pH 1,85, pode ser descrita como uma reação de ordem zero.

Palavras-chaves: citalopram, cromatografia líquida, espectrofotometria na região do ultravioleta, separação enantiomérica, dissolução, fotoestabilidade.





## ABSTRACT

Citalopram: development and validation of analytical methods, dissolution profile, enantiomeric separation and preliminary photostability study to the pharmaceutical dosage form

In this work were developed analytical methods for qualitative analysis of citalopram by ultraviolet spectrophotometry, thin layer chromatography and liquid chromatography (LC). Citalopram reference standard was characterized by infrared spectrophotometry, determination of melting point and ultraviolet spectrophotometry. Quantitative Methodologies for determination of citalopram in tablets were validated by: ultraviolet spectrophotometry and LC. In the spectrophotometry method the drug was extracted in 0.1 M hydrochloric acid and its concentration was measured at 239 nm. The LC system was operated isocratically in reverse phase C<sub>18</sub> (250 x 4.6 mm), using a mobile phase composed of triethylamine solution 0.3%:acetonitrile (55:45, v/v), pH 6.60, at a flow rate of 1.0 ml.min<sup>-1</sup> and detection at 239 nm. No significant difference between the results obtained by the two methods. Moreover, a method for the dissolution test of citalopram in tablets was developed and validated. Dissolution studies were conducted by basket method at 37 ± 0.5 °C in 900 ml of 0.1 M hydrochloric acid at 50 rpm and the quantification was achieved by LC. These three methods showed good specificity, linearity, accuracy, precision and robustness. The dissolution profile comparison with some available commercial formulations evidenced that the profiles were not similar to the reference product. The enantiomeric separation of citalopram was developed using a Chiral - AGP™ column and a mobile phase composed of 100 mM ammonium acetate buffer and 4 mM triethylamine, pH 5.47, at a flow rate of 0.8 ml.min<sup>-1</sup> and detection at 239 nm. This system showed good enantiomeric separation with selectivity and specificity. The kinetics of photodegradation under UV light at 254 nm to citalopram in water pH 1.85 solution, can be described by zero-order kinetics.

Keywords: citalopram, liquid chromatography, ultraviolet spectrophotometry, enantiomeric separation, dissolution, photostability.



## 1. INTRODUÇÃO

A qualidade tornou-se um tema de extrema relevância em todos os ramos de atividade. Na área farmacêutica, tanto no processo de desenvolvimento de novos fármacos e formas farmacêuticas (estudo de formulação, estabilidade) como no processo de fabricação destes medicamentos, o controle de qualidade é indispensável para garantir ao consumidor a qualidade dos produtos que recebe (AVENDAÑO, 1993).

Dentre os objetivos do controle de qualidade está a obtenção de medicamentos melhores, mais eficazes, menos tóxicos e mais estáveis e, principalmente, a garantia do conteúdo da substância ativa nas especialidades disponíveis no mercado. O controle de qualidade do medicamento é um processo complexo, e para que se tenha confiabilidade nos resultados de uma análise, devem-se fazer várias considerações em relação às amostras, ao método empregado e ao analista (OHLWEILER, 1984; SANTORO, 1988).

A validação de ensaios de controle de qualidade é essencial na fabricação de produtos farmacêuticos, registro de novos medicamentos, bem como em laboratórios de controle de qualidade, pois é uma ferramenta que demonstra que o método é apropriado para a finalidade pretendida. A disponibilidade de literatura relacionada com a validação de métodos analíticos (ICH, 2005; BRASIL, 2003b e USP 29, 2006) facilita o entendimento e a execução deste processo. Segundo a Resolução da Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária 899/03, os estudos de validação constituem parte essencial das Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos (BPFM) e devem ser conduzidos de acordo com protocolos pré-definidos (BRASIL, 2003a).

O controle de qualidade também abrange estudos de estabilidade, objetivando a avaliação do comportamento do produto frente a fatores que possam ocasionar degradação, possibilitando, assim, a verificação do perfil de degradação

do fármaco, o isolamento e a identificação dos produtos de degradação (RHODES, 2000).

O uso de fármacos com eficácia em distúrbios psiquiátricos tornou-se disseminado a partir da década de 50 (BALDESSARINI, 2003). Estudos epidemiológicos de grande escala mostram que a depressão e os distúrbios de ansiedade juntos são as condições clínicas que mais aparecem no mundo (HOLSBOER, 2004). A depressão é uma doença comum que aflige 5 - 6% da população. É estimado que 10 - 15% das pessoas têm experiência de depressão alguma vez durante a vida (WALLACE, 2000).

A introdução dos ISRS na década de 80 mudou radicalmente o tratamento de transtornos depressivos em todo mundo, surgindo como medicamentos de primeira escolha no tratamento da depressão (VASWANI *et al.*, 2003) e nos distúrbios do humor como: distúrbio obsessivo compulsivo, distúrbio do pânico, fobia social, distúrbio do estresse pós-traumático, distúrbios pré-menstruais e ansiedade generalizada (SANZ *et al.*, 2005).

Os ISRS são um grupo de fármacos com a propriedade comum de bloquear a recaptação de serotonina sem afetar outros neurotransmissores (WILSON *et al.*, 2004). Após a introdução da fluvoxamina, em 1983, fluoxetina tornou-se amplamente utilizada seguida de paroxetina, citalopram e sertralina (HIEMKE; HARTTER, 2000).

O citalopram (Cipramil<sup>®</sup>), Figura 1.1, é um racemato (mistura de S e R enantiômeros) e o mais seletivo dos ISRS (ANDERSON, 1999). É comercializado no Brasil na forma farmacêutica comprimido contendo 20 mg ou 40 mg (DEF 2004/2005).

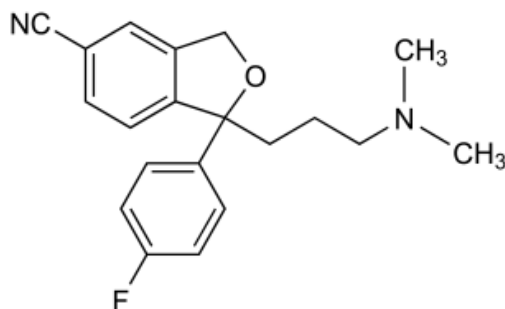


Figura 1.1 - Estrutura química do citalopram (MOFFAT *et al.*, 2004).

No mercado brasileiro o citalopram encontra-se comercializado por vários laboratórios e, em face de fatores econômicos, torna-se interessante a utilização de genéricos e similares como alternativa aos produtos inovadores, desde que garantam segurança e eficácia equivalentes. Neste contexto, é fundamental ressaltar a importância do estudo de dissolução para os comprimidos de citalopram, a fim de verificar, através da comparação dos perfis de dissolução, a equivalência entre o medicamento referência e os medicamentos genéricos e similares.

Os comprimidos devem cumprir com as especificações atualizadas da Farmacopéia Brasileira ou outros códigos autorizados pela legislação vigente. Na ausência de monografia oficial, torna-se imprescindível o desenvolvimento e a validação de métodos, para que se possa avaliar a qualidade de produtos farmacêuticos desde a matéria – prima até a forma farmacêutica e, posterior, garantia da manutenção da estabilidade.

Apesar de sua utilização e importância terapêutica, o citalopram não consta nos códigos oficiais, sendo poucos os relatos na literatura de métodos para a análise isolada deste fármaco na sua forma farmacêutica comprimido. Por essa razão, buscou-se desenvolver e validar metodologia analítica para determinação do citalopram em comprimidos, cujos resultados estão apresentados no Capítulo II. Visou-se, também, realizar a separação dos enantiômeros do citalopram em comprimidos e matéria – prima, apresentado no Capítulo III, devido à importância do emprego de fármacos isomericamente puros, sendo que, para o citalopram, o enantiômero S (+) (escitalopram) é o responsável pela atividade antidepressiva e ansiolítica. Foi realizada a avaliação dos comprimidos por meio de ensaios de dissolução e comparação com alguns produtos disponíveis no mercado nacional, apresentado no Capítulo IV. Estudo preliminar de estabilidade, através da determinação da cinética de fotodegradação do citalopram está descrito no Capítulo V. Com base nestes estudos, este trabalho pretende ser uma importante contribuição para o controle de qualidade deste medicamento.

## **1.1. Objetivos**

### **1.1.1. Objetivo geral**

Desenvolver e validar metodologia para avaliar a qualidade dos comprimidos de citalopram.

### **1.1.2. Objetivos específicos**

- Caracterizar a SQR do citalopram por calorimetria exploratória diferencial (DSC), espectrometria na região do infravermelho e espectrofotometria na região do ultravioleta;
- Desenvolver método por cromatografia em camada delgada para identificação do citalopram em comprimidos;
- Desenvolver método por espectrofotometria na região do ultravioleta para identificação do citalopram em comprimidos;
- Desenvolver método por cromatografia a líquido para identificação do citalopram em comprimidos;
- Desenvolver e validar método por espectrofotometria na região do ultravioleta para determinação quantitativa citalopram em comprimidos;
- Desenvolver e validar método por cromatografia a líquido para quantificação do citalopram em comprimidos;
- Realizar estudo comparativo dos métodos propostos;
- Desenvolver método de separação enantiomérica para a SQR do citalopram e do citalopram em comprimidos;
- Desenvolver e validar método de dissolução para os comprimidos de citalopram;
- Realizar estudo comparativo de perfis de dissolução dos comprimidos de citalopram disponíveis no mercado;
- Realizar estudo preliminar de fotoestabilidade para os comprimidos de citalopram.

## **2. REVISÃO**

### **2.1. Considerações gerais**

#### **2.1.1. Depressão**

A depressão é uma síndrome complexa de gravidade amplamente variável (BALDESSARINI, 2003). Até a introdução da terapia eletroconvulsiva na década de 30, não havia tratamento disponível para a depressão. Em 1951, observou-se que a isoniazida e seu derivado isopropílico iproniazida, usados como fármacos tuberculostáticos, melhoravam o humor dos pacientes. Em 1952, foi demonstrado que a iproniazida era capaz de inibir a enzima monoamino-oxidase (MAO) levando ao aumento do nível cerebral de noradrenalina e serotonina. O efeito antidepressivo da imipramina foi descoberto por Kuhn, em 1957, com isso, ocorreu uma mudança radical na terapêutica das depressões; progressivamente, houve uma quase completa substituição dos IMAO pela imipramina e seus derivados tricíclicos. Na atualidade, uma série de agentes inovadores, como os inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRS) dominam o tratamento dos transtornos depressivos (SILVA, 1985; KOROLKOVAS, 1988; BALDESSARINI, 2003).

Os distúrbios do humor incluem as síndromes de depressão maior e o distúrbio bipolar (BALDESSARINI, 2003). Entre 1987 e 1997, houve um grande aumento de pacientes que receberam tratamento para depressão maior, que se caracteriza por sentimentos de intensa tristeza e desespero, lentidão mental e perda da concentração, preocupações pessimistas, falta de prazer, autodepreciação e agitação variável e de 10 - 15% desses pacientes exibem comportamento suicida durante a vida (BALDESSARINI, 2003; FUCHS; WANNMACHER, 2004). O tratamento é caracterizado por um longo intervalo (2 – 3 semanas ou meses) do início do tratamento até que os benefícios clínicos sejam observados, devido ao processo adaptativo nos receptores (WALLACE, 2000; FUCHS; WANNMACHER, 2004).



As observações iniciais de que os antidepressivos bloqueiam a recaptação neuronal ou inibem o metabolismo de norepinefrina ou serotonina levaram à hipótese clássica de que a depressão decorreria da falta desses neurotransmissores no sistema nervoso central (KOROLKOVAS, 1988; BALDESSARINI, 2003; FUCHS; WANNMACHER, 2004). O restabelecimento das funções neuronais envolvidas na regulação do humor ocorre através da ligação destes neurotransmissores aos seus receptores, desencadeando uma cascata de sinais intracelulares que ativam fatores de transcrição, os quais promovem a expressão de genes (VETULANI; NALEPA, 2000).

A serotonina (5-hidroxitriptamina) (5-HT) (Figura 2.1) é o principal neurotransmissor estando relacionada com ansiedade, depressão, esquizofrenia, abuso de drogas, sono, sonhos, atividade alucinógena, dor de cabeça, problemas cardiovasculares e controle do apetite (WALLACE, 2000). Está postulado que a serotonina é um modulador da homeostasia entre dopamina, noradrenalina e GABA. Quando esta homeostasia fica desequilibrada, a depressão aparece (VASWANI *et al.*, 2003).

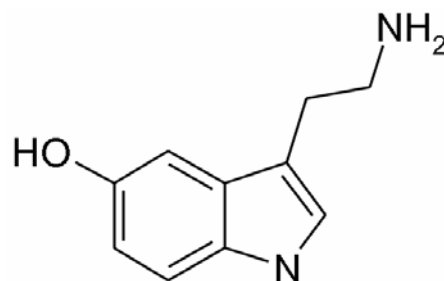


Figura 2.1 - Estrutura química da serotonina (GLENNON; DUKAT, 2002).

A serotonina é biossintetizada a partir de seu precursor L-triptofano e armazenada em vesículas no interior do neurônio. Cada um dos passos da biossíntese e metabolismo de 5-HT são alvos para a manipulação de fármacos. Os alvos terapêuticos incluem os receptores pós-sinápticos, mecanismos de recaptação de 5-HT e metabolismo.

Existem sete famílias de receptores para a serotonina, designados 5-HT<sub>1</sub>, 5-HT<sub>2</sub>, 5-HT<sub>3</sub>, 5-HT<sub>4</sub>, 5-HT<sub>5</sub>, 5-HT<sub>6</sub>, 5-HT<sub>7</sub>, sendo que alguns foram divididos em subgrupos distintos. Entretanto, os sintomas da depressão causados pela depleção

de serotonina, ocorrem devido à sua interação com os receptores 5-HT<sub>2A</sub> e 5-HT<sub>2C</sub> (GLENNON; DUKAT, 2002).

### **2.1.2. Ansiedade**

Ansiedade pode ser definida como um sentido de expectativa apreensiva (BOOTH; NEUMEYER, 2002). Atualmente, assegura-se que a ansiedade tem uma base neurobiológica que envolve o sistema límbico, bem como suas conexões com o sistema monoaminérgico (serotonina, noradrenalina e dopamina). Os sintomas da ansiedade estão geralmente associados à depressão.

A última edição do Manual Estatístico e Diagnóstico dos Distúrbios Mentais (DSM-IV), da Associação Psiquiátrica Americana, subdividiu os distúrbios da ansiedade em: distúrbio da ansiedade generalizada; distúrbio do pânico; distúrbio obsessivo-compulsivo; fobia específica; fobia social; agorafobia sem distúrbio de pânico; distúrbio de estresse pós-traumático; distúrbio de estresse agudo; distúrbio de ansiedade devido a uma condição médica geral; distúrbio de ansiedade induzido por substâncias químicas e distúrbio atípico de ansiedade (BOOTH; NEUMEYER, 2002; FUCHS; WANNMACHER, 2004).

Uma variedade de neurotransmissores, neuromoduladores e neuropeptídeos podem estar envolvidos na patofisiologia da ansiedade. Além dos benzodiazepínicos, são também utilizados no tratamento de distúrbios da ansiedade os antidepressivos ISRS. No desenvolvimento de agentes ansiolíticos que não agem via complexo de receptores GABA<sub>A</sub>, receptores serotoninérgicos (5-HT<sub>1A</sub> está envolvido na modulação da ansiedade) tem sido o foco de pesquisas nos últimos anos, com evidências pré-clínicas e clínicas do envolvimento da serotonina na ansiedade. Os ISRS têm demonstrado serem efetivos no distúrbio obsessivo-compulsivo, distúrbio do pânico e fobia social. O mecanismo de ação dos ISRS em ansiedade, entretanto, podem diferir com sua função no tratamento da depressão e o entendimento dos diversos efeitos psicobiológicos dos ISRS vai depender de um maior entendimento das funções do sistema de receptores de serotonina dentro das diferentes regiões do cérebro (BOOTH; NEUMEYER, 2002; BALDESSARINI, 2003).

### 2.1.3. Antidepressivos

Antidepressivos são medicamentos utilizados para restaurar pacientes mentalmente deprimidos a um estado mental melhorado. Responsáveis pela diminuição da intensidade dos sintomas, da tendência ao suicídio e promoção do bem estar mental (KOROLKOVAS, 1988). São geralmente reservados para distúrbios depressivos mais graves, sendo os resultados mais satisfatórios em pacientes portadores de doenças moderadamente graves, com características endógenas ou melancólicas, sem aspectos psicóticos (BALDESSARINI, 2003).

Os antidepressivos variam em suas propriedades químicas e farmacológicas, sendo divididos em específicos (inibidores da monoamino-oxidase (IMAO), antidepressivos tricíclicos, inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRS), antidepressivos atípicos, inibidores da recaptação de norepinefrina e inibidores da recaptação de serotonina e norepinefrina) e inespecíficos (precursores, potencializadores e outros) (ANDERSON, 1999).

Todos os antidepressivos apresentam eficácia e velocidade de início de resposta similar, porém possuem significantes diferenças em relação aos seus efeitos adversos. A escolha do fármaco a ser utilizado no tratamento da depressão e nos distúrbios de ansiedade é baseada no potencial destes em causar efeitos adversos, segurança, tolerabilidade, toxicidade em super dosagem, resposta prévia do paciente a determinado agente (WALLACE, 2000; FUCHS; WANNMACHER, 2004).

Os ISRS, introduzidos na prática médica em 1988 (SANZ *et al.*, 2005), fluoxetina, fluvoxamina, paroxetina, sertralina e citalopram consistem em aril ou ariloxialquilaminas com similar eficácia e efeitos adversos, porém diferem em suas estruturas químicas e propriedades farmacocinéticas, sendo estas propriedades o critério de escolha entre os ISRS (HIEMKE; HARTTER, 2000). Estes fármacos apresentam uma baixa incidência de efeitos adversos, relativa segurança e tolerabilidade em comparação aos antidepressivos tricíclicos e IMAOS, sendo os medicamentos mais comumente prescritos, sobretudo para pacientes com doença clínica ou potencialmente suicidas, bem como para indivíduos idosos (WALLACE, 2000; BALDESSARINI, 2003).

O citalopram, aprovado pelo Food and Drug Administration (FDA) em 1998 (GUTIERREZ; ABRAMOWITZ, 2000), é o mais seguro inibidor seletivo da recaptação de serotonina, sendo o mais seletivo dentre os ISRS, *in vitro* (CORDIOLI, 1997; HIEMKE; HARTTER, 2000; VASWANI *et al.*, 2003). Eficaz no tratamento da depressão e prevenção de recaída ou recorrência, de distúrbios do pânico com ou sem agorafobia e em distúrbios obsessivo-compulsivo (DEF 2004/2005). Dentro dos ISRS, o citalopram é o mais popularmente prescrito devido ausência de interações concomitantes com outros fármacos e, também, a alta seletividade na inibição da recaptação de serotonina (HEIKKINEN *et al.*, 2002), ou seja, não exerce atividade na recaptação de noradrenalina, dopamina e GABA (RAFFAELE *et al.*, 2002).

Estudos demonstram que o citalopram é eficaz no tratamento de outras doenças que podem ou não estar diretamente relacionadas com a depressão e os distúrbios de ansiedade, como no tratamento da epilepsia (FAVALE *et al.*, 2003); mal de Alzheimer (CASINI *et al.*, 2003), anorexia nervosa (FASSINO *et al.*, 2002), fobia social (BOUWER; STEIN, 1998; VARIA *et al.*, 2002), bulimia nervosa (ANDERSON, 1999) e exerce efeito analgésico (KORZENIEWSKA – RYBICKA; PLAZNIK, 1998).

## **2.2. Farmacocinética**

O citalopram, como outros fármacos lipofílicos, é absorvido facilmente por via oral, com uma biodisponibilidade de, aproximadamente, 80% (VASWANI *et al.*, 2003). Os picos plasmáticos são atingidos dentro de 2 a 4 horas, depois da administração. O volume de distribuição é de 12 a 16 l/kg.

A ligação às proteínas plasmáticas é de 50%. O tempo de meia-vida plasmático é aproximadamente 33 horas, o que permite uma única administração diária do medicamento. Citalopram é metabolizado pelas isozimas do citocromo P450 (CYP), microsômico hepático CYP2C19 (aproximadamente 60%), CYP2D6 (aproximadamente 10%) e CYP3A4 (aproximadamente 30%) (HIEMKE; HARTTER, 2000; BROSEN; NARANJO, 2001; HEIKKINEN *et al.*, 2002; DEF 2004/2005), por N-desmetilação, desaminação e oxidação nos derivados ativos desmetilcitalopram, didesmetilcitalopram, citalopram-N-óxido e um derivado do ácido propiônico. Os metabólitos que apresentam alguma atividade farmacológica não contribuem para os

efeitos antidepressivos do citalopram e também são menos aptos a atravessar a barreira hematoencefálica (PALLANTI *et al.*, 1999). Sua eliminação ocorre, principalmente (65%), pelas fezes. Uma pequena parte (aproximadamente 12%) é eliminada na forma inalterada e na forma de seu principal metabólito ativo desmetilcitalopram, pela urina (DEF 2004/2005).

A relação entre a concentração plasmática e a dose administrada de citalopram é linear (HIEMKE; HARTTER, 2000). Os níveis plasmáticos são alcançados em uma ou duas semanas (DEF 2004/2005). É distribuído em pequenas quantidades no leite materno. Grande ligação aos tecidos tem sido observada e acumulações podem ocorrer com repetição das doses (MOFFAT *et al.*, 2004).

### 2.3. Mecanismo de ação

A ação da serotonina (5-HT) é finalizada pela difusão para longe da sinapse, pela degradação enzimática ou pela recaptação para dentro do terminal sináptico. Seguindo recaptação, a serotonina, dentro do neurônio, pode ser re-armazenada em vesículas ou ser metabolizada. O processo de recaptação envolve proteínas transportadoras de alta afinidade que estão localizadas no terminal pré-sináptico da membrana (Figura 2.2).

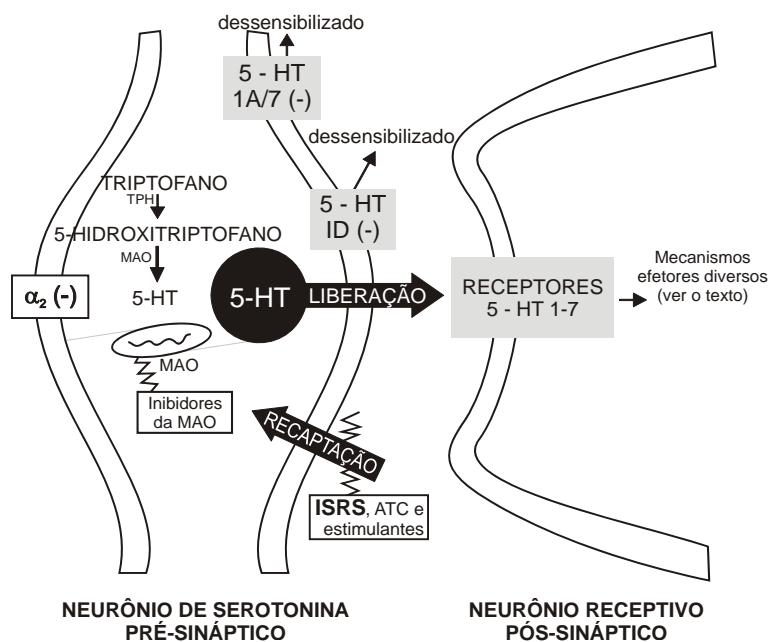


Figura 2.2 - Local de ação dos ISRS (BALDESSARINI, 2003).

O transportador 5-HT está envolvido com problemas afetivos. Agentes que bloqueiam este transportador aumentam os níveis sinápticos de 5-HT, sendo utilizados no tratamento da depressão, comportamento obsessivo-compulsivo e transtornos do pânico. ISRS foram desenvolvidos para inibir a bomba de recaptação de serotonina sem afetar outros neuroreceptores ou canais de sódio, afetados pelos antidepressivos tricíclicos (VASWANI *et al.*, 2003). São antagonistas dos receptores 5-HT<sub>2A</sub> e 5-HT<sub>2C</sub> (envolvido com transtorno do pânico e comportamento obsessivo compulsivo) (GLENNON; DUKAT, 2002).

O citalopram é um potente inibidor da recaptação 5-HT com nenhum ou mínimo efeito sobre a recaptação da noradrenalina, dopamina e ácido gamaminobutírico (GABA). O aumento da disponibilidade sináptica de serotonina estimula grande número de receptores 5-HT pós-sinápticos, resultando tanto em ação terapêutica como em alguns efeitos adversos (GLENNON; DUKAT, 2002; BALDESSARINI, 2003).

#### **2.4. Interações e reações adversas**

O uso deste fármaco com antidepressivos tricíclicos pode levar ao aumento da concentração sérica dos tricíclicos até níveis tóxicos. A interação com IMAOs pode produzir a “síndrome serotoninérgica” que inclui sudorese, contrações musculares, calafrios, tremores, convulsões e coma, podendo, assim, ser fatal (BROSEN; NARANJO, 2001; BALDESSARINI, 2003).

Administração concomitante com outros fármacos que atuam no sistema nervoso central pode acarretar em interações farmacológicas com o citalopram. Metoprolol, cimetidina e inibidores das isozimas CYP3A4 e CYP2C19 apresentam potencial interação farmacocinética com o citalopram, aumentando sua concentração plasmática (BROSEN; NARANJO, 2001). O álcool tem seu efeito potencializado pelo antidepressivo (DRUG INFORMATION, 2000).

O citalopram é um antidepressivo bem tolerado, sendo sua maior vantagem a ausência de efeitos colaterais severos e a segurança em relação ao risco de overdose (VASWANI *et al.*, 2003). Está isento de efeitos anticolinérgicos, cardiotoxicos, sedativos e de ganho de peso (ANDERSON, 1999; RAFFAELE *et al.*, 2002), o que o diferencia dos antidepressivos tricíclicos (SILVA, 1985).

As reações adversas mais comuns relatadas foram náusea, boca seca, insônia, sudorese, disfunção sexual, tremor, diarreia, sonolência, fadiga (CORDIOLI, 1997; DRUG INFORMATION, 2000; DEF 2004/2005).

## 2.5. Contra indicações

O citalopram é contra-indicado em caso de hipersensibilidade ao fármaco e aos demais componentes da formulação, bem como o uso concomitante com IMAOs (DRUG INFORMATION, 2000; DEF 2004/2005). Resultados de estudos clínicos demonstram que não ocorre nenhuma complicação durante a gravidez e lactação para mulheres que estão administrando citalopram; entretanto, é necessário o monitoramento do fármaco para diminuir a exposição fetal (HEIKKINEN *et al.*, 2002).

## 2.6. Descrição (THE MERCK, 2001; MOFFAT *et al.*, 2004)

- Nome químico: 1-[3-(dimetilamino)propil]-1-(4-flúorfenil)-1,3-diidro-5-isso-benzofuranocarbonitrila;
- Registro no Chemical Abstracts Service (CAS): 59729-33-8 (citalopram), 59729-32-7 (bromidrato de citalopram);
- Fórmula molecular:  $C_{20}H_{21}FN_2O$ ;
- Massa molecular: 324,4 (citalopram) e 405,3 (bromidrato de citalopram);
- Composição elementar: C 74,05%; H 6,52%; F 5,86%, N 8,64%; O 4,93%;
- Apresentação e solubilidade: sólido cristalino branco a esbranquiçado, solúvel em clorofórmio e etanol (96%), levemente solúvel em água e praticamente insolúvel em dietiléter;
- Faixa de fusão: 182 – 183 °C;
- pKa: 9,5;

Estudos da relação estrutura-atividade para os ISRS não estão bem estabelecidos. Entretanto, sabe-se que a substituição no anel aromático em posição *para* pelo  $CF_3$  da fluoxetina (Figura 2.3) é decisiva para a potência de bloquear a recaptação de serotonina (BALDESSARINI, 2003).

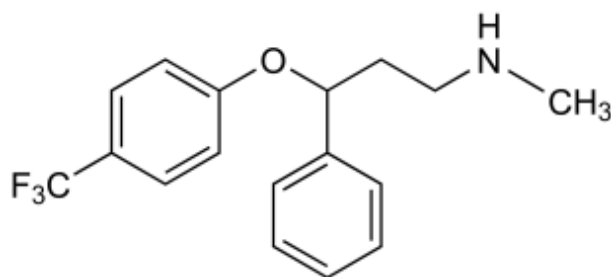


Figura 2.3 - Estrutura química da fluoxetina (MOFFAT *et al.*, 2004).

Na literatura há diversos métodos analíticos desenvolvidos para a análise do citalopram seja em fluidos biológicos ou em forma farmacêutica, concomitantemente com outros ISRS, por cromatografia líquida, eletroforese capilar e espectrofotometria na região do UV – VIS. Estes trabalhos estão descritos no Capítulo II. Os trabalhos relacionados com a separação enantiomérica do citalopram em fluidos biológicos e em forma farmacêutica estão descritos no Capítulo III. Estudos de dissolução *in vitro*, essenciais para a avaliação das propriedades biofarmacêuticas, e comparação dos perfis de dissolução *in vitro* para os comprimidos de citalopram disponíveis no mercado nacional, não foram encontrados na literatura. No Capítulo V está descrito um estudo preliminar de fotoestabilidade desenvolvido para o citalopram em sua forma farmacêutica comprimidos.





### **3. CAPITULO I – CARACTERIZAÇÃO DA SUBSTÂNCIA QUÍMICA DE REFERÊNCIA (SQR) E ANÁLISE QUALITATIVA DO CITALOPRAM EM COMPRIMIDOS**

#### **3.1. Introdução**

O desenvolvimento de um método analítico depende de diversos fatores para oferecer resultados apropriados. Dentre esses, a substância utilizada como referência constitui-se em fator principal. Neste sentido, a pureza da SQR é essencial para a validação de métodos analíticos. De acordo com o FDA, existem duas categorias de SQR: compendiais: as quais são obtidas de fontes como USP e não necessitam de caracterização posterior e as não compendiais, que são aquelas com elevado teor de pureza, mas que devem ser cuidadosamente caracterizadas para garantir sua identidade, potência e pureza (SWARTZ & KRULL, 1998).

No controle de qualidade das formas farmacêuticas é necessária a realização de testes de identificação do fármaco além de sua quantificação. Estes testes são realizados através de métodos instrumentais (espectrofotometria na região do ultravioleta, cromatografia líquida) e não instrumentais, como a cromatografia em camada delgada (CCD).

O objetivo deste estudo é a caracterização da SQR do citalopram, mediante a determinação do ponto de fusão e análise dos espectros de absorção nas regiões do infravermelho e ultravioleta e o desenvolvimento de metodologia que permita a identificação do citalopram em comprimidos, mediante a utilização da cromatografia em camada delgada (CCD), a espectrofotometria no ultravioleta e a cromatografia líquida.

## **3.2. Caracterização da SQR**

### **3.2.1. Substância química de referência**

Utilizou-se como SQR a matéria-prima do bromidrato de citalopram, com teor declarado de 98,41%, identificado pelo lote nº 10862, fornecido pela Indústria Farmacêutica Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos LTDA (Brasil).

### **3.2.2. Espectroscopia na região do infravermelho**

A análise espectrofotométrica no infravermelho (IV) é uma impressão digital, única para cada composto (WATSON, 1999). Por essa razão, é um dos métodos mais empregados na identificação de fármacos, pois é capaz de diferenciar substâncias por menores que sejam as diferenças estruturais, com exceção dos isômeros ópticos.

Com isso, através da análise de um espectro obtido no infravermelho é possível visualizar as bandas características de grupos funcionais que permitem a obtenção de informações estruturais úteis para a identificação de substâncias (PAVIA *et al.*, 2001). Apresenta, porém, como limitação o fato de raramente ser utilizada como método de quantificação de substâncias, devido à relativa dificuldade de preparo da amostra e da complexidade do espectro (WATSON, 1999).

Segundo MOFFAT e colaboradores (2004), as principais bandas de absorção para o citalopram no IV são em 834, 1034, 1226, 1160, 1507, 1601  $\text{cm}^{-1}$ . A Farmacopéia Americana (USP 29, 2006) descreve na monografia do bromidrato de citalopram a espectroscopia na região do infravermelho para identificação da matéria – prima.

- Materiais e métodos

O espectro de absorção na região do infravermelho da SQR do citalopram foi obtido em espectrofotômetro IV SHIMADZU, modelo 8101, utilizando pastilhas de brometo de potássio.

Em geral de ágata foi realizada a mistura de 148,46 mg de brometo de potássio (dessecado a 105 °C, por duas horas) e 1,54 mg da SQR do citalopram. Esta mistura foi transferida para um molde e prensada, formando um disco transparente (indicativo de baixa umidade da amostra) que foi analisado no espectrofotômetro.

- Resultados e discussão

O espectro de absorção do citalopram na região do infravermelho obtido a partir da SQR está apresentado na Figura 3.1.

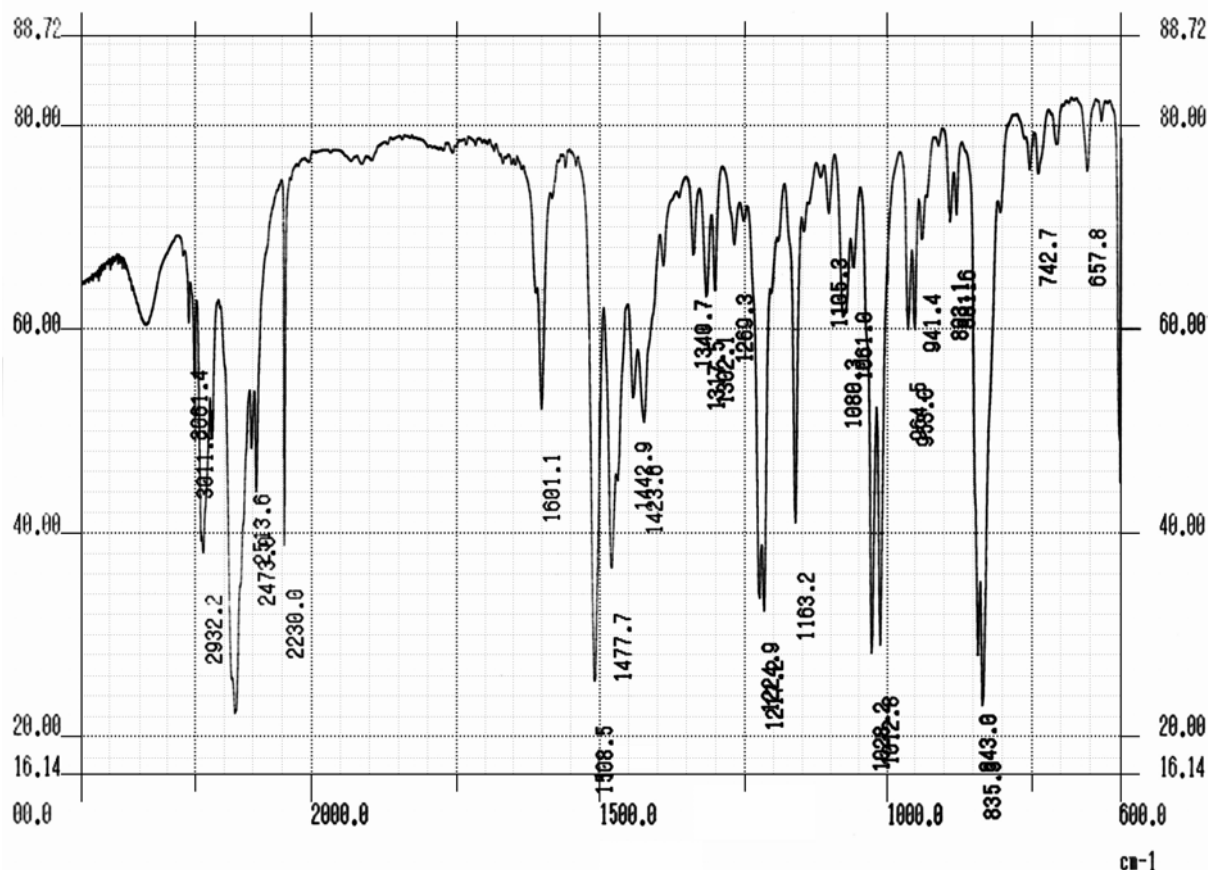


Figura 3.1 – Espectro na região do infravermelho da SQR do citalopram.

As atribuições das principais freqüências características do citalopram foram baseadas na literatura (SILVERSTEIN, 2000; PAVIA *et al.*, 2001, MOFFAT *et al.*, 2004).

As bandas de deformação axial em  $3011\text{ cm}^{-1}$  referem-se às vibrações =C-H de aromático, enquanto que em  $2932\text{ cm}^{-1}$  refere-se à deformação axial das ligações C-H do grupamento metila. Em  $2230\text{ cm}^{-1}$ , é possível observar a presença de uma banda mais aguda, a qual pode ser atribuída às vibrações de deformação axial referente a C≡N ligada ao anel aromático. A banda de absorção presente na faixa de  $1601 - 1508\text{ cm}^{-1}$  pode ser atribuída às vibrações de deformação axial de C=C de aromático e em  $1478 - 1443\text{ cm}^{-1}$  às vibrações de deformação angular de CH<sub>2</sub> e CH<sub>3</sub>. A ligação C-O é responsável pelo aparecimento da banda de absorção em

1225  $\text{cm}^{-1}$  decorrente das vibrações de deformação axial desta ligação. Em 1163  $\text{cm}^{-1}$  e 1029  $\text{cm}^{-1}$ , observam-se as bandas resultantes das vibrações de deformações axiais referentes à ligação C-F e C-N, respectivamente. As bandas em 882 e 836  $\text{cm}^{-1}$  podem ser atribuídas às deformações angulares de C-H fora do plano do benzeno 1,2,4-trissubstituído e do benzeno p-dissubstituído, respectivamente.

O espectro de absorção obtido para a SQR do citalopram na região do infravermelho está de acordo com os dados encontrados na literatura, assegurando a identidade da substância química de referência.

### **3.2.3. Determinação do ponto de fusão**

O ponto de fusão é uma avaliação físico-química que fornece informações do grau de pureza, presença de polimorfos e estabilidade do fármaco, e é utilizada para pesquisar a presença de possíveis contaminantes.

A determinação do ponto de fusão da substância química de referência foi realizada através do aparelho de calorimetria exploratória diferencial (DSC) que avalia o fluxo de calor: energia absorvida (processo endotérmico como a fusão) ou liberada (processo exotérmico como a cristalização) Este equipamento auxilia na identificação de impurezas e polimorfismos além de fornecer com rapidez e maior exatidão o ponto de fusão de uma substância quando comparado com os métodos tradicionais. Para a análise é necessária uma pequena quantidade de amostra que é pesada em um porta – amostra de alumínio, por ser um material de boa condutividade e mínima reação com a amostra (CLAS *et al.*, 1999).

A USP 29 (2006) utiliza a DSC para a determinação das temperaturas de transição e da pureza das amostras.

- **Materiais e métodos**

Foi utilizado o equipamento de DSC SHIMADZU – 60, equipado com controlador de fluxo FC – 60A, integrador TA 60WS e software TA 60 versão 2.0.

Pesou-se 1,15 mg da SQR do citalopram, a qual foi distribuída uniformemente em um porta - amostra de alumínio (capacidade de 4,0  $\mu\text{L}$ ) que foi selado com o uso de uma prensa, assegurando, assim, o contato térmico da amostra. Velocidade de aquecimento de 10  $^{\circ}\text{C}$  / min, que pode ser utilizada para verificar a presença de

impurezas e polimorfos. Baseado na faixa de fusão do citalopram encontrada na literatura, a temperatura máxima estipulada para este teste foi de 250 °C e o tempo de análise de 23 minutos. O ensaio é realizado sob atmosfera inerte de nitrogênio (fluxo de 50,0 ml/min).

- Resultados e discussão

Uma substância é 100% pura quando ela apresenta exatamente o ponto de fusão descrito na literatura. As impurezas na amostra podem ser identificadas pelo DSC frente à diminuição da temperatura de fusão ou calculadas através da equação de van't Hoff. A presença de polimorfismo pode ser identificada quando ocorre transição endotérmica para exotérmica após a fusão do fármaco (CLAS *et al.*, 1999).

Na literatura está descrita a faixa de fusão de 182 a 183 °C para o bromidrato de citalopram (THE MERCK, 2001). No laudo de análise, enviado juntamente com a matéria – prima, há a especificação da faixa de fusão de 182 a 189 °C para o fármaco, e a faixa encontrada pelo fornecedor foi de 184 a 187 °C.

O ponto de fusão fornecido pelo equipamento de DSC é chamado de temperatura de fusão onset ( $T_{onset}$ ), que é a temperatura de interseção da linha de base extrapolada com a extremidade principal da transição extrapolada. Esta temperatura não sofre influência da velocidade de aquecimento (CLAS *et al.*, 1999).

A temperatura de fusão onset encontrada para o bromidrato de citalopram foi de 184,92 °C. A faixa de fusão (184,92 a 190, 58 °C) do bromidrato de citalopram encontra-se próximo ao da literatura, sendo um indicativo da pureza da amostra. Na Figura 3.2 pode-se observar que não ocorreu a transição do processo endotérmico para o exotérmico, indicando a ausência de polimorfos na matéria – prima.

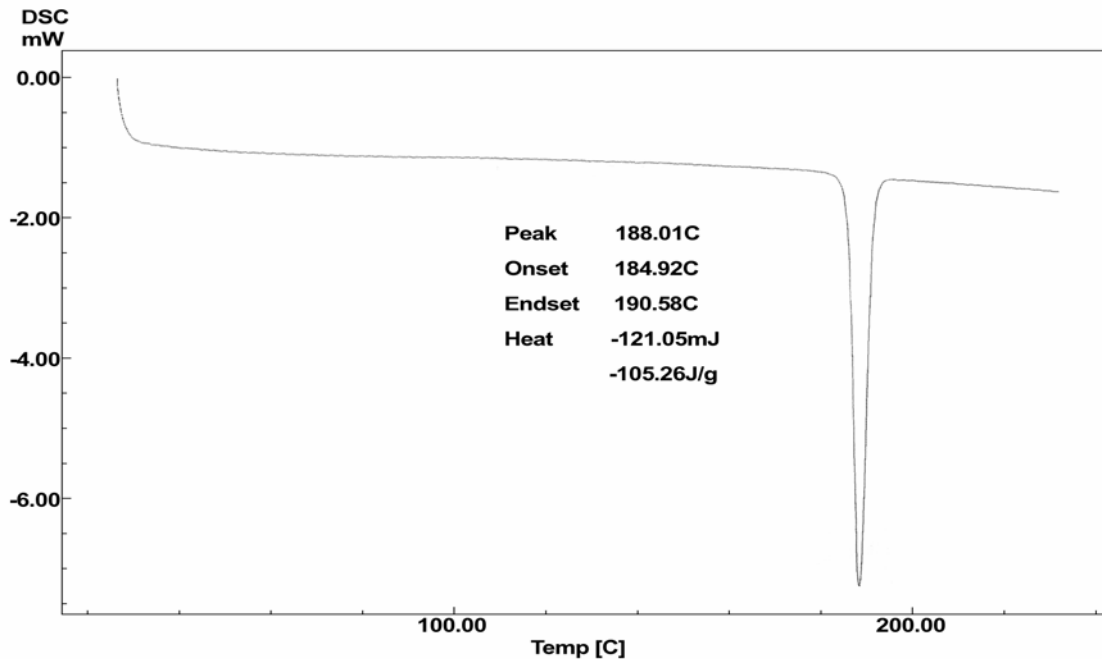


Figura 3.2 – Curva de DSC da SQR do citalopram, obtida em atmosfera de nitrogênio com fluxo de 50,0 ml/min, razão de aquecimento = 10°C/min, porta amostra de alumínio selado.

### 3.2.4. Espectrofotometria na região do ultravioleta

A identificação de um fármaco pode ser feita através da análise do seu espectro de absorção na região do ultravioleta (200 – 400 nm). Com a utilização de alguns solventes (água, etanol, ácido clorídrico 0,1 M), visou-se observar as bandas de absorção máxima do citalopram, assim como a influência do pH em suas características de absorção.

- **Materiais e métodos**

Utilizou-se o espectrofotômetro UV-VIS Shimadzu, modelo UV-160A na análise das amostras. Foram preparadas soluções da SQR do citalopram em água, etanol e ácido clorídrico 0,1 M, obtendo-se concentração final de 10,0 µg/ml, conforme descrito no Capítulo II (item 4.5.1.3). Os espectros de absorção das amostras foram registrados, numa faixa de comprimento de onda de 200 a 400 nm. Empregou-se cubetas de quartzo de 1,0 cm de percurso óptico e o mesmo solvente utilizado no preparo da solução como branco.

- **Resultados e discussão**

Alguns trabalhos encontrados na literatura utilizam o detector de ultravioleta acoplado ao equipamento de cromatografia líquida (CL) ou a eletroforese capilar.

