

Universidade Federal de Alfenas  
Instituto de Química  
Programa de Pós-Graduação em Química – PPGQ

ANA FLÁVIA DE OLIVEIRA E SILVA

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO INDICATIVO DE  
ESTABILIDADE POR LC-UV-CAD PARA ANÁLISE DE CLORIDRATO DE  
TRAZODONA**

Alfenas/MG  
2019

ANA FLÁVIA DE OLIVEIRA E SILVA

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO INDICATIVO DE  
ESTABILIDADE POR LC-UV-CAD PARA ANÁLISE DE CLORIDRATO DE  
TRAZODONA**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre pelo Programa de Pós Graduação em Química (PPGQ) da Universidade Federal de Alfenas.  
Área de concentração: Química Analítica  
Orientador: Prof. Dr. Marcello Garcia Trevisan

Alfenas/MG  
2019

Dedico esse trabalho a Deus, minha família e amigos que estiveram comigo durante toda essa caminhada.

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente a Deus pela realização de mais uma etapa importante da minha vida, sem ele nada seria possível.

Aos meus pais, Martha e Giovani, pelo amor, dedicação e apoio incondicional. Por acreditarem e confiarem em mim e não medirem esforços para que tudo fosse possível.

As minhas irmãs, Marina e Giovanna, que estiveram comigo durante toda caminhada, me dando forças, carinho, alegrias e incentivo.

A toda minha família e amigos pelo carinho e por estarem sempre comigo. Em especial ao meu amigo João Paulo, pelo apoio, incentivo e palavras de conforto em momentos difíceis durante o mestrado.

Aos amigos do Laboratório de Análise e Caracterização de Fármacos e Formulações (LACFar), pelo convívio, apoio e pela amizade.

Ao meu orientador Prof. Dr. Marcello Garcia Trevisan pelas oportunidades, aprendizado e apoio.

A UNIFAL (Universidade Federal de Alfenas) pela oportunidade.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior- Brasil (CAPES)- Código de financiamento 001.

A todos que direta ou indiretamente colaboraram para a realização deste trabalho.

## RESUMO

A depressão é definida pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como um transtorno mental e pode se manifestar de diferentes formas de acordo com cada indivíduo, o tratamento é realizado com antidepressivos. Dentre os antidepressivos utilizados destaca-se o Cloridrato de Trazodona. A Trazodona está descrita na farmacopéia americana e britânica, porém os métodos disponíveis na farmacopéia preconizam principalmente a detecção UV para quantificação do fármaco, não sendo capazes de quantificar a formação de possíveis produtos de degradação ou impurezas, tais como compostos com baixa absorvidade molar, que não apresentam grupos cromóforos em suas estruturas químicas e nem possuem padrões certificados disponíveis. Dessa forma, faz-se importante o desenvolvimento e a validação de metodologia analítica indicativa de estabilidade por cromatografia líquida acoplada ao detector UV e também ao detector Corona<sup>®</sup> CAD<sup>®</sup> (LC-CAD). Durante o desenvolvimento do método as condições cromatográficas foram otimizadas e definidas com uso da coluna C18 (100 mm x 2,1 x 2,2  $\mu\text{m}$ ); fase móvel composta de acetato de amônio 20 mM + 0,1% de trietilamina; pH 6,0 e metanol (40:60); fluxo 0,3 mL min<sup>-1</sup>; comprimento de onda de 255 nm e temperatura da coluna de 35°C. O método analítico proposto foi validado conforme a Resolução 166/2017 da ANVISA. O presente trabalho avaliou a estabilidade intrínseca do fármaco através dos estudos de degradação forçada. A trazodona apresentou degradação quando submetida à hidrólise básica e solução oxidativa e se manteve estável às condições de calor, umidade, luz e hidrólise ácida. Os produtos encontrados foram identificados por LC-MS e tiveram suas estruturas químicas determinadas. O método apresentou faixa linear de 10 a 250  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; LD (limite de detecção) = 2  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e LQ (limite de quantificação) = 6  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para o detector UV; LD = 0,3  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e LQ = 0,9  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para o detector CAD. A precisão foi avaliada em três níveis de concentração (10, 100 e 250  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) e expressa em termos de repetitividade e precisão intermediária. Os valores encontrados para ambos detectores do coeficiente de variação (C.V.) variaram de 0,18 a 0,95 %. A exatidão foi avaliada pelos ensaios de recuperação do analito e os valores obtidos variaram de 97 a 101%. O método foi considerado robusto pelo teste de Youden para os detectores UV e CAD e os parâmetros analisados não apresentaram influência significativa no método desenvolvido.

**Palavras chave:** cloridrato de trazodona, método indicativo de estabilidade, produtos de degradação, validação, Corona<sup>®</sup> CAD<sup>®</sup>.

## ABSTRACT

Depression is defined by the World Health Organization (WHO) as a mental disorder and can manifest in different ways according to each individual, treatment is performed with antidepressants. Among the antidepressants used, there is Trazodone Hydrochloride. Trazodone is described in the American and British Pharmacopoeia, but the methods available in pharmacopoeia used UV detection for drug quantification and are not capable of quantifying the formation of possible degradation products or impurities, such as compounds with low molar absorptivity, which do not present chromophore groups in their chemical structures and do not have certified standards available. Thus, the development and validation of analytical methodology indicative of stability by liquid chromatography coupled to the UV detector and also to the Corona® CAD® detector (LC-CAD) is important. During the development of the method the chromatographic conditions were optimized and defined using the C18 column (100 mm x 2.1 x 2.2  $\mu\text{m}$ ); mobile phase composed of 20 mM ammonium acetate + 0.1% triethylamine; pH 6.0 and methanol (40:60); flow 0.3 mL  $\text{min}^{-1}$ ; wavelength of 255 nm and column temperature of 35°C. The proposed analytical method was validated according to ANVISA Resolution 166/2017. The present work evaluated the intrinsic stability of the drug through the studies of forced degradation. Trazodone presented degradation when submitted to basic hydrolysis and oxidative solution and remained stable in conditions of heat, humidity, light and acid hydrolysis. The products found were identified by LC-MS and had their chemical structures determined. The method presented a linear range of 10 to 250  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; LD (detection limit) = 2  $\mu\text{g mL}^{-1}$  and LQ (quantification limit) = 6  $\mu\text{g mL}^{-1}$  for the UV detector; LD = 0.3  $\mu\text{g mL}^{-1}$  and LQ = 0.9  $\mu\text{g mL}^{-1}$  for the CAD detector. Precision was evaluated at three concentration levels (10, 100 and 250  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) and expressed in terms of repeatability and intermediate precision. The values found for both detectors of coefficient of variation (C.V.) ranged from 0.18 to 0.95%. Accuracy was assessed by analyte recovery assays and values ranged from 97 to 101%. The method was considered robust by the Youden test for the UV and CAD detectors and the analyzed parameters did not present significant influence in the developed method.

**Keywords:** trazodone hydrochloride, method of stability, degradation products, validation, Corona® CAD®.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Estrutura química do cloridrato de trazodona-----	13
Figura 2- Produtos de degradação identificados para a trazodona: A e B) em meio ácido, C) em meio oxidativo e D) exposto a luz-----	16
Figura 3-Esquema de funcionamento do DAD -----	26
Figura 4- Esquema de funcionamento do detector CAD -----	29
Figura 5- Cromatogramas da Trazodona ( $10 \text{ ug mL}^{-1}$ ) utilizando fase móvel acetato de amônio 10 mM; pH 6,0 : metanol (40:60 v/v), coluna C18, volume de injeção 5 $\mu\text{L}$ , fluxo de $0,3 \text{ mL min}^{-1}$ e detecção no UV a : a) 250 nm b) 255 nm -----	42
Figura 6- Cromatograma da Trazodona ( $10 \text{ ug mL}^{-1}$ ) utilizando fase móvel acetato de amônio 20 mM; pH 6,0 : metanol (40:60 v/v), coluna C18, volume de injeção 5 $\mu\text{L}$ , fluxo de $0,3 \text{ mL min}^{-1}$ e detecção no UV á 255 nm -----	44
Figura 7- Cromatogramas da Trazodona ( $100 \text{ ug mL}^{-1}$ ) utilizando fase móvel acetato de amônio 20 mM+ 0,1% de trietilamina; pH 6,0 : metanol (40:60 v/v), coluna C18, volume de injeção 5 $\mu\text{L}$ , fluxo de $0,3 \text{ mL min}^{-1}$ e detecção: a) UV á 255 nm b) CAD -----	45
Figura 8- Cromatogramas dos perfis de degradação da trazodona ( $100 \text{ ug mL}^{-1}$ ) exposto à solução oxidativa nos detectores: a) UV b) CAD -----	48
Figura 9-Cromatograma do perfil de degradação da trazodona ( $100 \text{ ug mL}^{-1}$ ) exposto à condição básica no detector CAD -----	48
Figura 10- Cromatogramas dos perfis de degradação da trazodona ( $100 \text{ ug mL}^{-1}$ ) exposto à condição básica e solução oxidativa nos detectores: a) UV e b) CAD -----	49
Figura 11-Curva analítica para trazodona ( $100 \text{ ug mL}^{-1}$ ) no detector: a) UV b) CAD -----	52
Figura 12- Gráfico dos resíduos padronizados versus níveis de concentração da trazodona para avaliação do modelo de regressão nos detectores: a) UV b) CAD -----	53
Figura 13- Espectro de massas obtido para a trazodona -----	59
Figura 14-Perfil de fragmentação da trazodona a partir dos estudos de MS/MS -----	59
Figura 15-Espectro de massas obtido para o produto de degradação formado a partir da hidrólise básica -----	60
Figura 16- Espectro de massas obtido para o produto de degradação formado em meio oxidativo -----	60

Figura 17- Mecanismo proposto para o produto obtido pela degradação em  
meio básico -----65

Figura 18- Mecanismo proposto para o produto obtido pela degradação em  
meio oxidativo -----65



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Condições de degradação utilizadas na avaliação da estabilidade intrínseca da trazodona-----	37
Tabela 2-Parâmetros, condições e combinação experimental utilizadas na robustez-----	42
Tabela 3- Parâmetros cromatográficos da trazodona (10 ug mL <sup>-1</sup> ) -----	45
Tabela 4- Parâmetros cromatográficos da trazodona (100 ug mL <sup>-1</sup> ) após otimização do método-----	47
Tabela 5- Estudo de degradação forçada da trazodona (100 ug mL <sup>-1</sup> ) no estado sólido nos detectores UV e CAD -----	48
Tabela 6- Estudo de degradação forçada da trazodona (100 ug mL <sup>-1</sup> ) em solução nos detectores UV e CAD -----	49
Tabela 7- Estudo de degradação forçada da trazodona (100 ug mL <sup>-1</sup> ) em solução nos detectores UV e CAD, após aumento das condições de degradação -----	49
Tabela 8- Resultado do cálculo do balanço de massas do estudo de degradação forçada nos detectores UV e CAD -----	52
Tabela 9- Resultado do cálculo do balanço de massas para análise simultânea dos PDs do estudo de degradação forçada nos detectores UV e CAD -----	52
Tabela 10- Resultados da precisão – repetibilidade nos detectores UV e CAD (n=3/ concentração) -----	55
Tabela 11- Resultados da precisão intermediária nos detectores UV e CAD (n=6/ concentração) -----	56

Tabela 12- Resultados do teste de exatidão para os detectores UV e CAD (n=6) -----57

Tabela 13- Resultados do teste de Youden para análise da robustez nos detectores UV e  
CAD -----58

Tabela 14- Resultado do efeito de todos os parâmetros na robustez para detector UV  
e CAD -----60

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADTs - Antidepressivos

ANVISA- Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CAD- Detector de Aerossol Carregado (do inglês: Charged Aerosol Detection)

CLAE- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CMD- Concentração média determinada

CME- Concentração média experimental

CT- Concentração total

CV- Coeficiente de variação

DP- Desvio padrão

FDA- *Food and Drug Administration*

FE- Fase estacionária

IC- Inclinação da curva

ICH- *International Conference on Harmonisation*

k' - Fator de retenção

LC- Cromatografia líquida (do inglês: *Liquid Chromatography*)

LD- Limite de detecção

LQ- Limite de quantificação

mCPP- Meta-clorofenil-piperazina

MMQO- Método dos mínimos quadrados ordinários

MRM- Monitoramento de reações múltiplas

MS- Espectrômetro de massas

MS/MS- Espectrometria de massas seqüencial

*m/z*- Relação massa carga

N- Número de pratos teóricos

NA- Noradrenalina

NT- Neurotransmissores

PD- Produto de degradação

RDC- Resolução da diretoria colegiada

RMN- Ressonância magnética nuclear

5-HT- Serotonina

UHPLC- Cromatografia líquida de ultra performance (do inglês: *Ultra and High Performance Liquid Chromatography*)

USP- *United States Pharmacopeia*

UV- Ultravioleta

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	15
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	17
2.1 Depressão .....	17
2.2 Cloridrato de trazodona .....	18
2.3 Produtos de degradação .....	22
2.4 Estudos de degradação forçada .....	23
2.4.1 Hidrólise .....	24
2.4.2 Oxidação .....	24
2.4.3 Fotólise .....	25
2.4.4 Termólise .....	25
2.4.5 Umidade .....	26
2.5 Desenvolvimento e validação de métodos analíticos .....	26
2.6 Cromatografia líquida de alta eficiência .....	30
2.6.1 Detector de arranjo de diodos (DAD) .....	32
2.6.2 Detector de aerossol carregado (CAD) .....	33
3. OBJETIVOS .....	36
3.1 Objetivo geral .....	36
3.2 Objetivos específicos .....	36
4. MATERIAIS E MÉTODOS .....	37
4.1 MATERIAIS .....	37
4.1.1 Amostras .....	37
4.1.2 Equipamentos e acessórios .....	37
4.1.3 Reagentes .....	38
4.2 METODOLOGIA .....	38
4.2.1 Desenvolvimento do método cromatográfico .....	38
4.2.2 Validação do método analítico .....	40
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	46
5.1 Desenvolvimento do método cromatográfico .....	46
5.2 Seletividade e estudos de degradação forçada .....	51
5.3 Linearidade .....	56
5.4 Limite de detecção (LD) e quantificação (LQ) .....	58
5.5 Precisão .....	58
5.6 Exatidão .....	59

5.7 Robustez .....	60
6. CONCLUSÃO .....	66
7. REFERÊNCIAS.....	68

## 1. INTRODUÇÃO

A depressão é definida pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como um transtorno mental e pode se manifestar de diferentes formas de acordo com cada indivíduo, os sintomas emocionais podem se mostrar mais evidentes em alguns e os sintomas físicos em outros (CASEY, 2017). A doença constitui um importante problema de saúde devido a sua frequência, a prevalência da doença é estimada entre 10 e 15%, sendo mais de 350 milhões de pessoas afetadas no mundo. Há uma maior incidência nas mulheres do que nos homens e levando em consideração todos os gêneros e idades, estima-se que em 2020 seja a segunda principal causa de incapacidade na taxa de doença global (MOLINA et al., 2012; READ et al., 2017).

O tratamento da depressão é realizado através de psicoterapia, farmacoterapia ou na maioria dos casos na combinação de ambas, com intuito de eliminar ou reduzir os sintomas. Os medicamentos utilizados no tratamento são os antidepressivos (ADTs), dentre os utilizados destaca-se o cloridrato de trazodona, o primeiro derivado da triazolopiridina a ser utilizado clinicamente (SUNNETCIOGLU; YONAR, 2014).

Com base na importância desse medicamento para o tratamento de uma das doenças que mais atinge os indivíduos no mundo, há um aumento das exigências das agências reguladoras quanto aos aspectos científicos e técnicos relacionados, de forma a garantir os parâmetros de segurança, eficácia e qualidade do medicamento. Nesse sentido, torna-se importante o estudo da estabilidade de um fármaco, ou seja, sua capacidade de conservar, ao longo do tempo e sob determinadas condições, as mesmas propriedades e características que possuía quando foi fabricado (SINGH et al., 2012; ABDALLAH; AL-GHOBASHY; LOTFY, 2015).

Esse estudo é recomendado pela *International Conference on Harmonisation* (ICH) e pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). O fármaco é submetido a reações de degradação forçada (também denominada reações de “estresse”) para avaliar a sua estabilidade intrínseca, auxiliando na identificação dos produtos de degradação (PD) que podem ser formados, bem como as condições ambientais que favorecem a formação de tais produtos. Sendo assim, é avaliado o comportamento do fármaco frente a variações bruscas de pH, ambiente oxidativo, presença de radiação

UV, exposição a elevadas temperaturas e umidade, possibilitando o desenvolvimento de métodos indicativos de estabilidade com seletividade adequada e o fornecimento de informações das possíveis rotas de degradação de um determinado produto (SINGH et al., 2013; BLESSY et al., 2014; HENRIQUES et al., 2017).

Para obtenção de resultados confiáveis e que atendam a legislação, é importante a escolha de métodos analíticos adequados. A Cromatografia Líquida (LC) é considerada a técnica mais eficiente e mais utilizada para identificar produtos de degradação de fármacos, por fornecer análises rápidas com resolução, exatidão e sensibilidade adequadas, podendo ser acoplada a diferentes detectores, características não muito comuns a outras técnicas (FIBIGR; SATINSKY; SOLICH, 2017).

Métodos que empregam a técnica de LC associada aos detectores UV, espectrômetro de massas (MS), Corona® CAD® e RMN são os mais utilizados para essa finalidade. A legislação exige que esses métodos sejam indicativos de estabilidade, capazes de quantificar o fármaco e separá-lo adequadamente dos seus produtos de degradação (GORECKI et al., 2006; COSTA et al., 2013). Com o desenvolvimento de novos métodos, aumentam-se as exigências em relação à qualidade das medições químicas para garantir a sua confiabilidade, sendo necessário o processo de validação analítica (RIBANI et al., 2004).

A Trazodona está descrita na farmacopéia americana e britânica, porém os métodos disponíveis na farmacopéia preconizam principalmente a detecção UV para quantificação do fármaco (THE UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2007; BRITISH PHARMACOPEIA, 2009), não sendo capazes de quantificar adequadamente os produtos de degradação com baixa absorvidade molar, que não apresentam grupos cromóforos em suas estruturas químicas e não possuem padrões certificados disponíveis (ALMELING; ILKO; HOLZGRABE, 2012). Sendo assim, a utilização de uma técnica complementar é necessária. O CAD é um detector universal com alta sensibilidade e independe das estruturas químicas do analito ou da sua capacidade de ionização. Por isso, é possível a quantificação de produtos de degradação sem a necessidade de utilizar padrões de referência, levando em consideração a relação direta com o sinal da massa do fármaco (CARLOS et al., 2016; RAGHAM; CHANDRASEKHAR, 2016).



