UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos
Área: Produção e Controle Farmacêuticos

Aplicação dos métodos farmacopeicos para a avaliação da indicação da estabilidade dos cloridratos de propafenona e pioglitazona.

Heitor Oliveira de Almeida Leite

Versão corrigida

Dissertação para obtenção do grau de MESTRE

Orientador: Prof. Dr. Anil Kumar Singh

São Paulo

-2018-

Heitor Oliveira de Almeida Leite

Aplicação dos métodos farmacopeicos para a avaliação da indicação da
estabilidade dos cloridratos de propafenona e pioglitazona.

Comissão Julgadora da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof. Dr. Anil Kumar Singh
Orientador / Presidente

1º. examinador

2º. Examinador

3º. Examinador

São Paulo _____ de _____.

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

L533a Leite, Heitor Oliveira de Almeida
 Aplicação dos métodos farmacopeicos para a
 avaliação da indicação da estabilidade dos
 cloridratos de propafenona e pioglitazona. / Heitor
 Oliveira de Almeida Leite. - São Paulo, 2018.
 124 p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências
Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.
Departamento de Farmácia.
Orientador: SINGH, ANIL KUMAR

1. produtos de degradação, . 2. métodos
indicativos estabilidade. 3. cloridrato de
propafenona. 4. cloridrato de pioglitazona. I. T.
II. SINGH, ANIL KUMAR, orientador.

Intelligence is the ability to adapt to change.

Stephen Hawking

Aos meus pais Carmem e Bene, pelo esforço, por serem meus exemplos e inspiração, com quem divido e dividirei todos os méritos das minhas conquistas.

Ao amor incondicional fraterno pelo meu irmão Haroldo.

À minha esposa Gisele, pelo grande amor, paciência, companheirismo e vontade de crescermos sempre juntos.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Anil, primeiramente, pela confiança no meu trabalho. Pela paciência, aprendizado e dedicação, além das grandes discussões técnicas e da vida. Às caminhadas no CEPEUSP e os sábios conselhos.

A professora Maria Aurora pela orientação inicial e grande ajuda na minha entrada no Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos.

Aos meus primos Andréia, Gregory, Larissa, e Michaela por me ensinar o significado do amor familiar, e por serem os melhores primos do mundo.

Aos meus tios Baia e Ludy por sempre me estimularem a incessante busca pelo conhecimento.

In memoriam da minha madrinha Laura, e dos meus avós Jovita e Osvaldo por ensinar que o amor pode continuar além da nossa vida.

A todos os meus amigos, mais uma vez, peço desculpas pela ausência e agradeço todo o suporte. Aos queridos papitos: Aline, Fábio, Guilherme, Iandra, Lauriane, Michele, Rafael, Sabrina, que me ensinaram que a amizade é um dos grandes sentimentos da vida. Aos etapenses Alex, Bruno, Celene, Carina e Marcel que me ensinaram que uma boa amizade feita vale a pena manter, ainda que sigamos caminhos distintos na vida.

A Nath Araújo pela grande amizade e pela revisão perfeita que só uma pessoa número 1 poderia ter feito.

Ao professor Felipe Rebello pelos ensinamentos na disciplina de estatística e fora dela, além de toda disponibilidade e boa vontade.

Aos professores das disciplinas de pós-graduação, com quem pude aprender que o conhecimento é sempre renovável.

Ao secretário David Olimpio pelo profissionalismo, atenção e auxílio de sempre e a bibliotecária Leila pela ajuda na revisão final das referências.

À Libbs Farmacêutica pela doação das matérias-primas. Aos meus líderes que sempre compreenderam a importância desse trabalho para mim e incentivaram: Gina Chin, Jaudir Caetano, Fernanda Pereira e Lívia Passos.

Aos amigos da Libbs Farmacêutica Alexandra Iwasaki, Aline Rocha, Aurora Eimi, Brunelly Coelho, Bruno Baldo, Erika Ishida, Fernanda Belém, Gabriela Luz, James Patriota, Juliana dos Santos, Karoliny Araújo, Larissa Avelino, Larissa Sumitomo, Leilane Oliveira, Leonardo Donzelli, Patrícia Matsumoto, Roberta

Facincani, Wellington Iglesias, por todo o incentivo e companheirismo diário. À
Mônica Junqueira por toda boa vontade e o material de interpretação de
espectrometria de massas, além do suporte com o Zeneth®.

A Michele Alecrim pela amizade e por sempre instigar a incessante busca do
conhecimento.

Aos colegas que fiz no programa Vinícius Marques e Georg Ivanov.

A todos aqueles que contribuíram de qualquer forma para a realização deste
trabalho, meu enorme agradecimento.

Lista de Siglas

ANDA - *Abbreviated New Drug Application*

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ATD – Administração total diária

DAD – detector arranjo de diodos

DBMA – Déficit de balanço de massa absoluto

DOE - *Design of experiment*

ESI – *electrospray ionisation mass spectrometry*

FDA – *Food and Drug Administration*

HPLC – *High performance liquid chromatography*

HPTLC – *High-performance thin-layer chromatography*

ICH - *The International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use*

LC-MS – *Hyphenated liquid chromatography/mass spectrometry*

logP –coeficiente de partição

NA – não aplicável

PDE – *Permitted Daily Exposure*

PVDF – Fluoreto de polivinilideno

RDC – Resolução da Diretoria Colegiada

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

UR – Umidade relativa

USP – *United States Pharmacopoeia*

UV – Ultravioleta

Aplicação dos métodos farmacopeicos para a avaliação da indicação da estabilidade dos cloridratos de propafenona e pioglitazona.

RESUMO

No contexto de qualidade, segurança e eficácia dos medicamentos, os produtos de degradação surgem com um crescente foco regulatório no Brasil e no mundo. Para análise confiável dos medicamentos, métodos indicativos de estabilidade devem ser utilizados, visando a avaliação qualitativa e quantitativa das impurezas e dos produtos de degradação neles contidos. O cloridrato de propafenona é utilizado no tratamento de arritmias supraventriculares e ventriculares, apresentando-se como bloqueadores dos canais de sódio, além de ser um betabloqueador. O cloridrato de pioglitazona é um agente anti-hiperglicemiante que atua primariamente diminuindo a resistência à insulina, no tratamento da Diabetes tipo 2. Os métodos oficiais descritos nas farmacopeias, muitas vezes, não fornecem informações a respeito de análise de impurezas farmacêuticas e de produtos de degradação. Assim sendo, deve-se verificar se os métodos são indicativos da estabilidade, antes de utilizá-los para analisar os produtos de degradação. A presente pesquisa tem como objetivo avaliar amostras simuladas dos medicamentos citados, após serem submetidos a condições de estresse; determinar os principais produtos de degradação através dos métodos descritos na Farmacopeia Americana e avaliar se tais métodos são indicativos de estabilidade, assim como realizar balanço de massa. Foi realizado um delineamento fatorial 3^2 dos meios de degradação avaliando-se a variação do tempo e da intensidade e a capacidade de detecção e quantificação de produtos de degradação presentes. Os fatores considerados no delineamento foram degradação ácida, alcalina, meio oxidativo com peróxido de hidrogênio, e temperatura/umidade além da fotoestabilidade. O cloridrato de propafenona apresentou degradação nos estresses ácidos, oxidativos e em temperatura/umidade. No meio alcalino e a exposição a luz (branca/UV), a magnitude da degradação foi amena. Houve um balanço de massas entre os métodos de doseamento e de impurezas, mostrando-se que o método é indicativo de estabilidade. O principal produto de degradação, no meio ácido e oxidativo, foi identificado utilizando o método de LC-MS. O cloridrato de pioglitazona apresentou degradação em meios básicos, oxidativos assim como em exposição à luz e elevada temperatura/umidade. A hidrólise ácida não apresentou impacto

significativo. Os métodos de doseamento e de impurezas não apresentaram balanço de massa, mostrando-se que o método não é indicativo de estabilidade. As análises *in silico*, com o software Zeneth®, foi utilizada para estabelecer correlações entre o processo de degradação e os plausíveis produtos formados. Assim, conclui-se que os dados de estresses obtidos, neste trabalho, podem servir como suporte nos estudos de estabilidade, bem como contribuir na definição das condições de transporte e armazenamento do cloridrato de propafenona e cloridrato de pioglitazona.

Palavras-chave: produtos de degradação, cloridrato de propafenona, cloridrato de pioglitazona, métodos indicativo estabilidade

Application of pharmacopoeial methods for the assessment of the stability of propafenone and pioglitazone hydrochlorides.

ABSTRACT

In the context of quality, safety and efficacy of pharmaceuticals, degradation products ascend with a growing regulatory focus in Brazil and in the world. For reliable analysis of pharmaceutical products, stability indicative methods must be used, aiming at qualitative and quantitative analysis of impurities and degradation products contained therein. Propafenone HCl is used in the treatment of supraventricular and ventricular arrhythmias and has sodium channel blocking capacity, besides its beta-receptor blocking activity. Pioglitazone HCl is an anti-hyperglycemic agent that acts primarily by reducing insulin resistance in the treatment of type 2 diabetes. The official methods described in the Pharmacopoeias often do not provide information regarding the analysis of pharmaceutical impurities and degradation products. Therefore, it is important to verify whether the methods are stability indicative or not, before being used in the analysis of degradation products. The objective of this research is to evaluate simulated samples of cited pharmaceuticals, after submission to stress conditions. To determine the main degradation products through the methods described in the American Pharmacopoeia and assess whether such methods are indicative of stability by mass balance approach. A factorial design (3^2) of the degradation mediums was carried out to evaluate impact of time of contact and variable intensity. On the other side, the ability of the method to detect and quantify degradation products was also assessed. The degradation medium factors considered in the design were, acid, alkaline, oxidant medium using hydrogen peroxide, temperature/humidity and photostability. Propafenone hydrochloride presented degradation in acid, oxidative and temperature/humidity stress conditions. In the alkaline medium and exposure to light (white/UV), the extent of degradation was mild. There was a mass balance between the assay method and impurity method, illustrating that the method is stability indicative. The main degradation product, in the acidic and oxidative medium, was identified using the LC-MS method. Pioglitazone hydrochloride presented degradation in basic, oxidative means as well as on exposure to light and elevated temperature/humidity conditions. Acidic hydrolysis has no significant impact. The assay and impurity methods did not show mass balance, elucidating that the method is not stability indicative. In silico analysis, with the Zeneth[®] software, was used

to establish correlations between the degradation process and the plausible degradation pathway and products. Thus, it is concluded that the data obtained in degradation studies, in this work, may serve as support in the stability studies, as well as subsidize to define transport and storage conditions for propafenone HCl and pioglitazone HCl.

Key word: degradation products, propafenone hydrochloride, pioglitazone hydrochloride, stability indicating methods

SUMÁRIO

<i>CAPÍTULO I: MÉTODOS INDICATIVOS DE ESTABILIDADE E AVALIAÇÃO DE PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO: DO PRINCÍPIO REGULATÓRIO À PRÁTICA.</i>	20
---	----

1. Introdução	21
2. A qualidade, a segurança e a eficiência perante os órgãos reguladores	21
3. Produtos de degradação	23
3.1 Produtos de degradação e a qualidade.....	23
3.2 Produtos de degradação e a segurança	24
3.3 Produtos de degradação e a eficácia	25
4. As impurezas presentes nos medicamentos	26
4.1 Impurezas elementares ou inorgânicas	26
4.2 Solventes residuais	27
4.3 Impurezas orgânicas e produtos de degradação	27
4.4 A regulamentação quanto aos produtos de degradação.....	27
5. Métodos indicativos de estabilidade	30
5.1 Estudos de balanço de massas	30
5.2 Estudos de degradação forçada	31
6. Conclusões	32
Referência	33

<i>CAPÍTULO II: APLICAÇÃO DOS MÉTODOS FARMACOPEICOS DE CLORIDRATO DE PROPAFENONA PARA A AVALIAÇÃO DA INDICAÇÃO DE ESTABILIDADE</i>	38
--	----

1. Introdução	39
2. Objetivos	42
3. Material e métodos	42
3.1 Material	42
Foram utilizados soluções	44
3.2. Métodos	44
4. Resultados e discussão	56

4.1 Adequabilidade dos métodos cromatográficos para a análise de cloridrato de propafenona.....	56
4.2 Caracterização do cloridrato de propafenona na região do ultravioleta	57
4.3 As especificações para os produtos de degradação de cloridrato de propafenona.....	58
4.4 Método de doseamento	59
4.5 Método de produtos de degradação.....	62

5. Conclusões.....	81
---------------------------	-----------

Referências.....	82
-------------------------	-----------

<i>CAPÍTULO III: APLICAÇÃO DOS MÉTODOS FARMACOPEICOS DE CLORIDRATO DE PIOGLITAZONA PARA A AVALIAÇÃO DA INDICAÇÃO DE ESTABILIDADE.....</i>	<i>85</i>
---	-----------

1. Introdução	86
2. Objetivos	87
3. Material e métodos	87
3.1 Material.....	87
3.2 Métodos.....	89
4. Resultados e discussão.....	100
4.1 Adequabilidade dos métodos cromatográficos para a análise de cloridrato de pioglitazona	100
4.2 Caracterização do cloridrato de pioglitazona na região de ultravioleta	102
4.3 As especificações para os produtos de degradação da cloridrato de pioglitazona.....	103
4.4 Método de doseamento	104
4.5 Método de produtos de degradação.....	107

5. Conclusões.....	125
---------------------------	------------

Referências.....	126
-------------------------	------------

***Capítulo I: MÉTODOS INDICATIVOS DE ESTABILIDADE E AVALIAÇÃO
DE PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO: DO PRINCÍPIO REGULATÓRIO À
PRÁTICA.***

1. Introdução

No dia 12 de dezembro de 2013, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) publicou a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 58 estabelecendo 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 (BRASIL, 2013). Essa resolução exige que as indústrias monitorem os produtos de degradação em medicamentos produzidos por elas para garantir, principalmente, a segurança dos pacientes. Em 2015, tal resolução foi revogada pela RDC nº 53 num novo texto que a complementa (BRASIL, 2015).

Os produtos de degradação ou impurezas orgânicas relacionadas aos medicamentos podem ser originados de duas formas: a primeira delas se dá durante a síntese das substâncias ativas, como subprodutos, quando normalmente são chamadas de impurezas farmacêuticas. A outra forma é a partir de degradações da molécula devido aos fatores exógenos, como exposição à elevada temperatura, umidade e luz, ou até mesmo aos fatores intrínsecos a formulação como os excipientes. Esses compostos são conhecidos como produtos de degradação (BRASIL, 2015; ICH, 2006).

Métodos para quantificação de produtos de degradação são descritos por compêndios oficiais, como as farmacopeias. Eles são o código oficial farmacêutico de um país, nos quais se estabelecem, além de outros parâmetros, os requisitos mínimos de qualidade para fármacos, insumos, drogas vegetais, medicamentos e produtos para à saúde. Além da Farmacopeia Brasileira, a ANVISA aceita como oficiais os métodos e especificações das Farmacopeias Americana, Britânica, Europeia, Japonesa, entre outras (BRASIL, 2009a).

2. A qualidade, a segurança e a eficiência perante os órgãos reguladores

Criada em 1999 pela lei nº 9782, a ANVISA é um órgão regulador e regulamentador brasileiro responsável pelo registro de medicamentos (BRASIL,

1999). Entre suas competências está a regulamentação das indústrias farmacêuticas para produzirem medicamentos de qualidade, seguros e eficazes para os pacientes.

O FDA define qualidade como uma medida de capacidade de um produto ou serviço para satisfazer as expectativas e necessidades. Dessa forma, para cada produto farmacêutico são garantidos a sua identidade, potência, pureza, entre outras características (FDA, 2006).

O *International Conference of Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use* (ICH) apresenta definições de qualidade em diversos âmbitos. De modo generalizado, define o termo “qualidade” como o grau em que um conjunto de propriedades inerentes a um produto, sistema ou processo cumpre requisitos preestabelecidos (ICH, 2005). No contexto farmacêutico, a instituição acrescenta à definição também como a adequação de uma substância farmacológica ou de um medicamento para o seu uso pretendido, atrelando-se a este termo os atributos de identidade, potência e pureza.

O termo “segurança” tanto para o FDA quanto para o ICH vem associado ao termo “segurança farmacológica”, que mede os índices funcionais de potenciais toxicológicos. O objetivo da segurança farmacológica é revelar qualquer efeito funcional no sistema fisiológico (ICH, 2017).

Singal et al. define o termo “eficácia” como o desempenho de uma intervenção sob circunstâncias ideais e controladas (SINGAL; HIGGINS; WALJEE, 2014). De acordo com a ANVISA, a eficácia de um medicamento é a capacidade de um medicamento de produzir os efeitos benéficos pretendidos em um indivíduo de uma determinada população, em condições ideais de uso (BRASIL, 2009b).

Esta tríade formada pela qualidade, segurança e eficácia é de suma importância e seus componentes estão intimamente relacionados. O êxito do medicamento depende de cada um deles. Caso os estudos comprovem a segurança e a eficácia, mas os requisitos de qualidade não sejam atendidos, o sucesso do tratamento estaria comprometido. Se não houver estudos capazes de garantir a segurança, ter eficácia e um alto padrão de qualidade não faria sentido, pois colocaria em risco a vida do paciente. Da mesma forma, o medicamento pode ser seguro e ter qualidade, mas, se sua eficácia não pode ser comprovada, perde-se o propósito do uso do medicamento (BRASIL, 2010).

Em uma esfera internacional, o ICH e o FDA em seus guias também ressaltam a importância destes requisitos para a produção de medicamentos.

3. Produtos de degradação

A ANVISA, na resolução nº 53 de 2015, define produtos de degradação como impurezas resultantes de alterações químicas que surgem durante a fabricação ou armazenamento do medicamento (BRASIL, 2015).

Considerando o medicamento da sua fabricação até o consumo final, existe um intervalo de tempo em que o medicamento continua sofrendo transformações cinéticas. Essas transformações são condicionadas e catalisadas pelo ambiente em que ele está inserido. Atkins et al avaliam que a cinética química é um balanço entre um grande número de reações que ocorrem ao mesmo tempo. Assim sendo, o medicamento até o seu consumo passa por alterações que podem gerar produtos de degradação, tais como mudança no pH em medicamentos na forma líquida, alteração da dureza em comprimidos, etc. (ATKINS; JONES, 2006).

A formação destes produtos de degradação pode interferir tanto na qualidade como na segurança e na eficácia dos medicamentos. Dessa forma, eles devem ser estudados e compreendidos como integrantes importantes na produção, no armazenamento e no transporte de medicamentos (BAERTSCHI, ALSANTE, & REED, 2005).

3.1 Produtos de degradação e a qualidade

Durante o processo de produção do medicamento, a substância ativa recebe a associação de diversas matérias-primas que auxiliam na forma de veiculação do fármaco bem como no seu processo de fabricação. Todos esses processos devem ser permeados pela qualidade em suas operações unitárias e constituintes (BAERTSCHI, 2011; ICH, 2005).

Os excipientes utilizados, por exemplo, devem ser sempre de pureza e origem conhecidas e confiáveis. A assepsia e o controle microbiológico do ambiente de

produção sempre devem estar de acordo com a classe de limpeza adequada para a forma farmacêutica a ser produzida (BRASIL, 2017).

Contudo, tais cuidados para que o fármaco não perca a qualidade, segurança e eficácia estabelecida se estendem além dos controles de processo citados. Características intrínsecas ao processo, como aquecimento, utilização de solventes na granulação ou até a exposição ao oxigênio atmosférico, podem favorecer a degradação do fármaco, comprometendo a qualidade final do produto. Diversos trabalhos vêm sendo realizados com o objetivo de conhecer os limites do fármaco quanto a estabilidade do medicamento, utilizando ferramentas como DOE (*Design of experiment*) para otimizar o método de produtos de degradação (DURGA RAO et al., 2010; MUSCAT GALEA et al., 2017).

3.2 Produtos de degradação e a segurança

O organismo humano é um sistema complexo com diversos receptores que são ativados e desativados fisiologicamente por moléculas endógenas. O efeito da maioria dos insumos farmacêuticos ativos no organismo é a alteração de algum componente do sistema. Geralmente, as moléculas ligam-se aos receptores gerando alterações biológicas e fisiológicas comumente chamadas de efeito (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2011). No nível molecular, essa ligação é representada por uma interação de origem química entre as proteínas constituintes dos receptores celulares e a molécula ativa, de forma covalente ou não covalente, conforme ilustrado no exemplo da Figura 1.