BERZAS e colaboradores (2002), quantificaram o citalopram em comprimidos em soluções aquosas no comprimento de onda de 238 nm. MOFFAT e colaboradores (2004) determinaram o comprimento de onda do citalopram em solução de ácido clorídrico 0,1 M e obtiveram máximos em 205 e 238 nm.

A otimização da espectrofotometria na região do UV para análise qualitativa da SQR do citalopram iniciou com a obtenção dos espectros de absorção deste fármaco nos diferentes solventes citados.

Os espectros do citalopram na concentração de 10,0 µg/ml estão apresentados na Figura 3.3, onde observa-se o mesmo comprimento de onda máximo de 239 nm e absorvâncias de 0,414, 0,411 e 0,512 para as soluções preparadas em água, etanol e ácido clorídrico 0,1 M, respectivamente, estando de acordo com os dados descritos na literatura.

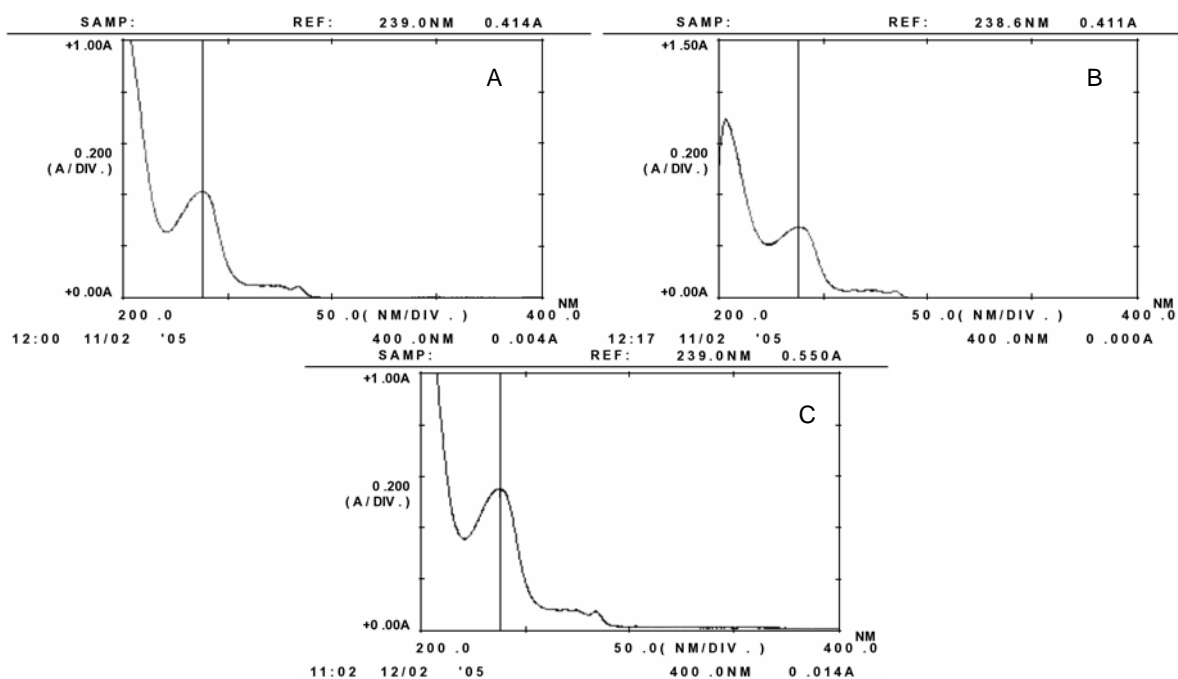


Figura 3.3 – Espectros na região do ultravioleta da SQR do citalopram, na concentração de 10,0 µg/ml, utilizando como solvente água (A), etanol (B) e ácido clorídrico 0,1 M (C).

Tendo em vista os resultados obtidos nas análises espectroscópicas e no ponto de fusão da matéria – prima, que garantiram a identidade do fármaco, utilizou-se a mesma como substância química de referência (SQR).



### **3.3. Identificação da amostra**

#### **3.3.1. Produto farmacêutico**

Comprimidos contendo 20 mg de citalopram, com o nome comercial de Cipramil<sup>®</sup>, fabricados pela Lundbeck, lote 2049810, fabricação 10 / 2005 e validade 10 / 2008.

#### **3.3.2. Cromatografia em camada delgada**

A cromatografia em camada delgada (CCD) é uma técnica flexível, através da qual podem-se identificar substâncias, impurezas e produtos de degradação. Apresenta como vantagens ser de fácil execução e compreensão, versátil e de baixo custo. Esta técnica de identificação baseia-se na comparação dos valores de R<sub>f</sub> obtidos quando o fármaco é cromatografado juntamente com a substância de referência (WATSON, 1999).

Como todas as técnicas analíticas, a CCD possui suas limitações. Dentre elas, pode-se citar a sua baixa sensibilidade e a exigência de uma maior capacidade analítica do operador, maior do que para uma análise por cromatografia líquida, por exemplo (WATSON, 1999).

Não há relatos na literatura que descreva um método por cromatografia em camada delgada para identificação do citalopram em comprimidos.

- Materiais e métodos

Para a composição do sistema eluente empregaram-se os seguintes reagentes: butanol (Synth<sup>®</sup>), ácido acético glacial (Nuclear<sup>®</sup>), ambos grau analítico e água. A migração cromatográfica foi realizada em cromatoplasmas aluminizadas (Merck<sup>®</sup>) de sílica gel 60 F<sub>254</sub> com 15 cm de comprimento, 5 cm de largura e 0,25 mm de espessura de camada adsorvente. Os reveladores utilizados foram a lâmpada ultravioleta a 254 nm e vapor de iodo, obtido a partir de iodo grau analítico (Synth<sup>®</sup>).

As amostras da SQR e dos comprimidos do citalopram e da SQR da fluoxetina foram preparadas diretamente em água a uma concentração final de 1,0 mg/ml. O sistema eluente proposto para a corrida cromatográfica foi preparado a partir da mistura de butanol, ácido acético glacial e água, na proporção de 4:1:5

(v/v/v), respectivamente, em uma pêra de separação. A mistura ficou em repouso por aproximadamente 24 horas para a perfeita separação das fases, para a realização do teste foi utilizada a fase superior.

As soluções das amostras foram aplicadas, por meio de tubos capilares, a uma distância de 1,0 cm da borda inferior da placa que foi transferida para cuba cromatográfica saturada contendo o sistema eluente. Procedeu-se, então, a migração cromatográfica por aproximadamente 10 cm do ponto de aplicação, e, ao final, retirou-se a placa da cuba. A leitura foi realizada, após a evaporação do solvente residual, através da exposição à lâmpada UV a 254 nm e aos vapores de iodo.

Determinou-se a especificidade do sistema desenvolvido utilizando solução de SQR da fluoxetina, que foi cromatografada junto às amostras do citalopram SQR e comprimidos.

- Resultados e discussão

A partir da observação das características polares do citalopram, testaram-se os seguintes sistemas eluentes utilizados na análise de substâncias polares: butanol:ácido acético glacial:água (4:1:5, v/v/v) e butanol:etanol:água (4:1:2,2, v/v/v), sendo o primeiro sistema mais adequado, apesar da elevada concentração de água ocasionar uma lentidão na análise.

Algumas técnicas de revelação foram testadas para a visualização do citalopram. A luz ultravioleta a 254 nm, seguida da exposição da placa cromatográfica aos vapores de iodo, foi empregada para a revelação. Através das cromatoplasmas da Figura 3.4, observa-se que a melhor técnica de revelação é utilizando-se a luz UV a 254 nm. O valor de R<sub>f</sub> obtido após a migração cromatográfica foi de 0,50 para a SQR do citalopram, 0,48 para o citalopram em comprimidos e 0,62 para a SQR da fluoxetina.

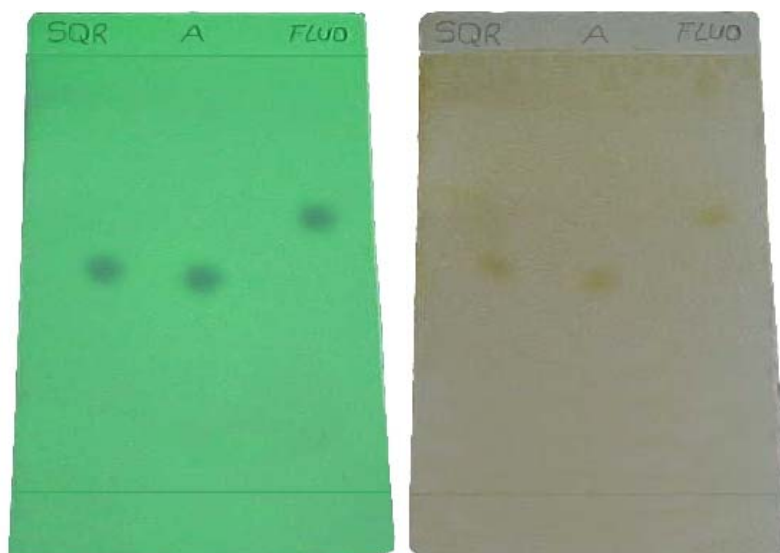


Figura 3.4 – Cromatogramas obtidos por cromatografia em camada delgada (CCD) na análise do citalopram SQR (SQR), citalopram em comprimidos (A) e fluoxetina SQR (FLUO), utilizando como reveladores a luz UV em 254 nm e o vapor de iodo, respectivamente.

Estes resultados sugerem que o citalopram SQR e a amostra comercial possuem a mesma identidade e este sistema cromatográfico pode ser utilizado para a identificação do citalopram. O valor do Rf da fluoxetina foi diferente das amostras de citalopram, comprovando a especificidade do sistema.

### 3.3.3. Espectrofotometria na região do ultravioleta

Não foram encontrados na literatura, métodos descritos para a análise qualitativa do citalopram em comprimidos, por espectrofotometria na região do ultravioleta. Para a identificação do citalopram em comprimidos, foram comparados os espectros obtidos com a solução SQR do citalopram com o da amostra de citalopram na forma farmacêutica.

- Materiais e métodos

As soluções foram preparadas, conforme descrito no Capítulo II, item 4.5.1.3, na concentração final de 10,0 µg/ml. Os espectros foram obtidos a partir de leituras na faixa de comprimento de onda de 200 a 400 nm, utilizando o ácido clorídrico 0,1 M como branco.

Utilizou-se o espectrofotômetro UV-VIS Shimadzu, modelo UV-160A. As condições otimizadas para a análise das amostras pelo método de espectrofotometria na região do ultravioleta foram previamente desenvolvidas e estão descritas no item 4.5.

- Resultados e discussão

Os espectros obtidos na análise das soluções da SQR do citalopram e do citalopram em comprimidos por espectrofotometria no UV apresentam o mesmo perfil exibindo máximo em 239 nm (Figura 3.5), sugerindo a mesma identidade das amostras analisadas.

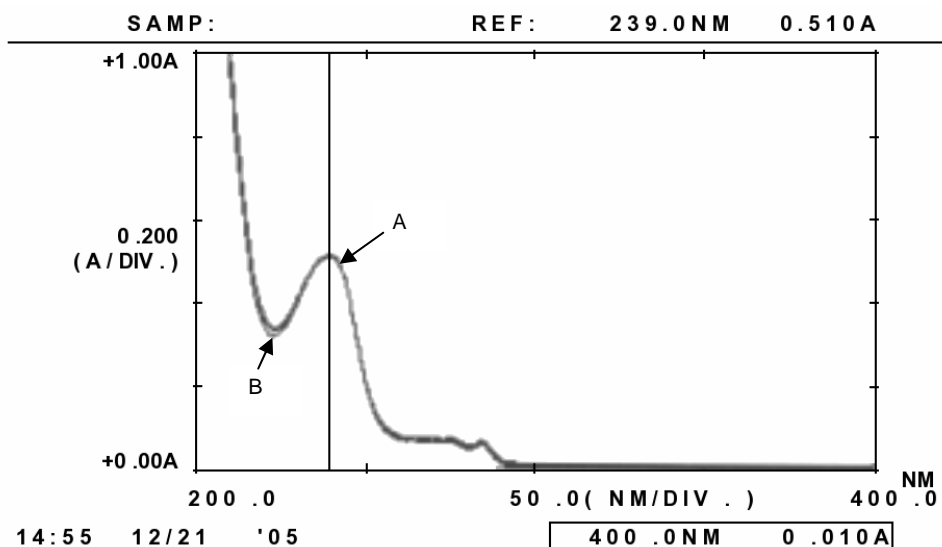


Figura 3.5 – Espectros de absorção na região do ultravioleta da solução SQR de citalopram (A) e solução amostra de citalopram em comprimidos (B), ambas na concentração de 10,0 µg/ml.

### 3.3.4. Cromatografia líquida

Apesar de ser mais freqüentemente aplicado para análise quantitativa, o método por CL pode ser muito útil na identificação de fármacos, através da comparação dos tempos de retenção da amostra e da respectiva SQR. Se as substâncias analisadas são idênticas, obrigatoriamente apresentarão o mesmo tempo de retenção, quando em análise sob as mesmas condições.

A Farmacopéia Americana (USP 29, 2006), na monografia da matéria – prima do bromidrato de citalopram, propõe a identificação da amostra pelo método de cromatografia líquida, através da comparação do seu tempo de retenção com o tempo de retenção da substância química de referência.

- Materiais e métodos

As soluções foram preparadas conforme descrito no Capítulo II, item 4.6.1.3, na concentração final de 40,0 µg/ml.

Utilizou-se o cromatógrafo a líquido Shimadzu, equipado com controlador SCL-10Avp, com bomba modelo LC-10ADvp, detector com comprimento de onda variável UV/VIS modelo SPD-M10Avp, controlador de temperatura para coluna modelo CTO-10ACvp, injetor automático com “loop” variável SIL-10ADvp e integrador automático computadorizado através do software CLASS VP<sup>®</sup>. As condições cromatográficas foram previamente desenvolvidas e estão descritas no item 4.6.

- Resultados e discussão

O tempo de retenção observado na análise cromatográfica da amostra de citalopram em comprimidos foi de aproximadamente 5,4 minutos, semelhante ao tempo de retenção observado para a solução SQR do citalopram, assegurando a identidade da amostra comercial (Figura 3.6). Este resultado confirma os outros resultados obtidos através de outras técnicas analíticas desenvolvidas para a identificação do citalopram na forma farmacêutica comprimido.

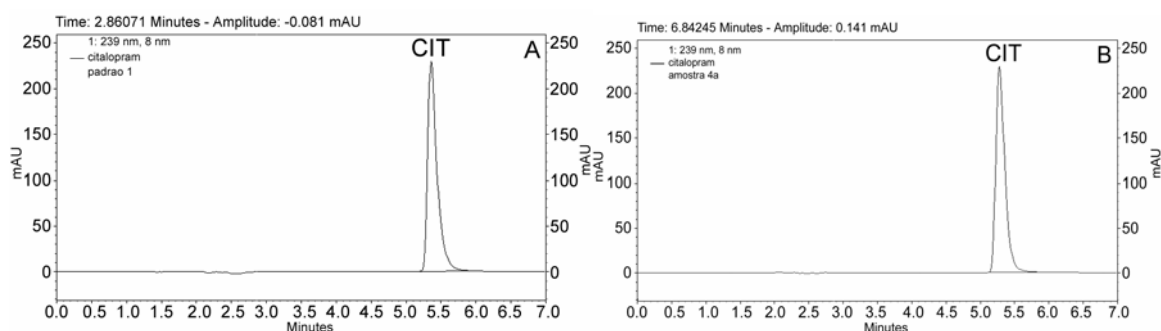


Figura 3.6 – Cromatogramas obtidos com a solução SQR do citalopram (A) e solução amostra de citalopram em comprimidos (B), ambas na concentração de 40,0 µg/ml. Condições cromatográficas: Coluna ACE<sup>®</sup> C<sub>18</sub> (250 x 4,6 mm); fase móvel: solução de trietilamina 0,3%:acetonitrila (55:45, v/v), pH 6,60; fluxo: 1,0 ml/min; detecção: 239 nm; temperatura de 25 °C. CIT: citalopram.

## **4. CAPITULO II – DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA DE ANÁLISE QUANTITATIVA**

### **4.1. Introdução**

O emprego de métodos analíticos sensíveis é imprescindível para que o controle de qualidade possa garantir a eficácia e a segurança do uso de um medicamento. A escolha do método a ser utilizado na análise é o primeiro passo em análises quantitativas e depende de vários fatores, tais como a exatidão requerida, natureza do fármaco, complexidade, pureza e quantidade da amostra. Outros fatores importantes são as disponibilidades econômicas de equipamentos e reagentes (AVENDAÑO, 1993; SKOOG *et al.*, 1994).

A aplicação da metodologia analítica deve ser específica à forma farmacêutica e às propriedades físico-químicas do fármaco em estudo. Além disso, deve-se levar em conta qual o propósito da análise, ou seja, qualitativa, semi-quantitativa ou quantitativa (AVENDAÑO, 1993).

Espectrofotometria no ultravioleta é amplamente utilizada em métodos farmacopéicos para a quantificação de fármacos em suas formas farmacêuticas, podendo também ser empregada em testes de dissolução, no monitoramento de estudos de cinética de degradação e na identificação de fármacos. Os métodos cromatográficos constituem-se em procedimentos de larga utilização em razão de sua versatilidade, possibilitando a separação e quantificação de diferentes componentes de uma formulação, através da adequada escolha de parâmetros, tais como colunas, fase móvel e método de detecção (WATSON, 1999).

Antes de utilizar um método analítico no controle de qualidade de formas farmacêuticas, é necessário validá-lo para garantir que o método em questão atende às exigências desejadas (BRITAIN, 1998; ERMER, 2001). O ICH (2005), a Farmacopéia Americana (USP 29, 2006) e a RE 899, de 29 de maio de 2003, descrevem os parâmetros analíticos que devem ser avaliados para a validação de

um método, sendo que o tipo do método e seu respectivo uso determinam quais os parâmetros que devem ser avaliados, cabendo ao analista selecionar aqueles relevantes para cada método.

Há na literatura métodos descritos para a quantificação do citalopram em fluidos biológicos por cromatografia líquida (CL) (Tabela 4.1) e eletroforese capilar (EC) (HALVORSEN *et al.*, 2001, LABAT *et al.*, 2002). Em forma farmacêutica a quantificação do citalopram foi realizada concomitantemente com outros antidepressivos ISRS, por cromatografia líquida (Tabela 4.2) e eletroforese capilar (PUCCI *et al.*, 2002; BERZAS-NEVADO; CONTENDO-SALCEDO, 2002; FLORES *et al.*, 2004, SKIBINSKI; MISZTAL, 2005). Existe um método por espectrofotometria no UV-VIS que utiliza metanol e reação colorimétrica para a quantificação do citalopram em comprimidos (Tabela 4.2).

Na Farmacopéia Americana (USP 29, 2006) encontra-se descrito método para determinação do citalopram em matéria – prima por cromatografia líquida com detecção no ultravioleta (239 nm), empregando como fase móvel tampão acetato de sódio:acetonitrila:triethylamina (80:20:0,75, v/v/v), com pH ajustado para 5,0 com ácido fosfórico, fluxo de 1,0 ml/min e coluna cromatográfica C<sub>8</sub> (150 mm x 4,6 mm, 5 µm) a uma temperatura de 50 °C.

Tabela 4.1 - Sistemas cromatográficos desenvolvidos para a quantificação do citalopram, em fluidos biológicos referenciados na literatura.

Sistema cromatográfico	Amostra	Referência
Ultron N C <sub>18</sub> (150 mm x 4,6 mm) FM: tampão fosfato 20 mM:acetonitrila:dietilamina (70:30:0,1 v/v/v), pH 4,6, fluxo de 1,0 ml/min Detecção: fluorescência (249 – 302 nm)	Plasma humano	MATSUI <i>et al.</i> , 1995
Supleco C <sub>18</sub> (250 x 4,6 mm) FM: tampão fosfato de potássio 44mM:acetonitrila: triethylamina (55:45:0,002, v/v/v), fluxo de 1,5 ml/min Detecção: ultravioleta (240 nm)	Soro humano	OLESEN; LINNET, 1996
Nova Pak C <sub>18</sub> (100 mm x 8,0 mm, 4 µm) FM: tampão fosfato 70 mmol/l:acetonitrila (60:40, v/v), fluxo de 3,0 ml/min Detecção: fluorescência (235 – 290 nm)	Plasma humano	CARLSSON; NORLANDER, 1997

continuação da Tabela 4.1:

Sistema cromatográfico	Amostra	Referência
Select-B C <sub>8</sub> (125 mm x 4,0 mm, 4 µm) FM: tampão fosfato 50 mM:acetonitrila (5:2, v/v), pH 2,5, fluxo de 1,2 ml/min Detecção: ultravioleta (220 nm)	Soro humano	AKERMAN <i>et al.</i> , 1998
Waters C <sub>18</sub> (150 mm x 3,9 mm, 5 µm) FM: formato de amônio 45mM:acetonitrila (70:30 v/v), pH 4,0, fluxo de 1,2 ml/min Detecção: fluorescência (245 – 295 nm)	Plasma e sangue humano	KRISTOFFERSEN <i>et al.</i> , 1999
Kromasil C <sub>18</sub> (300 mm x 0,32 mm, 3,5 µm) FM: acetonitrila: formato de amônio 45 mM (75:25, v/v), pH 4,0 Detecção: ultravioleta (230 nm)	Plasma humano	MOLANDER <i>et al.</i> , 2001
Beckman C <sub>18</sub> (250 x 4,6 mm, 5 µm) FM: acetonitrila:tampão fosfato de sódio 0,05M (50:50, v/v), pH 3,8, fluxo de 1,0 ml/min Detecção: ultravioleta (200,4 nm)	Soro humano	TOURNEL <i>et al.</i> , 2001
Ultrasphere C <sub>18</sub> (450 mm x 4,6 mm, 5 µm) FM: acetonitrila:tampão fosfato de potássio (50:50 v/v), pH 6,0, fluxo de 2,0 ml/min Detecção: fluorescência (236 - 306 nm)	Plasma humano	MACEK <i>et al.</i> , 2001
Nucleosil 100 – Protect 1 C <sub>18</sub> (250 x 4,6 mm, 5 µm) FM: acetonitrila:tampão diidrogenofosfato de potássio 25 mM (60:40, v/v), fluxo de 1,0 ml/min Detecção: ultravioleta (230 nm)	Soro humano	FRAHNET <i>et al.</i> , 2003
Li Chro Sphere C <sub>18</sub> (125 mm x 4,3 mm) FM: tampão fosfato:acetonitrila (60:40, v/v), fluxo de 1,0 ml/min Detecção: SERS	Sangue e urina humano	TRACHTA <i>et al.</i> , 2004
Hypersil BDS C <sub>8</sub> (250 x 2,1 mm, 3,5 µm) FM: acetonitrila:formato de amônio 10mM – ácido fórmico (70:30, v/v) pH 4,5, fluxo de 0,15 ml/min Detecção: MS / ESI	Plasma humano	PISTOS <i>et al.</i> , 2004
Ultrasphere C <sub>18</sub> (150 mm x 4,6 mm, 5 µm) FM: tampão fosfato de potássio 10 mM:acetonitrila (2:1, v/v) pH 4,0, fluxo de 0,70 ml/min Detecção: fluorescência (250 – 325 nm)	Plasma humano	MENG; GAUTHIER, 2005
Macherey-Nagel C <sub>18</sub> (250 x 4,6 mm, 5 µm) FM: acetonitrila:água (ácido fórmico 0,6%, acetato de amônio 30 mmol/l) (65:35, v/v), fluxo de 0,85 ml/min Detecção: MS / ESI	Plasma humano	JUAN <i>et al.</i> , 2005



Tabela 4.2 - Métodos por cromatografia líquida e espectrofotometria no ultravioleta desenvolvidos para a quantificação do citalopram, na forma farmacêutica comprimido, referenciados na literatura.

Método	Condições otimizadas	Referência
CL	Nova Pack C <sub>18</sub> (150 mm x 3,9 mm, 5 µm) FM: tampão fosfato 75 mM:acetonitrila (60:40, v/v), pH 2,5, fluxo de 1,5 ml/min Detecção: ultravioleta (230 nm)	BERZAS <i>et al.</i> , 2002
	Uso de CL em fase normal e reversa na separação de seis antidepressivos Detecção: ultravioleta (210 nm)	SKIBINSKI; MISZTAL, 2002
UV - VIS	UV = diluente:metanol, λ 240 nm VIS = reação colorimétrica de transferência de carga com 2,3-dicloro-5,6-diciano-1,4-benzoquinona, λ 590 nm.	RAZA, 2006

O objetivo deste trabalho é o desenvolvimento e validação de métodos analíticos por espectrofotometria no UV e CL para o controle de qualidade de rotina do citalopram em comprimidos, baseados nas características físico-químicas do fármaco, e nos dados encontrados na literatura.

#### 4.2. Produto farmacêutico

Comprimidos contendo 20 mg de citalopram, com o nome comercial de Cipramil<sup>®</sup>, fabricados pela Lundbeck, lote 2049810, fabricação 10 / 2005 e validade 10 / 2008.

Excipientes: amido, lactose, celulose microcristalina, copolividona, glicerol a 85%, croscarmelose sódica, estearato de magnésio, hipromelose, macrogol 400 e dióxido de titânio.

#### 4.3. Solventes e reagentes

- Acetonitrila grau cromatográfico, Merck<sup>®</sup>, Darmstadt, Alemanha,
- Ácido clorídrico fumegante grau analítico, Quimex<sup>®</sup>, Brasil,
- Ácido orto-fosfórico 85% grau analítico, Merck<sup>®</sup>, Darmstadt, Alemanha,
- Água purificada, Milli-Q plus, Millipore<sup>®</sup>, Milford, Estados Unidos,

- Trietilamina grau analítico, Merck<sup>®</sup>, Darmstadt, Alemanha,
- Etanol grau analítico, Quimex<sup>®</sup>, Brasil,
- Metanol grau cromatográfico, Merck<sup>®</sup>, Darmstadt, Alemanha.

#### 4.4. Equipamentos e acessórios

- Coluna cromatográfica de fase reversa octadecilsilano ACE<sup>®</sup> (250 x 4,6 mm d.i.) 5 µm, Aberdeen, Escócia,
- Coluna cromatográfica de fase reversa octadecilsilano BDS Hypersil<sup>®</sup> (250 x 4,6 mm d.i.) 5 µm, Califórnia, Estados Unidos,
- Coluna cromatográfica de fase reversa octilsilano Thermo Hypersil - Keystone<sup>®</sup> (250 x 4,6 mm d.i.) 5 µm, Keystone, Inglaterra,
- Cromatógrafo a líquido equipado com controlador SCL-10Avp, com bomba modelo LC-10ADvp, detector com comprimento de onda variável UV/VIS modelo SPD-M10Avp, controlador de temperatura para coluna modelo CTO-10ACvp, injetor automático com “loop” variável SIL-10ADvp e integrador automático computadorizado através do software CLASS VP<sup>®</sup>, Shimadzu, Japão,
- Estufa DeLeo<sup>®</sup>, Brasil,
- Espectrofotômetro UV-VIS, modelo UV-160A, Shimadzu, Japão,
- Membrana filtrante de nylon, porosidade 0,45 µm, 47 mm, MFS<sup>®</sup>, Millipore Corporation, MA, Estados Unidos,
- Membrana filtrante Millex<sup>®</sup> HN de nylon, porosidade 0,45 µm, 13 mm, Millipore Corporation, MA, Estados Unidos,
- Filtro qualitativo 80g, porosidade 3,0 µm, 600 x 600 mm, Frama 1600<sup>®</sup>, Brasil,
- Potenciômetro Digimed<sup>®</sup> modelo DM-20, Brasil,
- Banho de ultra-som, modelo USC 2850, Brasil,
- Lâmpada ultravioleta 30W, 254 nm, Ecolume<sup>®</sup>, Estados Unidos.

## 4.5. Espectrofotometria no ultravioleta

As condições experimentais desenvolvidas para análise do citalopram através do método espectrofotométrico na região do ultravioleta, encontram-se estabelecidas na Tabela 4.3.

Tabela 4.3 - Condições otimizadas para execução do método por espectrofotometria na região do ultravioleta.

Parâmetros	Descrição
Diluyente	Ácido clorídrico 0,1 M
Cubeta	Quartzo com 1,0 cm de percurso ótico
Comprimento de onda	239 nm (máxima absorção)

### 4.5.1. Validação do método analítico

A validação foi conduzida de acordo com o ICH (2005), Farmacopéia Americana (USP 29, 2006) e resolução RE 899, de 29 de maio de 2003. Os parâmetros de validação avaliados foram: especificidade, linearidade, precisão (repetibilidade e precisão intermediária), exatidão e limites de detecção e quantificação.

#### 4.5.1.1. Especificidade

Avaliou-se a possível interferência dos excipientes na determinação do citalopram. A solução placebo foi comparada com a solução amostra quanto ao perfil dos espectros obtidos.

- Preparo da solução placebo

Pesou-se quantidade de excipientes equivalente a 10,0 mg de citalopram e transferiu-se para balão volumétrico de 50 ml. Adicionou-se aproximadamente 30 ml de ácido clorídrico 0,1 M e colocou-se em banho de ultra-som por 10 minutos. Completou-se o volume com ácido clorídrico 0,1 M, homogeneizou-se e filtrou-se a solução com papel filtro. Alíquota de 5,0 ml do filtrado foi transferida para balão volumétrico de 100 ml, completou-se o volume com ácido clorídrico 0,1 M.

#### 4.5.1.2. Linearidade

Para o preparo da curva padrão, pesou-se o equivalente a 10,0 mg de citalopram e transferiu-se para um balão volumétrico de 100 ml. Completou-se o volume com ácido clorídrico 0,1 M, obtendo-se solução com concentração de 100,0 µg/ml. Foram transferidas alíquotas de 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0 e 3,5 ml, com auxílio de bureta, para balões volumétricos de 20 ml. Os volumes foram completados com ácido clorídrico 0,1 M, obtendo-se soluções com concentrações de 2,5; 5,0; 7,5; 10,0; 12,5; 15,0 e 17,5 µg/ml, respectivamente. As curvas foram preparadas em triplicata no mesmo dia. O branco foi composto de ácido clorídrico 0,1 M e as leituras efetuadas a 239 nm.

#### 4.5.1.3. Precisão

- Preparo da solução SQR

Pesou-se o equivalente a 10,0 mg de citalopram e transferiu-se para balão volumétrico de 100 ml. Completou-se o volume com ácido clorídrico 0,1 M, obtendo-se solução com concentração de 100,0 µg/ml. Alíquota de 5,0 ml desta solução foi transferida para balão volumétrico de 50 ml. O volume foi completado com ácido clorídrico 0,1 M, obtendo-se solução com concentração final de 10,0 µg/ml.

- Preparo da solução amostra

Foi determinado o peso médio de 20 comprimidos, conforme a Farmacopéia Brasileira IV Edição (1998). Os comprimidos foram triturados até a formação de um pó homogêneo. Pesou-se, do pó, o equivalente a 10,0 mg de citalopram, transferiu-se para balão volumétrico de 50 ml e adicionou-se de 30 ml de ácido clorídrico 0,1 M. A solução foi submetida a banho de ultra-som por 10 minutos. Completou-se o volume com ácido clorídrico 0,1 M, homogeneizou-se e filtrou-se a solução com papel filtro. Alíquota de 5,0 ml do filtrado foi transferida para balão volumétrico de 100 ml e completou-se o volume com ácido clorídrico 0,1 M, obtendo-se solução com concentração de 10,0 µg/ml. Para a amostra foi realizada determinação no mesmo dia (n=6), a fim de avaliar a repetibilidade (precisão intradia) e em diferentes dias (n=3), a fim de avaliar a precisão intermediária (precisão interdia) do método. O branco foi composto de ácido clorídrico 0,1 M.

- Cálculos

A concentração de citalopram nas amostras foi obtida através da seguinte expressão:

$$C_A = (A_A \cdot C_{SQR}) / A_{SQR}$$

Onde:

$C_A$  = Concentração de citalopram na amostra

$A_A$  = Absorvância média absoluta da amostra

$C_{SQR}$  = Concentração da SQR

$A_{SQR}$  = Absorvância média absoluta da SQR

O valor percentual de citalopram nas amostras foi calculado pela expressão abaixo:

$$C_A\% = (C_A \cdot 100) / C_T$$

Onde:

$C_A\%$  = Concentração percentual da amostra

$C_A$  = Concentração de citalopram encontrada na amostra

$C_T$  = Concentração teórica de citalopram na amostra

#### **4.5.1.4. Exatidão (Teste de Recuperação)**

Pesou-se, do pó preparado no item 4.5.1.3, quantidade equivalente a 10,0 mg de citalopram, transferiu-se para balão volumétrico de 50 ml e adicionou-se 30 ml de ácido clorídrico 0,1 M. A solução foi submetida a banho de ultra-som por 10 minutos. Completou-se o volume com ácido clorídrico 0,1 M, homogeneizou-se e filtrou-se a solução com papel filtro. Alíquotas de 1,0 ml do filtrado foram transferidas para balões volumétricos de 20 ml, denominados  $R_1$ ,  $R_2$  e  $R_3$ . A cada balão volumétrico acrescentou-se, respectivamente, 0,5; 1,0 e 1,5 ml da solução de SQR em ácido

clorídrico 0,1 M contendo 100,0 µg/ml de citalopram e completou-se o volume com ácido clorídrico 0,1 M. Obtiveram-se soluções com concentrações finais de 12,5; 15,0 e 17,5 µg/ml de citalopram, respectivamente. Foram preparadas, simultaneamente, soluções amostra e da substância química de referência na concentração de 10,0 µg/ml de citalopram, denominadas de A e SQR, respectivamente.

As soluções denominadas de R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> e R<sub>3</sub> foram preparadas em triplicata, ao contrário das soluções denominadas A e SQR, em que somente uma solução foi preparada. Para cada solução foram realizadas três determinações. A Tabela 4.4 representa, esquematicamente, o preparo das soluções para o teste de recuperação.

Tabela 4.4 - Preparo das soluções para o teste de recuperação do citalopram por espectrofotometria no ultravioleta.

Soluções	Volume (ml) da solução amostra (200,0 µg/ml)*	Volume (ml) da solução SQR (100,0 µg/ml)*	Concentração final (µg/ml)
A	1,0	-	10,0
R <sub>1</sub>	1,0	0,5	12,5
R <sub>2</sub>	1,0	1,0	15,0
R <sub>3</sub>	1,0	1,5	17,5
SQR	-	2,0	10,0

\* Aliquotas adicionadas em balões volumétricos de 20 ml.

- Cálculo para o teste de recuperação

As percentagens de recuperação (R%) foram calculadas pela expressão:

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

Onde:

C<sub>A</sub> = Concentração de citalopram encontrada na amostra adicionada de SQR

C<sub>NA</sub> = Concentração de citalopram encontrada na amostra não adicionada de SQR

C<sub>SQR</sub> = Concentração da SQR adicionada à amostra

#### 4.5.1.5. Limite de quantificação (LQ) e Limite de detecção (LD)

Os LQ e LD foram calculados a partir das fórmulas descritas no ICH (2005), baseadas no desvio padrão do intercepto ( $\sigma$ ) e na inclinação da curva padrão (IC). O cálculo foi realizado baseado nos dados das três curvas padrões, segundo as equações a seguir:

$LQ = \frac{10\sigma}{IC}$	$LD = \frac{3,3\sigma}{IC}$
----------------------------	-----------------------------

#### 4.5.2. Resultados e discussão

Espectrofotometria na região do ultravioleta pode ser utilizada, com boa precisão, para a determinação quantitativa de fármacos nas diferentes formas farmacêuticas, devido a sua facilidade de execução, custo e quando comparada com cromatografia líquida, a análise é mais rápida (SKOOK *et al.*, 1994; WATSON, 1999). A utilização da espectrofotometria na região do ultravioleta nos laboratórios analíticos é limitada em virtude da falta de especificidade do método (WATSON, 1999).

Existem dois métodos na literatura para determinação do citalopram em comprimidos envolvendo a espectrofotometria no ultravioleta e no visível, porém, estes métodos necessitam do uso de metanol e de uma reação colorimétrica de transferência de carga, respectivamente. O método agora proposto por espectrofotometria no ultravioleta é simples, rápido e econômico para a quantificação do citalopram em comprimidos sem consumo de tempo no preparo das amostras.

Muitos solventes estão disponíveis para análise na região do ultravioleta e a escolha do mesmo deve ser baseada na solubilidade da substância a ser analisada. Inicialmente avaliou-se o etanol e a água como solvente (Figura 3.3 do item 3.2.4). Devido ao futuro estudo do perfil de dissolução do citalopram em comprimidos, optou-se por desenvolver e validar o método com o uso do ácido clorídrico 0,1 M, sendo que neste meio o máximo de absorção do fármaco é observado no comprimento de onda de 239 nm.

No desenvolvimento deste método estudaram-se diferentes tempos de extração (10 e 20 minutos) do citalopram dos comprimidos com o uso de agitador mecânico e banho de ultra-som. Não houve diferença significativa entre as absorvâncias obtidas, portanto, a extração do fármaco das amostras foi realizada em banho de ultra-som por 10 minutos.

Não foram observadas influências devido aos excipientes, solventes ou outras impurezas nas condições otimizadas, o que pode ser verificado nos espectros obtidos com a SQR e a solução placebo dos comprimidos de citalopram, apresentados na Figura 4.1, demonstrando a especificidade do método.

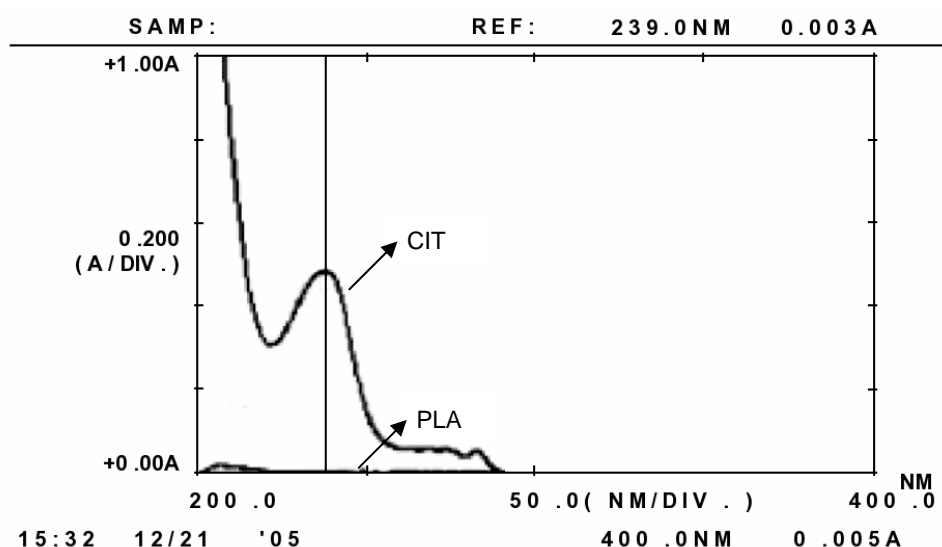


Figura 4.1 – Sobreposição dos espectros de absorção obtidos por espectrofotometria no ultravioleta das soluções de SQR (CIT) e solução placebo (PLA) obtidos em ácido clorídrico 0,1 M, na concentração teórica de 10,0 µg/ml.

Para a avaliação da linearidade do método, a Tabela 4.5 apresenta os valores experimentais obtidos na construção da curva padrão para o citalopram por espectrofotometria no ultravioleta. Gráfico da concentração *versus* área absoluta foi plotado e mostrou linearidade adequada na faixa de 2,5 a 17,5 µg/ml, obedecendo a Lei de Lambert - Beer (Figura 4.2).



Tabela 4.5 - Valores de absorvâncias obtidas na determinação da curva padrão do citalopram por espectrofotometria no ultravioleta.

Concentração ( $\mu\text{g/ml}$ )	Absorvâncias			Média	DPR
	1° curva	2° curva	3° curva		
2,5	0,130	0,132	0,132	0,131	0,88
5,0	0,259	0,254	0,255	0,256	1,03
7,5	0,381	0,384	0,385	0,383	0,54
10,0	0,515	0,509	0,513	0,512	0,60
12,5	0,643	0,635	0,634	0,637	0,77
15,0	0,772	0,767	0,764	0,768	0,53
17,5	0,898	0,890	0,893	0,894	0,45

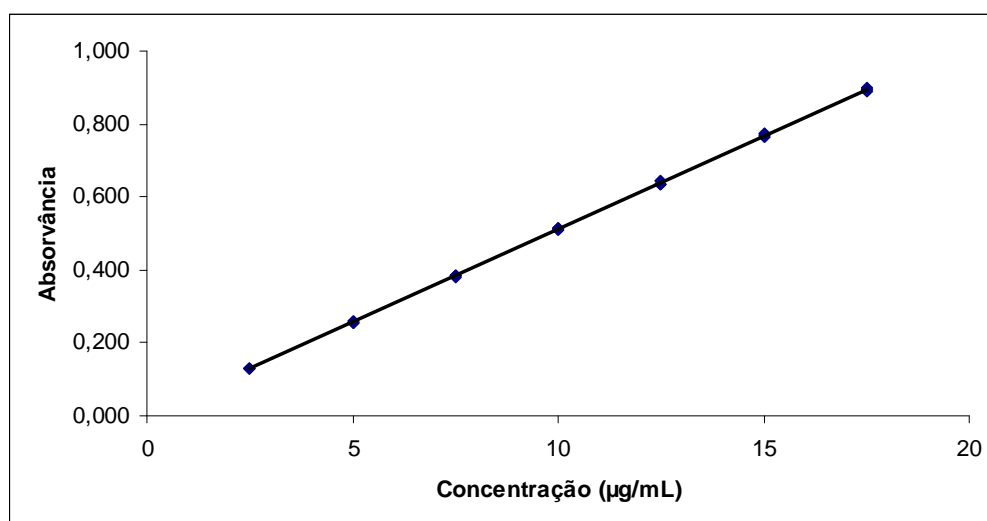


Figura 4.2 - Representação gráfica da curva padrão do citalopram obtida através do método espectrofotométrico na região do ultravioleta.

As Tabelas 4.6 e 4.7 apresentam os resultados dos tratamentos estatísticos sobre os valores experimentais obtidos para a curva padrão.

Tabela 4.6 - Resultados da curva padrão, obtidos pelo método dos mínimos quadrados, para o método por espectrofotometria no ultravioleta.

Parâmetros	Resultados
Faixa de linearidade	2,5 – 17,5 µg/ml
Equação: $y = bx + a$	$Y = 0,0509 x + 0,0025$
Inclinação (b) ± desvio padrão	$0,0509 \pm 0,0003$
Intercepto (a) ± desvio padrão	$0,0025 \pm 0,0013$
Coefficiente de correlação (r)	0,9999

Tabela 4.7 – Análise de variância das absorvâncias obtidas na curva padrão do citalopram por espectrofotometria no ultravioleta.

Fontes de variação	GL	Soma dos quadrados	Variâncias	F*
Entre	6	1,36	$2,27 \cdot 10^{-1}$	20,102 (2,85)
- regressão linear	1	1,36	1,36	120,612 (4,60)
- desvio da linearidade	5	$2,92 \cdot 10^{-5}$	$5,85 \cdot 10^{-6}$	0,56 (2,96)
Resíduo	14	$1,58 \cdot 10^{-4}$	$1,13 \cdot 10^{-5}$	
Total	20	1,36		

\*Valores entre parênteses correspondem aos valores críticos de F para  $P = 0,05$ .

Os resultados da avaliação da linearidade do método demonstram que as soluções SQR de citalopram apresentam correlação linear (coeficiente de correlação linear de 0,9999) entre as absorvâncias e as concentrações, no intervalo utilizado. A análise de variância (ANOVA) efetuada sobre os valores de absorvância da curva padrão do citalopram, cujos elementos estão descritos na Tabela 4.7, demonstra regressão linear significativa, não havendo desvio da linearidade para um nível de significância de 5%, comprovando a validade do método em relação à linearidade.

A precisão do método foi demonstrada pela repetibilidade (intradia) e precisão intermediária (interdia), sendo expressa pelo desvio padrão relativo (DPR) de uma série de leituras. O valor experimental obtido para a determinação do citalopram nas amostras analisadas no mesmo dia, sob as mesmas condições experimentais, foi de 98,83%. Nas análises realizadas no segundo e no terceiro dias obteve-se,

respectivamente, 98,38 e 99,14% (Tabela 4.8). Os desvios padrões relativos encontrados para os três dias de análise foram inferiores a 2%, indicando que o método proposto é preciso.

Tabela 4.8 – Valores experimentais referentes à determinação de citalopram por espectrofotometria no ultravioleta.