Dessa forma esse trabalho tem como objetivo desenvolver e validar um método analítico que permita a avaliação da estabilidade intrínseca do fármaco cloridrato de trazodona, por meio da identificação e quantificação dos seus produtos de degradação utilizando a técnica de cromatografia líquida associada aos detectores UV e Corona<sup>®</sup> CAD<sup>®</sup>.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 Depressão**

Os transtornos psíquicos estão presentes desde a antiguidade em casos de pessoas com alterações emocionais, ao nível da cognição, de controle comportamental e interferência na capacidade dos indivíduos em desempenhar as suas funções na sociedade. Geralmente, iniciam-se no percurso de vida, tornando-se frequente até uma situação crônica, afetando milhões de pessoas no mundo. A depressão é caracterizada por tristeza, perda de interesse ou prazer, oscilações de sentimentos e pode causar distúrbios do sono ou perda de apetite. Um paciente depressivo pode apresentar também sintomas de ansiedade, dificuldade de concentração, sensação de cansaço e pensamentos recorrentes de morte e suicídio (CASEY, 2017).

Com base em estudos epidemiológicos, a doença é mais frequente em mulheres, isso pode ser explicado pelas alterações hormonais que tornam as mulheres mais predispostas aos transtornos depressivos. Estima-se que a prevalência desses transtornos é de 1,9 % nos homens e de 3,2 % nas mulheres, sendo que 2% a 25% das mulheres apresentam um episódio depressivo em algum momento de suas vidas. As crises de depressão podem ser episódicas, recorrentes ou crônicas. Alguns fatores podem desencadear a doença ocasionando as crises, como por exemplo, eventos estressantes da vida, fatores genéticos, fatores hormonais, incidentes na infância e doenças (MOLINA et al., 2012; READ et al., 2017).

Esse transtorno psíquico se desenvolve pela alteração ou disfunção dos níveis de neurotransmissores (NT) no hipotálamo, tais como a serotonina (5-HT) e noradrenalina (NA). A serotonina esta relacionada com o humor e outras funções vitais do organismo, em pacientes com depressão existe uma diminuição da produção desse NT e uma

alteração na função dos seus receptores, desse modo o sistema serotoninérgico fica deficitário. Não existem exames laboratoriais que indiquem a doença, sendo então diagnosticada clinicamente por observação dos sintomas pelo médico. Com isso o diagnóstico pode demorar e evoluir para estados mais graves e chegar a um nível crônico (SWARTZ et al., 2013; MALHI; MANN, 2018).

O tratamento é realizado através de medicamentos, de intervenções psicoterapêuticas, ou na maioria dos casos utilizando ambos. Os medicamentos utilizados no tratamento são os antidepressivos (ADTs), também utilizados em outros transtornos. Embora esse seja o tratamento mais comum para depressão, o seu uso inadequado é frequente, em muitos casos são utilizados em excesso e sem supervisão médica. Os ADTs podem ser classificados de acordo com a sua estrutura química ou preferencialmente pelas propriedades farmacológicas, pelo fato dos de nova geração não compartilharem estruturas comuns (ELIZABETH; COZINE; WILKINSON, 2016; VUORILEHTO et al., 2016).

Estes medicamentos de uma maneira geral, aumentam a disponibilidade sináptica dos neurotransmissores serotonina e noradrenalina, através da ação de receptores sinápticos e enzimas específicas. Essa ação diminui o número e a sensibilidade dos receptores pós-sinápticos, aumentados durante a depressão (VUORILEHTO et al., 2016).

## **2.2 Cloridrato de trazodona**

Dentre os fármacos utilizados no tratamento da depressão encontra-se o cloridrato de trazodona, um antidepressivo não tricíclico derivado da triazolopiridina, responsável pela inibição da recaptação neuronal de serotonina e tem ação antagonista serotoninérgica nos receptores 5-HT<sub>1</sub> e 5-HT<sub>2</sub> (LI-BO et al., 2014). Esse fármaco foi aprovado pelo *U.S. Food and Drug Administration* (FDA) em março de 1987 (FDA, 2017), no Brasil as suas fórmulas comerciais Donaren®, o genérico Cloridrato de Trazodona foram aprovadas, em março de 1997 e em março de 2015, respectivamente (BRASIL, 2017).

O fármaco apresenta fórmula molecular  $C_{19}H_{22}ClN_5O$ . HCl e massa molecular  $408,3 \text{ g mol}^{-1}$ . Sendo um pó cristalino branco ou quase branco, solúvel em água e metanol, pouco solúvel em etanol e praticamente insolúvel em éter. Sua estrutura química esta representada na Figura 1 (THE UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2007).

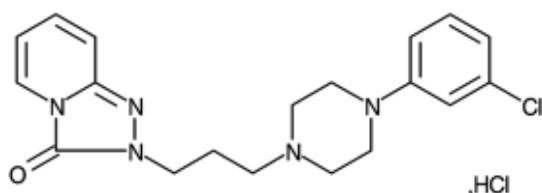


Figura 1: Estrutura química do cloridrato de trazodona

Fonte: THE UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2007

A Trazodona pertence ao grupo dos ADTs não tricíclicos e a sua ação está relacionada à inibição da recaptação neuronal de serotonina e tem ação antagonista serotoninérgica nos receptores 5-HT1 e 5-HT2 e adrenérgicos ( $\alpha_1$  e  $\alpha_2$ ), apresenta capacidade de modular diferentes receptores, e por isso é considerada como um antidepressivo de segunda geração. Possui comprovada ação em transtornos de depressão associados com insônia e ansiedade (SUNNETCIOGLU; YONAR, 2014; YI et al., 2018).

A Trazodona se difere química e farmacologicamente da família dos inibidores da recaptação seletiva da serotonina, dos antidepressivos tricíclicos e de outras famílias de antidepressivos, isto é, possui propriedades farmacológicas e bioquímicas muito específicas. Atua como fármaco com efeito antidepressivo e efeito ansiolítico, com isso é um dos antidepressivos mais prescritos. Apesar de possuir outras ações terapêuticas, atua de forma mais potente ao antagonismo dos receptores de serotonina (MARTINEZ et al., 2005; MARCOLIN, 2006; PATEL et al, 2008).

Após a administração oral a trazodona apresenta uma boa absorção, as suas ações farmacológicas são dose-dependentes, isto é, os efeitos no organismo dependem da dose de fármaco ingerido, doses menores possuem um efeito sedativo e doses maiores possuem efeito antidepressivo, no entanto deve-se atentar para necessidade de

cada paciente. O seu metabolito ativo meta-clorofenil-piperazina (mCPP) possui afinidade por vários receptores de serotonina, o que poderia diminuir o antagonismo direto da trazodona sobre os receptores. Contudo, os níveis plasmáticos de mCPP representam menos de 10% do composto de trazodona, portanto não apresenta efeito significativo na eficácia terapêutica (PATEL et al, 2008).

Há na literatura alguns métodos para análise da trazodona, sendo que a maioria faz uso da técnica de LC em fase reversa associada aos detectores ultravioleta (UV), espectrômetro de massas e fluorescentes, esses estudos estão descritos a seguir. Patel et al (2008) desenvolveram e validaram um método por CLAE utilizando o detector espectrômetro de massas para análise da trazodona e do seu metabolito m-CPP em plasma humano. Eles concluíram através dos parâmetros da validação que o método pode ser útil para monitoramento de drogas terapêuticas tanto para análise de amostras de rotina dose única ou de dose múltipla e também para amostras de ensaios clínicos com precisão e exatidão aceitáveis. Mercolini et al (2008) realizaram o mesmo tipo de estudo da trazodona e do seu metabolito, porém utilizando diferentes condições cromatográficas e a extração em fase sólida para tratamento da amostra. Em comparação com o trabalho citado anteriormente, concluíram que o procedimento de extração utilizado é mais vantajoso, pois utiliza menores volumes de plasma, é menos trabalhoso e possui menor tempo de análise.

Li-Bo et al (2014) realizaram um estudo para quantificação da trazodona em plasma, utilizando a técnica LC e uma coluna cromatográfica de troca catiônica acoplada ao detector de fluorescência. Os autores concluíram que o método é sensível, seletivo, estável, exato e preciso, apresentando resultados satisfatórios, com LD= 1,5 ng mL<sup>-1</sup> e LQ= 5 ng mL<sup>-1</sup>, sendo uma alternativa confiável aos métodos de cromatografia em fase reversa. Gindy et al (2001) realizaram a determinação da trazodona através de método espectrofotométrico, espectrofluorimétrico e por LC acoplada ao detector UV, todos os métodos foram validados e os resultados comparados. Os autores concluíram que o método por LC é mais sensível e fornece resultados mais precisos, com valores de LD= 0,4 e LQ= 0,12 ug mL<sup>-1</sup>.

A Trazodona esta descrita na farmacopéia britânica e americana (BRITISH PHARMACOPOEIA, 2009; THE UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2007), porém os métodos disponíveis nas farmacopéias preconizam principalmente a detecção

UV para doseamento e controle de qualidade do fármaco, não sendo capazes de quantificar adequadamente a formação de possíveis produtos de degradação. Há um relato na literatura de um método indicativo de estabilidade por LC-UV, nesse estudo a trazodona foi exposta às condições de estresse e foram identificados dois produtos de degradação (em meio oxidativo), porém os produtos encontrados não foram caracterizados estruturalmente (GINDY et al., 2009). Thummar et al (2018) desenvolveram e validaram um método por LC-MS e RMN para identificação dos produtos de degradação da trazodona, foram obtidos dois produtos em meio ácido, um em meio oxidativo e um PD exposto a luz, os quais tiveram suas estruturas químicas reportadas e estão representadas na Figura 2. É possível que novos PDs surjam da interação direta do fármaco com excipientes da formulação, sendo assim, é recomendado que estes estudos sejam continuamente desenvolvidos para uma formulação proposta específica.

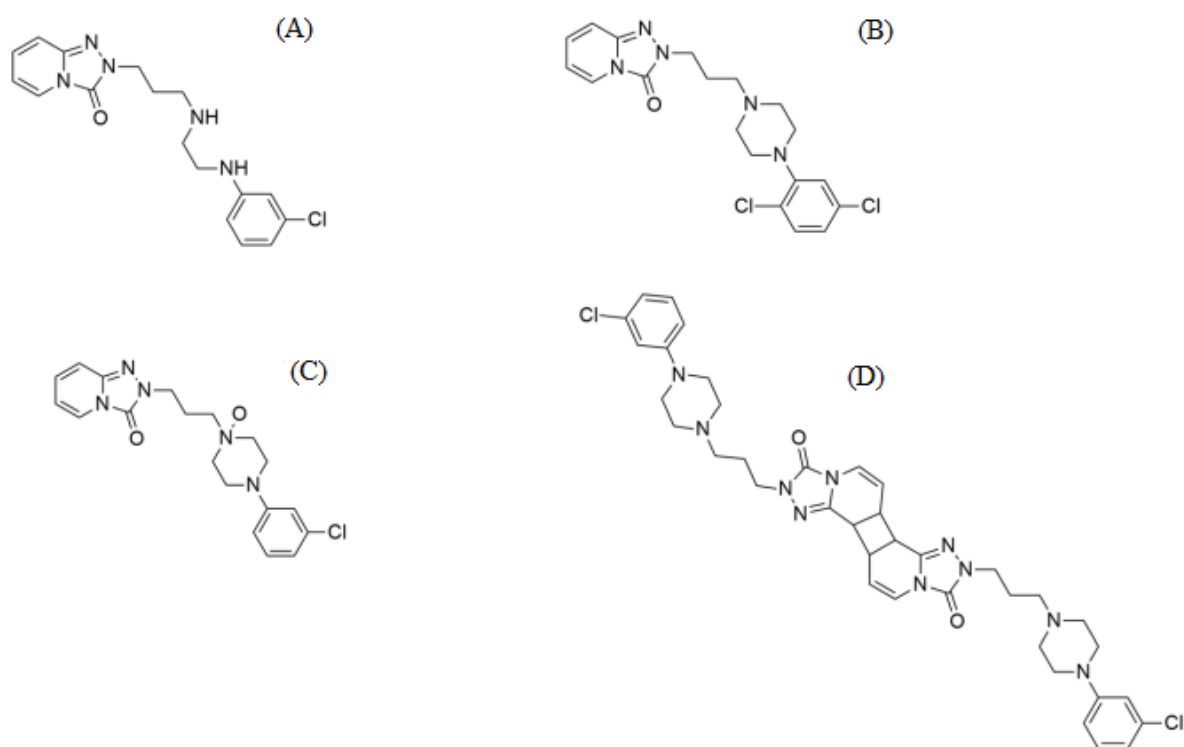


Figura 2: Produtos de degradação identificados para a trazodona: A e B) em meio ácido, C) em meio oxidativo e D) exposto a luz.

Fonte: THUMMAR et al., 2018

### 2.3 Produtos de degradação

Produtos de degradação (PD) são definidos de acordo com a ANVISA como “impurezas resultantes de alterações químicas que surgem durante a fabricação ou armazenamento do medicamento” (BRASIL, 2015). Sua identificação é importante nas etapas iniciais da formulação para prever a estabilidade de um produto ao longo do tempo e no controle de qualidade de fármacos que já estão no mercado, uma vez que medicamentos degradados podem causar perda ou diminuição da eficácia e gerar efeitos colaterais ou tóxicos (SKIBINSKI et al., 2016). Devido ao risco dos PD à saúde, as agências reguladoras têm elaborado guias e resoluções para controlar a presença dos mesmos em medicamentos.

No Brasil, a resolução nº 1, de 29 de julho de 2005 da ANVISA era utilizada como guia para realização de estudos de estabilidade, que preconiza a quantificação dos produtos de degradação como parte integrante do relatório de estudo (BRASIL, 2005). Porém em 2012 a ANVISA publicou a resolução nº 45, a qual preconiza a realização de testes de degradação forçada em fármacos (BRASIL, 2012). Já em 2013 publicou a resolução nº 58 que estabelece os parâmetros para a notificação, identificação e qualificação de produtos de degradação em medicamentos novos, genéricos e similares e preconiza a realização de ensaios de degradação forçada para avaliar a estabilidade intrínseca dos fármacos (BRASIL, 2013). Porém essa foi substituída pela resolução nº 53 de 4 de dezembro de 2015 que estabelece os mesmos parâmetros, mas com novos prazos para adequação dos produtos já registrados conforme categorias de uso (BRASIL, 2015).

Um problema que pode ocorrer nos estudos de produtos de degradação é os mesmos não possuírem separação adequada do fármaco de origem, pois apresentam propriedades físico-químicas muito próximas devido à suas semelhanças estruturais com o fármaco. Dessa forma, é necessário o desenvolvimento de um método indicativo de estabilidade, métodos estes validados capazes de detectar alterações nas propriedades dos fármacos e medicamentos, permitindo a análise dos analitos sem interferência dos produtos de degradação e impurezas do processo (ICH, 2003; REIS et al., 2016; COELHO et al., 2017). Padrões dos produtos de degradação devem ser utilizados para validar o método analítico, porém quando esses não estão disponíveis, deve-se utilizar

uma metodologia bem caracterizada, incluindo análise de amostras que foram submetidas às condições de estresse. Para isso, recomenda-se que o fármaco seja submetido a reações de degradação forçada, também chamada de *stress testing* (SINGH et al., 2013; BLESSEY et al., 2014).

## **2.4 Estudos de degradação forçada**

A estabilidade é definida pelo tempo no qual um produto farmacêutico, mantém sob determinadas condições de estocagem e uso e dentro dos limites especificados, as mesmas características e propriedades que possuía quando foi fabricado. A mesma depende de fatores ambientais, fatores relacionados ao próprio produto, excipientes e processo de fabricação. Dessa forma são preconizados estudos de estabilidade, com o intuito de garantir a integridade do fármaco e da forma farmacêutica dentro dos limites especificados, sob influência dos fatores ambientais em função do tempo (SOARES et al., 2016; KAMBERI; RAPOSA, 2016).

Dentre os estudos de estabilidade recomendados pelos órgãos reguladores, destaca-se a avaliação da estabilidade intrínseca do fármaco. A ANVISA exige que essa avaliação seja realizada através de estudos de degradação forçada como forma de avaliar a estabilidade química, identificar os produtos de degradação formados e as condições ambientais que ocasionaram essa formação, fornecendo informações importantes que permitam elaborar alternativas para prolongar o uso desses medicamentos na formulação final (BRASIL, 2015; CARMO; PEREIRA; GRATIERI, 2018).

Os testes de degradação forçada são definidos como teste de estabilidade para fármacos sob condições extremas, ou seja, ocorre um aumento da degradação química utilizando condições elevadas de temperatura e umidade, hidrólise ácida e básica, exposição à luz e solução oxidativa. Dessa forma os fármacos podem ser caracterizados como termolábeis, hidrolisáveis, fotoinstáveis e oxidáveis em vários níveis, ou seja, podem ser muito ou pouco susceptíveis em uma ou mais condições, sendo também possível que o mesmo seja estável em todas as condições (TAMIZI; JOUYBAN, 2016; CHIGURU et al., 2016).

As condições de estresse são especificadas pela ANVISA, e o tempo de exposição aos agentes degradantes varia de acordo com cada fármaco e com o método desenvolvido. O objetivo do teste não é degradar 100% o composto, mas promover uma pequena degradação de 10-30%, evitando a formação de compostos secundários. Não havendo degradação após o tempo determinado, o fármaco é considerado estável. Se esta for inferior a 10%, as condições de estresse devem ser aumentadas, se maior que 30%, deve-se diminuir essas condições (KLICK et al., 2005;BLESSY et al., 2014;ANVISA, 2015; VENKATARAMAN; MANASA, 2018).

#### **2.4.1 Hidrólise**

A hidrólise é definida como um processo que envolve a quebra de uma molécula pela ação da água, sendo uma das reações químicas mais comuns em uma ampla gama de pH. A água é considerada um dos principais catalisadores em reações de degradação, por estar presente em níveis significativos em muitos fármacos e excipientes, sendo que muitos fármacos são instáveis nesse meio. Para que a sua eficácia e estabilidade não sejam comprometidas, intervenções durante o seu desenvolvimento e armazenamento devem ser realizadas (HOTHHA et al., 2013; BLESSY et al., 2014).