Nela, a epinefrina liga-se a diversos receptores com diferentes interações: o seu anel aromático liga-se através de interações hidrofóbicas ao grupamento de fenilalanina (Phe290); suas duas hidroxilas interagem através das ligações de hidrogênio com as hidroxilas do aminoácido serina (Ser) disponíveis (EMERCE; COK; DEGIM, 2015). Essas interações geram um sinal que desencadeia uma cascata de eventos bioquímicos.

Figura 1: Ligação da epinefrina com o receptor hipotético adrenérgico.

Fonte: CARVALHO, I. et al.(2003).

O efeito resultante dessa cascata de reações está relacionado com todos os pontos de ligação entre o fármaco e o receptor. A intensidade entre estas ligações determina a intensidade do efeito. A ausência de interação em algum ponto ou até a interação parcial do receptor pode levar a não propagação do efeito. Neste contexto farmacodinâmico, as impurezas muitas vezes apresentam alterações em alguns grupos funcionais e podem desencadear desde interações diferenciadas com o receptor até ausência de interações, gerando efeitos indesejáveis ou diferentes do esperado (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2011; EMERCE; COK; DEGIM, 2015)

3.3 Produtos de degradação e a eficácia

A diminuição na eficácia terapêutica dos medicamentos pode ocorrer indiretamente pela formação de produtos de degradação. Isso porque, uma vez degradada, a molécula do fármaco não atuará mais no seu receptor alvo, levando a uma diminuição da resposta do organismo. Para os fármacos que apresentam uma larga janela terapêutica, a degradação pode influenciar pouco, mas para os de estreita janela terapêutica pode ser decisivo na evolução do tratamento (BAERTSCHI, ALSANTE, & REED, 2005).

4. As impurezas presentes nos medicamentos

As impurezas presentes no medicamento podem ser didaticamente classificadas em 3 grupos: as impurezas elementares (ou impurezas inorgânicas), os solventes residuais e as impurezas orgânicas (entre elas os produtos de degradações)(BAERTSCHI, 2011).

4.1 Impurezas elementares ou inorgânicas

Impurezas elementares em produtos farmacêuticos podem surgir de diversas fontes: oriundas de catalisadores residuais que são adicionados intencionalmente na síntese ou podem simplesmente estar presentes como impurezas – oriundas de interações com o equipamento durante o processo. Como as impurezas elementares não trazem benefícios terapêuticos, em sua maioria além de poderem ser tóxicas, seus níveis no produto farmacêutico devem ser controlados com limites aceitáveis (BAERTSCHI, 2011).

As impurezas elementares, na forma de íons metálicos, também podem afetar a estabilidade e a vida útil da formulação. Podem catalisar a degradação de fármacos lábeis, favorecendo o estresse metálico (BALARAM, 2016).

O ICH elaborou um guia experimental para avaliação de impurezas elementares. Neste guia, preconiza-se três avaliações para o controle de tais impurezas: a avaliação dos dados de toxicidade para potenciais impurezas elementares; o estabelecimento de uma exposição diária permitida (em inglês PDE – *Permitted Daily Exposure*) para cada elemento de toxicologia conhecida; a aplicação de uma estratégia para controlar as impurezas elementares em produtos farmacêuticos (ICH, 2014).

A Farmacopeia Americana também preconiza a análise elementar (em impurezas inorgânicas) como essencial para se garantir a tríade qualidade/segurança/eficácia dos medicamentos (UNITED States Pharmacopeia, 2017).

Desta forma, o controle das impurezas deve ser realizado desde a fase de desenvolvimento do medicamento até a rotina de produção pelo controle de qualidade, de modo a manter rastreado o aparecimento e/ou aumento de possíveis fontes de contaminações.

4.2 Solventes residuais

Solventes residuais em medicamentos são definidos pelo ICH como produtos químicos orgânicos voláteis utilizados ou produzidos durante a fabricação de substâncias ou excipientes empregados na síntese do princípio ativo ou na fabricação de medicamentos (ICH, 2016). Os solventes não são completamente removidos nas práticas de fabricação do princípio ativo. A seleção adequada do solvente para síntese da substância pode aumentar o rendimento ou determinar características como forma cristalina, pureza e solubilidade. Portanto, o solvente pode ser um parâmetro crítico no processo sintético.

Como não há benefício terapêutico com solventes residuais, todos devem ser removidos, na medida do possível, para atender às especificações de boas práticas de fabricação ou outros requisitos baseados na qualidade. As matérias primas e os medicamentos não devem conter níveis mais elevados de solventes residuais do que os dados de segurança. Para tanto, o ICH preconiza um limite toxicológico para cada solvente tanto na matéria prima quanto para o produto acabado (ICH, 2016).

4.3 Impurezas orgânicas e produtos de degradação

As impurezas orgânicas podem surgir durante o processo de fabricação do fármaco ou no seu posterior armazenamento. Elas podem ser classificadas como conhecidas ou desconhecidas, e incluem materiais de partida, reagentes, subprodutos, intermediários e produtos de degradação. Desta forma, podemos dizer que os produtos de degradação são um dos tipos de impurezas orgânicas (HOLM; ELDER, 2016)

Um número crescente de publicações têm mostrado a importância do estudo dos produtos de degradação, uma vez que a estabilidade de um medicamento pode impactar a formulação, o desenvolvimento de métodos analíticos, as especificações analíticas, as configurações de embalagem, a rotulagem, as condições de armazenamento e o prazo de validade do medicamento (DURGA RAO et al., 2010; ICH, 2014; PIETRAS et al., 2014).

4.4 A regulamentação quanto aos produtos de degradação

O FDA, em seu guia *Abbreviated New Drug Applications: Impurities in Drug Products* (ANDA), traz recomendações para apresentação quanto a sua notificação, identificação ou qualificação (ICH, 2006). A ANVISA também traz considerações semelhantes ao FDA na RDC nº 53 de 2015 (BRASIL, 2015).

O limite de notificação, segundo a ANVISA, é o valor acima do qual um produto de degradação deverá ser relatado no estudo de estabilidade do produto (BRASIL, 2015).

Os produtos de degradação classificados como identificados podem ser definidos como produto de degradação para o qual uma caracterização estrutural foi alcançada (ICH, 2006). A identificação dos produtos de degradação deve ser realizada com técnicas espectroscópicas de identificação aceitáveis para tal como infravermelho, ressonância magnética nuclear (RMN), espectrometria de massas e (Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS).

Para que uma substância possa ser considerada identificada pode-se comparar a análise cromatográfica de um padrão farmacopeico e da amostra que apresentem o mesmo tempo de retenção e o mesmo espectro de UV no método indicativo de estabilidade. Quando não houver padrões disponíveis comercialmente, pode-se elucidar o mecanismo de degradação proposto que leve a uma estrutura de confirmação com uma técnica espectroscópica de caracterização (espectria de massas, RMN, infravermelho) ou com a utilização de duas técnicas espectroscópicas (BRASIL, 2015).

O limite de qualificação de um produto de degradação é o valor acima do qual ele deverá ser qualificado. Consideramos sua qualificação como avaliação da segurança biológica, seja de um produto de degradação individual ou de um dado perfil de degradação em um nível especificado (BRASIL, 2015).

O ICH e a ANVISA também recomendam alguns critérios de aceitação para considerar um produto de degradação qualificado, tais como ser um produto de biotransformação significativo do fármaco; se os critérios de aceitação propostos podem ser justificados por literatura científica específica; ou se os níveis observados e os critérios de aceitação propostos não excedem o nível avaliado nos estudos toxicológicos realizados (BRASIL, 2015; ICH, 2006).

A qualificação de produtos de degradação deve ser realizada de acordo com seu poder de mutagenicidade e carcinogenicidade. Para a condução de ensaio de

qualificação de uma impureza de degradação é necessário que os estudos de segurança considerem a população de pacientes, a dose diária e a duração da administração do medicamento. Após realizar o estudo de segurança deve-se concluir e discutir a evidência de efeito adverso clinicamente relevante e a necessidade de reduzir as especificações para limites considerados seguros, além de avaliar se, diante dos estudos conduzidos, os limites adotados são considerados seguros.

Baseada nas diretrizes sugeridas pelo ICH, a ANVISA tem alertado quanto à necessidade de notificação, identificação e qualificação dos produtos de degradação no decorrer do estudo de estabilidade do medicamento (BRASIL, 2015; ICH, 2016). Para tanto, na RDC nº53 de 2015, a ANVISA traz considerações sobre o tema e o Quadro 1 exemplifica os limites de notificação.

	ATD	Limites (o que for menor)
Limites de notificação	≤1 g	0,1 %
	>1 g	0,05 %
Limites de identificação	< 1 mg	1,0 % de ATD
	1 mg - 10mg	0,5 % de ATD ou 20 µg
	> 10 mg – 2 g	0,2 % de ATD ou 2 mg
	> 2 g	0,10%
Limites de qualificação	< 10 mg	1,0 % de ATD ou 50 µg
	10 mg - 100 mg	0,5 % de ATD ou 200 µg
	> 100 mg - 2 g	0,2 % de ATD ou 3 mg
	> 2 g	0,15 %

Quadro 1: Limites de notificação, identificação e qualificação para produtos de degradação. ATD: administração total diária.

Segundo a resolução, deve-se considerar a administração total diária (ATD) como a quantidade máxima do insumo farmacêutico ativo administrado por dia, conforme bula. A partir das doses máximas, estabelecer-se os limites considerados

seguro para o paciente. Tais especificações devem ser adotadas para os produtos de degradação quantificados nos estudos de estabilidade dos medicamentos.

5. Métodos indicativos de estabilidade

De acordo com o FDA, um método indicativo de estabilidade é definido como um procedimento analítico, preciso e exato, capaz de determinar seus constituintes ativos e seus produtos de degradação (FDA, 2003).

A ANVISA apresenta uma definição mais completa na RDC nº 45, de 9 de agosto de 2012. No documento, consta que métodos analíticos quantitativos são indicados para análise de amostras de estabilidade, validados, capazes de detectar, ao longo do tempo, mudanças nas propriedades físicas, químicas ou microbiológicas de uma substância. Pode-se dizer também que são métodos seletivos, capazes de mensurar, com exatidão, o teor do insumo farmacêutico ativo, produtos de degradação e outros componentes de interesse, sem interferência (BRASIL, 2012) .

Portanto, os métodos indicativos de estabilidade devem ser utilizados para a avaliação de amostras de estudo de estabilidade. Dessa forma, os métodos de análises devem, por exemplo, ser capazes de identificar e quantificar tanto uma queda na dosagem do medicamento quanto o aparecimento de produtos de degradação por ele formados (BAERTSCHI, 2011).

Estes métodos devem atender aos requisitos necessários para que sejam validados. Devido às diferenças e erros analíticos inerentes às técnicas, os métodos devem sofrer o mínimo possível de interferência quanto à troca de pessoas que realizam os testes, aos equipamentos e demais instrumentos utilizados durante a análise. Um método validável deve ser considerado seletivo, linear, preciso, exato, sensível e robusto (BRASIL, 2017).

5.1 Estudos de balanço de massas

O estudo de balanço de massas é uma ferramenta científica para evidenciar e avaliar se o método é indicativo de estabilidade ou não.

O ICH define como balanço de massas o processo de adição do valor do ensaio e dos níveis de produtos de degradação para ver quão próximos estes somam 100 % do valor inicial, tendo em conta a margem de exatidão (ICH, 2003).

Do ponto de vista teórico, qualquer diminuição real na massa de composto principal após a degradação é necessariamente equivalente à massa total de todos os produtos de degradação formados. Em um sistema fechado, o balanço de massa ficaria assim assegurado se fossem utilizados métodos para quantificar com precisão todas as espécies presentes no material degradado e em seu ambiente. No entanto, o sistema fechado nunca é obtido. Por exemplo, a degradação pode produzir substâncias voláteis que escapam da matriz de amostra. A adsorção ou outras perdas físicas também podem resultar em erro na avaliação das quantidades de material degradado ou produzido (BAERTSCHI, ALSANTE, & REED, 2005).

A importância do balanço de massa pode ser verificada por diversas razões. Demonstrando que as perdas degradativas do fármaco inicial se correlacionam bem com o aumento medido dos produtos de degradação, infere-se que não existem produtos de degradação significativos não conhecidos. Por outro lado, se observarmos, por exemplo, uma perda de 20 % de fármaco original, mas apenas medidas de aumento de 5 % nos produtos de degradação, é provável que durante a degradação sejam formados produtos que não são precisamente determinados pelo dado método. Produtos de degradação desconhecidos podem comprometer a segurança do fármaco. Dessa forma, é importante a existência de métodos que detectem todos os principais produtos de degradação. Assim, a segurança é a principal razão para avaliar o balanço de massa.

A fim de demonstrar que os métodos analíticos são indicativos de estabilidade pode-se realizar uma simulação das possíveis degradações que o medicamento pode sofrer e, então, avaliar os resultados que tais métodos evidenciam. Um aumento nos produtos de degradação que se correlaciona com a perda do fármaco inicial ajuda a demonstrar que os métodos podem ser usados para avaliar com exatidão a degradação (HOLM; ELDER, 2016).

5.2 Estudos de degradação forçada

O teste de estresse tem sido reconhecido, há muito tempo, como uma parte importante do processo de desenvolvimento de um medicamento.

Desde 2003, o ICH expõe a importância do estudo dos produtos de degradação, sugerindo a exigência de identificação e de qualificação toxicológica em níveis muito baixos (ICH, 2003) .

A ANVISA define como estudo de degradação forçada o estudo que permite a geração de produtos de degradação através da exposição do insumo farmacêutico ativo e produto acabado a condições de estresse como, por exemplo, luz, temperatura, calor, umidade, hidrólise ácida / básica e oxidação. Esse estudo permite o desenvolvimento de métodos indicativos de estabilidade com seletividade adequada, bem como fornece informações das possíveis rotas de degradação de um determinado produto (BRASIL, 2015).

6. Conclusões

Os produtos de degradação ou impurezas farmacêuticas verificadas nos estudos de estabilidade devem ser notificados, identificados ou qualificados de acordo com o valor de teor obtido para as impurezas ou degradações. A segurança dos resultados do estudo de estabilidade somente é possível ao utilizar-se um método quantitativo validado que seja indicativo de estabilidade para analisar as amostras nos tempos de estabilidade definidos. O desenvolvimento de um método indicativo de estabilidade eficiente somente é possível com a realização do estudo de degradação forçada.

Um método analítico indicativo de estabilidade capaz de verificar os possíveis degradantes e as impurezas do produto é uma das formas de se promover a vigilância sanitária dos medicamentos e, com isso, garantir a segurança e a eficácia dos produtos farmacêuticos. Nesta linha, o ICH e a ANVISA têm modernizado e unificado suas legislações, principalmente após o convênio de harmonização entre os dois órgãos firmado em 2016 (BRASIL,2009).

Referência

ATKINS, P.; JONES, L. **Princípios de química**: Questionando a vida moderna e o meio ambiente. 3. ed. Porto Alegre: Bookman, p. 100-121, 2006.

BAERTSCHI, S. W. **Pharmaceutical stress testing**: Predicting drug degradation. 5. ed. New York: CRC Press, p. 601, 2011.

BALARAM, V. Recent advances in the determination of elemental impurities in pharmaceuticals - Status, challenges and moving frontiers. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 80, p. 83–95, 2016.

BRASIL. **Lei n. 9.782, 26 de janeiro de 1999**. Define o Sistema Nacional de Vigilância Sanitária, cria a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, e dá outras providências, 1999. Disponível em: <<http://www.legislacao.pr.gov.br/legislacao/listarAtosAno.do?action=exibir&codAto=5849&codItemAto=40340>>. Acesso em: 15 nov. 2016.

BRASIL. **Resolução de Diretoria Colegiada - RDC n. 37, de 6 de julho de 2009 - ANVISA**. Trata da admissibilidade das Farmacopéias estrangeiras, 2009a. Disponível em http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/res0037_06_07_2009.pdf/bea487de-4eb5-413d-913b-4c71b3109ec6; Acesso em 16 nov, 2017.

BRASIL. **Resolução de Diretoria Colegiada - RDC n. 4, de 10 de fevereiro de 2009 - ANVISA**. Dispõe sobre as normas de farmacovigilância para os detentores de registro de medicamentos de uso humano, 2009b. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/res000.pdf>; Acesso em: 16 nov, 2017.

BRASIL. **Resolução de Diretoria Colegiada - RDC n. 45, de 09 de agosto de 2012 - ANVISA**. Dispõe sobre a realização de estudos de estabilidade de insumos farmacêuticos ativos, 2012. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2012/rdc0045_09_08_2012.html; Acesso em: 15 out, 2016.

BRASIL. **Resolução de diretoria Colegiada - RDC n. 58, de 20 de dezembro de 2013 - ANVISA**. Estabelece 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, 2013. Disponível em:

<http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2013/rdc0058.pdf>; Acesso em: 15 out, 2016.

BRASIL. **Resolução de Diretoria Colegiada - RDC n. 53, de 04 de dezembro de 2015 - ANVISA**. Estabelece 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, 2015. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2867975/%281%29RDC_34_2014_COMP.pdf/ddd1d629-50a5-4c5b-a3e0-db9ab782f44a>; Acesso em: 15 out, 2016.

BRASIL. **Resolução de Diretoria Colegiada - RDC n. 166, de 24 de julho de 2017 - ANVISA**. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências, 2017. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2721567/RDC_166_2017_COMP.pdf/d5fb92b3-6c6b-4130-8670-4e3263763401; Acesso em: 15 dez, 2017.

BRUNTON, L. L.; CHABNER, B. A.; KNOLLMANN, B. C.; **The pharmacological basis of therapeutics**. 13. ed. San Diego: McGraw-Hill Education, p. 968-969, 2011.

RAO, D. D.; KALYANARAMAN, L.; SAIT, S. S.; RAO, P. V.; A validated stability-indicating normal phase LC method for clopidogrel bisulfate and its impurities in bulk drug and pharmaceutical dosage form. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 52, n. 1, p. 160–165, 2010.

EMERCE, E.; COK, I.; DEGIM, I. T. Determination of the impurities in drug products containing montelukast and in silico/in vitro genotoxicological assessments of sulfoxide impurity. **Toxicology Letters**, v. 238, n. 2, p. 90–99, 2015.

FOOD and Drug Administration, **FDA**, guidance for industry: Q1A(R2) stability testing of new drug substances and products, 2003. Disponível em: <https://www.fda.gov/downloads/drugs/guidances/ucm073369.pdf>; Acesso em: 15 set, 2016.

FOOD and Drug Administration, **FDA**, guidance for industry. pharmaceutical CGMP regulations guidance for industry, 2006. Disponível em: <https://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/UCM070337.pdf>; Acesso em: 6 set, 2016.

HOLM, R.; ELDER, D. P. Analytical advances in pharmaceutical impurity profiling. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 87, p. 118–135, 2016.

INTERNATIONAL Conference on Harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use. **ICH Q1A(R2)** - stability testing of new drug substances and products. November, 2005. Disponível em: https://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q1A_R2/Step4/Q1A_R2__Guideline.pdf; Acesso em: 16 out, 2016.

INTERNATIONAL Conference on Harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use. **ICH Q9** - quality risk management. November, 2005. Disponível em: https://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q9/Step4/Q9_Guideline.pdf; Acesso em: 16 out, 2016.

INTERNATIONAL Conference on Harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use. **ICH Q3B(R2)** - impurities in new drug products. June, 2016. Disponível em: https://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q3B_R2/Step4/Q3B_R2__Guideline.pdf; Acesso em: 1 dez, 2016.

INTERNATIONAL Conference on Harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use. **ICH Q3D** - guideline for elemental impurities. December, 2014. Disponível em: https://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q3D/Q3D_Step_4.pdf; Acesso em: 1 dez, 2017.

INTERNATIONAL Conference on Harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use. **ICH Q3C(R6)** - guideline for residual solvents. October, 2016. Disponível em: http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q3C/Q3C_R6__Step_4.pdf; Acesso em: 1 dez, 2017.

INTERNATIONAL Conference on Harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use. **ICH S5(R3)** - detection of toxicity to reproduction for human pharmaceuticals, July, 2017. Disponível em: http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Safety/S5/S5-R3EWG_Step2_Guideline_2017_0705.pdf; Acesso em: 1 dez, 2017.

GALEA, C.M.; DIDION, D.; CLICQ, D.; MANGELINGS, D.; HEYDEN, Y. V.; Method optimization for drug impurity profiling in SFC: Application to a pharmaceutical mixture. **Journal of Chromatography A**, v. 1526, p. 128–136, 2017.