Amostras	Teor					
	Primeiro dia		Segundo dia		Terceiro dia	
	(mg)	(%)	(mg)	(%)	(mg)	(%)
1	20,00	99,99	19,80	98,98	19,58	97,91
2	19,53	97,67	19,49	97,46	19,85	98,27
3	19,46	97,32	19,60	97,98	19,72	98,60
4	19,70	98,51	19,71	98,57	19,70	98,52
5	19,86	99,30	19,82	99,09	20,06	100,28
6	20,03	100,16	19,64	98,20	20,05	100,23
Média	19,77	98,83	19,68	98,38	19,83	98,97
DPR	1,20		0,63		1,04	
Média / DPR interdia	98,72 / 0,31					

A exatidão do método foi avaliada e a faixa de recuperação média encontrada foi de 98,48 a 98,65%, demonstrando a boa exatidão do método, uma vez que fica dentro dos limites de 95 a 105%, conforme representado na Tabela 4.9.

Tabela 4.9 – Valores experimentais do teste de recuperação realizado por espectrofotometria no ultravioleta.

Amostras	Quantidade de SQR ( $\mu\text{g/ml}$ )		% de Recuperação
	Adicionada	Recuperada	
R <sub>1</sub>	2,5	2,47	98,65
R <sub>2</sub>	5,0	4,93	98,65
R <sub>3</sub>	7,5	7,39	98,48

A sensibilidade do método espectrofotométrico foi avaliada através da determinação dos limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) do citalopram no sistema empregado. Os valores obtidos para o LD e LQ foram, de acordo com o calculado, 0,08 e 0,26 µg/ml, respectivamente, indicando boa sensibilidade com valores reduzidos.

O método proposto mostrou-se adequado, apresentando simplicidade, especificidade, linearidade, precisão, exatidão e sensibilidade podendo ser empregado para o controle de qualidade do citalopram em comprimidos.

#### 4.6. Cromatografia Líquida (CL)

As condições experimentais estabelecidas para análise do citalopram, através do método por CL, encontram-se na Tabela 4.10.

Tabela 4.10 - Condições otimizadas para execução do método por cromatografia líquida.

Parâmetros	Descrição
Coluna	ACE <sup>®</sup> C18 (250 x 4,6 mm d.i.) 5 µm
Fase móvel	Solução trietilamina 0,3%:Acetonitrila (55:45, v/v) pH 6,60 (ajustado com ácido fosfórico 10%)
Fluxo	1,0 ml/min
Comprimento de onda	239 nm
Volume de injeção	20 µl

A fase móvel foi preparada adicionando-se 0,3% de trietilamina à água ultrapura, ajustando-se o pH da solução para 6,60 com ácido fosfórico 10%. A esta solução adicionou-se acetonitrila. Os constituintes da fase móvel foram misturados e filtrados, sob vácuo, através de membrana de nylon com porosidade de 0,45 µm e 47 mm de diâmetro, e desgaseificados com gás hélio durante 5 minutos. A coluna foi previamente estabilizada, através do fluxo de fase móvel a 1,0 ml/min, durante 30 minutos. Todas as amostras foram filtradas em membrana filtrante Millex HN de nylon com porosidade de 0,45 µm e 13 mm de diâmetro, antes de serem analisadas.

#### **4.6.1. Validação de método analítico**

A validação foi conduzida de acordo com o ICH (2005), Farmacopéia Americana (USP 29, 2006) e resolução RE 899, de 29 de maio de 2003. Os parâmetros de validação avaliados foram: especificidade, linearidade, precisão (repetibilidade e precisão intermediária), exatidão, robustez e limites de detecção e quantificação.

##### **4.6.1.1. Especificidade**

A especificidade do método analítico foi determinada pela análise de amostra placebo e pelo estudo de degradação forçada da SQR do fármaco, com o objetivo de propor um método indicativo de estabilidade. O fármaco foi submetido a condições de hidrólise ácida e básica, fotólise, oxidação e temperatura. No acompanhamento do estudo de degradação forçada da SQR foi avaliada a pureza do pico através do software CLASS VP®.

- Preparo da solução SQR nas condições normais (tempo zero)

Pesou-se o equivalente a 10,0 mg de citalopram e transferiu-se para balão volumétrico de 50 ml. Completou-se o volume com água, obtendo-se solução com concentração de 200,0 µg/ml. Alíquota de 5,0 ml desta solução foi transferida para balão volumétrico de 25 ml. O volume foi completado com água, obtendo-se solução com concentração final de 40,0 µg/ml.

- Preparo da solução placebo

Pesou-se quantidade de excipientes equivalente a 10 mg de citalopram e transferiu-se para balão volumétrico de 50 ml. Adicionou-se aproximadamente 40 ml de água pH 1,85 (ajustado com ácido fosfórico 10%) e colocou-se em banho de ultra-som por 10 minutos. Completou-se o volume com água pH 1,85, homogeneizou-se e filtrou-se a solução com papel filtro. Alíquota de 5,0 ml do filtrado foi transferida para balão volumétrico de 25 ml, completou-se o volume com água.

- Hidrólise ácida

Pesou-se o equivalente a 10,0 mg de citalopram e transferiu-se para balão volumétrico de 10 ml. Completou-se o volume com ácido clorídrico 1,0 M, obtendo-

se solução com concentração de 1,0 mg/ml. Deixou-se aproximadamente 8,0 ml desta solução em banho-maria a 70 °C e 1,0 ml à temperatura ambiente, protegida da luz, por 4 horas. Alíquotas de 1,0 ml dessas soluções foram transferidas para balões volumétricos de 25 ml, neutralizaram-se as soluções com 1,0 ml de hidróxido de sódio 1,0 M e completou-se o volume com água, obtendo-se soluções com concentração de 40,0 µg/ml. Preparou-se uma solução controle em ácido clorídrico 1,0 M para análise do tempo zero.

- Hidrólise básica

Pesou-se o equivalente a 10,0 mg de citalopram e transferiu-se para balão volumétrico de 10 ml. Completou-se o volume com hidróxido de sódio 1,0 M, obtendo-se solução com concentração de 1,0 mg/ml. Deixou-se aproximadamente 8,0 ml desta solução em banho-maria a 70 °C e 1,0 ml à temperatura ambiente, protegida da luz, por 4 horas. Alíquotas de 1,0 ml dessas soluções foram transferidas para balões volumétricos de 25 ml, neutralizaram-se as soluções com 1,0 ml de ácido clorídrico 1,0 M e completou-se o volume com água, obtendo-se soluções com concentração de 40,0 µg/ml. Preparou-se uma solução controle em hidróxido de sódio 1,0 M para análise do tempo zero.

- Fotólise

Pesou-se o equivalente a 10,0 mg de citalopram e transferiu-se para balão volumétrico de 10 ml. Completou-se o volume com água, obtendo-se solução com concentração de 1,0 mg/ml. A amostra foi irradiada durante 4 horas por luz UV em cubetas de quartzo dispostas horizontalmente, propiciando, assim, uma grande área de exposição à luz. Alíquota de 1,0 ml desta solução foi transferida para balão volumétrico de 25 ml e completou-se o volume com água, obtendo-se solução com concentração de 40,0 µg/ml. Preparou-se uma solução controle sob as mesmas condições, protegida da luz, para análise do tempo zero.

- Oxidação

Pesou-se o equivalente a 10,0 mg de citalopram e transferiu-se para balão volumétrico de 10 ml. Completou-se o volume com peróxido de hidrogênio 3%, obtendo-se solução com concentração de 1,0 mg/ml. Deixou-se aproximadamente 8,0 ml desta solução em banho-maria a 70 °C e 1,0 ml à temperatura ambiente,

protegida da luz, por 4 horas. Alíquotas de 1,0 ml dessas soluções foram transferidas para balões volumétricos de 25 ml e completou-se o volume com água, obtendo-se soluções com concentração de 40,0 µg/ml. Preparou-se uma solução controle em peróxido de hidrogênio 3% para análise do tempo zero.

- Temperatura

Pesou-se o equivalente a 10,0 mg de citalopram e transferiu-se para balão volumétrico de 10 ml. Completou-se o volume com água, obtendo-se solução com concentração de 1,0 mg/ml. A amostra foi colocada em estufa mantida a 80 °C por 24 horas. Alíquota de 1,0 ml desta solução foi transferida para balão volumétrico de 25 ml e completou-se o volume com água, obtendo-se solução com concentração de 40,0 µg/ml. Preparou-se uma solução controle para análise do tempo zero.

#### **4.6.1.2. Linearidade**

Para o preparo da curva padrão, pesou-se o equivalente a 20,0 mg de citalopram e transferiu-se para um balão volumétrico de 200 ml. Completou-se o volume com água, obtendo-se solução com concentração de 100,0 µg/ml. Foram transferidas alíquotas de 2,0; 4,0; 6,0; 8,0; 10,0; 12,0 e 14,0 ml, com auxílio de bureta, para balões volumétricos de 20 ml. Os volumes foram completados com água, obtendo-se soluções com concentrações de 10,0; 20,0; 30,0; 40,0; 50,0 60,0 e 70,0 µg/ml, respectivamente. As curvas foram preparadas em triplicata no mesmo dia.

#### **4.6.1.3. Precisão**

- Preparo da solução SQR

Preparou-se solução SQR contendo 40,0 µg/ml de citalopram, conforme descrito no item 4.6.1.1.

- Preparo da solução amostra

Foi determinado o peso médio de 20 comprimidos, conforme a Farmacopéia Brasileira IV Edição (1998). Os comprimidos foram triturados até a formação de um pó homogêneo. Pesou-se, do pó, o equivalente a 10,0 mg de citalopram e transferiu-se para balão volumétrico de 50 ml, com auxílio de 40 ml de água pH 1,85 (ajustado com ácido fosfórico 10%). A solução foi submetida a banho de ultra-som por 10

minutos. Completou-se o volume com água pH 1,85, homogeneizou-se e filtrou-se a solução com papel filtro. Alíquota de 5,0 ml do filtrado foi transferida para balão volumétrico de 25 ml e completou-se o volume com água, obtendo-se solução com concentração de 40,0 µg/ml. Para a amostra foi realizada determinação no mesmo dia (n=6), a fim de avaliar a repetibilidade (precisão intradia) e em diferentes dias (n=3), a fim de avaliar a precisão intermediária (precisão interdia) do método.

- Cálculos

A concentração de citalopram nas amostras foi obtida através da seguinte expressão:

$$C_A = (A_A \cdot C_{SQR}) / A_{SQR}$$

Onde:

$C_A$  = Concentração de citalopram na amostra

$A_A$  = Área média absoluta da amostra

$C_{SQR}$  = Concentração da SQR

$A_{SQR}$  = Área média absoluta da SQR

O valor percentual de citalopram nas amostras foi calculado pela expressão abaixo:

$$C_A\% = (C_A \cdot 100) / C_T$$

Onde:

$C_A\%$  = Concentração percentual da amostra

$C_A$  = Concentração de citalopram encontrada na amostra

$C_T$  = Concentração teórica de citalopram na amostra



#### 4.6.1.4. Exatidão (Teste de Recuperação)

Pesou-se, do pó preparado no item 4.6.1.3, quantidade equivalente a 10,0 mg de citalopram e transferiu-se para balão volumétrico de 50 ml, com auxílio de 40 ml de água pH 1,85. A solução foi submetida a banho de ultra-som por 10 minutos. Completou-se o volume com água pH 1,85, homogeneizou-se e filtrou-se a solução com papel filtro. Alíquotas de 4,0 ml do filtrado foram transferidas para balões volumétricos de 20 ml, denominados R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> e R<sub>3</sub>. A cada balão volumétrico acrescentou-se, respectivamente, 1,0; 2,0 e 3,0 ml da solução aquosa de SQR contendo 200,0 µg/ml de citalopram e completou-se o volume com água. Obtiveram-se soluções com concentrações finais de 50,0; 60,0 e 70,0 µg/ml de citalopram, respectivamente. Foram preparadas, simultaneamente, soluções amostra e da substância química de referência na concentração de 40,0 µg/ml de citalopram, denominadas de A e SQR, respectivamente.

As soluções denominadas de R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> e R<sub>3</sub> foram preparadas em triplicata, ao contrário das soluções denominadas A e SQR, em que somente uma solução foi preparada. Para cada solução foram realizadas três determinações. A Tabela 4.11 representa, esquematicamente, o preparo das soluções para o teste de recuperação.

Tabela 4.11 - Preparo das soluções para o teste de recuperação do citalopram por cromatografia líquida.

Soluções	Volume (ml) da solução amostra (200,0 µg/ml)*	Volume (ml) da solução SQR (200,0 µg/ml)*	Concentração final (µg/ml)
A	4,0	-	40,0
R <sub>1</sub>	4,0	1,0	50,0
R <sub>2</sub>	4,0	2,0	60,0
R <sub>3</sub>	4,0	3,0	70,0
SQR	-	4,0	40,0

\* Alíquotas adicionadas em balões volumétricos de 20 ml.

- Cálculo para o teste de recuperação

As percentagens de recuperação (R%) foram calculadas pela expressão:

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

Onde:

$C_A$  = Concentração de citalopram encontrada na amostra adicionada de SQR

$C_{NA}$  = Concentração de citalopram encontrada na amostra não adicionada de SQR

$C_{SQR}$  = Concentração da SQR adicionada à amostra

#### 4.6.1.5. Robustez

A robustez do método foi avaliada por pequenas modificações nas condições cromatográficas estabelecidas, tais como: mudança na temperatura de análise para 30 °C, utilização de coluna de diferente fabricante (Hypersil) com as mesmas dimensões e especificações, mudança na proporção da fase móvel com uma variação de  $\pm 5\%$  da fase orgânica e alteração do pH da fase aquosa de 6,60 para 6,70 e 6,50. Alterou-se o pH da água utilizada no preparo das amostras de citalopram de 1,85 para 1,90 e 1,80.

Para avaliar a influência desses fatores sobre o método realizou-se a análise do teor (conforme descrito no item 4.6.1.3) dos comprimidos nas diferentes condições. Foram preparadas três tomadas de amostra, sendo realizadas três determinações para cada solução de análise. Os efeitos no tempo de retenção e nos parâmetros cromatográficos foram avaliados durante o estudo.

#### 4.6.1.6. Limite de quantificação (LQ) e Limite de detecção (LD)

Os LQ e LD foram calculados através da relação sinal / ruído. Essas relações de sinal / ruído foram experimentalmente determinadas através da injeção de soluções diluídas da solução SQR do citalopram no cromatógrafo, em triplicata, para encontrar a concentração do fármaco cujo sinal correspondesse a 10 vezes o ruído para o LQ, com precisão (expressa através do DPR) e exatidão, e 3 vezes o ruído para o LD.

#### 4.6.2. Resultados e discussão

A cromatografia líquida (CL) é o método mais comumente utilizado na análise farmacêutica. A combinação desta técnica cromatográfica com o monitoramento através da detecção pela espectrofotometria na região do ultravioleta fornece um método preciso, exato e robusto para a análise quantitativa dos produtos farmacêuticos, tornando-se um padrão na indústria farmacêutica (WATSON, 1999).

As outras aplicações da CL incluem o monitoramento da estabilidade de fármacos e medicamentos, com possibilidade de quantificação dos produtos de degradação, e a análise quantitativa dos fármacos e seus metabólitos nos fluidos biológicos (WATSON, 1999).

Na literatura são encontrados alguns métodos para análise do citalopram em matéria – prima e juntamente com outros antidepressivos ISRS, em forma farmacêutica por cromatografia líquida (Tabela 4.2). Nesses estudos, as condições propostas dificultam a aplicação dos métodos em controle de qualidade rotineiro, tais como extração utilizando solvente tóxico, uso de tampão na fase móvel e, além disso, os métodos não são indicativos de estabilidade.

Segundo BERZAS e colaboradores (2002), na faixa usual de pH das colunas C<sub>18</sub> (2,5 – 7,5) o citalopram, que é um composto básico, encontra-se na forma catiônica devido à protonação da amina presente em sua estrutura química, portanto, o aumento no pH da fase móvel acarreta no aumento do tempo de retenção do citalopram. O aumento da proporção da fase orgânica aumenta a força do eluente e, conseqüentemente, diminui o tempo de retenção do fármaco.

No desenvolvimento do método proposto empregou-se coluna cromatográfica C<sub>18</sub>, devido seu maior uso nos trabalhos existentes na literatura para quantificação do citalopram e a coluna C<sub>8</sub>, a qual foi utilizada nos estudos desenvolvidos por AKERMAN e colaboradores (1998), PISTOS e colaboradores (2004) e na Farmacopéia Americana (USP 29, 2006) para quantificação da matéria – prima do citalopram. Diversas fases móveis constituídas de acetonitrila:água e metanol:água utilizando ou não trietilamina foram testadas em diferentes proporções, pH e fluxos. Os ajustes de pH foram realizados com o uso de ácido fosfórico 10%.

Em uma fase prévia, utilizando a coluna cromatográfica C<sub>8</sub> com a fase móvel acetonitrila:água, fluxo de 1,0 ml/min somente na proporção 90:10 (v/v) foi possível obter a eluição do citalopram em 11 minutos de análise. Com a substituição da acetonitrila pelo metanol na fase móvel, obteve-se a eluição do citalopram em torno de 9 minutos, sendo necessário um alto consumo de solvente orgânico (85% de metanol). Alterando-se o fluxo da fase móvel constituída por metanol:água:trietilamina (85:15:0,1 v/v/v) para 1,5 ml/min o tempo de retenção do citalopram foi de 5,6 minutos, entretanto, os parâmetros cromatográficos não foram satisfatórios quando comparados com os obtidos com o uso da coluna C<sub>18</sub>.

Empregando-se a coluna C<sub>18</sub> com as fases móveis constituídas por metanol:água:trietilamina na proporção de 70:30:0,2 (v/v/v), pH 6,40 e água:acetonitrila:trietilamina na proporção de 55:45:0,3 (v/v/v), pH 6,60, ambas com fluxo de 1,0 ml/min, o tempo de retenção do citalopram foi de 6,2 e 5,0 minutos, respectivamente. As fases móveis testadas com pH baixo apresentaram picos com tempo de retenção em torno de 3 minutos, dificultando a separação dos produtos de degradação obtidos durante os estudos de degradação forçada da SQR do citalopram. A Tabela 4.12 apresenta os parâmetros cromatográficos obtidos para esses dois sistemas, que estão de acordo com os preconizados na literatura (FDA, 1994).

Tabela 4.12 – Valores experimentais dos parâmetros cromatográficos obtidos durante o desenvolvimento do método analítico por cromatografia líquida.

Fase móvel	Fator de capacidade	Pratos teóricos	Fator de Assimetria
metanol:água:trietilamina 70:30:0,2 (v/v/v), pH 6,40	2,31	6950,61	1,32
água:acetonitrila:trietilamina 55:45:0,3 (v/v/v), pH 6,60	1,69	10390,86	1,54

A fase móvel metanol:água:trietilamina (70:30:0,2 v/v/v), pH 6,40, apresentou-se pouco robusta em relação a pequenas variações de pH. Variações de  $\pm 0,1$  no pH desta fase móvel acarretaram em alterações significativas no tempo de retenção e na assimetria do pico do fármaco, não sendo adequado seu uso para a quantificação do citalopram em comprimidos. O aumento na proporção de água da fase móvel

água:acetonitrila:triethylamina aumentou o tempo de retenção do fármaco (6,7 minutos) e foi detectada impureza no pico com o uso do detector de diodos (DAD).

Compostos básicos podem interagir com os grupamentos silanóis das colunas o que acarreta em aumento no tempo de retenção, cauda nos picos e irreprodutibilidade nos resultados de coluna para coluna. Estas interações são minimizadas com o uso de colunas específicas para compostos básicos, triethylamina e dimetiloctilamina. As colunas “end-capped” sofrem hidrólise de seus grupamentos quando são utilizadas fases móveis com pH baixo (< 3,0), sendo recomendado o uso de pH intermediário a elevado (6,0 – 9,0) para a melhor proteção do suporte da sílica contra dissolução (SNYDER *et al.*, 1997).

A coluna C<sub>18</sub> utilizada para o desenvolvimento deste método sofreu ação de fases móveis ácidas, portanto, diferentes proporções de triethylamina (TEA) foram estudadas na fase móvel água:acetonitrila (55:45, v/v), pH 6,60 para a obtenção de picos com boa simetria. A fase móvel contendo a solução de 0,3% de TEA:acetonitrila (55:45, v/v), pH 6,60, mostrou-se adequada, proporcionando um tempo de retenção reprodutível, boa eficiência, picos de boa resolução, seletividade e simetria (Figuras 4.3 e 4.4). Cabe salientar que o baixo consumo de solvente orgânico desta fase móvel contribui com o meio ambiente.

Baseado no trabalho de BERZAS e colaboradores (2002) que utiliza água no preparo das soluções amostra de citalopram (Seropram<sup>®</sup>), foram preparadas e injetadas soluções aquosas (pH 5,76) da SQR (área = 2095072) e amostra (área = 1542743) na concentração de 40,0 µg/ml de citalopram, obtendo-se o teor de 73,64% para o citalopram em comprimidos. No método por espectrofotometria no ultravioleta (item 4.5) desenvolvido e validado neste presente trabalho, o solvente utilizado foi o ácido clorídrico 0,1 M (pH aproximadamente 1,0), portanto, para a extração do citalopram dos comprimidos de Cipramil<sup>®</sup> é necessário o uso de pH mais ácido. Como a SQR do citalopram é solúvel em água, provavelmente há uma ligação física entre o citalopram e os excipientes presentes na formulação que impedem sua solubilização em determinados pH.

A solução aquosa de citalopram foi submetida a diferentes tempos de extração com o uso do banho de ultra-som e o agitador mecânico. Essas alterações

não influenciaram no aumento da extração do citalopram das amostras, confirmando a influência do solvente neste processo de extração.

Foram preparadas soluções amostra de citalopram em água pH 4,0; 3,0 e 1,85. A acidificação da água foi realizada com ácido fosfórico 10%. A solução amostra preparada com água pH 4,0 apresentou resultados semelhantes (área = 1465288) aos das amostras preparadas com água pH 5,76. Com o uso da água pH 3,0 o resultado obtido foi satisfatório (área = 2020822), porém, na avaliação da pureza do pico com o uso do detector de arranjo de diodos (DAD), foi indicada a presença de impureza no pico do citalopram. Através do emprego da água pH 1,85 no preparo das soluções, ocorreu a dissolução do fármaco das amostras (área = 2095169); na avaliação da pureza do pico, não foram detectadas impurezas, sendo este o solvente adequado para o preparo das soluções amostras de citalopram.

Preparou-se solução SQR de citalopram com água pH 1,85 e os resultados das áreas obtidas não diferiram das obtidas com a solução aquosa de SQR utilizada na construção da curva padrão. A última concentração das soluções SQR e amostras foram preparadas em água e resultaram em picos assimétricos, sendo este solvente utilizado com o intuito de reduzir custos e diminuir o uso de solvente orgânico.

Para ser considerado específico, um método analítico deve ser capaz de avaliar, de forma inequívoca, as substâncias em exame na presença de componentes (excipientes, produtos de degradação, impurezas) que podem interferir com a sua determinação em uma amostra complexa. A pureza do pico pode ser indicada através do uso de detectores de arranjo de diodos (DAD), que comparam o espectro de um pico obtido na separação com o de um padrão (RIBANI *et al.*, 2004). A avaliação da especificidade do método foi realizada através da comparação de uma solução isenta da substância de interesse com uma solução amostra dos comprimidos de citalopram e submetendo-se a SQR do citalopram à degradação forçada. No cromatograma da Figura 4.4 pode-se observar que não há interferência dos excipientes no tempo de retenção do citalopram, sendo comprovada a especificidade através do detector de diodos (DAD), que não indicou presença de impureza no pico do fármaco.

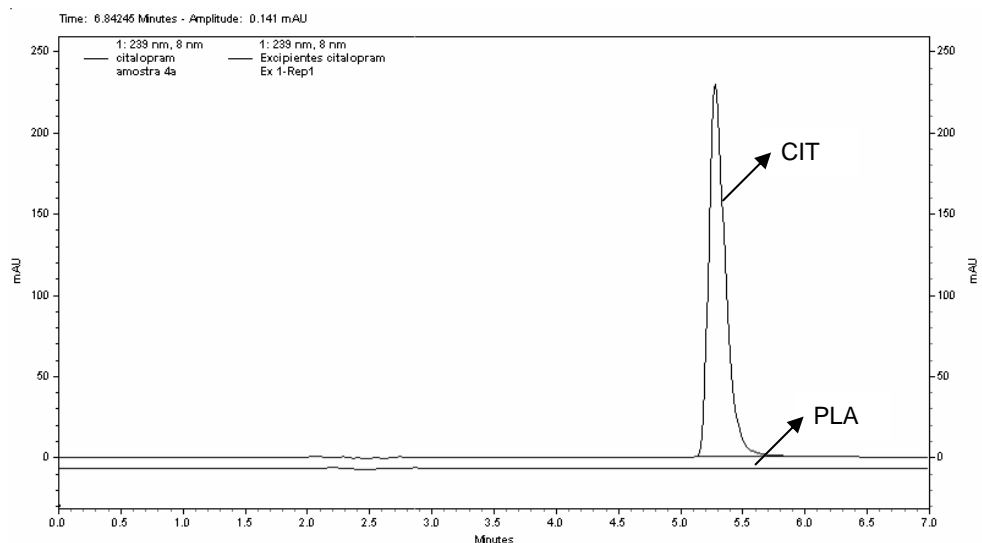


Figura 4.3 - Cromatogramas obtidos com a solução amostra de citalopram na concentração de 40,0 µg/ml (CIT) e com a solução placebo (PLA). Condições cromatográficas: Coluna ACE<sup>®</sup> C<sub>18</sub> (250 x 4,6 mm); fase móvel: solução de trietilamina 0,3%:acetonitrila (55:45, v/v), pH 6,60; fluxo: 1,0 ml/min; detecção: 239 nm; temperatura de 25 °C.

A Figura 4.5 apresenta um cromatograma obtido com a SQR antes de sofrer degradação forçada, na concentração de 40,0 µg/ml.

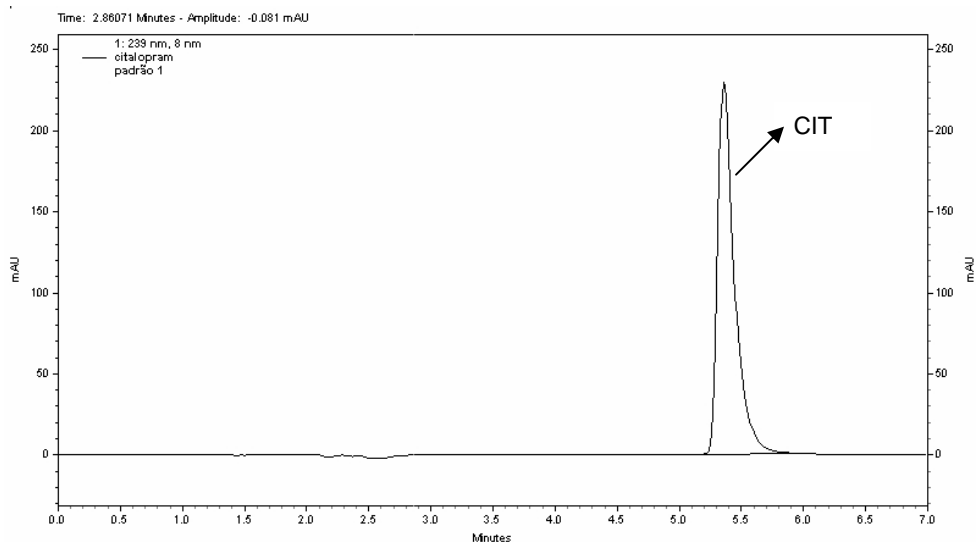


Figura 4.4 - Cromatograma obtido com a solução SQR na concentração de 40,0 µg/ml (CIT) no tempo zero. Condições cromatográficas: Coluna ACE<sup>®</sup> C<sub>18</sub> (250 x 4,6 mm); fase móvel: solução de trietilamina 0,3%:acetonitrila (55:45, v/v), pH 6,60; fluxo: 1,0 ml/min; detecção: 239 nm; temperatura de 25 °C.

Nos cromatogramas da SQR do citalopram, ao ser submetido à temperatura de 80 °C durante 24 horas e à hidrólise ácida por 4 horas em banho-maria ou à temperatura ambiente (25 °C), não foram detectados picos de produtos de degradação (Figura 4.5). Quando o citalopram foi submetido à hidrólise alcalina, à temperatura ambiente, a reação de degradação foi rápida e intensa. Na oxidação com peróxido de hidrogênio 3%, somente após 4 horas em banho-maria a 70 °C ocorreu a formação de picos adicionais (Figura 4.6). Frente à luz UV formaram-se picos de produtos de degradação após 1 hora de exposição à luz, indicando que o citalopram pode ser considerado um fármaco fotossensível e seus produtos de degradação possuem grupamentos cromóforos em sua estrutura (Figura 4.7).

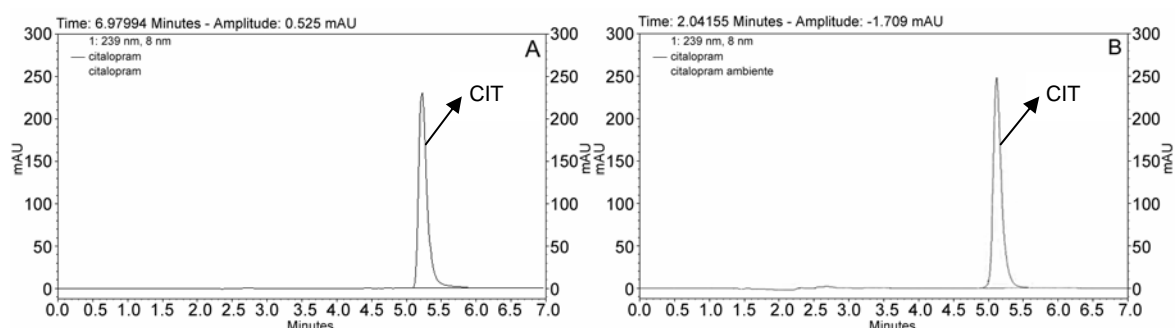


Figura 4.5 - Cromatogramas das degradações forçadas da SQR do citalopram após ser submetido à temperatura de 80 °C por 24 horas (A) e à hidrólise ácida em banho-maria a 70 °C por 4 horas (B). Condições cromatográficas: Coluna ACE<sup>®</sup> C<sub>18</sub> (250 x 4,6 mm); fase móvel: solução de trietilamina 0,3%:acetonitrila (55:45, v/v), pH 6,60; fluxo: 1,0 ml/min; detecção: 239 nm; temperatura de 25 °C. CIT: citalopram.

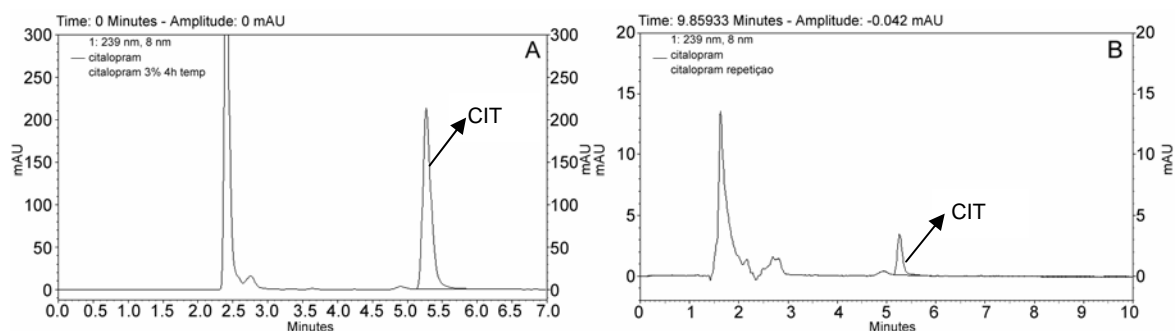


Figura 4.6 - Cromatogramas das degradações forçadas da SQR do citalopram após ser submetido à oxidação em banho-maria a 70 °C por 4 horas (A) e à hidrólise básica à temperatura ambiente (B). Condições cromatográficas: Coluna ACE<sup>®</sup> C<sub>18</sub> (250 x 4,6 mm); fase móvel: solução de trietilamina 0,3%:acetonitrila (55:45, v/v), pH 6,60; fluxo: 1,0 ml/min; detecção: 239 nm; temperatura de 25 °C. CIT: citalopram.



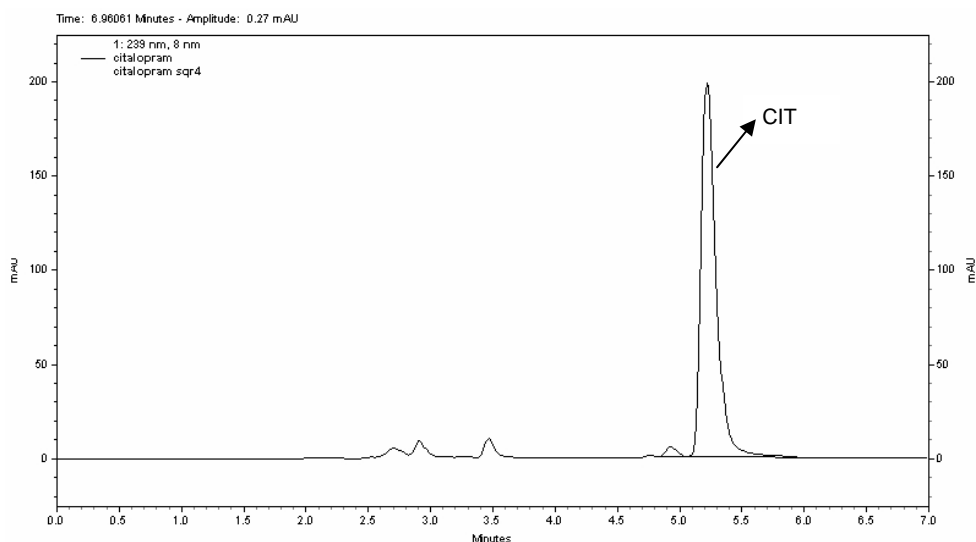


Figura 4.7 - Cromatogramas da degradação forçada da SQR do citalopram após exposição a luz UV por 4 horas. Condições cromatográficas: Coluna ACE<sup>®</sup> C<sub>18</sub> (250 x 4,6 mm); fase móvel: solução de trietilamina 0,3%:acetonitrila (55:45, v/v), pH 6,60; fluxo: 1,0 ml/min; detecção: 239 nm; temperatura de 25 °C. CIT: citalopram.

Como pode ser observado nos cromatogramas obtidos no estudo de degradação forçada, o pico dos produtos de degradação formados encontram-se resolvidos em relação ao citalopram não interferindo na sua quantificação. Utilizando o detector de diodos (DAD), pode-se verificar que a SQR permaneceu com elevada pureza em todas as determinações. Na Figura 4.8 está representada a curva de pureza do pico da SQR do citalopram obtida através do uso do DAD para a solução SQR de citalopram degradada na luz UV por um período de 4 horas. Baseado nos resultados obtidos sugere-se que o método possui especificidade, podendo ser utilizado como indicativo de estabilidade.

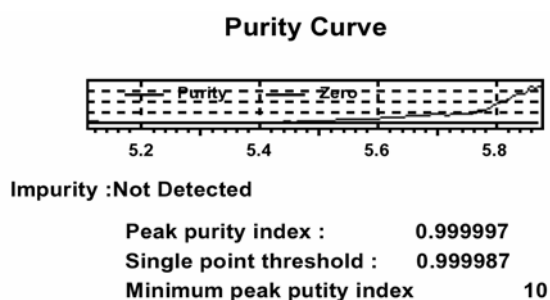


Figura 4.8 – Curva de pureza apresentada para a SQR do citalopram após degradação sob a luz UV por 4 horas, indicando a pureza total do pico do fármaco de 0,999997, obtido por CL com comprimento de onda de 239 nm, utilizando a fase móvel: solução de trietilamina 0,3%:acetonitrila (55:45, v/v), pH 6,60; fluxo: 1,0 ml/min; temperatura de 25 °C.

A Tabela 4.13 apresenta os valores experimentais obtidos na construção da curva padrão para o citalopram por cromatografia líquida para a avaliação da

linearidade do método. Gráfico da concentração *versus* área absoluta foi plotado e mostrou linearidade adequada na faixa de 10,0 a 70,0 µg/ml (Figura 4.9).

Tabela 4.13 - Áreas absolutas obtidas na determinação da curva padrão do citalopram por cromatografia líquida.

Concentração (µg/ml)	Áreas absolutas			Média	DPR
	1° curva	2° curva	3° curva		
10,0	525217	536352	527762	529777	1,10
20,0	1069303	1040182	1064709	1058065	1,48
30,0	1587016	1603919	1602681	1597872	0,59
40,0	2092329	2120602	2118158	2110363	0,74
50,0	2666361	2649951	2657672	2657995	0,31
60,0	3188677	3194102	3190669	3191149	0,09
70,0	3697179	3694276	3709826	3700427	0,22

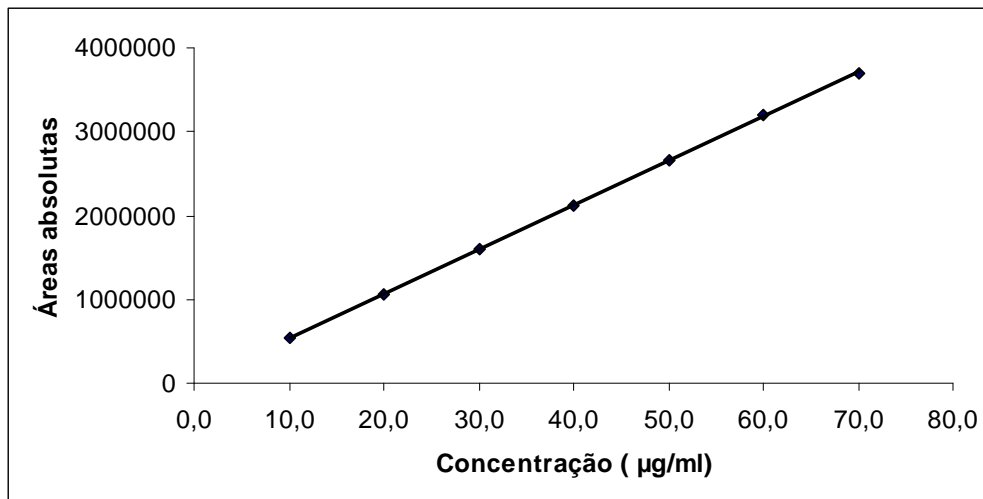


Figura 4.9 - Representação gráfica da curva padrão do citalopram obtida através do método por cromatografia líquida.

As Tabelas 4.14 e 4.15 apresentam os resultados dos tratamentos estatísticos sobre os valores experimentais obtidos para a curva padrão.

Tabela 4.14 - Resultados da curva padrão, obtidos pelo método dos mínimos quadrados, para o método por cromatografia líquida.

Parâmetros	Resultados
Faixa de linearidade	10,0 – 70,0 µg/ml
Equação: $y = bx + a$	$Y = 52994 x + 1058$
Inclinação (b) ± desvio padrão	$52994 \pm 237,5$
Intercepto (a) ± desvio padrão	$1058 \pm 11594,5$
Coefficiente de correlação (r)	0,9999

Os resultados da avaliação da linearidade do método demonstram que as soluções SQR de citalopram apresentam correlação linear (coeficiente de correlação linear de 0,9999) entre a área e as concentrações, no intervalo utilizado. A análise de variância (ANOVA) efetuada sobre os valores de área absoluta da curva padrão do citalopram, cujos elementos estão descritos na Tabela 4.15, demonstra regressão linear significativa, não havendo desvio da linearidade para um nível de significância de 5%, comprovando a validade do método em relação à linearidade. Para fins de quantificação a faixa de variação pode variar de 80 a 120% da concentração de trabalho. A faixa utilizada no presente estudo foi de 25 a 175% da concentração de trabalho.

Tabela 4.15 – Análise de variância das áreas absolutas determinadas para obtenção da curva padrão do citalopram por cromatografia líquida.

Fontes de variação	GL	Soma dos quadrados	Variâncias	F*
Entre	6	$2,36 \cdot 10^{13}$	$3,93 \cdot 10^{12}$	36,376 (2,85)
- regressão linear	1	$2,36 \cdot 10^{13}$	$2,36 \cdot 10^{13}$	218,242 (4,60)
- desvio da linearidade	5	$1,30 \cdot 10^{09}$	$2,60 \cdot 10^{08}$	2,41 (2,96)
Resíduo	14	$1,51 \cdot 10^{09}$	$1,08 \cdot 10^{08}$	
Total	20	$2,36 \cdot 10^{13}$		

\*Valores entre parênteses correspondem aos valores críticos de F para P = 0,05.

A precisão do método foi demonstrada pela repetibilidade (intradia) e precisão intermediária (interdia), sendo expressa pelo desvio padrão relativo (DPR) de uma série de leituras. O valor experimental obtido para a determinação do citalopram nas amostras analisadas no mesmo dia, sob as mesmas condições experimentais, foi de 99,32%. Nas análises realizadas no segundo e no terceiro dias obteve-se, respectivamente, 101,31 e 99,45% (Tabela 4.16). Os desvios padrões relativos encontrados para os três dias de análise foram inferiores a 2%, indicando que o método proposto é preciso.

Tabela 4.16 – Valores experimentais referentes à determinação de citalopram por cromatografia líquida, para a avaliação da precisão intra e interdia.

Amostras	Teor					
	Primeiro dia		Segundo dia		Terceiro dia	
	(mg)	(%)	(mg)	(%)	(mg)	(%)
1	19,65	98,26	20,47	102,36	19,44	97,22
2	19,81	99,06	20,18	100,91	19,72	98,61
3	20,25	101,23	20,19	100,95	19,86	99,29
4	19,75	98,74	20,24	101,22	20,19	100,93
5	19,77	98,84	20,08	100,39	19,99	99,93
6	19,95	99,77	20,40	102,00	20,14	100,70
Média	19,86	99,32	20,26	101,31	19,89	99,45
DPR	1,07		0,73		1,40	
Média / DPR interdia	100,02 / 1,11					

A exatidão do método foi avaliada e a faixa de recuperação média encontrada foi de 100,7 a 101,35%, demonstrando a boa exatidão do método, uma vez que fica dentro dos limites de 95 a 105%, conforme representado na Tabela 4.17.

Tabela 4.17 – Valores experimentais do teste de recuperação realizado por cromatografia líquida.

Amostras	Quantidade de SQR ( $\mu\text{g/ml}$ )		% de Recuperação
	Adicionada	Recuperada	
R <sub>1</sub>	10,0	10,14	101,35
R <sub>2</sub>	20,0	20,01	100,07
R <sub>3</sub>	30,0	30,08	100,25

Um método é robusto quando não é afetado por uma modificação pequena e deliberada em seus parâmetros (RIBANI *et al.*, 2004). Na avaliação dos resultados obtidos no teste de robustez verificou-se que, após alterações no pH e proporção da fase orgânica da fase móvel, coluna, temperatura e variações no pH da solução de extração do citalopram dos comprimidos, o tempo de retenção do citalopram e os parâmetros cromatográficos avaliados sofreram alterações não significativas para a quantificação do citalopram (Tabela 4.18).

Tabela 4.18 – Valores experimentais obtidos no estudo da robustez do método por cromatografia líquida.

Parâmetro	Tempo de retenção (min)	Assimetria	Pratos teóricos	Fator de capacidade	Teor (%)
Fase móvel proposta <sup>a</sup>	5,1	1,44	10777,94	1,72	100,02
40 % de acetonitrila <sup>b</sup>	6,6	1,85	10521,24	2,50	99,45
50% de acetonitrila <sup>b</sup>	4,4	1,78	9563,57	1,36	98,87
pH 6,50 <sup>c</sup>	5,1	1,75	9961,88	1,73	98,70
pH 6,70 <sup>c</sup>	5,5	1,85	10108,28	1,97	98,80
Temperatura 30 °C	5,4	1,74	10838,54	1,90	98,37
Coluna <sup>a</sup>	4,9	1,57	9363,40	1,64	99,27
pH 1,80 <sup>a</sup> (solução extração)	5,3	1,72	9400,54	1,81	99,82
pH 1,90 <sup>a</sup> (solução extração)	5,3	1,75	9620,64	1,81	100,90

a = solução de trietilamina 0,3%:acetonitrila pH 6,60 (55:45, v/v), temperatura de 25 °C;

b = pH = 6,60;

c = proporção da fase aquosa e orgânica: 55:45, v/v.

A sensibilidade do método cromatográfico foi avaliada através da determinação dos limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) do citalopram no sistema empregado. O LD é a concentração mínima na qual a substância pode ser facilmente detectada, mas não necessariamente quantificada e o LQ é expresso como uma concentração na qual a substância pode ser quantificada com precisão e exatidão. O valor obtido para o LD de acordo com a relação sinal / ruído foi de 30,0 ng/ml e para o LQ foi de 100,0 ng/ml com um DPR de 1,07% para três sucessivas injeções da amostra. Estes resultados indicam a sensibilidade do método (Figura 4.10).