Para avaliar a instabilidade sob a condição de hidrólise, leva-se em consideração o pH do meio, uma vez que os íons hidrogênio e hidroxila aceleram ou retardam o processo de degradação. Normalmente, são utilizados como reagentes para hidrólise: ácido clorídrico ou sulfúrico e hidróxido de sódio ou potássio. Caso os compostos analisados forem pouco solúveis em água, co-solventes são utilizados para dissolvê-los, a seleção é realizada baseada na polaridade do composto (HOTHHA et al., 2013;VENKATARAMAN; MANASA, 2018).

#### **2.4.2 Oxidação**

Uma das principais causas de instabilidade em fármacos é devido à degradação oxidativa, que envolve um mecanismo de transferência de elétrons que forma radicais livres. Geralmente, as oxidações que ocorrem em fármacos são reações em cadeia de forma lenta sob condições normais de armazenamento e sob influência do oxigênio



molecular, esse processo é definido como auto-oxidação. Peróxido de hidrogênio é o solvente mais utilizado para desencadear essa degradação, mas outros agentes oxidantes como, por exemplo, íons metálicos podem ser utilizados (HOTHHA et al., 2013; BLESSY et al., 2014; VENKATARAMAN; MANASA, 2018).

Para evitar que ocorra degradação oxidativa, precauções durante o processo de produção e estocagem devem ser implementadas. Deve ser utilizado nitrogênio ou dióxido de carbono como alternativa ao oxigênio nos recipientes de armazenamento, o contato dos fármacos com metais pesados que possam favorecer a oxidação devem ser evitados e durante a estocagem, temperaturas reduzidas devem ser utilizadas (VENKATARAMAN; MANASA, 2018).

### **2.4.3 Fotólise**

A maioria dos princípios ativos utilizados nas preparações farmacêuticas apresenta absorção máxima na região do ultravioleta (UV) do espectro eletromagnético (LIU et al., 2018). A degradação fotolítica ocorre devido à absorção de radiação eletromagnética, que por ser muito energética propicia a clivagem das ligações químicas quando o fármaco é exposto em câmaras com emissão de luz UV ou fluorescente, em um comprimento de onda na faixa de 300-800 nm. A taxa de degradação depende da intensidade da luz incidente e da quantidade absorvida pelo fármaco, compostos susceptíveis a fotólise devem ser armazenados em frascos de vidro âmbar e em ambientes escuros (HOTHHA et al., 2013; VENKATARAMAN; MANASA, 2018).

### **2.4.4 Termólise**

A termólise é definida como uma reação química em que o composto se decompõe devido à exposição ao calor ou elevadas temperaturas, induzindo a quebra de ligações, mecanismo denominado pirólise. Dessa forma para realizar o estudo de degradação forçada à temperatura utilizada deve ser maior do que em estudos de estabilidade acelerada ( $>40^{\circ}\text{C}$ ), verificando se o produto manterá suas características durante o tempo de armazenamento e prazo de validade (HOTHHA et al., 2013; BLESSY et al., 2014).

#### **2.4.5 Umidade**

A umidade pode afetar a cinética de degradação do fármaco, tanto os higroscópicos quanto os não higroscópicos são sensivelmente degradados pela umidade relativa, principalmente quando a umidade esta associada aos efeitos em altas temperaturas. É recomendada que esta avaliação seja realizada com um teor de umidade acima de 70%, para induzir a degradação do fármaco (HOTHA et al., 2013; VENKATARAMAN; MANASA, 2018).

#### **2.5 Desenvolvimento e validação de métodos analíticos**

O desenvolvimento da metodologia tende à otimização e avaliação das condições, o que envolve etapas de preparo de amostra, separação cromatográfica, detecção e quantificação do fármaco (BRASIL, 2015). Os ensaios de validação têm por objetivo garantir por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados. Todos os órgãos reguladores do Brasil e de outros países exigem a execução da validação analítica e estabelecem documentos oficiais que são diretrizes a serem adotadas no processo. A validação bem definida e documentada oferece evidências objetivas às agências reguladoras de que os métodos são adequados para o uso pretendido. Deve ser realizada no desenvolvimento de novos produtos, quando são realizadas adaptações em metodologias já validadas, inclusão de novas técnicas ou uso de diferentes equipamentos (RIBANI et al., 2004; ALEGRE; ROMERO; BROCH, 2012; BRASIL, 2017; SAHU et al., 2017).

No Brasil, a Resolução (RDC) nº 899, de 29 de maio de 2003 para validação de métodos analíticos e bioanalíticos (BRASIL, 2003) era utilizada para a validação dos métodos e foi recentemente substituída pela Resolução nº 166 de 24 de julho de 2017, que estabelece critérios para a validação de “métodos analíticos empregados em insumos farmacêuticos, medicamentos e produtos biológicos em todas as suas fases de produção”. A nova resolução inclui informações e orientações técnicas mais detalhadas,

abrangentes e novas diretrizes sobre a forma de conduzir os parâmetros da validação, padronizando a forma de avaliar e reportar os resultados. Os parâmetros analíticos que devem ser avaliados são: seletividade, linearidade, exatidão, precisão, limites de detecção (LD) e quantificação (LQ), robustez e efeito matriz quando as análises são realizadas em matrizes complexas (BRASIL, 2017). No estudo da linearidade e efeito matriz, a nova RDC exige uma análise estatística mais aprofundada, realizada de acordo com o Guia nº 10 - Guia para Tratamento Estatístico da Validação Analítica (ANVISA, 2017).

A seletividade é o primeiro parâmetro avaliado na validação de um método instrumental de separação, ela avalia a capacidade do método de identificar ou quantificar o analito de interesse na presença de componentes que podem estar presentes na amostra e coeluir com o composto de interesse, como impurezas, diluentes, componentes da matriz, excipientes e produtos de degradação. Dessa forma a pureza cromatográfica do sinal do analito deve ser comprovada (RIBANI et al., 2004; SOWJANYA; SUBASHINI; LAKSMI, 2015; BRASIL, 2017)

A linearidade é a capacidade do método em obter respostas analíticas diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de uma determinada faixa estabelecida. Para a determinação da linearidade são utilizadas, no mínimo, cinco concentrações diferentes do padrão analítico, as soluções devem ser preparadas em triplicata de maneira independente, podendo ser utilizadas soluções diluídas de uma mesma solução mãe do padrão (BRASIL, 2017). A correlação entre o sinal medido (área ou altura do pico) e a massa ou concentração do analito a ser quantificado deve ser determinada empiricamente, a partir de sinais medidos para massas ou concentrações conhecidas desse analito. Essa relação é representada por uma equação de reta da curva analítica (RIBANI et al., 2004; SOWJANYA; SUBASHINI; LAKSMI, 2015).

Para estimar a equação da reta, é utilizado o método dos mínimos quadrados ordinários (MMQO), através da equação de primeiro grau do tipo  $y = ax + b$ , em que  $x$  é a variável independente e representa a concentração,  $y$  é a variável dependente e representa a resposta e  $a$  e  $b$  são os coeficientes angular e linear, respectivamente, estimados pelo modelo matemático de regressão linear. Além desses coeficientes, é determinado o coeficiente de correlação  $r$  que estima a qualidade da curva obtida. De

acordo com a ANVISA o seu valor deve ser próximo a 1,0 ( $r > 0,99$ ) (SOWJANYA; SUBASHINI; LAKSMI, 2015; BRASIL, 2017).

Para comprovar a linearidade, é necessário demonstrar que a variação devida à regressão (modelo) é suficientemente maior que a devida ao erro (resíduos). Resíduo é a diferença entre o valor encontrado e o valor estimado pelo modelo (equação) em um determinado ponto. Os métodos analíticos são sensíveis a valores "extremos", também denominados *outliers*, pelo fato de não fazerem parte do conjunto de dados, podendo levar a erros na estimativa dos parâmetros da regressão. Sendo assim é importante a avaliação da presença destes e uma possível exclusão, os valores "extremos" podem ser avaliados pelo teste de Grubbs, D de Cook, entre outros. Os resíduos devem ser independentes entre si, seguir uma distribuição normal e apresentar uma homogeneidade da variância, ou seja, é importante que a independência, a normalidade e a homocedasticidade sejam avaliadas (BRASIL, 2017; BELOUFA et al., 2017). O teste F da Anova também deve ser realizado para comprovar a significância do coeficiente angular, que deve ser significativamente diferente de zero (BRASIL, 2017).

O limite de detecção é outro parâmetro avaliado e pode ser definido como a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, mas não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas. Já o limite de quantificação é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser quantificado com exatidão e precisão aceitável, sob as condições experimentais estabelecidas. A determinação dos limites pode ser realizada pela relação sinal-ruído ou pelos parâmetros da curva de calibração, considerando-se o método analítico utilizado (UHROVCIK, 2014; BRASIL, 2017).

A precisão do método avalia a proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra, deve ser expressa por meio da repetibilidade, da precisão intermediária ou da reprodutibilidade. As amostras devem ser avaliadas em três níveis de concentração: baixa, média e alta, em triplicata, de acordo com o intervalo linear. A determinação da repetibilidade é realizada sob as mesmas condições, mesmo analista e instrumentação em uma única corrida analítica, já a precisão intermediária expressa à proximidade entre os resultados obtidos em pelo menos dois dias diferentes, realizada por analistas distintos. A reprodutibilidade é avaliada pela proximidade dos resultados obtidos em laboratórios diferentes, realizada

em estudos colaborativos (RIBANI et al., 2004; BRASIL, 2017; GONZALEZ; MERTIERE; HERRADOR, 2017).

A exatidão mede a proximidade dos resultados obtidos pelo método em relação a um valor aceito como verdadeiro. As amostras podem ser avaliadas de três maneiras: comparação de métodos, utilizando materiais de referência certificados e por ensaios de recuperação. Os ensaios de recuperação são os mais utilizados para avaliar a exatidão, pois em muitos casos não é possível obter um método para comparação e nem materiais de referência, que para determinadas aplicações não existem. A recuperação é a proporção da quantidade da substância de interesse, presente ou adicionada ao material teste, que é extraída e passível de ser quantificada. É calculada levando em consideração a concentração teórica do método e a concentração experimental obtida (RIBANI et al., 2004; BRASIL, 2017; GONZALEZ; MERTIERE; HERRADOR, 2017).

A robustez avalia a capacidade do método em resistir a pequenas e deliberadas variações das condições analíticas. Para métodos cromatográficos, podem ser realizadas variações no pH e na composição da fase móvel, na temperatura do forno da coluna, fluxo da fase móvel e diferentes lotes ou fabricantes de colunas e solventes, variações que podem ocorrer devido a transferência de métodos, troca de analistas e equipamentos (SOWJANYA; SUBASHINI; LAKSMI, 2015; ANVISA, 2017).

O teste de Youden é comumente utilizado para avaliar a robustez, pois avalia também a influência de cada parâmetro analítico nos resultados finais, sendo considerado um teste completo. É realizado utilizando-se sete parâmetros e oito corridas analíticas através de uma combinação fatorial, as corridas são realizadas pela condição analítica já definida do método e uma pequena variação. Se algum parâmetro for susceptível a alguma variação, essa condição deve ser controlada e deve-se incluir uma declaração de precaução (RIBANI et al., 2004; CESAR; PIANETTI, 2009; GEHRING et al., 2011).

## 2.6 Cromatografia líquida de alta eficiência

A cromatografia surgiu no início do século XX quando o botânico russo Mikhail S. Tswett estudava pigmentos de folhas extraído de plantas, como as clorofilas e xantofilas, passando soluções dessas espécies através de colunas de vidro recheadas com carbonato de cálcio finamente dividido. Tswett empregou o termo cromatografia devido às espécies separadas aparecerem como bandas coloridas na coluna, o termo possui origem da palavra grega, em que *chrom* significa cor e *graphe* significa escrever (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

A cromatografia é definida como um método físico-químico de separação e tem como objetivo separar os constituintes de uma mistura de substâncias seja para identificação, quantificação ou obtenção da substância pura. Tal separação ocorre através da migração da amostra entre duas fases, denominadas fase estacionária e fase móvel, os componentes são distribuídos pelas fases de forma que cada um é seletivamente retido pela fase estacionária, o que resulta em diferentes migrações. As separações podem ocorrer por mecanismos de adsorção, partição, exclusão, troca iônica, interações estereoquímicas e por bioafinidade (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006; SKOOG et al., 2006).

Dentre as técnicas de separação existentes, a Cromatografia líquida de Alta Eficiência (CLAE) é muito utilizada pelas indústrias e laboratórios de análises devido a sua ampla gama de aplicações, sendo considerada uma técnica de referência em estudos de estabilidade para investigar a presença de produtos de degradação (MAROTHU et al., 2015). A técnica faz o uso de colunas metálicas fechadas e sistemas de bomba de alta pressão, permitindo a migração da fase móvel através da coluna, podendo dessa forma apresentar diversas separações com operações reprodutíveis, rápidas e precisas (SAHU et al., 2017). A cromatografia por adsorção pode ser classificada de acordo com a polaridade das fases, a CLAE de fase reversa é uma das técnicas mais utilizadas e se difere da CLAE de fase normal por apresentar uma fase estacionária mais apolar e fase móvel mais polar, tendo como principal vantagem uma redução no custo das análises devido aos solventes utilizados (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006; SINGH, 2013).

Informações sobre as propriedades e composição da amostra são muito

importantes para o desenvolvimento de um método por CLAE, tais como a estrutura química do composto, valores de pka, massas molares, espectros de absorvância no UV, intervalo de concentração e solubilidade da amostra (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006; BLESSY et al., 2014). A amostra deve ser solúvel na fase móvel e não deve se decompor, dessa forma os analitos podem ser transportados através da coluna sem sofrer modificações. Para que a mesma não precipite no injetor ou na coluna cromatográfica, recomenda-se que o diluente utilizado seja a própria fase móvel ou um de seus componentes (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

Na CLAE de modo reverso, acetonitrila e metanol associados com solução tampão ou água são os reagentes mais utilizados. O metanol apresenta como vantagens menor custo, é menos tóxico a saúde e possui um menor risco de precipitação de sais quando se utiliza em combinação com tampão na fase móvel. Já a acetonitrila é menos viscosa que o metanol, o que reduz a pressão do sistema cromatográfico e aumenta a vida útil das colunas. O método desenvolvido pode ser isocrático, quando a concentração da fase móvel é constante durante toda a análise e existem também os métodos por gradiente, em que as proporções de solventes variam durante a análise objetivando otimizar a separação (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

Com o intuito de se obter análises mais rápidas e mais eficientes, melhorias com o desenvolvimento de novas fases estacionárias e avanços na instrumentação vem sendo incorporadas a CLAE. Em função disso, a técnica evoluiu para sistemas que operam em maiores condições de pressão, uma vez que sistemas convencionais utilizam colunas com tamanho de partículas que variam de 3 a 10  $\mu\text{m}$ , sendo capazes de suportar uma pressão da ordem de 5000 psi. Os sistemas de cromatografia líquida de ultra performance utilizam colunas com tamanhos de partícula menores que 3  $\mu\text{m}$ , que são capazes de suportar pressões da ordem de 15.000 psi, uma vez que quanto menor o tamanho das partículas, maior é a pressão necessária para o bombeamento da fase móvel. Devido a isso, há uma redução no tempo de análise, melhor resolução entre picos, maior sensibilidade na detecção e menor consumo de reagentes utilizados no método analítico (WALTER; ANDREWS, 2014; BROECKHOVEN; DESMET, 2014).

### 2.6.1 Detector de arranjo de diodos (DAD)

A CLAE associada ao detector UV se tornou uma escolha em análises farmacêuticas para desenvolvimento de metodologias analíticas indicativas de estabilidade, por apresentar boa sensibilidade, ampla faixa linear, possuir fácil operação e ser compatível com análises isocráticas e por gradiente (CARLOS et al., 2015; ROBERTIS et al., 2015). Compostos que absorvem radiação do espectro eletromagnético na faixa de 190 a 800 nm podem ser detectados, isso representa uma vantagem uma vez que a maior parte dos fármacos absorvem nessa região, devido a presença de grupos cromóforos em sua estrutura (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006; CORRADINI, 2010).

As informações simultâneas dos comprimentos de onda da faixa UV são obtidas por dispositivos equipados com arranjo de diodos (conhecidos como DAD, *Diode Array Detector* ou PDA, *Photodiode Array*), possibilitando a construção de espectros 3D. O arranjo de diodos se baseia em uma série de fotodiodos posicionados lado a lado em um cristal de silício, dessa forma toda luz emergente da cela de amostra é dispersa na grade holográfica de modo que cada comprimento de onda difratado atinja o arranjo e conseqüentemente o detector (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006; CORRADINI, 2010). Tal funcionamento pode ser observado na Figura 3.

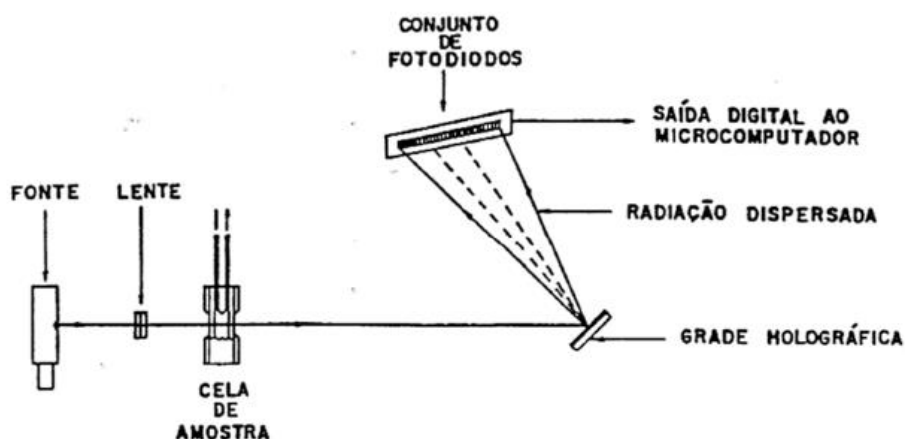


Figura 3 – Esquema de funcionamento do DAD

Fonte: COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006.



