

# VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA DA FLUOXETINA CLORIDRATO

Joel Rocha da Silva – Faculdade Anhanguera de Anápolis  
Daiana da Silva Vargem – Faculdade Anhanguera de Anápolis  
Erick de Oliveira Lemes – Faculdade Anhanguera de Anápolis  
Angélica de Freitas Moura – Faculdade Anhanguera de Anápolis

**RESUMO:** De modo geral um método analítico deve, idealmente, ser exato para fornecer valor real, ser preciso para fornecer, com menor número de ensaios, este valor real, ser seletivo para que a exatidão não se desvie com interferentes potências, ser sensível ou capaz de determinar as menores concentrações possíveis e responder de forma proporcional linear. A validação tem por intuito assegurar o método analítico que será utilizado posteriormente para quantificação de determinado princípio ativo. Como princípio ativo de referência, será utilizada a Fluoxetina Cloridrato é o antidepressivo mais utilizado no mundo, comercialmente conhecido como Prozac. Assim, este estudo tem o objetivo de validar uma metodologia para quantificar este composto tendo como ferramenta a espectrofotometria baseada na interação entre energia eletromagnética e matéria.

**ABSTRACT:** In general an analytical method should ideally be accurate to provide real value, may need to provide, with smaller number of trials, its real value, be selective so that the accuracy does not vary with potential interfering, or able to be sensitive determine the lowest concentrations possible and respond linearly proportional. The validation is meant to ensure that the analytical method to be used later for quantification of specific active ingredient. As active principle of reference, will be used to Fluoxetine hydrochloride is the most widely used anti-depressant in the world, commercially known as Prozac. Thus, this study aims to validate a methodology to quantify this compound as a tool with spectrophotometry based on the interaction between electromagnetic energy and matter.

**PALAVRAS-CHAVE:**  
Fluoxetina Cloridrato, Prozac;  
espectrofotometria; energia  
eletromagnética.

**KEYWORDS:**  
Fluoxetine Hydrochloride, Prozac;  
spectrophotometry; electromagnetic  
energy.

*Informe Técnico*  
Recebido em: 10/03/2014  
Avaliado em: 27/03/2014  
Publicado em: 28/11/2014

*Publicação*  
Anhanguera Educacional Ltda.

*Coordenação*  
Instituto de Pesquisas Aplicadas e  
Desenvolvimento Educacional - IPADE

*Correspondência*  
Sistema Anhanguera de  
Revistas Eletrônicas - SARE  
rc.ipade@anhanguera.com

## 1. INTRODUÇÃO

A Metodologia de validação analítica tem um papel fundamental na garantia da qualidade e na confiabilidade dos produtos elaborados em muitas indústrias. Portanto, é plenamente justificável que os métodos analíticos empregados devam ser confiável, exato, preciso e adequado ao uso (VOGEL, 2002).

A busca da qualidade total requer um domínio amplo de cada fase do processo produtivo. Neste caso, a validação é a ferramenta adequada para garantir a confiabilidade de instalação deste processo, bem como de componentes-chaves que incluem qualificação de equipamentos, instalação, fornecedores e a validação de metodologias analíticas (GIL, 2010).

Validar significa provar e documentar resultados que indiquem que o método é seguro dentro dos limites estabelecidos, e que com sua aplicação se conseguem os resultados desejados. A validação da metodologia analítica constitui-se na atividade essencial e inicial de um programa de garantia de qualidade bem estruturado (GIL, 2010).

Os mesmos autores relatam que o controle de qualidade de medicamentos destaca-se pelo número e diversidades de técnicas analíticas. Este número cresce com o desenvolvimento de novos produtos para os quais frequentemente são necessários o uso de técnicas distintas. A escolha de uma metodologia analítica adequada é de fundamental importância para o procedimento de controle de qualidade.

Quando se trata da produção de medicamentos, por exemplo, qualquer falha mínima no processo pode acarretar sérios prejuízos à saúde dos consumidores e ao nome da indústria no mercado. Nos últimos anos, muito se tem falado sobre validação, certificação e qualificação de instalação, equipamento, processo e metodologia analítica, porém a falta de uma padronização de linguagem do setor cria uma barreira para o entendimento total dos termos (PAULA, 2004).

A aplicabilidade dos métodos oficiais na análise de medicamentos nem sempre é possível de ser realizada, considerando a grande diversificação de formulações farmacêuticas, bem como de produtos novos e possíveis impurezas (VALENTINI, 2007).

