UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas

Programa de Pós-Graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas

Desenvolvimento de método indicativo de estabilidade para o antineoplásico cloridrato de doxorrubicina e avaliação da toxicidade *in vitro* de seus principais produtos de degradação

Mariah de Almeida Ultramari

São Paulo

2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas

Programa de Pós-Graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas

Desenvolvimento de método indicativo de estabilidade para o antineoplásico cloridrato de doxorrubicina e avaliação da toxicidade *in vitro* de seus principais produtos de degradação

Mariah de Almeida Ultramari

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutora em Ciências.

Área de Concentração: Toxicologia e Análises Toxicológicas

Orientador: Prof. Dr. Ernani Pinto Junior

São Paulo

2014

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Ultramari, Mariah de Almeida
U47d Desenvolvimento de método indicativo de estabilidade para o antineoplásico cloridrato de doxorrubicina e avaliação da toxicidade *in vitro* de seus principais produtos de degradação / Mariah de Almeida Ultramari. -- São Paulo, 2014.
130p.

Tese (doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas.
Orientador: Pinto, Ernani

1. Estabilidade : Medicamento : Análise farmacêutica 2. Cromatografia líquida de alta eficiência 3. Espectrometria de massas 4. Medicamento : Toxicidade I. T. II. Pinto, Ernani, orientador.

615.19015 CDD

ULTRAMARI, M. A. **Desenvolvimento de método indicativo de estabilidade para o antineoplásico cloridrato de doxorrubicina e avaliação da toxicidade *in vitro* de seus principais produtos de degradação.** Tese apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutora em Ciências.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição:_____

Julgamento:_____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____ Instituição:_____

Julgamento:_____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____ Instituição:_____

Julgamento:_____ Assinatura:_____

Dr._____ Instituição:_____

Julgamento:_____ Assinatura:_____

Dr._____ Instituição:_____

Julgamento:_____ Assinatura:_____

Aos meus pais, irmãos e familiares por todo apoio, carinho, compreensão e por em mim acreditarem.

“Algumas pessoas querem que algo aconteça,

outras desejam que aconteça, outras fazem acontecer.”

Michael Jordan

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo pela oportunidade e pelo ensino de excelência e qualidade.

À sociedade brasileira trabalhadora e honesta que, por pagar devidamente seus abusivos impostos, investiu em minha formação de excelência. Espero ao longo de toda minha vida poder retribuir os investimentos em mim realizados.

Ao meu querido orientador Prof. Ernani, por me receber, pela oportunidade, por confiar em mim e em meu projeto, pelos conselhos, amizade, respeito e por me ajudar e me apoiar em todos os momentos e situações, principalmente nas mais difíceis.

Aos meus pais, Anibal e Dirce pela educação e formação de excelência que me proporcionaram, por apoiarem minhas ideias e convicções, pelo amor, carinho, dedicação e por confiarem e acreditarem em mim.

Aos meus irmãos Raphael, Rodrigo e Anibal por aturarem meus ideais de estudo e dedicação, pelo apoio, respeito e compreensão, pelo amor e admiração.

A todos os meus familiares, tias, tios, primos e primas, que nada mais são do que pais, mães, irmãos e irmãs, que sempre me acompanharam, me incentivaram, me apoiaram e que, principalmente nos momentos mais difíceis estiveram lá para me levantar e me ajudar a caminhar, sempre com humildade e respeito ao próximo.

À minha avó Therezinha (*in memoriam*), meu maior exemplo de amor, dedicação e respeito e que foi a responsável por tudo o que sou.

Aos meus amigos e colegas que passaram ou ainda estão no Laboratório de Toxinas e Produtos Naturais de Algas (LTPNA): Vania, Stella, Sidnei, Fabyana, Vanessa, Fabiana, Paula, Vinícius, Diogo, Raphael, Sara, Regiane, Bruno, Gabriela, Bárbara, Bruna, Gustavo, Ronaldo, Fabiane, Fernanda, Raquel, Kazumi e Simone, por todo apoio, pelas brilhantes discussões e troca de conhecimento e pela convivência agradável ao longo deste longo período.

Às minhas amigas Natália e Ariane pela amizade, companheirismo, discussões, ensinamentos e apoio, principalmente nos momentos mais difíceis.

Ao querido amigo Felipe, por todo ensinamento, conselhos, instruções, pela dedicação e disponibilidade em ajudar sempre e pela troca, ou melhor, fornecimento de conhecimentos.

Às minhas eternas pupilas Luana e Gisele, que muito me ajudaram e me ensinaram, pela amizade, carinho e dedicação.

Aos meus alunos de TCC, Juliana, Iris, Fabiana e Felipe, que muito me deram trabalho, mas que também me ensinaram muito.

Aos professores, funcionários, colegas e amigos do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, pelos ensinamentos, carinho e atenção.

À Samantha e à Sueli por todo apoio, cobrança, dicas sobre as normas, documentos, procedimentos que só elas sabem e por apagarem o incêndio e me salvarem antes das reuniões da CCP.

Ao professor Érick Bastos Leite do Instituo de Química da USP e suas alunas Ana Clara Beltran e Letícia Pires, pela ajuda com os experimentos de fotoquímica e por todo apoio e ensinamento.

À Prof. Margareth, sua aluna Érika e seu aluno Samuel, pela ajuda nos experimentos de degradação e por sempre me receberem muito bem.

À Prof. Marina Tavares e ao Dr Valdemir Melechco por todos os conselhos, pelas discussões e por todo conhecimento transmitido na minha qualificação.

Ao Dr Giordano Trazzi por ter acompanhado meu trabalho desde o início, por todas as contribuições, pelos conselhos de trabalho e de vida e por ter sido uma grande inspiração profissional.

Ao meu amado time Basquete Balboa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, sem vocês minha vida seria infinitamente mais difícil e chata. Obrigada pela oportunidade, pela amizade, pelas risadas, pelo companheirismo, ensinamentos, apoio, por acreditarem e confiarem em mim, por alimentarem a minha competitividade e por estarem sempre presentes e ao meu lado quando eu mais quis vencer e também quando eu pensei em desistir. Obrigada por me tornarem uma veterana tão querida de uma faculdade que nem cursei.

Aos meus amigos da vida inteira que em muitos momentos entenderam minhas ausências e minha dedicação e que sempre me animaram, estiveram ao meu lado e me receberam de braços abertos quando eu tinha um tempinho para a diversão.

A todas as pessoas que passaram pela minha vida ao longo deste período, que permaneceram ou simplesmente deixaram sua marca, e que fizeram parte desta história.

RESUMO

ULTRAMARI, M. A. **Desenvolvimento de método indicativo de estabilidade para o antineoplásico cloridrato de doxorrubicina e avaliação da toxicidade *in vitro* de seus principais produtos de degradação.** 2014. 130p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Em julho de 2008, a ANVISA publicou um informe técnico esclarecendo um item importante da RE nº 1 (2005), que trata sobre os estudos de estabilidade de medicamentos. Este documento originou uma nova RDC de nº 58, publicada em dezembro de 2013, a qual estabelece limites para produtos de degradação em medicamentos. O objetivo do presente trabalho foi avaliar o comportamento do antineoplásico cloridrato de doxorrubicina frente a condições de decomposição (hidrólise ácida, básica, oxidação, temperatura e fotólise), a fim de se determinar suas principais vias de degradação e também elucidar as estruturas de seus principais produtos de degradação. Para isso foi desenvolvido e validado um método indicativo de estabilidade por HPLC-DAD-MS, o qual utiliza como fase estacionária uma coluna Luna C18(2) (150 mm x 3,0 mm, 3 μm) com gradiente de fase móvel de tampão formiato de amônio 5 mmoles.L^{-1} pH 3 e metanol e fluxo de 0,3 mL.min^{-1}. Ao longo do estudo foram encontrados diversos produtos de degradação, dentre eles a 7-deoxidehidrodoxorrubicinona, originada por hidrólise ácida e também o produto da degradação térmica de *m/z* 530, o qual foi encontrado nas análises do medicamento após expirado seu prazo de validade. Além disso, a avaliação da toxicidade *in vitro* de amostras contendo produtos de degradação de origem térmica indicou atividade citotóxica para células mononucleares.

Palavras-chave: produtos de degradação, HPLC, método indicativo de estabilidade, cloridrato de doxorrubicina, toxicidade.

ABSTRACT

ULTRAMARI, M. A. **Stability indicating method development for the antineoplastic drug doxorubicin and *in vitro* toxicity evaluation of its main degradation products.** 2014. 130p. Thesis (PhD) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

ANVISA has published in July 2008, a technical sheet explaining an important item of the RE No.1 (2005), which describes drugs stability studies. This document originated a new RDC No. 58, published in December 2013, which sets thresholds for degradation products in pharmaceuticals. The aim of this study was to evaluate the behavior of the antineoplastic doxorubicin when exposed to stress conditions (acid and base hydrolysis, oxidation, photolysis and temperature) in order to determine the major pathways of degradation and also to elucidate the structures of their main degradation products. To this was developed and validated a target stability indicating method by HPLC-DAD-MS, with Luna C18 (2) (150 mm x 3.0 mm, 3 μm) column as stationary phase and a mobile phase gradient composed of ammonium formate buffer 5 mmoles.L^{-1} and pH 3 and methanol with flow of 0.3 ml min^{-1}. Throughout the study many degradation products was discovered, among them 7-deoxydehydrodoxorubicinone, formed by acid hydrolysis and also the main product of thermal decomposition of *m/z* 530, which was found in the analyzes of the medicine after the expiry of its validity were found. Furthermore, evaluation of the *in vitro* toxicity of samples containing degradation products of thermal decomposition was found to be citotoxic for mononuclear cells.

Keywords: degradation products, HPLC, stress testing, forced degradation, doxorubicin, stability-indicating method.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Limites especificados para impurezas em fármacos. 35
Tabela 2 – Limites de notificação para produtos de degradação em medicamento 36
Tabela 3 – Limites de identificação para produtos de degradação em medicamento 36
Tabela 4 – Limites de qualificação para produtos de degradação em medicamentos 37
Tabela 5 – Classificação de impurezas em relação ao potencial mutagênico e carcinogênico e ação de controle. 44
Tabela 6 – Ingestão aceitável para uma impureza individual..... 45
Tabela 7 – Ingestão aceitável para impurezas totais..... 45
Tabela 8 - Condições cromatográficas do MIE para a doxorrubicina 57
Tabela 9 - Resultados do ensaio de Análise Elementar da Doxorrubicina 64
Tabela 10 – Condições de estresse sugeridas no Informe Técnico nº1 da ANVISA (2008) (39). 80
Tabela 11 - Sistema de classificação para hidrólise ácida e básica (Singh e Bakshi, 2000) (41). 82
Tabela 12 - Resultados do teste de precisão intra-corrida 103
Tabela 13 - Resultados do ensaio de precisão inter-corrida 104
Tabela 14 - Resultados do ensaio de exatidão para os pontos 50%, 100% e 120% 105
Tabela 15 - Variação entre as áreas do padrão de doxorrubicina após três ciclos de congelamento e descongelamento, em diferentes diluentes e na presença e ausência de O_2. Áreas avaliadas em λ 480 nm. 109
Tabela 16 - Resultados das degradações da DOX padrão..... 117
Tabela 17 - Resultados das degradações do medicamento 118

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Doxorrubicina 48

Figura 2 - Espectro de IV do ativo cloridrato de doxorrubicina realizado em equipamento BOMEM MB100 em pastilha de KBr..... 65

Figura 3 – A) Espectro de massas de alta resolução, ESI+ do composto doxorrubicina, relação *m/z* 544,1761 obtido em Espectrômetro de Massas do tipo QTOF (Bruker Daltonics®); B) Espectro de massas MS2 da doxorrubicina ilustrando seus principais fragmentos. 66

Figura 4 - Estrutura e espectro de absorção no UV-Vis de 200 a 800 nm da DOX em água.... 71

Figura 5 - Comparação entre os espectros de emissão da DOX em meio aquoso (preto), tampão MOPS 10 mmoles.L^{-1} (azul) e soro fisiológico 0,9% (vermelho) (λ^{exc} em 480 nm e λ^{em} em 593 nm e fenda de excitação de 5nm e fenda de emissão de 10 nm). 72

Figura 6 - Comparação entre os espectros de emissão da DOX (preto) e do medicamento (vermelho) em meio aquoso (λ^{exc} em 480 nm e λ^{em} em 593 nm e fenda de excitação de 5nm e fenda de emissão de 10 nm). 73

Figura 7 - Espectros de absorção (UV-Vis) (preto) e de emissão de fluorescência da DOX em meio aquoso (vermelho) (λ^{exc} em 480 nm e λ^{em} em 593 nm e fenda de excitação de 5nm e fenda de emissão de 10 nm). 75

Figura 8 – A) Cromatograma da análise da DOX (Tr= 13,46 min.) com fase móvel composta por ACN:Formiato de amônio 5 mmoles.L^{-1}, 23:77 (v/v); B) Cromatograma da DOX (Tr= 8,10 min.) com fase móvel ACN:Tampão formiato de amônio 5 mmoles.L^{-1}, pH 3, 23:77 (v/v). As análises foram feitas em coluna Luna C18 (2) e os cromatogramas adquiridos em λ 235 nm. 77

Figura 9 – Microespécies da doxorrubicina formadas em solução aquosa e seus respectivos pKas (cálculo *in silico* – I-Lab, ACD/Labs)..... 78

Figura 10 - Cromatogramas do ensaio de hidrólise básica do ativo doxorrubicina nos tempos zero, 1 hora e 24 horas, respectivamente, em λ 254 nm. 81

Figura 11 - Comparação entre os espectros de UV-Vis (200-800 nm) do padrão de DOX sem reação (preto), exposto à NaOH 0,01 mol.L^{-1} (vermelho) e do medicamento também exposto à hidrólise (azul), todos no tempo zero de reação..... 83

Figura 12 - Cinética de degradação básica do ativo doxorrubicina por UV-Vis (200-800 nm) nos tempos 0, 1, 2, 3, 24 e 48 horas. 84
Figura 13 - Cinética de degradação básica do medicamento por UV-Vis (200–800 nm) nos tempos 0, 1, 2, 3, 24 e 48 horas. 85
Figura 14 – Comparação entre os cromatogramas do teste de hidrólise ácida (HCl 0,05 mmoles.L^{-1}) com DOX (primeiro pico) e DAU (daunorrubicina) (segundo pico) nos tempos 0, 1, 2, 3, 4 e 5 h, mostrando que não houve diminuição significativa da área do pico. Cromatogramas analisados em λ 478 nm. 86
Figura 15 - Cinética de reação da DOX por UV-Vis em pH 2 e temperatura ambiente nos tempos 0, 5, 10, 15, 20 e 23 horas. 89
Figura 16 - Cromatograma em λ 254 nm do padrão de DOX exposto a HCl 0,1 moles.L^{-1} à 50°C nos tempos 0 e 1 hora, indicando formação de um único produto de degradação após 1 horas de reação. 90
Figura 17 - Degradação do medicamento em HCl 0,1 moles.L-1 à 50°C nos tempos 0 e 1 hora (λ 254 nm), demonstrando alta taxa de degradação da doxorrubicina após apenas 1 hora. 91
Figura 18 - A) Cromatograma em λ 254 nm da degradação ácida com pico do produto de degradação em Tr 40,5 min e pico da DOX em 33,3 min; A) Espectro de massas em modo *scan* obtido por ionização ESI modo positivo do pico em Tr 40,5 min confirmando a estrutura prosposta como sendo a 7-deoxidehidrodoxorrubicinona (*m/z* 397) e o amino-açúcar daunosamina (*m/z* 148); C) Espectro de UV-Vis da 7-deoxidehidrodoxorrubicinona..... 92
Figura 19 – Estruturas moleculares da doxorrubicina e os produtos de hidrólise ácida, 7-deoxidehidrodoxorrubicinona (*m/z* 397) e o amino-açúcar daunosamina (*m/z* 148), encontrados ao longo dos experimentos e a doxorrubicinona (*m/z* 415) citada por Wasserman et al (1983) (44). 93
Figura 20 - Cromatogramas do ensaio de estresse com H_2O_2 3% nos tempos 0 e 48 horas (λ 254 nm), indicando a não degradação total da DOX após 48 h de reação. 96
Figura 21 - Cinética de reação da DOX com H_2O_2 3% por UV-Vis à temperatura ambiente durante 48 horas. 97
Figura 22 - Cromatogramas nos tempos 4, 24 e 48 horas (λ 254 nm) do padrão de DOX exposto a 50°C. Os cromatogramas nos tempos 24 e 48 horas indicam a presença de um único produto de degradação com Tr em 35,1 min. 99