Em métodos indicativo de estabilidade, o detector UV apresenta duas limitações, a primeira é o fato de que por ser um detector seletivo, os produtos de degradação formados podem não absorver luz no espectro eletromagnético e não serem detectados. A segunda limitação é que para identificar e quantificar o composto de interesse e os seus possíveis produtos de degradação é necessário a utilização de um padrão de referência, essa característica ocorre devido aos compostos possuírem diferentes valores de absorvidade molar. Dessa forma, PDs desconhecidos ou que não apresentam padrões disponíveis no mercado não podem ser analisados (ALMELING; ILKO; HOLZGRABE, 2012). Sendo assim a utilização de uma técnica complementar é necessária para separar, identificar e quantificar adequadamente o fármaco e seus produtos de degradação.

### **2.6.2 Detector de aerossol carregado (CAD)**

O CAD é um detector universal com alta sensibilidade que fornece uma resposta adequada para todos os analitos, é proporcional a quantidade do analito presente e independe de suas propriedades ópticas ou capacidade de ionização. Por isso, é possível a quantificação de produtos de degradação sem a necessidade de padrões de referência, levando em consideração a relação direta com sinal da massa do fármaco (CARLOS et al., 2015; BU et al., 2016; RAGHAM; CHANDRASEKHAR, 2016). O detector possui boa precisão e facilidade de manuseio, uma vez que a pressão de entrada do gás e a faixa de saída do sinal são os únicos parâmetros que devem ser controlados (CARLOS et al., 2015).

Comparado com o detector UV, a resposta do CAD não depende da presença de grupos cromóforos na estrutura dos analitos de interesse, mas sim da quantidade do analito presente, o que resulta em uma resposta mais uniforme comparada com o sinal no UV, uma vez que a resposta pode variar de acordo com o comprimento de onda utilizado e com o coeficiente de extinção. Isso é considerado uma vantagem quando não é disponibilizada nenhuma informação estrutural sobre os produtos de degradação (ALMELING; ILKO; HOLZGRABE, 2012; STYPULKOWSKA et al.; 2015;).

Como pode ser observado na Figura 4, após os componentes de uma amostra ser separados pelo sistema cromatográfico, o eluente chega ao detector e é nebulizado com nitrogênio produzindo gotículas do analito. As gotículas menores vão para um tubo de secagem onde ocorre a remoção da fase móvel. Uma corrente secundária de nitrogênio passa pela agulha de platina corona de alta voltagem sendo carregada positivamente, essa carga é transferida para as partículas do analito que fluem em sentido oposto. A partícula carregada é transferida para um coletor e é medida por um eletrômetro altamente sensível, gerando um sinal diretamente proporcional à quantidade de analito presente (VEHOVEC; OBREZA, 2010; ALMELING; ILKO; HOLZGRABE, 2012; PEREIRA et al., 2015).

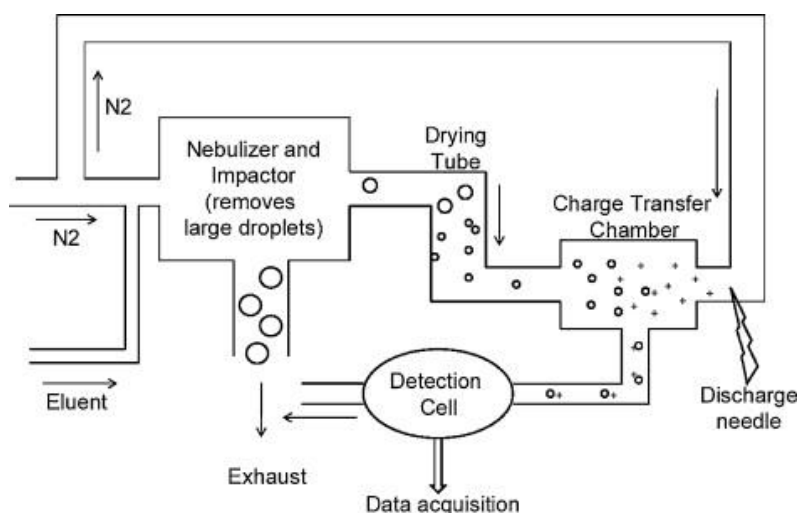


Figura 4- Esquema de funcionamento do detector CAD

Fonte: ALMELING; ILKO; HOLZGRABE, 2012

O detector é ideal para uma ampla faixa de aplicações de compostos não voláteis e semi-voláteis, com uso de aditivos da fase móvel que sejam voláteis e compatíveis. Além disso, a resposta depende da quantidade de orgânico presente na fase móvel, o sinal do analito aumenta à medida que aumenta o orgânico, resultando em uma melhor detecção (VIINAMAKI; OJANPERA, 2015; SOLIVEN et al., 2017). Um aumento no sinal do detector em uma escala de 5 a 10 é observado quando modifica a fase móvel de 100% aquoso para 100% orgânico (ALMELING; ILKO; HOLZGRABE, 2012).

Além de não poder utilizar aditivos não voláteis na fase móvel, uma segunda limitação do CAD é em relação à resposta não linear, se aproximando de uma função quadrática, podendo influenciar na quantificação do composto. Porém, em intervalos de concentrações menores, pode se aproximar ao ajuste linear (VIINAMAKI; OJANPERA, 2015; SOLIVEN et al., 2017). Essa resposta não linear pode ser explicada a partir da seguinte fórmula:

$$A = aM^b$$

Em que:

A= resposta obtida pelo detector

M = massa do analito

a e b = valores que dependem do analito e das condições cromatográficas

Por ser uma técnica relativamente recente, o CAD possui poucas metodologias validadas na literatura, sendo algumas descritas a seguir. Brondi e colaboradores (2017) realizaram um estudo com os detectores UV e CAD, nesse trabalho foi desenvolvido e validado um método por LC para determinação de amlodipina e olmesartana. Os autores concluíram que o detector apesar de pouco utilizado é uma ferramenta valiosa, uma vez que independe das estruturas químicas dos compostos e suas propriedades ópticas, o que é limitado ao detector UV. Raghav e Chandrasekhar (2016) desenvolveram e validaram um método indicativo de estabilidade utilizando o detector CAD para análise de gabapentina, os autores concluíram que o método apresentou resultados satisfatórios, foi considerado linear na faixa de 0,25-0,60 µg/mL, seletivo, sensível, preciso e reprodutível para a gabapentina e seus produtos de degradação.

Pereira et al (2016) desenvolveram e validaram um método para determinação de cocaína e seus metabólitos por LC acoplada aos detectores UV e CAD. Os autores concluíram que a combinação das técnicas foi de extrema importância, uma vez que permitiu a análise de cinco compostos em uma única corrida. Alguns foram detectados somente pelo CAD por não possuírem grupos cromóforos e outros apenas pelo UV por serem voláteis e essa característica ser uma limitação para o CAD. Outro estudo foi realizado por Fibigr et al (2017) com o detector CAD, nesse trabalho os autores desenvolveram e validaram um método para quantificar fitoesteróis, utilizando a técnica de LC. Os autores concluíram que o uso do detector foi satisfatório, pois a maioria dos

fitosteróis analisados não apresenta grupos cromóforos em suas estruturas e possuem baixa absorvidade molar, sendo uma limitação ao UV.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Desenvolver e validar um método analítico indicativo de estabilidade, para identificação e quantificação da trazodona e dos seus produtos de degradação pela técnica de LC associada aos detectores UV e CAD.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Estudar o perfil cromatográfico da trazodona a partir da aplicação de métodos cromatográficos disponíveis na literatura;
- Desenvolvimento de metodologia analítica indicativa de estabilidade para análise da trazodona e seus produtos de degradação por LC;
- Otimizar condições de análise do novo método;
- Submeter os fármacos a reações de degradação forçada, para avaliar a sua estabilidade intrínseca;
- Avaliar o balanço de massas durante o estudo de degradação forçada;
- Validação da metodologia analítica desenvolvida, em função dos parâmetros exigidos pela legislação da ANVISA.
- Elucidar a estrutura química dos produtos de degradação da trazodona empregando a técnica de LC-MS/MS.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 MATERIAIS

#### 4.1.1 Amostras

Foi utilizado padrão certificado proveniente da Farmacopéia dos Estados Unidos (USP) de cloridrato de trazodona (código1673500) para construção da curva de calibração e validação do método analítico. Para desenvolvimento do método e estudos de degradação forçada foi utilizado padrão secundário de cloridrato de trazodona (código 015907), obtido por doação.

#### 4.1.2 Equipamentos e acessórios

- Sistema UHPLC *Ultimate 3000 LC system (Thermo Scientific, USA)*, equipado com bomba LPG-3400RS, desgaseificador a vácuo integrado, auto amostrador WPS-3000RS com injetor de 100 µL, forno de coluna TCC-3000RS, detector DAD-3000RS e Corona Ultra, software Chromeleon 6.8 - Laboratório de análise e caracterização de fármacos (LACFar), UNIFAL;
- Sistema UHPLC (*Shimadzu, Japão*) equipado com detector UV acoplado ao LC-MS/MS com analisador de massas tipo triplo quadrupolo, modelo LC- MS 8030 - Laboratório de Toxicologia, UNIFAL;
- pHmetro MS Tecnopon, modelo mPA210 - LACFar, UNIFAL;
- Balança analítica Shimadzu, modelo AY220 - LACFar, UNIFAL;
- Câmara de estabilidade montada em estufa, para incubação das amostras a 60°C e 75% de umidade relativa-LACFar, UNIFAL;
- Câmara de luz ultravioleta, montada em laboratório- LACFar, UNIFAL;
- Agitador de tubos tipo vórtex, (Labnet, modelo: S0200)- LACFar, UNIFAL;
- Banho de ultrassom (Quimis, modelo: Q33502) – LACFar, UNIFAL;
- Vidrarias de grau analítico - LACFar, UNIFAL;
- Filtros de membrana Durapore 0,45 µm, (Merck);
- Filtros de membrana Millipore, (Merck);
- Microcomputador.

### **4.1.3 Reagentes**

Nesse trabalho foram utilizados os seguintes reagentes: metanol grau HPLC obtido pela J.T.Baker; acetato de amônio P.A., ácido clorídrico (HCl) P.A., trietilamina P.A. e hidróxido de sódio (NaOH) P.A. obtidos pela Vetec; ácido acético P.A. e peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) P.A. obtidos pela Synth. Para o preparo de todas as soluções foi utilizada água deionizada, obtida por um sistema de purificação Master System MS 200 (Gehaka).

## **4.2 METODOLOGIA**

### **4.2.1 Desenvolvimento do método cromatográfico**

Foi desenvolvido um método analítico por cromatografia líquida de fase reversa, utilizando um sistema UHPLC Ultimate 3000, com detectores DAD-3000RS e Corona Ultra (CAD) em série, para quantificação da trazodona e dos seus produtos de degradação. Inicialmente o método foi desenvolvido utilizando apenas o detector UV, após ajustar todas as condições cromatográficas foi utilizado o detector CAD. Foi realizada uma revisão bibliográfica de caráter contínuo com intuito de verificar métodos já disponíveis para análise do fármaco e levantar dados característicos, como sua estrutura e massa molecular, solubilidade, constante de ionização (pka) e comprimento de onda no UV.

As análises cromatográficas preliminares da trazodona foram realizadas utilizando o método já disponível na USP 30, porém a fase móvel presente na farmacopéia utilizava tampão fosfato, que não é volátil e, portanto não é compatível com o detector CAD, dessa forma o tampão foi modificado. A fase móvel foi composta de tampão acetato de amônio 10 mM; pH 6,0: metanol (40:60 v/v). A coluna empregada para separação foi C18 com tamanho de 100 mm, diâmetro interno de 2,1 mm e tamanho de partícula de 2,2 µm, com temperatura de forno de 35 °C. A vazão de fluxo foi de 0,3 mL min<sup>-1</sup>, e detecção no comprimento de onda de 250 nm. Mercolini et al

(2008) desenvolveram um método para análise da trazodona e do seu metabólito m-CPP por HPLC-UV em plasma humano e obtiveram um valor de absorvância máxima para a trazodona em 255 nm. Dessa forma, foi realizada uma análise do método também nesse comprimento de onda a fim de se obter uma absorção máxima do fármaco. Após esta análise inicial com base no método USP 30 e algumas modificações, foram avaliados os seguintes parâmetros cromatográficos: fator de retenção; assimetria do pico e número de pratos teóricos da coluna.

Em seguida, o método foi otimizado a fim de melhorar a assimetria do pico da trazodona. Foram realizadas modificações na concentração do tampão da fase móvel, utilizando tampão acetato na concentração de 20 mM e 50 mM e no pH da fase móvel, utilizado pH 5,0. Apesar dessas alterações, a assimetria do pico ainda apresentava um valor significativo, sendo assim, para diminuir a interação da trazodona com os grupos silanóis da coluna, foi adicionada trietilamina a fase móvel, um modificador de caráter básico que se liga aos grupos silanóis reduzindo a sua interação com o fármaco.

Após otimizar e avaliar as condições descritas acima, o método para análise da trazodona ficou definido com fase móvel acetato de amônio 20 mM contendo 0,1 % de trietilamina ; pH 6,0 : metanol na proporção de 40:60 (v/v). A fase móvel foi filtrada em membrana 0,45  $\mu\text{m}$  e degaseificada. A coluna empregada para separação foi a mesma dos testes iniciais, C18 com tamanho de 100 mm; diâmetro interno de 2,1 mm e tamanho de partícula de 2,2  $\mu\text{m}$ , com temperatura de forno mantida a 35 °C. A vazão de fluxo foi de 0,3 mL  $\text{min}^{-1}$  com detecção no comprimento de onda de 255 nm. O volume de injeção foi de 5  $\mu\text{L}$  e o tempo de corrida de 10 minutos.

Para realizar as análises descritas acima, soluções estoque do fármaco na concentração de 1 mg  $\text{mL}^{-1}$  foram preparadas utilizando metanol como solvente. E a partir dessas foram obtidas as soluções de trabalho nas concentrações de 10 e 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  empregando a fase móvel como diluente.

## 4.2.2 Validação do método analítico

O método analítico desenvolvido foi validado de acordo com a RDC 166 de 2017 da ANVISA, avaliando os seguintes parâmetros exigidos: seletividade; linearidade; limite de detecção e quantificação; exatidão; precisão e robustez. Juntamente com a seletividade a ANVISA determina os estudos de degradação forçada, para avaliar o analito frente aos seus produtos de degradação (BRASIL, 2017).

### 4.2.2.1 Seletividade e estudos de degradação forçada

Para o teste de seletividade, a trazodona foi submetida às reações de degradação forçada através das condições recomendadas pela ANVISA, baseadas nos guias Q1A (R2) e Q1B (R2) da ICH. Essas condições estão descritas na Tabela 1. Apesar de esses guias serem compêndios oficiais, não há um delineamento de como os estudos de degradação devem ser conduzidos, isso também é observado em outras legislações de outros órgãos regulatórios. Klick et al (2005) realizaram um estudo com vinte empresas diferentes que executaram os estudos de degradação forçada e todas aplicavam uma abordagem diferente para conduzir os mesmos. Sendo assim, os testes foram realizados de acordo com alguns estudos disponíveis na literatura, como descrito abaixo.

Tabela 1- Condições de degradação utilizadas na avaliação da estabilidade intrínseca da trazodona

Aquecimento	60°C
Umidade	75% de umidade relativa
Solução Ácida	0,1 mol L <sup>-1</sup> HCl
Solução Básica	0,1mol L <sup>-1</sup> NaOH
Solução Oxidativa	3% (v/v) H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>

Fonte: ICH, 2003; ANVISA, 2015.



O aquecimento, a exposição à luz e umidade foram realizadas com amostras do fármaco no estado sólido. Foi pesado em vidro relógio 10 mg de trazodona para cada condição e colocadas na estufa para incubação das amostras a 60°C e em um câmara de estabilidade montada no laboratório para obter 75% de umidade relativa, onde o fármaco ficou exposto por um período de 10 dias. Já para avaliar a exposição à luz, a trazodona foi exposta por 12 horas a luz ultravioleta em uma câmara também montada no laboratório. Após o tempo de exposição, às amostras foram dissolvidas em metanol em uma concentração final de 1 mg mL<sup>-1</sup>, diluídas na fase móvel para a concentração de trabalho (100 ug mL<sup>-1</sup>) e analisadas, a fim de se obter o cromatograma para cada condição.

A exposição à hidrólise ácida, hidrólise básica e solução oxidativa foram realizadas com amostras do fármaco em solução da seguinte forma:

a) Degradação ácida e básica: O estudo foi realizado com 5,0 mL de solução padrão de trazodona, 2,5 mL de HCl 0,1 mol L<sup>-1</sup> a 60° C durante 6 horas. A solução resultante foi neutralizada com solução de NaOH 0,1 mol L<sup>-1</sup> e diluída na fase móvel para obter uma concentração de 100 ug mL<sup>-1</sup>. Já para degradação básica foi realizado o mesmo procedimento, no entanto, a solução foi tratada com NaOH e neutralizada com HCl.

b) Degradação oxidativa: O estudo foi realizado com 5,0 mL de solução padrão de trazodona, 5,0 mL peróxido de hidrogênio 3% v/v em temperatura ambiente durante 6 horas. A solução resultante foi diluída na fase móvel para obter uma concentração de 100 ug mL<sup>-1</sup>.

Na hidrólise ácida e básica, o fármaco apresentou degradação inferior a 10%, sendo necessário aumentar as condições utilizadas. Foi utilizada para ambas concentrações de 1 mol L<sup>-1</sup> de HCl e NaOH em 8 horas de exposição, os testes foram conduzidos como descritos acima. Foi realizada uma análise simultânea dos produtos encontrados em uma mesma corrida analítica para ambos os detectores, a trazodona foi exposta às condições de hidrólise básica e solução oxidativa como descrito anteriormente e após o tempo determinado foi obtida uma mistura das condições nas mesmas proporções.

Para avaliar a pureza do pico da trazodona, utilizou-se o software *Chromeleon* que correlaciona diferentes pontos do pico, esta correlação é apresentada em termos percentuais que corresponde de 0 (pico totalmente impuro) a 100% (pico totalmente puro). Foi realizado também o cálculo de balanço de massas, para quantificar os produtos de degradação e comparar com a perda do teor do fármaco. O balanço de massas é aceito quando totaliza aproximadamente 100%, isto é, quando a diminuição do composto original é completamente convertida em produto de degradação (LUKULAY, HOKANSON, 2005).