PIETRAŚ, R.; KOWALCZUK, D.; RUTKOWSKA, W.; KOMSTA, L.; GUMIENICZEK, A.; Validated stability-indicating HPTLC method for the determination of propafenone hydrochloride in tablets and the GC-MS identification of its degradation products. **Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies**, v. 37, n. 20, p. 2942–2955, 2014.

SINGAL, A. G.; HIGGINS, P. D. R.; WALJEE, A. K. A primer on effectiveness and efficacy trials. **Clinical and Translational Gastroenterology**, v. 5,n 45, p. 1-3, 2014.

UNITED States Pharmacopeia. 40. ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2017. p. 8065–8069.

Capítulo II: APLICAÇÃO DOS MÉTODOS FARMACOPÉICOS DE CLORIDRATO DE PROPAFENONA PARA A AVALIAÇÃO DA INDICAÇÃO DE ESTABILIDADE.

1. Introdução

1.1 Cloridrato de propafenona

O nome químico do cloridrato de propafenona (Figura 1), conforme a Farmacopeia Americana é cloridrato de 1-[2-[2-hidroxi-3-(propilamino)propoxi] fenil]-3-fenil-1-propanona. Sua fórmula molecular é $C_{21}H_{28}ClNO_3$ e sua massa molar é 377,9 g/mol. Sua aparência pode ser descrita como pó cristalino fino de branco a quase branco. É solúvel em álcoois alifáticos, tetracloreto de carbono e água quente. Pouco solúvel em água fria e clorofórmio. Insolúvel em éter e tolueno. Apresenta constante de ionização a 25°C igual a 9,6 e seu coeficiente de partição (log P) igual a 3,5 ("Chemicalize", 2017, UNITED States Pharmacopeia, 2017). No sistema de classificação biofarmacêutica é classificado como fármaco de classe II, ou seja, apresenta baixa solubilidade e alta permeabilidade (KHAN, 2001).

Figura 1: Estrutura química do cloridrato de propafenona.

Fonte: (UNITED States Pharmacopeia, 2017)

O cloridrato de propafenona é utilizado no tratamento de arritmias supraventriculares e ventriculares, apresentando-se como bloqueadores dos canais de sódio, além de proporcionar efeito antagonista de betareceptores (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2011). Clinicamente é um fármaco útil na reversão aguda da fibrilação arterial como na manutenção do ritmo sinusal cardíaco, tanto para pacientes adultos quanto para uso pediátrico. É uma medicação segura em pacientes com coração estruturalmente normal (MAGALHÃES et al., 2016). As doses comumente utilizadas na terapêutica são 150 e 300 mg, até três vezes ao dia, respeitando sua dose máxima de 900 mg por dia. Os principais efeitos adversos são

a depressão moderada da contratilidade miocárdica, gosto metálico, visão borrada, náusea, constipação, tontura, agranulocitose. Diversos trabalhos ressaltam que apesar do cloridrato de propafenona se tratar de um medicamento seguro, alguns efeitos adversos podem ser intensificados com o aumento de dose (HOFMANN et al., 2000; PREVOT et al., 1992). Considerando que alguns efeitos adversos podem ser ocasionados por produtos de degradação, justifica-se a pesquisa de métodos analíticos confiáveis para produtos de degradação para que possa monitorá-los adequadamente (BAERTSCHI, 2011; MELLO et al., 2014).

Diversos métodos para quantificação do cloridrato em propafenona são encontrados na literatura (LAMPRECHT; STOSCHITZKY, 2009; PREVOT et al., 1992). Pietras et al desenvolveu um método de quantificação de produtos de degradação de cloridrato de propafenona por cromatografia de camada delgada de alta eficiência (HPTLC) (PIETRAS et al., 2014).

A Farmacopéia Britânica traz a monografia do insumo farmacêutico ativo em seu compêndio oficial desde 2005 (BRITISH Pharmacopoeia, 2017). Já a Farmacopeia Americana, desde 2009, traz dentre suas monografias oficiais, além da monografia do insumo farmacêutico ativo, a monografia de comprimidos e cápsulas de liberação prolongada.

A necessidade que os métodos de quantificação confiáveis, tanto do insumo farmacêutico ativo quanto de suas impurezas, sejam indicativos de estabilidade estão intimamente ligadas a qualidade e segurança do medicamento. Desta forma, a avaliação destes métodos oficiais se torna importante no atual contexto mundial globalizado, em que medicamentos são produzidos e exportados para todo o mundo. Os métodos devem ser capazes de identificar os produtos de degradação formados, garantindo na formulação limites seguros para o paciente (BAERTSCHI, 2011; BRASIL, 2015; ICH, 2006).

1.2 Planejamento do estudo de degradação forçada

Os métodos estatísticos oferecem importantes ferramentas que auxiliam na avaliação dos dados e determinação da finalidade dos resultados para que sejam considerados válidos, cientificamente. Contudo, para que estes sejam adequados e confiáveis, é necessário um correto planejamento do estudo. Uma das ferramentas utilizadas na otimização do número de ensaios é o planejamento fatorial.

O planejamento fatorial é adequado para estudar, de forma eficiente e econômica, o efeito conjunto de vários fatores sobre uma variável resposta de interesse. De um modo geral, cada fator pode ser observado em vários níveis. Para uma melhor compreensão, pode-se definir fator como o que está sendo medido para avaliar a resposta. Porém, estes fatores só podem receber um número limitado de valores possíveis, conhecidos como níveis de fatores (MINITAB INC, 2016).

Estes fatores podem ser avaliados em seus diversos níveis, de modo a verificar a sua influência na resposta. Assim sendo, se temos dois fatores, por exemplo a temperatura T com 2 níveis e a pressão P também com 2 níveis, teremos as seguintes combinações para ensaios (RODRIGUES; IEMMA, 2009).

T1	P1	T1	P2
T2	P1	T2	P2

Se T tem 3 níveis e P tem dois níveis, temos:

T1	P1	T1	P2
T2	P1	T2	P2
T3	P1	T3	P2

Rodrigues e Iemma em *Planejamento de experimentos e otimização de processos* expõem o número de ensaios, tratamento ou combinações de alguns esquemas fatoriais completos, conforme Tabela 1. Nele pode-se verificar que considerando k o número de fatores em estudo, cada qual com seu N níveis, denota-se um esquema fatorial completo. (RODRIGUES; IEMMA, 2009).

Tabela 1: Número de ensaios tratamento ou combinações de alguns esquemas fatoriais completos.

Níveis	Fatores						
	k=2	k=3	k=4	k=5	k=6	k=7	... k=K
2	$2^2 = 4$	$2^3 = 8$	$2^4 = 16$	$2^5 = 32$	$2^6 = 64$	$2^7 = 128$	... 2^k
3	$3^2 = 9$	$3^3 = 27$	$3^4 = 81$	$3^5 = 243$	$3^6 = 729$	$3^7 = 2187$	... 3^k
...	...	...	...	...	...	...	...
N	N^2	N^3	N^4	N^5	N^6	N^7	... N^k

Fonte: Planejamento de experimentos & otimização de processos (RODRIGUES; IEMMA, 2009).

2. Objetivos

O objetivo deste trabalho é avaliar a suscetibilidade do insumo farmacêutico ativo cloridrato de propafenona submetidos a condições de estresse alcalino, ácido, oxidativo, temperatura e umidade.

Utilizar os métodos cromatográficos descritos na Farmacopeia Americana nos estudos de estresse e avaliar se os métodos oficiais são indicativos de estabilidade. Almeja-se a determinação de seus principais produtos de degradação por meio dos métodos indicativos de estabilidade e conferi-las através dos estudos de balanço de massas.

3. Material e métodos

3.1 Material

3.1.1. Equipamentos

Sistema de cromatografia líquida de alta eficiência, Shimadzu (Class-VP) equipado com desgaseificador “*on line*”, com duas bombas binárias, injetor automático com alça (loop) de 50 µL e detector UV-Vis SPD-M 10Avp do tipo DAD (detector arranjo de diodos);

Aparelho de ultrassom (Quimis Q3360); balança analítica com precisão de quatro casas decimais (Mettler Toledo AB204);

Câmara Climática Mecalor, modelo EC/1,2/ AR-URC, São Paulo, Brasil, nas condições de 50°C +/- 2°C de temperatura e 90,0 % +/- 5,0 % de umidade relativa e 70°C +/- 2°C de temperatura e 75,0 % +/- 5,0 % de umidade relativa.

Câmara de fotodegradação: Weiss VP500L, França, com lâmpadas de luzes UV e brancas.

Filtro seringa de PVDF, 25 mm de diâmetro e 0,45 µm de tamanho de poro.

HPLC Shimadzu acoplado a Amazon speed ETD Bruker Daltonics, Fonte ESI, Ion Trap de baixa resolução, MS e MS.

3.1.2. Solventes e reagentes

Durante a execução dos ensaios foram utilizados os solventes e reagentes do grau cromatográficos ou para análise (P.A.), a saber:

Acetonitrila grau cromatográfico, JT Baker[®], (Pensilvânia, Estados Unidos da América);

Fosfato de potássio monobásico anidro, Synth, (Diadema, Brasil);

Fosfato de hidrogênio dipotássico anidro, Merck, (Rödermark, Alemanha);

Ácido fosfórico, Merck, (New Jersey, Estados Unidos da América);

Ácido clorídrico, Merck, (New Jersey, Estados Unidos da América);

Hidróxido de sódio, Synth[®], (Diadema, Brasil);

Peroxido de hidrogênio, Synth[®], (Diadema, Brasil);

Água ultrapura - Milli Q Plus[®], (New Jersey, Estados Unidos da América);

3.1.3. Padrões e amostra

O padrão utilizado foi o cloridrato de propafenona – insumo farmacêutico ativo de referência produzida pela Erregierre SPA, Itália lote 5675P cuja pureza declarada é de 99,8 %. Utilizou-se também a impureza cloridrato de propafenona impureza B fornecida pela Farmacopeia Americana (USP) lote HOF438.

A amostra simulada contendo cloridrato de propafenona foi baseada no medicamento referência Ritmonorm[®], que apresenta como excipientes: amido, celulose microcristalina, croscarmelose sódica, estearato de magnésio, hipromelose, macrogol 4000 e dióxido de titânio. Tal formulação, segue os constituintes conforme bula cadastrada na ANVISA, nomeada BU_07_Ritmonorm_bula_profissional_FINAL, e as proporções conforme descritos na Tabela 1 (RITMONORM, 2016). A composição quantitativa seguiu conforme composição farmacotécnica estabelecida por PRISTA et al, 1991. Um placebo foi preparado com uma formulação contendo todos os excipientes exceto o insumo farmacêutico ativo.

Tabela 1: Componentes qualitativos e quantitativos simulados para a formulação referência de cloridrato de propafenona 300 mg.

Componente da formulação	Proporção (%)
Amido pré-gelatinizado	5,00
Celulose microcristalina 102	17,0
Croscarmellose sódica	5,00
Estearato de magnésio	0,500
Hipromelose LV	1,25
Macrogol 4000	1,25
Dióxido de titânio	0,500
Cloridrato de propafenona	69,5

3.1.4. Soluções auxiliares

Foram utilizados soluções

3.2. Métodos

3.2.1 Método para quantificação do cloridrato de propafenona em comprimidos.

Para o teste de doseamento de cloridrato de propafenona em comprimidos foi utilizado o método cromatográfico cujo as condições analíticas estão descritas na Tabela 3. Os ensaios foram realizados com amostra simulada.

Tabela 3: Método de doseamento de propafenona HCl comprimidos da Farmacopeia Americana (UNITED States Pharmacopeia, 2017).

Fase móvel	Tampão fosfato de potássio monobásico pH 3,1: Acetonitrila (68/32, v/v)
Diluyente	Fase móvel
Comprimento de onda	UV - 250 nm
Coluna	4,6 x 150 mm (5 µm) – YMC – Pack Pró-C18
Temperatura do forno da coluna	45°C
Vazão	1,2 mL / min
Volume de injeção	20 µL
Concentração do padrão e amostra	0,15 mg/mL

Fonte:(UNITED States Pharmacopeia, 2017).

A) Preparo das soluções utilizadas:

- Tampão fosfato de potássio monobásico pH 3,1

Pesou-se 13,6 g de fosfato de potássio monobásico e solubilizou-se em 900 mL de água. Ajustou-se o pH a 3,1 com ácido fosfórico (10 %) e completou-se o volume para um litro. Homogeneizou-se a solução tampão e filtrou-se através de membrana de PVDF de 0,45 µm porosidade. Desgaseificou-se a solução final, antes de utilização.

- Diluyente

Misturou-se quantitativamente 320 mL do tampão fosfato de potássio monobásico pH 3,1 com 680 ml de acetonitrila. Desgaseificou-se a solução final, antes de utilização.

- Solução padrão

Pesou-se analiticamente e transferiu-se 15,00 mg de cloridrato de propafenona substância referência para um balão de 100 mL. Diluiu-se com cerca de 90 mL do diluyente e submeteu-se ao banho de ultrassom por 10 minutos. Aguardou-

se chegar a temperatura ambiente, completou-se o balão volumétrico com diluente e homogeneizou-se. Filtrou-se por uma membrana de PVDF 0,45 µm descartou-se os primeiros 5 mL. A concentração obtida foi de 0,15 mg/mL de cloridrato de propafenona.

- Solução amostra

Pesou-se analiticamente e transferiu-se o equivalente a 37,50 mg de cloridrato de propafenona amostra simulada (cerca de 56,25 mg do pó) para um balão volumétrico de 25 mL. Diluiu-se com cerca de 20 mL do diluente e submeteu-se ao banho de ultrassom por 10 minutos. Aguardou-se chegar a temperatura ambiente e agitou-se mecanicamente por mais 10 minutos. Completou-se o volume do balão, homogeneizou-se e filtrou-se por uma membrana de PVDF 0,45 µm descartando-se os primeiros 5 mL. Transferiu-se 1 mL deste filtrado para um balão volumétrico de 10 mL e completou-se com diluente. A concentração final desta amostra foi de 0,15 mg/mL.

B) Condições de adequabilidade do sistema

A Farmacopeia Americana condiciona a validade da análise através das condições de adequabilidade do sistema. Estes critérios devem ser atendidos para que se possa ter uma análise confiável. As condições impostas para esta metodologia foram o fator cauda do pico relativo ao cloridrato de propafenona e o DPR (desvio padrão relativo) das áreas obtidas por injeções consecutivas do mesmo, conforme apresentadas na Tabela 4 (UNITED States Pharmacopeia, 2017).

Tabela 4: Parâmetros para avaliação da adequabilidade do sistema cromatográfico.

	Fator de cauda	DPR
Cloridrato de propafenona	≤ 2,0.	≤ 2%.

Fonte:(UNITED States Pharmacopeia, 2017)

C) Cálculo dos resultados do teste de doseamento

O cálculo da porcentagem de cloridrato de propafenona presente na amostra foi realizado de acordo com a equação 1:

$$\frac{AA}{AP} \times \frac{MP}{DP} \times PP \times \frac{DA}{MA} \times 100 = \% \text{ cloridrato de propafenona (1)}$$

Em que: AA: é a área do pico de cloridrato de propafenona no cromatograma da amostra; AP é a média das áreas de cloridrato de propafenona dos seis cromatogramas da solução padrão; MP é a tomada de ensaio de cloridrato de propafenona da solução padrão (em mg); DP é a diluição da solução padrão; PP é a potência em decimal de cloridrato de propafenona na substância padrão; DA é a diluição da solução amostra; MA é a tomada de ensaio de cloridrato de propafenona da solução amostra (em mg); 100 é o fator de conversão para o resultado em %.

3.2.2 – Método para quantificação dos produtos de degradação de cloridrato de propafenona em comprimidos.

Para o teste de produtos de degradação de cloridrato de propafenona em comprimidos foi utilizado o método cromatográfico cujas condições analíticas estão descritas na Tabela 5. Os ensaios foram realizados com a amostra simulada, em que cada 375 mg do pó continha 250 mg de cloridrato de propafenona.

Tabela 5: Método de produtos de degradação em cloridrato de propafenona comprimidos da Farmacopeia Americana.

Fase Móvel	Fase móvel A: tampão hidrogenofosfato dipotássio anidro em pH 2,5 Fase móvel B: Acetonitrila conforme Tabela 6.
Diluyente	Fase móvel A e B (65:35, v/v)
Comprimento de onda	UV - 220 nm
Coluna	3,9 x 150 mm (4 µm) – YMC Pack ODS -C18
Temperatura do forno	30°C
Fluxo	1 mL/min
Volume de injeção	20 µL

Fonte: (UNITED States Pharmacopeia, 2017)

Tabela 6: Condições cromatográficas em modo gradiente de fase móvel.

Tempo (min)	Fase Móvel A (%)	Fase Móvel B (%)
0	71	29
8	71	29
20	29	71
30	29	71
31	71	29
36	71	29

Fonte: (UNITED States Pharmacopeia, 2017)

A) Preparo das soluções utilizadas:

- Tampão hidrogenofosfato dipotássio pH 2,5 – fase móvel A

Pesou-se 2,61 g de hidrogenofosfato dipotássico anidro e solubilizou-se em 900 mL de água. Ajustou-se o pH a 2,5 com ácido fosfórico (10%) e completou-se o volume para um litro. Homogeneizou-se a solução tampão e filtrou-se através de membrana de PVDF de 0,45 µm. Desgaseificou-se a solução final, antes de utilização.

- Diluente

Misturou-se quantitativamente 650 mL do tampão hidrogenofosfato dipotássio anidro em pH 2,5 com 350 mL de acetonitrila. Desgaseificou-se a solução final, antes de utilização.

- Solução adequabilidade do sistema

Pesou-se analiticamente e transferiu-se 5,00 mg de cloridrato de propafenona e 5,00 mg de cloridrato de propafenona composto relacionado B para um balão de 50 mL. Diluiu-se com cerca de 40 mL do diluente e submeteu-se ao banho de ultrassom por 10 minutos. Aguardou-se chegar a temperatura ambiente e completou-se o volume do balão volumétrico com diluente e homogeneizou-se. Filtrou-se por uma membrana de PVDF 0,45 µm descartando os primeiros 5 mL. As concentrações obtidas foram de 0,10 mg/mL de cloridrato de propafenona e 0,10 mg/mL de cloridrato de propafenona composto relacionado B.

- Solução padrão

Pesou-se analiticamente e transferiu-se 10,00 mg de cloridrato de propafenona substância referência para um balão de 100 mL. Diluiu-se com cerca de 90 mL do diluente e submeteu-se ao banho de ultrassom por 10 minutos. Aguardou-se chegar a temperatura ambiente e completou-se o volume do balão volumétrico com diluente e homogeneizou-se. Transferiu-se, volumetricamente, 1,00 mL desta solução para um balão volumétrico de 100 mL e completou-se o volume do balão volumétrico com diluente e homogeneizou-se. Filtrou-se por uma membrana de PVDF 0,45 µm descartando os primeiros 5 mL. A concentração obtida foi de 1,00 µg/mL de cloridrato de propafenona.

- Solução amostra

Pesou-se analiticamente e transferiu-se o equivalente a 25,00 mg de cloridrato de propafenona amostra simulada (cerca de 37,5 mg do pó) para um balão volumétrico de 25 mL. Diluiu-se com cerca de 15 mL do diluente e submeteu-se ao banho de ultrassom por 10 minutos. Aguardou-se chegar a temperatura ambiente e completou-se o volume do balão volumétrico com diluente e homogeneizou-se por mais 10 minutos. Filtrou-se por uma membrana de PVDF 0,45 µm descartando os primeiros 5mL. A concentração obtida foi cerca de 1,00 mg/mL de cloridrato de propafenona.

B) Condições de adequabilidade do sistema

A Farmacopeia Americana condiciona a validade da análise por meio das condições de adequabilidade do sistema. Estes critérios devem ser atendidos para que se possa ter uma análise confiável. As condições impostas para esta metodologia foram: resolução entre os picos de cloridrato de propafenona e seu composto relacionado B, o fator cauda do pico relativo ao cloridrato de propafenona e o DPR das áreas obtidas por injeções consecutivas do mesmo e estão apresentadas na Tabela 7 (UNITED States Pharmacopeia, 2017).

Tabela 7: Parâmetros para avaliação da adequabilidade do sistema cromatográfico para o método de produtos de degradação em cloridrato de propafenona.