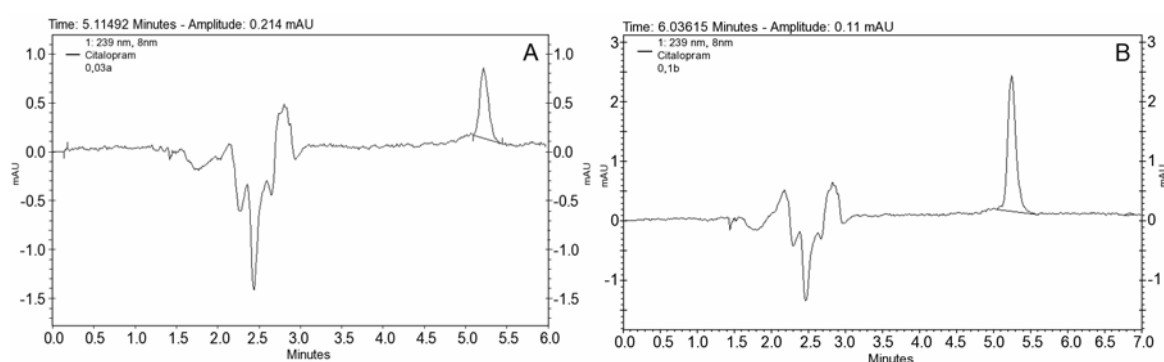


Figura 4.10 - Cromatogramas obtidos na determinação das concentrações do limite de detecção (A) e do limite de quantificação (B). Condições cromatográficas: Coluna ACE<sup>®</sup> C<sub>18</sub> (250 x 4,6 mm); fase móvel: solução de trietilamina 0,3%:acetonitrila (55:45, v/v), pH 6,60; fluxo: 1,0 ml/min; detecção: 239 nm; temperatura de 25 °C.

O método proposto mostrou-se adequado, apresentando simplicidade, especificidade, linearidade, precisão, exatidão e sensibilidade, podendo ser empregado para o controle de qualidade e para estudos preliminares de estabilidade do citalopram em comprimidos.

#### 4.7. Comparação dos métodos propostos

Quando diferentes métodos são desenvolvidos para a análise de uma mesma amostra, é importante compará-los estatisticamente, a fim de verificar se são equivalentes.

Os resultados obtidos por espectrofotometria no ultravioleta e por cromatografia líquida (Tabela 4.19) foram comparados estatisticamente através do teste *t* de Student, presumindo variâncias equivalentes.

Tabela 4.19 – Resultados obtidos na determinação do citalopram em comprimidos por espectrofotometria na região do ultravioleta e cromatografia líquida.

	UV	CL
Teor (%)	98,83	99,32
	98,38	101,31
	98,97	99,45
Teor médio (%)	98,72	100,02
DPR	0,31	1,11

O valor do  $t$  calculado ( $t_{\text{calc.}} = 1,949$ ) não excede o valor do  $t$  crítico ( $t_{\text{crit.}} = 2,776$ ), demonstrando que não há diferença significativa entre os teores obtidos com os diferentes métodos, para um nível de significância de 5%. Esse resultado indica que os dois métodos são equivalentes, podendo ser utilizados de maneira conjunta na determinação do citalopram, ou, em caso de necessidade, um método pode substituir o outro nesta mesma análise.

Em virtude dos resultados obtidos neste capítulo pode-se dizer que ambos os métodos são adequados para a análise de rotina em controle de qualidade do citalopram em comprimidos, pois são métodos rápidos, de fácil execução e cumprem com os requisitos de validação.

Os métodos podem ser utilizados para determinação quantitativa, teste de uniformidade de conteúdo e como técnicas de identificação do citalopram em comprimidos.

## 5. CAPÍTULO III – DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA DE SEPARAÇÃO ENANTIOMÉRICA PARA O CITALOPRAM

### 5.1. Introdução

A isomeria corresponde aos compostos que apresentam os mesmos átomos na molécula, a mesma fórmula molecular, mas com diferentes arranjos espaciais ou com diferentes ligações. A isomeria óptica ocorre quando as substâncias apresentam as mesmas propriedades físicas, porém se diferem somente pelo desvio da luz polarizada. O par objeto-imagem de uma molécula assimétrica é denominado par de enantiômeros (SNYDER *et al.*, 1997; COSTA, D.; COSTA, E., 2003; CARLSSON, 2003).

Por razões econômicas e dificuldades de ordem prática nos processos de produção, a maioria dos fármacos quirais, obtidos por vias sintéticas, é comercializada como racemato, ou seja, mistura contendo quantidades iguais dos dois enantiômeros (o isômero ativo é chamado de eutômero e o que não apresenta atividade óptica é denominado de distômero). Para garantir a segurança e a eficiência dos fármacos disponíveis e em desenvolvimento, é necessário isolar e examinar cada um dos enantiômeros separadamente. As autoridades governamentais, como o FDA, enfatizam a necessidade de produção de novos fármacos na forma de enantiômeros puros, sendo que a composição estereoisomérica deve ser avaliada em função da identidade e pureza (SANTORO; SINGH, 2001; CARLSSON, 2003; BONATO *et al.*, 2005; THOMPSON, 2005).

A estereoquímica vem influenciando muitas áreas da farmacoterapia, com um grande crescimento no campo da psiquiatria, especialmente nos tratamentos da depressão, pois os enantiômeros de muitos fármacos quirais apresentam diferentes perfis farmacológicos e farmacocinéticos (BAUMANN *et al.*, 2002; CARLSSON, 2003). Ligações preferenciais de um dos enantiômeros às proteínas plasmáticas



resultam em diferentes quantidades do enantiômero livre na circulação, que resulta em diferentes concentrações no centro ativo (CARLSSON; NORLANDER, 2001).

O uso de um único enantiômero pode resultar num aumento da potência do fármaco e com isso aumento da eficácia e maior seletividade e por isso uma redução nos efeitos colaterais (COSTA, D; COSTA, E., 2003). O citalopram apresenta um centro quiral. O enantiômero S (+) (escitalopram) do citalopram é o responsável pela atividade antidepressiva e ansiolítica, inibindo duas vezes mais a recaptação de serotonina. O enantiômero R (-) quando administrado sozinho não apresenta atividade serotoninérgica; estudos indicam que este isômero apresenta um efeito inibitório dose dependente sobre a atividade do escitalopram (SÁNCHEZ; BRENNUM, 2000; OWENS *et al.*, 2001; COSTA, D; COSTA, E., 2003; SÁNCHEZ, KREILGAARD, 2004; LACERDA, 2003). O escitalopram foi o primeiro medicamento antidepressivo comercializado originalmente introduzido no mercado como um racemato, sendo o mais seletivo inibidor de recaptação de serotonina (OWENS *et al.*, 2001; BAUMANN *et al.*, 2002).

O desenvolvimento de métodos analíticos adequados para determinar precisamente as concentrações dos enantiômeros de um fármaco, seja em fluidos biológicos ou em preparações farmacêuticas é um pré-requisito essencial para estabelecer os parâmetros farmacocinéticos e controlar a qualidade, respectivamente. As técnicas analíticas utilizadas são a cromatografia líquida (CL), que é a mais empregada, a eletroforese capilar (EC), a cromatografia gasosa (CG), a cromatografia com fluido super (CFS) e sub-crítico e a cromatografia em camada delgada (CCD) (BHUSHAN; THIONGO, 1998; TERFLOTH, 2001; CARLSSON; NORLANDER, 2001; SCHURIG, 2001; SÁNCHEZ; KREILGAARD, 2004; BONATO *et al.*, 2005).

Por CL a separação pode ser obtida por procedimentos indiretos ou diretos. No procedimento indireto, o par de enantiômeros é submetido a uma reação de derivação com um reagente quiral e enantiomericamente puro, visando a obtenção de diastereoisômeros (com propriedades físico-químicas diferentes), que podem ser separados por fases estacionárias não quirais. Nos diretos, a separação do par de enantiômeros acontece pelo uso de fases móveis contendo aditivos quirais ou pelo

uso de fases estacionárias quirais (SNYDER *et al.*, 1997; BONATO *et al.*, 2005; THOMPSON, 2005).

Existem várias teorias sobre o mecanismo de separação envolvendo discriminação ou reconhecimento enantiomérico pela fase estacionária quiral. O conceito mais aceito pelos pesquisadores envolve a teoria de três pontos de ligação. Segundo essa teoria são necessários, pelo menos, três pontos de ligação (ou interações) entre a molécula quiral e a fase estacionária quiral para que ocorra a resolução dos enantiômeros, a formação de um complexo diastereoisomérico transitório, sendo que uma destas interações deve ser estereoespecífica. A força de interação de um destes complexos será mais forte que a do outro, resultando em diferentes tempos de retenção para o par de enantiômeros. Os tipos de interações, que podem ser de atração ou de repulsão, são por ponte de hidrogênio, transferência de carga, interações dipolares, interações iônicas e interações estéricas (PIRKLE; BURKE, 1991; SNYDER *et al.*, 1997; DAVANKOV, 1997; THOMPSON, 2005).

A primeira fase estacionária quiral para CL tornou-se disponível comercialmente em consequência dos trabalhos de PIRKLE e colaboradores (1981). Há no mercado diversas fases estacionárias quirais através de diferentes fornecedores. Estas fases são baseadas em derivados de polissacarídeos (celulose e amilose), proteína, tipo Pirkle, par iônico, ciclodextrina, antibióticos macrocíclicos e éter coroa (SNYDER *et al.*, 1997; BONATO *et al.*, 2005; THOMPSON, 2005).

As fases estacionárias do tipo Pirkle são derivadas de dinitrobenzoil e podem ser utilizadas tanto em fase normal quanto em fase reversa proporcionando assim, grande vantagem sobre as colunas derivadas de polissacarídeos. O uso da fase normal é mais comum devido a maior interação  $\pi$ - $\pi$  e pontes de hidrogênio entre a fase estacionária e o soluto. A estereoquímica da fase estacionária quiral é conhecida, assim, a ordem de eluição pode ser determinada previamente (PIRKLE *et al.*, 1981; AHUJA, 1991; SNYDER *et al.*, 1997; THOMPSON, 2005). Os três pontos de interação principais para o reconhecimento quiral da fase estacionária quiral (S,S) Whelk-O 1<sup>®</sup> são (a) ponte de hidrogênio entre o grupo amido da fase estacionária quiral e o grupo carboxílico do soluto; (b) interação  $\pi$ - $\pi$  entre o conjunto dinitrobenzoil da fase estacionária quiral e o anel naftil ou outro anel aromático do

soluto; (c) interação  $\pi$ - $\pi$  entre o conjunto tetraidrofenantreno da fase estacionária quiral e o sistema aromático presente no soluto (KENNEDY, 1996; WELCH *et al.*, 1997).

As fases estacionárias quirais derivadas de proteína apresentam alta diversidade e enantiosseletividade (ALLENMARK, 1990). Acredita-se que o reconhecimento quiral ocorre predominantemente através de interações hidrofóbicas e eletrostáticas. Uma série de fases estacionárias quirais derivadas de proteínas tem sido comercializada, entre elas destaca-se a derivada de glicoproteínas, a  $\alpha_1$ -ácido glicoproteína (AGP) desenvolvida por HERMANSSON e colaboradores (1994), soroalbumina humana, soroalbumina bovina, ovomucóide, pepsina e celobioidrolase. As proteínas são ligadas covalentemente à sílica e utilizadas somente em fase reversa. A otimização da fase móvel é realizada através de alterações no pH, temperatura, força iônica e modificador orgânico, esses fatores influenciam na enantiosseletividade e no tempo de retenção da separação enantiomérica (SNYDER *et al.*, 1997; THOMPSON, 2005; BONATO *et al.*, 2005).

Há na literatura métodos descritos para a separação dos enantiômeros do citalopram em fluidos biológicos e em forma farmacêutica por cromatografia líquida (Tabela 5.1) e eletroforese capilar (Tabela 5.2).

Tabela 5.1 - Separações do citalopram por CL segundo a literatura.

Coluna / Seletor quiral	Sistema cromatográfico	Amostra	Ref.
Chiral - AGP <sup>®</sup>	N-dodecil-N,N-dimetilamônio-3-propanosulfonato 3mM:ácido hexanóico 10mM em tampão fosfato (pH 6,5), fluxo de 0,9 ml/min; detecção: ultravioleta (240 nm)	Plasma humano	HAUPT, 1996
Chirobiotic V <sup>®</sup>	Metanol:ácido acético:triethylamina (99,9:0,055:0,060 v/v/v), fluxo de 1,0 ml/min; detecção fluorescência (240–296 nm)	Plasma humano	KOSEL <i>et al.</i> , 1998
Cyclobond I 2000 Ac <sup>®</sup>	Metanol:ácido cítrico 10mM (pH 6,3)(55:45 v/v), fluxo de 0,8 ml/min; detecção: fluorescência (240 – 300 nm)	SQR	CARLSSON; NORLANDER, 2001
Chiralcel OD-H <sup>®</sup>	<i>n</i> -hexano : isopropanol:triethylamina (95:05:0,1 v/v/v), fluxo de 1,0 ml/min; detecção: UV (240 nm) e Polarimétrico	SQR e FF	RAO <i>et al.</i> , 2006
$\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ -CD)	Tampão acetato de triethylamônio 0,1% (pH 4,0):acetonitrila (90:10 v/v) contendo 12mM de $\beta$ -CD, fluxo de 0,8 ml/min; detecção: ultravioleta (240 nm)	FF	EL – GINDY <i>et al.</i> , 2006

Tabela 5.2 - Separações do citalopram por EC segundo a literatura.

Coluna / Seletor quiral	Sistema de solvente	Deteção (nm)	Amostra	Ref.
Sulfato de $\beta$ -ciclodextrina (S- $\beta$ -CD)	Tampão fosfato 25 mM (pH 2,5) contendo 1% (p/v) de S- $\beta$ -CD e 12% de acetonitrila	Fl. 266 - 302	Plasma humano	ANDERSEN <i>et al.</i> , 2003
Sulfato de $\beta$ -ciclodextrina (S- $\beta$ -CD) e $\beta$ -CD	Tampão fosfato 35 mM (pH 2,5) contendo 1% (p/v) de S- $\beta$ -CD e 0,05% (p/v) de $\beta$ -CD e tampão citrato 25Mm (pH 5,5) contendo 0,04% (p/v) de S- $\beta$ -CD	UV 240	Plasma humano e FF	MANDRIOLI <i>et al.</i> , 2003
Carboximetil- $\gamma$ -ciclodextrina (CM- $\gamma$ -CD)	Tampão fosfato 20mM (pH 7,0) contendo 0,15% (p/v) CM- $\gamma$ -CD	UV 205	FF	BERZAS NEVADO <i>et al.</i> , 2005

Fl = fluorescência,

FF = forma farmacêutica.

O objetivo desta pesquisa é o desenvolvimento de um método de separação enantiomérica rápido e de alta seletividade empregando a cromatografia líquida com fases estacionárias quirais e detecção no ultravioleta para a determinação qualitativa de enantiômeros visando à aplicação no controle de qualidade de preparações farmacêuticas disponíveis comercialmente no Brasil, sob a forma racêmica ou como enantiômeros isolados.

Este estudo foi desenvolvido no Laboratório de Controle de Qualidade da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

## 5.2. Materiais e Métodos

### 5.2.1. Produtos farmacêuticos

- Comprimidos contendo 20 mg de citalopram, com o nome comercial de Cipramil<sup>®</sup>, fabricados pela Lundbeck, lote 2049810, fabricação 02 / 2005 e validade 02 / 2008.

Excipientes: amido, lactose, celulose microcristalina, copolividona, glicerol a 85%, croscarmelose sódica, estearato de magnésio, hipromelose, macrogol 400 e dióxido de titânio.

- Comprimidos contendo 10 mg de escitalopram, com o nome comercial de Lexapro<sup>®</sup>, fabricado pela Lundbeck, lote 2084429, fabricação 12 / 2005 e validade 12 / 2008.

Excipientes: celulose microcristalina, sílica coloidal, talco, croscarmelose sódica, estearato de magnésio, hipromelose, macrogol 400 e dióxido de titânio.

### **5.2.2. Solventes e reagentes**

- Hexano grau cromatográfico, Merck<sup>®</sup>, Darmstadt, Alemanha,
- Etanol grau cromatográfico, Merck<sup>®</sup>, Darmstadt, Alemanha,
- Diclorometano grau cromatográfico, Merck<sup>®</sup>, Darmstadt, Alemanha,
- Isopropanol grau cromatográfico, OmniSolv<sup>®</sup>, Salisbury, Estados Unidos,
- Metanol grau cromatográfico, OmniSolv<sup>®</sup>, Salisbury, Estados Unidos,
- Ácido acético glacial grau analítico, Merck<sup>®</sup>, Darmstadt, Alemanha,
- Trietilamina grau analítico, Merck<sup>®</sup>, Darmstadt, Alemanha,
- Acetato de amônio grau analítico, Merck<sup>®</sup>, Darmstadt, Alemanha.
- Fosfato de sódio monobásico grau analítico, JT Baker<sup>®</sup>, Phillipsburg, Estados Unidos,
- Hidróxido de sódio grau analítico, Merck<sup>®</sup>, Darmstadt, Alemanha.
- Fosfato de amônio monobásico grau analítico, JT Baker<sup>®</sup>, Phillipsburg, Estados Unidos,
- Acetonitrila grau cromatográfico, Merck<sup>®</sup>, Darmstadt, Alemanha.

### **5.2.3. Equipamentos e acessórios**

- Cromatógrafo a líquido equipado com controlador SCL-10Avp, com bomba modelo LC-10ADvp, detector com comprimento de onda variável UV/VIS modelo SPD-M10Avp, controlador de temperatura para coluna modelo CTO-10ACvp, sistema de desgaseificação “on line” modelo DGU-14A, injetor automático com “loop” variável SIL-10ADvp e integrador automático computadorizado através do software CLASS VP<sup>®</sup>, Shimadzu, Japão,

- Fase estacionária quiral (S,S) Whelk-O 1<sup>®</sup> (250 x 4,6 mm d.i) [(3S, 4S)-4-(3, 5-dinitrobenzamido)-1,2,3,4-tetraidro-fenentereno] depositada sobre partículas de sílica gel 5 µm, 100 Å (Regis Technologies, Inc. USA),
- Fase estacionária quiral: Chiral – AGP<sup>TM</sup> <sup>®</sup> (100 X 4,0 mm d.i), 5 µm (Chromtech, Congleton, U.K.),
- Coluna de guarda Chiral – AGP<sup>®</sup> guard cartridge (10 x 4 mm), 2 – pack (Chromtech, Congleton, U.K.),
- Banho de ultra-som, modelo Thornton T-14,
- Potenciômetro Digimed <sup>®</sup> modelo DM-21, Brasil,
- Membrana de filtro hidrofílica Durapore<sup>®</sup> PVDF 0,45 µm de tamanho de poro, diâmetro de 47 mm (Millipore Corporation, MA, Estados Unidos),
- Unidade filtrante HV Millex em polietileno com membrana Durapore<sup>®</sup> 0,45 µm de tamanho de poro, diâmetro de 13 mm não estéril (Millipore Corporation, MA, Estados Unidos).

#### 5.2.4. Desenvolvimento do método de separação dos enantiômeros

As possíveis interações entre a molécula de citalopram e a fase estacionária quiral foram estudadas a fim de determinar, dentre as colunas disponíveis no laboratório, as mais adequadas para a separação dos enantiômeros do citalopram. Na primeira etapa, a fase estacionária do tipo Pirkle (S,S) (Whelk-O 1<sup>®</sup>) foi empregada para a separação enantiomérica. Como não foram obtidas separações satisfatórias, foi utilizada a fase estacionária quiral Chiral – AGP<sup>TM</sup> <sup>®</sup>.

As amostras de citalopram foram cromatografadas na temperatura ambiente, com um volume de injeção de 20 µL. Para favorecer a separação e diminuir o tempo de análise, o fluxo da fase móvel foi testado no intervalo entre 0,4 e 0,8 ml/min. A detecção foi efetuada no UV no comprimento de onda de 239 nm. As condições foram modificadas sempre levando-se em consideração os limites máximos e seguros de pressão e vazão a que as colunas podem ser submetidas. Outros parâmetros instrumentais foram otimizados de acordo com as condições analíticas. Todas as soluções a serem analisadas foram filtradas através da unidade filtrante HV Millex em polietileno com membrana Durapore<sup>®</sup> 0,45 µm de tamanho de poro,

diâmetro de 13 mm não estéril, antes de serem injetadas, para evitar entrada de impurezas e partículas.

#### **5.2.4.1. Preparo das fases móveis para a coluna (S,S) Whelk-O 1<sup>®</sup>**

A separação enantiomérica do citalopram foi obtida empregando CL em modo normal. As fases móveis foram constituídas por um solvente apolar A (hexano e ou diclorometano), juntamente com o modificador orgânico polar B como etanol ou isopropanol ou metanol. A proporção de B foi variada para controlar a retenção (*k*) e a resolução do par de enantiômeros. O acetato de amônio e ou a trietilamina, em pequena quantidade, foram utilizados para favorecer a simetria dos picos. Após a preparação, as fases móveis foram filtradas através de membrana de filtro hidrofílica Durapore<sup>®</sup> PVDF 0,45 µm de tamanho de poro, diâmetro de 47 mm (Millipore Corporation, MA, Estados Unidos) antes de serem utilizadas.

#### **5.2.4.2. Preparo das fases móveis para a coluna Chiral – AGP<sup>TM</sup><sup>®</sup>**

A separação enantiomérica do citalopram foi obtida empregando CL em fase reversa. As fases móveis foram constituídas de tampão fosfato de sódio, ou tampão fosfato de amônio, ou tampão acetato de amônio em diferentes concentrações (10mM a 100mM), preparados segundo descrito por SNYDER e colaboradores (1997). Isopropanol e metanol foram utilizados com o objetivo de diminuir o tempo de retenção dos picos dos enantiômeros. A trietilamina foi empregada para favorecer a simetria dos picos e a seletividade entre enantiômeros que dificilmente são resolvidos com outras fases móveis usuais. Após a preparação, as fases móveis foram filtradas através de membrana de filtro hidrofílica Durapore<sup>®</sup> PVDF 0,45 µm de tamanho de poro, diâmetro de 47 mm (Millipore Corporation, MA, Estados Unidos) antes de serem utilizadas.

#### **5.2.4.3. Preparo da solução SQR de citalopram**

Pesou-se o equivalente a 10 mg de citalopram e transferiu-se para balão volumétrico de 50 ml. Completou-se o volume com metanol 50% e homogeneizou-se. Alíquota de 5,0 ml desta solução foi transferida para balão volumétrico de 25 ml, completou-se o volume com a fase móvel, obtendo-se uma solução SQR de concentração final de 40 µg/ml.

#### **5.2.4.4. Preparo da solução amostra de citalopram**

Foram pesados 20 comprimidos contendo 20 mg citalopram e determinou-se o peso médio. Os comprimidos foram triturados e o pó misturado. Foi pesado o equivalente a 10 mg de citalopram e transferido para balão volumétrico de 50 ml. Adicionou-se aproximadamente 40 ml de metanol 50% e colocou-se em banho de ultra-som por 10 minutos. Completou-se o volume com metanol 50%, homogeneizou-se e filtrou-se a solução. Alíquota de 5,0 ml do filtrado foi transferida para balão volumétrico de 25 ml, completou-se o volume com a fase móvel, obtendo-se solução de concentração final de 40 µg/ml.

#### **5.2.4.5. Preparo da solução amostra de escitalopram**

Foram pesados 20 comprimidos contendo 10 mg escitalopram e determinou-se o peso médio. Os comprimidos foram triturados e o pó misturado. Foi pesado o equivalente a 10 mg de escitalopram e transferido para balão volumétrico de 50 ml. Adicionou-se aproximadamente 40 ml de metanol 50% e colocou-se em banho de ultra-som por 10 minutos. Completou-se o volume com metanol 50%, homogeneizou-se e filtrou-se a solução. Alíquota de 5,0 ml do filtrado foi transferida para balão volumétrico de 25 ml, completou-se o volume com a fase móvel, obtendo-se solução de concentração final de 40 µg/ml.

#### **5.2.4.6. Preparo da solução placebo**

Pesou-se quantidade de excipientes equivalente a 10 mg de citalopram e transferiu-se para balão volumétrico de 50 ml. Adicionou-se aproximadamente 40 ml de metanol 50% e colocou-se em banho de ultra-som por 10 minutos. Completou-se o volume com metanol 50%, homogeneizou-se e filtrou-se a solução. Alíquota de 5,0 ml do filtrado foi transferida para balão volumétrico de 25 ml, completou-se o volume com a fase móvel.

### **5.2.5. Resultados e discussão**

A cromatografia líquida é a técnica mais utilizada para a separação dos enantiômeros (BONATO *et al.*, 2005). A capacidade de separação do par de enantiômeros por CL é medida pela enantioseletividade (fator  $\alpha$ ). Para um par de enantiômeros ser considerado resolvido, o valor de  $\alpha$  deve ser maior que 1,1. O fator de capacidade ( $k$ ) deve estar entre 0,5 e 20 (SNYDER *et al.*, 1997).



No desenvolvimento do método de separação dos enantiômeros devem ser consideradas as seguintes características relacionadas com a estrutura química do fármaco: solubilidade em diferentes solventes, capacidade de ligações  $\pi$  ou pontes de hidrogênio, pKa, grupos funcionais, espectro no UV, capacidade de formação de complexos de inclusão (SNYDER *et al.*, 1997).

Para a realização deste estudo, as seguintes fases estacionárias quirais estavam disponíveis: Chiralcel OD<sup>®</sup>, Chiradex<sup>®</sup>, (S,S)  $\alpha$ -Burke-2<sup>®</sup>, (S,S) Whelk-O 1<sup>®</sup> e Chiral-AGP<sup>TM®</sup>. Com base na estrutura química do citalopram, a coluna Chiradex<sup>®</sup> não foi testada devido ao alto peso molecular do fármaco que não permitiria a formação de complexos estáveis de inclusão. A coluna (S,S)  $\alpha$ -Burke-2<sup>®</sup> é do tipo  $\pi$ -aceptora especialmente desenvolvida para a separação enantiomérica dos álcoois amínicos, como os  $\beta$ -bloqueadores (PETERSEN *et al.*, 1997). RAO e colaboradores (2006) realizaram a separação dos enantiômeros do citalopram com a fase estacionária quiral Chiralcel OD-H<sup>®</sup>, que é preparada com sílica de 5  $\mu$ m. A coluna quiral Chiralcel OD<sup>®</sup> (preparada com sílica de 10  $\mu$ m) não foi testada por apresentar menor resolução e eficiência cromatográfica quando comparada com a Chiralcel OD-H<sup>®</sup>.

A fase estacionária quiral (S,S) Whelk-O 1<sup>®</sup> é um tipo de coluna “híbrida”, ou seja, é do tipo  $\pi$ -doadora e  $\pi$ -aceptora, sendo utilizada na separação de enantiômeros que contêm tanto grupamentos  $\pi$ -básicos quanto grupamentos  $\pi$ -ácidos (SNYDER *et al.*, 1997). Não há nenhum trabalho descrito na literatura que utilize esta fase estacionária quiral para a separação dos enantiômeros do citalopram na forma farmacêutica comprimido. Dos três pontos de interação (item 5.1) para o reconhecimento quiral por esta coluna, duas possíveis interações  $\pi$ - $\pi$  poderiam ocorrer entre o conjunto dinitrobenzoiil e o conjunto tetraidrofenantreno da fase estacionária quiral com o anel aromático do fármaco, possibilitando, assim, a separação enantiomérica do citalopram.

Os teste preliminares para a separação enantiomérica do citalopram foram realizados com a solução SQR de citalopram, utilizando-se a coluna do tipo Pirkle (S,S) Whelk-O 1<sup>®</sup> e fases móveis em diferentes proporções constituídas por hexano e ou diclorometano com modificadores orgânicos, tais como isopropanol, etanol ou

metanol, juntamente com trietilamina e acetato de amônio (Tabela 5.3). O efeito na resolução pelo fluxo da fase móvel em colunas do tipo Pirkle é menos pronunciado quando comparando, por exemplo, com as colunas de proteína (SNYDER *et al.*, 1997), portanto, este fator foi pouco modificado nos ensaios para o desenvolvimento do método de separação enantiomérica.

Tabela 5.3 - Ensaios preliminares para a separação enantiomérica do citalopram utilizando a coluna tipo Pirkle Whelk-O 1<sup>®</sup>.

Fase móvel	Proporção fase móvel	Fluxo (ml/min)	Concentração injetada (µg/ml)
Hexano:etanol	90:10 (v/v)	1,0	± 80,0
	95:5 (v/v)	1,0	± 80,0
	80:20 (v/v)	1,0	± 80,0
	70:30 (v/v)	1,0	± 80,0
Hexano:etanol:trietilamina	80:20:0,2 (v/v/v)	1,0	± 80,0
	99:1:0,2 (v/v/v)	1,0	± 80,0 / 160,0
	95:5:0,2 (v/v/v)	1,0	± 80,0 / 160,0
	60:40:0,2 (v/v/v)	0,8	± 80,0 / 160,0
	80:20:0,3 (v/v/v)	1,0 / 0,6	± 80,0
Hexano:isopropanol:trietilamina	95:5:0,1 (v/v/v)	1,0	± 80,0
	90:10:0,1 (v/v/v)	1,0	± 80,0
	85:15:0,1 (v/v/v)	1,0	± 80,0
Hexano:etanol; (act. am. 10mM)	80:20 (v/v)	1,0	± 160,0
	90:10 (v/v)	1,0	± 160,0
Hexano:etanol; (act. am. 30mM)	70:30 (v/v)	1,0	± 160,0
Hexano:etanol; (act. am. 50mM)	75:25 (v/v)	1,0	± 160,0
Diclorometano:etanol	80:20 (v/v)	1,0	± 160,0
Diclorometano:etanol:trietilamina	80:20:0,3 (v/v/v)	1,0	± 160,0
	90:10:0,15 (v/v/v)	1,0	± 160,0 / 320,0
	95:5:0,15 (v/v/v)	1,0	± 160,0
	98:2:0,06 (v/v/v)	1,0	± 160,0
	93:7:0,21 (v/v/v)	1,0	± 160,0
	90:10:0,3 (v/v/v)	1,0	± 160,0
	95:5:0,075 (v/v/v)	1,0 / 0,6	± 160,0
	96:4:0,06 (v/v/v)	0,8	± 160,0

continuação da Tabela 5.3:

Fase móvel	Proporção fase móvel	Fluxo (ml/min)	Concentração injetada (µg/ml)
Diclorometano:hexano:etanol:triethylamina	80:15:5:0,15 (v/v/v/v)	1,0	± 160,0
	82:15:3:0,09 (v/v/v/v)	1,0	± 160,0
	83:16:1:0,03 (v/v/v/v)	1,0	± 160,0
	70:25:5:0,15 (v/v/v/v)	1,0	± 160,0
	75:20:5:0,3 (v/v/v/v)	1,0	± 160,0
Diclorometano:etanol:hexano:triethylamina	85:10:5:0,3 (v/v/v/v)	1,0	± 160,0
	88:10:2:0,3 (v/v/v/v)	1,0	± 160,0
	78:21:1:0,3 (v/v/v/v)	1,0	± 160,0
Diclorometano:metanol; (act. am. 20 mM)	80:20 (v/v)	1,0	± 160,0
Diclorometano:metanol;(act.am. 10 mM)	90:10 (v/v)	1,0	± 160,0
	95:5 (v/v)	1,0	± 80,0
Diclorometano:methanol; (act. Am. 5 mM)	95:5 (v/v)	1,0	± 160,0
Diclorometano:metanol; (act. am. 14 mM)	93:7 (v/v)	1,0	± 80,0
Diclorometano:metanol; (act. am. 8 mM)	96:4 (v/v)	1,0	± 80,0
Diclorometano:metanol; (act. am. 18 mM)	91:9 (v/v)	1,0	± 80,0
Diclorometano:metanol; (act. am. 26 mM)	87:13 (v/v)	1,0	± 80,0

Act. am = acetato de amônio

Inicialmente a separação enantiomérica do citalopram foi efetuada utilizando-se o composto na forma ionizada, empregando-se a fase móvel hexano:etanol em diferentes proporções. O par de enantiômeros não foi eluído após 25 minutos de análise, provavelmente devido a maior afinidade do citalopram pela fase estacionária quiral.

Para proceder a separação isomérica do citalopram na forma não dissociada, empregou-se a triethylamina na fase móvel. O par de enantiômeros foi eluído concomitantemente (tempo de retenção de 16 minutos) ao utilizar-se a fase móvel hexano:etanol:triethylamina na proporção de 60:40:0,2 (v/v/v). O aumento da proporção do hexano para 80, 95 e 99%, aumentou o tempo de retenção e não separou os enantiômeros do fármaco.

A mudança no modificador orgânico pode acarretar em diferentes enantioseletividades (SNYDER *et al.*, 1997). Por esta razão, utilizou-se isopropanol ao invés de etanol. Mesmo após 30 minutos não se obteve a eluição dos enantiômeros do citalopram, utilizando-se a fase móvel constituída por hexano:isopropanol:trietilamina em diferentes proporções. Nos cromatogramas obtidos com a fase móvel hexano:etanol:acetato de amônio observou-se que quanto menor a concentração de acetato de amônio, maior é o tempo de retenção do citalopram em relação à fase móvel contendo trietilamina. Nestas condições, não foi obtida a separação dos enantiômeros do citalopram, portanto, a substituição da trietilamina pelo acetato de amônio não influencia na separação enantiomérica.

A utilização do diclorometano em substituição ao hexano na fase móvel reduz sua apolaridade, possibilitando, assim, maior afinidade do citalopram pela fase móvel e conseqüentemente reduzindo o tempo de retenção dos enantiômeros. Ao empregar estes sistemas constituídos por solventes clássicos (diclorometano:etanol) com esse tipo de coluna, também não foi possível separar os enantiômeros do citalopram. O tempo de retenção do citalopram na fase móvel contendo diclorometano:etanol:trietilamina (90:10:0,15, v/v/v) foi em torno de 5 minutos, aumentando-se a proporção de diclorometano o tempo de retenção foi de 3 minutos, porém, em todos os cromatogramas os enantiômeros foram eluídos juntos.

Empregou-se a fase móvel contendo diclorometano:hexano:etanol:trietilamina em diferentes proporções, porém, após 30 minutos não obteve-se a eluição dos enantiômeros. Para aumentar a polaridade da fase móvel contendo diclorometano, substituiu-se o etanol pelo metanol e a trietilamina pelo acetato de amônio, contudo, o par de enantiômeros foi eluído junto (tempo de retenção em torno de 20 minutos). Baseado nos resultados obtidos, concluiu-se que a fase estacionária quiral (S,S) Whelk-O 1<sup>®</sup> devido às fortes ligações iônicas e à ausência de pontes de hidrogênio com a molécula de citalopram não é recomendada para a separação de seus enantiômeros. A fase móvel deve ser apolar para que ocorra a separação enantiomérica, mas polar o suficiente para que o citalopram seja carregado através desta fase estacionária quiral, sendo que essa correlação não foi possível estabelecer.

Misturas racêmicas que são dificilmente separadas por outras fases estacionárias quirais podem ter seus enantiômeros resolvidos com o uso de coluna quiral protéica, tendo como principal vantagem sua compatibilidade com fases móveis tamponadas. As proteínas de colunas quirais são relativamente estáveis, algumas toleram uma ampla faixa de solventes orgânicos, pH e temperatura (SNYDER *et al.*, 1997).

A coluna Chiral - AGP<sup>TM®</sup> é indicada para a separação enantiomérica de solutos ácidos e básicos sem necessidade de derivação. Devido sua alta estabilidade e ampla faixa de uso, é a fase estacionária quiral de proteína escolhida para o desenvolvimento de separações enantioméricas (SNYDER *et al.*, 1997; BONATO *et al.*, 2005).

Em pesquisas anteriores realizadas por HAUPT (1996), foi utilizada a coluna quiral do tipo Chiral - AGP<sup>TM®</sup> para a separação enantiomérica do citalopram em plasma humano. A determinação da ordem de eluição foi possível durante a análise por comparação com os isômeros puros na forma isolada. No catálogo da ChromTech, o citalopram é utilizado como exemplo de substância, cujos enantiômeros são separados pela coluna quiral Chiral - AGP<sup>TM®</sup>, utilizando a fase móvel acetato de amônio 50mM:triethylamina 3mM, pH 5,0 ajustado com ácido acético, fluxo de 0,8 ml/min e detecção no ultravioleta em 220 nm. No cromatograma deste catálogo não é apresentada a ordem de eluição dos enantiômeros do citalopram. Não há na literatura o uso desta fase estacionária quiral para a separação enantiomérica do citalopram na forma farmacêutica comprimido.

As condições testadas (Tabela 5.4) partiram de uma solução SQR de citalopram na concentração de 40 µg/ml devido à baixa capacidade de ligação das proteínas comparada com outras colunas quirais. Os fluxos de fase móveis empregados para a separação dos enantiômeros foram estudados durante a otimização das condições. Tomou-se como fator limitante a pressão máxima em que a coluna Chiral - AGP<sup>TM®</sup> suporte sem danificar-se, o que implicou na impossibilidade do emprego de fluxo maior do que 0,8 ml/min.

Inicialmente, utilizou-se a fase móvel constituída por tampão fosfato de sódio 20mM, pH 6,0, fluxo de 0,6 ml/min, após 50 minutos não se obteve a eluição dos

enantiômeros. A percentagem de solvente orgânico e o tipo de solvente adicionado à fase móvel afetam as interações hidrofóbicas com os sítios apolares presentes na proteína. O aumento na concentração do modificador orgânico acarreta em uma diminuição no tempo de retenção do fármaco (HAUPT, 1996; SNYDER *et al.* 1997; BONATO *et al.*,2005). Adicionou-se, portanto, 5% de isopropanol à fase móvel contendo tampão fosfato de sódio 20mM, pH 6,0, resultando em uma diminuição no tempo de retenção (19 minutos), porém, não foi possível separar os enantiômeros do citalopram.

Tabela 5.4 - Ensaios preliminares para a separação enantiomérica do citalopram utilizando a coluna Chiral - AGP<sup>TM</sup>.

Fase móvel	Proporção fase móvel	Fluxo (ml/min)	Concentração injetada (µg/ml)	Fatores k <sub>1</sub> e k <sub>2</sub>
Tampão fosfato de sódio 20mM (pH 6,0)	100 (v)	0,6	± 40,0	*
Tampão fosfato de sódio 20mM:isopropanol (pH 6,0)	95:05 (v/v)	0,6	± 40,0	*
Tampão fosfato de sódio 50mM (pH 6,0)	100 (v)	0,6 / 0,8	± 40,0	*
Tampão fosfato de sódio 50mM:isopropanol (pH 6,0)	98:02 (v/v)	0,6	± 40,0	*
Tampão fosfato de sódio 20mM (pH 7,0)	100 (v)	0,6	± 40,0	*
Tampão fosfato de amônio 50mM (pH 7,0)	100 (v)	0,6	± 40,0	*
Tampão fosfato de amônio 50mM:isopropanol (pH 7,0)	99:01 (v/v)	0,6	± 40,0	*
Tampão fosfato de amônio 25mM (pH 6,0)	100 (v)	0,6 / 0,8	± 40,0	*
Tampão fosfato de amônio 25mM:isopropanol (pH 6,0)	98:02 (v/v)	0,6	± 40,0	*
Tampão fosfato de amônio 10mM (pH 6,0)	100 (v)	0,6 / 0,8	± 40,0	*
Tampão fosfato de amônio 10mM : metanol (pH 6,0)	95:05 (v/v)	0,8	± 40,0	*
Tampão fosfato de amônio 20mM (pH 6,0)	100 (v)	0,8	± 40,0	*
Tampão acetato de amônio 50mM (pH 5,0)	100 (v)	0,8	± 40,0	3,6 e 4,4
Tampão acetato de amônio 50mM : metanol (pH 5,0)	99:01 (v/v)	0,4 / 0,8	± 40,0	3,8 e 4,6/ 3,3 e 4,0
Tampão acetato de amônio 50mM (pH 5,6)	100 (v)	0,8	± 40,0	3,6 e 4,8
Tampão acetato de amônio 60mM (pH 5,6)	100 (v)	0,6 e 0,8	± 40,0	8,5 e 10,7/ 4,6 e 5,8

\*Não foi obtida separação enantiomérica.

continuação da Tabela 5.4:

Fase móvel	Proporção fase móvel	Fluxo (ml/min)	Concentração injetada ( $\mu\text{g/ml}$ )	Fatores $k_1$ e $k_2$
Tampão acetato de amônio 40mM (pH 5,6)	100 (v)	0,8	$\pm 40,0$	4,6 e 5,8
Tampão acetato de amônio 100mM (pH 5,6)	100 (v)	0,8	$\pm 40,0$	4,2 e 5,8
Tampão acetato de amônio 100mM : isopropanol (pH 5,6)	99:01 (v/v)	0,8	$\pm 40,0$	2,0 e 2,5
Tampão acetato de amônio 100mM : trietilamina 2mM (pH 5,6)	100 (v)	0,8	$\pm 40,0$	5,4 e 7,6
Tampão acetato de amônio 100mM : trietilamina 3mM (pH 5,47)	100 (v)	0,8	$\pm 40,0$	5,0 e 7,0
Tampão acetato de amônio 100mM : trietilamina 3mM : acetonitrila (pH 5,47)	99:01 (v/v) 99,5:0,5 (v/v)	0,8	$\pm 40,0$	4,1 e 4,7/ 4,3 e 5,5
Tampão acetato de amônio 100mM : trietilamina 4mM : acetonitrila (pH 5,47)	99:01 (v/v) 99,5:0,5 (v/v)	0,8	$\pm 40,0$	4,4 e 5,6/ 5,0 e 6,5
Tampão acetato de amônio 100mM : trietilamina 4mM (pH 5,47)	100 (v)	0,8	$\pm 40,0$	5,0 e 7,0

A interação eletrostática entre a proteína e o soluto carregado também é afetada pela concentração do tampão empregado na fase móvel. Um aumento na concentração do tampão reduz o tempo de retenção do soluto (SNYDER *et al.*, 1997; BONATO *et al.*, 2005). Aumentando-se a força iônica da fase móvel através do emprego do tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 6,0, com fluxo de 0,6 ou 0,8 ml/min, obtiveram-se resultados semelhantes aos encontrados com o tampão fosfato de sódio 20 mM, ou seja, não houve a separação enantiomérica do fármaco (tempo de retenção de 42 e 29 minutos, respectivamente). Com a adição de 2% de isopropanol, também não foi obtida a separação dos enantiômeros do citalopram, somente redução no tempo de retenção para 20 minutos.

A fase estacionária Chiral - AGP<sup>TM</sup>® é baseada na proteína glicoproteína  $\alpha_1$ -ácida que apresenta ponto isoelétrico = 2,7, portanto, para a separação dos enantiômeros de um composto básico, como o citalopram (pKa = 9,5), é necessário um elevado pH da fase móvel (no intervalo de 3,0 a 7,0) para acarretar em um aumento na retenção dos enantiômeros, devido ao aumento na interação eletrostática entre o soluto e a proteína, cuja densidade de cargas negativas

aumenta à medida em que o pH é aumentado. Quanto maior for a retenção dos enantiômeros, maior é a sua separação. O pH da fase móvel geralmente é utilizado para controlar o tempo de retenção e a seletividade da separação quiral (SNYDER *et al.*, 1997, BONATO *et al.*, 2005; THOMPSON, 2005).

Empregou-se a fase móvel tampão fosfato de sódio 20mM em pH 7,0, com fluxo de 0,6 ml/min. Nesta condição, não se obteve a eluição dos enantiômeros do citalopram após mais de 50 minutos de análise. No catálogo da ChromTech, conforme descrito, a fase móvel utilizada é constituída de tampão acetato de amônio, baseada nesta informação estudou-se o tampão fosfato de amônio. Os cromatogramas obtidos com este tampão em diferentes concentrações, pH, fluxo e adição de modificadores orgânicos não forneceram resultados satisfatórios, pois a separação dos isômeros do citalopram foi parcial, sendo que, em algumas condições, o citalopram não foi eluído em mais de 50 minutos de análise.

Frente aos resultados obtidos, constatou-se a necessidade de alterar a faixa tamponante para encontrar a melhor resolução entre os enantiômeros, portanto, passou-se a utilizar o tampão acetato. Para a fase móvel constituída de tampão acetato de amônio 50 mM, pH 5,0, fluxo de 0,8 ml/min, obteve-se como resultado a separação parcial dos enantiômeros (8,0 e 9,5 minutos), visto que a separação dos picos não se completou até a linha de base, que é um dos requisitos para futuros estudos quantitativos (Figura 5.1). Na tentativa de reduzir os tempos de retenção dos isômeros e aumentar a resolução entre os picos, adicionou-se à fase móvel um modificador orgânico fraco (metanol).