#### **4.2.2.2 Linearidade**

A linearidade foi determinada em sete níveis de concentração, sendo cada nível realizado em triplicata. Foi preparada uma solução estoque da trazodona na concentração de  $1 \text{ mg mL}^{-1}$  em metanol e posteriormente diluída na fase móvel a fim de se obter as seguintes concentrações : 10, 20, 80, 100, 120, 200 e  $250 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ . A faixa de linearidade foi estabelecida de acordo com o objetivo do método e conforme estabelecido pela RDC 166 da ANVISA. Após as concentrações serem injetadas em triplicata no cromatográfico, foram obtidas as áreas em cada nível de concentração e a análise de regressão pelo método dos mínimos quadrados ordinários (MMQO), a fim de se calcular a equação da reta e o coeficiente de correlação ( $r$ ).

Uma vez que o método é sensível a valores extremos (*outliers*), foi avaliado a presença dos mesmos pelo teste de Grubbs e pela análise visual do gráfico de resíduos de regressão versus níveis de concentração da trazodona. Em seguida foram avaliadas as seguintes premissas exigidas pelo MMQO: normalidade pelo teste de Ryan-Joiner; homocedasticidade pelo teste de Cochran e independência dos resíduos pelo teste de Durbin-Watson. A significância do coeficiente angular foi avaliada pelo teste F da Anova.

#### **4.2.2.3 Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)**

Os limites de detecção e quantificação foram obtidos com base nos parâmetros da curva de calibração. A partir da curva obtida em triplicata na avaliação da linearidade, foi estabelecida a inclinação da mesma pelo modelo de regressão linear e determinado o desvio padrão a partir das áreas obtidas em cada nível de concentração. Esses valores foram substituídos nas equações 1 e 2, conforme estabelecido pela RDC 166 da ANVISA.

$$LD = \frac{3 \times DP}{IC}$$

(1)

$$LQ = \frac{10 \times DP}{IC}$$

(2)

Sendo que:

DP = é o desvio padrão médio das áreas obtidas;

IC = é a inclinação da curva de calibração.

#### 4.2.2.4 Precisão

A precisão foi determinada pela repetibilidade (precisão intra-corrída) e pela precisão intermediária (precisão inter-corrída). No estudo da repetibilidade, foram obtidas a partir da solução estoque de 1 mg mL<sup>-1</sup>, soluções de trabalho contemplando a faixa linear em 3 níveis de concentração do fármaco: 10; 100 e 250 ug mL<sup>-1</sup>, realizada no mesmo dia e sob as mesmas condições experimentais. A precisão intermediária foi realizada durante três dias consecutivos, utilizando diferentes analistas e nos mesmos níveis de concentração do teste de repetibilidade. Em ambos os estudos as concentrações foram preparadas em triplicata e quantificadas contra uma curva de calibração preparada a cada dia de análise. A precisão foi avaliada pelo coeficiente de variação (CV), conforme fórmula descrita abaixo:

$$C.V = DP/CMD \times 100$$

Sendo que:

DP = desvio padrão das medições;

CMD= concentração média determinada.

#### 4.2.2.5 Exatidão

A exatidão foi determinada pelos ensaios de recuperação. Para realização do ensaio, foram obtidas soluções de trabalho da trazodona preparadas nos mesmos níveis de concentração estabelecidas no item 4.2.2.4 dos testes de precisão e quantificada contra uma curva de calibração. A exatidão foi avaliada pela porcentagem da área recuperada, a partir da seguinte fórmula:

$$\text{Recuperação(\%)} = \frac{CME}{CT} \times 100$$

Sendo que:

Concentração média experimental (CME) = concentração calculada através da equação da reta a partir das áreas obtidas;

Concentração teórica (CT) = concentração utilizada no teste.

#### 4.2.2.6 Robustez

A robustez foi avaliada pelo teste de Youden, com análise multivariada de sete parâmetros que podem interferir no resultado analítico (CESAR; PIANETTI, 2009). Os parâmetros selecionados e a forma como o teste foi conduzido estão representados na Tabela 2. Foram realizadas oito corridas analíticas, sendo as condições normais dos parâmetros representados pelo sinal (+) e as condições alternativas representadas pelo sinal (-). Os resultados de cada corrida estão representados pelas letras de **A** a **H**.

Tabela 2 - Parâmetros, condições e combinação experimental utilizadas na robustez.

Parâmetros	Condições Normais	Condições alternativas	Combinação experimental							
			1	2	3	4	5	6	7	8
Proporção metanol na fase móvel (%)	75	73	+	+	+	+	-	-	-	-
pH fase móvel	6,0	5,8	+	+	-	-	+	+	-	-
Temperatura da coluna (C°)	35	30	+	-	+	-	+	-	+	-
Fluxo(ml min <sup>-1</sup> )	0,3	0,5	+	+	-	-	-	-	+	+
Fornecedor metanol	J.Backer	Panteac	+	-	+	-	-	+	-	+
Comprimento de onda (nm)	250	248	+	-	-	+	+	-	-	+
Concentração tampão na fase móvel	20 mM	22 mM	+	-	-	+	-	+	+	-
<b>Resultados (%)</b>			<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>	<b>D</b>	<b>E</b>	<b>F</b>	<b>G</b>	<b>H</b>

Fonte: Do Autor.

O efeito de cada variável foi estipulado pela diferença entre as médias dos resultados das quatro análises nas condições normais do método analítico (representadas pelo sinal +) e dos resultados das quatro análises nas condições alternativas (representadas pelo sinal -), através das seguintes fórmulas:

$$\text{Proporção de metanol na fase móvel} = (A+B+C+D)/4 - (E+F+G+H)/4$$

$$\text{pH da fase móvel} = (A+B+E+F)/4 - (C+D+G+H)/4$$

$$\text{Temperatura da coluna} = (A+C+E+G)/4 - (B+D+F+H)/4$$

$$\text{Fluxo} = (A+B+G+H)/4 - (C+D+E+F)/4$$

$$\text{Fornecedor de metanol} = (A+C+F+H)/4 - (B+D+E+G)/4$$

$$\text{Comprimento de onda} = (A+D+E+H)/4 - (B+C+F+G)/4$$

Concentração de tampão na fase móvel =  $(A+D+F+G)/4 - (B+C+E+H)/4$ .

### 4.2.3 Estudo dos produtos de degradação da trazodona por LC-MS/MS

Os produtos de degradação da trazodona foram caracterizados estruturalmente por espectrometria de massas a partir de amostras submetidas à hidrólise básica e solução oxidativa. As análises foram realizadas utilizando sistema UHPLC *Shimadzu* acoplado a um analisador de massas triplo quadrupolo, modelo LC-MS-8030. Inicialmente, foi realizada uma varredura da amostra de trazodona com intuito de obter o modo de ionização mais adequado e a razão m/z do íon precursor. A partir dessa análise foram obtidos os íons produto do fármaco e os espectros dos produtos de degradação encontrados, utilizando o modo de monitoramento de reações múltiplas (MRM).

Os parâmetros utilizados foram: ionização por electrospray no modo positivo, nitrogênio como gás de nebulização de 2 L min<sup>-1</sup> e gás de secagem de 15 L min<sup>-1</sup>, temperatura de dessolvatação 250°C, tensão no capilar 4 kV e tensão no cone 30 V. As amostras foram injetadas no cromatógrafo na concentração de 5 ug mL<sup>-1</sup> utilizando fase móvel acetato de amônio 20 mM contendo 0,1 % de trietilamina ; pH 6,0 : metanol na proporção de 40:60 (v/v) ( também usada como diluente), fluxo de 0,3 mL min<sup>-1</sup> e coluna C18 com tamanho de 100 mm; diâmetro interno de 2,1 mm e tamanho de partícula de 2,2 µm. O tempo de corrida foi de 10 minutos.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Desenvolvimento do método cromatográfico

Os parâmetros cromatográficos inicialmente utilizados para desenvolver o método analítico foram baseados na farmacopéia e revisão da literatura. A fase móvel foi escolhida de acordo com fatores relacionados à compatibilidade dos detectores utilizados no trabalho e na solubilidade do fármaco. De acordo com Viinamaki e Ojanpera (2015) quando a fase móvel contendo o analito chega ao detector corona CAD, ela é nebulizada e todo o solvente é evaporado, sendo assim, devem ser utilizados

solventes que possuem volatilidade suficiente para que esse processo aconteça. O tampão fosfato utilizado na composição da fase móvel do método disponível na farmacopéia não pode ser utilizado, dessa forma, utilizou-se tampão acetato de amônio na concentração de 10 mM. Como a trazodona é solúvel em metanol (THE UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2007), este foi escolhido como solvente para solubilização do fármaco.

Os cromatogramas das análises iniciais da trazodona de acordo com a USP 30 realizadas no detector UV nos comprimentos de onda de 250 e 255 nm e na concentração de 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$  do fármaco estão representados na Figura 5. Foi possível observar que a trazodona apresentou um tempo de retenção de 7,4 minutos e não foi detectado nesse tempo sinais analítico da fase móvel ou diluente. Os parâmetros cromatográficos obtidos estão apresentados na Tabela 3.

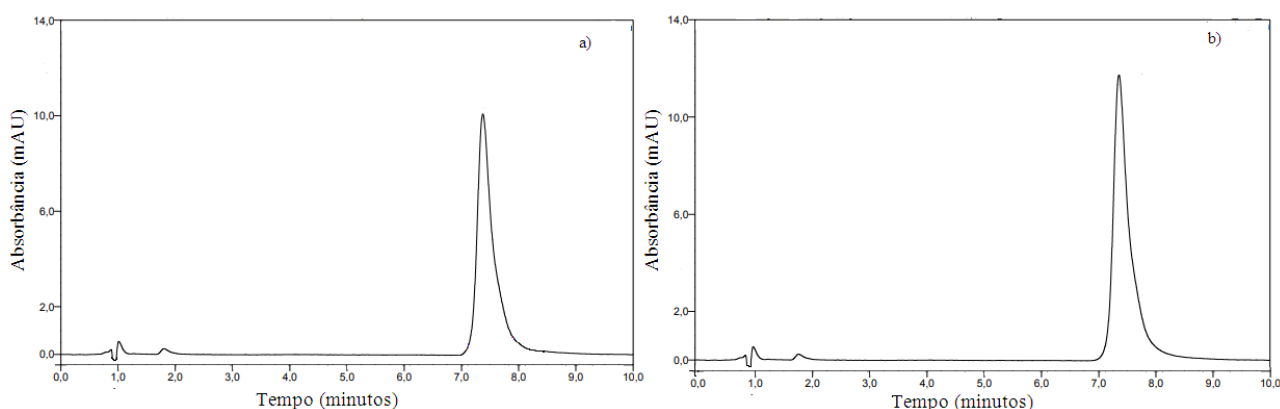


Figura 5 – Cromatogramas da Trazodona ( $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) utilizando fase móvel acetato de amônio 10 mM; pH 6,0 : metanol (40:60 v/v), coluna C18, volume de injeção 5  $\mu\text{L}$ , fluxo de  $0,3 \text{ mL min}^{-1}$  e detecção no UV a : a) 250 nm b) 255 nm.

Fonte: Do autor.

A Trazodona apresentou uma maior absorção no UV no comprimento de onda de 255 nm, uma vez que em 250 nm foi obtido uma área de 7.331 mAU e em 255 nm uma área de 7.876 mAU, sendo o comprimento de 255 definido para análise do fármaco. Foi observado um fator de retenção ( $k'$ ) de 2,81 para o pico da Trazodona, esse parâmetro corresponde ao intervalo de tempo que o soluto permanece na fase estacionária (FE), ou seja, mede a habilidade da FE em reter os componentes. Valores de  $k'$  entre 2 e 5 são considerados aceitáveis (SKOOG et al., 2006), indicando boa

interação do analito com a FE. Outro parâmetro avaliado é o número de pratos teóricos da coluna (N), que mede a eficiência da coluna. Em geral, para métodos cromatográficos, esse valor deve ser acima de 2000 pratos (RIBANI et al., 2004; SKOOG et al., 2006). Foi obtido para o pico da trazodona um valor de 7795 pratos, indicando boa eficiência da coluna utilizada.

O fator de assimetria é um dos parâmetros avaliados mais importante em análises quantitativas. Os picos devem ser simétricos e valores iguais a 1 indicam uma simetria perfeita do pico, porém são aceitáveis valores até 2. A falta de simetria do pico analisado pode gerar erros na sua integração e conseqüentemente na quantificação (SKOOG et al., 2006). O pico obtido para trazodona apresentou um valor de assimetria de 1,57, com uma leve cauda, como pode ser observado na Figura 5. Com o intuito de obter um pico mais simétrico, foram realizadas alterações na concentração do tampão e no pH da fase móvel.

Tabela 3- Parâmetros cromatográficos da trazodona (10 ug mL<sup>-1</sup>)

<b>Analito</b>	<b>Tempo de retenção</b>	<b>Área (mAU*min)</b>	<b>Fator de retenção (k')</b>	<b>Pratos teóricos</b>	<b>Assimetria</b>
Cloridrato de trazodona	7,471	7.531	2,81	7795	1,57

Fonte: Do autor.

Inicialmente foram realizadas alterações na concentração do tampão da fase móvel, com intuito de aumentar a sua força iônica. O tampão foi preparado nas concentrações de 20 mM e 50 mM e as demais condições cromatográficas foram mantidas, porém não foram observadas mudanças significativas. Na concentração de 20 mM houve uma redução da assimetria para 1,53 e na concentração de 50 mM houve um aumento da assimetria para 1,76. Como na concentração do tampão de 20 mM houve uma pequena melhora na assimetria, essa ficou definida para utilização no método.

Segundo Li-Bo et al (2014) a trazodona é considerada uma base fraca com valor de pka de 6,42, sendo assim, em valores de pH mais ácidos ela se encontra na sua forma ionizada. Com o intuito de diminuir a interação do fármaco com a fase estacionária e



conseqüentemente solucionar o problema da cauda, uma diminuição do pH da fase móvel para 5,0 foi realizado. Ao diminuir o pH, a trazodona fica mais ionizada e torna-se menos hidrofóbica, diminuindo a sua interação com a coluna C18, como pode ser observado no cromatograma da Figura 6. O pico da trazodona apresentou tempo de retenção de 5,1 minutos e o valor de assimetria obtido com a mudança de pH não foi significativo, apresentando um valor de 1,51, dessa forma, foi mantido o pH 6,0 na fase móvel.

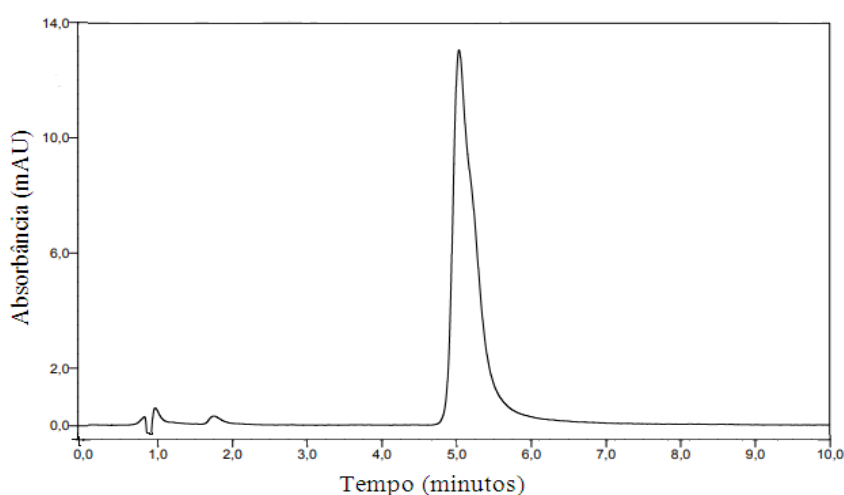


Figura 6- Cromatograma da Trazodona ( $10 \text{ ug mL}^{-1}$ ) utilizando fase móvel acetato de amônio 20 mM; pH 6,0 : metanol (40:60 v/v), coluna C18, volume de injeção 5  $\mu\text{L}$ , fluxo de  $0,3 \text{ mL min}^{-1}$  e detecção no UV á 255 nm.

Fonte: Do autor.

De acordo com Mercolini et al (2008), a presença do grupamento amino na molécula da trazodona faz com que ocorra uma forte interação da mesma com os grupos silanóis da fase estacionária, ocasionando o alargamento do pico. Sendo assim, foi adicionada a fase móvel uma base competitiva, a trietilamina, que se liga aos silanóis ácidos diminuindo suas interações com o analito e melhorando a separação cromatográfica. Além disso, Li-Bo et al (2014) relatam que a trazodona possui uma absorção relativamente fraca na região do UV, sendo necessário a análise do fármaco em concentrações maiores. Dessa forma foi empregada e definida como solução de trabalho da trazodona uma concentração de  $100 \text{ ug mL}^{-1}$ . Após a otimização completa do método, o detector corona CAD foi acoplado ao sistema, com coleta de dados a 10

Hz e temperatura de nebulização de 35°C. A Figura 7 apresenta os cromatogramas em ambos os detectores após todas as condições cromatográficas serem definidas.

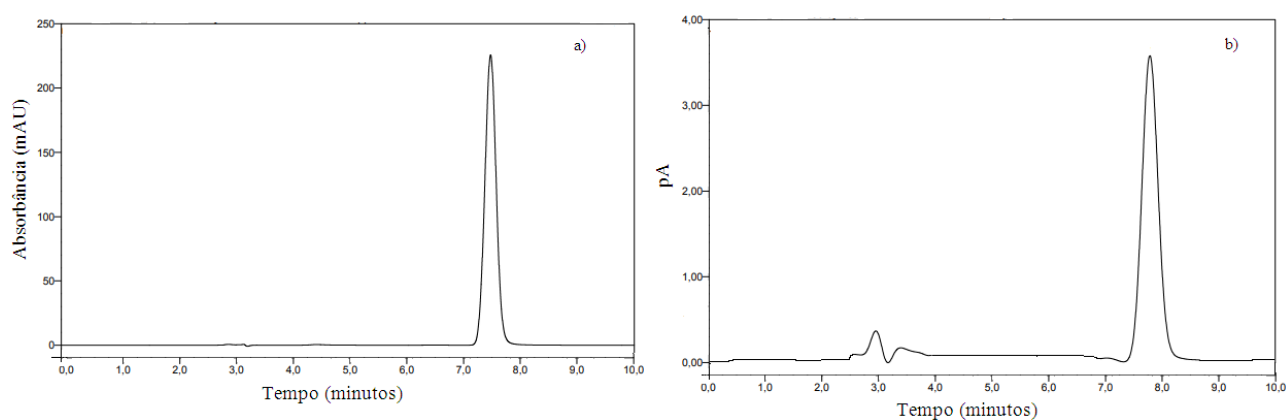


Figura 7- Cromatogramas da Trazodona ( $100 \text{ ug mL}^{-1}$ ) utilizando fase móvel acetato de amônio 20 mM+ 0,1% de trietilamina; pH 6,0 : metanol (40:60 v/v), coluna C18, volume de injeção 5 uL, fluxo de  $0,3 \text{ mL min}^{-1}$  e detecção: a) UV á 255 nm b) CAD.