Figura 23 - A) Cromatograma do medicamento (λ 254 nm) após 48 horas de exposição ao calor (50°C) ilustrando pico do principal produto de degradação; B) Espectro de massas obtido no modo scan por ESI modo positivo do pico do produto de degradação por temperatura (Tr 34,9 min) com sua possível estrutura molecular. 100
Figura 24 – Cromatogramas da fotodegradação da DOX nos tempos 0 e 48 horas em λ 254 nm constatando nenhum aparecimento de produto de fotodecomposição. 102
Figura 25 - Ensaio de degradação da DOX por H_2O_2 3% por 24 horas a temperatura ambiente (λ 254 nm). 103
Figura 26 - Cromatograma da análise do medicamento em λ 254 nm após prazo de validade expirado indicando a presença de um único produto de degradação em Tr 34,9 min. 106
Figura 27 – A) Cromatograma da análise do medicamento vencido (λ 254 nm) contendo produto de degradação em Tr 34,9 min; B) Espectro de massas na modo scan, ionização por ESI+ referente ao pico em Tr 34,9 min ilustrando a possível estrutura do principal produto de degradação do medicamento..... 107
Figura 28 – A) Espectro de massas no modo scan com ionização por ESI+ do principal produto de degradação do medicamento; B) Espectro de massas MS2 do íon m/z 530, confirmando a estrutura proposta para o principal produto de degradação presente no medicamento..... 108
Figura 29 – Estrutura molecular do principal produto de degradação do medicamento (íon *m/z* 530) e seu principal fragmento (íon *m/z* 383)..... 108
Figura 30 – Resultado do ensaio *in silico* para mutagenicidade (teste de Ames) da doxorrubicina e de seu principal produto de degradação. 111
Figura 31 – Estrutura molecular proposta para o produto de termodegradação da doxorrubicina..... 117

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Gráfico para a determinação do coeficiente de Absorção Molar da DOX em tampão MOPS 10 mmoles.L^{-1} em λ 480nm. 68

Gráfico 2 - Gráfico para a determinação do coeficiente de Absorção Molar da DOX em água em λ 480nm 69

Gráfico 3 - Gráfico para a determinação do coeficiente de Absorção Molar da DOX em soro fisiológico 0,9% em λ 480nm 70

Gráfico 4 – Gráfico comparando a diminuição da área do pico da DOX em meio ácido e básico em função do tempo de reação. 87

Gráfico 5 - Gráfico mostrando que não houve diminuição significativa (teste KW, $p>0,05$) na área do pico da DAU quando submetida à degradação por hidrólise ácida por 5h. 88

Gráfico 6 – Gráfico demonstrando a diminuição gradual da área do pico da DOX quando submetida à oxidação por H_2O_2 30%. 95

Gráfico 7 – Resultado da avaliação da ação citotóxica da doxorrubicina e de seu medicamento em células mononucleares (PBMC) indicando que não houve morte significativa das células com as concentrações descritas. 112

Gráfico 8 - Resultado da avaliação da ação citotóxica de amostras de doxorrubicina e de seu medicamento contendo quantidade significativa de produtos de degradação formados por fotólise em células mononucleares (PBMC) indicando que não houve morte celular significativa. 113

Gráfico 9 – Resultados do tratamento de células mononucleares com amostras de doxorrubicina e de medicamento contendo produtos de termodegradação, indicando morte significativa das células nas concentrações de ativo 2, 3 e 3,5 μml.L^{-1} (**) e de medicamento 5 μmol.L^{-1} (*). 114

LISTA DE SIGLAS

ACN – Acetonitrila

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

A_s – Simetria do pico cromatográfico

CAD – Charged Aerosol Detector/Detector por Aerosol Carregado

CE – Eletroforese Capilar

DAD – Detector por Arranjo de Diodos

DAU – Daunorrubicina

DOX – Doxorrubicina

ELSD – Evaporation Light Scattering Detector/ Detector por Espalhamento de Luz

EMEA – European Medicines Agency

ESI – Electrospray Ionization/Ionização por Eletrospray

FD – Detector por Fluorescência

FDA – Food and Drug Administration

GC – Cromatografia a Gás

HCl – Ácido Clorídrico

H_2O_2 – Peróxido de Hidrogênio

HPLC – Cromatografia à Líquido de Alta Eficiência

IARC - International Agency for Research on Cancer

ICH – International Conference on Harmonisation

ISO – International Standards Organization

k' – Fator de capacidade

LC-MS – Cromatografia a Líquido acoplada à Espectrometria de Massas

MeOH – Metanol

MIE – Método Indicativo de Estabilidade

MS – Espectrometria de Massas

NaOH – Hidróxido de Sódio

RDC – Resolução da Diretoria Colegiada

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

RP-HPLC – Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência em Fase Reversa

TF – Fator de cauda

TLC – Cromatografia em Camada Delgada

TTC – Threshold of Toxicologycal Concern

UR – Umidade Relativa

UV – Radiação Ultravioleta

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 33

1.1. HISTÓRICO E DEFINIÇÕES 33

1.2. IMPUREZAS E PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO EM MEDICAMENTOS GENÉRICOS 38

1.3. MÉTODO INDICATIVO DE ESTABILIDADE 39

1.3.1. Identificação de Impurezas e Produtos de Degradação 41

1.4. IMPUREZAS TÓXICAS 42

1.5. CLORIDRATO DE DOXORRUBICINA 47

2. JUSTIFICATIVA 52

3. OBJETIVO 53

3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS 53

4. MATERIAIS E MÉTODOS 54

4.1. PADRÃO DE DOXORRUBICINA E MEDICAMENTO 54

4.2. CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DA DOXORRUBICINA 54

4.3. MÉTODO INDICATIVO DE ESTABILIDADE 56

4.3.1. Estudos de Estresse 57

4.4. VALIDAÇÃO DO MÉTODO INDICATIVO DE ESTABILIDADE 59

4.5. TESTE DE CONGELAMENTO 60

4.6. CINÉTICA POR UV-VIS 61

4.7. AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DOS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO DA DOXORRUBICINA 61

4.7.1. Teste de Ames in silico 61

4.7.2. Ensaio de viabilidade celular por MTT 62

4.8. ANÁLISE DE DADOS 63

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO 64

5.1. CARACTERIZAÇÃO DO ATIVO DOXORRUBICINA 64

5.2. DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO INDICATIVO DE ESTABILIDADE 75

5.2.1. Estudos de estresse 80

5.2.1.1. Hidrólise 80

5.2.1.2. Oxidação 94
5.2.1.3. Degradação térmica 97
5.2.1.4. Fotodegradação 100
5.2.2. Validação do método indicativo de estabilidade 102
5.3. AVALIAÇÃO DO MEDICAMENTO 105
5.4. TESTE DE CONGELAMENTO 109
5.5. AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DOS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO DA DOXORRUBICINA 110
6. CONCLUSÕES 116
7. REFERÊNCIAS 119

1. INTRODUÇÃO

1.1. Histórico e Definições

Criada pela lei nº 9.782 de 26 de janeiro de 1999, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) tem por finalidade promover a saúde da população por intermédio do controle sanitário da produção e da comercialização de produtos e serviços submetidos à vigilância sanitária, inclusive dos ambientes, dos processos, dos insumos e das tecnologias a eles relacionados (1). Este controle deve ser feito para que se garanta, principalmente, a eficácia e a segurança de produtos para a saúde humana.

Um dos maiores alvos de fiscalização da ANVISA são os medicamentos, que para serem comercializados, devem passar por rigorosos testes, a fim de comprovar sua qualidade.

Para que um medicamento tenha qualidade ele precisa ser eficaz e seguro tendo um processo de produção de acordo com as exigências do órgão regulatório. Aliado a isto, devem ser adotadas boas práticas de fabricação e o controle de todas as substâncias que irão compor o medicamento (seja o ativo farmacêutico, sejam os excipientes), a fim de se prever a maior pureza possível. Também é importante reconhecer que todos estes compostos acabam por conter impurezas (2), o que pode interferir nas propriedades toxicológicas do medicamento.

As impurezas são resultantes de inúmeras fontes, como por exemplo, das matérias-primas, dos reagentes de síntese, como materiais de partida e ainda da degradação do produto, que pode originar compostos indesejáveis durante o próprio processo de fabricação, transporte ou ainda durante o armazenamento dos medicamentos. Entender a origem, controlar e quantificar as impurezas, é importante e crítico para a produção de fármacos e medicamentos com alta qualidade.

Os principais órgãos regulatórios do mundo trazem diferentes definições para impurezas. O guia Q3A (R2) do International Conference on Harmonisation (ICH), que trata sobre impurezas em novos princípios ativos, define impureza como qualquer componente do novo ativo que não é a própria entidade química referente ao novo insumo farmacêutico

ativo (3). Já o guia do ICH Q3B (R2), que trata sobre impurezas em novos produtos farmacêuticos define impureza como sendo qualquer componente do novo produto farmacêutico que não é nem o princípio ativo e nem os excipientes contidos no novo produto (4). A ANVISA trata impureza como sendo qualquer componente do medicamento que não seja o fármaco nem o excipiente (5), assim como o guia Q3B (R2) do ICH. Todas as definições existentes para impureza podem ser resumidas como sendo qualquer substância que afeta a pureza do material de interesse, no caso um fármaco ou medicamento.

Segundo os guias anteriormente citados (ICH), as impurezas podem ser classificadas em diferentes categorias: impurezas orgânicas, impurezas inorgânicas e solventes residuais (3). As impurezas orgânicas podem surgir durante o processo de produção e/ou armazenamento do medicamento e podem ser conhecidas ou não, voláteis ou não, e incluem: materiais de partida, coprodutos, intermediários, produtos de degradação, reagentes, ligantes ou ainda catalisadores (3). As impurezas inorgânicas podem resultar do processo de produção e, normalmente, são conhecidas e identificadas e incluem: reagentes, ligantes e catalisadores, metais pesados ou outro resíduo de metal, sais inorgânicos e outros materiais como, por exemplo, carvão vegetal (3). Solventes residuais são líquidos orgânicos ou inorgânicos utilizados como veículos para o preparo de soluções ou suspensões, na síntese do fármaco ou no processo de manufatura do produto. Como geralmente são toxicologicamente conhecidos, existe um guia específico do ICH (Q3C) destinado somente a este tópico (6).

A fim de se monitorar a presença das diversas impurezas que podem ser encontradas nos fármacos ou no próprio medicamento os guias do ICH para controle de impurezas, assim como os guias do Food and Drug Administration (FDA) e mais recentemente os da ANVISA, especificam limites aceitáveis para impurezas, os quais estão indicados na tabela 1.

Tabela 1 – Limites especificados para impurezas em fármacos.

Dose Diária Máxima[1]	Limite de Notificação[2,3]	Limite de Identificação[3]	Limite de Qualificação[3]
≤ 2 g/dia	0,05%	0,10% ou 1 mg ingerido por dia (o que for menor)	0,15% ou 1 mg ingerido por dia (o que for menor)
> 2 g/dia	0,03%	0,05%	0,05%

Guia Q3A (R2) ICH – Impurities in new drug substances.

[1] Quantidade de fármaco ingerido por dia

[2] Limites de notificação maiores devem ser cientificamente justificados

[3] Limites menores podem ser assumidos se a impureza for extremamente tóxica

Se a porcentagem da impureza encontrada está dentro do limite de notificação, esta deverá ser apenas reportada ao órgão regulatório. Caso a impureza presente esteja em concentração maior, dentro do limite de identificação, esta deverá ser devidamente caracterizada, ou seja, sua estrutura molecular e demais informações reportadas ao órgão regulatório. Caso a impureza atinja o limite de qualificação, esta deverá ser qualificada, ou seja, deverão ser reportados aos órgãos regulatórios os dados toxicológicos da molécula encontrada.

Apesar de os produtos de degradação também serem considerados impurezas, estes possuem atenção especial quando se trata de limites. O guia Q3B (R2) do ICH (4), assim como a RDC nº 58 da ANVISA (5), trazem limites específicos para produtos de degradação, conforme as tabelas a seguir (Tabela 2-4) e definem produto de degradação como sendo uma impureza resultante de uma alteração química do ativo farmacêutico originada durante o processo de produção e/ou devido aos efeitos, por exemplo, da luz, temperatura, pH, umidade ou a reações com os excipientes e/ou contato com a embalagem primária durante o armazenamento do produto (4 e 5).

Tabela 2 – Limites de notificação para produtos de degradação em medicamento

Dose Diária Máxima [1]	Limite [2,3]
≤ 1 g	0,1%
> 1 g	0,05%

[1] Quantidade do fármaco ingerido por dia.

[2] Os limites para produtos de degradação são expressos em porcentagem do fármaco ou como a ingestão diária total (IDT) de um produto de degradação. Limites menores podem ser assumidos caso o produto de degradação seja extremamente tóxico.

[3] Limites maiores devem ser cientificamente justificados.

Tabela 3 – Limites de identificação para produtos de degradação em medicamento

Dose Diária Máxima [1]	Limite [2,3]
< 1 mg	1,0% ou 5 µg IDT, o que for menor
1 mg – 10 mg	0,5% ou 20 µg IDT, o que for menor
> 10 mg – 2 g	0,2% ou 2 mg IDT, o que for menor
> 2 g	0,10%

[1] Quantidade do fármaco ingerido por dia.

[2] Os limites para produtos de degradação são expressos em porcentagem do fármaco ou como a ingestão diária total (IDT) de um produto de degradação. Limites menores podem ser assumidos caso o produto de degradação seja extremamente tóxico.

[3] Limites maiores devem ser cientificamente justificados.

Tabela 4 – Limites de qualificação para produtos de degradação em medicamentos

Dose Diária Máxima [1]	Limite [2,3]
< 10 mg	1,0% ou 50 µg IDT, o que for menor
10 mg – 100 mg	0,5% ou 200 µg IDT, o que for menor
> 100 mg – 2 g	0,2% ou 3 mg IDT, o que for menor
> 2 g	0,15%

[1] Quantidade do fármaco ingerido por dia.

[2] Os limites para produtos de degradação são expressos em porcentagem do fármaco ou como a ingestão diária total (IDT) de um produto de degradação. Limites menores podem ser assumidos caso o produto de degradação seja extremamente tóxico.

[3] Limites maiores devem ser cientificamente justificados.

Ao se comparar os limites de impurezas exigidos para fármacos com os exigidos para medicamentos se pode perceber que os limites para produtos de degradação são mais detalhados, dando, portanto, destaque a valores mais baixos de doses diárias. Já os limites para impurezas em ativos farmacêuticos são mais restritos. Isto ocorre, provavelmente, para que se tenha melhor controle sobre a qualidade da matéria-prima empregada para a produção de medicamento, a fim de que esta não agregue impurezas ao produto final.

Os limites acima indicados não servem para todos os compostos existentes. Quando a impureza encontrada possui toxicidade conhecida e elevada, estes limites devem ser ajustados para que se garanta a segurança do produto. Como exemplo, podem ser consideradas as impurezas genotóxicas, que não são mencionadas nos guias referidos, pois possuem um guia específico, o M7 do ICH, de fevereiro de 2013 (7), além de ser um assunto de constantes discussões no âmbito acadêmico (8).

Além das impurezas genotóxicas, as impurezas quirais também não são mencionadas nos guias do ICH, e neste caso, em nenhum outro guia de agências regulatórias no mundo (8). Talvez isto ocorra devido ao fato de as técnicas analíticas, que são atualmente utilizadas para determinar e quantificar isômeros, serem, ainda, um desafio tecnológico. Estas impurezas quirais, apesar de serem quimicamente idênticas às moléculas de interesse, sendo a única diferença entre elas o arranjo tridimensional dos átomos, deveriam ser

cuidadosamente monitoradas, pois como já comprovado *in vivo*, existem diferenças significativas entre as ações farmacológicas e principalmente toxicológicas destas moléculas (9).

Em 20 de dezembro de 2013 a ANVISA publicou a RDC nº 58, que estabelece parâmetros para a notificação, identificação e qualificação de produtos de degradação em medicamentos com substâncias ativas sintéticas e semissintéticas, classificados como novos, genéricos ou similares, e dá outras providências (5). Esta resolução exige que as indústrias farmacêuticas realizem o monitoramento dos produtos de degradação dos medicamentos, para conhecê-los, de forma a garantir, além da qualidade do produto, sua segurança. E para redigir tal resolução a ANVISA teve como base o guia internacional Q3B do ICH.

Esta nova resolução também traz providências quanto aos estudos que devem ser realizados para que se conheça de fato o comportamento do ativo farmacêutico no medicamento. Estes testes são conhecidos como testes de estresse ou ainda ensaios de degradação forçada. Tais testes são usados para avaliar a formação dos produtos de degradação e são objetos de estudo o medicamento, o fármaco isolado e o placebo. Estes ensaios ajudam a entender melhor a cinética de formação dos produtos de degradação, além de ajudar a prever quais são os mais prováveis produtos de degradação que podem ser realmente encontrados no medicamento que está disponível para a população, e também auxiliam no desenvolvimento de métodos analíticos específicos, chamados de métodos indicativos de estabilidade.

O objetivo inicial deste teste é gerar produtos de degradação em quantidade suficiente para poder se desenvolver e validar o método indicativo de estabilidade. Depois de desenvolvido e validado, este método deverá ser destinado a avaliar as amostras de medicamentos provenientes dos estudos de estabilidade, o qual tem como objetivo geral prever, determinar e acompanhar o prazo de validade do produto farmacêutico.

1.2. Impurezas e Produtos de Degradação em Medicamentos Genéricos

Publicado primeiramente em 1994, o guia Q3A do ICH trouxe a preocupação das agências regulatórias do mundo com a presença de impurezas em novos fármacos e

medicamentos. Desde então, as agências passaram a exigir o monitoramento de tais impurezas a fim de garantir, principalmente, a segurança dos produtos farmacêuticos.

Para introduzir um novo medicamento no mercado, as indústrias precisam investigar tanto as impurezas contidas nos fármacos quanto os produtos de degradação que podem ser formados ao longo do processo de fabricação, transporte e armazenamento do novo produto. As indústrias produtoras de medicamentos referência realizam os estudos de degradação e perfil de impurezas no início dos testes com a nova entidade química e isto faz com que elas conheçam melhor todos os interferentes oriundos da síntese do ativo, o que pode auxiliar na otimização do processo de produção com consequente diminuição de impurezas, além de gerar conhecimento sobre o perfil de degradação do ativo, o que auxiliará nos estudos de formulação do novo produto e também na escolha das embalagens primárias (10).