A validação deve garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados. Para tanto, deve apresentar especificidade, linearidade, intervalo, precisão, sensibilidade, limite de quantificação e exatidão adequadas à análise (RE nº 899, 2003). Como ferramentas de validação são utilizados métodos como a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e a cromatografia gasosa (CG) e outros métodos não-cromatográficos como titulometria e espectrofotometria UV-VIS, desde que estes ofereçam uma seletividade aceitável (DEGANI, 1998).

O presente trabalho apresenta um método de validação para Fluoxetina Cloridrato, um antidepressivo inibidor seletivo da recaptação de serotonina, que será utilizado os seguintes parâmetros de validação:

**Especificidade:** é definida como a capacidade de medir com exatidão, unicamente, o componente ativo, em presença de impurezas, excipientes, e produtos de degradação.

**Seletividade:** possibilidade de se detectar qualitativamente uma substância em presença de outra, de uma mesma amostra;

**Faixa (Range):** é o intervalo entre o maior e o menor nível do analito em que a exatidão, precisão e linearidade dos resultados obtidos com o método em estudo tenham sido demonstradas.

**Linearidade:** capacidade do método em gerar resposta diretamente proporcional à concentração do analito na amostra, dentro de uma faixa determinada pelo intervalo da curva de calibração.

**Limite de Detecção (LD):** menor quantidade de analito que pode ser detectada na amostra, mas não necessariamente quantificada.

**Exatidão:** grau de concordância ou compatibilidade entre o valor de referência aceito ou verdadeiro.

**Precisão:** é o grau de concordância ou de dispersão entre uma série de medidas, obtidas de múltiplas alíquotas de uma mesma amostra homogênea, sob determinadas condições. Pode ser considerada em três aspectos: Repetibilidade, Precisão Intermediária e Reprodutibilidade.

**Repetibilidade:** máxima diferença aceitável entre resultados de medidas independentes, obtidos por diferentes preparações de uma amostra homogênea, pelo mesmo método de ensaio, mesmo analista, mesmo equipamento, mesmo local e condições de uso, em um curto intervalo de tempo.

**Precisão Intermediária:** expressa as variações obtidas de uma mesma amostra homogênea sob condições diferentes em um mesmo laboratório.

**Robustez:** é a capacidade de medir a resistência do método quando este sofre pequenas e deliberadas variações nos parâmetros analíticos, tais como: variações na composição da fase móvel, diferentes lotes ou fabricantes de colunas, temperatura, fluxo da fase móvel, equipamentos diferentes, tais fatores utilizados em cromatografia líquida de alta eficiência. Parâmetros relacionados à espectrofotometria são: variação do pH da solução, temperatura, diferentes fabricantes de solventes e variação do comprimento de onda (BEZERRA, 2011).

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

A validação de método foi realizada no Laboratório de Controle de Qualidade Gênix Indústria Farmacêutica Ltda. Anápolis – GO. O método desenvolvido não foi baseado em métodos farmacopéicos que já são utilizados.

### **Equipamentos:**

Balança Analítica; Banho de Ultra-som; Espectrofotômetro Ultravioleta; Banho-maria; Geladeira, Cubeta de Quartzo.

### **Reagentes:**

Álcool Etílico; Ácido Clorídrico; Peróxido de Hidrogênio. Hidróxido de sódio;

### **Vidrarias:**

Balão volumétrico 100mL; Balão volumétrico 50mL; Balão volumétrico 250mL; Bureta de 25mL.

### **Padrão Primário**

Fluoxetina Cloridrato, lote GOF085, fornecedor: USP. (Teor: 99,99%)

### **Amostra**

Fluoxetina Cloridrato lote: 0040109, fabricante: Divis Pharmaceuticals (Água: 0,06%).

### **Doseamento:**

**Deteção:** UV/VIS 276 nm

**Diluyente:** álcool etílico

### **Preparo da solução padrão:**

Para análise foi preparada uma solução padrão 100 mL contendo 20 mg do padrão de Fluoxetina Cloridrato, lote GOF085 fornecedor :USP ,teor :99.99%,. O solvente utilizado foi etanol, com solubilização no ultrassom.

### **Preparo da amostra:**

Para análise da amostra foi preparada uma solução 100mL contendo 20 mg da amostra de Fluoxetina Cloridrato lote 0040109, fabricante: Divis Pharmaceuticals (Água:0,06%). O solvente utilizado foi etanol, com solubilização no ultrassom.