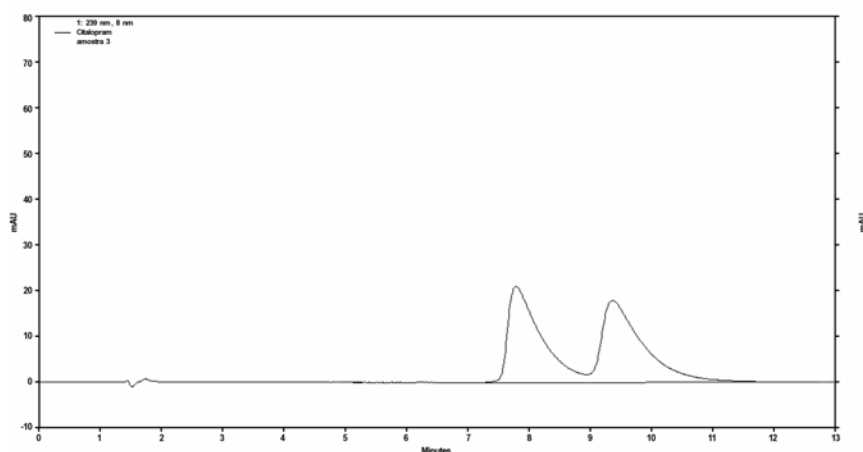


Figura 5.1 – Cromatograma da separação enantiomérica do citalopram utilizando fase móvel constituída por tampão acetato de amônio 50 mM, pH 5,0, com fluxo de 0,8 ml/min.



A adição de 1% de metanol à fase móvel de tampão acetato de amônio 50 mM, pH 5,0, empregando-se os fluxos de 0,4 e 0,8 ml/min, resultou em separações parciais dos enantiômeros e com tempos de retenção menor (12 e 14 minutos para o fluxo de 0,4 ml/min; 6,5 e 7,5 minutos para o fluxo de 0,8 ml/min), quando comparado com a fase móvel anteriormente testada (Figura 5.2). O aumento do fluxo da fase móvel reduziu a seletividade provavelmente devido à diminuição do tempo de interação entre o soluto e a coluna.

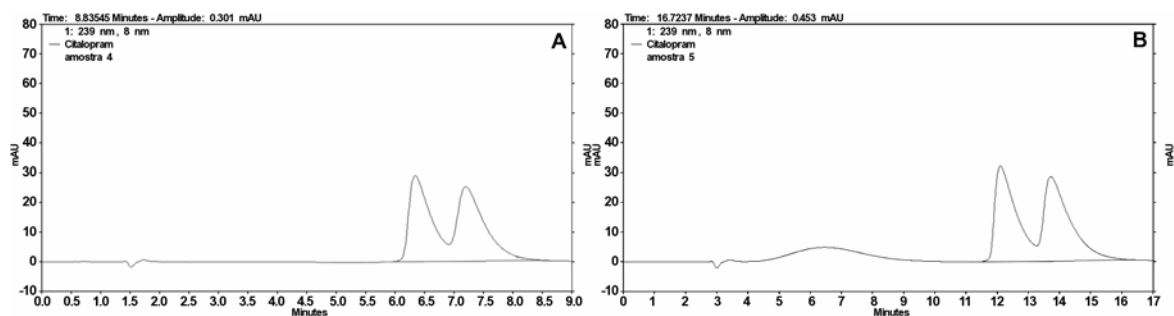


Figura 5.2 – Cromatograma da separação enantiomérica do citalopram utilizando fase móvel constituída por tampão acetato de amônio 50 mM: metanol (99:01, v/v), pH 5,0, com fluxo de 0,8 ml/min (A) e 0,4 ml/min (B).

O aumento do pH da fase móvel acarreta em uma diminuição no tempo de retenção de substâncias básicas quando as interações eletrostáticas são predominantes. Quando as interações hidrofóbicas predominam, o tempo de retenção dessas substâncias é aumentado (SNYDER *et al.*, 1997). Aumentando o pH do tampão acetato de amônio 50 mM para 5,6, com fluxo de 0,8 ml/min, observou-se no cromatograma (Figura 5.3) maior resolução entre os enantiômeros em um tempo de retenção relativamente adequado (11,5 e 14,5 minutos).

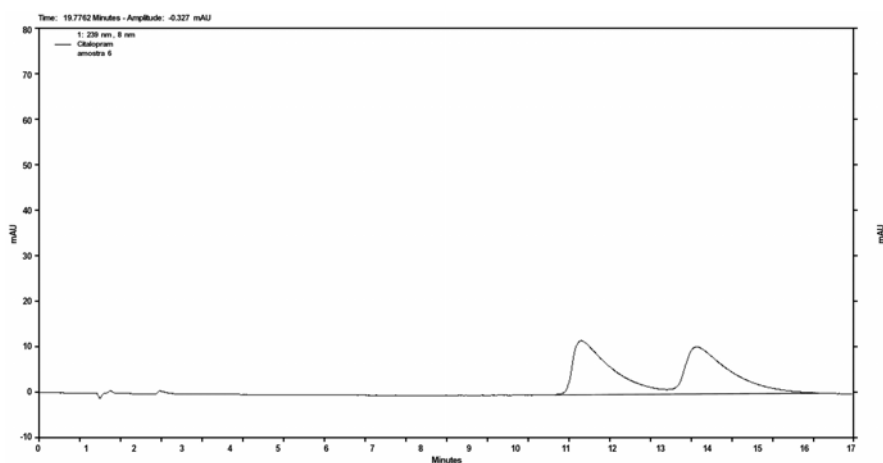


Figura 5.3 - Cromatograma da separação enantiomérica do citalopram utilizando fase móvel constituída por tampão acetato de amônio 50 mM, pH 5,6, com fluxo de 0,8 ml/min.

Para evitar o uso da trietilamina na fase móvel, utilizou-se uma fase móvel com maior força iônica através do uso do tampão acetato de amônio 60 mM, pH 5,6 e fluxo de 0,6 ml/min, com o objetivo de melhorar a enantioseletividade dos enantiômeros em um tempo de retenção adequado. No cromatograma da Figura 5.4, observa-se um aumento na resolução do par de enantiômeros (19 e 23,5 minutos), porém a separação não se completou até a linha de base. Utilizando tampão acetato de amônio 40 mM, pH 5,6 e fluxo de 0,8 ml/min, o tempo de retenção foi de 14 e 17 minutos, entretanto, a seletividade dos enantiômeros foi reduzida (Figura 5.5).

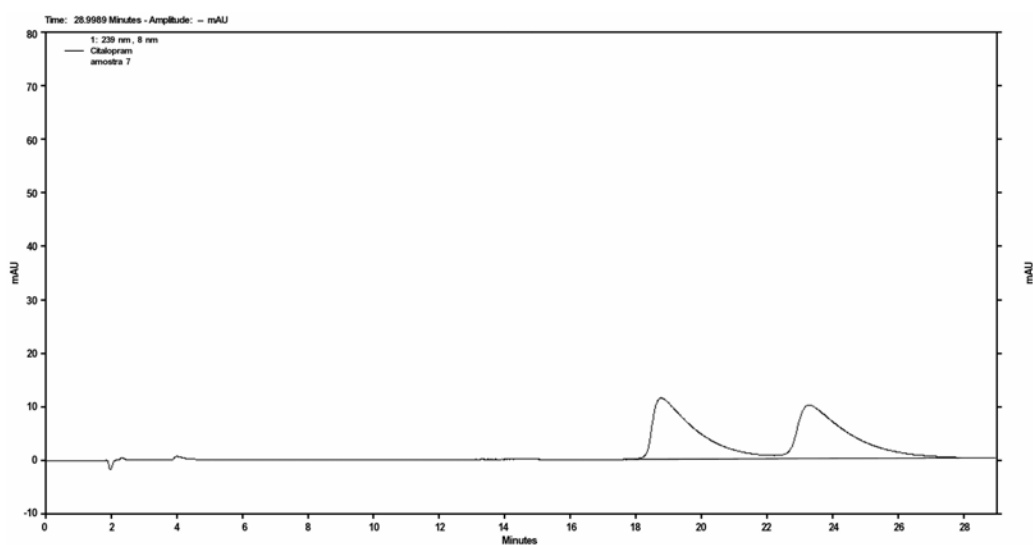


Figura 5.4 - Cromatograma da separação enantiomérica do citalopram utilizando fase móvel constituída por tampão acetato de amônio 60 mM, pH 5,6, com fluxo de 0,6 ml/min.

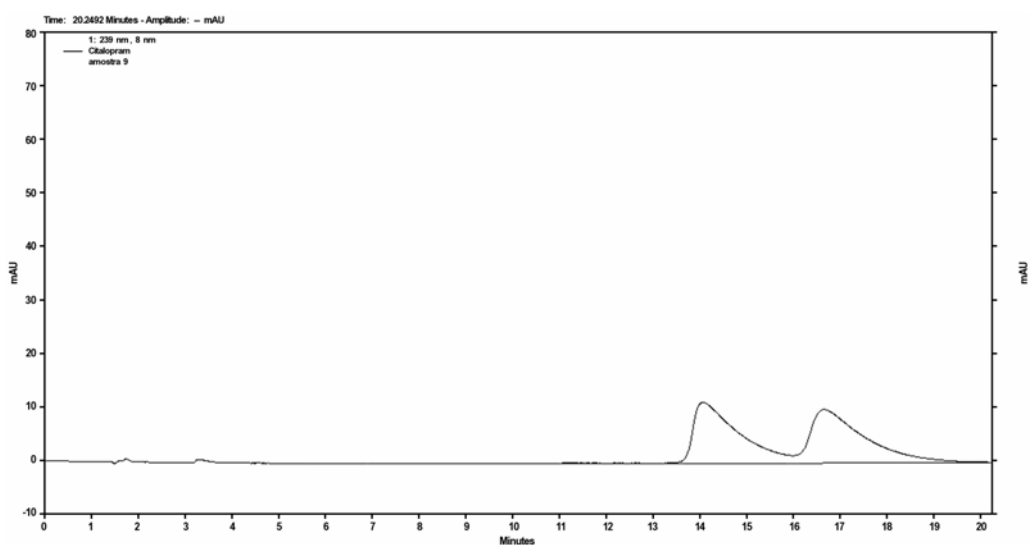


Figura 5.5 - Cromatograma da separação enantiomérica do citalopram utilizando fase móvel constituída por tampão acetato de amônio 40 mM, pH 5,6, com fluxo de 0,8 ml/min.

Empregou-se a fase móvel constituída de tampão acetato de amônio 100 mM, que é a máxima concentração de tampão que esta coluna quiral suporta. O pH foi alterado para 5,47 e o fluxo desta fase móvel foi de 0,8 ml/min. No cromatograma da Figura 5.6 observa-se a separação completa dos enantiômeros do citalopram. A adição de 1% de isopropanol nesta fase móvel reduziu o tempo de retenção e a resolução dos picos formados. Este fato ocorreu provavelmente porque os modificadores orgânicos, como o isopropanol, competem com as moléculas do soluto na coluna para formar pontes de hidrogênio com as moléculas quirais da fase estacionária. Esta competição, entre o modificador orgânico e as moléculas do soluto, conduziu ao deslocamento das moléculas do citalopram pela coluna, antes que ele pudesse interagir com as moléculas quirais da fase estacionária quiral levando a complexação temporária.

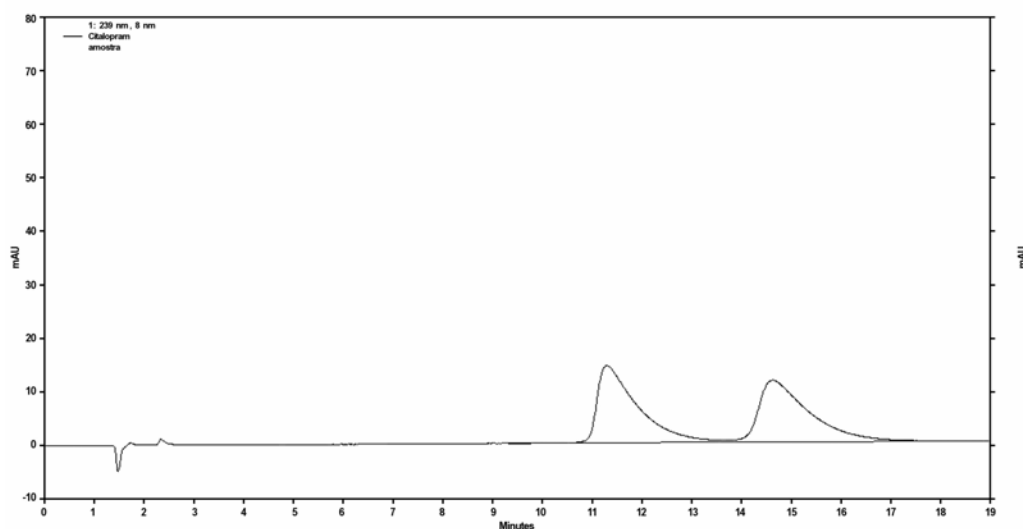


Figura 5.6 - Cromatograma da separação enantiomérica do citalopram utilizando fase móvel constituída por tampão acetato de amônio 100 mM, pH 5,47, com fluxo de 0,8 ml/min.

A trietilamina foi adicionada à fase móvel contendo tampão acetato de amônio 100 mM com o objetivo de melhorar a simetria dos picos formados, conseqüentemente, aumentando a enantioseletividade dos enantiômeros formados. Para obter-se concentração ótima de trietilamina na fase móvel, foram testadas três concentrações de 2 mM, 3 mM e 4 mM, mantendo-se os outros parâmetros constantes. Os perfis dos picos estão apresentados na Figura 5.7, em que se observa uma melhor resolução com adequado tempo de retenção (9 e 12 minutos) dos picos com o aumento na concentração de trietilamina, portanto, os resultados confirmam que 4 mM de trietilamina é a concentração apropriada para diminuir a

cauda sem danificar a coluna. Os tempos de retenção obtidos para a fase móvel contendo 2 mM de TEA foram 11,5 e 15,5 minutos e com 3 mM de TEA foram 10,8 e 14,5 minutos. O uso de um modificador orgânico (acetonitrila) na fase móvel resultou em perda de resolução da separação enantiomérica.

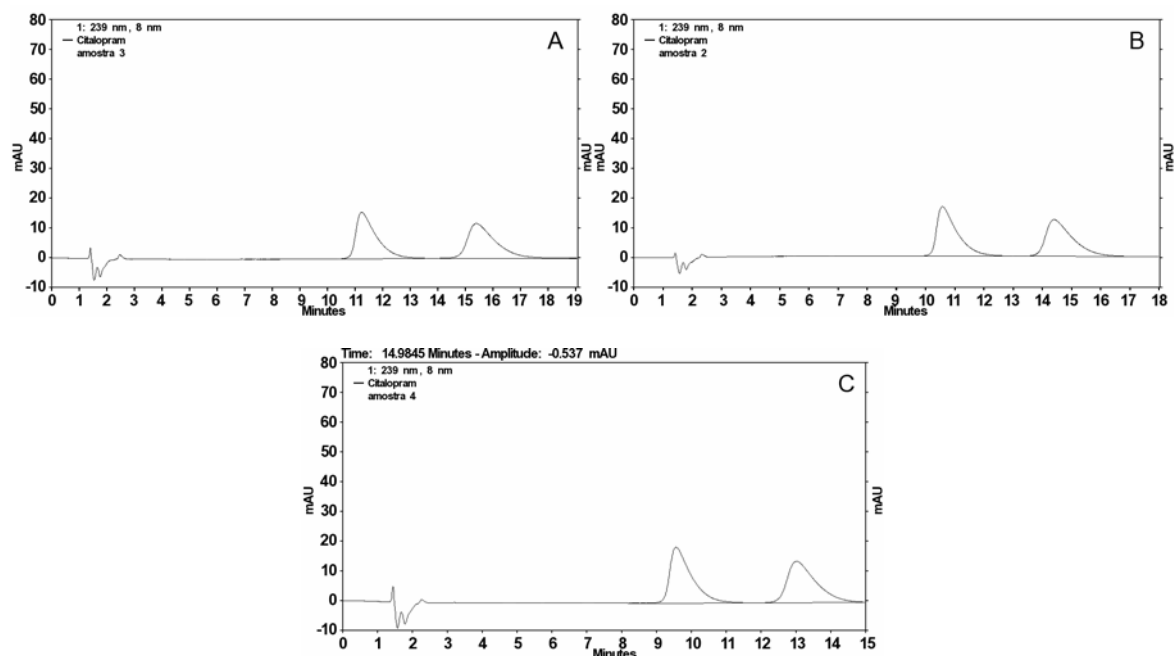


Figura 5.7 - Cromatograma da separação enantiomérica do citalopram utilizando fase móvel constituída por tampão acetato de amônio 100 mM: 2 mM de TEA (A) ou 3 mM de TEA (B) ou 4 mM de TEA (C), pH 5,47, com fluxo de 0,8 ml/min.

O sistema constituído por coluna do tipo Chiral - AGP<sup>TM</sup>® e fase móvel contendo tampão acetato de amônio 100 mM: trietilamina 4 mM, pH 5,47, fluxo de 0,8 ml/min e detecção em 239 nm foi considerado apropriado para a análise enantiomérica do citalopram, na forma farmacêutica comprimido. Este sistema deu origem à separação com os seguintes parâmetros cromatográficos: fator de capacidade  $k_1 = 5,0$ ,  $k_2 = 7,0$  e seletividade de 1,4. Na Figura 5.8 observa-se a separação completa dos enantiômeros do citalopram SQR e em comprimido. Os cromatogramas apresentam os picos correspondentes aos enantiômeros com pouca cauda e a linha de base no sistema apresenta estabilidade. Com a finalidade de se verificar a interferência dos excipientes foi injetada amostra placebo. O cromatograma da Figura 5.9 comprova que não houve interferência dos excipientes na análise dos enantiômeros do citalopram.

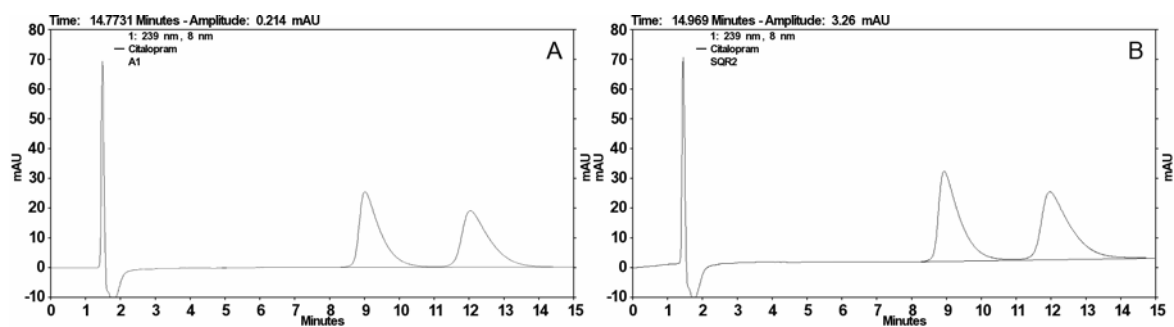


Figura 5.8 - Cromatograma da separação enantiomérica da SQR do citalopram (A) e do citalopram em comprimido (B), utilizando fase móvel constituída por tampão acetato de amônio 100 mM: TEA 4 mM, pH 5,47, com fluxo de 0,8 ml/min.

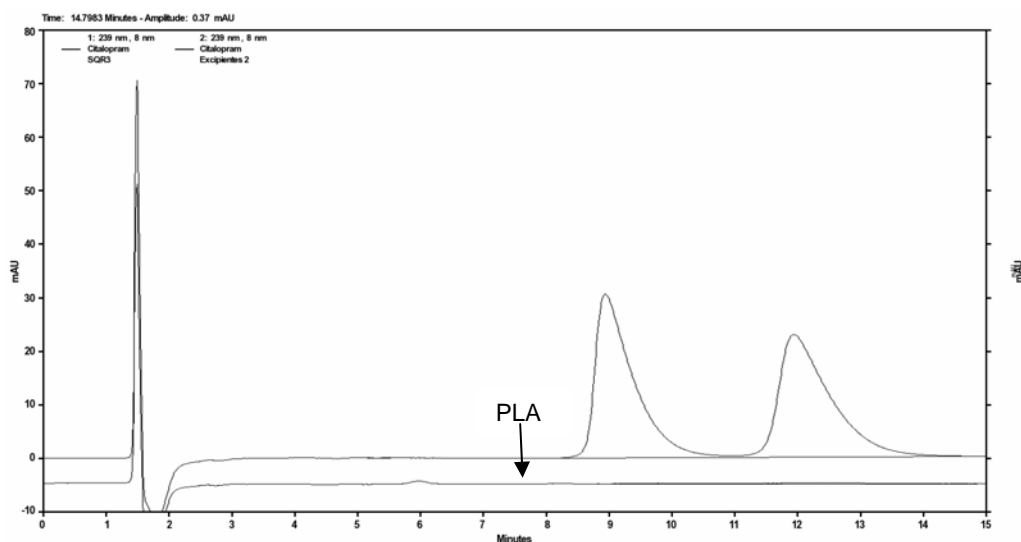


Figura 5.9 - Cromatograma da separação enantiomérica da SQR do citalopram e da solução placebo (PLA), utilizando fase móvel constituída por tampão acetato de amônio 100 mM: TEA 4 mM, pH 5,47, com fluxo de 0,8 ml/min.

Devido à falta do enantiômero puro do escitalopram (isômero S), procedeu-se a preparação de uma solução de escitalopram a partir de seus comprimidos. A ordem de eluição foi determinada pela injeção desta solução de escitalopram, que através da análise do cromatograma da Figura 5.10 conclui-se que o isômero S é eluído em 12 minutos e o isômero R em 9 minutos, portanto, o enantiômero S apresenta ligações mais fortes com esta fase estacionária quiral.

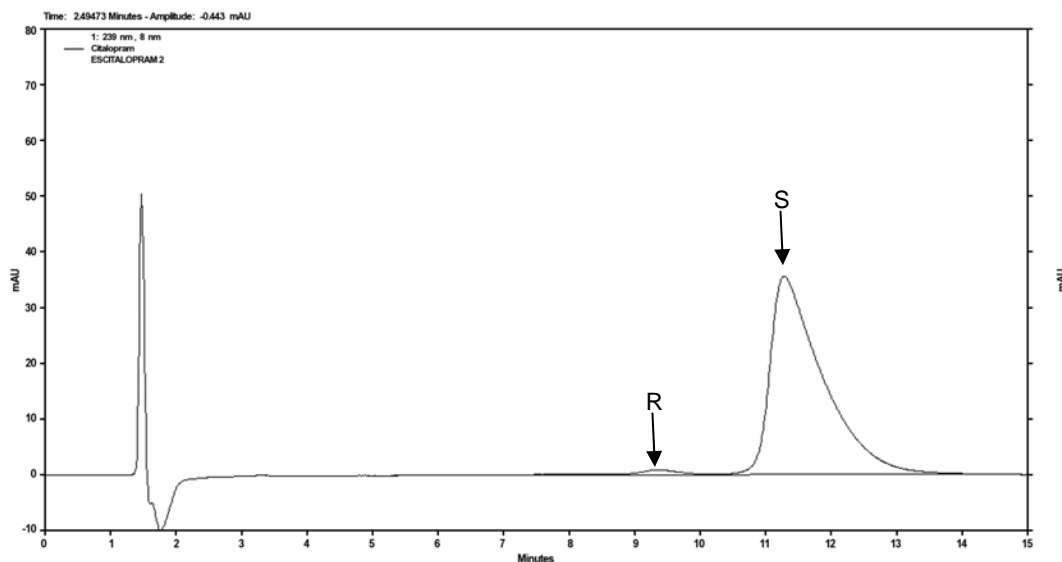


Figura 5.10 - Cromatograma da separação enantiomérica do escitalopram (isômero S) em comprimido, utilizando fase móvel constituída por tampão acetato de amônio 100 mM: TEA 4 mM, pH 5,47, com fluxo de 0,8 ml/min.

O aumento na temperatura da coluna cromatográfica geralmente reduz a retenção e a enantioseletividade, mas, em alguns casos, pode levar a inversões na ordem de reação e a vida útil da coluna é reduzida (BONATO *et al.*, 2005; THOMPSON, 2005). Temperatura de 22 °C não provou alterações na seletividade dos picos formados. Determinou-se como temperatura para este método 24 °C (temperatura ambiente).

Através da utilização da fase estacionária quiral Chiral - AGP™<sup>®</sup> é possível a análise qualitativa da SQR do citalopram, do citalopram e do escitalopram em comprimidos. Os valores de fator de capacidade e de seletividade encontrados são superiores aos encontrados nos outros métodos descritos na literatura e o curto tempo de análise (15 minutos) para a separação enantiomérica do citalopram em sua forma farmacêutica tornam este método vantajoso para o controle de qualidade de rotina do citalopram. Na presença das SQR dos isômeros do citalopram é possível a validação deste método para a quantificação do fármaco e do escitalopram em sua forma farmacêutica.



## 6. CAPITULO IV – DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO DE DISSOLUÇÃO PARA COMPRIMIDOS

### 6.1. Introdução

#### 6.1.1. Ensaio de dissolução

A dissolução de medicamentos pode ser definida como o fenômeno em que um fármaco no estado sólido se libera de sua forma farmacêutica de administração e entra em solução. Uma vez solubilizado, o fármaco está pronto para ser absorvido pelo organismo. Para medicamentos de administração oral, os parâmetros fundamentais que controlam a taxa e a extensão da absorção são a sua solubilidade aquosa e sua permeabilidade gastrintestinal (AMIDON *et al.*, 1995; KASIM *et al.*, 2003). No Brasil, os ensaios de dissolução passaram a ser exigidos para o registro de medicamentos a partir de 1999, com a introdução dos medicamentos genéricos (MARCOLONGO, 2003).

O teste de dissolução é uma importante ferramenta nas etapas de desenvolvimento farmacotécnico, que permite a avaliação de novas formulações, verificar a estabilidade e possibilita possível correlação *in vivo* – *in vitro* e no controle de qualidade de medicamentos, aonde os resultados obtidos com esse teste auxiliam na detecção de desvios de fabricação, asseguram a uniformidade durante a produção de um lote e a reprodutibilidade lote a lote, minimizando o risco da falta de bioequivalência entre os lotes (FDA, 1997; SHAH, 2001; MARQUES; BROWN, 2002).

Desse modo, os estudos de dissolução *in vitro* constituem um dos elementos essenciais para avaliar e garantir as propriedades biofarmacotécnicas das formulações.

Durante as décadas de 70 e 80, o teste de dissolução consagrou-se como ferramenta indispensável à rotina do controle de qualidade de medicamentos,



estando incluído praticamente em todas as farmacopéias, como método geral e na forma de monografia de medicamentos (MARCOLONGO, 2003). Na Farmacopéia Americana (USP 29, 2006) está presente a monografia para a matéria-prima do citalopram, entretanto, não há dados na literatura para o teste de dissolução do citalopram na forma farmacêutica comprimido. Portanto, existe a necessidade do desenvolvimento de ensaio de dissolução para o controle de qualidade do citalopram em comprimidos.

Idealmente, as condições nas quais o ensaio de dissolução deveria ser conduzido, seriam aquelas que mimetizassem as fisiológicas, entretanto, no desenvolvimento do teste de dissolução observou-se que não há necessidade rigorosa de identidade ao ambiente gastrointestinal, as condições físico-químicas do fármaco podem predominar na escolha das condições (FDA, 1997; PHARMACOPEIAL FORUM, 2004).

O conhecimento relacionado à solubilidade, permeabilidade, dissolução e farmacocinética do fármaco devem ser considerados para a definição de especificações de dissolução (FDA, 1997).

Segundo o sistema de classificação biofarmacêutica (SCB) que tem como base a dose, a solubilidade e a permeabilidade, os fármacos podem ser classificados como pertencentes às seguintes classes (AMIDON *et al.*, 1995; BRASIL, 2003c; LINDENBERG *et al.*, 2004):

- Classe I: alta solubilidade (AS) e alta permeabilidade (AP);
- Classe II: baixa solubilidade (BS) e alta permeabilidade (AP);
- Classe III: alta solubilidade (AS) e baixa permeabilidade (BP);
- Classe IV: baixa solubilidade (BS) e baixa permeabilidade (BP).

A classificação biofarmacêutica do fármaco é importante na escolha do meio de dissolução. Na falta de evidências de instabilidade no trato gastrointestinal, considera-se um fármaco de alta permeabilidade quando a extensão da absorção em humanos é igual ou superior a 90% da dose administrada, baseada em balanço de massa, comparação com uma dose intravenosa e biodisponibilidade absoluta. A solubilidade de um fármaco é determinada pela dissolução da dose unitária mais elevada em 250 ml de soluções tampão de pH entre 1,0 e 7,5 a 37 °C. Um fármaco

é considerado solúvel quando o resultado, em volume, da relação dose / solubilidade é menor que 250 ml (FDA, 1997; FDA, 2000; BRASIL, 2003c; LINDENBERG *et al.*, 2004; MENDOZA *et al.*, 2005).

O citalopram possui uma biodisponibilidade de aproximadamente 80% e é prontamente absorvido no trato gastrointestinal em uma hora após a sua administração (HIEMKE; HÄRTTER, 2000; MENDOZA *et al.*, 2005). Segundo KASIM e colaboradores (2003) um fármaco é considerado de alta solubilidade quando a relação dose / solubilidade é menor ou igual a um, para o bromidrato de citalopram, na dose de 40 mg, foi encontrado 0,016 para esta relação, portanto, ele é um fármaco de alta solubilidade. Fármaco de alta permeabilidade apresenta valor de log P (coeficiente de partição octanol / água) maior ou igual a 1,72, segundo MOFFAT e colaboradores (2004), o log P para o citalopram é 3,74. Com base nos dados farmacocinéticos, de log P e de solubilidade, sugere-se para o citalopram a classificação biofarmacêutica de Classe I devido sua alta solubilidade e os dados encontrados na literatura sugerem que ele seja um fármaco de alta permeabilidade (Classe I). Para fármacos de Classe I ou III, uma limitada correlação *in vivo* – *in vitro* pode ser alcançada, dependendo da relação entre dissolução e esvaziamento gástrico / trânsito intestinal (AMIDON *et al.*, 1995; FDA, 1997; KASIM *et al.*, 2003;).

No desenvolvimento de um método de dissolução, muitas são as variáveis a serem analisadas que influenciam a dissolução e a reprodutibilidade dos resultados dos testes (MARQUES; BROWN, 2002; MARCOLONGO, 2003; STORPIRTIS *et al.*, 2004). Dentre essas variáveis, citam-se as:

- relacionadas com o fármaco: solubilidade, tamanho de partícula, polimorfismo, higroscopicidade;

- relacionadas com a forma farmacêutica: excipientes, tecnologia de fabricação;

- relacionadas com o equipamento: aparato utilizado, velocidade de agitação, posição e método de amostragem, vibração do sistema, posição da haste;

- relacionadas com o meio de dissolução: volume, presença de gases, pH, temperatura, força iônica, evaporação do meio, viscosidade;

- relacionadas como método analítico: método de filtração e método analítico.

As seleções das condições do teste de dissolução devem ser no sentido de obter o máximo poder discriminatório e resultar na capacidade de refletir mudanças feitas na formulação, no processo de fabricação, ou nas características físico-químicas do fármaco (MARQUES; BROWN, 2002, PHARMA COPEIAL FORUM, 2004). A avaliação do perfil de dissolução do fármaco (percentagem de fármaco dissolvido *versus* tempo) em diferentes meios é recomendada como suporte no desenvolvimento dos testes de dissolução.

Nenhum dos objetivos dos ensaios de dissolução será alcançado se o teste não for confiável e apresentar, no mínimo, especificidade, robustez, linearidade, precisão e exatidão dos resultados (MARQUES; BROWN, 2002; MARCOLONGO, 2003). Antes de prosseguir com a validação do método de dissolução deve-se avaliar a calibração do aparato a ser utilizado, as condições *sink*, a influência dos filtros e a estabilidade das soluções amostra.

As especificações de dissolução *in vitro* são estabelecidas para garantir consistência de qualidade lote a lote e para indicar problemas potenciais de biodisponibilidade. A especificação de um único ponto para forma farmacêutica de liberação imediata, contendo fármaco altamente solúvel e que se dissolve rapidamente, sendo adequada para a rotina de testes e controle de qualidade para uniformidade lote a lote (FDA, 1997; BRASIL, 2003c).

### **6.1.2. Comparação de perfis de dissolução**

Considerando-se que os medicamentos sólidos de uso oral, de liberação imediata ou modificada, são aqueles que podem apresentar maior problema em relação à biodisponibilidade, torna-se essencial avaliar a dissolução do fármaco a partir da forma farmacêutica, realizando teste *in vitro* que permita visualizar como a dissolução ocorre em função do tempo. Este teste, conhecido como perfil de dissolução, tem sido utilizado como uma ferramenta no desenvolvimento de formulações, uma vez que estabelece a semelhança entre uma nova formulação genérica e seu produto de referência, como também evidencia diferenças na dissolução causadas por fatores ligados ao fármaco, excipientes e à técnica de fabricação empregada (MARCOLONGO, 2003; STORPIRTIS *et al.*, 2004).

A comparação de perfis de dissolução entre o produto teste e o referência realizada antes da condução do estudo de bioequivalência atua como um indicativo do comportamento semelhante dos produtos, mas não garante que os produtos sejam bioequivalentes (ANVISA, 2004).

Para a realização da comparação de perfis de dissolução há dois métodos propostos na literatura: modelo independente e o dependente. O primeiro pode ainda ser dividido em procedimentos baseados na ANOVA, testes de razão (área sob a curva) ou testes combinados (fatores  $f_1$  e  $f_2$ ). Alguns métodos modelo dependentes aplicáveis à comparação de perfis de dissolução são: ordem zero, primeira ordem, Hixson-Crowell, Higushi, quadrático, Weibull. FDA (1997), ANVISA (2004) e EMEA (1999) adotaram o fator  $f_1$  e  $f_2$  como indicativo da semelhança entre os perfis de dissolução por ser de fácil aplicação e interpretação (ANDERSON *et al.*, 1998; MARCOLONGO, 2003).

Esses fatores,  $f_1$  e  $f_2$ , propostos por MOORE e FLANNER (1996) são duas equações que avaliam a diferença entre a percentagem de fármaco dissolvido por unidade de tempo entre um produto teste e outro referência. Estes fatores apresentam como desvantagem apenas demonstrar a diferença entre duas curvas, são insensíveis ao formato da curva. Este método está sujeito a muitas críticas, pois os critérios de aceitação são muito amplos, o que faz com que o método seja muito liberal em concluir semelhança de perfis e pouco discriminativo (O'HARA *et al.*, 1998; ANDERSON *et al.*, 1998; MARCOLONGO, 2003).

O fator  $f_1$  calcula a percentagem de diferença entre os dois perfis avaliados a cada tempo de coleta e corresponde a uma medida do erro relativo entre os perfis:

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

onde:

$n$  = número de tempos de coleta;

$R_t$  = valor da percentagem dissolvida no tempo  $t$ , obtido com o medicamento de referência ou com a formulação original (antes da alteração);

$T_t$  = valor da percentagem dissolvida do produto teste ou da formulação alterada, no tempo  $t$ .

O fator  $f_2$  corresponde a uma medida de semelhança entre as porcentagens dissolvidas de ambos os perfis:

$$f_2 = 50 \log \{ [1 + (1/n) \sum_{t=1}^n (R_t - T_t)^2]^{-0,5} \} \times 100$$

O critério para que os dois perfis sejam considerados semelhantes são:  $f_1 = 0$  a 15 e  $f_2 = 50$  a 100.

Para aplicar esse modelo deve-se considerar:

- avaliar doze unidades;
- empregar no mínimo cinco pontos de coleta;
- incluir apenas um ponto acima de 85% de dissolução para ambos os produtos;
- para permitir o uso de médias, os coeficientes de variação para os primeiros pontos (15 minutos, por exemplo) não devem exceder 20%. Para os demais pontos considera-se o máximo de 10%;
- nos casos em que a dissolução for muito rápida, apresentando valor igual ou superior a 85% de fármaco dissolvido em 15 minutos, os fatores  $f_1$  e  $f_2$  perdem o seu poder discriminativo e, portanto, não é necessário calculá-los (BRASIL, 2004).

Outra forma útil de fazer comparações é o termo eficiência de dissolução (ED), termo empregado por Khan e Rhodes, em 1972. A ED pode ser definida como a área sob a curva de dissolução até um determinado tempo  $t$ , expressa como a porcentagem da área do retângulo que corresponderia a 100% de dissolução no mesmo tempo (KHAN, 1975):

$$ED\% = \frac{\text{Área sob a curva (ASC)}}{\text{Área retângulo } y_{100}} \times 100$$

A ED apresenta como vantagens a plotagem dos dados em um único gráfico, o que permite que se faça uma comparação rápida entre um grande número de formulações e, os dados podem estar, teoricamente, relacionados com dados *in vivo* (KHAN, 1975; MARCOLONGO, 2003).

Há na literatura três trabalhos de bioequivalência do citalopram *in vivo* (GUTIERREZ; ABRAMOWITZ, 2000; MENDOZA *et al.*, 2005; MENDES *et al.*, 2005). Entretanto, não existem trabalhos descritos para a comparação dos perfis de dissolução *in vitro*, a fim de verificar se os perfis de liberação do citalopram dos comprimidos de medicamentos genérico e similar, comercializados no mercado nacional, são semelhantes ao do medicamento referência.

## **6.2. Materiais e Métodos**

### **6.2.1. Produto farmacêutico**

Comprimidos contendo 20 mg de citalopram, com o nome comercial de Cipramil<sup>®</sup>, fabricados pela Lundbeck, lote 2083025, fabricação 10 / 2005 e validade 10 / 2008.

Excipientes: amido, lactose, celulose microcristalina, copolividona, glicerol a 85%, croscarmellose sódica, estearato de magnésio, hipromelose, macrogol 400 e dióxido de titânio.

### **6.2.2. Solventes e reagentes**

- Acetonitrila grau cromatográfico, Merck<sup>®</sup>, Darmstadt, Alemanha,
- Ácido clorídrico fumegante grau analítico, Quimex<sup>®</sup>, Brasil,
- Ácido orto-fosfórico 85% grau analítico, Merck<sup>®</sup>, Darmstadt, Alemanha,
- Água purificada, Milli-Q plus, Millipore<sup>®</sup>, Milford, Estados Unidos,
- Trietilamina grau analítico, Merck<sup>®</sup>, Darmstadt, Alemanha,
- Fosfato de potássio monobásico grau analítico, Synth<sup>®</sup>, Brasil,
- Hidróxido de sódio grau analítico, Quimex<sup>®</sup>, Brasil,
- Acetato de sódio grau analítico, Quimex<sup>®</sup>, Brasil,
- Ácido acético glacial grau analítico, Nuclear<sup>®</sup>, Brasil.

### **6.2.3. Equipamentos e acessórios**

- Aparelho para teste de dissolução multi-banho (n=7), Sotax AT7, Suíça,
- Banho de ultra-som, modelo USC 5000, Brasil,

- Centrífuga, excelsa 2, Fanem<sup>®</sup>, Brasil,
- Coluna cromatográfica de fase reversa octadecilsilano ACE<sup>®</sup> (250 x 4,6 mm d.i.) 5 µm, Aberdeen, Escócia,
- Cromatógrafo a líquido equipado com controlador SCL-10Avp, com bomba modelo LC-10ADvp, detector com comprimento de onda variável UV/VIS modelo SPD-M10Avp, controlador de temperatura para coluna modelo CTO-10ACvp, injetor automático com “loop” variável SIL-10ADvp e integrador automático computadorizado através do software CLASS VP<sup>®</sup>, Shimadzu, Japão,
- Espectrofotômetro UV-VIS, modelo UV-160A, Shimadzu, Japão,
- Membrana filtrante de nylon, porosidade 0,45 µm, 47 mm, MFS<sup>®</sup>, Millipore Corporation, MA, Estados Unidos,
- Membrana filtrante Millex<sup>®</sup> HN de nylon, porosidade 0,45 µm, 13 mm, Millipore Corporation, MA, Estados Unidos,
- Filtro quantitativo faixa preta, 10 mm, Framex<sup>®</sup>, Alemanha,
- Filtro qualitativo 80g, porosidade 3,0 µm, 600 x 600 mm, Framax 1600<sup>®</sup>, Brasil,
- Potenciômetro Digimed<sup>®</sup> modelo DM-20, Brasil.

### 6.3. Desenvolvimento do método para o teste de dissolução

Segundo a legislação brasileira e o FDA, os perfis de dissolução devem ser realizados em, pelo menos, três meios de dissolução diferentes, dentro da faixa de pH fisiológico (FDA, 1997, BRASIL, 2004). A seleção do meio é feita considerando-se, em parte, a solubilidade do fármaco de maneira a assegurar as condições *sink* (MARQUES; BROWN, 2002). A determinação das condições *sink* foi realizada em quatro meios de dissolução: ácido clorídrico 0,1 M; ácido clorídrico 0,01 M; tampão acetato (pH 4,1) e tampão fosfato (pH 6,8), utilizando quantidades de SQR de citalopram equivalente a três vezes a dose dos comprimidos em 900 ml dos meios de dissolução. Pesou-se o equivalente a 10,0 mg de SQR de citalopram e transferiu-se para um erlenmyer contendo 150 ml dos meios de dissolução. As amostras foram

agitadas lentamente. Os meios de dissolução foram preparados segundo a Farmacopéia Americana (USP 29, 2006).

A água não foi testada por não ser um meio de dissolução adequado devido a inúmeras razões: a qualidade da água pode variar dependendo da fonte, o pH e a tensão superficial podem variar em função do dia e durante o teste em função do fármaco e dos excipientes, não é um meio representativo do trato gastrointestinal, não é um meio fisiologicamente relevante (FDA, 1997; MARQUES; BROWN, 2002; PHARMACOPEIAL FORUM, 2004).

### **6.3.1. Avaliação da influência do filtro**

A filtração do meio de dissolução antes da quantificação mostra-se necessária para a remoção tanto de partículas não dissolvidas da substância quanto de excipientes insolúveis que podem mascarar resultado ou obstruir a coluna, no caso de serem usados métodos cromatográficos (MARCOLONGO, 2003; PHARMACOPEIAL FORUM, 2004).

Para essa avaliação foram preparadas soluções de SQR e amostra nos meios de dissolução propostos (ácido clorídrico 0,01 M e 0,1 M, tampão acetato (pH 4,1) e tampão fosfato (pH 6,8)), comparando-se a concentração de citalopram antes e após a filtração, utilizando a espectrofotometria no ultravioleta. Para que o filtro possa ser utilizado, os resultados obtidos após a filtração devem estar dentro da faixa de 98 – 102% da concentração original da solução SQR não filtrada e da solução amostra centrifugada (MARQUES; BROWN, 2002; MARCOLONGO, 2003; PHARMACOPEIAL FORUM, 2004).

#### **6.3.1.1. Avaliação da SQR**

Pesou-se o equivalente a 11,11 mg da SQR, transferiu-se para balão volumétrico de 100 ml, completou-se o volume com o meio de dissolução e homogeneizou-se. Transferiu-se alíquota de 10,0 ml para balão volumétrico de 100 ml e completou-se o volume com o meio de dissolução, obtendo-se solução com concentração final de 11,11 µg/ml.

A solução final (11,11 µg/ml) foi dividida em quatro partes iguais. A primeira parte não foi filtrada, sendo diretamente realizada a leitura de sua absorvância, a



qual foi utilizada como referência. As demais partes foram filtradas em papel filtro quantitativo, em membrana de nylon com poro de 0,45µm e em papel filtro de 3,0 µm, respectivamente, e suas absorvâncias foram determinadas.

#### **6.3.1.2. Avaliação das amostras**

Para a avaliação da interferência dos filtros na quantificação das amostras, foi utilizado um agitador magnético provido de aquecimento, no qual um béquer de 1.000 ml contendo o meio de dissolução foi mantido aquecido a  $37,0 \pm 0,5$  °C com o auxílio de um banho-maria. A agitação foi realizada com o uso de um bastão magnético. Todas as alíquotas foram retiradas no mesmo ponto de coleta.

Realizou-se o teste com amostra simulada de excipientes acrescidas de 20,0 mg de SQR, utilizando 900 ml de meio de dissolução a  $37,0 \pm 0,5$  °C. Após uma hora de agitação branda, alíquota de 10,0 ml foi retirada e centrifugada por 10 minutos a 3000 rpm. A seguir, realizou-se o mesmo procedimento utilizando papel filtro quantitativo, membrana de nylon com poro de 0,45µm e papel filtro de 3,0 µm, respectivamente, para filtração das amostras. Foram transferidos 5,0 ml de cada filtrado para balões volumétricos de 10 ml, completando-se o volume com o meio de dissolução, obtendo-se solução com concentração final de 11,11 µg/ml. Suas absorvâncias foram determinadas. Os resultados obtidos foram avaliados em função da concentração da solução centrifugada.