A criação em meados dos anos 90 da indústria de genéricos no Brasil e no mundo também gerou preocupações quanto as possíveis impurezas presentes nestes medicamentos. No momento em que os genéricos são lançados no mercado, informações como a toxicidade do ativo, seus metabólitos e as impurezas que podem ser encontradas no medicamento são conhecidas e já foram estudadas pela empresa inovadora (11). Porém, as rotas de síntese dos fármacos, a origem dos excipientes e as formulações dos produtos genéricos serão diferentes do produto referência. Consequentemente, os genéricos poderão conter impurezas não conhecidas, não estudadas e nem contidas na monografia do ativo ou em literatura científica (11), o que exige que novos estudos sejam realizados.

1.3. Método Indicativo de Estabilidade

Como já abordado anteriormente, um dos objetivos do estudo de estresse é gerar amostras com quantidades suficientes de produtos de degradação que irão auxiliar no desenvolvimento do método analítico, o qual, mais tarde, será utilizado para avaliar as amostras provindas dos estudos de estabilidade, a fim de investigar a real presença de produtos de degradação no medicamento. Como a finalidade deste método é específica

para avaliar a estabilidade dos compostos da formulação, este é chamado de método indicativo de estabilidade.

Este método deve ser capaz de detectar concentrações baixas de produtos de degradação, de separar adequadamente todas as substâncias presentes na amostra e, se possível, identificá-las estruturalmente. Muitas vezes uma única ferramenta analítica não é capaz de realizar todas estas exigências de uma única vez, por isso, cada vez mais o uso de técnicas hifenadas para a investigação de impurezas e produtos de degradação se faz necessário.

A principal técnica empregada atualmente para análises de impurezas e/ou produtos de degradação é a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com detecção por UV-Visível (detector por arranjo de diodos – DAD). Outras técnicas também podem ser utilizadas ou associadas à cromatografia líquida para otimizar a separação dos compostos, como, por exemplo, a cromatografia em camada delgada (TLC), eletroforese capilar (CE) ou ainda a cromatografia gasosa (GC) muito utilizada para análise de compostos voláteis.

Outros tipos de detectores, como o de fluorescência (FD), espectrômetro de massas (MS), índice de refração (IR), por espalhamento de luz (ELSD) e aerossol carregado (CAD), também podem e devem ser utilizados quando possível. A detecção por espectrometria de massas permite identificar a maioria dos compostos em análise e, como o DAD, é capaz de garantir a eficácia da separação através da comprovação da pureza do pico cromatográfico.

Para se desenvolver um método indicativo de estabilidade três importantes fatores devem ser considerados: a amostra, a técnica de separação e o detector (12). A amostra usada para o desenvolvimento do método deve ser representativa, ou seja, deve conter a maior quantidade de produtos de degradação e impurezas possíveis. A escolha pode ser algo que se encaixe entre o pior caso de degradação e a degradação real, natural da amostra (12). Como dificilmente é possível escolher uma única amostra que possua estas características, o desenvolvimento pode ser feito com várias amostras diferentes, ao invés de uma única, o que irá ajudar a desafiar a especificidade do método. Outra escolha importante é a técnica de separação. Como já dito anteriormente, a cromatografia líquida é a técnica mais utilizada atualmente e o método de escolha para a separação dos compostos é a fase reversa (RP-HPLC) (12). Tendo em mãos as amostras mais representativas e já tendo escolhido a RP-HPLC

como técnica de separação, os parâmetros cromatográficos devem ser escolhidos e testados.

O detector DAD é o mais utilizado para este tipo de análise, pois, além de ser um equipamento relativamente barato, ele é capaz de analisar a amostra injetada, em uma ampla faixa de comprimento de onda (200 – 800 nm) e por isso também gera informações importantes como a pureza de pico, a qual eleva a seletividade da detecção reduzindo a interferência por coeluição, e também o espectro de absorção das substâncias (12). Técnicas hifenadas com detectores em série também são uma boa opção para se obter mais informações em uma única corrida analítica.

Para compostos que não absorvem no UV-Visível, mas que são fluorescentes, o detector por fluorescência é uma ótima escolha, pois é bem específico e seletivo, além de ser um dos detectores mais sensíveis, sendo capaz de determinar concentrações muito baixas de analitos. Porém, recomenda-se que, no caso de métodos indicativos de estabilidade, não se utilize este como única fonte de detecção, pois muitos produtos de degradação podem ser moléculas que não possuem a propriedade fluorescente e, neste caso, muita informação importante será perdida.

Levando-se em consideração a semelhança entre os produtos de degradação e o fármaco, o melhor detector, capaz de diferenciar os compostos através do peso molecular além de fornecer informações mais detalhadas sobre as estruturas das moléculas em análise, é o espectrômetro de massas (MS). Este detector só não é o mais utilizado atualmente devido a seu alto custo.

1.3.1. Identificação de Impurezas e Produtos de Degradação

De acordo com os guias do ICH para impurezas em ativos e em medicamentos, o menor limite especificado para impurezas é de 0,1% de acordo com a dose diária ingerida (3,4). Portanto, é importante que o limite de quantificação do método seja de no mínimo 0,05% e para isso o método deve ser sensível. Acima destes limites as substâncias encontradas devem ser identificadas, ou seja, sua estrutura molecular deve ser descoberta e devidamente reportada para a agência regulatória. A identificação dos produtos de

degradação é importante para promover o conhecimento sobre a formação desta impureza e definir seus mecanismos de degradação (13). Uma das inúmeras opções para identificar uma substância em uma amostra complexa é isolá-la em quantidade suficiente para caracterizá-la. Somente para este processo devem ser empregadas um conjunto de ferramentas analíticas: uma cromatografia líquida preparativa ou semipreparativa com detecção por UV (DAD) ou por fluorescência para o isolamento do composto e para a elucidação estrutural podem ser utilizadas diferentes técnicas, como Ressonância Magnética Nuclear de ^{1}H e/ou ^{13}C, Espectrometria de Massas *in Tandem* ou de alta resolução, dentre outras técnicas espectroscópicas.

Atualmente, existem programas computacionais que auxiliam o estudo e a identificação dos possíveis produtos de degradação, dentre eles o Zeneth (Lhasa Limited, Reino Unido) e o ACD/Percepta (ACD Labs, Canadá), por exemplo. Estes programas são capazes de prever possíveis produtos de degradação a partir do fármaco e a quais reações de degradação este deve ser submetido para serem gerados. Porém, deve-se levar em consideração que tais programas são apenas uma ferramenta para auxiliar no entendimento e na busca por moléculas que ainda não são conhecidas. Após o estudo feito com a ajuda destes programas, métodos confirmatórios devem ser realizados para elucidar a real estrutura do composto em análise.

1.4. Impurezas Tóxicas

Segundo Ahuja (9), impurezas tóxicas são impurezas que possuem atividade biológica indesejada, mesmo em baixas concentrações, e requerem identificação e quantificação individual por testes específicos. Quando os guias do ICH (Q3A e Q3B) especificam limites para a qualificação de impurezas, isto significa que há uma preocupação com a segurança, tanto do ativo quanto do medicamento, pois, impurezas em determinadas concentrações podem causar sérios riscos à saúde humana e estas, ao contrário do consumo de medicamentos, que envolve risco/benefício, sempre representarão risco, sem nenhum benefício associado.

Atualmente existe uma grande preocupação quanto a impurezas genotóxicas e por isso, em fevereiro de 2013 o ICH publicou um *draft* de um guia específico, o M7, que trata deste tema (7). Este guia é um complemento aos guias Q3A e Q3B do ICH, os quais são limitados quando se trata de impurezas que reagem com o DNA (ácido desoxirribonucleico). Segundo as recomendações deste guia, que traz providências para avaliação e controle de impurezas mutagênicas presentes ou esperadas no fármaco ou medicamento para evitar o risco de câncer, estas devem ser controladas baseando-se na avaliação de risco específica para cada composto (7). Reconhecendo a dificuldade de se obter dados relevantes sobre os riscos de impurezas genotóxicas, este guia propõe um limite de risco toxicológico (TTC – threshold of toxicological concern), que indica um limite de exposição ao composto, que não implicaria nenhum risco carcinogênico ou outro efeito toxicológico. O guia propõe um TTC de 1,5 µg/dia, que corresponde a um risco menor que 1 em 100.000 de a substância causar câncer, risco que o ICH considera justificável quando se considera os benefícios dos medicamentos (7).

No guia M7 (7), toda impureza real ou potencial, em que a estrutura é conhecida, deve ter seu potencial mutagênico avaliado e classificado em uma das 5 classes, conforme a Tabela 5.

Tabela 5 – Classificação de impurezas em relação ao potencial mutagênico e carcinogênico e ação de controle.

Classe	Definição	Ação proposta para controle
1	Mutagênico cancerígeno conhecido.	Controlar abaixo ou no limite aceitável específico do composto.
2	Mutagênico conhecido com potencial carcinogênico desconhecido (Mutagenicidade Bacteriana Positiva*, sem dados de carcinogenicidade em roedores).	Controlar abaixo ou no limite aceitável (TTC ajustado ou genérico).
3	Estrutura alerta, não relacionada à estrutura do fármaco; sem dados de mutagenicidade.	Controlar abaixo ou no limite aceitável (TTC ajustado ou genérico) ou realizar ensaio de mutagenicidade bacteriana. Se não mutagênico = Classe 5. Se mutagênico = Classe 2.
4	Estrutura alerta, relacionada à estrutura no fármaco que foi testado e não é mutagênico.	Tratar impureza como não mutagênica.
5	Sem alerta estrutural, ou estrutura alerta com dados suficientes para demonstrar ausência de mutagenicidade.	Tratar impureza como não mutagênica.

*Ou outro dado relevante de mutagenicidade positiva indicativa de reatividade a DNA relacionada à indução de mutação gênica (ex: achados positivos em estudos de mutação gênica *in vivo*). ICH M7 - Assessment and control of DNA reactive (mutagenic) impurities in pharmaceuticals to limit potential carcinogenic risk (7)

As classes 3, 4 e 5 incluem impurezas cujos dados de mutagenicidade bacteriana e carcinogenicidade não estão disponíveis nos bancos de dados e literatura. Para esses casos, a avaliação da Relação Estrutura-Atividade (REA), que prediz a mutagenicidade bacteriana, define se a impureza será tratada como mutagênica.

Para impurezas da classe 1, a ingestão aceitável específica para a substância pode ser calculada baseada em seu potencial carcinogênico e extrapolação linear como abordagem padrão. Outras avaliações de risco já existentes por algumas agências regulatórias também podem ser praticadas.

O valor limite aceito pelo TTC é considerado preventivo para exposições diárias ao longo da vida (aproximadamente, 70 anos). O guia apresenta um conceito diferente para exposições a impurezas por curto período (Less-Than-Lifetime), em que se distribuem uniformemente as doses cumulativas para a vida (de 1,5 µg/dia x 25.550 dias = 38,3 mg) pelo total de dias de exposição do tratamento, resultando em doses diárias de impurezas mutagênicas mais altas, como representas as Tabelas 6 e 7 (7).

Tabela 6 – Ingestão aceitável para uma impureza individual

Duração do tratamento	≤ 1 mês	>1 - 12 meses	>1 - 10 anos	>10 anos à vida
Ingestão diária [µg/dia]	120	20	10	1.5

ICH M7 - Assessment and control of DNA reactive (mutagenic) impurities in pharmaceuticals to limit potential carcinogenic risk (7).

Tabela 7 – Ingestão aceitável para impurezas totais

Duração do tratamento	≤ 1 mês	>1 - 12 meses	>1 - 10 anos	>10 anos à vida
Ingestão diária [µg/dia]	120	60	10 (30*)	5

ICH M7 - Assessment and control of DNA reactive (mutagenic) impurities in pharmaceuticals to limit potential carcinogenic risk (7).

*Para o desenvolvimento clínico de até 3 anos. Princípios semelhantes podem ser aplicados a produtos comercializados desde que devidamente justificados.

Apenas impurezas especificadas contribuem para o cálculo total. Produtos de degradação seriam controlados individualmente, sendo assim o limite total não seria aplicável (7).

Embora estabelecidos os princípios, o guia dá abertura a exceções e flexibilidades para justificativas dos valores de ingestões aceitáveis caso-a-caso, (ex: pela severidade da

doença que o medicamento vem a tratar) para o desenvolvimento de medicamentos e produtos já comercializados (7).

Para avaliar a toxicidade destas impurezas, em novembro de 2011, o ICH publicou um guia específico para impurezas genotóxicas, o S2 (R1), que trata sobre testes de genotoxicidade e interpretação de seus dados para medicamentos de uso humano. Este guia define testes de genotoxicidade como sendo testes *in vitro* e *in vivo*, desenvolvidos para detectar compostos capazes de induzir danos genéticos, por vários mecanismos (14). Também traz diretrizes para a realização dos testes de genotoxicidade para moléculas de fármacos e não se aplica a produtos biológicos (14).

Padrões para a realização dos ensaios de genotoxicidade são recomendados neste guia (14) e de maneira geral, as características gerais de uma sequência de testes são as seguintes:

i. Avaliação da mutagenicidade em bactérias em testes de mutação gênica (AMES). Este teste tem sido capaz de detectar mudanças genéticas e a maioria dos carcinógenos potenciais para roedores e humanos.

ii. Genotoxicidade também deve ser avaliada em testes *in vitro* e *in vivo* em células de mamíferos.

Dentre os testes *in vitro*, o ICH recomenda os que são mais amplamente utilizados e que já estão devidamente validados, como os ensaios de aberração cromossômica, micronúcleo e ensaios de mutação gênica em células de linfoma L5178Y.

Os ensaios *in vivo* estão incluídos nos protocolos do ICH por garantia, pois muitos compostos podem apresentar genotoxicidade *in vivo* e não apresentar *in vitro* e também porque se deve levar em consideração a farmacocinética dos toxicantes.

Os testes *in vivo* sugeridos pelo órgão internacional englobam os ensaios de micronúcleo em eritrócitos (em sangue e em medula óssea) e ensaios de aberrações cromossômicas em células metafásicas de medula óssea.

Além de testes *in vitro* e *in vivo,* também podem ser usados testes *in silico* para predizer se as moléculas das impurezas têm ou não o potencial genotóxico. Estes ensaios são feitos por programas computacionais como QSAR (relação estrutura-atividade quantitativa)

ou simplesmente por SAR (relação estrutura-atividade qualitativa) (15). O QSAR é capaz de fornecer informações importantes sobre a toxicidade dos compostos, porém alguns QSARs não fornecem níveis de toxicidade. Outros programas são capazes de fornecer este tipo de informação, como TOPKAT, CASE, DEREK, dentre outros (16).

Outra forma de tentar prever a genotoxicidade de determinados compostos é estudando detalhadamente sua estrutura química e identificando alertas genotóxicos. Müller e colaboradores (17) indicaram estruturas alertas para genotoxicidade, porém eles ressaltam que, outros testes devem ser feitos para comprovar a toxicidade do composto.

1.5. Cloridrato de Doxorrubicina

A doxorrubicina (DOX) (Figura 1), também conhecida como Adriamicina é um antibiótico do grupo das antraciclinas de amplo espectro antineoplásico e um dos mais importantes agentes anticâncer utilizados (18). Em meados dos anos 1960, a doxorrubicina e sua precursora a daunorrubicina (DAU) foram identificadas e isoladas pela primeira vez de uma cepa do fungo *Streptomyces* sp. produtor de pigmentos (19). Este fármaco tem sido usado com sucesso na terapia de primeira linha, nas seguintes condições neoplásicas: leucemia linfoblástica aguda, leucemia mieloblástica aguda, tumor de Wilm, neuroblastoma, sarcomas de tecidos moles e de ossos, carcinoma de mama, carcinoma de ovário, carcinoma avançado do endométrio, carcinoma de células transitórias da bexiga, carcinoma de tireóide, linfomas do tipo Hodgkin e não Hodgkin, carcinoma gástrico e carcinoma broncogênico, no qual o tipo histológico de células pequenas é mais responsivo em comparação a outros tipos celulares. Também tem demonstrado resultados promissores na terapia de segunda linha em câncer testicular refratário e carcinomas de cabeça e de pescoço (20).

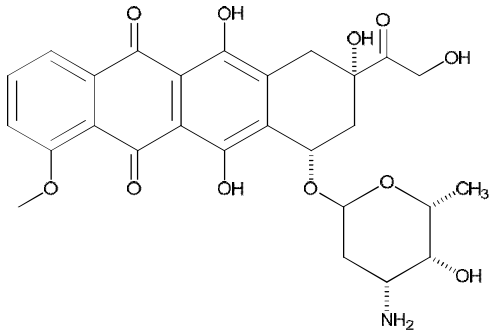


Figura 1- Doxorrubicina

A doxorrubicina é um dos medicamentos mais utilizados para o tratamento do câncer de mama, em combinação com outros antineoplásicos. Segundo dados do Ministério da Saúde, esperam-se para 2012, no Brasil, 52.680 novos casos somente de câncer de mama, com um risco estimado de 52 casos, a cada 100 mil mulheres (21). Este tipo de câncer acomete mulheres em todo o mundo, tanto em países em desenvolvimento quanto em países desenvolvidos. Cerca de 1,4 milhões de casos novos desta neoplasia foram esperados para o ano de 2008 em todo mundo, o que representa 23% de todos os tipos de câncer (21).