Fonte: Do autor.

Como pode ser observado na Figura 7, o problema referente a cauda foi resolvido com a adição da trietilamina á fase móvel, obtendo-se um valor de assimetria do pico de 1,01 para detector UV e de 1,05 para detector CAD . A trazodona apresentou um tempo de retenção de 7,7 no detector CAD, essa pequena alteração nos tempos de retenção observada (0, 274 min de atraso em relação ao detector UV) ocorre devido a distância adicional que o fluxo precisa percorrer para chegar até este detector. Os parâmetros cromatográficos para o método foram definidos e estão representados na Tabela 4.

Tabela 4- Parâmetros cromatográficos da trazodona ( $100 \text{ ug mL}^{-1}$ ) após otimização do método

Analito	Tempo de retenção (UV)	Tempo de retenção (CAD)	Área (mAU* min)	Área (pA*min)	Fator de retenção (k')	Pratos teóricos	Assimetria (UV)	Assimetria (CAD)
Cloridrato de trazodona	7,482	7,756	51.876	1.656	2,84	7862	1,01	1,05

Fonte: Do autor.

## 5.2 Seletividade e estudos de degradação forçada

A seletividade do método foi avaliada através de estudos de degradação forçada, conforme descrito no item 4.2.2.1. O método demonstrou ser seletivo, pelo fato de que em todas as condições de degradação a qual o fármaco foi exposto foi possível observar a pureza cromatográfica do seu pico, não havendo coeluição de picos secundários, gerando confiabilidade na sua quantificação e no estudo indicativo de estabilidade. Nas condições avaliadas no estado sólido do fármaco (temperatura, umidade e fotolítica), a trazodona demonstrou ser estável, não gerando produtos de degradação e degradando dentro da faixa estabelecida (10-30%), não sendo necessário aumentar as condições de degradação. Os resultados estão representados na Tabela 5.

Tabela 5 – Estudo de degradação forçada da trazodona (100 ug mL<sup>-1</sup>) no estado sólido nos detectores UV e CAD.

Condições avaliadas	Média das áreas (mAU*min)	Média das áreas (pA*min)	Taxa de degradação UV (%)	Taxa de degradação CAD (%)
Temperatura	44.213	1.435	14,77	13,34
Umidade	43.010	1.369	17,09	17,33
Fotolítica	41.747	1.258	19,53	24,03

Fonte: Do autor.

Nas condições avaliadas do fármaco em solução (hidrólise ácida, básica e solução oxidativa), a trazodona demonstrou ser estável na condição ácida e apresentou produtos de degradação nas condições básica e oxidativa. Porém nas condições de hidrólise ácida e básica degradou abaixo da faixa estabelecida (>10%), sendo necessário aumentar as condições de degradação conforme foi descrito no item 4.2.2.1. Os resultados estão representados nas Tabelas 6 e 7.

Tabela 6 - Estudo de degradação forçada da trazodona (100 ug mL<sup>-1</sup>) em solução nos detectores UV e CAD.

Condições avaliadas	Média das áreas (mAU*min)	Média das áreas (pA*min)	Taxa de degradação UV (%)	Taxa de degradação CAD (%)
Ácida	48.703	1.549	6,11	6,46
Básica	47.801	1.511	7,85	8,75
Oxidativa	43.261	1.456	15,59	12,07

Fonte: Do autor.

Tabela 7- Estudo de degradação forçada da trazodona (100 ug mL<sup>-1</sup>) em solução nos detectores UV e CAD, após aumento das condições de degradação.

Condições avaliadas	Média das áreas (mAU*min)	Média das áreas (pA*min)	Taxa de degradação UV (%)	Taxa de degradação CAD (%)
Ácida	42.784	1.418	17,52	14,37
Básica	41.159	1.389	20,65	16,12

Fonte: Do autor

Na condição oxidativa foi verificada a formação de um produto de degradação, tanto no detector UV como no detector CAD, com tempo de retenção de 1,67 min (PD 1) e 1,91 min (PD 2) respectivamente, em relação ao pico da trazodona. Na condição básica foi observada a formação de um PD apenas no detector CAD com tempo de retenção de 3,11 min (PD 2). Os cromatogramas referentes a esses produtos estão representados nas Figuras 8 e 9. Os resultados obtidos para análise simultânea dos PDs estão representados na Figura 10, três picos foram observados no detector CAD, sendo um da trazodona e dois referentes aos produtos de degradação (PD1 e PD2). Já ao utilizar o detector UV foi observado apenas o pico do fármaco e de um dos produtos de

degradação (PD1), estando de acordo com os cromatogramas obtidos de cada condição separadamente.

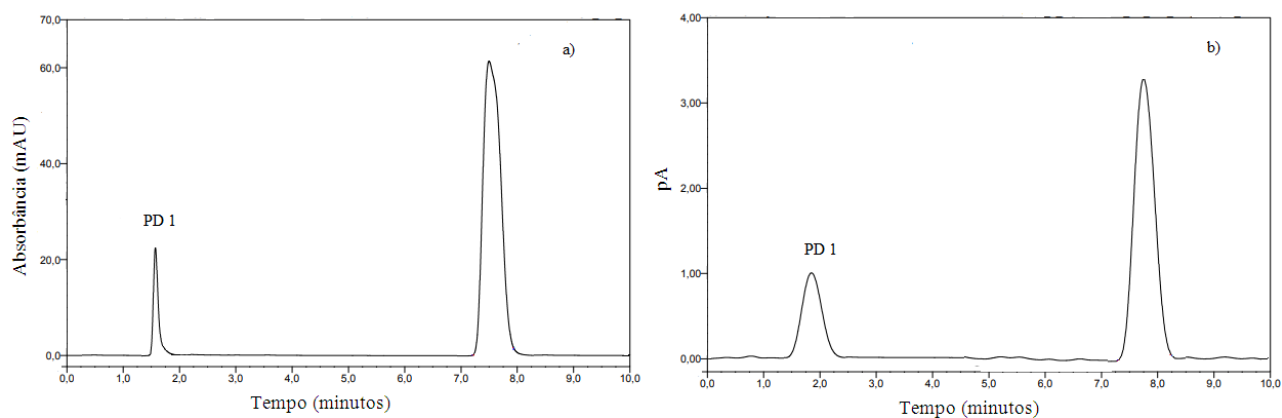


Figura 8- Cromatogramas dos perfis de degradação da trazodona (100 ug mL<sup>-1</sup>) exposto à solução oxidativa nos detectores: a) UV b) CAD.

Fonte: Do autor

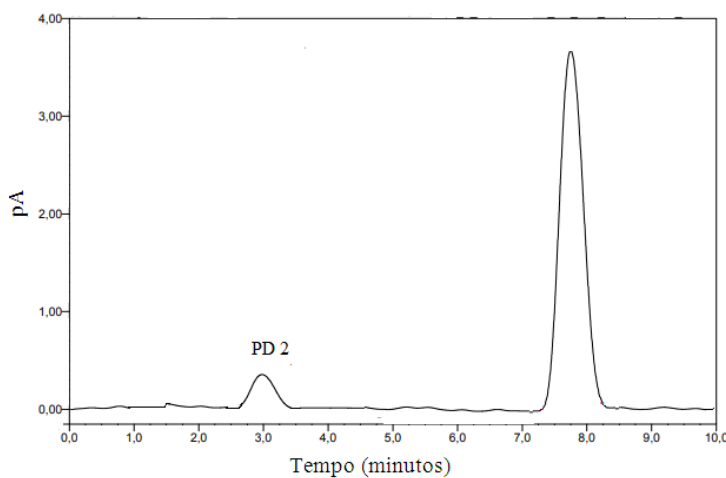


Figura 9- Cromatograma do perfil de degradação da trazodona (100 ug mL<sup>-1</sup>) exposto à condição básica no detector CAD.

Fonte: Do autor.

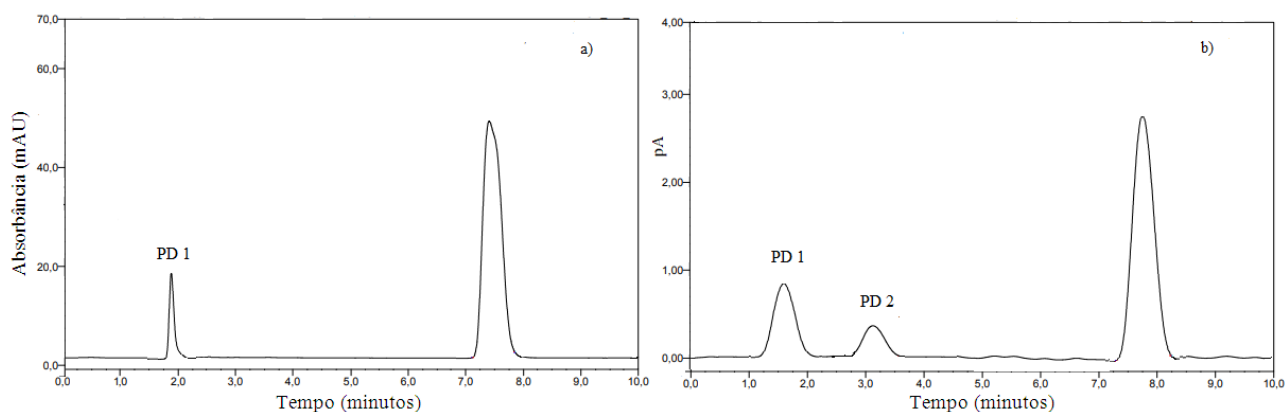


Figura 10- Cromatogramas dos perfis de degradação da trazodona ( $100 \text{ ug mL}^{-1}$ ) exposto à condição básica e solução oxidativa nos detectores: a) UV e b) CAD

Fonte: Do autor

A resolução é um parâmetro cromatográfico que deve ser avaliado quando são realizadas análises de mais de um pico em uma mesma corrida analítica. Esses picos devem estar bem separados para não gerar erros na quantificação. Para se obter uma resolução ideal entre os picos, os valores devem ser maiores do que 2 (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006; SKOOG et al., 2006). Os produtos de degradação eluíram em tempos diferente do pico do fármaco e a resolução entre os picos apresentou valores bem superiores ao recomendado, indicando completa separação da trazodona frente aos seus produtos de degradação.

Os resultados obtidos para o balanço de massas estão expressos nas Tabelas 8 e 9. Como pode ser observado, no detector UV não foi possível obter balanço de massas de 100%, mas valor bem próximo de 99,53% e para análise simultânea de 86,53%, indicando que o fármaco degradado não foi integralmente convertido em produto de degradação. De acordo com Lukulay e Hokanson (2005) isso pode acontecer pela diferença de resposta entre o produto de degradação em relação ao fármaco, devido há alterações estruturais nos grupos cromóforos e conseqüente mudança no espectro de absorção. Outro motivo é devido à necessidade de correção da diferença de massa molar entre o fármaco e o produto de degradação, mas para tal é necessário conhecer a identidade do PD, que em alguns casos é desconhecida. Apesar de que no detector UV não se obteve 100% no balanço de massas, a pureza para o pico da trazodona foi de 99,93%, comprovando a seletividade do método. Já para o detector CAD foi possível

obter um balanço de massas de 100%, indicando que o uso desse detector é importante para análise dos produtos de degradação formados, sendo possível fazer a quantificação desses PDs a partir do fármaco de origem.

Tabela 8 – Resultado do cálculo do balanço de massas do estudo de degradação forçada nos detectores UV e CAD.

Condições avaliadas	Degradação Trazodona UV (%)	Degradação Trazodona CAD (%)	PD UV (%)	PD CAD (%)	Balanço de massa (%) UV	Balanço de massa (%) CAD
Degradação básica	85,49	83,80	-	16,20	85,49 ± 0,04	100 ± 0,02
Degradação oxidativa	83,94	87,93	15,59	12,07	99,53 ± 0,02	100 ± 0,01

Fonte: Do autor.

Tabela 9 – Resultado do cálculo do balanço de massas para análise simultânea dos PDs do estudo de degradação forçada nos detectores UV e CAD.

Condições avaliadas	Degradação Trazodona UV (%)	Degradação Trazodona CAD (%)	PD UV (%)	PD1 CAD (%)	PD2 CAD (%)	Balanço de massa (%) UV	Balanço de massa (%) CAD
Degradação básica/oxidativa	71,03	71,81	15,50	16,15	12,04	86,53 ± 0,03	100 ± 0,01

Fonte: Do autor.

### 5.3 Linearidade

As curvas analíticas com sete pontos nas concentrações de 10; 20; 80; 100; 120; 200 e 250  $\mu\text{g mL}^{-1}$  realizadas em triplicata, foram construídas para a trazodona no comprimento de onda de 255 nm para detector UV e no detector CAD, conforme a Figura 11. Para o detector UV, o método foi considerado linear dentro da faixa de trabalho, a equação da reta obtida pela regressão linear do método dos mínimos quadrados ordinário foi  $y = 0,7431x + 0,7248$ , com um valor de  $R^2 = 0,9998$ . Já para o detector CAD, a curva foi polinomial de ordem 2, com equação da reta de  $y = 4\text{E-}06x^2 + 0,006x + 0,0193$  e valor de  $R^2 = 0,9993$ . Para ambos os detectores, os coeficientes de correlação ( $r$ ) foram superiores ao recomendado pela ANVISA, que é 0,99 (BRASIL, 2017).

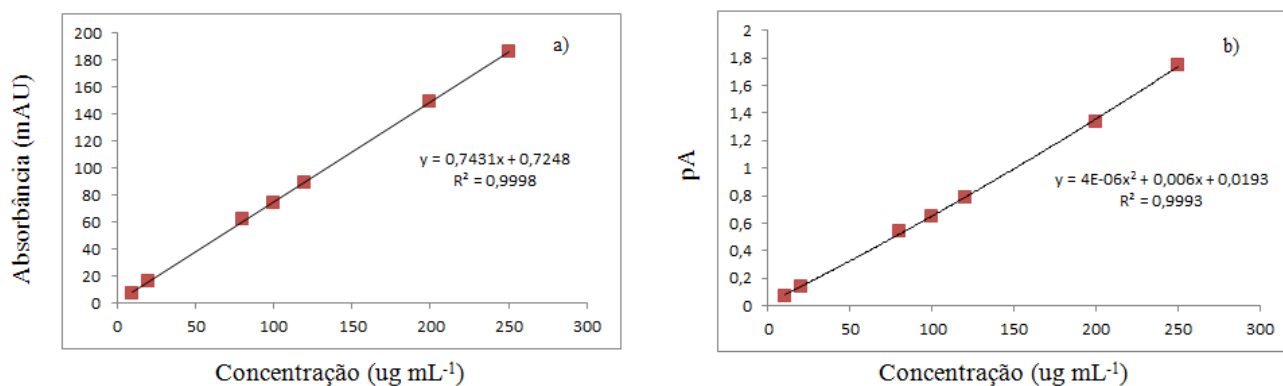


Figura 11 – Curva analítica para trazodona ( $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) no detector: a) UV b) CAD.

Fonte: Do autor.

As curvas polinomiais não são muito comuns, sendo o ajuste linear mais adequado para os métodos analíticos. Porém o detector CAD apresenta como uma de suas características curvas parabólicas, que quando em intervalo de concentrações menores se aproximam do ajuste linear (VEHOVEC; OBREZA, 2010; ALMELING; ILKO; HOLZGRABE, 2012).

Uma vez que esse método é sensível a valores extremos (*outliers*) (ANVISA, 2017; BELOUFA et al., 2017), suas presenças foram avaliadas pelo teste de Grubbs e pela análise visual dos gráficos de resíduos da regressão versus níveis de concentração da trazodona. Na Figura 12 estão representados os gráficos de resíduos para o detector



UV e CAD. O intervalo de variação aceitável para os resíduos de regressão corresponde a  $\pm t_{(1-\alpha/2;n-2)}S_{res}$ , espera-se que 95% dos resíduos estejam dentro desse intervalo (BELOUFA et al., 2017).

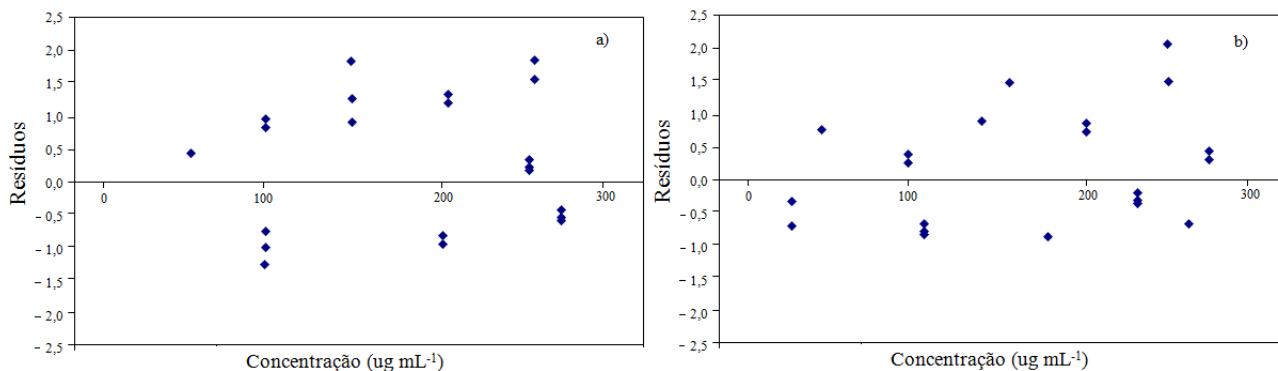


Figura 12- Gráfico dos resíduos padronizados versus níveis de concentração da trazodona para avaliação do modelo de regressão nos detectores: a) UV b) CAD.