	Resolução	Fator de cauda	DPR
Cloridrato de propafenona	Mínimo: 3 entre cloridrato de propafenona e impureza B	≤ 2,0 na solução padrão	≤ 5% para a solução padrão

Fonte: (UNITED States Pharmacopeia, 2017)

C) Cálculo dos resultados

O cálculo da porcentagem de produto de degradação de cloridrato de propafenona presente na amostra, foi realizado conforme equação 2:

$$\frac{AA}{AP} \times \frac{MP}{DP} \times PP \times \frac{DA}{MA} \times 100 = \% \text{ de produto de degradação (2)}$$

Em que: AA: é a área do pico de produto de degradação no cromatograma da amostra; AP é a média das áreas de cloridrato de propafenona dos seis cromatogramas da solução padrão; MP é a tomada de ensaio de cloridrato de propafenona da solução padrão (em mg); DP é a diluição da solução padrão; PP é a potência em decimal de cloridrato de propafenona na substância padrão; DA é a diluição da solução amostra; MA é a tomada de ensaio de cloridrato de propafenona da solução amostra (em mg); 100 é o fator de conversão para o resultado em %.

3.2.3 Métodos para quantificação de cloridrato de propafenona e seus produtos de degradação estatisticamente desenhados

A fim de se estudar a suscetibilidade do princípio ativo em meios de degradação diversos e de se realizar uma avaliação tanto qualitativa quanto quantitativa em relação aos produtos de degradação, foi planejado um estudo fatorial.

Tanto as agências reguladoras quanto a literatura científica sugerem diversos meios para a simulação da degradação forçada, durante a vida útil do medicamento. Os principais meios sugeridos são solução de ácido clorídrico, solução de hidróxido de sódio, solução de peróxido de hidrogênio, bem como a exposição do medicamento as condições adversas de luz, temperatura e umidade (BAERTSCHI, 2011; BRASIL, 2015; ICH, 2003) .

O planejamento de experimentos para os estudos de degradação foi realizado utilizando-se o software Minitab 17®. Um delineamento fatorial com duas variáveis, X₁ (intensidade) e X₂ (tempo), foi realizado para degradação ácida, alcalina, oxidativa e temperatura/umidade. Tanto as concentrações dos meios quanto o tempo de exposições aos meios foram estudados em três níveis (baixo, médio e alto) e os valores foram codificados para facilitar as análises estatísticas (Tabela 8) Considerando duas variáveis (intensidade e tempo) e três níveis, um planejamento fatorial 3² foi conduzido, assim perfazendo nove experimentos, para cada meio de

degradação forçada (MINITAB INC, 2016). Para obter resultados consistentes e confiáveis, todos os ensaios relativos a degradação forçada do cloridrato de propafenona foram realizados em duplicatas.

Tabela 8: O planejamento fatorial, com dois fatores e em três níveis, utilizados para os ensaios de degradação forçada do cloridrato de propafenona.

	Fatores					
	Intensidade (X ₁)			Tempo (X ₂)		
Valor codificado*	-1	0	1	-1	0	1
HCl	1 N	2 N	5 N	1 hora	3 horas	6 horas
NaOH	1 N	2 N	5 N	1 hora	3 horas	6 horas
H ₂ O ₂	10 %	25 %	50 %	1 hora	3 horas	6 horas
Temperatura/ Umidade	50°C / 75 % UR	70°C a seco	70°C / 75 % UR	7 dias	15 dias	30 dias
Luz	NA	NA	NA	1 ciclo	2 ciclos	3 ciclos

*Códigos utilizados no Minitab® para designar os diversos níveis. (NA – Não aplicável).

As concentrações dos meios e intensidades utilizadas foram embasadas em estudos de estabilidade do insumo farmacêutico ativo de forma que se obtivesse uma degradação suficiente para que fosse formados produtos de degradação (PIETRAŚ et al., 2014).

Para a degradação forçada com exposição a luz, foram realizadas três degradações fotolíticas separadas, consideradas um, dois e três ciclos da câmara de fotodegradação. Os ciclos constituem-se na exposição à luz UV e luz branca. As amostras do cloridrato de propafenona foram expostas até que a quantidade de luz não fosse menor que 1,2 milhão de luz hora por ciclo (FDA, 2003)

Os resultados foram avaliados de acordo com a influência de cada meio sobre a amostra simulada e a somatória das impurezas formadas no cada meio. Assim como foi avaliada a capacidade do método em separar, identificar e/ou quantificar os produtos de degradação formados.

3.2.4 Método de preparo de amostras para a degradação forçada

- Degradação ácida

Para o teste de doseamento, pesou-se analiticamente a massa da amostra simulada equivalente a 37,5 mg de cloridrato de propafenona (cerca de 56,3 mg do pó), dissolveu-se em cerca de 5,00 mL de acetonitrila e em seguida adicionou-se 10,0 mL de HCl (X_1N) durante um período de X_2 horas, separadamente. Após o período do estresse ácido, neutralizou-se as amostras com equivalente volume e concentração de NaOH de forma a se obter o volume final de 25 mL. Transferiu-se uma alíquota de 1,00 mL desta solução para um balão volumétrico de 10 mL e completou-se o volume com a fase móvel. A concentração final foi de 0,150 mg/mL de cloridrato de propafenona.

Para os testes de produtos de degradação, pesou-se analiticamente a massa da amostra simulada equivalente a 250,0 mg de cloridrato de propafenona (cerca de 375,0 mg do pó) e dissolveu-se em cerca de 5 mL de acetonitrila e em seguida adicionou-se 10,0 mL de HCl (X_1N) durante um período de X_2 horas, separadamente. Após o período do estresse ácido, neutralizou-se as amostras com equivalente volume e concentração de NaOH de forma a se obter o volume final de 25 mL. Transferiu-se uma alíquota de 1,0 mL desta solução para um balão volumétrico de 10 mL e completou-se o volume com a fase móvel. A concentração final foi de 1,00 mg/mL de cloridrato de propafenona.

-Degradação alcalina

Para o teste de doseamento, pesou-se analiticamente a massa da amostra simulada equivalente a 37,5 mg de cloridrato de propafenona (cerca de 56,3 mg do pó), dissolveu-se em cerca de 5 mL de acetonitrila e em seguida adicionou-se 10,0 mL de NaOH (X_1N) durante um período de X_2 horas, separadamente. Após o período do estresse alcalino, neutralizou-se as amostras com equivalente volume e concentração de HCl de forma a se obter o volume final de 25 mL. Transferiu-se uma alíquota de 1,00 mL desta solução para um balão volumétrico de 10 mL e completou-se o volume com a fase móvel. A concentração final foi de 0,10 mg/mL de cloridrato de propafenona.

Para os testes de produtos de degradação, pesou-se analiticamente a massa da amostra simulada equivalente a 250,0 mg de cloridrato de propafenona (cerca de

375,0 mg do pó) e dissolveu-se em cerca de 5 mL de acetonitrila e em seguida adicionou-se 10,0 mL de NaOH (X_1N) durante um período de X_2 horas, separadamente. Após o período do estresse alcalino, neutralizou-se as amostras com equivalente volume e concentração de HCl de forma a se obter o volume final de 25 mL. Transferiu-se uma alíquota de 1,00 mL desta solução para um balão volumétrico de 10 mL e completou-se o volume com a fase móvel. A concentração final foi de 1,00 mg/mL de cloridrato de propafenona.

- Degradação oxidativa

Para o teste de doseamento, pesou-se analiticamente a massa da amostra simulada equivalente a 37,5 mg de cloridrato de propafenona (cerca de 56,3 mg do pó), dissolveu-se em cerca de 5 mL de acetonitrila e em seguida adicionou-se 20,0 mL de H_2O_2 (X_1N) durante um período de X_2 horas, separadamente. O volume final desta solução foi de 25 mL. Após o período do estresse oxidativo, transferiu-se uma alíquota de 1,00 mL desta solução para um balão volumétrico de 10,0 mL e completou-se o volume com a fase móvel. A concentração final foi de 0,150 mg/mL de cloridrato de propafenona.

Para os testes de produtos de degradação, pesou-se analiticamente a massa da amostra simulada equivalente a 250,0 mg de cloridrato de propafenona (cerca de 375,0 mg do pó) e dissolveu-se em cerca de 5 mL de acetonitrila, e em seguida, adicionou-se 10,0 mL de H_2O_2 (X_1N) durante um período de X_2 horas, separadamente. O volume final desta solução foi de 25 mL. Após o período do estresse oxidativo, transferiu-se uma alíquota de 1,00 mL desta solução para um balão volumétrico de 10 mL e completou-se o volume com a fase móvel. A concentração final foi de 1,00 mg/mL de cloridrato de propafenona.

- Degradação térmica

Para o teste de doseamento e os testes de produtos de degradação, pesou-se a massa da amostra simulada equivalente a 37,5 mg e 250,0 mg para os testes de doseamento e produtos de degradação, respectivamente, e embalou-se em frascos de vidro semi-abertas. Submeteu-se a câmaras climáticas, e após um período pré-definido, retirou-se e dissolveu-se as amostras em 25,0 mL da fase móvel, separadamente. Após o período do estresse térmica, transferiu-se uma alíquota de 1,00 mL desta solução para um balão volumétrico de 10 mL e completou-se o volume com a fase móvel. A concentração final foi de 0,150 mg/mL e 1,00 mg/mL de cloridrato

de propafenona para os testes de doseamento e produtos de degradação, respectivamente.

- Fotodegradação

Para o teste de doseamento e os testes de produtos de degradação, pesou-se a massa da amostra simulada equivalente a 37,5 mg e 250,0 mg para os testes de doseamento e produtos de degradação, respectivamente, e embalou-se em plástico de polietileno transparente. Submeteu-se à câmara de fotodegradação e após um período pré-definido, retirou-se e dissolveu-se as amostras em 25,0 mL da fase móvel, separadamente. Após o período de fotodegradação, transferiu-se uma alíquota de 1,00 mL desta solução para um balão volumétrico de 10 mL e completou-se o volume com a fase móvel. A concentração final foi de 0,150 mg/mL e 1,00 mg/mL de cloridrato de propafenona para os testes de doseamento e produtos de degradação, respectivamente.

3.2.5 Método de balanço de massa

Segundo Baertschi et al, o estudo de balanço de massas pode ser realizado a partir do cálculo do déficit de balanço de massa absoluta (DBMA). O déficit de balanço de massa absoluta é calculado baseado na diferença entre a quantidade medida da substância ativa e as impurezas formadas:

$$DMBA = (M_{P,0} - M_{P,x}) - (M_{1,x} - M_{1,0})$$

Em que:

$M_{P,0}$ representa a massa da substância ativa inicial; $M_{P,x}$ representa a massa da substância ativa após a degradação; $M_{1,0}$ representa a massa da impureza inicial e $M_{1,x}$ representa a massa da impureza após a degradação.

O valor do balanço de massa pode mostrar o quanto o método está adequado para quantificar as impurezas formadas a partir de sua degradação.

A avaliação das condições de estresse, a sua eficiência na degradação dos fármacos citados e a capacidade de gerar compostos sem grupos cromóforos foi avaliada com os resultados gerados. A variação da soma das áreas das impurezas e da substância ativa foi avaliada como fator resposta para esta avaliação.

3.2.6 Previsão *in silico* dos possíveis produtos de degradação

As previsões *in silico* dos possíveis produtos de degradação foram realizadas usando o software Zeneth® 7.0 (Lhasa Limited, Leeds, UK). A técnica *in silico* com software especializado são capazes de prever as vias e rotas de degradação forçada de compostos orgânicos. Uma análise de predição *in silico* foi realizada com o cloridrato de propafenona para auxiliar na identificação de produtos de degradação potenciais que possam surgir durante estudos de degradação forçada. Essas previsões foram realizadas com restrições de processamento estabelecidas no planejamento fatorial de estresse. Os parâmetros e as condições de estresse escolhidos no sistema *in silico* foram mais próximos possíveis da realidade e das realizadas no presente trabalho, como degradação ácida, alcalina, oxidativa, térmica, úmida e fotolítica.

3.2.7 Identificação de produtos de degradação via LC/MS.

A cromatografia líquida acoplado à espectrometria de massas é vastamente reconhecida e aplicada para identificação dos produtos de degradação. Desenvolveu-se um método cromatográfico acoplado ao espectrômetro de massas (LC/MS), sem utilização do tampão fosfato, para a identificação dos produtos de degradação do cloridrato de propafenona. As demais condições cromatográficas, inclusive a coluna cromatográfica, foram mantidas conforme descrito no item 3.3.2. A utilização de tampão fosfato (tampão pouco volátil), impossibilitaram a implementação do método farmacopeico para a detecção dos produtos de degradação do cloridrato de propafenona. Desta forma, a água substituiu o tampão do método farmacopeico.

Uma espectrometria de massa de ionização electrospray (LC-MS) foi usada para escanear a propafenona e seus produtos de degradação com os seguintes parâmetros: o nitrogênio foi usado como gás nebulizador a 27 psi, temperatura ajustada para 300°C e como gás de secagem, com uma vazão de 1,2 L min⁻¹. A temperatura do vaporizador foi de 200°C e a tensão de ajuste da placa final foi de -500V. O espectrômetro de massa foi operado em modo de varredura (de 40 m/z a 1000 m/z) usando ionização eletro-pulverizada positiva e negativa (ESI) para propafenona HCl e seus produtos de degradação. Os espectros de massas de cada pico detectado na cromatograma de ions totais foram registrados.

4. Resultados e discussão

4.1 Adequabilidade dos métodos cromatográficos para a análise de cloridrato de propafenona

Inicialmente foi realizada uma avaliação crítica dos métodos oficiais descritos na Farmacopeia Americana (UNITED States Pharmacopeia, 2017). Uma das premissas na cromatografia é de utilizar a fase móvel em um pH de no mínimo duas unidades de diferença do pKa da molécula. Isso porque, por definição, o pKa de uma molécula é igual ao valor de pH em que as concentrações da forma base e da forma conjugada de uma substância são iguais. Para o cloridrato de propafenona tem-se o pKa de 9,6 (Figura 2) e o pH utilizado nos seus métodos de doseamento e de produto de degradação respectivamente é de 3,1 e 2,5. Desta forma, as escolhas do pH das fases móveis foram adequados e apresentam compatibilidade com a molécula estudada.

Figura 2: Grau de distribuição de espécies de cloridrato de propafenona em diferentes pH.

Fonte: ("Chemicalize", 2017)

4.2 Caracterização do cloridrato de propafenona na região do ultravioleta

O perfil do espectro das moléculas na região do ultravioleta é uma característica intrínseca das moléculas orgânicas. Com o auxílio de outras técnicas analíticas ele auxilia na identificação de moléculas. O medicamento é composto de diversos excipientes que apresentam moléculas orgânicas e inorgânicas, e preferencialmente não devem apresentar uma absorção máxima na mesma região dos fármacos ativos, já que pode interferir na sua quantificação. Desta forma, é importante que se avaliem os resultados num comprimento de onda máximo das moléculas no método de escolha, uma vez que suas impurezas apresentarão, muitas vezes, espectros próximos a ele (BAERTSCHI, 2011).

Para o cloridrato de propafenona foi obtido o espectro de absorção conforme Figura 3.

Figura 3: Espectro de absorção do cloridrato de propafenona em UV obtido no teste de doseamento.

A partir dos espectros na região de UV, foi possível observar que o cloridrato de propafenona apresenta bandas de absorção em 208 nm, 248 nm e 304 nm. A Farmacopeia Americana, em seu método de doseamento utiliza o comprimento de

onda de 250 nm e no seu método de determinação de produtos de degradação 220 nm. Esta diferença pode ser justificada a partir de duas abordagens. Primeiramente, a formulação é constituída pela substância ativa e seus excipientes, neste caso o cloridrato de propafenona, o amido, a celulose microcristalina, a croscarmelose sódica, o estearato de magnésio, a hipromelose, o macrogol e o dióxido de titânio. Qualquer excipiente, isoladamente ou misturados entre si pode apresentar máximos de comprimentos de onda próximos aos máximos obtidos da substância ativa, o que, em caso de coeluição pode gerar resultados cromatográficos incoerentes (BAERTSCHI, 2011).

Outra abordagem, considerando que os produtos de degradação são o resultado de reações que a molécula sofre (como hidrólise, oxidação etc), os compostos formados devem apresentar máximos de absorção no UV próximos, mas distintos aos da substância ativa. A escolha de um comprimento de onda deve ser realizada após a avaliação dos principais produtos de degradação, de modo que este seja o de melhor capacidade de identificá-los (BAERTSCHI, 2011).

4.3 As especificações para os produtos de degradação de cloridrato de propafenona

De acordo com as normas da ANVISA (BRASIL, 2013) e ICH (ICH, 2016) o fabricante do medicamento deve realizar os estudos de estresse para o desenvolvimento de um método indicativo de estabilidade com o objetivo de identificar e/ou quantificar os principais produtos de degradação formados durante o procedimento. Para garantir a segurança e eficácia dos produtos, há necessidade de realizar estudos para compreender o grau de vulnerabilidade do produto ativo e os mecanismos envolvidos ao longo do processo de degradação química da substância química ativa.

A especificação dos produtos de degradação segundo a ANVISA e o ICH deve ser realizada conforme Quadro 1 do Capítulo I. Desta forma, conforme a bula do cloridrato de propafenona (RITMONORM, 2016), a dose máxima diária recomendável para o paciente é de 900 mg por dia, consolidando uma especificação de 0,2 % para o limite de qualificação e de identificação, e 0,1 % de limite de notificação. Tais limites estão em concordância com a monografia apresentada na Farmacopeia Americana (UNITED States Pharmacopeia, 2017) .

4.4 Método de doseamento

4.4.1 Condição de adequabilidade do sistema

Para avaliar a adequabilidade do método de doseamento a solução padrão de cloridrato de propafenona (0,15 mg/mL) foi injetado no sistema, em replicata (n=6). Os parâmetros de adequabilidade do sistema foram avaliados de acordo com a Farmacopeia Americana (UNITED States Pharmacopeia, 2017). Uma separação adequada foi obtida, em menos de 10 minutos. O fator cauda do pico foi de 1,3. O DPR entre as respostas cromatográficas foi abaixo do limite aceitável. Os dados relacionados à capacidade do método de repetir as respostas cromatográficas podem ser encontrados na Tabela 9. Os cromatogramas obtidos com o padrão e a amostra estão apresentados na Figura 4 e Figura 5.

Tabela 9: Áreas dos picos de cloridrato de propafenona, média, desvio padrão e DPR para o método de doseamento.

Área	Média
168591750	167201930,6
163435554	Desvio Padrão
169856391	2176792,1
167153996	DPR (%)
167586961	1,3
166586932	

Figura 4: Cromatograma do cloridrato de propafenona 0,15 mg/mL da solução padrão usando o método de doseamento proposto pela Farmacopeia Americana.

Figura 5: Cromatograma do cloridrato de propafenona 0,15 mg/mL da solução amostra usando o método de doseamento proposto pela Farmacopeia Americana.

O método de doseamento do cloridrato de propafenona atende todos os pré-requisitos e pode ser considerado adequado para a análise do cloridrato de propafenona.

Para a amostra intacta, ou seja, aquela que não sofreu condições de degradação, aplicando-se a equação 1, obteve-se 99,8% de cloridrato de propafenona.

4.4.2 Doseamento do cloridrato de propafenona nas amostras após degradação forçada

Os resultados do doseamento de cloridrato de propafenona de degradação forçada de cloridrato de propafenona nas amostras submetidas a teste de estresse podem ser observados na Tabela 10. Os valores apresentados são expressos em porcentagem em relação ao valor inicial (amostra sem degradação) e foram calculados conforme equação 2.

Tabela 10: Porcentagem de cloridrato de propafenona encontrado nas amostras após o teste de estresse.

Número do experimento	X₁	X₂	Ácido (%)	Básico (%)	Oxidativo (%)	Temperatura / Umidade (%)
1	-1	-1	91,7	98,8	81,8	79,0
2	+1	-1	91,3	97,8	62,7	73,7
3	-1	+1	84,4	96,1	77,9	77,7
4	+1	+1	76,5	95,0	56,8	67,8
5	0	0	74,4	96,8	74,7	71,0
6	-1	0	90,4	96,8	80,1	79,0
7	+1	0	85,5	94,9	59,3	68,8
8	0	-1	88,5	94,8	80,9	75,4
9	0	+1	82,8	95,5	68,9	67,8

4.5 Método de produtos de degradação

4.5.1 Condição de adequabilidade do sistema

Para avaliar a adequabilidade do método para os produtos de degradação a solução padrão de cloridrato de propafenona (0,1 mg/mL) e o produto relacionado B (0,1 mg/mL) foram injetados no sistema. Os parâmetros de adequabilidade do sistema foram avaliados de acordo com a Farmacopeia Americana (UNITED States Pharmacopeia, 2017). Uma separação adequada foi obtida, em menos de 15 minutos com a resolução entre os picos de cloridrato de propafenona e cloridrato de propafenona impureza B foi de 5. Os fatores de cauda do pico foram de 1,3 e 1,1 para os cromatogramas do produto relacionado B e cloridrato de propafenona, respectivamente.