Do ponto de vista químico a doxorrubicina, assim como toda antraciclina, é composta por um anel aglicônico ligado a um aminoaçúcar (daunosamina) através de uma ligação glicosídica. A parte maior da molécula, a antraciclina propriamente dita, que é responsável pelo seu principal mecanismo de ação.

O mecanismo exato de ação deste fármaco é muito discutido. Segundo Lazo (22), as antraciclinas podem intercalar com o DNA, afetando diretamente a transcrição e replicação do mesmo. Muitos estudos mostram que as antraciclinas antitumorais são responsáveis por estabilizar um complexo covalente entre a topoisomerase II e o DNA, o que impede a conclusão do ciclo catalítico da enzima e consequente quebra da estrutura do DNA. Este processo é seguido pelo aumento do número de clivagens no DNA em células vivas assim como nos fragmentos de DNA na presença de topoisomerase II purificada. Assim, as antraciclinas são capazes de transformar uma enzima inofensiva, a topoisomerase II, em um potente agente tóxico para o núcleo, capaz de causar um dano letal a dupla hélice (18).

A topoisomerase II é uma enzima ATP dependente que se liga ao DNA e causa uma quebra na dupla fita na porção fosfato 3', permitindo a passagem e o desenrolar da fita.

Após a passagem da fita, a topoisomerase II religa as fitas de DNA. Esta função é essencial para a replicação e reparo da DNA. A formação da ligação tripartite entre a doxorrubicina, a enzima e o DNA, impede a religação das fitas do DNA, causando apoptose da célula (22).

Outro fator responsável pela citotoxicidade das antraciclinas é sua capacidade de produzir radicais livres, tanto em tecido atingidos pelo câncer quanto em tecidos sadios. Elas podem formar radicais intermediários semiquinonas, que consequentemente podem reagir com o oxigênio para produzir ânions de radicais superóxidos. Estes podem gerar tanto peróxido de hidrogênio quanto radicais hidroxila ($^{\cdot}OH$) que atacam o DNA e oxidam as bases nitrogenadas do DNA (19).

Segundo Binaschi e colaboradores (18) a ação citotóxica das antraciclinas é resultante da interação de diferentes fatores e pelo menos três fatores são importantes, os níveis de danos ao DNA, a persistência da clivagem e a seletividade do local da quebra da dupla fita dependente do estímulo da antraciclina.

A doxorrubicina é administrada por via intravenosa, é metabolizada por um complexo padrão do metabolismo hepático e sua excreção é biliar e urinária. Sua curva de desaparecimento plasmático é multifásica, com meia vida de eliminação de 3 horas e cerca de 30 horas. Toda antraciclina é convertida em metabólitos alcoólicos intermediários ativos responsáveis pela variabilidade em sua ação terapêutica. Este fármaco é rapidamente distribuído pelo organismo, sendo encontrado em concentrações mais altas no baço, fígado, rins, pulmões e coração. As antraciclinas não atravessam a barreira hematoencefálica, porém podem atravessar a barreira placentária. A doxorrubicina é eliminada pela sua conversão em diversos metabólitos aglicônicos, como doxorrubicinol aglicona, 7-deoxidoxorrubicina aglicona, doxorrubicinona, e outros produtos inativos (22).

A dose de doxorrubicina recomendada é de 50 a 75 mg/m² e administrada por infusão rápida e em dose única que deverá ser repetida após 21 dias. Durante a administração, cuidados devem ser tomados para que o líquido não extravase, pois isto pode causar sérios danos no local incluindo necrose do tecido (22).

Assim como a maioria dos antineoplásicos, a doxorrubicina causa muitos efeitos adversos dentre eles, mielossupressão dose limitante com leucopenia, trombocitopenia e anemia, estomatites, distúrbios gastrointestinais, alopecia, eritomatose perto do local de

aplicação. A principal e mais importante reação adversa de longo prazo causada por este fármaco é a cardiotoxicidade (22). Além de causar estes efeitos adversos, a doxorrubicina é classificada pela IARC (International Agency for Research on Cancer) como 2A, o que significa que ela é provavelmente carcinogênica para humanos (23).

O fato de a doxorrubicina ser um fármaco amplamente utilizado na terapia anticâncer atrelado ao fato de ser carcinogênico e ser administrado por via intravenosa, ou seja, de não haver necessidade de absorção ou passagem por barreiras biológicas, estando, portanto, 100% disponível, chamam a atenção para certos cuidados que se deve ter durante o armazenamento e manipulação de seu respectivo medicamento a fim de se evitar a degradação ou até mesmo contaminação do produto. Portanto, para se garantir a eficácia e segurança do medicamento estudos sobre a estabilidade da molécula devem ser realizados, principalmente pelo fato de as agliconas e outros produtos de degradação serem mutagênicos e não possuírem ação contra os tumores (24).

Sabe-se que além de ser extremamente sensível a meios básicos e meios oxidativos, a doxorrubicina também se mostra susceptível a luz e adsorve em membranas filtrantes e recipientes de vidro e plástico, com exceção de polipropileno (25).

Apesar de haver trabalhos mostrando a susceptibilidade da doxorrubicina a algumas condições adversas, nenhum deles identificou as estruturas moleculares dos produtos de degradação quando encontrados. Além disso, nenhum trabalho realizou ensaios para verificar a real presença de produtos de degradação no medicamento, tão pouco avaliou a toxicidade de tais produtos.

Como já alertado anteriormente, para realizar um estudo detalhado sobre a estabilidade de ativos farmacêuticos é necessário o desenvolvimento de um método indicativo de estabilidade, devido sua maior especificidade e seletividade. Inúmeros métodos analíticos para determinação e até mesmo para a quantificação da doxorrubicina e de suas principais impurezas e metabólitos podem ser encontrados na literatura. Desde sua descoberta e com os avanços da tecnologia, principalmente na área analítica, muitos métodos por HPLC acoplado a diferentes tipos de detectores foram publicados. Contudo, os dados apresentados ainda são inconclusivos e reformulações de testes de degradação e

novos métodos analíticos ainda são necessários. Há ainda a necessidade de estudo sobre a toxicidade dos produtos de degradação deste medicamento.

2. JUSTIFICATIVA

Estimativas para o ano de 2012 e também válidas para 2013 apontam a ocorrência de aproximadamente 518.510 mil novos casos de câncer no Brasil, dentre estes 260.640 mil para o sexo feminino. O câncer da pele tipo não melanoma será o mais incidente, seguido do câncer de próstata (60 mil) e do câncer de mama (53 mil) (21). Sendo o principal tratamento para o câncer de mama associações que incluem o cloridrato de doxorrubicina, é importante estudar e obter informações relevantes sobre este ativo para que o tratamento seja eficaz e para que se evite ao máximo seu efeito tóxico. Por isso, se faz importante a investigação de produtos de degradação no medicamento e também o estudo sobre a toxicidade destas impurezas, pois estes estudos podem garantir que estes compostos não serão prejudiciais ao paciente, ou podem ainda, provar os riscos de se ter estes produtos de degradação no medicamento. Apesar destas importantes constatações, não existe, atualmente, na literatura científica nenhum método indicativo de estabilidade para o ativo farmacêutico cloridrato de doxorrubicina. Os metabólitos da doxorrubicina são conhecidos e descritos na literatura e também há estudos de toxicidade dos mesmos, porém não há nenhuma correlação descrita atualmente sobre metabólito e produtos de degradação, pois pouco se sabe sobre estas impurezas e suas possíveis toxicidades.

O fato de este medicamento ser administrado por via intravenosa atrelado ao fato de ser um composto altamente tóxico traz uma grande preocupação, pois, se houver a presença de produtos de degradação que sejam prejudiciais ao paciente, estes estarão 100% biodisponíveis para interagir com qualquer sítio do organismo, podendo gerar uma toxicidade desnecessária para um paciente já debilitado, tanto pela doença (câncer) quanto por seu tratamento.

3. OBJETIVO

O presente trabalho tem como objetivo avaliar a suscetibilidade do ativo farmacêutico cloridrato de doxorrubicina e de seu medicamento a condições de estresse, determinar seus principais produtos de degradação através de métodos analíticos específicos e avaliar a toxicidade *in vitro* de amostras degradadas.

3.1. Objetivos Específicos

i. Desenvolver um método indicativo de estabilidade para o cloridrato de doxorrubicina por HPLC com detecção por DAD e Espectrometria de Massas;

ii. Avaliar a suscetibilidade da doxorrubicina a condições de degradação forçada;

iii. Avaliar amostras do medicamento passado o prazo de validade através do método desenvolvido para identificar os produtos de degradação reais;

iv. Identificar os principais produtos de degradação da doxorrubicina e suas vias de formação;

v. Avaliar a toxicidade *in vitro* de amostras degradadas do ativo e do medicamento.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Padrão de doxorrubicina e medicamento

Todos os estudos foram conduzidos com a matéria-prima de cloridrato de doxorrubicina gentilmente doada pela empresa Libbs Farmacêutica Ltda, com medicamento doado por uma indústria farmacêutica (pó liófilo - cloridrato de doxorrubicina) e com lactose (placebo) adquirida em farmácia de manipulação. Para a validação foi utilizado o padrão do ativo da farmacopeia americana (USP – United States Pharmacopoeial).

4.2. Caracterização estrutural da doxorrubicina

O estudo das características estruturais da molécula foi realizado pelas técnicas de Análise Elementar (%CHN), Infravermelho (IV), Espectrometria de Massas (MS), Espectrofotometria (UV-Vis) e Espectrofluorimetria. As duas primeiras técnicas foram realizadas pela Central Analítica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo. O espectro de massas de alta resolução foi obtido em um equipamento do tipo ESI-QTOF (Micro QTOF II, Bruker Daltonics®). As leituras em UV-Vis e fluorescência foram realizadas em espectrofotômetro Thermo Evolution 260 e Varian Cary 50 e espectrofluorímetro Varian Cary Eclipse.

Para se determinar o coeficiente de absorção molar ($\varepsilon^{\lambda abs}$) da doxorrubicina em diferentes meios foram preparadas curvas com absorções crescentes de 0,1, 0,3, 0,5, 0,7 e 0,9, tendo com referência $\varepsilon^{\lambda abs}$ =11500 $L.mol^{-1}cm^{-1}$ em λ^{abs}= 480 nm (62). As soluções com concentrações referentes às respectivas absorções foram preparadas em tampão MOPS (ácido 3-(N-morfolino) propanosulfônico - Sigma-Aldrich) 10 $mmoles.L^{-1}$ pH7,0, em água MilliQ® (Merck Millipore) e em soro fisiológico 0,9% (NaCl - Vetec) e a leitura foi realizada em espectrofotômetro em λ^{abs}= 480 nm em cubetas de quartzo com caminho ótico de 1 cm.

Foram obtidos espectros de fluorescência de soluções de doxorrubicina em MOPS (10 $mmoles.L^{-1}$) pH 7, em água, e em soro fisiológico 0,9%, e também do padrão fluoresceína

preparado em NaOH 0,1 moles.L^{-1} (Φ_{FL}=0,79) (26), em cubetas de quartzo de 1,5 mL com caminho ótico de 1 cm, para se determinar seu rendimento quântico de fluorescência (Φ_{FL}). As mesmas condições utilizadas para excitar as amostras de doxorrubicina foram utilizadas para o padrão, sendo elas λ^{exc}= 480 nm, f^{exc}= 5 nm, f^{em} = 10 nm e tensão = 600 V. Tanto as soluções de doxorrubicina quanto a de fluoresceína foram diluídas de forma que a absorção no $\lambda^{máx}$ fosse menor que 0,1 a fim de evitar efeitos de reabsorção (27).

Os cálculos dos rendimentos quânticos de todas as amostras estudadas foram realizados através da seguinte fórmula:

$$\Phi_{FL}^{X} = \Phi_{FL}^{S} \cdot \frac{A^{S}}{A^{X}} \cdot \frac{S_{FL}^{X}}{S_{FL}^{S}} \cdot \left(\frac{n^{S}}{n^{X}}\right)^{2}$$

Onde:

Φ_{FL}^{X} : rendimento quântico de fluorescência da amostra

Φ_{FL}^{S} : rendimento quântico de fluorescência do padrão (fluoresceína)

A^{S} : absorção do padrão

A^{X} : absorção da amostra

S_{FL}^{S} : área sobre a curva de emissão de fluorescência do padrão

S_{FL}^{X} : área sobre a curva de emissão de fluorescência da amostra

n^{S} : índice de refração do meio do padrão

n^{X} : índice de refração do meio da amostra

Nos ensaios para se determinar o tempo de vida de fluorescência (Edinburgh) foram avaliadas amostras de doxorrubicina em água, em MOPS e em soro fisiológico e também amostras do medicamento, todas com absorção de aproximadamente 0,5. Estas medidas foram realizadas no equipamento Edinburgh Photonics – série FLS920 com o sistema *Time Correlated Single Photon Counting*; com as seguintes condições experimentais: λ^{exc}= 335 nm (LED pulsado), λ^{em}= 550 nm, 1000 counts, 2048 canais e incremento de 0,5, f^{em}= 19 nm,

tempo de medição = 100 ns e ajuste monoexponencial. A função de resposta instrumental (por exemplo, pulso do LED, IRF) foi coletada com uma dispersão de sílica coloidal (Ludox), nas mesmas condições usadas para a doxorrubicina, exceto f^{em}= 3 nm.

4.3. Método Indicativo de Estabilidade

O desenvolvimento do método de separação dos compostos foi realizado em equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por UV-Visível (HPLC-DAD) e também por Espectrometria de Massas (MS) (Esquire HCT – IonTrap, Bruker Daltonics®). O HPLC da marca Prominence da Shimadzu® (Japão) é constituído por uma controladora (CBM-20A), uma bomba quartenária (LC-20AT), degaseificador (DGU-20As), amostrador automático (SIL-20AC), detector de arranjo de diodos (DAD) (SPD-M20A) e software LC Solution. Os parâmetros do MS utilizados foram os seguintes: modo *Scan* nos intervalos de *m/z* de 50 a 1500, com fonte de ionização por *eletrospray* (ESI) em modo positivo, com os seguintes parâmetros: voltagem do capilar, 4000 V, vazão do gás de secagem, 6,0 $L.min^{-1}$, temperatura do gás de secagem, 280°C e nebulizador 40,0 psi.

Muitos foram os testes realizados para o desenvolvimento do método indicativo de estabilidade. Inúmeras tentativas com diferentes amostras, diferentes colunas cromatográficas, composição das fases móveis com diferentes ácidos, sais e tampões e diferentes solventes, corridas isocráticas e com gradiente de solventes foram testadas.

Todos os solventes utilizados na cromatografia foram grau analítico. Para a fase móvel foi utlizada Acetonitrila (ACN) e metanol (MeOH) (J.T.Baker®) e água ultra pura (MilliQ®, Millipore®). Dentre os sais testados e respectivos ácidos, estão formiato e acetato de amônio (Fluka® Analytical HPLC), ácido acético (J.T.Baker® grau HPLC) e ácido fórmico (Fluka® Analytical grau MS).

Dentre as tentativas de desenvolvimento do método analítico foram avaliadas as fases estacionárias C18 (Luna C18 (2) - Phenomenex® - 150 x 3,0 mm, 3 µm, 100Å), PFP (penta flúor fenil) (Luna PFP (2) – Phenomenex® - 150 x 3,0 mm, 3 µm - 100Å) e C30 (Ultracarb®ODS(30) – Phenomenex® - 250 x 4,6 mm, 5 µm - 60Å), com diferentes

combinações de fases móveis, fluxos, corridas isocráticas e diferentes gradientes, diferentes volumes de injeção e também temperatura das colunas.

As condições do método definido como indicativo de estabilidade estão descritas na tabela a seguir (Tabela 8).

Tabela 8 - Condições cromatográficas do MIE para a doxorrubicina

Condições Cromatográficas			
Fase Estacionária	Coluna: Luna C18 (2) 150 x 3,0 mm, 3 µm, 100 Å (Phenomenex®)		
Fase Móvel	A – Tampão Formiato de Amônio 5 mmoles.L^{-1} pH 3,0		
	B – MeOH		
Diluente	Tampão:MeOH (1:1, v/v)		
Fluxo	0,3 mL.min^{-1}		
Temperatura	30°C		
Volume de injeção	10 µL		
Gradiente	**Tempo**	**%A**	**%B**
	0 min	95%	5%
	60 min	5%	95%
	61 min	95%	5%
	70 min	95%	5%

4.3.1. Estudos de Estresse

Para avaliar a especificidade do método e também para conhecer a estabilidade do composto frente a condições de estresse, foram realizados os ensaios de degradação forçada nas seguintes condições: hidrólise ácida e básica, oxidação, aquecimento e fotólise.

Soluções do ativo cloridrato de doxorrubicina e do medicamento a 1 mg.mL^{-1} e solução do placebo a 5 mg.mL^{-1} foram submetidas à hidrólise com NaOH (pastilha - Sigma

Aldrich®) em concentração 0,01 mmoles.L^{-1} a temperatura ambiente. As amostras foram avaliadas nos tempos 0, 1, 2, 3, 4, 5, 24 e 48 horas. A cada tempo foram retiradas alíquotas de 500 µL, estas solubilizadas em diluente (Tampão: MeOH, 1:1, v/v) e injetadas em volumes de 10 µL no HPLC, sem neutralização.