#### **6.3.2. Avaliação da estabilidade de soluções da SQR e amostras no meio de dissolução**

A estabilidade das soluções nos meios de dissolução propostos (ácido clorídrico 0,01 M e 0,1 M e tampão fosfato (pH 6,8)), foi determinada em temperatura ambiente e ao abrigo da luz por um período de 24 horas, a temperatura de  $37,0 \pm 0,5$  °C por 2 horas e a solução de SQR também foi avaliada após 24 horas em geladeira. A análise das soluções foi feita através do método por cromatografia líquida previamente validado.

##### **6.3.2.1. Preparo da SQR**

Pesou-se o equivalente a 11,11 mg de SQR e transferiu-se para balão volumétrico de 1000 ml. Adicionou-se aproximadamente 900 ml do meio de dissolução e colocou-se em banho de ultra-som por 10 minutos. O volume foi

completado obtendo-se solução com concentração final de 11,11 µg/ml. Filtrou-se uma alíquota com papel filtro quantitativo e após com membrana de nylon com poro de 0,45µm e avaliou-se por cromatografia líquida.

Estocou-se, ao abrigo da luz, em temperatura ambiente e na geladeira, durante 24 horas, em torno de 100 ml desta solução (solução A). Outra alíquota, aproximadamente 900 ml, foi transferida para cuba de dissolução e mantida a  $37,0 \pm 0,5$  °C por 2 horas (solução B). Decorrido os tempos determinados, alíquota da solução A foi retirada e filtrada com membrana de nylon com poro de 0,45µm e alíquotas de 10,0 ml da solução B foram retiradas e após filtração com papel filtro quantitativo e com membrana de nylon com poro de 0,45µm foram analisadas por cromatografia líquida.

#### **6.3.2.2. Preparo das amostras**

Foi transferida amostra simulada dos excipientes dos comprimidos acrescidos de 11,11 mg de SQR para balão volumétrico de 1000 ml. Adicionou-se aproximadamente 900 ml do meio de dissolução e colocou-se em banho de ultrassom por 10 minutos. O volume foi completado obtendo-se solução com concentração final de 11,11 µg/ml. Filtrou-se uma alíquota com papel filtro quantitativo e após com membrana de nylon com poro de 0,45µm e avaliou-se por cromatografia líquida.

Retirou-se alíquota de 100 ml que foi conservada ao abrigo da luz, em temperatura ambiente, por 24 horas (solução C). O restante, 900 ml, foi transferido para cuba do dissolutor e foi mantida por 2 horas em temperatura de  $37,0 \pm 0,5$  °C (solução D). Após decorridos seus respectivos tempos, foi retirada alíquota da solução C e filtrada com membrana de nylon com poro de 0,45µm e alíquotas de 10,0 ml da solução D que foram filtradas com papel filtro quantitativo e após com membrana de nylon com poro de 0,45µm e analisadas por cromatografia líquida.

#### **6.3.3. Condições do ensaio de dissolução**

O ensaio de dissolução dos comprimidos de citalopram foi desenvolvido e otimizado utilizando o equipamento de dissolução Sotax AT7, equipado com seis cubas. Foram testadas diversas condições de dissolução, de acordo com o método geral da USP 29 (2006), variando-se o meio utilizado (900 ml de ácido clorídrico 0,01

M e 0,1 M, tampão acetato (pH 4,1) e tampão fosfato (pH 6,8), desaerados) e o equipamento (aparato 1 – cestas ou aparato 2 – pás). A temperatura foi mantida a  $37,0 \pm 0,5$  °C. A influência da velocidade de agitação, meio de dissolução e desaeração foram avaliados. O meio, segundo MARCOLONGO (2003), pode ser devidamente desaerado por aquecimento a 45 °C seguido por filtração a vácuo, por sonicação a 37 °C, por ebulição seguida de esfriamento da água, ou por borbulhamento de gás hélio. A desaeração dos meios foi realizada através do aquecimento dos meios até aproximadamente 48 °C, posteriormente, transferiu-se o volume de 900 ml para cada cuba, as quais foram colocadas em banho de ultra-som por 20 minutos.

Nos testes iniciais do ensaio de dissolução foram realizadas coletas manuais de 15,0 ml da amostra nos tempos de 5, 10, 15, 20, 30, 45 e 60 minutos. Após a otimização do ensaio de dissolução, foram realizadas coletas manuais de 10,0 ml nos tempos de 5, 9, 12, 15, 20, 25 e 30 minutos, efetuando-se reposição do mesmo volume de meio de dissolução a  $37,0 \pm 0,5$  °C, a fim de manter um volume constante. A percentagem dissolvida do fármaco foi determinada, sem posterior diluição, por cromatografia líquida, após filtração das amostras através do papel filtro quantitativo e, em seguida, com a membrana de nylon com poro de 0,45 µm.

Para cada ensaio de dissolução foi preparada solução SQR no meio de dissolução avaliado. Pesou-se o equivalente a 11,11 mg de citalopram e transferiu-se para balão volumétrico de 50 ml. Completou-se o volume com o meio de dissolução e homogeneizou-se. Alíquota de 5,0 ml desta solução foi transferida para balão volumétrico de 50 ml, completou-se o volume com o meio de dissolução, obtendo-se uma solução SQR de concentração final de 22,22 µg/ml.

Nos cálculos da percentagem dissolvida levou-se em consideração o teor do fármaco, as concentrações nas alíquotas retiradas e devidas correções referentes às retiradas de fármaco e reposições de meio em cada tempo.

#### **6.4. Validação do método de dissolução**

O método de dissolução foi validado de acordo com o ICH (2005), MARQUES; BROWN (2002), MARCOLONGO (2003) e Pharmacopeial Fórum - <1092>The Dissolution Procedure: Development and Validation (2004).

#### **6.4.1. Especificidade**

Foram avaliadas amostras simuladas dos excipientes (ASE) dos comprimidos de citalopram, empregando-se as seguintes condições: 900 ml dos meios de dissolução (ácido clorídrico 0,01 e 0,1 M e tampão fosfato (pH 6,8)) desaerados a  $37,0 \pm 0,5$  °C, 150 rpm, aparato 2 (pás) e tempo de 60 minutos. Alíquotas de 20,0 ml foram retiradas e filtradas com papel filtro quantitativo (filtrado A).

Do filtrado A foi retirada alíquota de 5,0 ml e transferida para balão volumétrico de 10 ml. Completou-se o volume com o meio de dissolução correspondente, obtendo-se solução com concentração final de 11,11 µg/ml. Esta solução foi avaliada por espectrofotometria no ultravioleta. Alíquota em torno de 15,0 ml do filtrado A foi retirada e filtrada com membrana de nylon com poro de 0,45 µm (filtrado B). Do filtrado B, foi retirada alíquota de 5,0 ml e transferida para balão volumétrico de 10 ml. Completou-se o volume com o meio de dissolução correspondente, obtendo-se solução com concentração final de 11,11 µg/ml. Esta solução foi avaliada por espectrofotometria no ultravioleta e por cromatografia líquida.

Solução de SQR foi preparada pesando-se o equivalente a 11,11 mg de citalopram e transferindo-se para balão volumétrico de 100 ml. Completou-se o volume com o meio de dissolução correspondente. Desta solução, alíquota de 10,0 ml foi transferida para balão volumétrico de 100 ml, completou-se o volume com o meio de dissolução correspondente, obtendo-se solução com concentração final de 11,11 µg/ml. Esta solução foi avaliada por espectrofotometria no ultravioleta e cromatografia líquida.

#### **6.4.2. Linearidade**

Pesou-se o equivalente a 10,0 mg de SQR, transferiu-se para balão volumétrico de 100 ml e completou-se o volume com ácido clorídrico 0,1 M, obtendo-se uma solução com concentração final de 100,0 µg/ml. A partir desta foram preparadas soluções, as quais foram diluídas com ácido clorídrico 0,1 M, nas concentrações de 1,0; 5,0; 15,0; 20,0; 25,0; 30,0 e 40,0 µg/ml. Foram preparadas e analisadas três curvas, no mesmo dia, por cromatografia líquida. Cada ponto da curva foi injetado em triplicata.

Com a área absoluta média obtida nas três curvas, construiu-se um gráfico plotando-se área média *versus* concentração do fármaco ( $\mu\text{g/ml}$ ). Calculou-se a equação da reta através do estudo da regressão linear, pelo método dos mínimos quadrados e os resultados foram avaliados, estatisticamente, através da análise de variância (ANOVA).

#### **6.4.3. Exatidão**

A exatidão do método foi avaliada através do percentual de recuperação de uma quantidade conhecida da SQR adicionada à amostra simulada de excipientes.

Foram preparadas amostras simuladas de excipientes dos comprimidos de citalopram, às quais foram adicionadas 10, 100 e 150% da quantidade declarada de SQR.

Procedeu-se a dissolução por 30 minutos, empregando-se as seguintes condições: 900 ml de meio ácido clorídrico 0,1 M a  $37,0 \pm 0,5$  °C, 50 rpm, aparato 1 (cestas). Foram obtidas concentrações finais de 2,22  $\mu\text{g/ml}$ , 22,22  $\mu\text{g/ml}$  e 33,33  $\mu\text{g/ml}$ , respectivamente. Foram retiradas alíquotas de 10,0 ml de cada cuba e filtradas com papel filtro quantitativo e após com membrana de nylon com poro de 0,45  $\mu\text{m}$ . As amostras foram avaliadas por cromatografia líquida. Foram preparadas e analisadas duas cubas para cada percentual de SQR adicionado.

#### **6.4.4. Precisão**

A precisão do método foi avaliada através da repetibilidade e da precisão intermediária baseadas no desvio padrão relativo (DPR) dos resultados.

Foram preparadas amostras simuladas de excipientes dos comprimidos de citalopram, às quais foram adicionadas 100% da quantidade declarada de SQR.

Procedeu-se a dissolução por 30 minutos, empregando-se as seguintes condições: 900 ml de meio ácido clorídrico 0,1 M a  $37,0 \pm 0,5$  °C, 50 rpm, aparato 1 (cestas). Concentração final 22,22  $\mu\text{g/ml}$ . Foram retiradas alíquotas de 10,0 ml de cada cuba e filtradas com papel filtro quantitativo e após com membrana de nylon com poro de 0,45  $\mu\text{m}$ . As amostras foram avaliadas por cromatografia líquida. Foram preparadas três amostras e analisadas, em triplicata, em dois diferentes dias.

A precisão intermediária foi avaliada, também, através da quantificação do percentual de liberação do citalopram em um outro equipamento de cromatografia líquida (Agilent Technologies, model 1200, Agilent ChemStation software).

#### **6.4.5. Robustez**

A robustez do método foi avaliada verificando-se a influência da desaeração do meio de dissolução, visto que as bolhas existentes no meio poderiam: aderir nas malhas da cesta, alterando sua porosidade; aderir às formas farmacêuticas antes da desintegração, reduzindo a área superficial exposta ao solvente; impedir a interface sólido – líquido (SKOUG, *et al.*, 1997).

### **6.5. Comparação de perfis de dissolução**

#### **6.5.1. Amostras utilizadas no estudo**

Foi utilizada amostra de um lote de cada laboratório produtor, na concentração de 20 mg de citalopram. A amostragem foi composta dos seguintes laboratórios:

A – Cipramil<sup>®</sup>, Lundbeck<sup>®</sup> – medicamento referência.

B - Procimax<sup>®</sup>, Libbs<sup>®</sup> – medicamento similar.

Comprimido de 20 mg de citalopram. Lote 6A637, fabricação 05 / 2006 e validade 05 / 2008.

Excipientes: amido, lactose, celulose microcristalina, polividona, croscarmelose sódica, dióxido de silício coloidal, estearato de magnésio, polietilenoglicol, metacrilato de dimetilamino etila e corante amarelo crepúsculo.

C – Citalopram, Eurofarma<sup>®</sup> - medicamento genérico.

Comprimido revestido de 20 mg de citalopram. Lote 95178, fabricação 06 / 2006 e validade 06 / 2008.

Excipientes: amido de milho, lactose, celulose microcristalina, crospovidona, croscarmelose sódica, estearato de magnésio, óleo vegetal hidrogenado, hidroxipropilmetilcelulose, polietilenoglicol e dióxido de titânio.

### **6.5.2. Perfil de dissolução**

Realizou-se o teste de dissolução do citalopram utilizando doze comprimidos das amostras em estudo e do medicamento referência (Cipramil<sup>®</sup>), sob as condições previamente selecionadas. Amostras foram coletadas nos tempos 5, 9, 12, 15, 20, 25 e 30 minutos, gerando o perfil de dissolução de ambos os medicamentos.

A comparação dos perfis de dissolução foi realizada por duas metodologias do método modelo independente: (1) fator de diferença ( $f_1$ ) e fator de similaridade ( $f_2$ ); (2) cálculo da eficiência de dissolução (ED%) através da área trapezoidal, no qual foram determinadas as áreas sob a curva da percentagem de dissolução do citalopram *versus* tempo individual para as doze unidades de comprimido.

### **6.5.3. Uniformidade de doses unitárias das amostras**

Foram avaliadas, individualmente, dez unidades de cada produto, por cromatografia líquida. As amostras foram preparadas transferindo-se o conteúdo de uma unidade para balão volumétrico de 200 ml, e prosseguindo a diluição e a extração da mesma forma indicada no item 4.6.1.3 (Capítulo II).

A quantidade de fármaco presente em cada unidade foi avaliada segundo especificação da Farmacopéia Brasileira IV Edição (1988).

## **6.6. Resultados e discussão**

A solubilidade de fármacos veiculados em formas farmacêuticas de administração oral, como os comprimidos, depende da capacidade destes de se libertarem da formulação e solubilizar em condições fisiológicas, bem como sua permeabilidade através do trato gastrointestinal. A capacidade do fármaco de se libertar (disponibilizar) é avaliada através de estudos de dissolução (FDA, 1997). Neste intuito, foi desenvolvido e otimizado teste de dissolução para estudar a liberação do citalopram dos comprimidos e posteriormente comparar os perfis de dissolução com alguns produtos disponíveis no mercado nacional, visto que não foram encontrados métodos na literatura com este propósito.

O desenvolvimento de um teste de dissolução deve ser orientado no sentido de se obter o máximo poder discriminatório e resultar na capacidade de detecção de possíveis mudanças na qualidade de um produto que possa afetar suas

características biofarmacêuticas (MARQUES; BROWN, 2002; PHARMACOPEIAL FORUM, 2004).

Para o desenvolvimento do método de dissolução consideraram-se os dados de solubilidade e permeabilidade do fármaco, seguindo o sistema de classificação biofarmacêutica. Diferentes aparatos e meios foram testados.

Solubilidade e estabilidade do fármaco são propriedades importantes a serem consideradas quando se seleciona um meio de dissolução (PHARMACOPEIAL FORUM, 2004). O termo condições *sink* é definido como não menos que três vezes o volume de meio necessário para obter uma solução saturada do fármaco (MARQUES; BROWN, 2002; PHARMACOPEIAL FORUM, 2004). Atualmente, aceita-se também que um volume de 5 – 10 vezes o necessário para saturação seja suficiente para manter as condições *sink* (ABDOU, 1989). As condições *sink* são desejáveis a fim de evitar que a velocidade de dissolução seja influenciada, artificialmente, pela aproximação da saturação durante a realização do teste, porém, não são obrigatórias (FDA, 1997; MARQUES; BROWN, 2002).

As condições *sink* testadas demonstraram que o citalopram é solúvel em ácido clorídrico 0,01 M e 0,1 M, tampão acetato (pH 4,1) e tampão fosfato (pH 6,8). Desta forma, os ensaios preliminares de dissolução foram realizados utilizando estes quatro meios de dissolução, com a finalidade de selecionar as melhores condições para o teste de dissolução para os comprimidos de citalopram.

Para o desenvolvimento do teste de dissolução os primeiros parâmetros a serem avaliados são a filtração e a estabilidade do fármaco nos meios de dissolução testados (FORTUNATO, 2005).

A avaliação dos filtros foi realizada para verificar possíveis alterações significativas na concentração do fármaco ou liberação de material para a solução. Nessa avaliação foi utilizada a espectrofotometria no ultravioleta, pois a cromatografia líquida não possibilita o uso de amostras não filtradas, o que poderia danificar o equipamento e inutilizar a coluna cromatográfica.

Os resultados da avaliação dos filtros para filtração de SQR e amostras em estudo nos diferentes meios de dissolução encontram-se nas Tabelas 6.1 e 6.2.



Com base nestes valores, verificou-se que não houve alteração significativa (entre 98 – 102%) do percentual de SQR e de amostra recuperados nos diferentes meios comparando-se com a solução SQR não filtrada e solução amostra centrifugada, respectivamente, após a filtração com o filtro quantitativo e com membrana de nylon com poro de 0,45µm. O filtro qualitativo de 3,0 µm apresentou valores acima da faixa aceitável para a solução SQR e amostra em todos meios, exceto no tampão acetato (pH 4,1) em que o percentual de amostra recuperado encontra-se dentro dos limites aceitáveis. Portanto, o filtro quantitativo e a membrana de nylon com poro de 0,45µm foram os filtros selecionados para o desenvolvimento do método de dissolução.

Tabela 6.1 – Valores experimentais obtidos nas avaliações dos filtros utilizados para filtração de SQR e amostras por espectrofotometria no ultravioleta em ácido clorídrico 0,01 e 0,1 M.

Tipos de filtração	HCl 0,01 M		HCl 0,1 M	
	SQR (%)	Amostra (%)	SQR (%)	Amostra (%)
Sem filtração	100,0	-	100,0	-
Centrifugação	-	100,0	-	100,0
Filtro quantitativo	101,82	101,28	101,60	101,02
Membrana de nylon com poro de 0,45 µm	100,00	100,00	99,82	98,30
Filtro qualitativo de 3,0 µm	106,00	106,93	104,61	103,40

Tabela 6.2 – Valores experimentais obtidos nas avaliações dos filtros utilizados para filtração de SQR e amostras por espectrofotometria no ultravioleta em tampão acetato (pH 4,1) e tampão fosfato (pH 6,8).

Tipos de filtração	Tampão acetato (pH 4,1)		Tampão fosfato (pH 6,8)	
	SQR (%)	Amostra (%)	SQR (%)	Amostra (%)
Sem filtração	100	-	100	-
Centrifugação	-	100	-	100
Filtro quantitativo	102,63	100,0	101,94	101,08
Membrana de nylon com poro de 0,45 µm	99,65	99,83	100,36	100,90
Filtro qualitativo de 3,0 µm	103,68	99,34	107,07	107,53

As características de dissolução da formulação devem ser avaliadas na faixa de pH fisiológico entre 1,2 e 6,8 (PHARMACOPEIAL FORUM, 2004), portanto, na

avaliação da estabilidade do citalopram, optou-se em testar três meios de dissolução que permitissem verificar a estabilidade do fármaco nessa faixa de pH. Os valores experimentais obtidos na determinação da estabilidade das soluções SQR e amostra ficaram dentro da faixa estabelecida (98 – 102%) nos três meios avaliados (ácido clorídrico 0,01 M e 0,1 M, tampão fosfato (pH 6,8)), conforme a Tabela 6.3, demonstrando que o citalopram mantém suas propriedades nos parâmetros empregados. A estabilidade da solução conservada a temperatura ambiente e em geladeira por 24 horas, determinam que as amostras podem ser analisadas e armazenadas durante a noite, respectivamente. Foi medido o pH antes e depois dos testes, verificando-se que não ocorreram variações em seu valor, sendo mais um indicativo da estabilidade do fármaco nestes meios.

A Tabela 6.3 apresenta os resultados obtidos na determinação da estabilidade da SQR e amostra de comprimido em ácido clorídrico 0,01 e 0,1 M e em tampão fosfato (pH 6,8).

Tabela 6.3 - Valores experimentais obtidos na determinação da estabilidade da SQR e amostra de comprimido por cromatografia líquida.

Fatores	SQR (%)			Amostra (%)		
	HCl 0,01M	HCl 0,1M	Tampão fosfato	HCl 0,01M	HCl 0,1M	Tampão fosfato
Amostra recém preparada	-	-	-	100,41	100,89	99,99
2 horas a 37,0 ± 0,5 °C	101,45	100,78	101,17	101,64	101,40	99,23
24 horas a temperatura ambiente	100,85	101,87	99,29	100,42	100,33	100,94
24 horas em geladeira	99,89	100,76	100,93	-	-	-

Os métodos de análise utilizados na determinação do percentual dissolvido do fármaco em testes de dissolução são a espectrofotometria no ultravioleta e a cromatografia líquida. Destes métodos, através da espectrofotometria no ultravioleta os resultados são mais rápidos, simples e o consumo de solventes é menor em relação à cromatografia líquida (MARCOLONGO, 2003; PHARMACOPEIAL FORUM, 2004), contudo, é um método de baixa seletividade (WATSON, 1999; MARCOLONGO, 2003). Para a escolha do método analítico, procedeu-se a avaliação da especificidade dos métodos nos diferentes meios de dissolução (ácido

clorídrico 0,01 M e 0,1 M, tampão fosfato (pH 6,8)) anteriormente ao teste das condições de dissolução, com o intuito de verificar possíveis interferências na quantificação do citalopram em solução.

Nesta fase do desenvolvimento, foram utilizados os métodos por cromatografia líquida e espectrofotometria no ultravioleta descritos no Capítulo II.

Os espectros, obtidos após filtração com papel filtro quantitativo e membrana de nylon com poro de 0,45  $\mu\text{m}$  e os cromatogramas das amostras simuladas de excipientes de comprimidos em ácido clorídrico 0,01 M estão apresentados, respectivamente, nas Figuras 6.1 e 6.2.

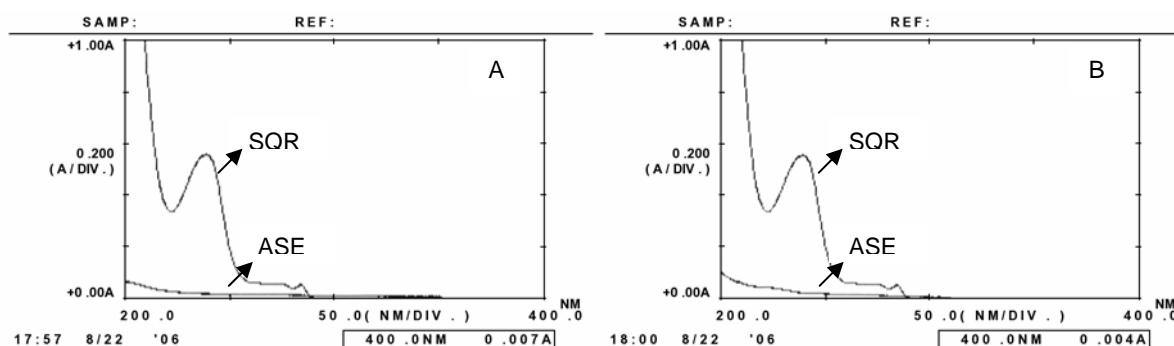


Figura 6.1 – Espectros de absorção na região do ultravioleta obtidos com a SQR e amostra simulada de excipientes (ASE) após filtração com papel filtro quantitativo (A) e membrana de 0,45  $\mu\text{m}$  (B) para o teste de dissolução em ácido clorídrico 0,01 M a  $37,0 \pm 0,5$   $^{\circ}\text{C}$  e rotação de 150 rpm, com aparato 2.

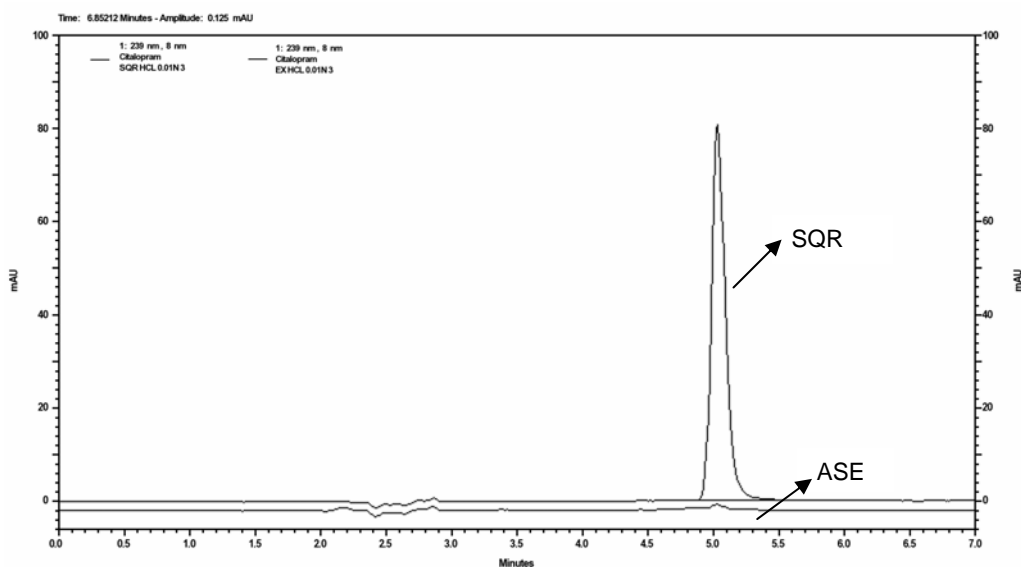


Figura 6.2 – Cromatogramas obtidos com a SQR e amostra simulada de excipientes (ASE) após dissolução em ácido clorídrico 0,01 M a  $37,0 \pm 0,5$   $^{\circ}\text{C}$  e rotação de 150 rpm, com aparato 2.

Os espectros, obtidos após filtração com papel filtro quantitativo e membrana de nylon com poro de 0,45  $\mu\text{m}$  e os cromatogramas das amostras simuladas de excipientes de comprimidos em ácido clorídrico 0,1 M estão apresentados, respectivamente, nas Figuras 6.3, e 6.4.

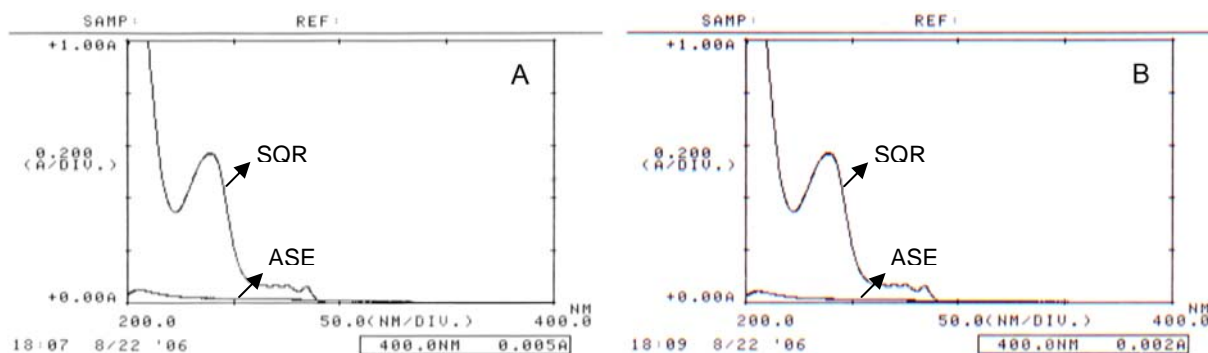


Figura 6.3 – Espectros de absorção na região do ultravioleta obtidos com a SQR e amostra simulada de excipientes (ASE) após filtração com papel filtro quantitativo (A) e membrana de 0,45  $\mu\text{m}$  (B) para o teste de dissolução em ácido clorídrico 0,1 M a  $37,0 \pm 0,5$   $^{\circ}\text{C}$  e rotação de 150 rpm, com aparato 2.

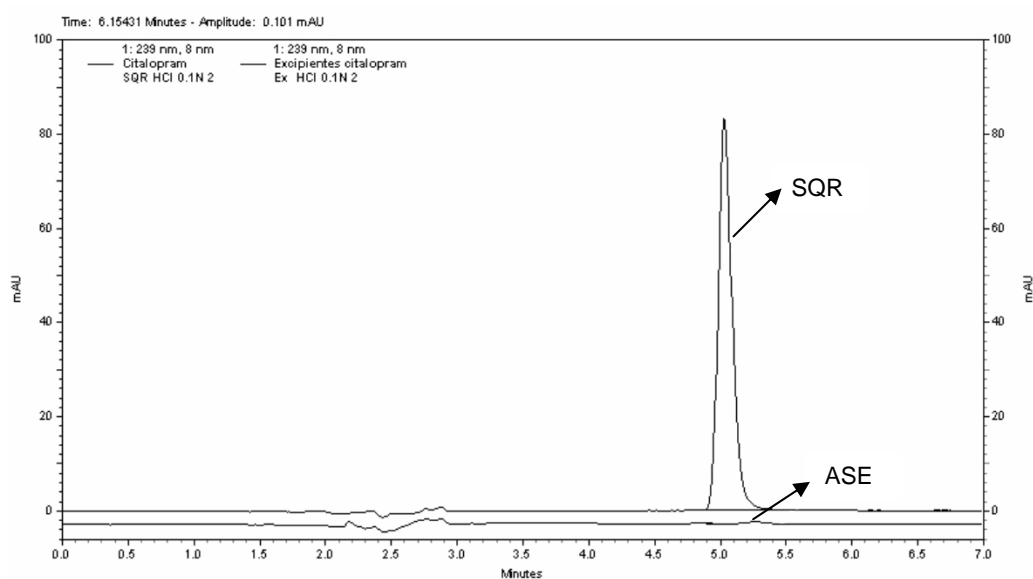


Figura 6.4 – Cromatogramas obtidos com a SQR e amostra simulada de excipientes (ASE) após dissolução em ácido clorídrico 0,1 M a  $37,0 \pm 0,5$   $^{\circ}\text{C}$  e rotação de 150 rpm, com aparato 2.

Os espectros, obtidos após filtração com papel filtro quantitativo e membrana de nylon com poro de 0,45  $\mu\text{m}$  e os cromatogramas das amostras simuladas de excipientes de comprimidos em tampão fosfato (pH 6,8) estão apresentados, respectivamente, nas Figuras 6.5 e 6.6.

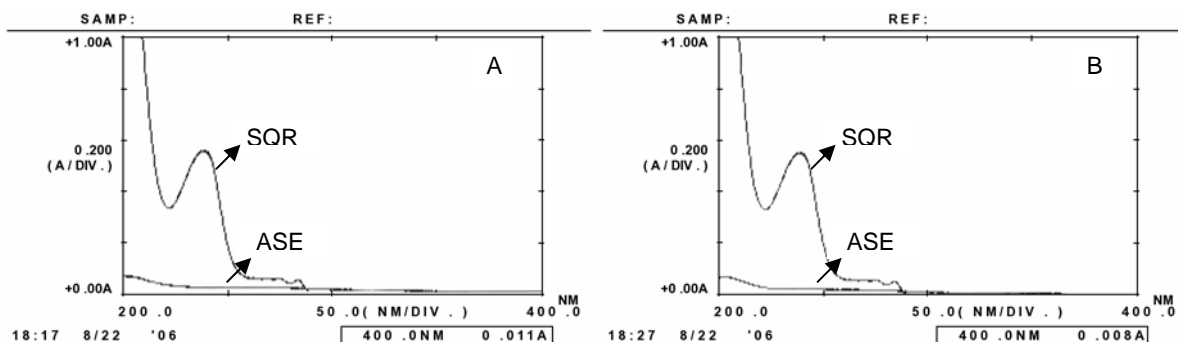


Figura 6.5 – Espectros de absorção na região do ultravioleta obtidos com a SQR e amostra simulada de excipientes (ASE) após filtração com papel filtro quantitativo (A) e membrana de 0,45 µm (B) para o teste de dissolução em tampão fosfato (pH 6,8) a  $37,0 \pm 0,5$  °C e rotação de 150 rpm, com aparato 2.

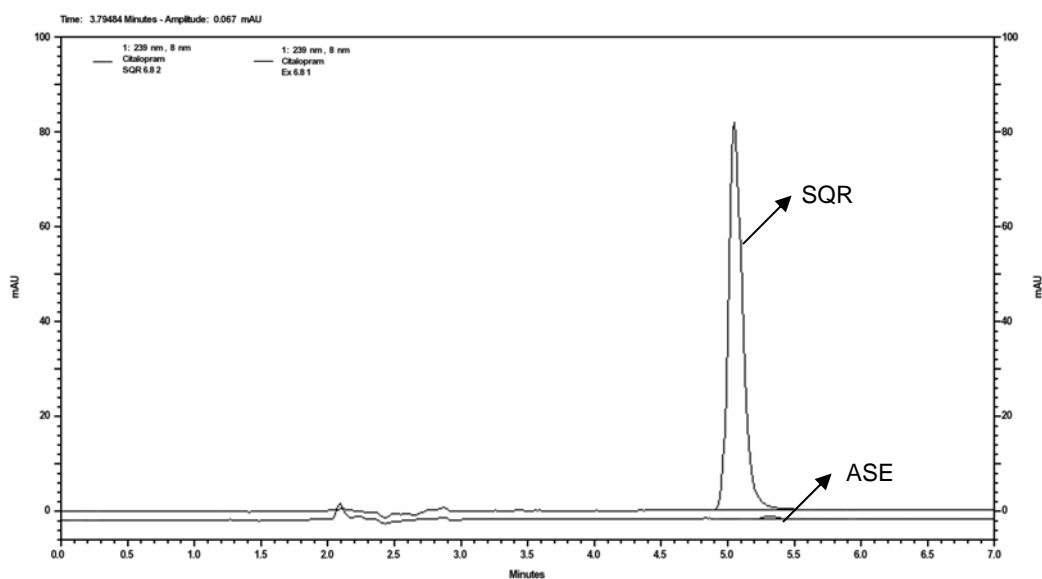


Figura 6.6 – Cromatogramas obtidos com a SQR e amostra simulada de excipientes (ASE) após dissolução em tampão fosfato (pH 6,8) a  $37,0 \pm 0,5$  °C e rotação de 150 rpm, com aparato 2.

Com base nos resultados obtidos para a especificidade, a análise por espectrofotometria no ultravioleta apresentou interferência dos excipientes, no comprimento de onda de 239 nm, nos diferentes meios de dissolução avaliados. As leituras de absorvância das ASE após as filtrações com filtro quantitativo e com membrana de nylon com poro de 0,45 µm (Figuras 6.1, 6.3 e 6.5) excedeu 2% (PHARMACOPEIAL FORUM, 2004), conforme a Tabela 6.4, da leitura de absorvância da solução SQR, não sendo, portanto, um método específico para a quantificação do percentual de liberação do citalopram nos meios testados.

Verificou-se que não houve interferência dos excipientes para o método cromatográfico, pois o cromatograma não apresenta nenhum outro pico no tempo de

retenção (5,0 minutos) do citalopram (Figuras 6.2, 6.4 e 6.6). Foi aplicada a ferramenta da pureza do pico para o citalopram e esta demonstrou que não há impureza no pico. Devido ao exposto, utilizou-se somente a cromatografia líquida como método de quantificação na avaliação das condições do ensaio e dos parâmetros de validação do teste de dissolução.

Tabela 6.4 – Leituras de absorvâncias obtidas na avaliação da especificidade do método por espectrofotometria no UV nos diferentes meios de dissolução.

Meio de dissolução	SQR	Filtro quantitativo	Membrana de nylon com poro de 0,45 µm
	Leitura de absorvância		
HCl 0,01 M	0,562	0,020	0,024
HCl 0,1 M	0,570	0,018	0,015
Tampão fosfato	0,564	0,029	0,029

Após a avaliação e definição das condições *sink*, da filtração, da estabilidade e do método de quantificação por cromatografia líquida, realizou-se o desenvolvimento das condições do teste de dissolução e validação do método de determinação da percentagem dissolvida de citalopram dos comprimidos. A seleção criteriosa das condições do ensaio deve ser orientada no sentido de obter o máximo poder discriminatório e resultar na capacidade de detecção de eventuais desvios dos padrões de qualidade inicialmente propostos (MARCOLONGO, 2003).

Nos estudos preliminares, o teste de dissolução foi realizado com seis comprimidos, utilizando-se 900 ml dos diferentes meios de dissolução (ácido clorídrico 0,01 M, tampão acetato (pH 4,1) e tampão fosfato (pH 6,8)) a  $37,0 \pm 0,5$  °C, velocidade de agitação de 50 rpm, aparato 2 (pás, freqüentemente agitação na faixa de 50 – 75 rpm). As amostras foram coletadas (alíquotas de 15,0 ml) e analisadas em diversos tempos (5, 10, 15, 20, 30, 45 e 60 minutos) a fim de gerar curvas do perfil de dissolução *versus* tempo para cada meio testado.

O perfil de dissolução obtido em ácido clorídrico 0,01 M é apresentado na Figura 6.7.

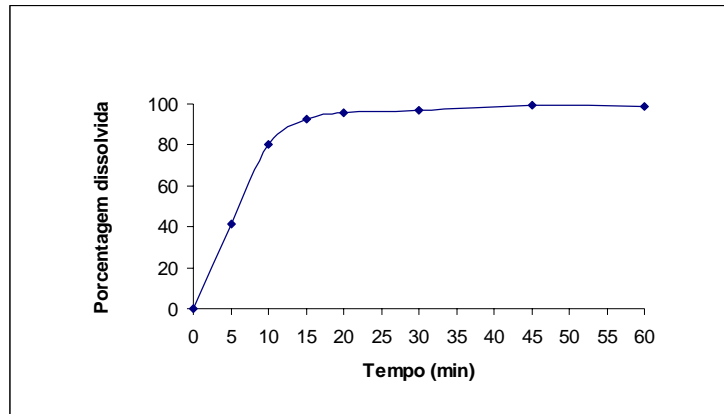


Figura 6.7 – Perfil de dissolução obtido para o citalopram em comprimidos utilizando aparato 2, 900 ml de meio ácido clorídrico 0,01 M a  $37,0 \pm 0,5$  °C e rotação de 50 rpm.

Em ácido clorídrico 0,01 M a velocidade de dissolução do citalopram foi rápida, mais de 90% do fármaco foi dissolvido em 15 minutos neste meio. A solubilização do citalopram, verificada durante a avaliação das condições *sink* e durante o desenvolvimento do método por cromatografia líquida (Capítulo II), é mais rápida e efetiva em pH mais ácido, portanto, na tentativa de retardar a velocidade de dissolução, não foi testado o ácido clorídrico 0,1 M, avaliou-se o tampão acetato (pH 4,1) a fim de se obter um perfil mais discriminativo para cada tempo de coleta.

Na Figura 6.8 tem-se o perfil de dissolução obtido para o citalopram com o uso de tampão acetato (pH 4,1), mantendo-se as mesmas condições de ensaio. De acordo com o esperado, o aumento do pH do meio de dissolução, com o uso do tampão acetato (pH 4,1), retardou um pouco a velocidade de dissolução, em torno de 88% do fármaco dissolvido em 15 minutos, mas não o suficiente para obter-se uma liberação gradual do fármaco através do tempo.

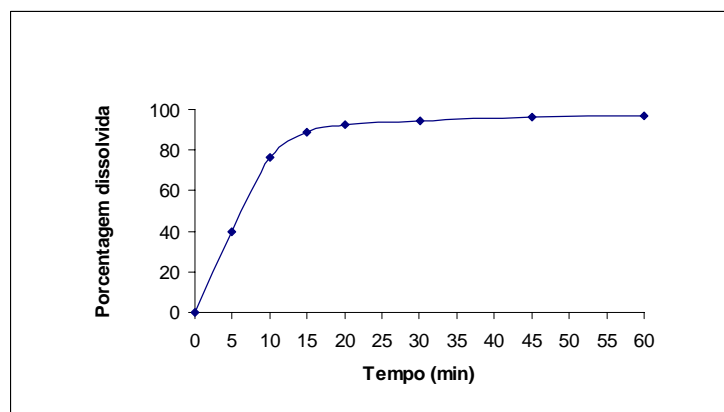


Figura 6.8 – Perfil de dissolução obtido para o citalopram em comprimidos utilizando aparato 2, 900 ml de meio tampão acetato (pH 4,1) a  $37,0 \pm 0,5$  °C e rotação de 50 rpm.

Com base nos resultados obtidos com o tampão acetato (pH 4,1), aumentou-se o pH do meio de dissolução com o uso do tampão fosfato (pH 6,8). O resultado obtido com este meio encontra-se na Figura 6.9, demonstrando que o perfil de dissolução é muito semelhante ao obtido com o tampão acetato (pH 4,1), ou seja, em torno de 15 minutos de dissolução são liberados aproximadamente 90% de fármaco dos comprimidos. Portanto, o aumento do pH do meio de dissolução, sob essas condições de velocidade de dissolução e aparato, não foi responsável pela obtenção de um perfil de dissolução discriminativo.

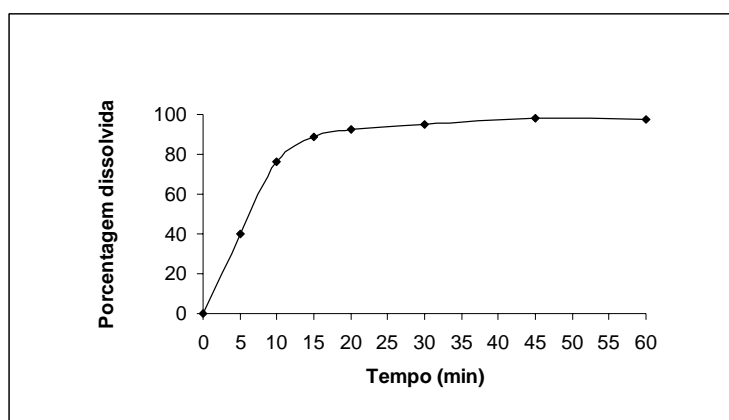


Figura 6.9 – Perfil de dissolução obtido para o citalopram em comprimidos utilizando aparato 2, 900 ml de meio tampão fosfato (pH 6,8) a  $37,0 \pm 0,5$  °C e rotação de 50 rpm.

Comparando-se os três perfis de dissolução (Figura 6.10) obtidos com velocidade de agitação de 50 rpm e uso do aparato 2, observa-se que não há uma diferença significativa entre os perfis apresentados.

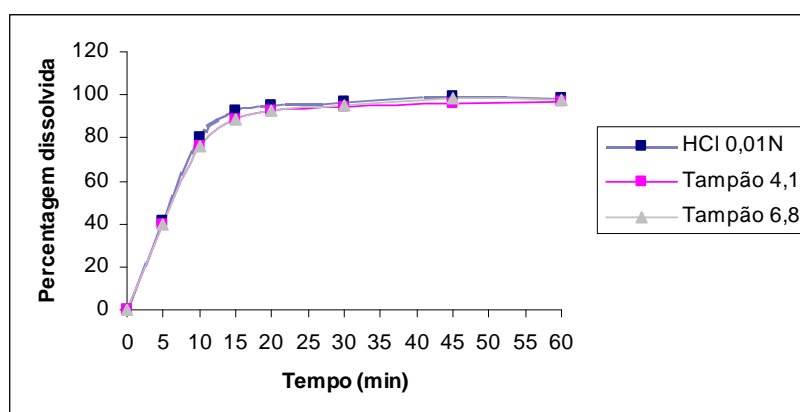


Figura 6.10 – Comparação dos perfis de dissolução obtido para o citalopram em comprimidos utilizando aparato 2, 900 ml de meio: ácido clorídrico 0,01 M, tampão acetato (pH 4,1) e tampão fosfato (pH 6,8) a  $37,0 \pm 0,5$  °C e rotação de 50 rpm.



Em geral, condições de agitação branda devem ser mantidas para obtenção do máximo poder discriminatório durante o teste de dissolução (FDA, 1997), portanto, devido à rápida velocidade de liberação do citalopram dos comprimidos nas condições descritas, foram formuladas novas alternativas, porém mantendo-se a velocidade de rotação de 50 rpm. Para os ensaios subseqüentes, optou-se em utilizar o tampão acetato (pH 4,1) em função de seu maior poder discriminatório frente aos outros meios nas condições avaliadas.

Segundo descrito por MARQUES e colaboradores (2002), para o uso de pás ou cestas o volume do meio de dissolução é de 500 ml até 1000ml, sendo 900 ml o volume mais utilizado. Foi avaliado, primeiramente, se ao diminuir o volume do meio de dissolução utilizado (900 ml) para 500 ml, o meio ficaria saturado mais rapidamente, conseqüentemente retardando o processo de dissolução do citalopram. Para isso, foi utilizado o tampão acetato (pH 4,1), mantendo-se as demais condições anteriormente descritas. Em 60 minutos do ensaio obteve-se dissolução incompleta do fármaco, em torno de 75% (Figura 6.11). O aumento da velocidade para 75 rpm aumentaria o percentual de dissolução do citalopram, porém, como a diferença de percentual dissolvido por tempo foi proporcional à diferença obtida com o volume de 900 ml deste meio, provavelmente não se teria alteração significativa no perfil de dissolução, além disso, as condições *sink* poderiam não ser mantidas.