Em seguida foi injetado em replicata (n=6) a solução padrão de cloridrato de propafenona a 1,00 µg/mL. O DPR entre as respostas cromatográficas foi abaixo do limite aceitável. Os dados relacionados à capacidade do método de repetir as respostas cromatográficas podem ser encontrados na Tabela 11. Os cromatogramas obtidos com o padrão e o produto relacionado B estão apresentados na Figura 6. O cromatograma da solução padrão de cloridrato de propafenona a 1,00 µg/mL encontra-se representado na Figura 7. O fator de cauda do pico do cloridrato de propafenona foi de 1,0.

Tabela 11: Áreas dos picos de cloridrato de propafenona na solução padrão a 1,00 µg/mL, média, desvio padrão e DPR para o método de produtos de degradação.

Área	Média
1085114	1123945
1111389	Desvio Padrão
1165124	26734,3
1119060	DPR
1137601	2,4
1125383	

Figura 6: Cromatograma do cloridrato de propafenona (0,10 mg/mL) e impureza B (0,10 mg/mL) empregando o método de produtos de degradação.

Figura 7: Cromatograma da solução padrão de cloridrato de propafenona (1,00 µg/mL) empregando o método de produtos de degradação.

Para estudar a interferência do diluente (utilizado na diluição das amostras) e o gradiente na determinação do cloridrato de propafenona e produto relacionado B, o diluente foi injetado no sistema. Verificou-se um grande desvio na linha de base de 13

a 18 minutos, contudo tal desvio não comprometeu a reprodutibilidade do método (conforme Tabela 11). O referido cromatograma pode ser visualizado na Figura 8.

Figura 8: Cromatograma do diluente empregando o método de produtos de degradação.

Verificou-se que, de acordo com o cromatograma, o pico do cloridrato de propafenona foi eluído em uma região onde a linha de base sofre uma interferência, provavelmente causada pelo gradiente do método que se inicia em 8 minutos. Contudo, tal característica do perfil cromatográfico não interfere na quantificação, já que sucessivas injeções apresentaram DPR dentro do aceitável.

Baseado nos resultados de adequabilidade do sistema pode-se confirmar que o sistema é adequado e preciso nas análises de cloridrato de propafenona e o produto relacionado B.

4.5.2 Os produtos de degradação após degradação forçada

Os ensaios de degradação forçada do cloridrato de propafenona amostra simulada foram realizados conforme planejamento descrito na Tabela 8. O intuito de avaliar diferentes tempos durante a degradação foi de se avaliar principalmente a formação de impurezas primárias de degradação. Os cromatogramas selecionados foram avaliados tanto o ponto de vista do perfil dos picos assim como os produtos de degradação formados após submissão a diversas condições de estresse. Abaixo,

reproduz-se cromatogramas dos ensaios realizados, como em ácido clorídrico (Figura 9), hidróxido de sódio (Figura 10), peróxido de hidrogênio (Figura 11), a 70°C/75%UR (Figura 12) e exposto a luz (Figura 13). Os picos cromatográficos formados correspondentes aos produtos de degradação formados foram integrados com o auxílio do software Class VP ® (Shimadzu, Japão).

Figura 9: Cromatograma de degradação da amostra simulada de cloridrato de propafenona 1,00 mg/mL em HCl 5N por 3 horas.

Figura 10: Cromatograma de degradação da amostra simulada cloridrato de propafenona 1,00 mg/mL em NaOH 2N por 1 hora.

Figura 11: Cromatograma de degradação da amostra simulada de cloridrato de propafenona 1,00 mg/mL em H₂O₂ 3% por 3 horas.

Figura 12: Cromatograma de degradação da amostra simulada de cloridrato de propafenona 1,00 mg/mL em temperatura a 70°C e 75 % de umidade por 30 dias.

Figura 13: Cromatograma de degradação da amostra simulada de cloridrato de propafenona 1,00 mg/mL após exposição a luz por 3 ciclos.

As somas das porcentagens de área dos picos de produtos de degradação foram calculadas com o auxílio do software Class VP (Shimadzu Corp.) e a porcentagem de produtos de degradação formados podem ser encontrados na Tabela 12.

Tabela 12: Porcentagem de produtos de degradação formados com o stress e determinados empregando o método de produto de degradação.

Número do experimento	X ₁	X ₂	Hidrólise ácida	Hidrólise alcalina	Oxidativa	Aquecimento / Umidade
1	-1	-1	6,30	0,9	15,7	18,0
2	+1	-1	12,5	1,5	35,2	24,1
3	-1	+1	20,6	0,7	20,1	19,1
4	+1	+1	19,8	2,7	40,3	30,0
5	0	0	24,1	1,8	23,4	26,8
6	-1	0	8,70	2,5	17,3	18,9
7	+1	0	12,2	4,8	37,2	29,5
8	0	-1	9,70	3,6	17,3	22,1
9	0	+1	15,2	2,9	29,4	30,1

A degradação ácida em HCl 5N por três horas apresentou uma tendência à formação de produtos de degradação com tempos de retenção de 2,30, 24,3, 26,3, 26,5 e 28,0 minutos.

Por outro lado, a degradação em NaOH 2N por um período de uma hora levou a formação dos principais produtos de degradação com tempos de retenção em 24,5, 26,1 e 28,0 minutos, aproximadamente. Entretanto, poucos picos foram formados e em quantidade bem menor que o meio ácido.

Avaliando-se a degradação da amostra simulada de cloridrato de propafenona em meio oxidativo, verifica-se a existência de uma alta labilidade do fármaco ao peróxido de hidrogênio. Em uma hora de exposição a peróxido de hidrogênio (3% v/v), houve formação de picos expressivos com tempo de retenção em 1,80 e 6,60, 24,3 e 26,3 minutos, aproximadamente. Os três últimos picos (6,60, 24,3 e 26,3 minutos) apresentam absorção na região do UV. A análise de perfil de absorção e similaridade entre os picos formados e o cloridrato de propafenona revelou certo grau de semelhança, embora sejam distintos do cloridrato de propafenona. Diferentemente do que ocorre com o espectro do pico com tempo de retenção de 1,80 minutos, aproximadamente (Figura 14).

O primeiro pico no estresse oxidativo corresponde ao peróxido de hidrogênio, como pode ser observado na Figura 15; desta forma, não foi considerado como produto de degradação do cloridrato de propafenona.

Figura 14: Espectro do pico na amostra simulada de cloridrato de propafenona de retenção 1,80 minuto degradado em peróxido de hidrogênio 3%.

Figura 15: Solução de peróxido de hidrogênio 3%.

Observou-se que o pico de produto de degradação de tempo aproximadamente 26,3 minutos está presente em quase todas as condições de degradação, com exceção da fotodegradação. Para este trabalho, convencionou-se chamar este produto de degradação de PD1. O espectro de absorção de PD1 com máximos em 217 e 254 nm difere-se do espectro de absorção do pico de cloridrato de

propafenona, que apresenta máximos em 220, 247 e 303 nm (Figura 16). Isto evidencia que o PD1 apresenta grupos cromóforos diferentes da molécula do cloridrato de propafenona.

Figura 16: Perfil de espectro em UV de (A) cloridrato de propafenona e (B) produto de degradação (PD1).

4.5.3 Predição de possíveis produtos de degradação

A análise de predição de Zeneth® foi realizada para o cloridrato de propafenona a fim de entender como métodos *in silico* podem ajudar identificar potenciais produtos de degradação. O Zeneth® é um software baseado no conhecimento que fornece previsões de degradação forçada, auxilia na compreensão das vias de degradação forçada de compostos orgânicos. Assim como prever os produtos de degradação que se formam por meio de vários mecanismos conhecidos.

A provável reação e a estrutura química do produto de degradação prevista para o cloridrato de propafenona podem ser encontradas na Figura 17. O provável mecanismo proposto ocorre por meio de um ataque intramolecular da hidroxila a carbonila disponível (SMITH; MARCH, 2006).

Figura 17: Produto de degradação formado após a reação intramolecular em

O produto de degradação do cloridrato de propafenona previsto pelo programa foi usado como guia inicial para avaliação de um potencial produto de degradação que pode se formar em diversas condições. Contudo, não se esperou que os estudos *in silico* com software previsse todos os produtos de degradação realmente observados durante estudos de estresse. Isso porque, podem ocorrer degradações primárias e secundárias durante o estresse. Tais produtos de degradação foram verificados, principalmente, no estresse oxidativo com peróxido de hidrogênio, assim como no caso da degradação forçada com elevadas temperaturas e umidade. No caso do estresse oxidativo, além do produto de degradação DP1, formaram-se diversos produtos de degradação como os com tempo de retenção aproximado de 7,00, 24,0 e 29,0 minutos, aproximadamente (Figura 11).

Avaliando-se a degradação forçada com elevadas temperaturas e umidade, picos adicionais ao DP1 foram observados em 24,0 e 29,0 minutos, aproximadamente (Figura 12).

4.5.4 Identificação dos produtos de degradação via LC/MS

Inicialmente, foi avaliado a possibilidade de algum comprometimento na separação cromatográfica entre os picos quanto a mudança do método na substituição do tampão fosfato pela água ultrapura. A escolha da água ultrapura como alternativa ao tampão fosfato deu-se a partir da avaliação da curva de pKa do cloridrato de propafenone, vistos na Figura 2. Como o método de produto de degradação utiliza um tampão de pH 2,5, neste pH a molécula está quase 100 % na forma molecular. A água ultrapura apresenta pH entre 6,5 e 7, região na qual as moléculas de cloridrato de propafenona também se encontram, majoritariamente, na forma molecular. Desta forma a substituição foi adequada e não se percebeu modificações significativas no perfil cromatográfico do pico correspondente ao PD1. Embora, verificou-se distorções quanto as características dos picos, como tempo de retenção e simetria do pico, fatores tais não foram impeditivos na identificação dos picos do cloridrato de propafenona e DP1.

Foram realizadas análises em LC-MS de amostras após o estresse por peróxido de hidrogênio (3 % por 6 horas) e temperatura/umidade (70°C/75 % UR por 30 dias) no método de produto de degradações e os cromatogramas encontram-se na Figura 18. O espectro de massas relativo ao pico correspondente ao PD1 (tempo de retenção de aproximadamente 21 minutos) encontra-se na Figura 19.

Figura 18: Cromatogramas da amostra simulada de cloridrato de propafenona 1,0 mg/mL em LC-MS/MS e UV. A – Estresse com temperatura/umidade (70°C/75 % UR por 30 dias) e B estresse com peróxido de oxigênio (3 % por 6 horas).

Figura 19: Espectro de massas de LC/MS/MS para o composto PD1 com m/z de 342,2 [H⁺].

O espectro de massas do PD1 mostra que o produto de degradação apresenta o mesma massa molar da propafenona (m/z de 342,2 + $[M+H]^+$). A fragmentação de DP1 está coerente com o produto de degradação sugerido no ensaio *in silico*, conforme detalhado na Figura 20 e Tabela 13

Figura 20: Estruturas moleculares do produto de degradação proposto $[M+H]^+$ e das fragmentações plausíveis obtidos no espectrômetro de massas.

Tabela 13: Produto de degradação 1 (DP1) e seus fragmentos.

Produto de degradação / fragmento	Massa Calculada (m/z)	Fórmula molecular proposta	Perda proposta
DP1(MS)	341,2+1	$[C_{21}H_{27}NO_3 + H^+]$	-
Fragmento 1	115,10+1	$[C_6H_{13}NO_2^- + H^+]^-$	$C_{15}H_{14}O_2^-$
Fragmento 2	264,16+1	$[C_{15}H_{22}NO_3^- + H^+]^-$	$C_6H_5^-$
Fragmento 3	325,2-1	$[C_{21}H_{27}NO^- + H^+]^-$	O_2^-

O íon proposto de produto de degradação 1 (DP1) no espectro de LC-MS tem m/z de 342,2, em modo positivo, correspondendo à sua massa molecular de 341,2 + 1 [DP1 + H⁺]. Pode notar-se que o DP1 tem uma massa molecular equivalente à massa de propafenona, embora tenha um tempo de retenção cromatográfico distinto. A perda de $[C_6H_{13}NO_2^- + H^+]^-$ mostra um pico com m/z de 116,3 no fragmento 1. No fragmento 2, uma diferença de massa de 77 entre o íon do fragmento DP1 (m/z de 265,14) e o íon precursor sugeriu a perda do $C_6H_5^-$. Além disso, uma perda de oxigênio pode ser observada no fragmento 3.

4.5.5 Balanço de massa

O balanço de massa do cloridrato de propafenona, antes e após submissão à degradação forçada, foi verificado a partir do cálculo do déficit de balanço de massa absoluta (DBMA). E o DBMA foi calculada baseado na diferença entre a quantidade medida da substância ativa e as impurezas formadas. De acordo com as recomendações do ICH, o DBMA deve ser inferior a 5 % entre o método de doseamento e o método de produtos de degradação (ICH, 2006). Como pode ser observado na Tabela 14 o DBMA foi inferior a 5 %, em todos os casos de degradação forçada.

Tabela 14: Balanço de massas para o cloridrato de propafenona.

Número do experimento	Hidrólise ácida	Hidrólise alcalina	Oxidativa	Aquecimento / Umidade
1	-2	-0.3	-2.5	-3
2	3.8	-0.7	-2.1	-2.2
3	5.0	-3.2	-2	-3.2
4	-3.7	-2.3	-2.9	-2.2
5	-1.5	-1.4	-1.9	-2.2
6	-0.9	-0.7	-2.6	-2.1
7	-2.3	-0.3	-3.5	-1.7
8	-1.8	-1.6	-1.8	-2.5
9	-2	-1.6	-1.7	-2.1

Verificou-se que, embora algumas condições de degradação tenham sido altamente drásticas para a amostra simulada, de modo que a queda encontrada no método de doseamento chegou a 40 %, o método de produto de degradação foi capaz de quantificar tais impurezas. Como a queda do doseamento em todas as condições acompanham um aumento nos produtos de degradação, pode-se considerar que tais métodos são indicativos de estabilidade. Um dado que ratifica tal verificação é a pureza de pico apresentada na Figura 21. Nela pode-se verificar que os picos de cloridrato de propafenona apresentaram pureza dentro do limite aceitável, considerando o intervalo de 200 a 250 nm, que contempla o comprimento de onda utilizado no método de doseamento (220 nm). Na avaliação da pureza de pico, desconsiderou-se o intervalo de 190 a 200 nm devido a interferências da fase móvel no espectro e utilizou-se um “*threshold*” de 990 como recomendado pelo fabricante do equipamento.

Figura 21: Espectro UV de 200 nm a 250 nm (A, B, C e D) e pureza de pico (1, 2, 3 e 4) do pico de propafenona HCl sob degradação ácida (A1), degradação alcalina (B2), degradação oxidativa com peróxido de hidrogênio (C3) e degradação por calor/umidade (D4) no método de doseamento.

A partir do gráfico de efeitos principais para a formação de impurezas podemos observar uma linearidade entre as relações tempo e concentração (Figura 22). Desta forma, notou-se que, com o aumento da concentração ou do tempo favoreceu a formação de produtos de degradação. Os tempos avaliados foram conforme Tabela 8 e variaram de 1 hora a 30 dias, dependendo da exposição relacionada. As concentrações variam conforme o tipo de exposição e também estão explicitadas na Tabela 8.

Figura 22: Gráfico de efeitos principais para a formação de impurezas da amostra simulada cloridrato de propafenona.

A relação entre os fatores meio versus tempo e meio versus concentração mostrou que o meio é o principal influenciador na formação de produtos de degradação. A fotodegradação, ainda que com tempo e intensidades crescentes, não apresentou efeito considerável sobre a degradação do cloridrato de propafenona. Contrário o que foi observado com a degradação oxidativa (em peróxido de hidrogênio), neste caso, a concentração e tempo crescentes proporcionaram uma maior degradação da substância ativa. Isto evidencia uma maior importância do fator meio na formação de impurezas.

4.5.6 Análise estatística de dados

A análise estatística das impurezas formadas foi realizada por método de variância empregando o software Minitab (MINITAB INC, 2016). A validade e significância dos dados obtidos nos estudos de degradação forçada assim como a influência dos componentes de variância podem ser observados na Tabela 15 e Tabela 16, respectivamente.

Tabela15: Análise de variância para a formação de impurezas.

Análise de Variância para % impureza				
Fonte	SQ	QM	F	P
Meio	5844,089	1461	10,529	0,001
Concentração	1387,556	138,8	4,0760	0,001
Tempo	1021,333	34,04		

Tabela 16: Componentes de variância

Componentes de variância			
Fonte	Comp. Var.	Total	Desvio Padrão
Meio	147	68	12
Concentração	35	16	6
Tempo	34	15	6

A análise de variância apresentado nas Tabelas 15 e 16 comprovam que o ensaio é válido dado que “p” para o meio e a concentração é inferior a 0,05 (com 95 % de confiança). A análise dos componentes de variância demonstra estatisticamente a maior influência do meio na composição dos fatores. O referido componente influencia aproximadamente 68 % do total, enquanto a concentração e o tempo influenciam aproximadamente 16 %.

5. Conclusões

Uma abordagem preditiva de balanço de massa foi aplicada, com sucesso, na avaliação do método farmacopeico para o cloridrato de propafenona. O método proposto é indicativo de estabilidade e foi aplicado, com êxito, na separação de propafenona e impurezas orgânicas relacionadas. Os estudos sistemáticos foram conduzidos para elucidar os mecanismos e vias de degradação forçada do cloridrato de propafenona. O principal produto de degradação ácida foi caracterizado empregando o LC-MS e provavelmente é formado devido ao ataque intramolecular de uma hidroxila a uma carbonila, em várias condições de estresse. O método proposto pode ser considerado como método de estabilidade e cumpre todos os pré-requisitos de acordo com as diretrizes tanto do ICH quanto da ANVISA.

Referências

RITMONORM®: comprimidos, Responsável Técnico: Ana Paula Antunes Azevedo. São Paulo, 2013 [Bula de remédio]. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila_bula/frmVisualizarBula.asp?pNuTransacao=28343992016&pIdAnexo=4241114>. Acesso em: 3 jan. 2017.

BAERTSCHI, S. W. **Pharmaceutical stress testing**: Predicting drug degradation. 5. ed. New York: CRC Press, p. 601, 2011.

BRASIL. **Resolução de diretoria Colegiada - RDC n. 58, de 20 de dezembro de 2013 - ANVISA**. Estabelece 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, 2013. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2013/rdc0058_20_12_2013.pdf; Acesso em: 15 out, 2016.

BRASIL. **Resolução de Diretoria Colegiada - RDC n. 53, de 04 de dezembro de 2015 - ANVISA**. Estabelece 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, 2015. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2867975/%281%29RDC_34_2014_CO MP.pdf/ddd1d629-50a5-4c5b-a3e0-db9ab782f44a>; Acesso em: 15 out, 2016.

BRITISH Pharmacopoeia. London: **Stationary Office**, 2017. Disponível em: <https://www.pharmacopoeia.com/bp-2018?date=2018-04-01>; Acessado em 01 nov, 2017.

BRUNTON, L. L.; CHABNER, B. A.; KNOLLMANN, B. C.; **The pharmacological basis of therapeutics**. 13. ed. San Diego: McGraw-Hill Education, p. 861-866, 2011.

CHEMICALIZE. **Propafenone hydrochloride** Disponível em: <<https://chemicalize.com/#/calculation>>. Acesso em: 15 set, 2016.

FOOD and Drug Administration, **FDA**, guidance for industry: Q1A(R2) stability testing of new drug substances and products, 2003. Disponível em:

<https://www.fda.gov/downloads/drugs/guidances/ucm073369.pdf>; Acesso em: 15 set, 2016.

HOFMANN, U.; PECIA, M.; HEINKELE, G.; DILGER, K.; KROEMER, H. K.; EICHELBAUM, M.; Determination of propafenone and its phase I and phase II metabolites in plasma and urine by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. **Journal of chromatography. B, Biomedical sciences and applications**, v. 748, n. 1, p. 113–123, 2000.

INTERNATIONAL CONFERENCE on Harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use. **ICH Q1A(R2)** - stability testing of new drug substances and products. November, 2005. Disponível em: https://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q1A_R2/Step4/Q1A_R2__Guideline.pdf; Acesso em: 16 out, 2016.