Fonte: Do autor.

Como pode ser observado, não houve *outliers* nas análises em ambos os detectores, indicando a ausência de valores que podem influenciar na equação da regressão e tornar o modelo não representativo. Além disso, mais de 95% dos resíduos padronizados ficaram com valores entre -2,5 e +2,5 indicando uma aparente normalidade, a qual foi comprovada pelo teste de Ryan-Joiner, confirmando que não houve desvio da normalidade. O gráfico dos resíduos padronizados apresentou os pontos distribuídos aleatoriamente, com ausência de um padrão definido, indicando a independência entre os resíduos, o qual foi confirmado pela estatística de Durbin-Watson. Nota-se também um comportamento homocedástico, o qual foi comprovado pelo teste de Cochran, uma vez que os resíduos não apresentaram variabilidade significativa de variância entre si, indicando um bom ajuste do método. Os resultados do teste F da ANOVA para ambos detectores demonstraram a significância da regressão, confirmando que não houve desvio da linearidade sobre a faixa de trabalho utilizada. Todos os testes estatísticos realizados acima foram avaliados com nível de significância de 5%, como é determinado pela ANVISA (BRASIL, 2017).

## 5.4 Limite de detecção (LD) e quantificação (LQ)

Os limites de detecção e quantificação foram calculados a partir das fórmulas descritas no item 4.2.2.3, utilizando os valores médios das áreas obtidas de cada ponto da curva analítica. Para análise com o detector UV, os limites calculados foram de LD = 2 ug mL<sup>-1</sup> e LQ= 6 ug mL<sup>-1</sup> e para análise no detector CAD, os limites foram de LD = 0,3 ug mL<sup>-1</sup> e LQ= 0,9 ug mL<sup>-1</sup>. Os valores encontrados foram considerados baixos, levando-se em consideração a ampla faixa linear utilizada, indicando uma boa sensibilidade do método.

## 5.5 Precisão

A precisão foi realizada pela repetibilidade e precisão intermediária e avaliada pelo coeficiente de variação (CV) em três níveis de concentração, conforme citado no item 4.2.2.4. Os resultados experimentais desses testes nos detectores UV e CAD estão representados nas Tabelas 10 e 11. Como pode ser observado, o método foi considerado preciso em ambos os detectores, uma vez que os valores encontrados de CV variaram de 0,28 a 0,95%, sendo que o recomendado pela ANVISA são valores inferiores a 5% (BRASIL, 2003).

Tabela 10- Resultados da precisão – repetibilidade nos detectores UV e CAD (n=3/ concentração).

Concentração (ug mL <sup>-1</sup> )	Concentração média determinada (ug mL <sup>-1</sup> ) UV	Concentração média determinada (ug mL <sup>-1</sup> ) CAD	Desvio padrão (UV)	Desvio padrão (CAD)	C.V (%) UV	C.V (%) CAD
10	9	9	0,07	0,08	0,78	0,81
100	100	99	0,06	0,06	0,41	0,57
250	249	249	0,04	0,05	0,25	0,28

Fonte: Do autor.

Tabela 11- Resultados da precisão intermediária nos detectores UV e CAD (n=6/ concentração).

Concentração (ug mL <sup>-1</sup> )	Concentração média determinada (ug mL <sup>-1</sup> ) UV	Concentração média determinada (ug mL <sup>-1</sup> ) CAD	Desvio padrão (UV)	Desvio padrão (CAD)	C.V (%) UV	C.V (%) CAD
10	9	9	0,08	0,09	0,86	0,95
100	99	99	0,07	0,08	0,53	0,74
250	250	249	0,03	0,06	0,18	0,43

Fonte: Do autor.

## 5.6 Exatidão

A exatidão foi avaliada pelos ensaios de recuperação em três níveis de concentração como citado no item 4.2.2.5. Os resultados obtidos para os valores de recuperação para o detector UV e CAD estão representados na Tabela 12. O método demonstrou-se exato em ambos os detectores, uma vez que os valores de recuperação ficaram entre 97 a 101%, sendo recomendado pela ANVISA valores de 80 a 120% (BRASIL, 2003).

Tabela 12– Resultados do teste de exatidão para os detectores UV e CAD (n=6).

Concentração (ug mL <sup>-1</sup> )	Concentração média experimental (ug mL <sup>-1</sup> ) UV	Concentração média experimental (ug mL <sup>-1</sup> ) CAD	Recuperação (%) UV	Recuperação (%) CAD
10	10	9	97,75 ± 0,06	98,81 ± 0,07
100	99	99	98,88 ± 0,04	99,85 ± 0,03
250	250	249	99,96 ± 0,02	101,61 ± 0,04

Fonte: Do autor.

## 5.7 Robustez

A Robustez foi avaliada pelo teste de Youden (CESAR; PIANETTI, 2009), como foi descrito no item 4.2.2.6. Foram realizadas oito corridas analíticas com sete combinações fatoriais, para detector UV e CAD. Os valores das áreas obtidas nas condições alternativas foram comparadas com a obtida na condição otimizada do método. Os resultados foram expressos em relação a exatidão de cada corrida realizada, obtida pelos valores de recuperação, como é exigido pela ANVISA (BRASL, 2017). A Tabela 13 apresenta esses resultados.

Tabela 13- Resultados do teste de Youden para análise da robustez nos detectores UV e CAD.

Combinação experimental	Recuperação (%) UV	Recuperação (%) CAD
<b>S</b>	98,67	99,92
<b>T</b>	98,26	99,31
<b>U</b>	99,42	98,09
<b>V</b>	97,81	98,24
<b>W</b>	95,40	96,06
<b>Y</b>	97,48	98,76
<b>X</b>	98,09	99,35
<b>Z</b>	98,45	98,56

Fonte: Do autor.

O método foi considerado robusto para ambos detectores através das análises das combinações fatoriais pelo método de Youden, uma vez que não houve alterações significativas nos valores obtidos de recuperação e esses valores variaram de 97,48 a 99,92%, estando dentro dos critérios exigidos pela ANVISA, que é de 80 a 120% (ANVISA, 2003).

O efeito de cada parâmetro foi calculado a partir dos resultados obtidos dos valores de recuperação e estão expressos na Tabela 14. Para avaliar se os parâmetros influenciam no método analítico, deve-se levar em consideração o desvio padrão entre os oito resultados obtidos, valores acima do desvio padrão multiplicado pela raiz quadrada de dois ( $s\sqrt{2}$ ) são considerados significantes e dessa forma alteram a resposta analítica (GEHRING et al., 2011). Os valores obtidos de  $s\sqrt{2}$  para os resultados nos detectores UV e CAD foram de 1,66 e 1,65, respectivamente. Como pode ser observado na Tabela 13, a influência dos parâmetros nos resultados das corridas foi relativamente pequena, sendo que nenhum efeito foi maior do que o critério  $s\sqrt{2}$ . Pode-se concluir que o método é robusto para todos os parâmetros utilizados.

Tabela 14- Resultado do efeito de todos os parâmetros na robustez para detector UV e CAD.

Parâmetros	Efeito no resultado (%)	
	UV	CAD
Proporção metanol na FM	1,12	0,71
pH da FM	-0,75	-0,50
Temperatura da coluna	-0,11	-0,36
Fluxo da FM	0,83	1,48
Fornecedor methanol	1,11	0,59
Comprimento de onda	-0,73	-0,68
Concentração tampão na FM	0,13	1,05

Fonte: Do autor.

### 5.8 Estudo dos produtos de degradação da trazodona por LC-MS/MS

A partir da varredura realizada para a trazodona com o intuito de obter a sua razão m/z e o modo de ionização mais adequado, o íon de m/z 372 foi determinado e a ionização no modo positivo obteve melhor resultado, estando de acordo com as informações disponíveis na literatura (PATEL et al., 2008; THUMMAR et al., 2018). O espectro de íons produto da trazodona foi obtido pelo modo MRM, como representado na Figura 13. Foram encontrados dois íons produto, com razão m/z de 176 e 148, que correspondem à perda dos grupamentos  $C_{10}H_{13}ClN_2$  e  $C_2H_4$ , respectivamente. Essa fragmentação da molécula de trazodona esta representada na Figura 14.

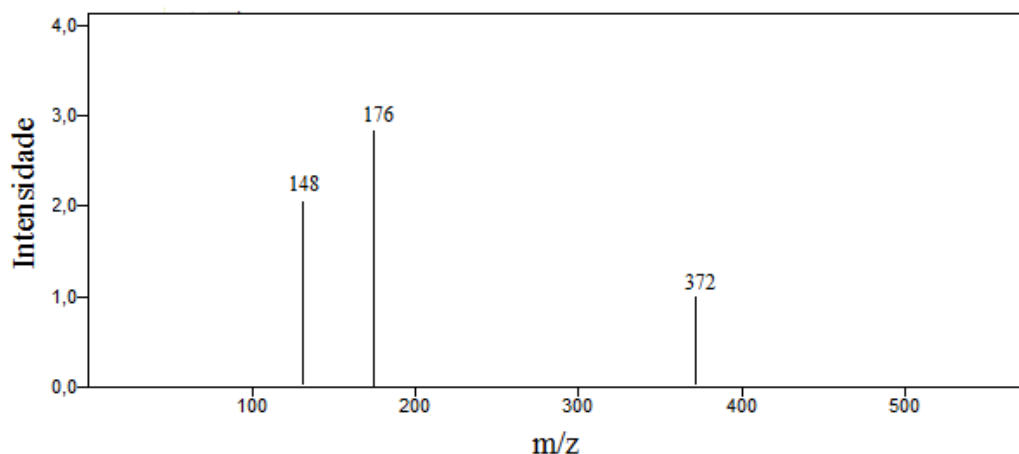


Figura 13 - Espectro de massas obtido para a trazodona

Fonte: Do autor

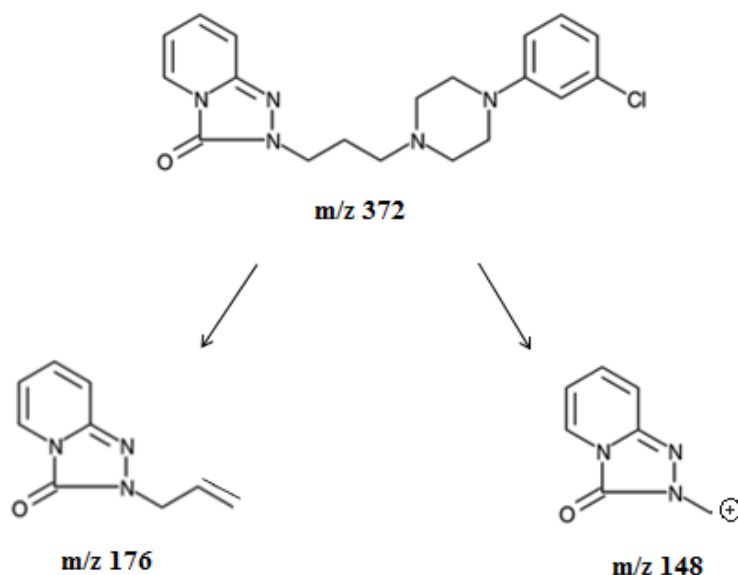


Figura 14- Perfil de fragmentação da trazodona a partir dos estudos de MS/MS

Fonte: Do autor

O produto de degradação formado quando exposto a hidrólise básica com tempo de retenção no detector CAD de 3,1 em relação do pico da trazodona, apresentou m/z de 354 (Figura 15). Já o PD formado quando exposto a solução oxidativa com tempo de retenção de 1,67 no detector UV e 1,9 no CAD em relação ao pico da trazodona, apresentou m/z de 388 (Figura 16). Dentre os produtos encontrados, apenas o exposto em meio oxidativo está descrito na literatura (Thummar et al., 2018).

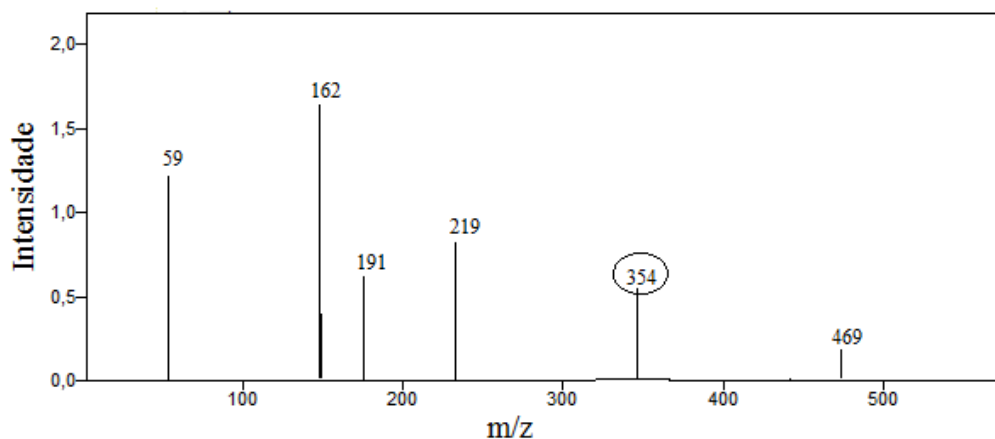


Figura 15- Espectro de massas obtido para o produto de degradação formado a partir da hidrólise básica.

Fonte: Do autor

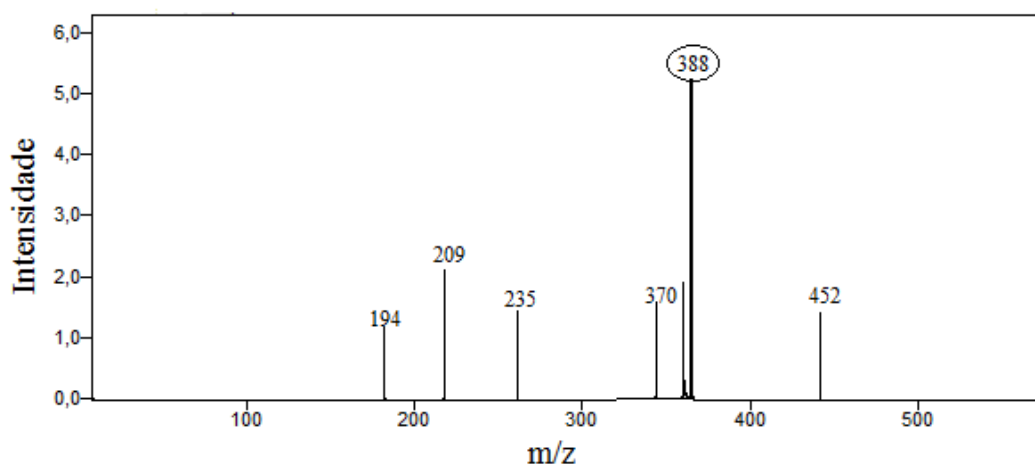


Figura 16 - Espectro de massas obtido para o produto de degradação formado em meio oxidativo

Fonte: Do autor

A partir das razões  $m/z$  obtidas e dos estudos MS/MS, as estruturas para os produtos de degradações provenientes da hidrólise básica e solução oxidativa foram propostas. O PD obtido pela degradação em meio básico, foi formado por uma reação de substituição nucleofílica aromática, onde ocorreu a substituição do cloro no anel aromático por um grupo hidroxila. Esse produto possui fórmula molecular de  $C_{19}H_{24}N_5O_2$  e o seu mecanismo proposto está representado na Figura 17. Como pode ser observado, inicialmente o hidróxido atua como base e desprotona o anel aromático,



sendo assim o grupo abandonador ( $\text{Cl}^-$ ) é eliminado formando um intermediário que contém em sua estrutura o anel benzino. Posteriormente o hidróxido atua como nucleófilo e ataca o benzino e o ânion resultante remove um próton da água para gerar o produto final.

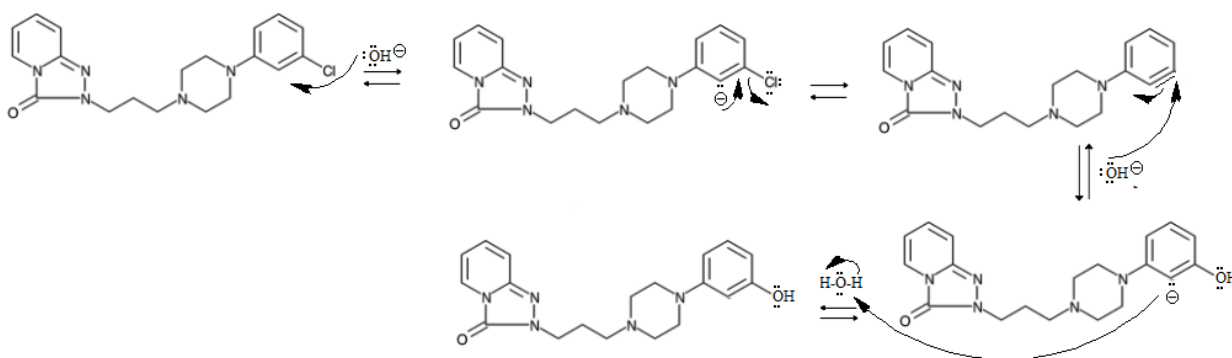


Figura 17- Mecanismo proposto para o produto obtido pela degradação em meio básico

Fonte: Do autor

O PD obtido pela degradação em meio oxidativo foi formado por uma reação de N-oxidação no anel de piperazina formando um N-óxido com fórmula molecular de  $\text{C}_{19}\text{H}_{23}\text{ClN}_5\text{O}_2^+$ . Seu mecanismo proposto está representado na Figura 18. Como pode ser observado, inicialmente ocorre o ataque do par de elétrons do átomo de nitrogênio presente no anel de piperazina ao peróxido de hidrogênio, ocorrendo dessa forma à eliminação do grupo abandonador ( $\text{OH}^-$ ). Posteriormente o grupamento  $\text{OH}^-$  remove um próton da hidroxila ligada ao nitrogênio no anel de piperazina gerando o produto final.