O mesmo foi realizado com a hidrólise ácida, a temperatura ambiente, na qual foi empregado HCl 0,05 e 0,01 mmoles.L^{-1} (solução ≥37% - Sigma-Aldrich®). Neste ensaio foi adicionado às amostras o ativo daunomicina para avaliação da sensibilidade a meio ácido de um composto semelhante à DOX. Além deste ensaio também foi avaliada a suscetibilidade do DOX quando na presença de HCl 0,1 mmoles.L^{-1} com temperatura constante de 50°C ao longo de 48 horas. Neste último as amostras foram acondicionadas em frascos para *headspace* lacrados para evitar evaporação da amostra.

Nos testes de oxidação as amostras foram submetidas a concentrações de 3 e 30% de H_2O_2 (Suprapur®, Merck®). Foram coletadas alíquotas de hora em hora durante as cinco primeiras horas e depois 24 e 48 horas. Antes de serem injetadas as amostras foram diluídas em fase móvel 1:1 (v/v) para concentrações de 1 mg.mL^{-1} e foram injetados 10 µL. Todos os métodos de degradação forçada descritos acima foram realizados na ausência de luz.

Amostras de medicamento, ativo e placebo em solução, e seus respectivos controles escuros, foram expostos à luz branca e UV-A durante 48 horas em câmara de fotoestabilidade (Câmara Weiss Gallen Kamp - Pharma Safe System) com temperatura (25±2°C) e umidade relativa (40±2%) controladas. As amostras submetidas à luz UV-A foram acondicionadas em tubos de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) por serem transparentes a radiação UV, já as expostas à luz branca foram armazenadas em frascos *headspace* devidamente lacrados. Os controles foram expostos nas mesmas condições, porém revestidos por papel alumínio. A intensidade da luz branca durante o estudo foi de 4,0 klux e a de UV-A 1,0 W/m^2.

Uma amostra de padrão de doxorrubicina, uma de medicamento e um branco (água) todas na concentração de 500 µg.mL^{-1} foram expostas à luz solar durante uma semana em frasco de HPLC transparente e analisadas por HPLC-DAD, LC-MS e também por espectrofotometria e espectrofluorimetria.

4.4. Validação do método indicativo de estabilidade

A fim de garantir a confiabilidade dos resultados, o método foi validado segundo as diretrizes da resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003 (28) e foram avaliados os seguintes parâmetros: especificidade, linearidade, precisão e exatidão.

Para se validar um método indicativo de estabilidade, se faz necessário, primeiramente, estipular uma especificação para o produto. Para isso, deve-se levar em consideração a cultura da empresa, os resultados dos testes de estabilidade acelerada e, principalmente, prolongada e ainda os limites especificados na RDC nº 58 (5) ou ICH Q3B (R2) (4), de acordo com a dose máxima diária do ativo.

Por ser um medicamento injetável e também por haver diferentes protocolos de tratamento, que variam de acordo com o tipo de câncer do paciente, não há registro de uma dose máxima diária fixa para DOX, por isso a dose diária para a doxorrubicina foi calculada considerando-se a superfície corporal de uma pessoa de 70 kg e 1,70 m de altura. Com estes dados, foi estimado um valor de superfície corporal através do seguinte cálculo:

$$\textit{Superfície corporal } (m^2) = 0{,}007184 \times (\textit{altura} - cm)^{0{,}725} \times (\textit{peso} - kg)^{0{,}425} \quad (29)$$

Segundo o cálculo acima, um indivíduo de 70 kg e 1,70 m de altura possui uma superfície corporal de 1,81 m^2. A maior dose empregada de DOX nos protocolos de tratamento de câncer, segundo a bula do medicamento (20), é de 75 mg/m^2, portanto, a dose máxima diária de DOX permitida neste caso seria de aproximadamente 140 mg.

O limite adotado no caso do medicamento, para este estudo, foi baseado apenas nos limites especificados na RDC nº 58 (5), por não haver resultados disponíveis na literatura de estabilidade do produto. Portanto, levando-se em consideração a dose máxima diária de doxorrubicina como sendo 140 mg, seu limite de identificação e de qualificação, segundo esta RDC, para o medicamento é de 0,2% para um produto de degradação individual, ou seja, 0,280 mg. De posse destes valores, se definiu esta porcentagem como sendo a especificação para produtos de degradação individuais no medicamento.

Não se pode deixar de considerar durante a validação o limite de notificação, que servirá como valor de referência para reportar algum caso de impureza desconhecida que se encontre abaixo do limite de identificação e que precisa apenas ser comunicado. No caso da DOX, seu limite de notificação é de 0,1% (5).

A linearidade para o ensaio de produto de degradação, segundo a RE nº 899 (28), deve incluir a faixa do nível esperado de impureza até 120% do limite especificado. Levando-se em consideração o limite de notificação, como sendo o nível esperado de um produto de degradação e o limite de identificação como sendo o limite especificado, o teste de linearidade compreendeu os seguintes pontos: 50% (limite de notificação), 80%, 100% (limite de identificação), 110% e 120%. Este teste foi realizado com o padrão farmacopeico do ativo.

O teste de precisão intra-ensaio também foi realizado com o padrão USP do ativo e foram avaliadas 6 amostras, que consistem na adição de quantidade conhecida de padrão ao placebo, a fim de simular uma amostra na concentração da especificação, ou seja, 0,2%. Este ensaio foi preparado duas vezes, em dias diferentes e por um analista diferente, a fim de se determinar a precisão inter-ensaio.

A exatidão do método foi conduzida adicionando-se quantidades conhecidas de padrão ao placebo nas concentrações de 50%, 100% e 120%, em triplicata, a fim de se comparar os valores obtidos experimentalmente com os valores teóricos.

A especificidade do método foi avaliada por estudo de degradação forçada.

A concentração de análise do medicamento, utilizada como referência para a validação do método foi de 1 $mg.mL^{-1}$.

4.5. Teste de Congelamento

Amostras de padrão de cloridrato de doxorrubicina foram preparadas em H_2O, tampão MOPS 10 $mmoles.L^{-1}$ pH 7 e soro fisiológico 0,9%, em concentração de 1 $mg.mL^{-1}$ e acondicionadas em vials de HPLC âmbar. A influência do oxigênio nas amostras foi avaliada e para isso o ambiente de armazenamento foi condicionado tanto com O_2 quanto com nitrogênio (N_2).

Três ciclos de congelamento e descongelamento foram avaliados e o método empregado para as análises foi o indicativo de estabilidade, descrito anteriormente no item 1.3.

4.6. Cinética por UV-Vis

A fim de entender o comportamento da DOX frente a uma faixa ampla de pH, foram realizadas varreduras de 200 a 800 nm em espectrofotômetro de hora em hora durante 24 horas, do ativo isolado, em tampão Britton-Robinson 40 mmoles.L^{-1} pHs 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 e 12. Este tampão é considerado em tampão universal e é uma mistura de solução aquosa de ácido bórico (2,5 g de H_3BO_3 em 1L de água, 0,04 moles.L^{-1}), ácido acético (2,3 mL de CH_3COOH em 1L de água, 0,04 moles.L-1) e ácido fosfórico (1,9 mL de H_3PO_4 em 1L de água, 0,04 moles.L^{-1}) e as valores desejados de pH ajustados com NaOH 0,2 moles.L^{-1}.

A concentração inicial do ativo no estudo foi ajustada para absorção de aproximadamente 0,5 em λ = 480 nm.

As degradações por HCl, NaOH e H_2O_2 também foram avaliadas por espectrofotometria em estudo de cinética com temperatura controlada e leituras de hora em hora durante 24 horas em faixa de 200 a 800 nm. Foram testados o padrão e o medicamento em concentrações iniciais de absorção 0,5 em λ 480 nm, e o placebo, para entendimento sobre possível interferência.

4.7. Avaliação da Toxicidade dos produtos de degradação da doxorrubicina

4.7.1. Teste de Ames in silico

A fim de avaliar a mutagenicidade tanto da DOX quanto de seu principal produto de degradação foram realizados testes de Ames *in silico* através do software ACD/Percepta da ACD/Labs (Advanced Chemistry Development, Inc., Canada).

4.7.2. Ensaio de viabilidade celular por MTT

A redução do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) é um método colorimétrico rápido, frequentemente usado para medir proliferação celular e citotoxicidade (30). Neste ensaio, o MTT é acumulado pelas células por endocitose e a redução do anel tetrazólico deste sal resulta na formação de cristais de *formazan* de cor azul que se acumulam em compartimentos endossomais e/ou lisossomais, sendo depois transportados para fora das células por exocitose. Sendo a endocitose um mecanismo fundamental das células vivas, o ensaio do MTT tem sido usado frequentemente como ensaio de viabilidade celular.

A fim de avaliar a citotoxicidade dos produtos de degradação da DOX foram realizados ensaios em culturas de células mononucleares do sangue periférico (PBMC), que contém principalmente linfócitos e monócitos. A viabilidade destas células após tratamento com as amostras foi avaliada pelo teste com MTT.

Como não foi possível isolar os produtos de degradação mais relevantes para os estudos de toxicidade, optou-se por avaliar as amostras contendo os degradantes. As amostras escolhidas para os testes foram as de 48 horas de exposição à luz branca, na qual houve uma degradação de 32% do ativo e de 23% do medicamento, e as de 48 horas a 50°C, na qual houve queda de aproximadamente 20% tanto para o padrão quanto para o medicamento. O fato destas amostras não possuírem agentes degradantes, como HCl, NaOH ou H_2O_2, que podem interferir nos estudos de toxicidade, reagindo com as células, também contribuiu com a decisão para a escolha das mesmas. Portanto, foram utilizadas as seguintes amostras para este ensaio: controle negativo (células mononucleares), controle positivo (DOX-padrão e MEDIC-padrão), amostras de padrão de do medicamento degradadas pelas condições citadas anteriormente (DOX-temperatura e DOX-fotólise e MEDIC-temperatura e MEDIC-fotólise).

O ensaio foi preparado da seguinte maneira: em amostra de sangue humano doado por um laboratório parceiro, células PBMC foram isoladas por centrifugação em gradiente de densidade usando Ficoll-Hypaque (Histopaque-1077) (Sigma-Aldrich). As células mononucleares foram lavadas com PBS estéril uma vez, permitindo repelir células que

estejam ainda aderidas ou agregadas, e centrifugadas a 440 *g* or 10 min. Posteriormente, o precipitado foi ressuspenso em tampão hemolítico e centrifugado a 250 *g* por 10 min. As células mononucleares foram lavadas com o meio de cultura RPMI contendo 10% de soro fetal bovino (SFB), ressuspensas com esse meio e ajustadas para 15 x 10^6 células.mL^{-1} após verificação por exclusão do corante azul de tripan. As células foram cultivadas em placas de 96 poços numa densidade de 1x10^5 células.mL^{-1}, num volume final de 200 µL, acrescidas de diferentes estímulos (DOX-padrão, MEDIC-padrão, DOX-fotólise, MEDIC-fotólise, DOX-temperatura e MEDIC-temperatura) em concentrações de 1, 2, 3, 3,5 e 5 µmoles.L^{-1}, em oito replicatas. Como foram utilizadas amostras degradadas, suas concentrações, levando em consideração a DOX, foram ajustadas para os valores citados, se mantendo iguais as do padrão e do medicamento. As células mononucleares permaneceram em contato com as amostras em estudo durante 24h. Passado este período, foi acrescentado em cada poço 40 µL de uma solução de MTT a 5 mg.mL^{-1}. Após um período de 4h, o MTT foi retirado e adicionou-se 100 µL de DMSO (dimetilsulfóxido) em cada poço até a dissolução dos cristais violáceos produzidos. As absorbâncias de cada poço foram lidas em espectrofotômetro de placas (Biotek®) em comprimento de onda de 550 nm.

4.8. Análise de dados

Para confirmar se houve ou não uma degradação significativa da DOX sob as condições de estresse foi realizada a análise de variância (ANOVA) pelo teste Kruskal-Wallis (KW) para múltiplas comparações, com pós-teste de Dunn para localizar as diferenças entre os tempos de reação. Todos os testes foram realizados com a utilização do aplicativo GraphPad-Instat 3.0.

Os dados gerados por espectrofotometria foram tratados com o auxílio do software OriginPro®8 e algumas informação sobre as características físico-químicas da DOX puderam ser estimadas pela ferramenta ACD Percepta (ACD/I-Labs).

Os resultados dos ensaios de toxicidade foram avaliados utilizando a análise variância ANOVA pelo teste de Turkey através do software GraphPad Prisma 5.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. *Caracterização do ativo Doxorrubicina*

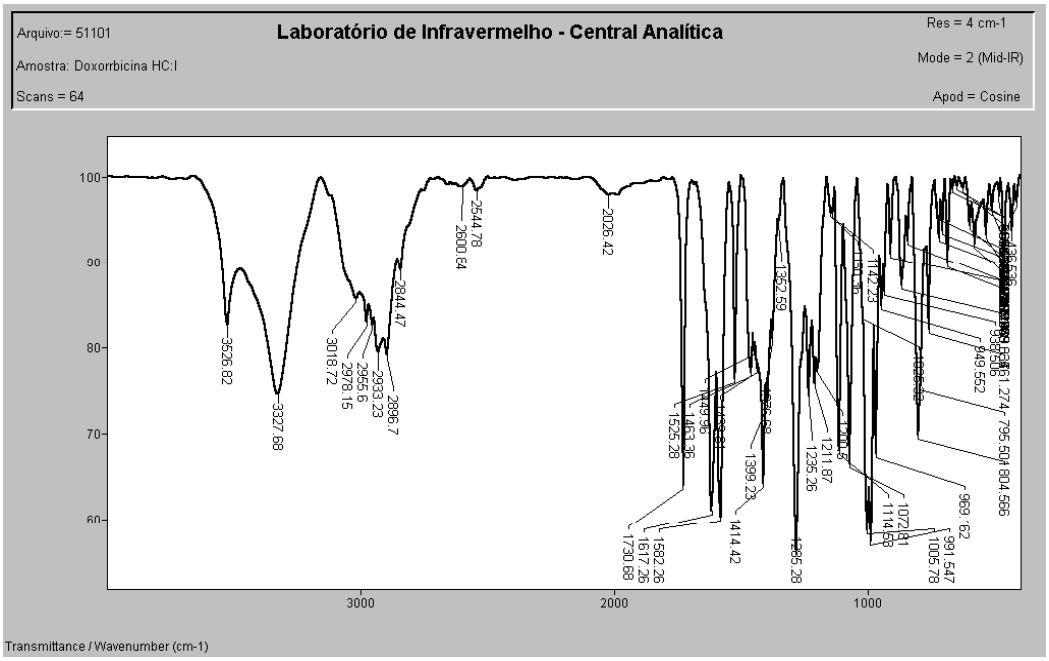
A fim de conhecer as principais características estruturais da molécula e também a pureza do objeto de estudo, foram realizados alguns testes espectrométricos e espectroscópicos, tais como Infravermelho, Análise Elementar e Espectrometria de Massas.

Os resultados da Análise Elementar, indicados na tabela abaixo (Tabela 9), confirmam as porcentagens de carbono (C), hidrogênio (H) e nitrogênio (N), presentes na molécula e a pureza do material.

Tabela 9 - Resultados do ensaio de Análise Elementar da Doxorrubicina

ANÁLISE ELEMENTAR			
Equipamento	Perkin-Elmer CHN 2400		
Descrição	**%C**	**%H**	**%N**
Réplica 1	55,80	5,23	2,47
Réplica 2	55,70	5,22	2,56
Réplica 3	55,52	5,19	2,48
Média	55,67	5,21	2,50
Desvio Padrão	0,12	0,02	0,04
CV%	6,68%	3,10%	2,97%
Valores Teóricos	59,66	5,38	2,97
Exatidão	93,31%	96,84%	84,18%
Média	91,44%		
Desvio Padrão	0,07		
Pureza (Tal Qual)	91,44±0,07%		

O espectro de Infravermelho (IV) da doxorrubicina confirma seus principais grupos funcionais, como mostra a figura 2, na qual é possível encontrar as bandas 3526 cm^{-1}, 3327 cm^{-1}, 1730 cm^{-1}, 1000 – 1260 cm^{-1}, características dos grupamentos O-H, N-H, C=O, C-O alcoólico, respectivamente, presentes na molécula em estudo (31).