INTERNATIONAL CONFERENCE on Harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use. **ICH Q3B(R2)** - impurities in new drug products. June, 2016. Disponível em: https://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q3B_R2/Step4/Q3B_R2__Guideline.pdf; Acesso em: 1 dez, 2016.

INTERNATIONAL CONFERENCE on Harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use. **ICH Q3C(R6)** - guideline for residual solvents. October, 2016. Disponível em: http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q3C/Q3C__R6__Step_4.pdf; Acesso em: 1 dez, 2017.

KHAN, I. A. Single oral loading dose of propafenone for pharmacological cardioversion of recent-onset atrial fibrillation. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 37, n. 2, p. 542–547, 2001.

LAMPRECHT, G.; STOSCHITZKY, K. Enantioselective analysis of R- and S-propafenone in plasma by HPLC applying column switching and liquid – liquid extraction. **Journal of Chromatography B: Analytical technologies in the biomedical and life sciences**; v. 877, n. 29, p. 3489–3494, 2009.

MAGALHÃES, L. P.; FIGUEIREDO, M. J. O.; CINTRA, F. D.; SAAD, E. B.; KUNIYOSHI, R. R.; TEIXEIRA, R. A.; LORGA FILHO, A. M.; D'AVILA, A.; DE PAOLA, A. A. V.; KALIL, C. A.; MOREIRA, D. A. R.; SOBRAL FILHO, D.C; STERNICK, E. B.;

DARRIEUX, F. C. C.; FENELON, G.; LIMA, G. G.; ATIÉ, J.; MATEOS, J. C. P.; MOREIRA, J. M.; VASCONCELOS, J. T. M.; ZIMERMAN, L. I.; SILVA, L. R. L.; SILVA, M. A.; SCANAVACCA, M. I.; SOUZA, O. F.; II Diretrizes Brasileiras de Fibrilação Atrial. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 106, n. 4, p. 10, 2016.

MELO, S.R.O.; HOMEM-DE-MELLO, M.; SILVEIRA, D.; SIMEONI, L.A.; **Advice on degradation products in pharmaceuticals: a toxicological evaluation.** Journal Pharmaceutical of Science and Technology, v. 68, p. 221-238, 2014.

MINITAB. **Minitab** Versão 17 para Windows, 2017.

PIETRAŚ, R.; KOWALCZUK, D.; RUTKOWSKA, W.; KOMSTA, L.; GUMIENICZEK, A.; Validated stability-indicating HPTLC method for the determination of propafenone hydrochloride in tablets and the GC-MS identification of its degradation products. **Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies**, v. 37, n. 20, p. 2942–2955, 2014.

PREVOT, M.; TOD, M.; CHALOM, J.; NICOLAS, P.; PETITJEAN, O.; Separation of propafenone enantiomers by liquid chromatography with a chiral counter ion. **Journal of Chromatography A**, v. 605, n. 1, p. 33–39, 1992.

PRISTA, L. N.; ALVES, A. C. E MORGADO, R. M. R. **Técnica farmacêutica e farmácia galênica.** 4 ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, v.3, 1991.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos & otimização de processos.** Campinas: Editora Casa do Pão, 2009.

SMITH, M. B.; MARCH, J. **March's Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure.** 6th. ed. New Jersey: John Wiley, 2006.

UNITED States Pharmacopeia. 40. ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, p. 5568–5570, 2017.

***CAPÍTULO III: APLICAÇÃO DOS MÉTODOS FARMACOPEICOS DE
CLORIDRATO DE PIOGLITAZONA PARA A AVALIAÇÃO DA INDICAÇÃO DE
ESTABILIDADE***

1. Introdução

O nome químico do cloridrato de pioglitazona (Figura 1), conforme a IUPAC é cloridrato de 2,4-tiazolidinediona,5-[[4-[2-(5-etil-2-piridinil) etoxi] fenil] metil] 1,3 tiazolidin-2,4-diona. Sua fórmula molecular é $C_{19}H_{21}ClN_2O_3S$ e sua massa molar é 392,9 g/mol. Sua aparência pode ser descrita como pó cristalino fino cuja coloração varia de branco a quase branco. É solúvel em dimetilformida e pouco solúvel em álcool desidratado. Muito pouco solúvel em acetona e em acetonitrila, além de praticamente insolúvel em água e insolúvel em éter. Apresenta constantes de ionização (pKa) a 25°C iguais a 5,8 (mais básico) e 6,4 (mais ácido) e seu coeficiente de partição (log P) é igual a 3,3 (“Chemicalize”, 2017, UNITED States Pharmacopeia, 2017). No sistema de classificação biofarmacêutica é classificado como fármaco de classe II, ou seja, apresenta baixa solubilidade e alta permeabilidade (SATHEESHKUMAR; SHANTIKUMAR; SRINIVAS, 2014).

Figura 1: Estrutura química do cloridrato de pioglitazona.

Fonte: (UNITED States Pharmacopeia, 2017)

O cloridrato de pioglitazona é um agente anti-hiperglicemiante que atua diminuindo a resistência à insulina, no tratamento da Diabetes tipo 2. Utilizado como segunda escolha, após a ineficácia do tratamento com cloridrato de metformina, ele auxilia os pacientes na diminuição da resistência à insulina na periferia e no fígado, resultando em um aumento da eliminação de glicose insulina-dependente e na diminuição da produção de glicose hepática (RITMONORM®, 2015; G.TERUI, T.GOTO, 2009; SCHEEN et al., 2009)

Um levantamento bibliográfico a respeito dos métodos analíticos aplicados na determinação do cloridrato de pioglitazona e/ou as suas impurezas farmacêuticas foi realizado. ASHOUR et al., DOREDLA et al., 2012, SHARMA et al., 2010 e CHATURVEDI et al., 2010 desenvolveram e validaram métodos de doseamento e

produtos de degradação de cloridrato de pioglitazona em HPLC-UV, UV e LC-MS respectivamente.

A Farmacopeia Americana apresenta um método analítico para quantificação do ativo e para a quantificação das impurezas de cloridrato de pioglitazona em comprimidos (UNITED States Pharmacopeia, 2017).

2. Objetivos

O objetivo deste trabalho de pesquisa é avaliar a suscetibilidade do insumo farmacêutico ativo cloridrato de pioglitazona submetidos a condições de estresse.

Utilizar os métodos cromatográficos descritos na Farmacopeia Americana nos estudos de estresse e avaliar se os métodos oficiais são indicativos de estabilidade. Almeja-se a determinação de seus principais produtos de degradação por meio dos métodos indicativos de estabilidade e conferi-las através dos estudos de balanço de massa.

3. Material e métodos

3.1 Material

3.1.1. Equipamentos

Sistema de cromatografia líquida de alta eficiência, Shimadzu (Class-VP) equipado com desgaseificador “*on line*”, com duas bombas binárias, injetor automático com alça ajustável (loop) de 50 µL e detector UV-Vis SPD-M 10Avp do tipo DAD (detector arranjo de diodos);

Aparelho de ultrassom (Quimis Q3360), Diadema, Brasil; balança analítica com precisão de quatro casas decimais (Mettler Toledo AB204), Columbus, Estados Unidos da América;

Câmara Climática Mecalor, modelo EC/1,2/ AR-URC, São Paulo, Brasil, nas condições de 50°C +/- 2 % de temperatura e 90,0 +/- 5,0 % de umidade relativa e 70°C +/- 2 de temperatura e 75,0 +/- 5,0 % de umidade relativa.

Câmara de fotodegradação: Weiss VP500L, Loughborough, Reino Unido, com lâmpadas de luzes UV e brancas.

Filtro seringa de PVDF, 25 mm de diâmetro e 0,45 µm de tamanho de poro.

3.1.2 Solventes e reagentes

Durante a execução dos ensaios foram utilizados os solventes e reagentes do grau cromatográficos ou grau para análise (P.A.), a saber: Acetonitrila e metanol grau cromatográfico, JT Baker®, (Pensilvânia, Estados Unidos da América); Acetato de amônio, hidróxido de sódio e peróxido de hidrogênio, Synth®, (Diadema, Brasil); Ácido acético, ácido clorídrico e benzofenona, Merck®, (New Jersey, Estados Unidos da América); Água ultrapura - Milli Q Plus®, (New Jersey, Estados Unidos da América);

3.1.3. Padrão e amostra

O padrão utilizado foi o cloridrato de pioglitazona – insumo farmacêutico ativo de referência produzida pela Selleckchem – pureza declarada de 99,6%.

A amostra simulada contendo cloridrato de pioglitazona foi baseada no medicamento referência Actos®, que apresenta como excipientes: lactose monoidratada, hiprolose, carmelose cálcica e estearato de magnésio. Tal formulação, segue os constituintes conforme bula cadastrada na ANVISA, e as proporções conforme descritos na Tabela 1 (ACTOS, 2015). A composição quantitativa seguiu conforme composição farmacotécnica estabelecida por PRISTA et al, 1991. Um placebo foi preparado com uma formulação contendo todos os excipientes exceto o insumo farmacêutico ativo.

Tabela 1: Componentes qualitativos e quantitativos simulados para a formulação referência de cloridrato de pioglitazona 45 mg comprimidos.

Componente da formulação	Quantidade (%)
Cloridrato de pioglitazona	16,5
Hiprolose	3,00
Lactose monoidratada	51,0
Celulose microcristalina	25,5
Carmelose cálcica	3,00
Estearato de magnésio	1,00

3.2 Métodos

3.2.1 Método para quantificação de cloridrato de pioglitazona e seus produtos de degradação em cloridrato de pioglitazona comprimidos

As condições cromatográficas são iguais para os dois métodos, havendo diferenças na concentração da amostra e do padrão, conforme Tabela 2. Os ensaios foram realizados com amostra simulada em que cada 300 mg do pó continha 49,6 mg de cloridrato de pioglitazona.

Tabela 2: Descrição do método para quantificação do cloridrato de pioglitazona e suas impurezas em cloridrato de pioglitazona comprimidos de acordo com a Farmacopeia Americana.

Fase Móvel	Acetonitrila, acetato de amônio 0,1N e ácido acético glacial (25:25:1, V/V/V)
Comprimento de onda	UV - 269 nm
Coluna	4,6 x 150 mm (5 µm) – C8
Temperatura do forno	25°C
Vazão	0,7 mL/min
Volume de injeção	20 µL

Fonte: (UNITED States Pharmacopeia, 2017)

Preparo das soluções utilizadas:

- Acetato de amônio 0,1N

Pesou-se 7,7 g de acetato de amônio e diluiu-se em 1 litro de água. Homogeneizou-se e filtrou-se em membrana de PVDF de 0,45 µm e desgaseificou-se.

- Fase móvel

Misturou-se, volumetricamente, 250 mL de acetonitrila com 250 mL da solução acetato de amônio 0,1N. A esta solução, adicionou-se 10,0 mL de ácido acético glacial. Homogeneizou-se e filtrou-se em membrana de PVDF de 0,45 µm e desgaseificou-se.

- Solução adequabilidade do sistema para o teste de doseamento

Pesou-se analiticamente, 25 mg de cloridrato de pioglitazona e 6,5 mg de benzofenona (padrão interno) e transferiu-se para um balão volumétrico de 50 mL. Solubilizou-se com cerca de 40 mL de metanol e submeteu-se ao banho de ultrassom até a solubilização. Aguardou-se chegar a temperatura ambiente, completou-se o volume com metanol. Pipetou-se, volumetricamente, 1,0 mL desta solução para um balão volumétrico de 10 mL e completou-se o volume com a fase móvel. Filtrou-se por uma membrana de PVDF 0,45 µm, descartando os primeiros 5 mL. A concentração final desta solução foi de 50 µg/mL de cloridrato de pioglitazona e 13 µg/mL de benzofenona.

- Solução adequabilidade do sistema para o teste de produtos de degradação

Pipetou-se, volumetricamente, 5,0 mL da solução adequabilidade do sistema para o teste de doseamento para um balão volumétrico de 10 mL e completou-se o volume com a fase móvel. Filtrou-se por uma membrana de PVDF 0,45 µm, descartando os primeiros 5 mL. A concentração final desta solução foi de 25,0 µg/mL de cloridrato de pioglitazona e 6,5 µg/mL de benzofenona.

- Solução padrão para o teste de doseamento

Pesou-se, analiticamente, 12,5 mg de cloridrato de pioglitazona para um balão volumétrico de 25 mL. Adicionou-se cerca de 20 mL de metanol e submeteu-se ao banho de ultrassom por 10 minutos. Aguardou-se até que a temperatura do balão se chegar a temperatura ambiente e completou-se o volume do balão com o metanol. Transferiu-se, volumetricamente, 1,0 mL desta solução para um balão volumétrico de 10 mL e completou-se o volume do balão com a fase móvel. Filtrou-se a solução assim obtida por uma membrana de PVDF 0,45 µm, descartando os primeiros 5 mL. A concentração final desta solução foi de 50 µg/mL de cloridrato de pioglitazona.

- Solução padrão para o teste de produtos de degradação

Pipetou-se, volumetricamente, 1,00 mL da solução padrão para o teste de doseamento para um balão volumétrico de 50 mL e completou-se o volume com a fase móvel. Filtrou-se a última solução através de uma membrana de PVDF 0,45 µm, descartando os primeiros 5 mL. A concentração final desta solução foi de 1 µg/mL de cloridrato de pioglitazona.

- Solução amostra para o teste de doseamento

Pesou-se, analiticamente, a massa da amostra simulada equivalente a 22,5 mg de cloridrato de pioglitazona (cerca de 136,0 mg do pó) e transferiu-se para um balão volumétrico de 50 mL. Transferiu-se cerca de 45 mL de metanol para o balão volumétrico e submeteu-se ao banho de ultrassom por 2 minutos. Aguardou-se até que a temperatura do balão se chegar a temperatura ambiente e completou-se o volume do balão com o metanol. Homogeneizou-se e centrifugou-se a 1500 rpm por 5 minutos. Pipetou-se 1,0 mL do sobrenadante e transferiu-se para um balão volumétrico de 10 mL e completou-se o volume do balão com a fase móvel. Filtrou-se a última solução através de uma membrana de PVDF 0,45 µm, descartando os primeiros 5 mL. A concentração final desta solução da amostra foi de 45,0 µg/mL de cloridrato de pioglitazona.

- Solução amostra para o teste de produtos de degradação

Pesou-se, analiticamente, a massa da amostra simulada equivalente a 18 mg de cloridrato de pioglitazona (cerca de 108,9 mg do pó) para um balão volumétrico de 100 mL. Transferiu-se cerca de 20 mL de metanol e submeteu-se ao banho de ultrassom por 2 minutos. Aguardou-se até que a temperatura do balão se chegar a temperatura ambiente e completou-se o volume do balão com a fase móvel. Filtrou-se o sobrenadante através de uma membrana de PVDF 0,45 µm, descartando os primeiros 5 mL. A concentração final desta solução amostra foi de 180,0 µg/mL de cloridrato de pioglitazona.

B) Condições de adequabilidade de sistema

A Farmacopeia Americana condiciona a validade das análises através das condições de adequabilidade. Estes critérios devem ser atendidos para que se pudesse ter uma análise confiável. As condições impostas para esta metodologia foram: resolução entre os picos de cloridrato de pioglitazona e benzofenona, o fator cauda do pico de cloridrato de pioglitazona e de benzofenona, e o DPR entre as áreas obtidas por injeções consecutivas da mesma solução padrão para o teste de doseamento conforme descrito na Tabela 3

Tabela 3: Parâmetros para avaliação da adequabilidade do sistema cromatográfico para o teste de doseamento.

	Resolução	Fator de cauda	DPR
Cloridrato de pioglitazona	Não aplicável	≤ 1,5 na solução adequabilidade	≤ 2% para a solução padrão em 6 replicatas
Benzofenona	Mínimo de 15	≤ 1,5 na solução adequabilidade	Não aplicável

Fonte: (UNITED States Pharmacopeia, 2017)

Para o método de produtos de degradação, os critérios de adequabilidade do sistema foram: resolução entre os picos de cloridrato de pioglitazona e benzofenona, o fator cauda do pico de cloridrato de pioglitazona e de benzofenona, e o DPR entre as áreas obtidas por injeções consecutivas da mesma solução padrão para o teste produtos de degradação (impurezas) conforme descrito na Tabela 4.

Tabela 4: Parâmetros para avaliação da adequabilidade do sistema cromatográfico para o teste de produtos de degradação.

	Resolução	Fator de cauda	DPR
Cloridrato de pioglitazona	Não aplicável	Não mais do que 1,5 na solução adequabilidade para o teste de produto de degradação	Não mais que 3% para a solução padrão em 6 replicatas
Benzofenona	Mínimo de 15		Não aplicável

Fonte: (UNITED States Pharmacopeia, 2017)

Cálculo dos resultados

O cálculo da porcentagem de cloridrato de pioglitazona presente na amostra foi realizado conforme equação 1:

$$\frac{AA}{AP} \times \frac{MP}{DP} \times \frac{PP}{MA} \times \frac{DA}{PMB} \times 100 = \% \text{ de pioglitazona (1)}$$

Em que:

AA: é a área do pico de cloridrato de pioglitazona no cromatograma da amostra; AP é a média das áreas de cloridrato de pioglitazona dos cromatogramas da solução padrão; MP é a tomada de ensaio de cloridrato de pioglitazona da solução padrão (em mg); DP é a diluição da solução padrão; PP é a potência em decimal de cloridrato de pioglitazona na substância padrão; DA é a diluição da solução amostra; MA é a tomada de ensaio de cloridrato de pioglitazona da solução amostra (em mg); PMp é a massa molar da pioglitazona (356,44 g/mol); PMb é a massa molar do cloridrato de pioglitazona (392,90 g/mol) e 100 é o fator de conversão para o resultado em %.

O cálculo da porcentagem produtos de degradação presente na amostra foi realizado conforme equação 2:

$$\frac{AA}{AP} \times \frac{MP}{DP} \times PP \times \frac{DA}{MA} \times \frac{PMp}{PMb} \times 100 = \% \text{ de produto de degradação (2)}$$

Em que:

AA: é a área do pico referente ao produto de degradação no cromatograma da amostra; AP é a média das áreas de cloridrato de pioglitazona dos cromatogramas da solução padrão; MP é a tomada de ensaio de cloridrato de pioglitazona da solução padrão (em mg); DP é a diluição da solução padrão; PP é a potência em decimal de cloridrato de pioglitazona na substância padrão; DA é a diluição da solução amostra; MA é a tomada de ensaio de cloridrato de pioglitazona da solução amostra (em mg); PMp é a massa molar da pioglitazona (356,44 g/mol); PMb é a massa molar do cloridrato de pioglitazona (392,90 g/mol) e 100 é o fator de conversão para o resultado em %.

3.2.2 Métodos para quantificação de cloridrato de pioglitazona e seus produtos de degradação estatisticamente planejado

A fim de se estudar a suscetibilidade dos princípios ativos em diversos meios de degradação e de se realizar uma avaliação qualitativa e quantitativa com relação a seus produtos de degradação, foi utilizado um estudo fatorial.

Tanto as agências reguladoras quanto a literatura científica sugerem diversos meios para a simulação da degradação forçada, durante a vida útil do medicamento. Os principais meios sugeridos são solução de ácido clorídrico, solução de hidróxido

de sódio, solução de peróxido de hidrogênio, bem como a exposição do medicamento as condições adversas de luz, temperatura e umidade (BAERTSCHI, 2011; BRASIL, 2015; ICH, 2003) .

KUDEMATI et al, (2014) verificaram que em estresse ácido e básico na concentração de 0,1N por 1 hora a 70°C gerou uma degradação do cloridrato de pioglitazona em cerca de 50 %. Quando o stress foi realizado via peróxido de hidrogênio, a 3 % por 1 hora, mantido a 75°C, obteve-se uma queda de cerca de 40 % do insumo farmacêutico ativo. No estresse de aquecimento a seco por 24 h, não foi verificado degradação do cloridrato de pioglitazona. CHATURVEDI et al, (2010) verificaram que a degradação ácida e básica na concentração de 1N por 12 horas levou a uma queda média de 10 % do cloridrato de pioglitazona. Já o estresse em peróxido de hidrogênio a 5 % e térmico a 80°C por 12 horas ambos levaram a uma queda de 5 % do insumo farmacêutico ativo. DOREDLA et al., (2012) verificaram que a degradação ácida com HCl 3N por 1 hora levou a uma queda de 19,7 %. Com hidróxido de sódio 0,1N por 1 hora e peróxido de hidrogênio 30 % por 15 minutos verificou uma queda de 13 % do teor de cloridrato de pioglitazona. Como pode ser observado na Tabela 5.