Para a análise de Doseamento de Fluoxetina Cloridrato na concentração de 0,2mg/mL, utilizou-se como base a metodologia desenvolvida no laboratório local a fim de garantir a confiabilidade de resultados para a leitura em sua respectiva concentração. Considerando que a metodologia proposta foi utilizada em Doseamento, tomou-se necessário comprovar a validade desse método, sendo a concentração de trabalho adotada de 0,2mg/mL, seguindo assim todos os parâmetros da validação.

### 3. RESULTADOS

Foram realizados os testes de Especificidade/Seletividade, Linearidade, Precisão, Exatidão, Robustez, Estabilidade da solução, Degradação Forçada, Limite de Detecção e Limite de Quantificação buscando assim comprovar a Validação de Fluoxetina Cloridrato. A validação desta metodologia foi realizada com a utilização de padrão Primário de Fluoxetina Cloridrato lote: GOF085. Resultados na tabela 1.

Tabela 1. Resultados dos testes de validação da amostra Primário de Fluoxetina Cloridrato

Características de Desempenho	Características Requeridas	Critério de Aceitação
Especificidade/Seletividade	Sim	Sem Interferentes
Linearidade	Sim	$R > 0,99$
Faixa (Linearidade)	Sim	80% a 120%
Precisão (Repetibilidade)	Sim	Máximo 5,0%
Exatidão	Sim	98,0% a 102,0%
Limite de Detecção	Sim	Informativo
Limite de Quantificação	Sim	Informativo
Robustez	Sim	98,0% a 102,0%
Estabilidade da solução	Sim	98,0% a 102,0%

Os espectros do padrão e da amostra apresentaram máximo de absorção no comprimento de onda em torno de 216nm, conforme demonstra a varredura espectrofotométrica na região do UV (400-200 nm).

### 4. DISCUSSÃO

#### **Especificidade/Seletividade:**

Foi adotado como comprimento de onda do método o valor de 276nm, o mesmo proposto pela dissertação. Avaliando os espectros obtidos com o diluente pôde-se observar que neste comprimento de onda (276nm), não há absorção de nenhum interferente. O método apresentou especificidade e seletividade de 100,0% para o princípio ativo Fluoxetina Cloridrato, uma vez que não foi observada nenhuma interferência do diluente nessas condições propostas pelo método.

**Faixa (Range)/ Linearidade:**

Crítérios de Aceitação: coeficiente de correlação -  $R > 0,99$ ; na faixa de 80% a 120%:

A concentração teórica que corresponde a 100,0% da concentração de trabalho do método de doseamento é de 0,2mg/mL. O cálculo de regressão linear pelo métodos mínimos quadradas demonstrou que o método utilizado apresentou-se linear de 0,16mg/mL a 0,24mg/mL com coeficiente de correlação de 0,9982.

**Limite de Detecção (LD):**

O método apresentou limite de detecção calculado de 0,0316491mg/mL que equivale a 31,6491 ppm, com base no menor nível da curva de calibração: 0,16mg/mL ou solução 80%. O limite de detecção foi estabelecido por meio da análise das soluções contendo concentrações decrescentes de Fluoxetina Cloridrato. A solução amostra a 5,0 % da concentração de trabalho, ou seja, 0,01mg/mL ou 10ppm foi o menor nível detectável.

**Limite de Quantificação (Informativo):**

O limite de quantificação é um parâmetro determinado, principalmente, para ensaios quantitativos de impurezas e produtos de degradação em fármacos e é expresso com a concentração do analito na amostra. O método apresentou limite de quantificação calculado de 0,1054972 mg/mL que equivale a 105,5 ppm, com base no menor nível da curva de calibração: 0,16mg/mL ou solução 80%.

**Exatidão:**

O método apresentou-se exato para as condições propostas, tendo como grau de recuperação (Quantidade de matéria-prima recuperada) 99,44%, 99,11% e 100,00% para as concentrações de 0,16mg/mL (80%), 0,2mg/mL (100%) e 0,24mg/mL (120%), respectivamente.

**Precisão/Repetibilidade:(Critério de Aceitação: DPR = máximo 5,0%)**

O resultado do ensaio de repetibilidade foi expresso como desvio padrão relativo (DPR).

O método apresentou precisão em relação à concentração de trabalho de um mesmo dia (precisão intra-dia). O desvio padrão relativo no primeiro dia foi de 0,308%, 0,210% e 1,040% para as nove amostras preparadas a 80% (0,16mg/mL), 100% (0,2mg/mL), e 120% (0,24mg/mL) uma vez que o DPR máximo permitido pela legislação é de 5% (RDE nº 899 de 29 de maio de 2003).