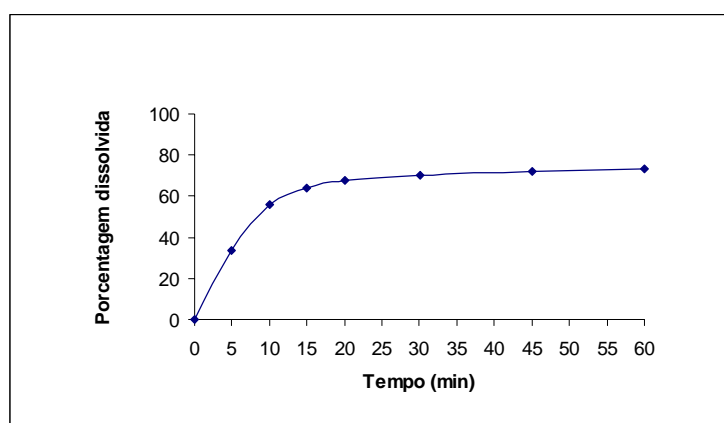


Figura 6.11 – Perfil de dissolução obtido para o citalopram em comprimidos utilizando aparato 2, 500 ml de tampão acetato (pH 4,1) a  $37,0 \pm 0,5$  °C e rotação de 50 rpm.

A diminuição dos primeiros tempos de coleta para 3, 5, 10, 15, 20, 30 e 40 minutos foi realizada como uma segunda alternativa para obtenção de um perfil mais

discriminativo nos primeiros pontos de coleta, porém, através da Figura 6.12 observou-se que não houve modificação significativa no perfil de dissolução em comparação com o perfil obtido na Figura 6.8.

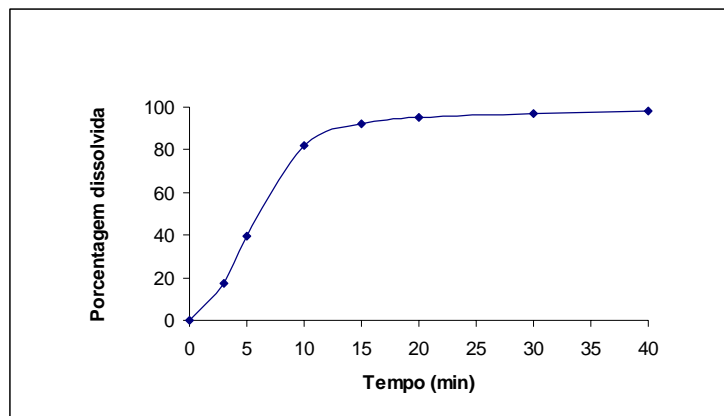


Figura 6.12 – Perfil de dissolução obtido para o citalopram em comprimidos utilizando aparato 2, 900 ml de meio tampão acetato (pH 4,1) a  $37,0 \pm 0,5$  °C, rotação de 50 rpm e diferentes tempos de coleta.

Segundo o FDA (1997), nos métodos de dissolução recomendados para fármacos, para o teste de dissolução dos comprimidos de citalopram é indicado o uso do aparato 1 (cestas; freqüentemente agitação de 50 – 100 rpm) com velocidade de agitação de 100 rpm, 800 ml de tampão pH 1,5. O uso de 900 ml de tampão acetato (pH 4,1), aparato 1 e velocidade de agitação de 50 rpm, resultou em um perfil mais discriminativo nos primeiros tempos de coleta em comparação ao perfil obtido utilizando-se o aparato 2, conforme a Figura 6.13. Nos ensaios de dissolução com o aparato 1 foram retiradas alíquotas de 10 ml, nos tempos de 5, 10, 15, 20, 30, 45 e 60 minutos.

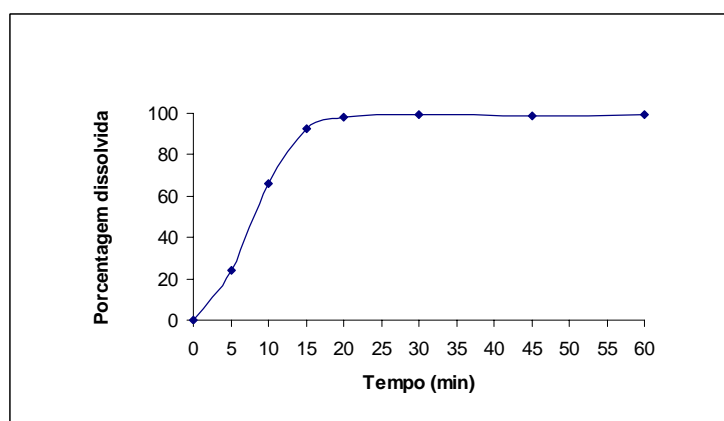


Figura 6.13 – Perfil de dissolução obtido para o citalopram em comprimidos utilizando aparato 1, 900 ml de meio tampão acetato (pH 4,1) a  $37,0 \pm 0,5$  °C, rotação de 50 rpm.

No intuito de obter uma liberação gradual do citalopram ao longo do tempo e também verificar a influência do aparato 1 na dissolução dos comprimidos de citalopram, este foi testado utilizando ácido clorídrico 0,01 M e tampão fosfato (pH 6,8) (Figura 6.14).

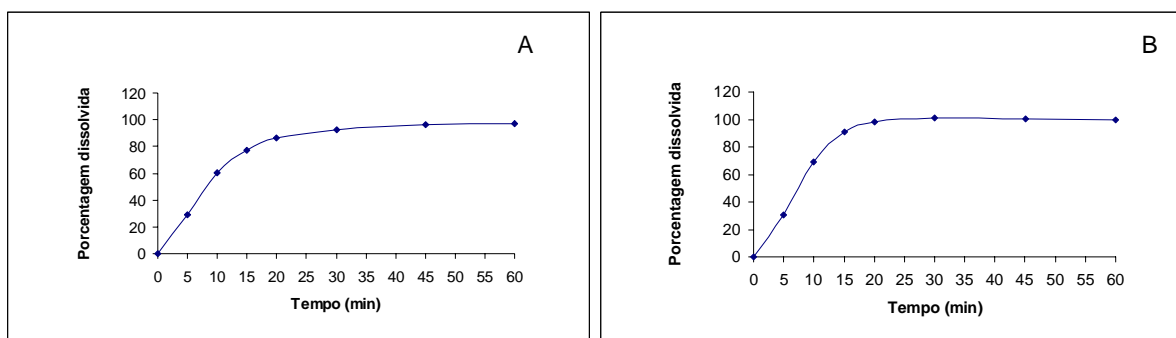


Figura 6.14 – Perfil de dissolução obtido para o citalopram em comprimidos utilizando aparato 1, 900 ml de meio ácido clorídrico 0,01 M (A) e 900 ml de tampão fosfato (pH 6,8) (B) a  $37,0 \pm 0,5$  °C, rotação de 50 rpm.

A mudança no aparato de dissolução, mantendo-se as demais condições, alterou o perfil de dissolução do citalopram nos diferentes meios testados. Com a diminuição do pH do meio através do uso de ácido clorídrico 0,01 M, a velocidade de liberação do citalopram dos comprimidos foi mais lenta, propiciando a visualização de um perfil de dissolução mais discriminativo. Diante destes resultados, foi testado o meio ácido clorídrico 0,1 M, cujo perfil de dissolução está representado na Figura 6.15.

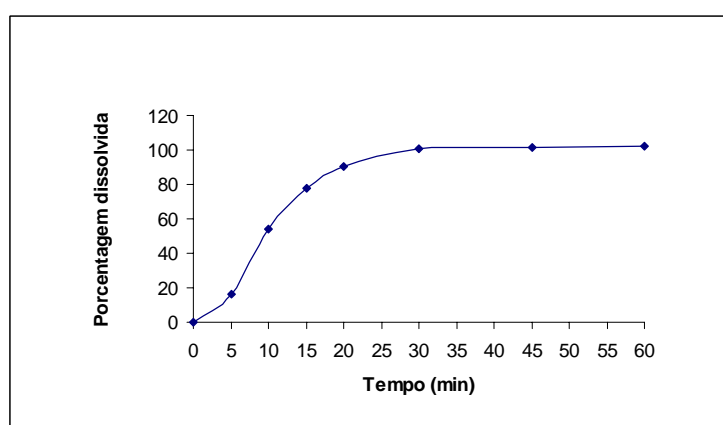


Figura 6.15 – Perfil de dissolução obtido para o citalopram em comprimidos utilizando aparato 1, 900 ml de meio de dissolução ácido clorídrico 0,1 M a  $37,0 \pm 0,5$  °C e rotação de 50 rpm.

O perfil de dissolução mais discriminativo e que possibilita a comparação dos perfis de dissolução através do método do modelo independente foi obtido com o

uso do aparato 1, rotação de 50 rpm e 900 ml de ácido clorídrico 0,1 M como meio de dissolução a  $37,0 \pm 0,5$  °C. Como esperado para fármacos de alta solubilidade, a dissolução do citalopram foi completa dentro de 30 minutos de ensaio. Na tentativa de aumentar o poder discriminatório do teste de dissolução nos primeiros tempos de coleta, alterou-se os tempos de coleta para 5, 9, 12, 15, 20, 25 e 30 minutos (Figura 6.16).

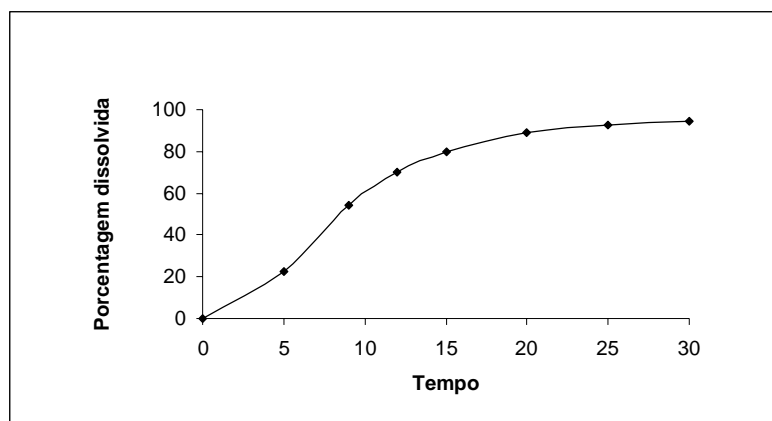


Figura 6.16 – Perfil de dissolução obtido para o citalopram em comprimidos utilizando aparato 1, 900 ml de meio ácido clorídrico 0,1 M a  $37,0 \pm 0,5$  °C, rotação de 50 rpm e tempos de coleta de 5, 9, 12, 15, 20, 25 e 30 minutos.

Na Figura 6.17 estão representados os quatro perfis de dissolução obtidos com o uso do aparato 1, verifica-se uma maior diferença entre eles e um perfil mais discriminativo quando comparados com os perfis obtidos com o uso do aparato 2.

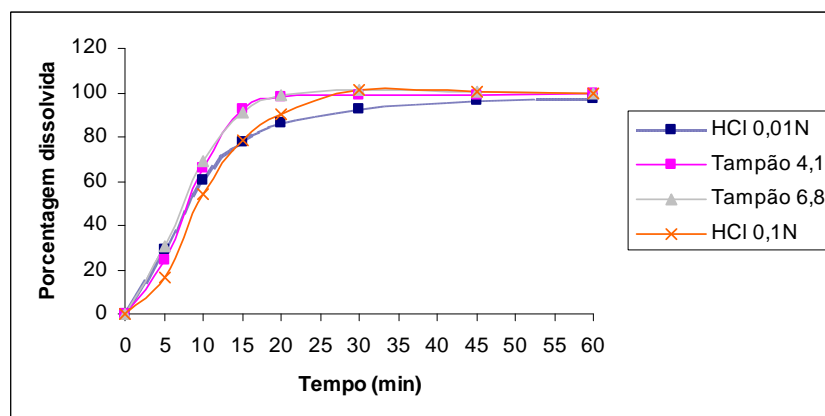


Figura 6.17 – Comparação dos perfis de dissolução obtidos para o citalopram em comprimidos utilizando aparato 1, 900 ml de meio: ácido clorídrico 0,01 M e 0,1 M, tampão acetato (pH 4,1) e tampão fosfato (pH 6,8) a  $37,0 \pm 0,5$  °C, rotação de 50 rpm.

Como mencionado anteriormente, a cromatografia líquida utilizada para avaliar a percentagem de dissolução foi desenvolvida e validada no Capítulo II.

Algumas alterações foram, no entanto, necessárias para o método proposto. Devido à baixa concentração do fármaco, as amostras foram analisadas diretamente do meio de dissolução utilizado (ácido clorídrico 0,1 M). No método previamente desenvolvido as amostras eram analisadas em água. A faixa de linearidade do método previamente validado varia de 10 a 70 µg/ml. Foi necessário modificar esta faixa para o método de dissolução (1 a 40 µg/ml), devido à reduzida quantidade de fármaco dissolvido nos primeiros tempos de coleta. Considerando o exposto, o método por cromatografia líquida foi novamente validado, para avaliar essas alterações.

A Tabela 6.5 apresenta os valores experimentais obtidos na construção da curva padrão para o citalopram por cromatografia líquida e a Figura 6.18 a curva padrão (área *versus* concentração) correspondente.

Tabela 6.5 – Áreas absolutas obtidas na determinação da curva padrão do citalopram por cromatografia líquida.

Concentração (µg/ml)	Áreas absolutas			Média	DPR
	1° dia	2° dia	3° dia		
1,0	57809	56895	57641	57448	0,85
5,0	266158	273242	274285	271228	1,63
15,0	811927	809975	809539	810480	0,16
20,0	1080035	1077998	1078417	1078817	0,10
25,0	1350835	1358666	1356202	1355234	0,30
30,0	1611080	1617932	1624820	1617944	0,42
40,0	2167598	2163279	2187077	2172651	0,58

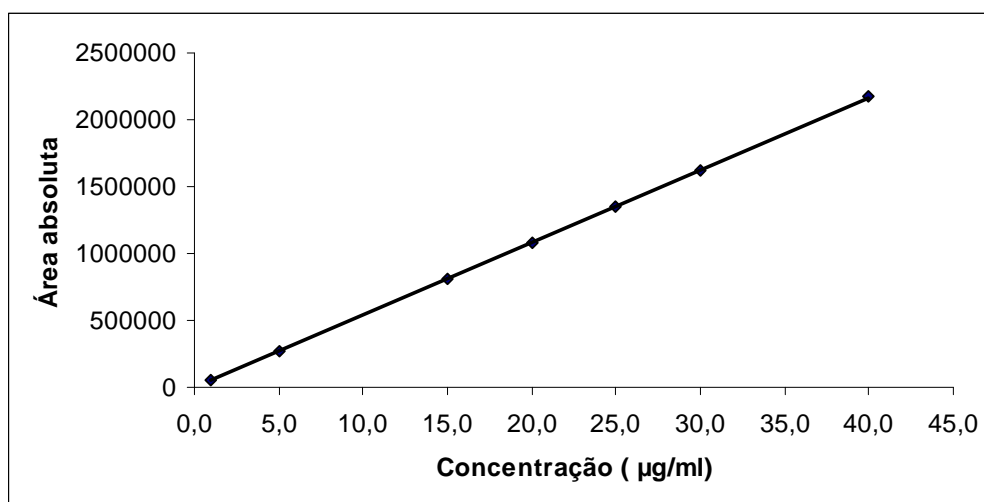


Figura 6.18 – Representação gráfica da curva padrão do citalopram obtida através de cromatografia líquida.

As Tabelas 6.6 e 6.7 apresentam os resultados dos tratamentos estatísticos sobre os valores experimentais obtidos para a curva padrão.

Tabela 6.6 – Resultados da curva padrão, obtidos pelo método dos mínimos quadrados, para o método por cromatografia líquida.

Parâmetros	Resultados
Faixa de linearidade	1,0 – 40,0 µg/ml
Equação: $y = bx + a$	$Y = 54162x - 317,49$
Inclinação (b) ± desvio padrão	$54162 \pm 253,8$
Intercepto (a) ± desvio padrão	$- 317,49 \pm 2338,4$
Coeficiente de correlação (r)	0,9999

Tabela 6.7 – Análise de variância das áreas absolutas determinadas para obtenção da curva padrão do citalopram por cromatografia líquida.

Fontes de variação	GL	Soma dos quadrados	Variâncias	F*
Entre	6	$9,98 \cdot 10^{12}$	$1,66 \cdot 10^{12}$	47,217 (2,85)
- regressão linear	1	$9,98 \cdot 10^{12}$	$9,98 \cdot 10^{12}$	283,293 (4,60)
- desvio da linearidade	5	$3,63 \cdot 10^{08}$	$7,26 \cdot 10^{07}$	2,06 (2,96)
Resíduo	14	$4,93 \cdot 10^{08}$	$3,52 \cdot 10^{07}$	
Total	20	$9,98 \cdot 10^{12}$		

\*Valores entre parênteses correspondem aos valores críticos de F para P = 0,05.

Os resultados da avaliação da linearidade do método demonstram que as soluções de citalopram SQR apresentam correlação linear (coeficiente de correlação linear de 0,9999) entre a área e as concentrações, no intervalo utilizado. A análise de variância (ANOVA) efetuada sobre os valores de área absoluta da curva padrão do citalopram, Tabela 6.7, demonstra regressão linear significativa, não havendo desvio da linearidade para um nível de significância de 5%.

Na avaliação da exatidão do método, a faixa de recuperação obtida foi de 99,69 – 101,30% (Tabela 6.8). Segundo MARQUES e colaboradores (2002), a recuperação deve estar entre 95 – 105% das quantidades pesadas. Os resultados obtidos pelo método proposto encontram-se, assim, dentro do especificado.

Tabela 6.8 – Valores experimentais do teste de recuperação realizado nas amostras simuladas de excipientes de comprimidos de citalopram por cromatografia líquida.

Amostra	Quantidade de SQR (mg)		% de recuperação
	Adicionada	Recuperada	
1	2,0	2,03	101,30
2	20,0	20,04	100,22
3	30,0	29,91	99,69

A precisão do método foi demonstrada pela repetibilidade (intradia), através da análise de três replicatas a 100% da quantidade de SQR adicionada à amostra simulada de excipientes em dois diferentes dias e pela precisão intermediária (interdia), através da análise do desvio padrão relativo dos dois dias de ensaio (Tabela 6.9). O valor experimental médio obtido no primeiro dia foi de 101,41% e no segundo dia foi de 100,77%, os desvios padrões relativos encontrados para ambos os dias foram inferiores a 2% indicando a precisão do método proposto. Na avaliação da precisão intermediária através da mudança de equipamento de cromatografia líquida, o DPR encontrado para o percentual de liberação de citalopram foi de 0,52%, o que indica a precisão do método.

Tabela 6.9 – Valores experimentais referentes à determinação de citalopram por cromatografia líquida, para a avaliação da precisão intra e interdia.

Amostras	Teor (%)	
	Primeiro dia	Segundo dia
1	103,26	99,91
2	100,31	100,88
3	100,67	101,52
Média	101,41	100,77
DPR	1,59	0,80
Média / DPR interdia	101,09 / 0,45	

Na avaliação da influência da desaeração do meio de dissolução, não houve diferença significativa no perfil de liberação do citalopram entre os ensaios realizados com e sem desaeração do meio, portanto, possíveis bolhas de ar presentes não interferem nos resultados do teste de dissolução para os comprimidos de citalopram. Estes resultados confirmam a robustez do método.

As especificações para quantidade de fármaco dissolvido envolvem uma quantidade mínima dissolvida em determinado intervalo de tempo. O objetivo de estabelecer especificações de dissolução é garantir a consistência dos resultados entre lotes. Especificações típicas para a quantidade de fármaco dissolvido, expressa como porcentagem da quantidade declarada (Q), estão na faixa de 70 a 80% do fármaco dissolvido (MARQUES; BROWN, 2002; PHARMACOPEIAL FORUM, 2004). Para fármacos altamente solúveis uma especificação de único ponto, com 85% dissolvidos em 60 minutos ou menos, é suficiente como teste de controle de qualidade lote a lote (FDA, 1997). Face ao exposto, sugere-se como especificação para o citalopram 80% de dissolução em 30 minutos, em ácido clorídrico 0,1 M.

A comparação dos perfis de dissolução para diferentes produtos citados no item 6.5.1 foi realizada utilizando como meio de dissolução ácido clorídrico 0,1 M a  $37,0 \pm 0,5$  °C, aparato 1 e rotação de 50 rpm. Na Tabela 6.10, podem ser observados os valores das porcentagens dissolvidas em 30 minutos para cada



medicamento. Os resultados dos perfis de dissolução encontram-se na Figura 6.19. O coeficiente de variação para os primeiros pontos (9 minutos, por exemplo) de coleta para o medicamento referência não excedeu 20% e dos demais pontos foram menores que 10%, conforme preconizado pela guia do FDA (1997).

Tabela 6.10 – Valores das percentagens dissolvidas (%) dos comprimidos de citalopram obtidas por cromatografia líquida.

<b>Amostra</b>	<b>Medicamento Referência</b>	<b>Medicamento Genérico</b>	<b>Medicamento similar</b>
1	93,07	95,85	93,72
2	99,87	95,45	95,61
3	98,25	94,24	93,87
4	81,71	97,85	95,76
5	91,28	94,31	94,82
6	91,37	96,61	99,89
7	100,89	95,37	96,80
8	99,25	98,89	93,98
9	86,26	90,27	94,65
10	98,48	98,88	93,22
11	99,59	94,53	98,68
12	93,82	100,00	95,88
Média	94,49	96,02	95,57
DPR	6,40	2,78	2,13

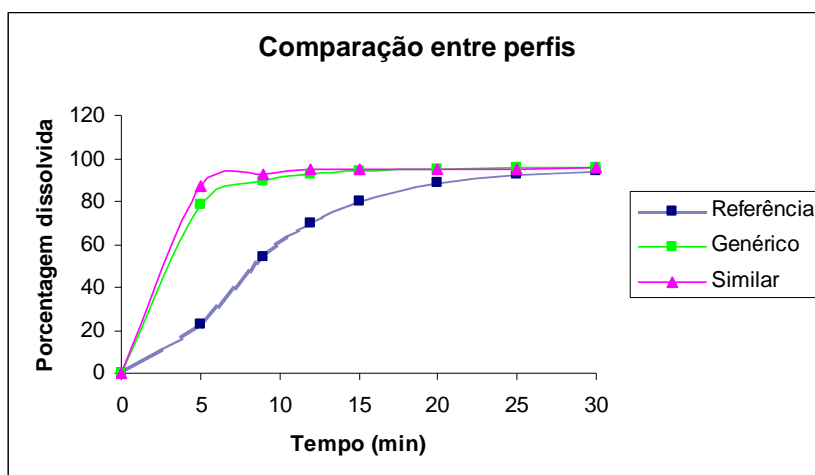


Figura 6.19 – Representação gráfica das porcentagens dissolvidas de citalopram nos comprimidos em 900 ml de meio ácido clorídrico 0,1 M a  $37,0 \pm 0,5$  °C, aparato 1 com rotação de 50 rpm,.

A uniformidade de conteúdo permite verificar a correta distribuição do fármaco em cada unidade dos produtos. Segundo a Farmacopéia Brasileira IV ed. (1998) os valores individuais podem variar de 85 a 115%, com DPR máximo de 6%. Os medicamentos referência (96,24 – 101,22%, média: 98,68% / 1,40%), genérico (97,28 – 103,31%, média: 101,24% / 2,36%) e similar (108,67 – 111,65%, média: 110,71% / 1,11%) testados, cumpriram com as especificações para o teste de uniformidade de conteúdo.

Foram realizados os cálculos de eficiência de dissolução (ED), fator de diferença ( $f_1$ ) e fator de semelhança ( $f_2$ ) para comparação dos perfis de dissolução. De acordo com a RE 310 (2004) e o FDA (1997), dois perfis são similares se o valor de  $f_1$  estiver entre 0 e 15 e se o valor de  $f_2$  estiver entre 50 e 100; valores de  $f_2 < 50$  são indicativos de uma potencial diferença de dissolução *in vivo* (ANDERSON *et al.*, 1998). Os valores de  $f_1$  e  $f_2$  para os medicamentos genérico e similar demonstram que os perfis não são similares ao do medicamento referência (Tabela 6.11). A análise de variância (ANOVA) da ED (Tabela 6.11) mostrou que há diferença significativa entre os perfis de dissolução (Tabela 6.12). Após a realização do teste de Tukey, verificou-se que os medicamentos genérico e similar testados apresentam perfis diferentes do medicamento referência, contudo, os medicamentos genérico e similar não apresentam perfis diferentes entre si (Tabela 6.13).

Tabela 6.11 – Comparação dos perfis de dissolução dos comprimidos de dissolução através da eficiência de dissolução (ED), fator de diferença ( $f_1$ ) e fator de semelhança ( $f_2$ ).

Parâmetro	Medicamento Referência	Medicamento Genérico	Medicamento Similar
ED (%)	65,69	83,72	85,69
$f_1$	-	14,81	16,14
$f_2$	-	33,24	31,45

Tabela 6.12 - Análise de variância dos resultados experimentais obtidos para eficiência de dissolução dos comprimidos de citalopram.

Fontes de variação	GL	Soma dos quadrados	Variâncias	F*
Entre	2	2916,787	1458,39	93,40 (3,28)
Resíduo	33	515,277	15,6	
Total	35	3432,06		

\*Valores entre parênteses correspondem aos valores críticos de F para P = 0,05.

Tabela 6.13 – Teste de Tukey aplicado aos valores de eficiência de dissolução encontradas para comprimidos.

Medicamento	Média (X)	X – 65,69	X – 83,72
Similar	85,69	20,00*	1,97**
Genérico	83,72	18,03*	-
Referência	65,69	-	-

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

As diferenças encontradas em relação aos produtos estudados poderiam alterar sua biodisponibilidade. AMIDON e colaboradores (1995) sugerem, no entanto, que produtos contendo fármacos de alta solubilidade e alta permeabilidade (Classe I) ou alta solubilidade e baixa permeabilidade (Classe III), como é o caso do citalopram, podem ser considerados bioequivalentes desde que apresentem dissolução de 85% do fármaco em menos de 15 minutos, pois as variações encontradas para que o fármaco seja absorvido serão devido ao esvaziamento gástrico, trânsito intestinal, conteúdo luminal e permeabilidade da membrana e não a fatores relacionados à formulação. Os medicamentos genérico e similar cumprem essa especificação.

Para medicamentos genéricos e / ou similar, o fabricante deve investir no desenvolvimento farmacotécnico de um produto que cumpra com as mesmas especificações *in vitro*, em relação ao medicamento referência. Entretanto, aceita-se que a formulação e o processo de fabricação não sejam idênticos, o que geralmente ocorre devido aos diferentes equipamentos e fornecedores de matérias – primas empregados por distintos fabricantes, desde que essas diferenças não comprometam a bioequivalência entre os produtos (STORPIRTIS *et al.*, 2004). Os três produtos testados apresentam formulações diferentes, o que poderia justificar a diferença dos perfis de dissolução entre eles. A presença ou não de bioequivalência entre os produtos só poderá ser confirmada após realização de estudo *in vivo*, pois o citalopram é, provavelmente, um medicamento de classe um na classificação biofarmacêutica sendo, portanto, baixa a possibilidade de correlação *in vivo* – *in vitro* para os comprimidos de citalopram. Como a bioequivalência é soberana e se ela for confirmada, o próprio laboratório fabricante do medicamento genérico e / ou similar, pode sugerir um outro teste de dissolução, desde que devidamente justificado e validado, para o controle de qualidade de seu produto (STORPIRTIS *et al.*, 2004).



## 7. CAPÍTULO V – ESTUDO PRELIMINAR DE ESTABILIDADE

### 7.1. Introdução

O estudo de estabilidade das formas farmacêuticas é de indiscutível importância no desenvolvimento de produtos farmacêuticos. Um produto é considerado estável quando mantém íntegras as suas características químicas, físicas e microbiológicas, durante o período de vida útil determinado (USP 29, 2006).

Os estudos de estabilidade, para determinação do prazo de validade de um produto farmacêutico podem ser de tipo acelerado ou de longa duração. Estes estudos são legislados no Brasil pela Resolução Re N° 1 de 29 de Julho de 2005. (BRASIL, 2005).

As reações de degradação dos medicamentos ocorrem a velocidades definidas e são de natureza química. Dependem de fatores intrínsecos (reações de hidrólise, oxidação, descarboxilação, decomposição, racemização, efeitos de substituintes) e extrínsecos (temperatura, luz, oxigênio, pH, contaminação microbiana, umidade).

Recentemente a decomposição de fármacos, como resultado da absorção da energia da radiação luminosa vem recebendo cada vez mais atenção devido à estrutura química complexa de muitos fármacos. As reações de degradação, tais como, as reações de oxidação e redução, rearranjo de anéis, a modificação ou polimerização, podem ocorrer por exposição à luz em determinados comprimentos de onda. As radiações absorvidas na gama do ultravioleta (baixo comprimento de onda), contribuem mais facilmente para o início de reações químicas do que aquelas absorvidas a partir de comprimentos de onda maiores. As reações fotodegradativas podem apresentar uma cinética de segunda ordem, primeira ordem e ordem zero (LACHMAN *et al.*, 2001).

O ICH (2003) apresenta as condições para o estudo de fotoestabilidade e exige a realização de análises de degradação forçada para a elucidação das características intrínsecas da estabilidade de fármacos em suas formas farmacêuticas. O estudo de estabilidade não terá êxito se os métodos analíticos indicadores de estabilidade não estiverem disponíveis. Esses métodos devem ser capazes de discriminar a substância ativa presente na formulação dos produtos de degradação que venham a ser formados durante o estudo. Além disso, devem ser suficientemente sensíveis para detectar um ou mais produtos de degradação. A cromatografia líquida tem sido amplamente utilizada em estudos de estabilidade devido sua alta capacidade de resolução, especificidade e sensibilidade (BAKSHI; SINGH, 2002).

KWON e colaboradores (2005) estudaram a degradação do citalopram em soluções de diferentes pH frente ao escuro e à luz fluorescente simulando a luz solar. Não ocorreram degradações significativas das soluções no escuro por um período de 30 dias. Em pH 5,0 e 7,0, após 30 dias de exposição à luz, ocorreu menos de 0,5% de degradação do citalopram. Somente em pH 9,0 o citalopram foi moderadamente degradado, apresentando um modelo cinético de pseudo-primeira ordem. Foram detectados, com o uso de detector de massas acoplado ao CL, dois produtos de degradação: o N-desmetilcitalopram (produzido pela N-desmetilação) e em menor quantidade o citalopram N-óxido (produzido através de uma N-oxigenação); estes dois produtos também são formados durante a metabolização do citalopram *in vivo*.

Considerando os poucos estudos de degradação do citalopram na literatura, o objetivo deste trabalho foi o estudo preliminar da fotoestabilidade do citalopram em solução, a determinação do modelo cinético de degradação descrevendo a alteração da concentração do fármaco ao longo do tempo e a determinação dos parâmetros cinéticos. A análise das amostras degradadas foi realizada pelo método por cromatografia líquida indicativo de estabilidade, previamente desenvolvido e validado (item 4.6).

## 7.2. Produtos farmacêuticos

Comprimidos contendo 20 mg de citalopram, com o nome comercial de Cipramil<sup>®</sup>, fabricados pela Lundbeck, lote 2083025, fabricação 10 / 2005 e validade 10 / 2008.

Excipientes: amido, lactose, celulose microcristalina, copolividona, glicerol a 85%, croscarmelose sódica, estearato de magnésio, hipromelose, macrogol 400 e dióxido de titânio.

## 7.3. Solventes e reagentes

- Acetonitrila grau cromatográfico, Merck<sup>®</sup>, Darmstadt, Alemanha,
- Ácido orto-fosfórico 85% grau analítico, Merck<sup>®</sup>, Darmstadt, Alemanha,
- Água purificada, Milli-Q plus, Millipore<sup>®</sup>, Milford, Estados Unidos,
- Trietilamina grau analítico, Merck<sup>®</sup>, Darmstadt, Alemanha.

## 7.4. Equipamentos e acessórios

- Coluna cromatográfica de fase reversa octadecilsilano ACE<sup>®</sup> (250 x 4,6 mm d.i.) 5 µm, Aberdeen, Escócia,
- Cromatógrafo a líquido Agilent Technologies<sup>®</sup>, modelo 1200, integrador automático computadorizado através do software Agilent ChemStation<sup>®</sup>, equipado com detector com comprimento de onda variável UV/VIS, controlador de temperatura para coluna e injetor automático com “loop” variável, Estados Unidos,
- Membrana filtrante de nylon, porosidade 0,45 µm, 47 mm, MFS<sup>®</sup>, Millipore Corporation, MA, Estados Unidos,
- Membrana filtrante Millex<sup>®</sup> HN de nylon, porosidade 0,45 µm, 13 mm, Millipore Corporation, MA, Estados Unidos,
- Filtro qualitativo 80g, porosidade 3,0 µm, 600 x 600 mm, Frama 1600<sup>®</sup>, Brasil,
- Potenciômetro Digimed<sup>®</sup> modelo DM-20, Brasil,



- Banho de ultra-som, modelo USC 2850, Brasil,
- Lâmpada ultravioleta 30W, 254 nm, Ecolume<sup>®</sup>, Estados Unidos.

### **7.5. Desenvolvimento do estudo de degradação**

A lâmpada de ultravioleta modelo Ecolume<sup>®</sup>, 30W, emitindo radiação em 254 nm, foi fixada horizontalmente em uma câmara com o interior espelhado para distribuir a luz UV uniformemente. A cinética de fotodegradação do citalopram foi avaliada expondo soluções amostra preparadas com água pH 1,85 em cubetas de quartzo de 1,0 cm de caminho ótico. A temperatura da câmara foi controlada.

Pesou-se, do pó (item 4.6.1.3), o equivalente a 100,0 mg de citalopram e transferiu-se para balão volumétrico de 100 ml, com auxílio de 90 ml de água pH 1,85. A solução foi submetida a banho de ultra-som por 10 minutos. Completou-se o volume com água pH 1,85, homogeneizou-se e filtrou-se a solução com papel filtro, obtendo-se solução com concentração de 1,0 mg/ml. Alíquotas de 2,0 ml do filtrado foram novamente filtradas, devido à possível interferência da passagem da luz UV pelas amostras turvas, através da membrana filtrante Millex HN de nylon, porosidade 0,45 µm, 13 mm, e transferidas para cubetas de quartzo. As cubetas foram dispostas horizontalmente na câmara espelhada e a irradiação das amostras foi conduzida sob o comprimento de onda de 254 nm. As amostras foram retiradas, em triplicata, nos diferentes intervalos de tempo (0, 2, 3, 4, 5, 6 e 7 horas). O último tempo de coleta deve apresentar uma diminuição de no mínimo 40% da concentração inicial.

Depois de cada tempo de coleta, alíquotas de 1,0 ml das amostras foram transferidas para balões volumétricos de 20 ml, completaram-se os volumes com água, obtendo-se soluções com concentração de 50,0 µg/ml que foram analisadas por cromatografia líquida, utilizando o sistema cromatográfico, previamente validado, descrito no item 4.6 deste trabalho. Todas as soluções foram injetadas em triplicata.

Com o objetivo de avaliar a influência da temperatura durante a exposição das amostras à luz UV, cubetas de quartzo contendo amostra foram envoltas em papel alumínio e submetidas às mesmas condições de degradação, sendo utilizadas como controle.

Solução placebo dos excipientes dos comprimidos de citalopram foi preparada em diluições equivalentes às amostras e submetida às mesmas condições de degradação, com o intuito de verificar a influência dos excipientes no processo de degradação.

## 7.6. Cálculos da cinética de degradação

A determinação da ordem de reação do citalopram foi realizada plotando-se a concentração do fármaco *versus* o tempo (cinética de ordem zero; a velocidade de reação é independente da concentração do reagente (LACHMAN *et al.*, 2001)), log da concentração do fármaco *versus* tempo (cinética de primeira ordem; a velocidade de reação depende da concentração do reagente (LACHMAN *et al.*, 2001)) e o inverso da concentração do fármaco *versus* tempo (cinética de segunda ordem). Coeficientes de regressão ( $r$ ) foram obtidos a partir das retas construídas. A reta que apresentar o valor de  $r$  mais próximo à unidade determina a ordem de reação para o fármaco em estudo. Os parâmetros cinéticos: constante de velocidade de reação ( $k$ ) (indica a quantidade de fármaco que se degrada por unidade de tempo) e  $t_{90\%}$  (tempo em que a concentração do fármaco é 90% do valor inicial) foram calculados a partir da inclinação da reta em cada tempo de coleta.

Os modelos cinéticos podem ser representados como (NUDELMAN, 1975):

- Cinética de ordem zero:  $C = C_0 - kt$   $t_{90\%} = 0,1 \cdot C_0 / k$
- Cinética de primeira ordem:  $\ln C = \ln C_0 - kt$   $t_{90\%} = 0,106 / k$
- Cinética de segunda ordem:  $1 / C = 1 / C_0 + kt$   $t_{90\%} = 1 / 9k \cdot C_0$

Onde:

$C_0$  = Concentração do fármaco a reagir no tempo zero

$C$  = Concentração do fármaco após a reação no tempo  $t$

$k$  = constante de velocidade de reação (inclinação da reta)

## 7.7. Resultados e discussão

O objetivo dos testes de fotoestabilidade é demonstrar como a qualidade do fármaco pode ser variada quando este é exposto à influência da luz UV. Os estudos de degradação forçada é a primeira etapa a ser realizada na avaliação da

estabilidade de fármacos, auxiliando na avaliação do número e no tipo de produtos de degradação formados sob as condições de estresse. Com base nos resultados obtidos nestes estudos, determinam-se os fatores de degradação aos quais o fármaco é susceptível e faz-se o delineamento da cinética de degradação (ICH, 2003).

Após o estudo da estrutura química do citalopram e de suas propriedades físico-químicas, submeteu-se o fármaco às seguintes condições drásticas de degradação: hidrólise ácida e básica, oxidação, temperatura e luz UV com o objetivo de determinar o fator de degradação ao qual o citalopram é mais susceptível. Nestes estudos, realizados durante a avaliação da especificidade do método por CL (item 4.6.1.1), observou-se que o citalopram é susceptível à hidrólise básica e à luz UV. O processo de degradação do fármaco sob a luz UV é gradual, entretanto, não é possível controlar sua degradação em meio básico.

O perfil de fotodegradação do citalopram foi avaliado em diferentes intervalos de tempo. O efeito da luz UV sobre a concentração residual de citalopram em amostras degradadas é apresentado na Tabela 7.1. Observa-se através dos resultados que 41,14% do fármaco sofre degradação após 7 horas de exposição à luz UV.

Tabela 7.1 – Resultados da concentração residual do citalopram em água pH 1,85 após as amostras serem submetidas à fotodegradação, utilizando o método por cromatografia líquida.

Tempo (horas)	Concentração amostra (µg/ml)	Concentração residual (µg/ml) *	DPR
0	50,0	50,0 (100%)	0,40
2		48,16 (96,31%)	1,84
3		44,94 (89,88%)	0,67
4		42,08 (84,15%)	3,31
5		36,99 (73,98%)	2,91
6		35,48 (70,97%)	4,71
7		29,43 (58,86%)	5,77

\* n = 3

Na Figura 7.1 estão representados os cromatogramas obtidos para a solução amostra de citalopram em comprimidos no tempo zero e a sua degradação após 7 horas de exposição à luz UV. Pode-se observar no cromatograma do citalopram exposto à luz UV por 7 horas a presença de um produto de degradação majoritário em 3,3 minutos (resolução de 7,79 calculada pelo software do equipamento) e outros produtos de degradação em 2,9 minutos. No cromatograma da solução placebo os excipientes não interferem no pico do citalopram e dos produtos de degradação formados (Figura 7.2). Os resultados obtidos com as soluções amostra nas cubetas envoltas em papel alumínio demonstraram que a temperatura não influencia na formação dos produtos de degradação do citalopram, durante a exposição à luz UV.

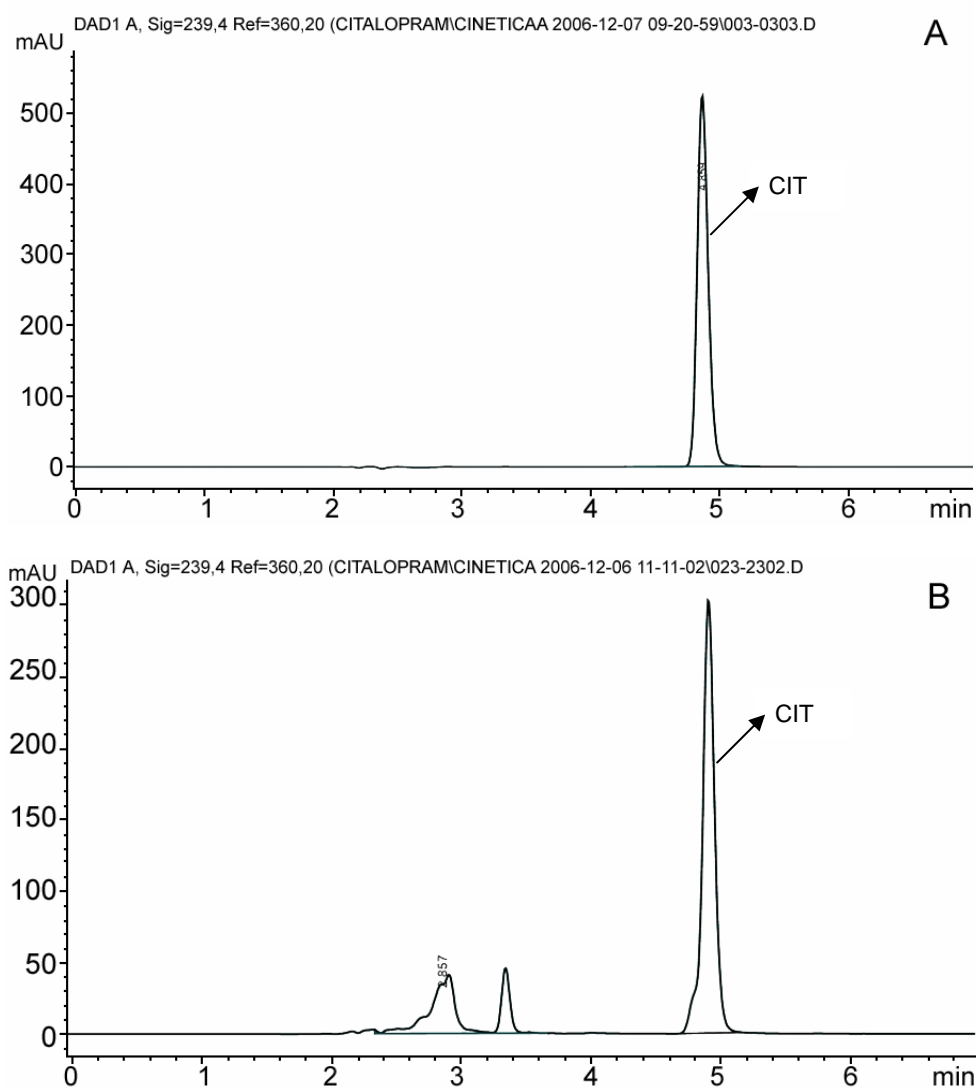


Figura 7.1 – Cromatogramas obtidos para a amostra de citalopram no tempo zero (A) e para a amostra de citalopram em comprimidos degradada após 7 horas de exposição à luz UV (B). CIT: citalopram.

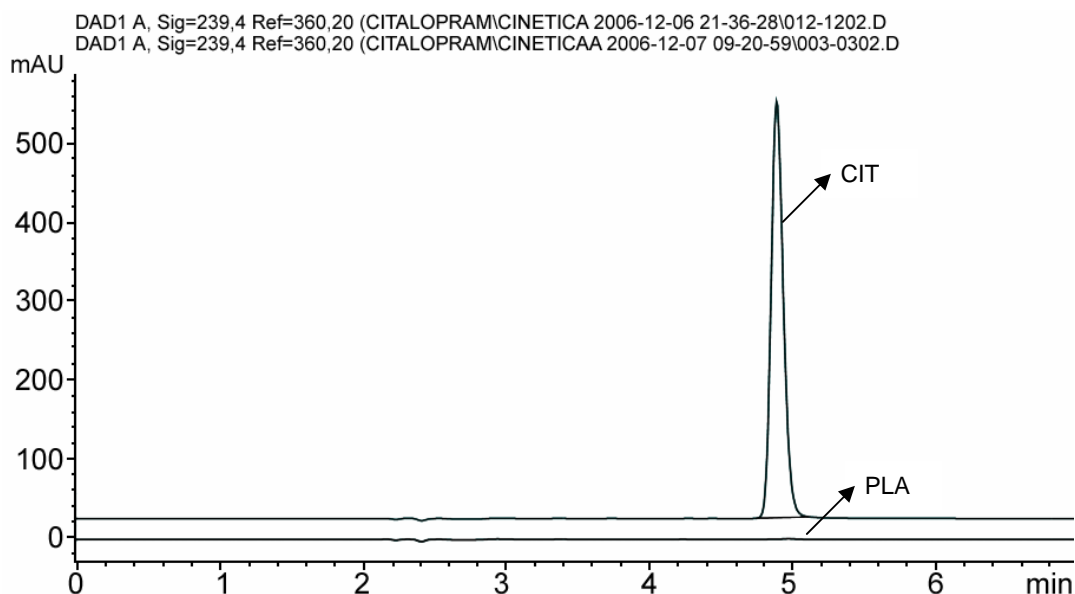


Figura 7.2 - Cromatogramas obtidos com a solução amostra de citalopram na concentração de 50,0 µg/ml (CIT) e solução placebo (PLA).