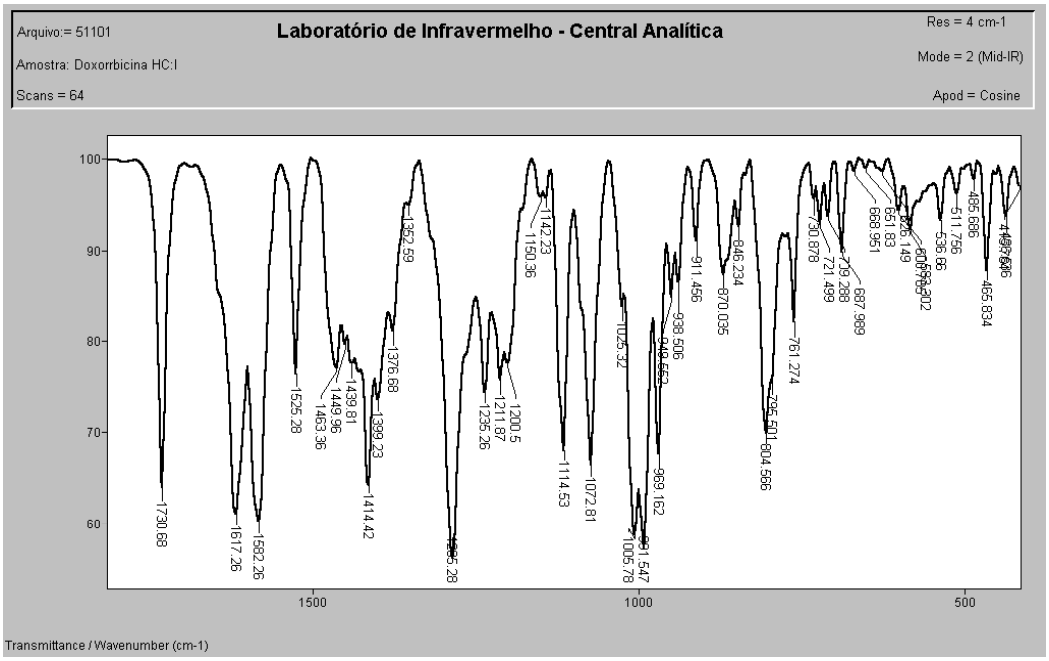


Figura 2 - Espectro de IV do ativo cloridrato de doxorrubicina realizado em equipamento BOMEM MB100 em pastilha de KBr

No equipamento de Espectrometria de Massas do tipo ESI-QTOF (Bruker Daltonics®), obteve-se o espectro de massas da doxorrubicina (figura 3), a qual possui relação *m/z* de 544,1761 para o íon molecular protonado $[M+H]^+$ e também seu espectro de MS2 com seus principais fragmentos.

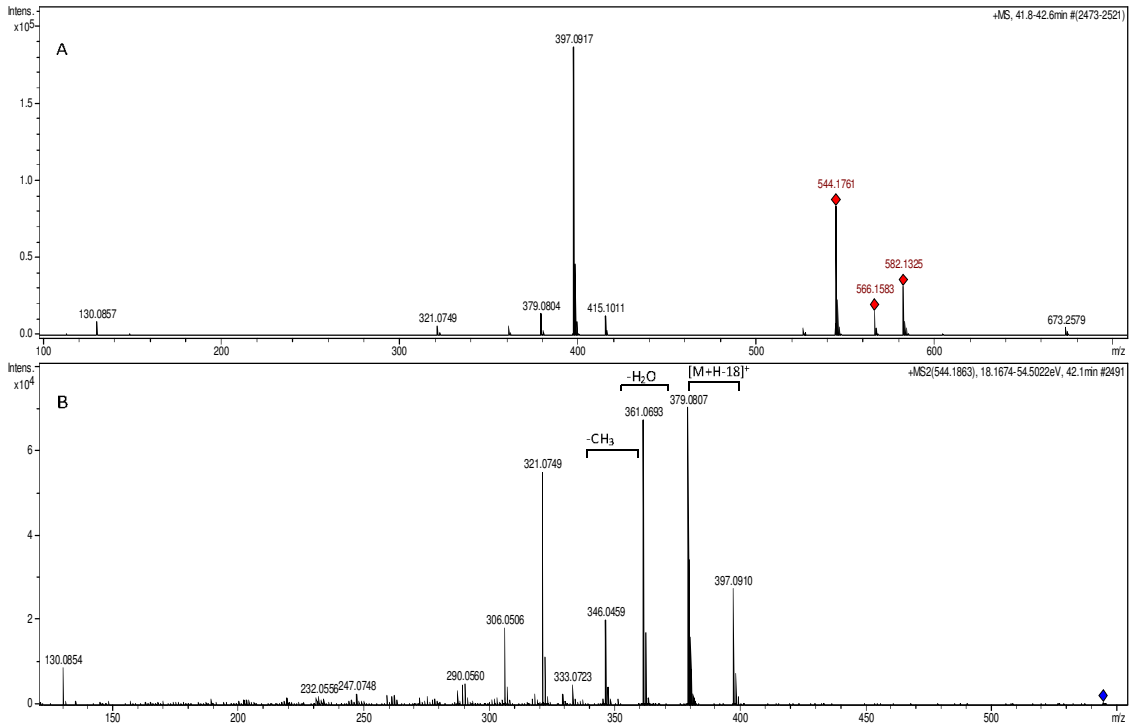


Figura 3 – A) Espectro de massas de alta resolução, ESI+ do composto doxorrubicina, relação *m/z* 544,1761 obtido em Espectrômetro de Massas do tipo QTOF (Bruker Daltonics®); B) Espectro de massas MS2 da doxorrubicina ilustrando seus principais fragmentos.

Por possuir uma massa monoisotópica de 543,1741 $g.mol^{-1}$, a DOX, quando protonada na fonte de *eletrospray* em modo positivo do espectrômetro de massas adquire um próton e passa a apresentar relação *m/z* de 544, 1761. O dado apresentado na figura anterior corrobora com a massa molecular do ativo em questão protonada com um erro de 3,28 ppm. A fragmentação da molécula de DOX com suas respectivas perdas de massas estão representadas na figura 3B.

O valor par da relação *m/z* da DOX era esperado, já que este composto apresenta uma amina primária no açúcar daunosamina, obedecendo a "regra do nitrogênio", que

indica que sempre que houver nitrogênio na estrutura dos compostos, quando estes forem ionizados e analisados por espectrometria de massas, suas relações *m/z* deverão apresentar valor par (31).

O perfil de absorção da DOX na região do UV-Vis e suas características fluorescentes em água, tampão e em soro fisiológico, também foram estudados.

Inicialmente a solução tampão de escolha foi tampão fosfato na concentração de 50 mmoles. L^{-1} pH 7, em razão da necessidade futura de realização de ensaios biológicos em meio de cultura com soluções de cloridrato de doxorrubicina e também seguindo a literatura. Porém, após inúmeras tentativas, não foi possível solubilizar o padrão deste ativo neste tampão. Segundo Bandak et al. (1999) (63), o tampão fosfato acelera a degradação da doxorrubicina e isto se dá, provavelmente, em razão da ou pela interação química que ocorre entre o grupo fosfato e a molécula de doxorrubicina, na qual o fosfato age como uma base induzindo a hidrólise alcalina da doxorrubicina. Esta reação pode formar um complexo insolúvel (32). Além disso, também é descrito na literatura que a doxorrubicina forma agregados e, por isso, pode ter se formado complexos insolúveis, impossibilitando sua dissolução em tampão fosfato (33). Segundo Barenholz et al. (1993) a agregação da doxorrubicina é possivelmente aumentada na presença do tampão fosfato por interações que ocorrem entre os íons fosfato e a amina primária da doxorrubicina.

O tampão que melhor atendeu a necessidade do presente estudo foi o MOPS (ácido 3-(N-morfolino) propanosulfônico), o qual possui um pKa de 7,20 e é um excelente tampão para diversos ensaios biológicos em pHs próximos a meios neutros.

Levando-se em consideração o coeficiente de absorção molar (ε) da doxorrubicina em tampão fosfato pH 7 de 11500 $L.mol^{-1}.cm^{-1}$ (34), ensaios foram realizados para determinar o ε da DOX em tampão MOPS 10 $mmoles.L^{-1}$ pH 7, em água e também em soro fisiológico 0,9%. Para as condições descritas acima, foram encontrados valores de ε de 10911 $L.mol^{-1}.cm^{-1}$, 11471 $L.mol^{-1}.cm^{-1}$ e 10824 $L.mol^{-1}.cm^{-1}$ respectivamente, conforme curvas abaixo (gráfico 1, 2 e 3).

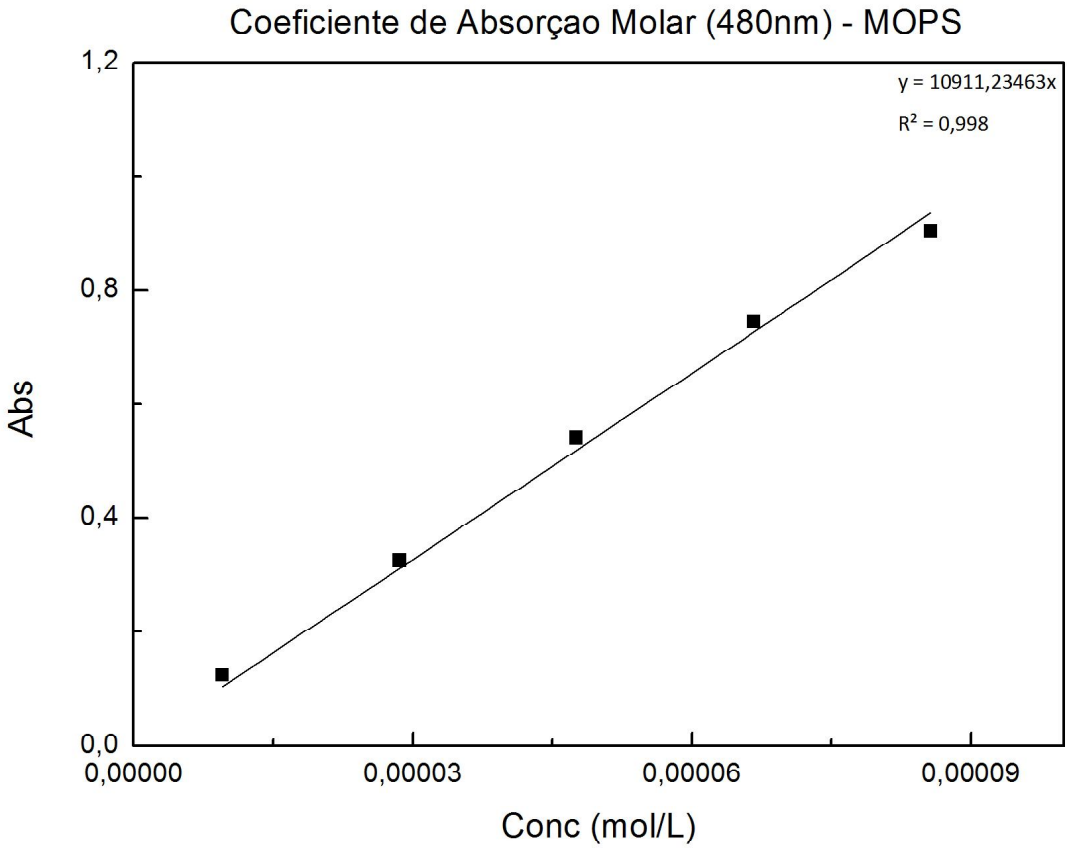


Gráfico 1 - Gráfico para a determinação do coeficiente de Absorção Molar da DOX em tampão MOPS 10 mmoles.L^{-1} em λ 480nm.

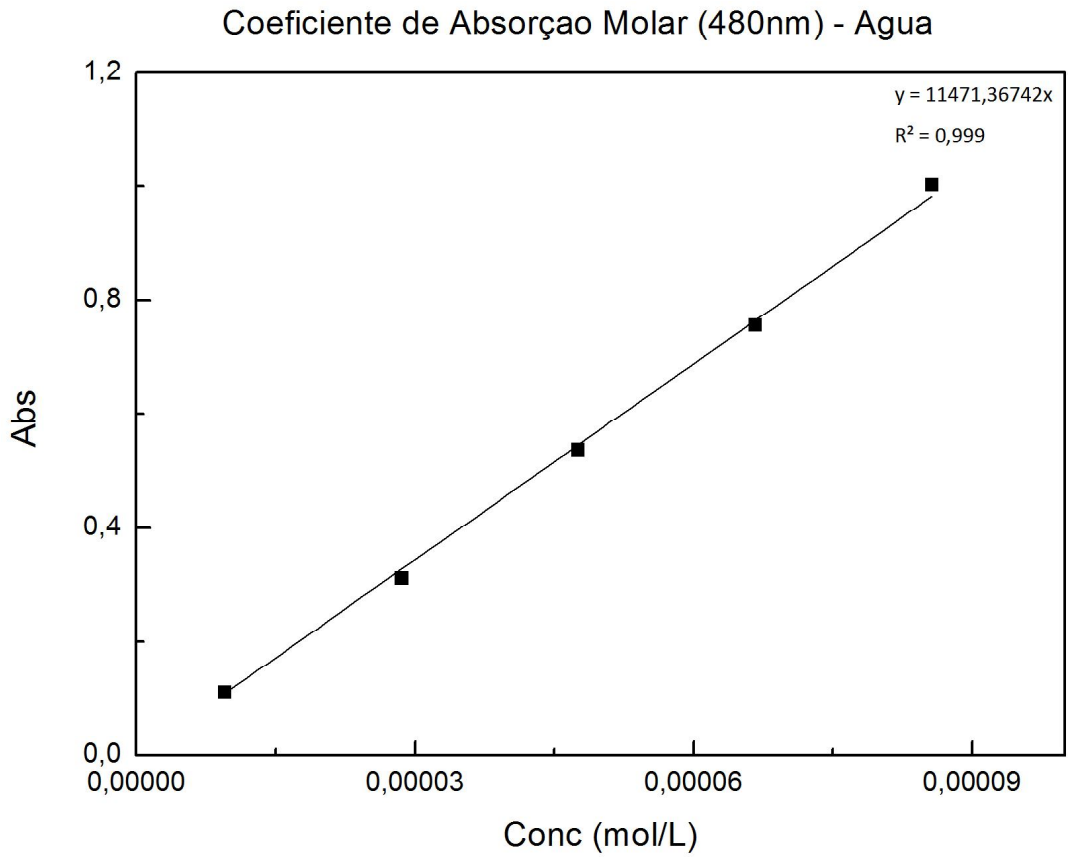


Gráfico 2 - Gráfico para a determinação do coeficiente de Absorção Molar da DOX em água em λ 480nm

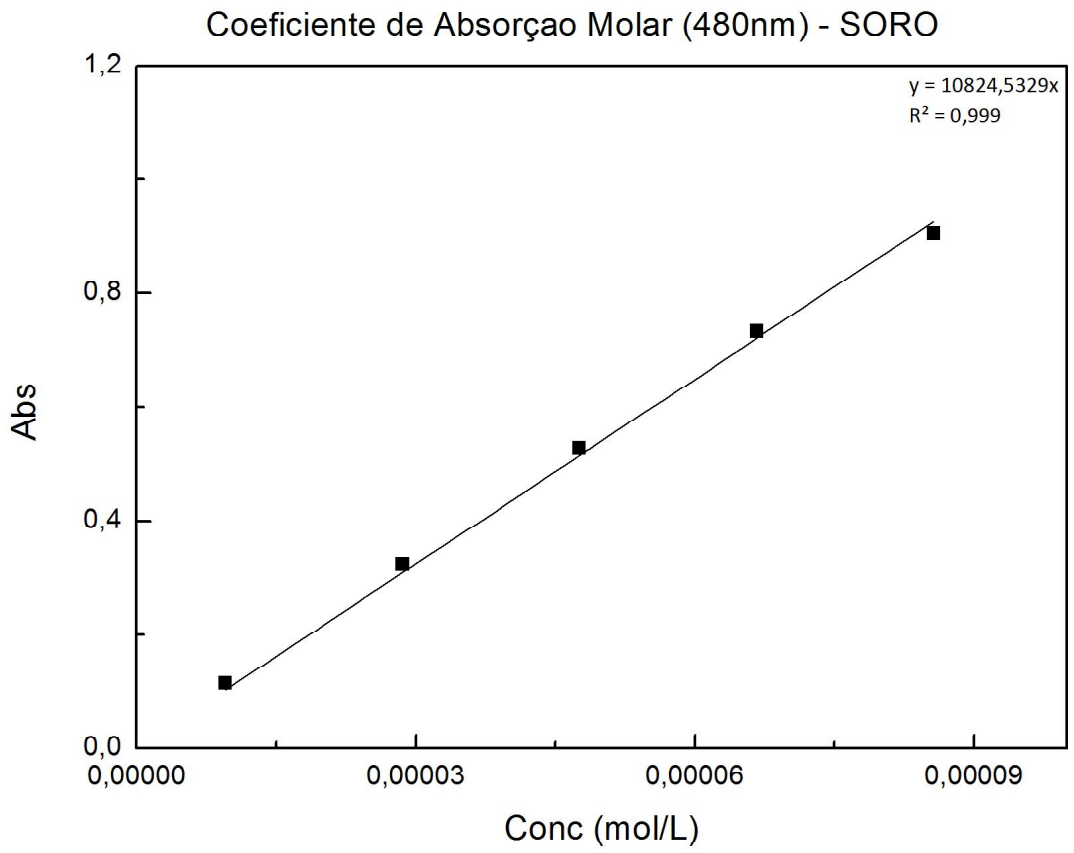


Gráfico 3 - Gráfico para a determinação do coeficiente de Absorção Molar da DOX em soro fisiológico 0,9% em λ 480nm

O espectro de absorção da DOX no UV-Vis é bastante peculiar (figura 4). A presença das três bandas na região do visível é característico das transições π,π* dos anéis conjugados da antraciclina. A banda em 288 nm na região do ultravioleta corresponde ao anel aromático, e as outras duas bandas em 252 e 233 nm referem-se ao amino-açúcar daunosamina da molécula (24). O ombro presente em 320-380 nm está associado à transição n,π* dos três grupos C=O da molécula (35).