**Robustez:**

A primeira parte da robustez foi testada a capacidade do método suportar pequenas variações no comprimento de onda, no qual são realizadas as leituras espectrofotométricas das amostras. Inicialmente foi alterado o comprimento de onda das leituras para 273 nm, sendo que o comprimento de onda utilizado nas demais etapas de validação foi de 276nm, e a média resultados obtidos nas três leituras espectrofotométricas foi de 100,55%,

com desvio padrão relativo cerca de 0,7%. Em seguida foi realizada a leitura das amostras no comprimento de 279 nm e a média das leituras foi de 98,30% e desvio padrão relativo cerca de 0,114 %. Em todas as variações realizadas no comprimento de onda de leitura das amostras observou-se que a média das leituras e o desvio padrão foram bem semelhantes aos resultados obtidos com o método original, sendo assim pode-se concluir que o método suporta essas pequenas variações sem grandes interferências nos resultado.

#### **Estabilidade:**

Para a realização do estudo de estabilidade devem ser observados os parâmetros de exatidão, precisão, linearidade, limite de detecção limite de quantificação, especificidade, limite de variação e robustez, previamente validadas. As determinações de estabilidade devem utilizar um conjunto de amostras, preparadas a partir de uma solução estoque recente do fármaco em análise, adicionado à matriz isenta de interferência. O ensaio de estabilidade da solução foi realizado com a finalidade de demonstrar quais condições de armazenamento, a amostra mantém inalteradas suas características químicas, após um intervalo determinado de tempo. Onde se utilizou as amostras armazenadas sob proteção de luz, exposta a luz e sob refrigeração.

---

## **5. CONCLUSÃO**

Diante dos resultados obtidos, conclui-se que o método demonstrou-se apropriado para a finalidade pretendida, pois pode ser considerado específico, seletivo, linear, preciso, exato, sensível e robusto. O método encontra-se validado, cumprindo todos os parâmetros de validação determinados no protocolo de validação. Dentro do intervalo estudado, a metodologia demonstrou ser adequada para análise de doseamento do insumo farmacêutico Fluoxetina Cloridrato, na concentração de 0,2mg/mL, no Laboratório de Controle de Qualidade Genix Indústria Farmacêutica Ltda.

---

## **REFERÊNCIAS**

BEZERRA, P.G.; CELINO, J.J.; GARCIA, K.S.; ROCHA, S.A.N. Validação de método cromatográfico acoplado ao purge and trap para análises ambientais. Caderno de geociências, v.8, n.1, maio 2011. Disponível em: <<http://www.portalseer.ufba.br/index.php/cadgeoc/article/viewFile/4969/3742>>. Acesso em 06 mar. 2014.

DEGANI, A. L. G.; CASS, Q. B.; VIEIRA, P. C. Cromatografia: um breve ensaio. Atualidades em Química. Química nova na escola, n.7, maio 1998. Disponível em : <<http://pt.scribd.com/doc/58576307/Cromatografia-Um-Breve-Ensaio>>. Acesso em 06 mar. 2014.

GIL, E. S.; Controle Físico-Químico de Qualidade de Medicamentos, 3ª ed., LMC-Pharmabooks Ed.: São Paulo, 2010.

PAULA, I.C. Proposta de um método em execução do processo de desenvolvimento de produtos farmacêuticos. Universidade Federal do Rio Grande do Sul- UFRGS, 2004. 314p. Disponível em: <[http://www.producao.ufrgs.br/arquivos/disciplinas/398\\_tese\\_istefani.pdf](http://www.producao.ufrgs.br/arquivos/disciplinas/398_tese_istefani.pdf)>. Acesso em 06 mar. 2014.



Resolucion, n. 899, of may 29, 2003. Disponível em: <[http://www.silvademoraes.com.br/site\\_ingles/jurisprudence/899.pdf](http://www.silvademoraes.com.br/site_ingles/jurisprudence/899.pdf)>. Acesso em 06 mar. 2014.

VALENTINI, S.R.; SOMMER, W.A.; MATIOLI, G. Validação de métodos analíticos. Maringá-PR Arq. Mudi, p. 26-31, 2007. Disponível em: <[http://www.mudi.uem.br/arqmudi/volume\\_11/numero\\_02/VALIDACAO-DE-METODOS.pdf](http://www.mudi.uem.br/arqmudi/volume_11/numero_02/VALIDACAO-DE-METODOS.pdf)>. Acesso em 06 mar. 2014.

VOGEL, ARTHUR. Análise química quantitativa. 6ª ed. Rio de Janeiro: LTC- Livros Técnicos e Científicos Editora S.A, 2002. 462p.