A cinética de fotodegradação foi calculada baseada na redução da concentração do citalopram no intervalo de tempo determinado. Não foi possível a realização do estudo após o período de 7 horas devido à perda de especificidade do método cromatográfico em função da formação de um produto de degradação junto ao pico do citalopram.

A concentração residual de citalopram foi calculada em cada tempo avaliado, em triplicata, comparando-se com a concentração inicial de citalopram na amostra. Na Figura 7.3 estão representados os gráficos obtidos plotando-se a concentração do fármaco *versus* o tempo (cinética de ordem zero), log da concentração do fármaco *versus* tempo (cinética de primeira ordem) e o inverso da concentração do fármaco *versus* tempo (cinética de segunda ordem). Através da avaliação do coeficiente de correlação ( $r = 0,9423$ ), pode-se verificar que o processo de degradação do citalopram em água pH 1,85 pode ser descrito como uma cinética de ordem zero, sob as condições descritas neste estudo. Os valores da constante de velocidade de reação ( $k$ ) e o  $t_{90\%}$  para o processo de degradação de ordem zero foram  $2,09 \text{ h}^{-1}$  e 2,39 horas, respectivamente.

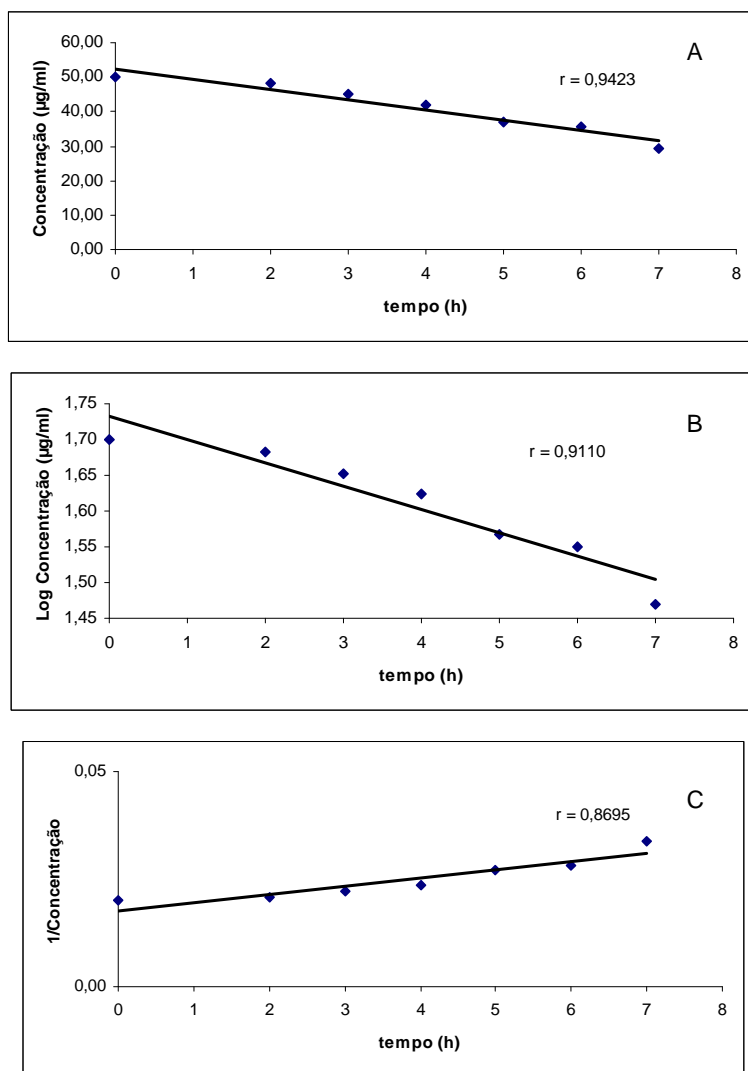


Figura 7.3 – Gráficos da concentração (A) – cinética de ordem zero, log da concentração (B) – cinética de primeira ordem e inverso da concentração (C) – cinética de segunda ordem do citalopram *versus* tempo.

A avaliação preliminar da estabilidade apresentou resultados importantes, com indicativos de que o citalopram apresenta sensibilidade à luz UV. Certamente, existe a necessidade de um estudo aprofundado da estabilidade frente à luz UV do citalopram na forma farmacêutica comprimido, de modo a esclarecer o comportamento deste fármaco nessas condições, bem como estudar seus produtos de degradação.



## 8. DISCUSSÃO GERAL

O controle de qualidade é parte integrante de todos os processos em uma indústria farmacêutica. A necessidade de se mostrar a qualidade de medições químicas, através de sua comparabilidade, rastreabilidade e confiabilidade, está sendo cada vez mais reconhecida e exigida. Para garantir que um novo método analítico gere informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra, ele deve ser validado. A validação de métodos deve ser planejada antes de seu desenvolvimento e execução (WATSON, 1999; RIBANI *et al.*, 2004).

Os métodos utilizados na caracterização da SQR do citalopram mostraram-se adequados e podem ser utilizados no controle de qualidade da matéria – prima do citalopram. Através da espectrometria na região do infravermelho foi possível obter bandas de absorção características do fármaco, de acordo com os resultados encontrados por MOFFAT e colaboradores (2004). A espectrofotometria na região do ultravioleta mostrou que independente dos solventes avaliados no preparo das soluções da SQR do citalopram, as absorções sempre obtiveram um máximo no comprimento de onda de 239 nm. O uso do equipamento de DSC além de determinar o ponto de fusão do fármaco de 184,92 °C, não identificou a presença de impurezas e polimorfismo na amostra analisada.

Para a análise qualitativa do citalopram em comprimidos foram propostos, neste trabalho, métodos simples que através da observação de características físico-químicas permitem a identificação do fármaco. No sistema desenvolvido para a realização da cromatografia em camada delgada obteve-se fatores de retenção ( $R_f$ ) para o citalopram em torno de 0,50, sendo que foi possível a separação do fármaco de compostos com afinidade estrutural, como a fluoxetina, comprovando a especificidade do método. A espectrofotometria na região do ultravioleta confirmou a identidade do fármaco em comprimidos visto que o espectro de absorção obtido pela solução amostra de citalopram em comprimidos exibiu um máximo em 239 nm



idêntico ao observado no espectro de absorção da solução SQR. A cromatografia líquida também é um método útil na identificação de fármacos em suas formas farmacêuticas (WATSON, 1999). O tempo de retenção da amostra de citalopram em comprimidos correspondeu ao tempo de retenção da solução SQR do citalopram.

Muitos medicamentos são inseridos no mercado nacional sem que os códigos oficiais disponibilizem metodologias analíticas para seu controle de qualidade. Os métodos para a análise quantitativa do citalopram em comprimidos foram desenvolvidos e validados com o objetivo de inserir na literatura metodologia de baixo custo, que minimizem a utilização de solventes orgânicos, rápidos e de fácil execução para o controle de qualidade de rotina deste fármaco em comprimidos.

A quantificação através da espectrofotometria na região do ultravioleta foi possível utilizando para o preparo das soluções amostra e SQR o solvente ácido clorídrico 0,1 M, no qual o fármaco apresenta absorção máxima no comprimento de onda de 239 nm. Este solvente foi escolhido em função da boa absorção do fármaco neste meio e da possível utilização deste método para o desenvolvimento dos testes de dissolução dos comprimidos de citalopram. A especificidade, linearidade, precisão, exatidão e sensibilidade foram determinadas satisfatoriamente de acordo com o ICH (2005), Farmacopéia Americana (USP 29, 2006) e Resolução RE 899, de 29 de maio, de 2003.

O método por cromatografia líquida foi desenvolvido utilizando solventes não agressivos para o equipamento e que permitissem a obtenção de um pico com simetria apropriada. A utilização da coluna cromatográfica de fase reversa C<sub>8</sub> na quantificação do citalopram em comprimidos não foi adequada, visto que com a coluna C<sub>18</sub> obtiveram-se os melhores resultados para os parâmetros cromatográficos (fator de capacidade, assimetria, números de pratos teóricos) com uma pequena proporção de solvente orgânico na fase móvel.

O estudo da degradação forçada da SQR do citalopram frente à hidrólise ácida e básica, oxidação, temperatura e luz UV demonstrou que o fármaco é susceptível à hidrólise alcalina e à luz UV, entretanto, somente através da degradação sob a luz UV há a possibilidade de controlar o decaimento da concentração do fármaco ao longo do tempo. Sob as condições de degradação, o

método desenvolvido por CL separou os produtos de degradação formados do pico do citalopram. A pureza do pico foi determinada com a utilização do detector de arranjo de diodos (DAD) que não indicou a presença de impurezas no pico do fármaco, sendo, portanto, um método indicativo de estabilidade e pode ser utilizado em estudos preliminares de fotoestabilidade do citalopram em comprimidos.

O sistema cromatográfico isocrático composto pela coluna cromatográfica de fase reversa ACE<sup>®</sup> C<sub>18</sub> (25 cm x 4,6 mm), fase móvel constituída de solução de trietilamina 0,3%:acetonitrila (55:45, v/v), pH 6,60, com fluxo de 1,0 ml/min e detecção no ultravioleta em 239 nm, permitiu a obtenção de picos com assimetria (1,54), fator de capacidade (1,69) e número de pratos teóricos (10391) adequados. O método por CL foi validado, apresentando especificidade, linearidade, precisão, exatidão, robustez e sensibilidade para a quantificação do citalopram em comprimidos.

A realização da análise comparativa dos métodos por espectrofotometria na região do ultravioleta e CL tem por objetivo demonstrar estatisticamente que os métodos são intercambiáveis entre si. Os métodos desenvolvidos e validados no presente trabalho, não diferem estatisticamente entre si e ambos podem ser utilizados para o doseamento do fármaco nos comprimidos.

A separação enantiomérica do citalopram é de extrema importância no controle de qualidade do fármaco para as análises qualitativa e quantitativa (SANTORO; SINGH, 2001). A análise quantitativa não foi possível devido à dificuldade de obtenção da SQR dos isômeros isolados, o que impossibilita a validação do método de separação.

Os estudos realizados com a coluna tipo Pirkle (S,S) Whelk-O 1<sup>®</sup>, com diferentes fases móveis, não possibilitou a separação enantiomérica do citalopram. O sistema cromatográfico constituído pela coluna de proteína Chiral - AGP<sup>TM</sup><sup>®</sup> e fase móvel contendo tampão acetato de amônio 100 mM:trietilamina 4 mM, pH 5,47, fluxo de 0,8 ml/min e detecção em 239 nm deu origem à separação enantiomérica da SQR do citalopram e do citalopram em comprimidos. Os valores obtidos através do uso deste sistema para o fator de capacidade ( $k_1 = 5,0$ ,  $k_2 = 7,0$ ) e seletividade (1,4) foram adequados.

A determinação da ordem de eluição foi realizada injetando-se no cromatógrafo, sob as condições acima descritas, uma amostra a partir dos comprimidos de escitalopram (isômero S). Os tempos de retenção dos isômeros R e S são, respectivamente, 9 e 12 minutos. Este método de separação enantiomérica é específico e pode ser utilizado na identificação dos isômeros do citalopram e do escitalopram em comprimidos. Na presença das SQR dos isômeros R e S é possível validar este método para a quantificação e determinação da pureza enantiomérica do citalopram e do escitalopram, respectivamente.

Os testes de dissolução vêm se tornando indispensáveis no controle de qualidade de comprimidos e cápsulas devido ao crescimento da produção de medicamentos genéricos e similares no mercado nacional (STORPIRTIS *et al.*, 2004). São poucas as guias utilizadas para o desenvolvimento de métodos analíticos que possuem diretrizes especificamente voltadas para o desenvolvimento e validação dos testes de dissolução, sendo um desafio para o pesquisador determinar as melhores condições *in vitro* para a formulação em estudo.

A condição que permitiu um perfil de dissolução discriminativo para os comprimidos de citalopram foi obtida com o uso do aparato 1, rotação de 50 rpm e 900 ml de ácido clorídrico 0,1 M como meio de dissolução a  $37,0 \pm 0,5$  °C e quantificação por CL. Em função dos resultados obtidos nos perfis de dissolução realizados sob estas condições, sugere-se a especificação de 80% de dissolução em 30 minutos para os comprimidos de citalopram.

A comparação dos perfis de dissolução é realizada, conforme a legislação brasileira (BRASIL, 2004), através do cálculo dos fatores  $f_1$  e  $f_2$ , entretanto, existem outros métodos descritos na literatura como o cálculo da eficiência de dissolução (ED) (KHAN, 1975; MARCOLONGO, 2003). Os perfis de dissolução dos medicamentos genérico e similar estudados, não são semelhantes ao do medicamento referência através do cálculo dos fatores  $f_1$  e  $f_2$ . O cálculo da eficiência de dissolução comprova a diferença entre os perfis, porém, através do teste de Tukey é possível concluir que a diferença é somente entre os medicamentos em teste com o medicamento referência, pois entre eles não há diferença nos perfis de liberação.

Esta diferença encontrada não permite concluir que os medicamentos genérico e similar avaliados não possam ser intercambiáveis com o medicamento referência. É necessária a realização de todos os testes físico-químicos e os estudos *in vivo* para comprovar a equivalência e a bioequivalência, respectivamente, entre os medicamentos.

O estudo preliminar de fotoestabilidade do citalopram demonstrou que o fármaco é instável frente à luz UV e a cinética de fotodegradação do fármaco segue uma cinética de ordem-zero. Estudos mais aprofundados da estabilidade do fármaco frente à luz UV são necessários a fim de esclarecer o seu comportamento nessas condições.

Este trabalho apresentou o desenvolvimento de análises qualitativas e quantitativas esperando contribuir com os códigos oficiais e indústrias farmacêuticas para o controle de qualidade de rotina do citalopram em comprimidos.



## 9. CONCLUSÕES

- As análises por espectroscopia na região do infravermelho, espectrofotometria na região do ultravioleta e determinação do ponto de fusão, permitiram a caracterização da substância química utilizada como referência no presente trabalho.

- As análises por cromatografia em camada delgada, espectrofotometria na região do ultravioleta e cromatografia líquida permitiram a identificação do citalopram em comprimidos.

- O método desenvolvido através da espectrofotometria na região do ultravioleta a 239 nm, utilizando ácido clorídrico 0,1 M como solvente, mostrou-se linear, sensível, específico, preciso e exato para a análise quantitativa do citalopram em comprimidos.

- O método desenvolvido através da cromatografia líquida, nas condições experimentais estabelecidas, mostrou-se linear, sensível, específico, preciso, exato e robusto para a análise quantitativa do citalopram em comprimidos.

- A análise comparativa entre os métodos propostos para a determinação quantitativa do citalopram demonstrou não haver diferenças estatisticamente significativas, sendo caracterizada a equivalência dos mesmos.

- O método desenvolvido através da cromatografia líquida, nas condições experimentais estabelecidas, mostrou-se adequado para a separação enantiomérica da SQR do citalopram e do citalopram em comprimidos.

- O método proposto para a separação enantiomérica do citalopram não sofre interferência dos excipientes da formulação analisada, sendo, portanto, enantiosseletivo para o citalopram.

- A coluna do tipo Pirkle (S,S) Whelk-O 1<sup>®</sup> empregada neste trabalho não foi capaz de separar os enantiômeros do citalopram.

- A vantagem principal do método proposto é que pode-se promover a separação dos enantiômeros (R)- e (S)- de maneira adequada e rápida. Com o aumento do interesse de se empregar, em formulações farmacêuticas, fármacos enantiomericamente puros, este método poderá ser utilizado para a determinação das impurezas quirais, tornando-se apropriado para o controle de qualidade de preparações farmacêuticas racêmicas e com o enantiômero isolado.

- O uso de 900 ml de ácido clorídrico 0,1 M a  $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ , aparato cesta e velocidade de rotação de 50 rpm, demonstraram resultados satisfatórios para avaliar a dissolução dos comprimidos de citalopram.

- Indica-se que a especificação de 80% ou mais de dissolução em 30 minutos seja suficiente para comprovar a qualidade dos comprimidos nas condições estabelecidas.

- O método por cromatografia líquida mostrou-se adequado para avaliar o percentual dissolvido do citalopram em comprimidos.

- O teor de citalopram nos produtos analisados ficou dentro da faixa de 90 – 110%.

- Todos os produtos avaliados apresentaram percentual de dissolução superior a 95% em 30 minutos.

- Na análise do perfil de dissolução, os produtos B e C apresentaram percentual dissolvido superior a 85% em 15 minutos.

- No estudo comparativo, verificou-se que os produtos B e C não apresentam perfil de dissolução semelhante ao produto A, mas apresentam semelhança entre si.

- O ensaio preliminar de fotoestabilidade de solução de citalopram demonstra que o fármaco é instável à luz ultravioleta durante o período e as condições experimentais utilizadas.

- A fotodegradação do citalopram em comprimidos segue uma cinética de ordem zero.

## 10. REFERÊNCIAS

ABDOU, H. M. **Dissolution. Bioavailability & Bioequivalence**. Easton: Mack Publishing Company, 1989. p. 554.

AHUJA, S. **Chiral separation by liquid chromatography**. American Chemical Society, 1991. p. 239.

AKERMAN, K. K.; JOLKKONEN, J.; HUTTUNEN, H.; PENTTILA, I. High-performance liquid chromatography method for analyzing citalopram and desmethylcitalopram from human serum. **Therapeutic-Drug-Monitoring**, v. 20, n. 1, p. 25-29, 1998.

ALLENMARK, S. Chromatographic methods for optical purity determination of drugs. **Acta Pharmaceutical Nordica**, v. 2, p. 161–170, 1990.

ANDERSEN, S.; HALVORSEN, T. G.; PEDERSEN-BJERGAARD, S.; RASMUSSEN, K. E.; TANUM, L.; REFSUM, H. Stereospecific determination of citalopram and desmethylcitalopram by capillary electrophoresis and liquid-phase microextraction. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 33, p. 263–273, 2003.

**ANVISA**, Workshop: “Equivalência Farmacêutica com Ênfase em Dissolução”, São Paulo, março de 2004.

AMIDON, G. L.; LENNERNÄS, H.; SHAH, V. P.; 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, n. 3, p. 413–420, 1995.

ANDERSON, I. M. The new antidepressants. **Current Anaesthesia and Critical Care**, v. 10, p. 32–39, 1999.

ANDERSON, N. H.; BAUER, M.; BOUSSAC, N.; KHAN-MALEK, R.; MUNDEN, P.; SARDARO, M. An evaluation of fit factors and dissolution efficiency for the comparison of *in vitro* dissolution profiles. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 17, p. 811–822, 1998.

AVENDAÑO, C. Síntesis de fármacos. Principios generales e introducción al análisis farmacéutico. In: LOPEZ, M. C. A. **Introducción a la Química farmacéutica** – Madrid: Intramericana McGraw-Hill, 1993. p.549-584; 843-857.

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



BALDESSARINI, R. J. Fármacos e o tratamento dos distúrbios psiquiátricos – depressão e distúrbios de ansiedade. In: HARDMAN, J.; LIMBIRD, L. (Ed). **Goodman & Gilman. As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 10. ed. Rio de Janeiro: McGraw Hill, 2003. p. 339-364.

BAUMANN, P.; ZULLINO, D. F.; EAP, C. B. Enantiomers' potencial in psychopharmacology – a chiral analysis with special emphasis on the antidepressant escitalopram. **European Neuropsychopharmacology**, v. 12, p. 433–444, 2002.

BERZAS, J. J.; GUIBERTEAU, C.; CONTENTO, A. M.; RODRÍGUEZ, V. Sensitive and rapid high – performance liquid chromatographic method for simultaneous determination of antidepressants in pharmaceutical formulations. **Chromatographia**, v. 56, p. 545–51, 2002.

BERZAS-NEVADO, J. J.; CABANILLAS, C. G.; LLERENA, M. J. V.; ROBLEDO, V. R. Enantiomeric determination, validation and robustness studies of racemic citalopram in pharmaceutical formulations by capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 1072, p. 249–257, 2005.

BERZAS-NEVADO, J. J.; CONTENTO - SALCEDO, A.M. Method development and validation for the simultaneous determination of five selective serotonin reuptake inhibitors by capillary zone electrophoresis. **Chromatographia**, v. 55, n. 5-6, p. 369-373, 2002.

BHUSHAN, R.; THIONGO, G. T. Direct enantioseparation of some  $\beta$ -adrenergic blocking agents using impregnated thin-layer chromatography. **Journal of Chromatography B**, v. 708, p. 330– 34, 1998.

BONATO, P. S.; JABOR, V. A. P.; GAITANI, C. M. Análise enantiosseletiva de fármacos: contribuições da cromatografia líquida de alta eficiência e eletroforese capilar. **Química Nova**, v. 28, n. 4, p. 683–691, 2005.

BOOTH, R. G., NEUMEYER, J. L. Fármacos psicoterapêuticos. In: WILLIAMS, D. A. (Ed.). **FOYE'S Principles of Medicinal Chemistry**. 5. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2002. p. 408 - 433.

BOUWER, C.; STEIN, D. J. Use of the selective serotonin reuptake inhibitor citalopram in the treatment of generalized social phobia. **Journal of Affective Disorders**, v. 49, p. 79–82, 1998.

BRASIL. Resolução – RDC nº 210, de 04 de agosto de 2003. Regulamento técnico para as Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos – 1/2003. **Diário Oficial** [da República Federativa do Brasil], Brasília, DF, 14 ago. 2003 a.

\_\_\_\_\_. Resolução - RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos - 2/2003. **Diário Oficial** [da República Federativa do Brasil], Brasília, DF, 02 jun. 2003 b.

\_\_\_\_\_. Resolução - RE nº 901, de 29 de maio de 2003. Guia para Ensaio de Dissolução para Formas Farmacêuticas Sólidas Orais de Liberação Imediata (FFSOLI). **Diário Oficial** [da República Federativa do Brasil], Brasília, DF, 02 jun. 2003c.

\_\_\_\_\_. Resolução - RE nº 310, de 1º de setembro de 2004. Guia para realização do estudo e elaboração do relatório de equivalência farmacêutica e perfil de dissolução. **Diário Oficial** [da República Federativa do Brasil], Brasília, DF, 03 set. 2004.

\_\_\_\_\_. Resolução - RE nº 1, de 29 de julho de 2005. Guia para realização de estudos de estabilidade. **Diário Oficial** [da República Federativa do Brasil], Brasília, DF, 25 ago. 2005.

BRITAIN, H. G. Validação de Métodos Analíticos Não Cromatográficos. **Pharmaceutical Technology**, v. 2, n. 3, p. 4-9, 1998.

BROSEN, K.; NARANJO, C. A. Review of pharmacokinetic and pharmacodynamic interaction studies with citalopram. **European Neuropsychopharmacology**, v. 11, p. 275–283, 2001.

CARLSSON, B.; NORLANDER, B. Solid – phase extraction with end – capped C2 columns for the routine measurement of racemic citalopram and metabolites in plasma by high – performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography B**, v. 702, p.234–239, 1997.

CARLSSON, B.; NORLANDER, B. Optimization and characterization of the chiral separation of citalopram and its demethylated metabolites by response-surface methodology. **Chromatographia**, v. 53, n. 5–6, p. 266–272, 2001.

CARLSSON, B. **From achiral to chiral analysis of citalopram**. 2003. 93f. Tese de doutorado – Faculty of Health Sciences, Linköping, 2003.

CASINI, A.; CACCIA, S.; SCOZZAFA, A.; SUPURAN, C. T. Carbonic anhydrase activators. The selective serotonin reuptake inhibitor fluoxetine, sertraline and citalopram are strong activators of isozymes I and II. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 13, p. 2765–2768, 2003.

CLAS, S. D.; DALTON, C. R.; HANCOCK, B. C. Differential scanning calorimetry: applications in drug development. **Pharmaceutical Science and Technology Today**, v. 02, n. 08, p. 311–320, 1999.

CORDIOLI, A. V. **Psicofármacos – Consulta Rápida**. Porto Alegre: Artes Médicas, 1997.

COSTA, D.; COSTA, E. Quiralidade, enantiômeros e antidepressivos. **Psiquiatria Biológica**, v. 11, n. 01, p. 09–13, 2003.

DAVANKOV, V. A. The nature of chiral recognition: is it a three-point interaction? **Chirality**, v. 9, p. 99–102, 1997.

**DEF 2004/2005. Dicionário de Especialidades Farmacêuticas**. 33. ed. Produção Jornal Brasileiro de Medicina, 2004.

**DRUG INFORMATION**, 2000-2001. 8. ed. Cleveland: Lexi-Comp. Inc., 2000.

EL-GINDY, A.; EMARA, S.; MESBAH, M. K.; HADAD, G. M.; Liquid chromatography determination of citalopram enantiomers using  $\beta$  - ciclodextrin as a chiral mobile phase additive. **Journal of AOAC International**, v. 89, n. 1, p. 65–70, 2006.

**EMA – The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products**: Note for Guidance on Quality of Modified Release Products: A: Oral Dosage Form, B: Transdermal Dosage Forms Section I (Quality). p. 1- 5, London, 1999.

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

**FARMACOPÉIA Brasileira**. 4 ed., São Paulo: Atheneu, 1988.

FASSINO, S.; LEOMBRUNI, P.; DAGA, G. A.; BRUSTOLIN, A; MIGLIARETTI, G.; CAVALLO, F.; ROVERA, G. G. Efficacy of citalopram in anorexia nervosa: a pilot study. **European Neuropsychopharmacology**, v. 12, p. 453–459, 2002.

FAVALE, E.; AUDENINO, D.; COCITO, L.; ALBANO, C. The anticonvulsant effect of citalopram as an indirect evidence of serotonergic impairment in human epileptogenesis. **Seizure**, v. 12. p. 316–318, 2003.

**FDA – Food and Drug Administration**: Validation of chromatographic methods. Washington: Center of Drug Evaluation and Research, 1994.

**FDA – Food and Drug Administration**: Guidance for Industry: Dissolution Testing of Immediate Release Solid Oral Dosage Forms. p. 1–11. Agosto, 1997.

**FDA – Food and Drug Administration**: Guidance for Industry: Waiver of In Vivo Bioavailability and Bioequivalence Studies for Immediate – Release Solid Oral Dosage Forms Based on a Biopharmaceutics Classification System. p. 1–13. Agosto, 2000.

FLORES, R.; BERNAS – NEVADO, J.; CONTENTO – SALCEDO, J. J.; CABELLO – DIAS, M. P. Development of a capillary zone electrophoretic method to determine six antidepressants in their pharmaceutical preparations. Experimental design for evaluating the ruggedness of method. **Journal of Separation Science**, v.27, n. 1–2, p. 33–40, 2004.

FORTUNATO, D. Dissolution method development for immediate release solid oral dosage forms. **Dissolution Technologies**, p. 12–14, 2005.

FRAHNET, C.; RAO, M. L.; GRASMADER, K. Analysis of eighteen antidepressants, four atypical antipsychotics and active metabolites in serum by liquid chromatography: a simple tool for therapeutic drug monitoring. **Journal of Chromatography B**, v. 794, p.35–47, 2003.

FUCHS, F. D.; WANNMACHER, L. **Farmacologia Clínica: fundamentos da terapêutica racional**. 3. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

GLENNON, R. A.; DUKAT, M. Receptores serotoninérgicos e fármacos que afetam a neurotransmissão serotoninérgica. In: WILLIAMS, D. A. (Ed.). **FOYE’S Principles of**

**Medicinal Chemistry**. 5. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2002. p. 315–337.

GUTIERREZ, M., M.; ABRAMOWITZ, W. Pharmacokinetic comparison of oral solution and tablet formulations of citalopram: a single – dose, randomized, crossover study. **Clinical Therapeutics**, v. 22, n. 12. p. 1525–1532, 2000.

HALVORSEN, T. G.; PEDERSEN – BJEGAARD, S. RASMUSSEN, K. E. Liquid – phase microextraction and capillary electrophoresis of citalopram, an antidepressant drug. **Journal of Chromatography A**, v. 909, p. 87–93, 2001.

HAUPT, D. Determination of citalopram enantiomer in human plasma by liquid chromatographic separation on a chiral – AGP column. **Journal of Chromatography B**, v. 685, p.299–305, 1996.

HEIKKINEN T.; EKBLAD, U.; KERO, P.; EKBLAD, S.; LAINE, K. Citalopram in pregnancy and lactation. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 72, n. 02, p. 184–191, 2002.

HERMANSSON, J.; HERMANSSON, I. Dynamic modification of the chiral bonding properties of a chiral-AGP column by organic and inorganic additives: separation of enantiomers of anti-inflammatory drugs. **Journal of Chromatography**, v. 666, p. 181–191, 1994.

HIEMKE, C.; HARTTER, S. Pharmacokinetics of selective serotonin reuptake inhibitors. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 85, p. 11–28, 2000.

HOLSBOER, F. Therapeutics for depression and anxiety disorders. **Drug Discovery Today: Therapeutic Strategies**, v. 1, n. 1, p. 105–109, 2004.

**ICH – International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use: Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1)**. p. 1-13, 2005. Commission of the European Communities. IFPMA, Switzerland, 2005.

**ICH – International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use: Stability Testing of New Drug Substances and Products Q1A (R2)**. p. 1-18, 2003. Commission of the European Communities. IFPMA, Switzerland, 2003.

JUAN, H.; ZHILING, Z.; HUANDE, L. Simultaneous determination of fluoxetine, citalopram, paroxetine, venlafaxine in plasma by high – performance liquid chromatography – electrospray ionization mass spectrometry (HPLC – MS / ESI). **Journal of Chromatography B**, v. 820, p.33–39, 2005.

KASIM, N. A.; WHITEHOUSE, M.; RAMACHANDRAN, C.; BERMEJO, M.; LENNERNÄS, H.; HUSSAIN, A. J.; JUNGINGER, H. E.; STAVCHANSKY, S. A.; MIDHA, K. K.; SHAH, V. P.; AMIDON, G. L. Molecular properties of WHO essential drugs and provisional biopharmaceutical classification. **Molecular Pharmaceutics**, v. 1, n. 1, p. 85–96, 2003.

KENNEDY, J. H. Comparison of chiral separations on polysaccharide chiral stationary phases to an improved Pirkle phase. **Journal of Chromatography A**, v. 725, p. 219–224, 1996.

KHAN, K. A. The concept of dissolution efficiency. **Journal Pharmaceutical Pharmacology**, v. 28, p. 48–49, 1975.

KOROLKOVAS, A. **Química Farmacêutica**. Rio de Janeiro: Guanabara, 1988.

KORZENIEWSKA – RYBICKA, I.; PLAZNIK, A. Analgesic effect of antidepressants drugs. **Pharmacology Biochemistry and Behaviour**, v. 59, n. 02, p. 331–338, 1998.

KOSEL, M.; EAP, C. B.; AMEY, M.; BAUMANN, P. Analysis of the enantiomers of citalopram and its demethylated metabolites using chiral liquid chromatography. **Journal of Chromatography B**, v. 719, p.234–238, 1998.

KRISTOFFERSEN, L.; BUGGE, A.; LUNDANES, E.; SLORDAL, L. Simultaneous determination of citalopram, fluoxetine, paroxetine and their metabolites in plasma and whole blood by high – performance liquid chromatography with UV and fluorescence detection. **Journal of Chromatography B**, v. 734, p.229–246, 1999.

KWON, J. W.; ARMBRUST, K. L. Degradation of citalopram by simulated sunlight. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 24, n. 7, p. 1618–1623, 2005.

LABAT, L.; DEVEAUX, M.; DALLEY, P.; DUBOST, J. P. Separation of new antidepressants and their metabolites by micellar electrokinetic capillary chromatography. **Journal of Chromatography B**, v. 773, p. 17–23, 2002.

LACERDA, A. L. T. A segunda geração dos inibidores de recaptura da serotonina – uma revisão da farmacologia e da eficácia clínica do escitalopram. **Psiquiatria Biológica**, v. 11, n. 2, p. 63–70, 2003.

LACHMAN, L.; DELUCA, P.; AKERS, M. J. Testes de estabilidade e fundamentos de cinética química. In: LACHMAN, L.; LIEBERMAN, H. A.; KANIG, J.L. **Teoria e Prática na Indústria Farmacêutica**. Lisboa: Calouste Gulbenkian, 2001. v. 2, cap. 26, p. 1277–1355.

LINDENBERG, M.; KOPP, S.; DRESSMAN, J. B. Classification of orally administered drugs on the world health organization model list of essential medicines according to the biopharmaceutics classification system. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 58, p. 265–278, 2004.

MACEK, J.; PTÁČEK, P.; KLIMA, J. Rapid determination of citalopram in human plasma by high – performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography B**, v. 755, p.279–285, 2001.

MANDRIOLI, R.; FANALI, S.; PUCCI, V.; RAGGI, M.A. Enantiomeric separation of citalopram and its metabolites by capillary electrophoresis. **Electrophoresis**, v. 24, n. 15, p. 2608–2616, 2003.

MARCOLONGO, R. **Dissolução de medicamentos: fundamentos, aplicações, aspectos regulatórios e perspectivas na área farmacêutica**. 2003. 117f. Dissertação (Mestrado em Fármacos e Medicamentos) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

MARQUES, M. R. C.; BROWN, W. Desenvolvimento e validação de métodos de dissolução para formas farmacêuticas sólidas. **Revista Analytica**, n. 1, p. 48–51, 2002.

MATSUI, E.; HOSHINO, M.; MATSUI, A; OKAHIRA, A Simultaneous determination of citalopram and its metabolites by high – performance liquid chromatography with column switching and fluorescence detection by direct plasma injection. **Journal of Chromatography B**, v. 668, p.299–307, 1995.

MENDES, G. D.; BORGES, N. C. C.; PEREIRA, A. S.; MENDES, F. D.; BARRIENTOS-ASTIGARRAGA, R. E.; NUCCI, G. A bioequivalence study of citalopram base don quantification by high-performance liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry. **International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics**, v. 43, n. 8, p. 389–398, 2005.

MENDOZA, L.; HAJDÚCH, M.; KEKULOVÁ, H.; SVOBODOVÁ, X.; MIHÁL, V.; SVOBODA, M. Bioequivalence of two brands of citalopram 40 mg tablets after single oral administration to healthy volunteers. **Biomedical Papers**, v. 149, n. 1, p. 169–172, 2005.

MENG, Q. H.; GAUTHIER, D. Simultaneous analysis of citalopram and dimethylcitalopram by liquid chromatography with fluorescence detection after solid – phase extraction. **Clinical Biochemistry**, v. 38, p. 282–285, 2005.

MOFFAT, A. C.; OSSELTON, M. D.; WIDDOP, B. **Clarke's Analysis of Drugs and Poisons in Pharmaceuticals, Body Fluids and Postmortem material**. 3. ed. London: Pharmaceutical Press, v. 2, 2004.

MOLANDER, P.; THOMASSEN, A.; KRISTOFFERSEN, L.; GREIBROKK, T.; LUNDANES, E. Simultaneous determination of citalopram, fluoxetine, paroxetine and their metabolites in plasma by temperature – programmed packed capillary liquid chromatography with on – column focusing of large injections volumes. **Journal of Chromatography B**, v. 766, p.77–87, 2001.

NUDELMAN, N. S. Estabilidad de medicamentos. Buenos Aires: El Ateneu, 1975. 186p.

O'HARA, T.; DUNNE, A.; BUTLER, J.; DEVANE, J. A review of methods used to compare dissolution profile data. **Pharmaceutical Science and Technology Today**, v. 1, n. 5, p. 214–223, 1998.

OHLWEILER, O. A. **Química Analítica Quantitativa**. 3. ed. Rio de Janeiro: Livros Técnicos Científicos, v. 1, 1984.

OLESEN, O, V.; LINNET, K. Simplified high – performance liquid chromatographic method for the determination of citalopram and desmethylcitalopram in serum without

interference from commonly used psychotropic drugs and their metabolites. **Journal of Chromatography B**, v. 675, p.83–88, 1996.

OWENS, M. J.; KNIGHT, D. L.; NEMEROFF, C. B. Second-generation SSRIs: human monoamine transporter binding profile of escitalopram and R-fluoxetine. **Biological Psychiatry**, v. 50, p. 345–350, 2001.

PALLANTI, S.; QUERCIOLI, L.; PAIVA, R. S.; KORAN, L. M. Citalopram for treatment resistant obsessive – compulsive disorder. **European Psychiatry**, v. 14, p. 101–106, 1999.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S. **Introduction to Spectroscopy – a guide for students of organic chemistry**. 2. ed. Philadelphia: Saunders College, 2001. 511p.

PETERSEN, P. V.; EKELUND, J.; OLSEN, L.; OVESEN, S. V. Chiral separations of beta-blocking drug substances using the Pirkle-type alpha-Burke 1 chiral stationary phase. **Journal of Chromatography**, v. 757, p. 65–71, 1997.

PHARMACOPEIAL FORUM. **Pharmacopeial Previews**, v. 30, n. 1, p. 351–363, 2004.

PIRKLE, W. H.; FINN, J. M.; SCHREINER, J. L.; HAMPER, B. C. A widely useful chiral stationary phase for the high performance liquid chromatography separation of enantiomers. **Journal of the American Chemical Society**, v. 103, p. 3964–3966, 1981.

PIRKLE, W. H.; BURKE, J. A. Chiral stationary phase designed for beta-blockers. **Journal of Chromatography**, v.557, p. 173–185, 1991.

PISTOS, C.; PANDERI, I.; POLITOU, J. A. Liquid chromatography – positive ion electrospray mass spectrometry method for the quantification of citalopram in human plasma. **Journal of Chromatography B**, v. 810, p.235–244, 2004.

PUCCI, V.; FANALI, S.; SABBIONI, C.; RAGGI, M. A. Separation of five recently commercialised selective serotonin reuptake inhibitor antidepressants by capillary electrophoresis. **Journal of Separation Science**, v. 25, n. 15 – 17, p. 1096–1100, 2002.

RAFFAELE, R.; VECCHIO, I.; GIAMMONA, G.; POLIZZI, A.; RUGGIERI, M.; MALAGUARNERA, M.; RAMPELLO, L.; NICOLETTI, F. Citalopram in the treatment of depression in the elderly. **Archives of gerontology and geriatrics**, v. 08, p. 303–308, 2002.

RAO, R. N.; RAJU, A. N.; NAGARAJU, D. Development and validation of a liquid chromatographic method for determination of enantiomeric purity of citalopram in bulk drugs and pharmaceuticals, **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 41, n. 1, p. 280–285, 2006.

RAZA, A. Development and application of spectrophotometric methods for the determination of citalopram hydrobromide in dosage forms. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 54, n. 4, p. 432–434, 2006.

RHODES, C. T. Introductory overview. In: CARSTENSEN, J. T.; RHODES, C. T. **Drug Stability: Principles and Practice**. New York: Marcel Dekker, 2000. cap. 1, p. 1-18.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; COSTA MELO, L. F. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771–780, 2004.

SÁNCHEZ, C.; BRENNUM, L. T. The S-enantiomer of citalopram (Lu 26 – 054) is a highly selective and potent serotonin reuptake inhibitor. **Biological Psychiatry**, v. 47, p. 88S, 2000.

SÁNCHEZ, C.; KREILGAARD, M. R – citalopram inhibits functional and 5-HT-evoked behavioral responses to the SSRI, escitalopram. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 77, p. 391–398, 2004.

SANTORO, M. I. R. M. **Introdução ao Controle de Qualidade de Medicamentos**. São Paulo: Atheneu, 1988. p. 27-39.

SANTORO, M. I. R. M.; SINGH, A. K. Development and regulation of chiral drug substances: an overview on worldwide pharmaceutical guidelines. **Revista de Farmácia e Bioquímica da Universidade de São Paulo**, v. 37, n. 3, p. 259–268, 2001.

SANZ, E. J.; CUEVAS, C.; KIURU, A.; BATE, A.; EDWARDS, R. Selective serotonin reuptake inhibitors in pregnant women and neonatal withdrawal syndrome: a database analysis. **Lancet**, v. 365, p. 482–487, 2005.

SCHURIG, V. Separation of enantiomers by gas chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 906, p. 275–299, 2001.

SHAH, V. P. Dissolution: a quality control test vs. a bioequivalence test. **Dissolution Technologies**, p. 1–2, [november] 2001.

SILVA, P. **Farmacologia**. 4. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1985.

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

SKIBINSKI, R.; MISZTAL, G. Normal phase (NP) and reversed phase (RP) high performance liquid chromatography analysis of new generation antidepressant drugs. **Chemia-Analityczna (Warsaw)**, v. 47, n. 04, p.531–538, 2002.

SKIBINSKI, R.; MISZTAL, G. Determination of citalopram in tablets by capillary zone electrophoresis and by direct and derivative UV spectrophotometry. **Acta Poloniae Pharmaceutica**, v. 62, n. 5, p. 331–334, 2005.

SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J. **Analytical Chemistry an Introduction**. 6. ed. Philadelphia: Saunders College Publishing, 1994.

SKOOG, J. W.; HALSTEAD, G. W.; THEIS, D. L.; FREEMAN, J. E.; FAGAM, D. T.; ROHRS, B. R. Roteiro para desenvolvimento e validação do teste de dissolução em



formas farmacêuticas sólidas para uso oral. **Pharmaceutical Technology**, v. 1, p. 34–43, 1997.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; GLAJCH, J. L. **Practical HPLC Method Development**, 2 ed. New York: John Wiley & Sons, 1997.

STORPIRTIS, S.; MARCOLONGO, R.; GASPAROTTO, F. S.; VILANOVA, C. M. A equivalência farmacêutica no contexto da intercambialidade entre medicamentos genéricos e de referência: bases técnicas e científicas. **Infarma**, v. 16, n. 9–12, p. 51-56, 2004.

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

TERFLOTH, G. Enantioseparations in super- and subcritical fluid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 906, p. 301–307, 2001.

**THE MERCK Index**. An Encycyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals. 13. ed. Whitehouse Station, Merck, 2001.

**THE UNITED STATES Pharmacopeia**. 29. ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2006.

THOMPSON, R. A practical guide to HPLC enantioseparations for pharmaceutical compounds. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 28, p. 1215–1231, 2005.

TRACHTA, G.; SCHWARZE, B.; SAGMULLER, B.; BREHM, G.; SCHENEIDER, S. Combination of high – performance liquid chromatography and SERS detection applied to the analysis of drugs in human blood and urine. **Journal of Molecular Structure**, v. 693, p. 175–185, 2004.

TOURNEL, G.; HOUDRET, N.; HÉDOUIN, V.; DEVEAUX, M.; GOSSET, D.; LHERMITTE, M. High – performance liquid chromatography method to screen and quantitate seven selective reuptake inhibitors in human serum. **Journal of Chromatography B**, v. 761, p.147–158, 2001.

VARIA, I. M.; CLOUTIER, C. A.; DORAISWAMY, P. M.; Treatment of social anxiety disorder with citalopram. **Progress in Neuro – Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 26, p. 205–208, 2002.

VASWANI, M.; LINDA, F. K.; RAMESH, S. Role of serotonin reuptake inhibitors in psychiatric disorders: a comprehensive review. **Progress in Neuro – Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 27, p. 85–102, 2003.

VETULANI, J.; NALEPA, I. Antidepressants: past, present and future. **European Journal of Pharmacology**, v. 405, p. 351–363, 2000.

WALLACE, L. J. Psychopharmacologic Agentes. in: GENNARO, A. R.(Ed). **Remington: The Science and Practice of Pharmacy**. 20. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. p. 1429-1443.

WATSON, D. G. **Pharmaceutical Analysis. A textbook for Pharmacy Students and Pharmaceutical Chemists.** London: Churchill Livingstone, 1999. 316p.

WELCH, C. J.; SZCZERBA, T.; PERRIN, S. R. Some recent high-performance liquid chromatography separations of the enantiomers of pharmaceuticals and other compounds using the Whelk-O 1chiral stationary phase. **Journal of Chromatography A**, v. 758, p. 93–98, 1997.

WILSON, S. J.; BAILEY, J. E.; RICH, A. S.; ADROVER, M.; POTOKAR, J.; NUTT, D. J. Using sleep to evaluate comparative serotonergic effects of paroxetine and citalopram. **European Neuropsychopharmacology**, v. 14, p. 367–372, 2004.