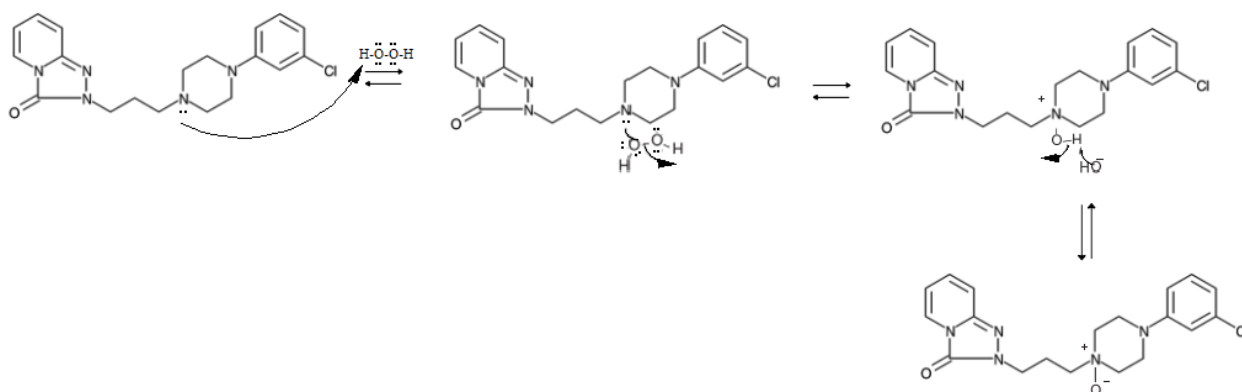


Figura 18- Mecanismo proposto para o produto obtido pela degradação em meio oxidativo

Fonte: Do autor

## 6. CONCLUSÃO

Neste trabalho, foi desenvolvido e validado um método por CLAE acoplado aos detectores UV e CAD para análise da trazodona e dos seus produtos de degradação. O método desenvolvido apresentou resultados satisfatórios dos parâmetros cromatográficos, com pico simétrico e eficiência da coluna utilizada. Apresentou também elevada frequência analítica, com tempo de corrida de 10 minutos. O método demonstrou ser adequado em relação aos parâmetros de validação, sendo considerado linear no intervalo de 10 a 250  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para ambos os detectores, os testes estatísticos comprovaram a linearidade do método.

Para garantir a segurança dos resultados do estudo de estabilidade, deve-se utilizar um método quantitativo que seja indicativo de estabilidade, sendo realizado através de estudos de degradação forçada. A avaliação da estabilidade intrínseca da trazodona pelos estudos de degradação forçada para avaliar a seletividade, demonstrou que a mesma sofre degradação quando submetida à hidrólise básica e meio oxidativo, comprovado pela obtenção de dois produtos de degradação. Porém esses produtos não interferiram no pico da trazodona, sendo o método considerado seletivo. Os produtos obtidos foram identificados por LC-MS, sendo possível propor suas estruturas químicas

e os mecanismos pelos quais foram formados. Foi realizado o balanceamento de massas para avaliar a queda do teor do fármaco e a porcentagem de produto de degradação formado, no detector UV não foi possível obter um valor de 100%, porém o pico da trazodona apresentou uma alta porcentagem de pureza.

Os valores de coeficiente de variação e porcentagem de recuperação mostraram uma boa precisão e exatidão, garantindo a confiabilidade do método. O estudo da robustez pelo teste de Youden mostrou que os parâmetros alterados não apresentaram nenhuma mudança significativa no método, sendo considerado robusto.

A associação de dois detectores, o UV e o CAD, sendo a primeira muito sensível na detecção de compostos que apresentam grupos cromóforos em sua estrutura e a segunda adequada para a detecção dos compostos independente de suas estruturas, não apresentaram diferenças significativas nos resultados dos parâmetros cromatográficos e parâmetros da validação. O método validado para o detector CAD se mostrou mais sensível devido à obtenção de menores valores para o limite de detecção e quantificação, sendo de extrema importância para acompanhar a formação do produto de degradação exposto a hidrólise básica que não foi detectado no UV. A técnica LC-CAD apesar de ser relativamente recente e possuir poucas metodologias validadas, se demonstrou promissora. Devido a não necessidade da utilização de um padrão analítico para a quantificação da formação de possíveis produtos de degradação, é um técnica atrativa para complementar o detector UV, que é o mais utilizado nesses tipos de estudos nas indústrias farmacêuticas.

## 7. REFERÊNCIAS

ABDALLAH, M. A.; AL-GHOBASHY, M. A.; LOFTY, H. M. Investigation of the profile and kinetics of degradation of rivaroxaban using HPLC, TLC-densitometry and LC/MS/MS: Application to pre-formulation studies. **Bulletin of Faculty of Pharmacy**, v. 53, p. 53- 61, 2015.

ALEGRE, M.R.; ROMERO, J.E.; BROCH, S.C. Is it really necessary to validate an analytical method or not? That is the question. **Journal of Chromatography A**, v.1232, p.101-109, 2012.

ALMELING, S.; ILKO, D.; HOLZGRABE, U. Charged aerosol detection in pharmaceutical analysis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 69, p. 50-63, 2012.

BELOUAFIA, S. et al. Statistical tools and approaches to validate analytical methods: methodology and practical examples. **International Journal of Metrology and Quality Engineering**, v.8, n.2, 2017.

BLESSY, M.; et al. Development of forced degradation and stability indicating studies of drugs. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v.4, n.3, p.159-165, 2014.

BRASIL, AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). RDC Nº 166, de 24 de julho de 2017. **Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências**. Brasília, DF, 2017.

BRASIL, AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). RDC Nº 1, de 29 de julho de 2005. **Dispõe sobre o guia para realização de estudos de estabilidade**. Brasília, DF, 2005.

BRASIL, AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). RDC Nº 45, de 09 de agosto de 2012. **Dispõe sobre a realização de estudos de estabilidade em insumos farmacêuticos ativos**. Brasília, DF, 2012.

BRASIL, AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). RDC Nº 58, de 20 de dezembro de 2013. **Dispõe sobre parâmetros para a notificação, identificação e qualificação de produtos de degradação em medicamentos com substâncias ativas sintéticas e semissintéticas, classificados como novos, genéricos e similares.** Brasília, DF, 2013.

BRASIL, AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). RDC Nº 53, de 4 de dezembro de 2015. **Dispõe sobre parâmetros para a notificação, identificação e qualificação de produtos de degradação em medicamentos com substâncias ativas sintéticas e semissintéticas, classificados como novos, genéricos e similares, e dá outras providências.** Brasília, DF, 2015.

BRASIL, AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Guia Nº 10, 01 de agosto de 2017. **Guia para tratamento estatístico da validação analítica.** Brasília, DF, 2017.

BRASIL, AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Lista de Medicamentos Inéditos Registrados.** Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/medicamentos-genericos-registrados>>. Acesso em: 28 agosto. 2017.

BRITISH PHARMACOPEIA. **The Stationery Office.** London, 2009.

BROECKHOVEN, K., DESMET, G. The future of UHPLC: Towards higher pressure and/or smaller particles?. **Trends in Analytical Chemistry**, v.63, p.65-75, 2014.

BRONDI, A.M.; GARCIA, J.S.; TREVISAN, M.G. Development and Validation of a Chromatography Method Using Tandem UV/Charged Aerosol Detector for Simultaneous Determination of Amlodipine Besylate and Olmesartan Medoxomil: Application to Drug-Excipient Compatibility Study. **Journal of Analytical Methods in Chemistry**, v.2, p. 240-248, 2017.

BU, X.; et al. Chiral analysis of poor UV absorbing pharmaceuticals by supercritical fluid chromatography-charged aerosol detection. **The Journal of Supercritical Fluids**, v.116, p.20-25, 2016.

CANTARELLI, M.; MARCOLIN, M.A. Trazodona: farmacologia e interações medicamentosas. **Revista de Psiquiatria Clinica**, v.33, p.329-36, 2006.

CARLOS, G.; et al. Development, validation and comparison of two stability-indicating RP-LC methods using charged aerosol and UV detectors for analysis of lisdexamfetamine dimesylate in capsules. **Arabian Journal of Chemistry**, v.9, p. 1905-1914, 2016.

CARMO, A.C.M.; PEREIRA, R.S.; GRATIERI, T. Brazilian requirements for stability indicating methods. **Trends in Analytical Chemistry**, v.98, p.58-63, 2018.

CASEY, A.D. Depression in Older Adults: A Treatable Medical Condition. **Primary Care: Clinics in Office Practice**, v.44, n.3, p.499-510, 2017.

CESAR, I.C.; PIANETTI, G.A. Robustness evaluation of the chromatographic method for the quantitation of lumefantrine using Youden's test. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, vol.45, n. 2, 2009.

CHIGURU, V.; et al. Study of Forced Degradation Behaviour of Brinzolamide Using LC-ESI-Q-TOF. **Chromatographia**, v.78, n.19, p.1293-1308, 2016.

COELHO, A.S.; et al. A comprehensive stability-indicating HPLC method for determination of chloroquine in active pharmaceutical ingredient and tablets: Identification of oxidation impurities. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.145, p.248-254, 2017.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P.S. **Fundamentos de cromatografia**, 5. ed. Campinas – SP: Editora Unicamp, 2014.

CORRADINI, D. **Handbook of HPLC**. Boca Raton: Taylor & Francis, 2010.

COSTA, S. P. M.; et al. Thermal behavior and compatibility analysis of the new chemical entity LPSF/FZ4. **Thermochimica Acta**, v. 562, p. 29-34, 2013.

ELIZABETH, W.; COZINE, M.D.; WILKINSON, J.M. Depression Screening, Diagnosis, and Treatment Across the Lifespan. **Primary Care: Clinics in Office Practice**, v.43, n.2, p. 229-243, 2016.

FIBIGR, J.; DALIBOR, S.; SOLICH, P. A UHPLC method for the rapid separation and quantification of phytosterols using tandem UV/Charged aerosol detection – A comparison of both detection techniques. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.140, p. 274-280, 2017.

GEHRING et al. Estabelecimento de condições para ensaio de dissolução de cápsulas de cinarizina empregando planejamento fatorial. **Química Nova**, v. 34, n. 3, p. 455-461, 2011.

GINDY, A.E.G.; et al. Spectrophotometric, spectrofluorimetric and LC determination of trazodone hydrochloride. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.26, p.211-217, 2001.

GINDY, A.E.G.; et al. Stability Indicating Assay of Trazodone Hydrochloride Using High Performance Liquid Chromatography. **Journal of Applied Research**, v.5, n.11, p.2028-2034, 2009.

GONZÁLEZ, A.; MERTIERE, G.M; HERRADOR, A. A practical guide to analytical method validation, including measurement uncertainty and accuracy profiles. **Trends in Analytical Chemistry**, v.26, n.3, p. 227-238, 2017.

GORECKI, T. Universal response in liquid chromatography using charged aerosol detection. **Analytical Chemistry**, v.78, n.9, p. 3186-3192, 2006.

HENRIQUES, B.O.; et al. Development and validation of a stability indicating method for quantification of the sesquiterpene lactone eremantholide C from *Lychnophora trichocarpha*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.24, n.4, p.502-509, 2017.

HOTHA, K.K.; et al. Forced Degradation Studies: Practical Approach - overview of regulatory guidance and literature for the drug products and drug substances. **International research journal of pharmacy**, v.4, n.5, p.78-85, 2013.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION. **Guidance for industry Q1A(R2): Stability testing of new drug substances and products**, 2003. Disponível em: <http://www.ich.org/products/guidelines/quality/article/qualityguidelines.html>. Acesso em: 10 agos. 2017.

KAMBERI, M.; RAPOZA, R. Stability testing of drug eluting stents. **Journal of Drug Delivery Science and Technolog**, v. 35, p. 58-68, 2016.

KLICK, S.; et al. Towards a generic approach for stressing of drug substance and drug products. **Pharmaceutical Technology**, v.29, n.2, p.48-66, 2005.

LI-BO, D.; et al. Quantitative analysis of trazodone in human plasma by using HPLC-fluorescence detector coupled with strong cation exchange chromatographic column: Application to a pharmacokinetic study in Chinese healthy volunteers. **Journal of Chromatography B**, v. 944, p. 43-48, 2014.

LIU, T.; et al. A comparison of the photolytic and photocatalytic degradation of fluvastatin. **Chemical Engineering Journal**, v.358, p.1296-1304, 2018.

LUKULAY, P., HOKANSON, G. Reconciling Mass Balance in Forced Degradation Studies. **Pharmaceutical Technology**, v.2, p.30-33, 2005.

MALHI, G.S.; MANN, J.J. Depression. **The Lancet**, v.392, n.161, p.2299-2312, 2018.



MAROTHU, V. K. et al. Application of HPLC to assess the compatibility of bisoprolol fumarate with selected excipients in mixtures by isothermal stress testing. **Annales Pharmaceutiques Françaises**, v. 73, p. 442-451, 2015.

MARTINEZ, M.A.; et al. Investigation of a fatality due to trazodone poisoning: case report and literature review. **Journal of analytical toxicology**, v. 29, n.4, p. 262-268, 2005.

MERCOLINI, L.; et al. HPLC analysis of the antidepressant trazodone and its main metabolite m-CPP in human plasma. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.47, p.882-887, 2008.

MOLINA, M.R.A.L.; et al. Prevalência de depressão em usuários de unidades de atenção primária. **Revista de psiquiatria clínica**, v.39, n.6, 2012.

PATEL, B.N.; et al. High throughput and sensitive determination of trazodone and its primary metabolite, m-chlorophenylpiperazine, in human plasma by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v.871, p.44-54, 2008).

PEREIRA, A.G.; et al. Method Development and Validation for Determination of Cocaine, its Main Metabolites and Pyrolytic Products by HPLC–UV–CAD. **Chromatographia**, v.79, p.179-187, 2016.

RAGHAM, P.K.; CHANDRASEKHAR, K.B. Development and validation of a stability-indicating RP-HPLC–CAD method for gabapentin and its related impurities in presence of degradation products. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 125, p. 122–129, 2016.

READ, J.R.; et al. Multimorbidity and depression: A systematic review and meta-analysis. **Journal of Affective Disorders**, v.221, p.36-46, 2017.

REIS, N.F.A.; et al. Stability-indicating UHPLC method for determination of nevirapine in its bulk form and tablets: identification of impurities and degradation kinetic study. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.126, p.103-108, 2016.

RIBANI, M.; et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, vol.27, n.5, p. 771-780, 2004.

ROBERTIS, S.D., et al. Stability-Indicating Liquid Chromatography–Spectrophotometric UV Method for the Simultaneous Determination of Marbofloxacin, Dexamethasone and Clotrimazole in a Liquid Pharmaceutical Dosage Form. **Chromatographia**, v. 78, n. 19-20, p. 1299-1304, 2015.

RUNJE, M.; et al. Forced degradation of nepafenac: Development and validation of stability indicating UHPLC method. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.123, p.42-52, 2016.

SAHU, P.K.; et al. An overview of experimental designs in HPLC method development and validation. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 2017.

SAHU, Y.; et al. Stability indicating method development and validation of assay method for the estimation of rizatriptan benzoate in tablet. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 10, n.2, p. 67-72, 2017.

SINGH, S.; et al. Forced degradation studies to assess the stability of drugs and products. **Trends in Analytical chemistry**, v. 49, p. 71-88, 2013.

SINGH, S.; et al. A critical review on the use of modern sophisticated hyphenated tools in the characterization of impurities and degradation products. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 69, p. 148-173, 2012.

SKIBINSKI, R.; TRAWINSKI, J. Studies on photodegradation process of psychotropic drugs: a review. **Environmental Science and Pollution Research**, v.24, n.2, p.1152-1199, 2016.

SKOOG, D. A. et al. **Princípios de Análise Instrumental**. 8. ed. São Paulo: Thomson Learning, 2006.

SOARES, M.F.R.; et al. Theoretical and experimental studies of the stability of drug-drug interact. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v.168, p.45-51, 2016.

SOLIVEN, A.; et al. A simplified guide for charged aerosol detection of non-chromophoric compounds—Analytical method development and validation for the HPLC assay of aerosol particle size distribution for amikacin. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.143, p. 68-76, 2017.

SOWJANYA, P.; SUBASHINI, D.; LAKSMI, R. Analytical Validation Parameters. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v.4, n.1, p. 240-257, 2015.

STYPLKOWSKA, K.; et al. Development of high performance liquid chromatography methods with charged aerosol detection for the determination of lincomycin, spectinomycin and its impurities in pharmaceutical products. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.112, p.8-14, 2015.

SUNNETÇIOGLU, M.M.; YONAR, D. Spectroscopic and calorimetric studies on trazodone hydrochloride-phosphatidylcholine liposome interactions in the presence and absence of cholesterol. **Biochimica Biophysica Acta**, v.1838, n.10, p. 2369-2379, 2014.

SWARTZ, K.L.; et al. Depression knowledge in high school students: Effectiveness of the adolescent depression awareness program. **Journal of Affective Disorders**, v.150, n.3, p.1025-1030, 2013.

TAMIZI, E.; JOUYBAN, A. Forced degradation studies of biopharmaceuticals: Selection of stress conditions. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.98, p.26-46, 2016.

THE UNITED STATES PHARMACOPEIA. **United States Pharmacopeial Conventon**. Rockville, 2007.

UHROVCIK, J.Strategy for determination of LOD and LOQ values – Some basic aspects.**Talanta**, v.119, p. 178-186, 2014.

VEHOVEC, T.; OBREZA, A. Review of operating principle and applications of the charged aerosol detector. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 10, p. 1549–1556, 5 mar. 2010.

VENKATARAMAN,S.; MANASA, M.Forced degradation studies: Regulatory guidance, characterization of drugs, and their degradation products - a review. **Drug invention today**, v.10, n.2, p.137-146, 2018.

VIINAMAKI, J.; OJANPERA, I. Photodiode array to charged aerosol detector response ratio enables comprehensive quantitative monitoring of basic drugs in blood by ultra-high performance liquid chromatography. **Analytica Chimica Acta**, v. 865, p. 1-7, 2015.

VUORILEHTO, M.S.; et al.Pharmacological and psychosocial treatment of depression in primary care: Low intensity and poor adherence and continuity.**Journal of Affective Disorders**, v.202, p.145-152, 2016.

WALTER, T.H.; ANDREWS, R.W.Recent innovations in UHPLC columns and instrumentation. **Trends in Analytical Chemistry**, v.63, p.14-20, 2014.

YI, X.Y.; et al. Trazodone for the treatment of insomnia: a meta-analysis of randomized placebo-controlled trials. **Sleep medicine**, v.45, p.25-32, 2018.