Tabela 5: Comparação de trabalhos que realizaram o estresse do cloridrato de pioglitazona (condição do ensaio e % de cloridrato de pioglitazona após o estresse).

Tipo de estresse	(ASHOUR; SAKUR; KUDEMATI, 2014)	(SHARMA; SHARMA; CHATURVEDI, 2010)	(DOREDLA et al., 2012)
Degradação ácida (HCl)	0,1N a 75°C por 60 minutos – 58 %	1N por 12 horas – 88 %	3N por 1 hora – 80 %
Degradação básica (NaOH)	0,1N a 75°C por 60 minutos – 56 %	1N por 12 horas – 90 %	0,1N por 1 hora – 87 %
Degradação oxidativa (H₂O₂)	3 % a 75°C por 60 minutos – 63 %	5 % por 12 horas – 94 %	30 % por 15 minutos – 87 %
Degradação térmica	100 °C por 24 horas – 100 %	80 °C por 12 horas – 95 %	70 °C por 48 horas – 100 %
Fotodegradação	Luz UV a 254nm por 24 horas – 101 %	Luz solar por 12 hirs – 97 %	Luz UV a não menos que 1,2 milhões de lux horas por 3 horas – 88 %

O desenho de experimentos para os estudos de degradação foi realizado utilizando-se o software Minitab 17®. Um delineamento fatorial com duas variáveis, X₁ (intensidade) e X₂ (tempo), foi realizado para degradação ácida, alcalina, oxidativa e temperatura/umidade. Tanto as concentrações dos meios quanto o tempo de exposições aos meios foram estudados em três níveis (baixo, médio e alto) e os valores foram codificados para facilitar as análises estatísticas (Tabela 6). Considerando duas variáveis (intensidade e tempo) e três níveis, um planejamento fatorial 3² foi conduzido, assim perfazendo nove experimentos, para cada meio de degradação forçada (MINITAB INC, 2016). Para obter resultados consistentes e confiáveis, todos os ensaios relativos a degradação forçada do cloridrato de pioglitazona foram realizados em duplicatas.

Tabela 6: O planejamento fatorial, com dois fatores e em três níveis, utilizados para os ensaios de degradação forçada do cloridrato de pioglitazona.

Valor codificado	Fatores					
	Intensidade (X ₁)			Tempo (X ₂)		
	-1	0	1	-1	0	1
HCl	0,1N	0,5 N	1 N	1 hora	3 horas	6 horas
NaOH	0,1N	0,5 N	1 N	1 hora	3 horas	6 horas
H₂O₂	1 %	3 %	5 %	1 hora	3 horas	6 horas
Temperatura /Umidade	50°C / 75 % UR	70°C a seco	70°C / 75 % UR	7 dias	15 dias	30 dias
Luz	NA	NA	NA	1 ciclo	2 ciclos	3 ciclos

*Códigos utilizados no Minitab® para designar os diversos níveis. (NA – Não aplicável).

Para a degradação forçada com exposição a luz, foram realizadas três degradações fotolíticas separadas, consideradas um, dois e três ciclos da câmara de fotodegradação. Os ciclos constituem-se na exposição à luz UV e luz branca. As amostras do cloridrato de pioglitazona foram expostas até que a quantidade de luz não fosse menor que 1,2 milhão de luz hora por ciclo (FDA, 2003)

Os resultados foram avaliados de acordo com a influência de cada meio sobre a amostra simulada e a somatória das impurezas formadas em cada meio. Posteriormente, foi avaliada a capacidade do método em separar, identificar e/ou quantificar os produtos de degradação formados.

3.2.3 Método de preparo de amostras para degradação forçada

- Degradação ácida

Para o teste de doseamento, pesou-se, analiticamente, a massa da amostra simulada equivalente a 22,5 mg de cloridrato de pioglitazona (cerca de 136,0 mg do pó) e transferiu-se para um balão volumétrico de 50 mL. Transferiu-se cerca de 10 mL de metanol para o balão volumétrico e submeteu-se ao banho de ultrassom por 2 minutos. Em seguida adicionou-se 20,0 mL de HCl (X_1N) aguardou-se durante um período de X_2 horas, separadamente, conforme Tabela 6.

Após o estresse ácido, as amostras foram neutralizadas com equivalente volume e concentração de NaOH de forma a se obter o volume final de 50,0 mL. Pipetou-se 1,0 mL desta solução e transferiu-se para um balão volumétrico de 10 mL e completou-se o volume do balão com a fase móvel. A concentração final foi de 45 µg/mL de cloridrato de pioglitazona.

Para o teste de produtos de degradação, pesou-se analiticamente, a massa da amostra simulada equivalente a 18 mg de cloridrato de pioglitazona (cerca de 108,9 mg do pó) e transferiu-se para um balão volumétrico de 100 mL. Transferiu-se cerca de 20 mL de metanol para o balão volumétrico e submeteu-se ao banho de ultrassom por 1 minuto. Em seguida adicionou-se 20,0 mL de HCl (X_1N) aguardou-se durante um período de X_2 horas, separadamente, conforme Tabela 6.

Após o estresse ácido, as amostras foram neutralizadas com equivalente volume e concentração de NaOH e posteriormente diluídas com acetonitrila de forma a se obter o volume final de 100 mL. A concentração final foi de 180 µg/mL de cloridrato de pioglitazona.

- Degradação alcalina

Para o teste de doseamento, pesou-se analiticamente, a massa da amostra simulada equivalente a 22,5 mg de cloridrato de pioglitazona (cerca de 136,0 mg do pó) e transferiu-se para um balão volumétrico de 50 mL. Transferiu-se cerca de 10 mL de metanol para o balão volumétrico e submeteu-se ao banho de ultrassom por 2 minutos. Em seguida adicionou-se 20,0 mL de NaOH (X_1N) aguardou-se durante um período de X_2 horas, separadamente, conforme Tabela 6.

Após o estresse alcalino, as amostras foram neutralizadas com equivalente volume e concentração de HCl de forma a se obter o volume final de 50 mL. Pipetou-se 1 mL desta solução e transferiu-se para um balão volumétrico de 10 mL e completou-se o volume do balão com a fase móvel. A concentração final foi de 45 µg/mL de cloridrato de pioglitazona.

Para o teste de produtos de degradação, pesou-se analiticamente, a massa da amostra simulada equivalente a 18,0 mg de cloridrato de pioglitazona (cerca de 108,8 mg do pó) e transferiu-se para um balão volumétrico de 100 mL. Transferiu-se cerca de 20 mL de metanol para o balão volumétrico e submeteu-se ao banho de ultrassom por 1 minuto. Em seguida, adicionou-se 20,0 mL de NaOH (X₁N) aguardou-se durante um período de X₂ horas, separadamente, conforme Tabela 6.

Após o estresse alcalino, as amostras foram neutralizadas com equivalente volume e concentração de HCl, e posteriormente, diluídas com acetonitrila de forma a se obter o volume final de 100 mL. A concentração final foi de 180 µg/mL de cloridrato de pioglitazona.

- Degradação oxidativa

Para o teste de doseamento, pesou-se analiticamente, a massa da amostra simulada equivalente a 22,5 mg de cloridrato de pioglitazona (cerca de 139,0 mg do pó) e transferiu-se para um balão volumétrico de 50 mL. Transferiu-se cerca de 10 mL de metanol para o balão volumétrico e submeteu-se ao banho de ultrassom por 2 minutos. Em seguida, adicionou-se 20,0 mL de H₂O₂ (X₁N) aguardou-se durante um período de X₂ horas, separadamente, conforme Tabela 6.

Após o estresse oxidativo, adicionou-se 20 mL do tampão acetato de amônia de forma a se obter o volume final de 50 mL. Pipetou-se 1,0 mL desta solução e transferiu-se para um balão volumétrico de 10 mL e completou-se o volume do balão com a fase móvel. A concentração final foi de 45 µg/mL de cloridrato de pioglitazona.

Para o teste de produtos de degradação, pesou-se, analiticamente, a massa da amostra simulada equivalente a 18 mg de cloridrato de pioglitazona (cerca de 108,8 mg do pó) e transferiu-se para um balão volumétrico de 100 mL. Transferiu-se cerca de 20 mL de metanol para o balão volumétrico e submeteu-se ao banho de ultrassom por 2 minutos. Em seguida adicionou-se 20,0 mL de H₂O₂ (X₁N) aguardou-se durante um período de X₂ horas, separadamente, conforme Tabela 6.

Após o estresse oxidativo, adicionou-se, 20,0 mL do tampão acetato de amônia e 40,0 mL de acetonitrila de forma a se obter o volume final de 100 mL. A concentração final foi de 180 µg/mL de cloridrato de pioglitazona.

- Degradação térmica

Para o teste de doseamento e os testes de produtos de degradação, pesou-se a massa das amostras equivalente a 22,5 mg (136,0 mg) e 18 mg (108,8 mg) de

cloridrato de pioglitazona, respectivamente, e embalou-se em frascos de vidro semi-abertas. Submeteu-se os frascos a câmaras climáticas conforme Tabela 6.

. Após um período pré-definido, retirou-se e dissolveu-se as amostras em 25 mL da fase móvel, separadamente. Após o período do estresse térmica, transferiu-se uma alíquota de 1,0 mL desta solução para um balão volumétrico de 10 mL e completou-se o volume com a fase móvel. As concentrações finais foram de 45 µg/mL e 180 µg/mL de cloridrato de pioglitazona para os testes de dosagem e produto de degradação, respectivamente.

- Fotodegradação

Para o teste de doseamento e os testes de produtos de degradação, pesou-se a massa das amostras equivalente a 22,5 mg (136,0 mg) e 18 mg (108,9 mg) de cloridrato de pioglitazona, respectivamente e embalou-se em plástico de polietileno transparente. Submeteu-se à câmara de fotodegradação, conforme Tabela 6.

Após um período pré-definido, retirou-se e dissolveu-se as amostras em 25 mL da fase móvel, separadamente. Transferiu-se uma alíquota de 1,0 mL desta solução para um balão volumétrico de 10 mL e completou-se o volume com a fase móvel. As concentrações finais foram de 45 µg/mL e 180 µg/mL de cloridrato de pioglitazona para os testes de dosagem e produto de degradação, respectivamente.

3.2.4 Método de balanço de massa

Segundo Baertschi et al, o estudo de balanço de massas pode ser realizado a partir do cálculo do Déficit de Balanço de Massa Absoluta (DBMA). O déficit de balanço de massa absoluta é calculado baseado na diferença entre a quantidade medida da substância ativa e as impurezas formadas (BAERTSCHI, 2011):

$$DMBA = (M_{P,0} - M_{P,x}) - (M_{1,x} - M_{1,0})$$

Em que:

$M_{P,0}$ representa a massa da substância ativa inicial; $M_{P,x}$ representa a massa da substância ativa após a degradação; $M_{1,0}$ representa a massa da impureza inicial e $M_{1,x}$ representa a massa da impureza após a degradação.

O valor do balanço de massa pode mostrar o quanto o método está adequado para quantificar as impurezas formadas a partir de sua degradação.

A avaliação das condições de estresse, a sua eficiência na degradação dos fármacos citados e a capacidade de gerar compostos sem grupos cromóforos foi

avaliada com os resultados gerados. A variação da soma das áreas das impurezas e da substância ativa foi avaliada como fator resposta para esta avaliação.

3.2.5 Predição *in silico* de possíveis produtos de degradação

As previsões *in silico* dos possíveis produtos de degradação foram realizadas usando o software Zeneth® 7.0 (Lhasa Limited, Leeds, UK). A técnica *in silico* com software especializado são capazes de prever as vias e rotas de degradação forçada de compostos orgânicos. Uma análise de predição *in silico* foi realizada com o cloridrato de pioglitazona para auxiliar na identificação de produtos de degradação potenciais que possam surgir durante estudos de degradação forçada. Essas previsões foram realizadas com restrições de processamento estabelecidas no planejamento fatorial de estresse. Os parâmetros e as condições de estresse escolhidos no sistema *in silico* foram mais próximos possíveis da realidade e das realizadas no presente trabalho, como degradação ácida, alcalina, oxidativa, térmica, úmida e fotolítica.

4. Resultados e discussão

4.1 Adequabilidade dos métodos cromatográficos para a análise de cloridrato de pioglitazona

Inicialmente, foi realizada uma avaliação crítica dos métodos oficiais descritos na Farmacopeia Americana (UNITED States Pharmacopeia, 2017). O cloridrato de pioglitazona apresenta dois pKas, visto que o mesmo possui dois grupos ionizáveis, um em 5,6 e outro em 6,7 como pode ser visto nas Figuras 2 e 3.

Em pH abaixo de 4, verifica-se majoritariamente a espécie conforme estrutura 2, carregada positivamente no anel piridínico. Na faixa de pH entre 4 e 6 verificamos uma queda da distribuição da estrutura 2 e um aumento da estrutura 1. Isso se deve principalmente a redução da concentração de H⁺ dificultar a protonação do anel piridínico. Ainda no pH 6, verificou-se a coexistência da estrutura 4, em que o anel piridínico encontra-se protonado e o anel originário do grupo tiazólico perde o hidrogênio, evidenciando uma porção negativa da molécula. Acima do pH 6, com o aumento da concentração do íon hidroxila em relação ao íon hidrogênio, verifica-se a

diminuição da distribuição das estruturas 1, 2 e 4 e o aumento da distribuição da estrutura 3. Isso se deve a dificuldade destas estruturas manterem o íon hidrogênio quando o meio básico retira os hidrogênios das porções mais ionizáveis da molécula.

Figura 2: Grau de distribuição de microespécies de cloridrato de pioglitazona em função do pH.

Fonte: ("Chemicalize", 2017)

Figura 3: Estruturas molecular e iônicas do cloridrato de pioglitazona.

Fonte: "Chemicalize", 2017

Costumeiramente no desenvolvimento de métodos analíticos utiliza-se um pH da fase móvel com no mínimo duas unidades acima ou abaixo do pKa do analíto. Isso facilita para que qualquer alteração do pH da fase móvel não proporcione um efeito considerável no equilíbrio entre a forma iônica e forma molecular do fármaco. Considerando o valor do pKa do cloridrato de pioglitazona (mais ácido e mais básico), seria coerente utilizar pH para uma fase móvel com pH inferior a 3,6 ou superiores a 8,7. Os métodos descritos na Farmacopeia Americana para a doseamento e para os produtos de degradação utiliza a fase móvel com pH 4,8 (UNITED States Pharmacopeia, 2017). Conforme a Figura 2, neste pH boa parte do cloridrato de pioglitazona se encontra na forma 2 (> 80%) e com a coexistência das estruturas 1 e 3, em menor quantidade (< 20%). Observou-se que durante o preparo da fase móvel, a porção aquosa apresenta pH de 3,8 e após a adição da acetonitrila um pH de 4,8. Assim, há necessidade de tomar cuidados para que durante toda a análise o pH se mantivesse constante para evitar problemas no deslocamento do equilíbrio da molécula.

4.2 Caracterização do cloridrato de pioglitazona na região de ultravioleta

Embora o detector de ultravioleta apresenta alta precisão na detecção e quantificação das moléculas, devidos cuidados devem ser tomados em relação a seletividades destes detectores. Para aumentar a sensibilidade da detecção e melhorar a seletividade, as detecções devem ser realizadas num comprimento de onda máximo das moléculas, uma vez que suas impurezas apresentarão, muitas vezes, espectros próximos do mesmo.

Para o cloridrato de pioglitazona foi obtido o espectro de absorção conforme Figura 4.

Figura 4: Espectro de absorção do cloridrato de pioglitazona em UV obtido no teste de doseamento.

A partir dos espectros do padrão do cloridrato de pioglitazona foi observado que o mesmo apresenta máximos em 235 nm e 266 nm. A Farmacopeia Americana, em seu método de doseamento e produtos de degradação efetua a detecção em 269 nm. Essa diferença se deve a constante dielétrica do solvente utilizado.

4.3 As especificações para os produtos de degradação da cloridrato de pioglitazona

As normas nacionais (BRASIL, 2015) e internacionais (ICH, 2003; UNITED States Pharmacopeia, 2017) recomendam os estudos de estresse para garantir a segurança e eficácia dos produtos farmacêuticos. Os métodos indicativos de estabilidade são primordiais para compreender o grau de vulnerabilidade do produto e os mecanismos envolvidos ao longo do processo de degradação química da substância química ativa.

As especificações dos produtos de degradação, segundo a ANVISA e o ICH, devem ser estudadas conforme Quadro 1 descrito no Capítulo 1. Desta forma, conforme a bula do cloridrato de pioglitazona (ACTOS, 2015) a dose máxima diária recomendável para o paciente é de 45 mg por dia, proporcionando uma especificação de 0,5 % para o limite de qualificação e 0,2 % para o limite de identificação, e 0,1 %

de limite de notificação. Tais limites são em congruência com a monografia apresentada na Farmacopeia Americana (UNITED States Pharmacopeia, 2017).

4.4 Método de doseamento

4.4.1 Condição de adequabilidade do sistema

Para avaliar a adequabilidade do método de doseamento a solução adequabilidade do sistema (0,05 mg/mL de cloridrato de pioglitazona e 0,013 mg/mL de benzofenona) foi injetada no sistema, Os resultados foram analisados conforme os parâmetros descritos na Farmacopeia Americana (UNITED States Pharmacopeia, 2017). O fator cauda do pico relativo ao cloridrato de pioglitazona foi de 1,1 e o pico relativo a benzofenona foi 1,2. A resolução entre os picos foi de 6,5. O cromatograma pode ser visualizado na Figura 5

Em seguida foi injetada a solução padrão em replicata (n=6). O DPR entre as respostas cromatográficas foi abaixo do limite aceitável. Os dados relacionados à capacidade do método de repetir as respostas cromatográficas podem ser encontrados na Tabela 7. Os cromatogramas obtidos com a solução adequabilidade do sistema, da solução padrão e da solução amostra estão apresentados na Figura 5, Figura 6 e Figura 7, respectivamente.

Tabela 7: Áreas dos picos de cloridrato de pioglitazona, média, desvio padrão e DPR para o método de doseamento.

Área	Média
829814	846335,5
859619	Desvio Padrão
833555	11915,5
853066	DPR (%)
848893	1,4
853066	

Figura 5: Cromatograma da solução adequabilidade do sistema para o método de doseamento.

Figura 6: Cromatograma do cloridrato de pioglitazona 50 µg/mL da solução padrão para o método de doseamento.

Figura 7: Cromatograma do cloridrato de pioglitazona 45 µg/mL da solução amostra para o método de doseamento.

O método de doseamento do cloridrato de pioglitazona atende todos os pré-requisitos e pode ser considerado adequado para a análise do cloridrato de pioglitazona.

Para a amostra sem sofrer condições de degradação, aplicando-se a equação 1, obteve-se 99,6% de cloridrato de pioglitazona.

4.4.2 Doseamento de cloridrato de pioglitazona em amostras após degradação forçada

Os resultados da degradação forçada de cloridrato de pioglitazona nas amostras submetidas a teste de estresse podem ser observados na Tabela 8. Os valores apresentados são expressos em porcentagem em relação ao valor inicial (amostra sem degradação).

Tabela 8: Porcentagem de cloridrato de pioglitazona encontrado na amostra após o estresse.

Número do experimento	X ₁	X ₂	Ácido (%)	Básico (%)	Oxidativo (%)	Temperatura/ / Umidade (%)
1	-1	-1	100	98,7	88,3	97,2
2	+1	-1	97,2	91,5	70,9	63,3
3	-1	+1	95,0	90,4	81,2	90,0
4	+1	+1	95,3	80,7	61,3	76,1
5	0	0	98,1	96,7	71,4	83,3
6	-1	0	100	99,2	88,2	96,4
7	+1	0	95,2	90,3	66,0	61,7
8	0	-1	98,1	95,1	80,3	86,5
9	0	+1	98,3	86,8	69,8	85,4

4.5 Método de produtos de degradação

4.5.1 Condição de adequabilidade do sistema

Para avaliar a adequabilidade do método para os produtos de degradação a solução adequabilidade do sistema (0,025 mg/mL de cloridrato de pioglitazona e 0,0065 mg/mL de benzofenona foi injetada no sistema. Os parâmetros de adequabilidade do sistema foram avaliados de acordo com a Farmacopeia Americana (UNITED States Pharmacopeia, 2017). Uma separação adequada foi obtida, em menos de 10 minutos com a resolução entre os picos de cloridrato de pioglitazona e benzofenona de 6,7. O pico do cloridrato de pioglitazona e de benzofenona apresentaram fator de cauda de 1,1. Em seguida foi realizado uma replicata (n=6) da solução padrão (1 µg/mL). O DPR entre as respostas cromatográficas foi abaixo do limite aceitável. Os dados relacionados à capacidade do método de repetir as respostas cromatográficas podem ser encontrados na Tabela 9.