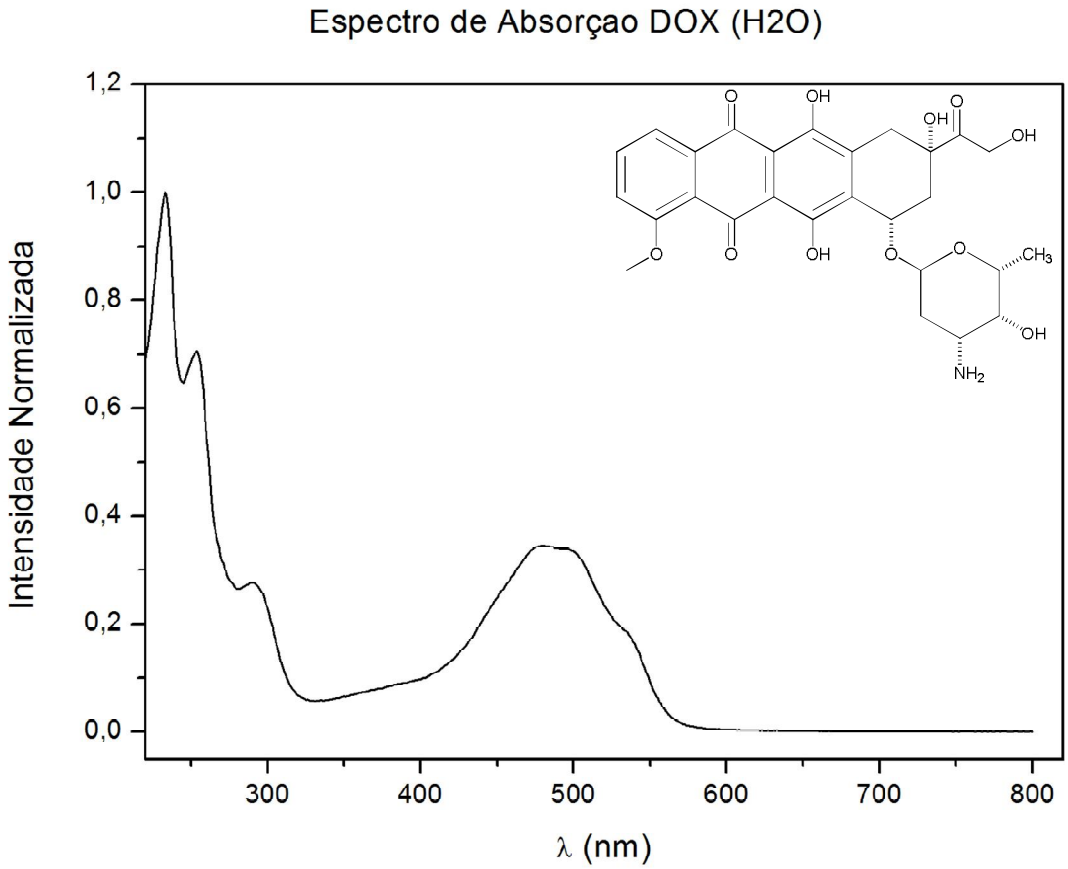


Figura 4 - Estrutura e espectro de absorção no UV-Vis de 200 a 800 nm da DOX em água.

A DOX também foi avaliada quanto as suas propriedades fluorescentes. Seus espectros de emissão de fluorescência foram registrados nos meios aquoso, tampão MOPS e também em soro fisiológico, com λ^{exc} em 480 nm e λ^{em} em 593 nm e fenda de excitação de 5nm e fenda de emissão de 10 nm. Em todos os casos não foi possível notar nenhuma diferença significativa nas leituras, conforme ilustra a figura 5.

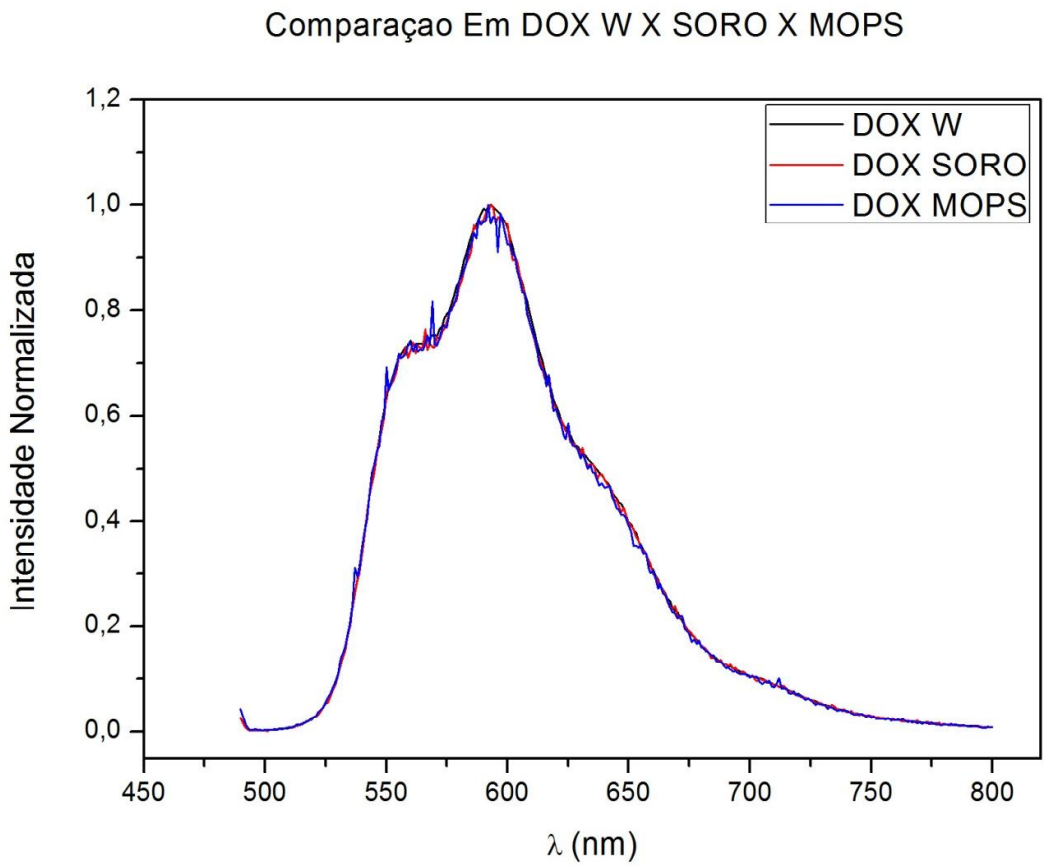


Figura 5 - Comparação entre os espectros de emissão da DOX em meio aquoso (preto), tampão MOPS 10 mmoles.L^{-1} (azul) e soro fisiológico 0,9% (vermelho) (λ^{exc} em 480 nm e λ^{em} em 593 nm e fenda de excitação de 5nm e fenda de emissão de 10 nm).

Comparando-se os espectros de emissão de fluorescência do ativo e do medicamento, também não foi possível identificar nenhuma diferença, conforme mostra a figura abaixo.

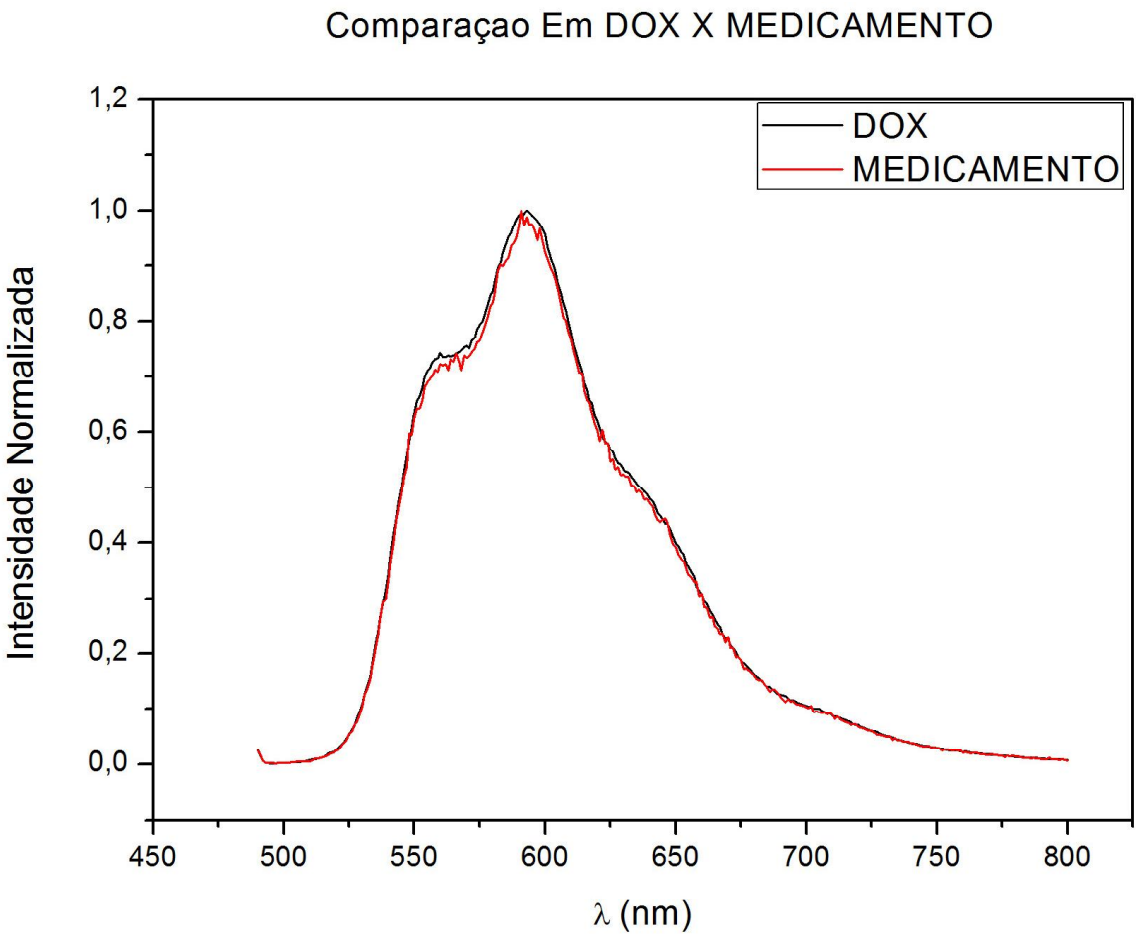


Figura 6 - Comparação entre os espectros de emissão da DOX (preto) e do medicamento (vermelho) em meio aquoso (λ^{exc} em 480 nm e λ^{em} em 593 nm e fenda de excitação de 5nm e fenda de emissão de 10 nm).

O rendimento quântico de fluorescência juntamente com o tempo de vida de fluorescência são as características mais importantes de um fluorófuro. O rendimento quântico de fluorescência (Φ) é a relação entre a quantidade de fótons emitidos e quantidade de fótons absorvidos por uma molécula. Substâncias com Φ altos, próximos de unidades, como as rodaminas, por exemplo, possuem as emissões mais brilhantes (36).

Para se determinar o rendimento quântico da doxorrubicina em diferentes meios, utilizou-se a fluoresceína como comparador (Φ_{FL}=0,79) (26). Quando em meio aquoso o Φ_{DOX} foi 0,064, em MOPS 0,077 e em soro fisiológico 0,069. Para o medicamento o $\Phi_{MEDICAMENTO}$ foi de 0,056.

O tempo de vida de fluorescência também é uma característica importante, pois determina o tempo disponível que o fluorófuro possui para interagir ou difundir no seu meio ambiente. Pode ser entendido como o valor médio de tempo que a molécula permanece no estado excitado antes de retornar para o estado fundamental. Geralmente, os tempos de vida de fluorescência são próximos a 10 ns (36).

Os valores de tempo de vida de fluorescência da doxorrubicina quando em água, tampão MOPS 10 mmoles.L^{-1} pH 7 e em soro fisiológico foram muito semelhantes, sendo 1,06 ns, 1,05 ns e 1,06 ns, respectivamente. O medicamento também apresentou tempo de vida de 1,06 ns.

Quando sobrepostos os espectros de absorção no UV-Vis e o de emissão de fluorescência da doxorrubicina, é possível perceber que um é a imagem especular do outro (figura 7). Esta similaridade ocorre, pois a excitação eletrônica não altera a geometria do núcleo da molécula. Por isso, o espaçamento entre os níveis de energia vibracional do estado excitado é semelhante à do estado fundamental. Como resultado, as estruturas de vibração vistas na absorção e os espectros de emissão são semelhantes (36).

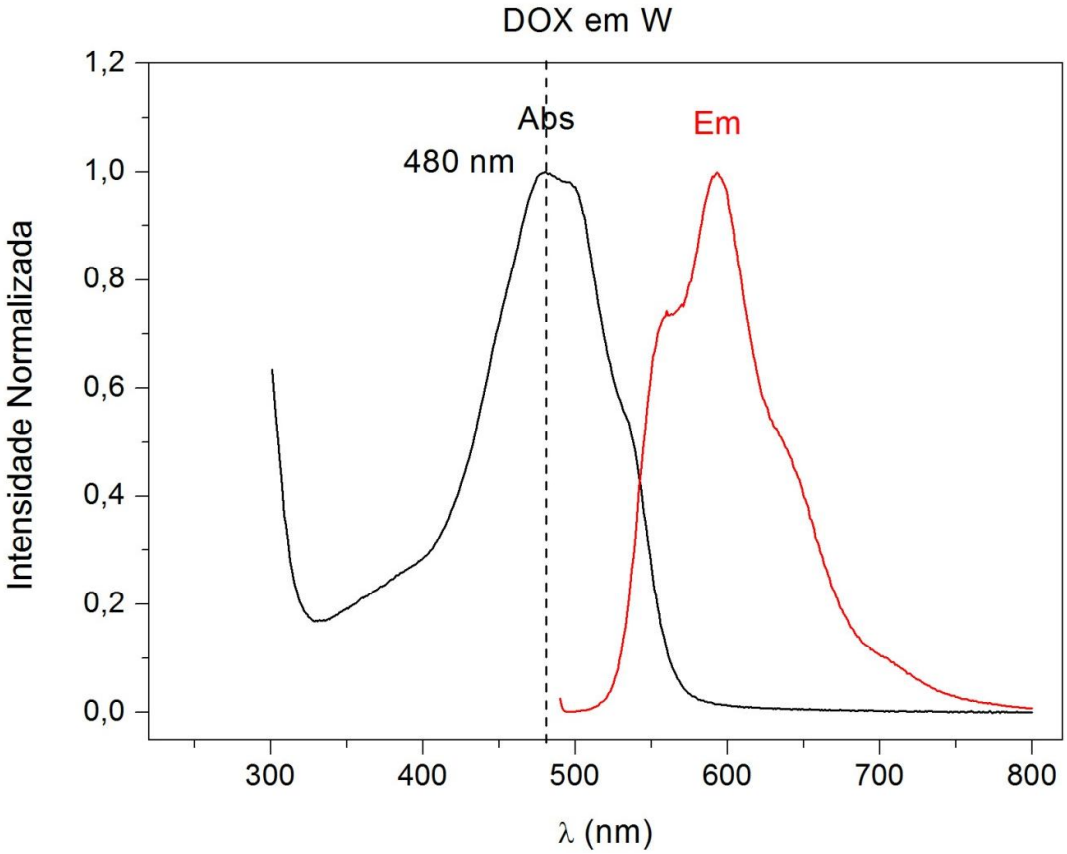


Figura 7 - Espectros de absorção (UV-Vis) (preto) e de emissão de fluorescência da DOX em meio aquoso (vermelho) (λ^{exc} em 480 nm e λ^{em} em 593 nm e fenda de excitação de 5nm e fenda de emissão de 10 nm).

5.2. Desenvolvimento do Método Indicativo de Estabilidade

Vários testes foram realizados com o objetivo de desenvolver um método específico para a doxorrubicina e seus produtos de degradação. Métodos com esta finalidade específica são também conhecidos como métodos indicativos de estabilidade (MIE).

Os métodos indicativos de estabilidade são desenvolvidos para que, ao longo dos estudos de estabilidade do produto farmacêutico, possam ser identificadas impurezas provenientes da degradação do mesmo, ou seja, tal método deve ser capaz de determinar outros picos num cromatograma de uma análise de um estudo de estabilidade de um

produto, quando houver diminuição da área do pico do ativo. E para isso, se faz necessário um método específico e seletivo, tal qual o MIE.

Há muitas dificuldades em se desenvolver um método para o qual não se tem informação completa sobre a amostra, isto porque, todas as substâncias que fazem ou farão parte da mesma em determinado momento não são conhecidas. Isto significa que, durante o desenvolvimento, muitos desafios devem ser propostos para que nenhuma intercorrência prejudique a especificidade do método. Além disso, a falta de conhecimento sobre as principais características dos compostos, como, por exemplo, absorção no UV-Vis, se são fluorescentes ou ionizáveis, exige o uso de técnicas amplas de detecção. O tipo de detector mais utilizado atualmente para MIE é o detector de arranjo de diodos (DAD), porém, os produtos de degradação formados podem não possuir grupos cromóforos, o que, certamente, prejudicará sua determinação por esta técnica.

O uso de técnicas complementares de detecção aumenta a possibilidade de se identificar maior número de substâncias que possam estar presentes na amostra. Um exemplo de combinação muito utilizada atualmente é a cromatografia líquida com detecção por DAD acoplada a espectrometria de massas (MS).

Segundo Baertschi (2011) (37), o MIE ideal deve ser capaz de quantificar com precisão o composto principal e todos seus produtos de degradação. Este método deve resolver todas as impurezas do pico do ativo bem como entre si; todas as moléculas devem ser detectadas e, suas respostas relativas ao seu respectivo precursor, estabelecidas. Em razão da dificuldade em se satisfazer todos estes requisitos, o foco deve ser no desenvolvimento de um método de varredura que tenha a maior probabilidade de resolução e detecção de um conjunto diversificado de substâncias. Em muitos casos, pode ser impossível se chegar num método ideal, por isso, o uso de duas técnicas ortogonais, frequentemente resulta em métodos mais adequados.