Tabela 9: Áreas dos picos de cloridrato de pioglitazona na solução padrão a 1 µg/mL, média, desvio padrão e DPR para o método de produtos de degradação.

Área	Média
17313	17064,3
17155	Desvio padrão
17160	212,7
16754	DPR(%)
17145	1,2
16859	

Como o DPR das seis injeções do padrão foi 1,2 pode-se verificar que o sistema apresentava repetibilidade. O cromatograma da solução padrão de cloridrato de pioglitazona a 1 µg/mL pode ser visualizado na Figura 8. Este apresentou fator de cauda de 1,0.

Figura 8: Cromatograma da solução padrão (cloridrato de pioglitazona a 1 µg/mL).

Para a amostra, sem sofrer as condições de degradação, obteve-se 0,00% de produtos de degradação (Figura 9). Não foi observado interferências do diluente no perfil cromatográfico.

Figura 9: Cromatograma da solução amostra simulada de cloridrato de pioglitazona a 0,18 mg/mL sem estresse.

4.5.2 Os produtos de degradação após degradação forçada

Foram realizados os ensaios de degradação do cloridrato de pioglitazona amostra simulada conforme planejamento da Tabela 6.

Os cromatogramas selecionados foram avaliados tanto o ponto de vista do perfil dos picos assim como os produtos de degradação formados após submissão a diversas condições de estresse. Seguem cromatogramas dos ensaios realizados, como em ácido clorídrico (Figura 10), hidróxido de sódio (Figura 11), peróxido de hidrogênio (Figura 12), a 70°C/75 %UR (Figura 13) e exposto a luz (Figura 14). Os picos cromatográficos formados correspondentes aos produtos de degradação formados foram integrados com o auxílio do software Class VP (Shimadzu Corp.).

Figura 10: Cromatograma de degradação da amostra simulada de cloridrato de pioglitazona 0,18 mg/mL em HCl 1N por 6 horas.

Figura 11: Cromatograma de degradação da amostra simulada cloridrato de pioglitazona 0,18 mg/mL em NaOH 1N por 6 horas.

Figura 12: Cromatograma de degradação da amostra simulada de cloridrato de pioglitazona 0,18 mg/mL em H₂O₂ 5 % (V/V) por 6 horas.

Figura 13: Cromatograma de degradação da amostra simulada de cloridrato de pioglitazona 0,18 mg/mL em temperatura a 70°C e 75 % de umidade por 30 dias.

Figura 14: Cromatograma de degradação da amostra simulada de cloridrato de pioglitazona 0,18 mg/mL após exposição a luz por 3 ciclos.

As somas das porcentagens de área das impurezas foram calculadas e os resultados (% de impurezas) estão descritos na Tabela 10.

Tabela 10: Porcentagem de produtos de degradação em relação a concentração formados com o stress quantificados a partir do método de produto de degradação.

Número do experimento	X ₁	X ₂	Hidrólise ácida (%)	Hidrólise alcalina (%)	Oxidativa (%)	Aquecimento / Umidade (%)
1	-1	-1	0,00	0,00	0,50	0,00
2	+1	-1	0,00	0,00	0,53	0,00
3	-1	+1	0,00	0,00	1,95	0,00
4	+1	+1	0,00	0,05	1,06	0,02
5	0	0	0,00	0,00	0,89	0,00
6	-1	0	0,00	0,00	1,13	0,00
7	+1	0	0,00	0,00	0,94	0,00
8	0	-1	0,00	0,00	0,54	0,00
9	0	+1	0,00	0,00	1,21	0,00

Como pode-se observar na Tabela 10, no estresse ácido, o método de produtos de degradação não detectou nenhum produto de degradação. Já no estresse básico, a condição mais drástica, quando os valores de X₁ e X₂ encontrava-se em seu máximo, a somatória da quantidade de produtos de degradação encontrada foi de 0,05 % com picos de tempo de retenção em 2,30, 3,10, 5,00, 8,20 e 8,90 minutos aproximadamente. No estresse de aquecimento e umidade o método foi capaz de quantificar 0,02 % de produto de degradação, pertencente a um único pico com tempo de retenção de 6,00 minutos, aproximadamente. Já a degradação oxidativa gerou diversos compostos que foram detectados e quantificados pelo método, com tempo de retenção de 2,10, 2,50 e 4,60 minutos, aproximadamente.

Avaliando-se a degradação da amostra simulada de cloridrato de pioglitazona verificou-se que existe uma alta labilidade do fármaco na presença de peróxido de hidrogênio. Em seis horas de exposição a 5 %, houve formação de grandes picos de retenção em 2,10, 2,50 e 4,60 minutos aproximadamente. Os picos em tempos de 2,10 e 4,60 minutos apresentam espectro na região do UV, ainda que distintos do cloridrato de pioglitazona, apresentam algumas semelhanças. Diferente do que ocorre

com o espectro do pico de aproximadamente 2,5 minutos. O referido pico no estresse oxidativo corresponde ao peróxido de hidrogênio, como pode ser observado na Figura 15 e Figura 16. Desta forma, não foi considerado como produto de degradação do cloridrato de pioglitazona.

Figura 15: Espectro do pico na amostra simulada de cloridrato de pioglitazona de retenção 2,6 minutos degradado em peróxido de hidrogênio 5%

Figura 16: Cromatograma da solução de peróxido de hidrogênio 5%.

Os cromatogramas obtidos com a injeção das soluções de ácido clorídrico, hidróxido de sódio e com placebo não apresentaram picos que pudessem ser considerados.

4.5.3 Predição de possíveis produtos de degradação

A análise de predição de Zeneth® foi realizada para o cloridrato de pioglitazona a fim de entender como métodos *in silico* podem ajudar identificar potenciais produtos de degradação. O Zeneth® é um software baseado no conhecimento que fornece previsões de degradação forçada, ajuda a compreender as vias de degradação forçada de compostos orgânicos e dá uma previsão dos produtos de degradação que se formam através de vários mecanismos conhecidos. A reação e as estruturas químicas dos produtos de degradação prevista para o cloridrato de pioglitazona são detalhados a seguir.

O produto de degradação previsto pelo programa foi usado como guia inicial para avaliação de potencial produto de degradação que pode se formar em diversas condições de estresse.

A plausível degradação ácida e básica pode levar a epimerização do cloridrato de pioglitazona, como pode ser verificado na Figura 17, ilustrada por NARAYANAM et al., 2013.

Figura 17: Epimerização da molécula de cloridrato de pioglitazona.

Fonte: (NARAYANAM et al., 2013)

Não há relatos de avaliação farmacológica de tais epímeros.

A degradação básica pode gerar um produto de degradação em que há uma quebra do anel tiazólico, como foi sugerido por NARAYANAM et al., 2013 exposto na Figura 18.

A degradação alcalina do cloridrato de pioglitazona pode gerar compostos conforme Figura 18. Verificou-se, que assim como a degradação ácida, a degradação alcalina também leva a formação de epímeros (moléculas B e C na Figura 19). Essa epimerização também pode ocorrer com os produtos de degradação, uma vez que eles mantêm o carbono assimétrico (moléculas E e F na Figura 19). Após o ataque da hidroxila, a carbonila adjacente ao átomo de enxofre quebra o anel tiazólico, formando uma estrutura com a função ácido carboxílico no seu término. A estrutura A é formada a partir de um seguinte ataque da hidroxila a carbonila terminal da molécula. Já a estrutura D é formada pelo ataque da hidroxila a carbonila intermediária (Figura 19).

Figura 18: Proposta de degradação alcalina do cloridrato de pioglitazona.

Fonte: (NARAYANAM et al., 2013)

Figura 19: Principais produtos de degradação formados a partir do estresse

Fonte: Zeneth®

Uma avaliação cuidadosa nas estruturas propostas de produtos de degradação no estresse alcalino do cloridrato de pioglitazona, verificou-se que as moléculas geradas continuam apresentando grupamentos cromóforos. Isso se deve principalmente aos anéis piridínico e benzênico presentes em tais produtos de degradação. Tal fato se mostra conflitante com a Tabela 10 que não mostra a evidência de formação de produtos de degradação após o estresse alcalino, adicionado ao fato de na Tabela 8, no método de doseamento de cloridrato de pioglitazona, mostrou-se uma queda diretamente proporcional a concentração e ao tempo de exposição ao estresse alcalino. Isso evidencia que o método de produto de degradação não é indicativo de estabilidade, uma vez que o método de produtos de degradação não pode identificar e quantificar as impurezas formadas.

A justificativa dos resultados apresentados pode ser feita com a seguinte abordagem: partindo do pressuposto que os principais produtos de degradação absorveriam facilmente no UV, poder-se-ia explicar a sua falta de detecção devido a

sua coeluição junto ao pico de cloridrato de pioglitazona. Entretanto, os picos de cloridrato de pioglitazona apresentam pureza de pico adequada em todas as condições de estresse avaliadas, conforme Figura 20.

Figura 20: Espectro UV de 250 nm a 300 nm (A, B, C, D e E) e pureza de pico (1, 2, 3, 4 e 5) do pico de pioglitazona HC sob degradação de ácida (A1), alcalina (B2), oxidativa com peróxido (C3), por calor/umidade (D4) e por fotodegradação (E5) no método de produtos de degradação.

Na Figura 20, pode-se verificar que os picos de cloridrato de pioglitazona estavam puros considerando o intervalo de 250 a 300 nm, que contempla o comprimento de onda utilizado no método (269 nm). Foi utilizado um “*threshold*” de 990 como recomendado pelo fabricante do equipamento. Para avaliação foi considerada a condição mais drástica do planejamento experimental, ou seja, a condição em que a intensidade e o tempo de exposição ao estresse eram maiores.

Numa segunda abordagem, pode-se considerar que a falta de detecção dos produtos de degradação pode ser devida ao comprimento de onda utilizado no método. Supõe-se que o grupamento tiazólico possa ter grande influência na detecção do máximo de 269 nm (região do UV C de baixa intensidade de energia e espectro). Desta forma, sua ausência pode justificar a baixa detecção dos produtos de degradação propostos, já que o ensaio *in silico* mostrou uma grande diversidade de produtos de degradação que perdem tal grupamento.

Outra hipótese dos produtos de degradação não detectados pode estar relacionada ao fator resposta dos mesmos. A alteração no grupo cromóforo da molécula pode levar a uma diferença na resposta do produto de degradação. Esta hipótese se mostra plausível para as condições de estresse que formaram ao menos um produto de degradação quantificável, como ocorreu na degradação oxidativa por peróxido de hidrogênio. Assim sendo essa diferença de resposta ao detector poderia ser compensada com um fator de correção entre eles, o que necessitaria da impureza isolada para quantificação e determinação dessa diferença de intensidade de sinal. Na Figura 21 podemos observar mais de 15 possíveis produtos de degradação de previsão *in silico* que poderiam ter formados na degradação oxidativa. Entretanto, o estresse oxidativo evidenciou poucos picos, como já mostrados.

Figura 21: Possíveis produtos de degradação (de A a S) do cloridrato de pioglitazona em presença de O₂ e um iniciador radicalar conforme Zeneth®.

4.5.4 Balanço de massa

O balanço de massa do cloridrato de pioglitazona foi resumido na Tabela 11.

Tabela 11: Balanço de massas para o cloridrato de pioglitazona

Número do experimento	Hidrólise ácida	Hidrólise alcalina	Oxidativa	Aquecimento / Umidade
1	-0,400	0,400	11,3	2,40
2	2,40	7,60	28,7	36,3
3	4,60	7,20	18,4	9,60
4	4,30	17,8	38,3	23,5
5	1,50	2,00	28,2	16,3
6	-0,400	-0,700	11,4	3,20
7	4,40	8,40	33,6	37,9
8	1,50	4,00	19,3	13,1
9	1,30	11,6	29,8	14,2

O ICH recomenda como uma diferença aceitável de 5 % entre o método de doseamento e o método de produtos de degradação (ICH, 2006). Tal valor é baseado no limite máximo da precisão do método de produtos de degradação. Desta forma, podemos verificar que somente o estresse ácido apresentou balanço de massa, ou seja, a queda de teor do cloridrato de pioglitazona foi de acordo com a quantidade de produtos de degradação formada. Já para os estresses alcalinos, oxidativo e por aquecimento/umidade de uma maneira geral não apresentou balanço de massa. Pode-se destacar o ensaio número 2 da degradação por aquecimento/umidade. Na condição de 70°C/75 % UR a diferença de balanço de massa entre os referidos métodos foi de 36,3 %. Apesar de não ser a condição experimental mais drástica, a diferença entre a quantificação dos métodos foi grande. Mostrando-se que o método de produtos de degradação da Farmacopéia Americana não apresentou balanço de massa.

O gráfico de efeito evidencia a queda de teor de cloridrato de pioglitazona e a sua grande dependência qualitativa do meio de degradação e dos fatores intensidade e tempo (Figura 22). A exceção se deu no fator tempo no estresse alcalino e de

temperatura/umidade, provavelmente oriundos de desvios analíticos. Ela também mostra a falta de balanço de massa, uma vez que evidencia uma queda do teor do cloridrato de pioglitazona, e a impossibilidade de gerar o gráfico de efeitos principais para os resultados dos produtos de degradação (já que em sua maioria os resultados foram próximos de zero).

Figura 22: Gráfico de efeitos principais para a queda do teor de cloridrato de pioglitazona da amostra simulada.

4.5.5 Análise estatística de dados

A análise estatística das impurezas formadas foi realizada por método de variância empregando o software Minitab® (MINITAB INC, 2016). A validade e significância dos dados obtidos nos estudos de degradação forçada assim como a influência dos componentes de variância podem ser observados na Tabela 12 e Tabela 13, respectivamente.

Tabela 12: Análise de variância para a queda do teor.

Análise de Variância para % teor				
Fonte	SQ	QM	F	P
Meio	5688	1333	8	2,300
Intensidade	1053	142	5	0,001
Tempo	954	25	3	0,001

Tabela 13: Componentes de variância

Componentes de variância			
Fonte	Comp. Var.	Total	Desvio Padrão
Meio	146	68	13
Intensidade	17	17	5
Tempo	17	15	4

A análise de variância nas Tabelas 12 e Tabela 13 mostram que o ensaio é válido dado que p para o meio e a intensidade é inferior a 0,05 (com 95% de confiança). A análise dos componentes de variância mostra estatisticamente a maior influência do meio na composição dos fatores. O referido componente influencia aproximadamente 68 % do total, enquanto a concentração do meio e o tempo influenciam aproximadamente 16 %.

5. Conclusões

Uma avaliação do balanço de massa foi aplicada no método farmacopeico de cloridrato de pioglitazona comprimidos. A degradação via estresse oxidativo levou a uma queda no doseamento do insumo farmacêutico ativo, mas o método não foi capaz de identificar e quantificar tais produtos de degradação. O método também não foi eficiente na identificação e quantificação de praticamente nenhuma impureza da degradação forçada via estresse ácido e por temperatura/umidade. O modelo *in silico* foi capaz de esclarecer o processo de degradação assim como a formação de possíveis estruturas dos produtos de degradação caso o cloridrato de pioglitazona seja submetido as condições de estresse. Portanto, o método proposto compendial não pode ser considerado como método de indicativo de estabilidade pois não cumpre todos os pré-requisitos de acordo com as diretrizes do ICH, bem como da ANVISA, principalmente o de balanço de massas.

Referências

ACTOS®: comprimidos, Responsável Técnico: Ana Paula Antunes Azevedo. São Paulo, 2015 [Bula de remédio]. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila_bula/frmVisualizarBula.asp?pNuTransacao=28343992016&pIdAnexo=4241114>. Acesso em: 10 jan. 2017.

ASHOUR, S.; SAKUR, A. A.; KUDEMATI, M. Development and Validation of Stability Indicating HPLC method for quality control of pioglitazone hydrochloride. **Canadian Chemical Transactions**, v. 3, n. 1, p. 1–11, 2014.

BAERTSCHI, S. W. **Pharmaceutical stress testing**: Predicting drug degradation. 5. ed. New York: CRC Press, p. 601, 2011.

BRASIL. **Resolução de diretoria Colegiada - RDC n. 58, de 20 de dezembro de 2013 - ANVISA**. Estabelece 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, 2013. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2013/rdc0058_20_12_2013.pdf; Acesso em: 15 out, 2016.

BRASIL. **Resolução de Diretoria Colegiada - RDC n. 53, de 04 de dezembro de 2015 - ANVISA**. Estabelece 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, 2015. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2867975/%281%29RDC_34_2014_CO MP.pdf/ddd1d629-50a5-4c5b-a3e0-db9ab782f44a>; Acesso em: 15 out, 2016.

CHEMICALIZE. **Pioglitazone hydrochloride** Disponível em: <<https://chemicalize.com/#/calculation>>. Acesso em: 11 abr, 2017.

DOREDIA, N. R.; YENGISETTY, B.; BOJJAGANI, R.; MADASU, S.V.; Method development and validation of forced degradation studies of pioglitazone hydrochloride by using UV spectroscopy. **International Journal of PharmTech Research**, v. 4, n. 4, p. 1750–1757, 2012.

FOOD and Drug Administration, **FDA**, guidance for industry: Q1A(R2) stability testing of new drug substances and products, 2003. Disponível em: <https://www.fda.gov/downloads/drugs/guidances/ucm073369.pdf>; Acesso em: 15 set, 2016.

TERUI, G.; GOTO, T.; KATSUTA, M.; Effect of pioglitazone on left ventricular diastolic function and fibrosis of type III collagen in type 2 diabetic patients. **Journal of Cardiology**, v. 54, n. 1, p. 52–58, 2009.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION OF technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use. **ICH Q1A(R2)** - stability testing of new drug substances and products. November, 2005. Disponível em: https://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q1A_R2/Step4/Q1A_R2_Guideline.pdf; Acesso em: 16 out, 2016.

INTERNATIONAL Conference on Harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use. **ICH Q3B(R2)** - impurities in new drug products. June, 2016. Disponível em: https://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q3B_R2/Step4/Q3B_R2__Guideline.pdf; Acesso em: 1 dez, 2016.

MINITAB. **Minitab** Versão 17 para Windows, 2017.

NARAYANAM, M.; HANDA, T.; SHARMA, P.; JHAHRA, S.; MUTHE, P. K.; DAPPILI, P. K.; SHAH, R. P.; SINGH, S. Critical practical aspects in the application of liquid chromatography-mass spectrometric studies for the characterization of impurities and degradation products. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 87, p. 191–217, 2013.

SATHEESHKUMAR, N.; SHANTIKUMAR, S.; SRINIVAS, R. Pioglitazone: A review of analytical methods. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 4, n. 5, p. 295–302, 2014.

SCHEEN, A. J.; TAN, M. H.; BETTERIDGE, D. J.; BIRKELAND, K.; SCHMITZ, O.; CHARBONNEL, B.; Long-term glycaemic effects of pioglitazone compared with placebo as add-on treatment to metformin or sulphonylurea monotherapy in PROactive (PROactive 18). **Diabetic Medicine**, v. 26, n. 12, p. 1242–1249, 2009.

SHARMA, S.; SHARMA, C.; CHATURVEDI, S. C. Study of stressed degradation behavior of pioglitazone hydrochloride in bulk and pharmaceutical formulation by HPLC assay method. **Journal of Optoelectronics and Biomedical Materials**, v. 1, n. 1, p. 17–24, 2010.

UNITED States Pharmacopeia. 40. ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, p. 5715–5716, 2017.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Uma revisão sobre as principais impurezas encontradas em medicamentos foi apresentada enfocando nos produtos de degradação. Considerações sobre a legislação nacional e internacional foram realizadas de forma se justificar e embasar o trabalho desenvolvido.

O método da Farmacopeia Americana da monografia de cloridrato de propafenona comprimidos foi testado e desafiado. Avaliou-se a capacidade do método em quantificar a queda do teor do insumo farmacêutico ativo bem como a sua quantificação dos produtos de degradação formados. Tal avaliação comprovou que o método oficial é um método indicativo de estabilidade.

O método da Farmacopeia americana da monografia de cloridrato de pioglitazona comprimidos foi testado e desafiado. O método não foi capaz de identificar e quantificar os produtos de degradação formados com a queda do teor, não apresentando, desta forma, um balanço de massas adequados para ser considerado um método indicativo de estabilidade.