As tentativas de desenvolvimento de um MIE por HPLC-DAD-MS para a doxorrubicina incluíram testes com três diferentes fases estacionárias, sendo estas, C18, PFP (penta flúor fenil) e C30, todas avaliadas com diferentes combinações de fases móveis e gradientes, dentre elas, água (H_2O) e acetonitrila (ACN), H_2O e metanol (MeOH), algumas combinações de diferentes aditivos, como ácido fórmico, ácido acético na fase aquosa e orgânica, e

também os tampões formiato e acetato nas concentrações de 5 e 10 mmoles.L^{-1} em pH 3 e 4, respectivamente. Além destas combinações, também foram testados diferentes fluxos de fase móvel e temperaturas das colunas.

A figura 8 ilustra uma das etapas do desenvolvimento do método, em que foram avaliadas as respostas cromatográficas da doxorrubicina a diferentes fases móveis.

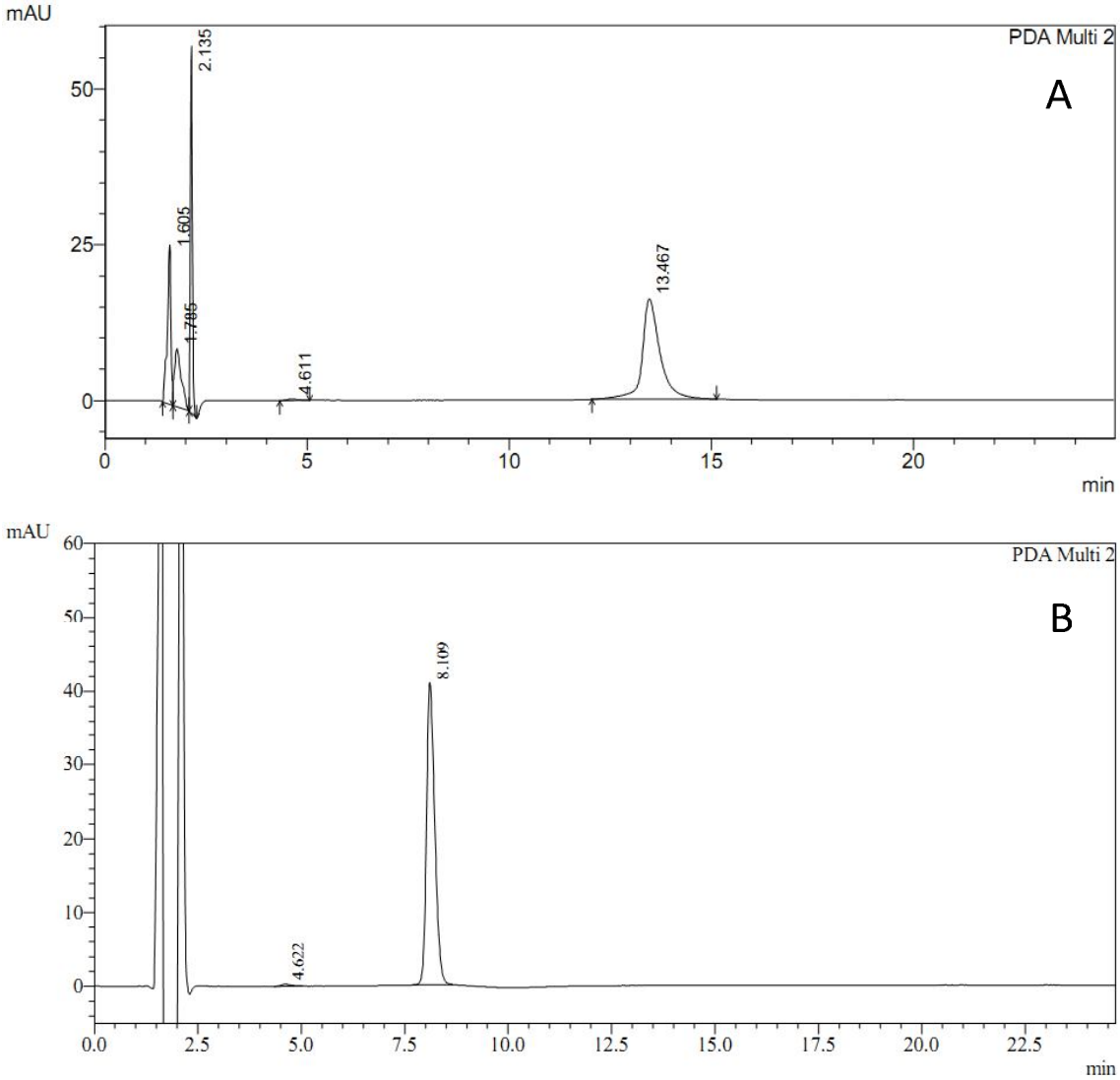


Figura 8 – A) Cromatograma da análise da DOX (Tr= 13,46 min.) com fase móvel composta por ACN:Formiato de amônio 5 mmoles.L^{-1}, 23:77 (v/v); B) Cromatograma da DOX (Tr= 8,10 min.) com fase móvel ACN:Tampão formiato de amônio 5 mmoles.L^{-1}, pH 3, 23:77 (v/v). As análises foram feitas em coluna Luna C18 (2) e os cromatogramas adquiridos em λ 235 nm.

Os cromatogramas acima demonstram a influência exercida pelo pH no perfil do pico da DOX. A força iônica do sal formiato de amônio na fase aquosa auxilia no aumento da retenção do composto, porém não favorece a simetria do pico. Quando se faz o controle do pH, levando-se em consideração os pKas da molécula (figura 9), o pico melhora sua simetria e aumenta de intensidade, o que, consequentemente, diminui o limite de quantificação e de detecção do mesmo.

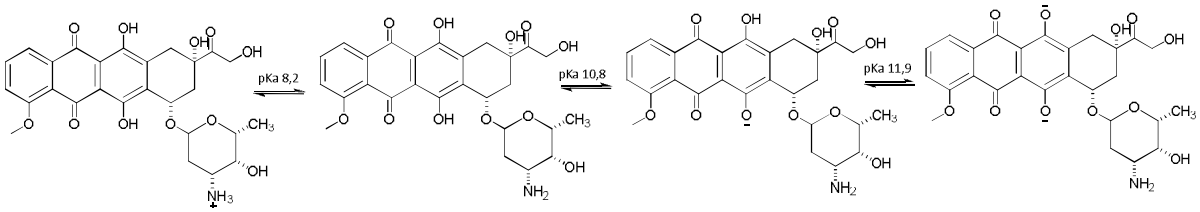


Figura 9 – Microespécies da doxorrubicina formadas em solução aquosa e seus respectivos pKas (cálculo *in silico* – I-Lab, ACD/Labs).

Os diversos grupos ionizáveis presentes na molécula da DOX favorecem a formação de inúmeras microespécies, porém as espécies mais relevantes, passíveis de serem formadas em solução aquosa estão descritas na figura anterior.

O racional criado para as decisões tomadas com relação ao desenvolvimento do método foi baseado principalmente na doxorrubicina, porém não deixando de se levar em consideração seus possíveis produtos de degradação. As escolhas das fases estacionárias testadas se justificam pela própria estrutura da molécula, passível de diversas interações, como ligações de hidrogênio, interações dipolo-dipolo, interações aromáticas e também as interações hidrofóbicas. Consequentemente, as escolhas das fases móveis também seguiram o mesmo racional, levando-se em consideração ainda outras características físico-químicas da DOX, como log P, pKa, dentre outras.

O método escolhido e que melhor atendeu a todos os requisitos descritos encontra-se especificado item 4.3. na seção materiais e métodos.

Outros fatores relevantes para a escolha do método foram o fator de capacidade (*k'*) do pico da DOX igual a 12,36, a simetria do pico (A_s) igual a 1,5 e o fator de cauda (*TF*) igual a 1,25 e também a resolução entre os principais picos de produtos de degradação, ilustrada nos cromatogramas dos ensaios de degradação. Levando-se em consideração que o valor de

k' e *TF* para se considerar um pico perfeitamente simétrico é igual a 1,0 (38), os dados obtidos para método desenvolvido são aceitáveis.

Para se determinar a real especificidade de um método indicativo de estabilidade, este deve ser desafiado e, para isso, faz-se necessário induzir a formação de possíveis produtos de degradação da molécula objeto do estudo, no caso a doxorrubicina. A maneira mais eficaz de se desafiar um MIE é realizando estudos de estresse com consequente degradação do ativo em análise e formação de produtos de degradação reais.

Os estudos de estresse servem não só como ferramenta para o desenvolvimento e validação de métodos analíticos, como também auxilia na predição de problemas de estabilidade e na identificação das principais vias de degradação tanto do ativo quanto do produto farmacêutico. Faz-se importante ressaltar, assim como Baertschi, S. (2011) (37) também alerta, que os produtos de degradação formados sob as condições de estresse são considerados potenciais, e podem ou não ser formados nas condições de armazenamento do produto. O contrário também pode ocorrer de um produto de degradação relevante não ser formado sob as condições de estresse testadas. Serão os estudos de estabilidade acelerada e prolongada que irão revelar quais os produtos de degradação relevantes que poderão ser encontrados ao longo do tempo de estocagem do produto.

Apesar de existir alguns guias para a realização de estudos de estresse, como a RDC nº 58 (5), os guias Q3A (R2) (3) e Q3B (R2) (4) do ICH, nenhum deles estabelece diretrizes sobre como devem ser realizados os ensaios de degradação forçada. Estes guias indicam apenas quais testes devem ser empregados para melhor avaliar a estabilidade tanto do ativo quanto do produto. Isto se dá em razão das diversidades estruturais das moléculas utilizadas como insumos farmacêuticos ativos.

Em 2008, quando a ANVISA publicou um informe técnico a respeito deste assunto, este, além de trazer os limites permitidos de produtos de degradação em medicamentos e as ações correspondentes, também trazia diretrizes de como deveriam ser realizados ou pelo menos iniciados os testes de estresse (39). As condições sugeridas estão exemplificadas na tabela abaixo (Tabela 10).

Tabela 10 – Condições de estresse sugeridas no Informe Técnico nº1 da ANVISA (2008) (39).

Aquecimento	60°C
Umidade	75% UR ou mais
Solução Ácida	0,1N HCl
Solução Básica	0,1N NaOH
Solução Oxidativa	3% H_2O_2
Fotólise	UV-B fluorescente
Íons Metálicos	0,05M Fe^{2+} ou Cu^{2+}

Na RDC nº 58 (5) a ANVISA não sugere mais as condições dos testes, apenas exige que todos os insumos farmacêuticos ativos isolados e em associação, no caso de associações em dose fixa, as formulações e os placebos sejam submetidos aos ensaios de hidrólise ácida, básica, oxidação, aquecimento, umidade, exposição fotolítica e a íons metálicos, e que haja uma degradação superior a 10% e inferior a degradação completa da amostra.

A doxorrubicina isolada, o medicamento e o placebo (lactose) foram submetidos às condições descritas acima, com exceção da exposição a íons metálicos e umidade. Os resultados destes estudos estão descritos a seguir.

5.2.1. Estudos de estresse

5.2.1.1.Hidrólise

Segundo Baertschi (2011) (37), a hidrólise é um dos mecanismos de degradação mais comuns e frequentes ocorridos em medicamentos, pois a presença da água na grande maioria dos ativos farmacêuticos, (por exemplo, os hidratos), nos excipientes e a própria umidade do ar, gera condições adequadas para que haja tal reação.

Em um levantamento realizado por Alsante et al. (2003) (40), os autores notaram que a maioria das indústrias farmacêuticas realiza a degradação por hidrólise ácida e básica, mais frequentemente em soluções do que em formas farmacêuticas sólidas. No caso da DOX,

apesar de seu medicamento possuir a forma farmacêutica de liófilo, ou seja, sólida, não sendo, portanto, comumente avaliada por ensaios de hidrólise, é muito importante submetê-la aos testes de estresse por hidrólise, pois, antes da administração do medicamento, este é reconstituído em solução fisiológica ou água para injeção.

Ensaios realizados com a doxorrubicina padrão e com o medicamento revelaram extrema suscetibilidade da DOX a meios básicos. Em menos de uma hora de reação com NaOH 0,01 moles.L^{-1} este ativo degradada aproximadamente 100% em temperatura ambiente. Os cromatogramas (figura 10) a seguir ilustram a ausência do pico da DOX após apenas uma hora de exposição à condição básica.

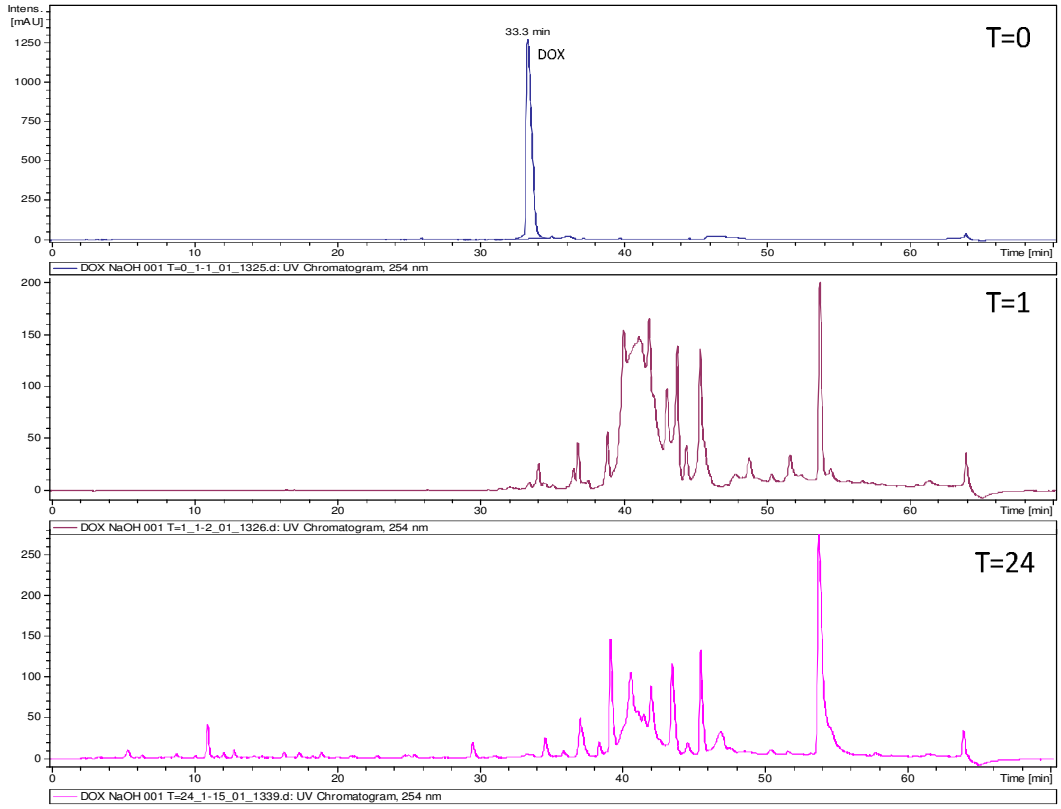


Figura 10 - Cromatogramas do ensaio de hidrólise básica do ativo doxorrubicina nos tempos zero, 1 hora e 24 horas, respectivamente, em λ 254 nm.

O perfil do cromatograma após uma hora de reação da DOX com NaOH não é satisfatório, porém não foi dada ênfase na melhora da separação, pois os produtos de

degradação presentes na amostra não são reais. Por ter sido degradada em sua totalidade a DOX, provavelmente, gerou produtos dos produtos de degradação e estes não são relevantes, pois, possivelmente, não estarão presentes no medicamento mesmo ao final de seu prazo de validade.

Seguindo a classificação criada por Singh e Bakshi (2000) (41) (tabela 11), pode-se classificar a DOX quanto à suscetibilidade a meio básico como extremamente lábil.

Tabela 11 - Sistema de classificação para hidrólise ácida e básica (Singh e Bakshi, 2000) (41).

Categoria	Condição	Tempo de exposição	Temperatura	Degradação
Praticamente estável	5N	2 dias	refluxo	Nenhuma
Muito estável	2N	1 dia	refluxo	Suficiente
Estável	1N	12 h	refluxo	Suficiente
Lábil	0,1N	8 h	refluxo	Suficiente
Muito lábil	0,01N	8 h	40°C	Suficiente
Extremamente lábil	0,01N	2h	25°C	Suficiente

Para melhor compreender a cinética de degradação por hidrólise básica, foram realizados ensaios por espectrofotometria no UV-Visível. Com os resultados foi possível notar que no tempo zero de reação o espectro da doxorrubicina, tanto padrão quanto medicamento, sofre deslocamento de suas bandas principais quando comparados com o padrão sem reação, conforme indica a figura 11.

Segundo Anand et al. (2012) (35), a desprotonação do amino-açúcar daunosamina-NH_3^+ e de um dos OH fenólicos do anel B da porção aglicônica em meio aquoso ocorre em valores de pK de *ca.* 8,15 e 10,16, respectivamente, o que leva as grandes mudanças observadas tanto na região UV (252 e 233 nm) quanto na região visível (480 nm) do espectro da doxorrubicina.

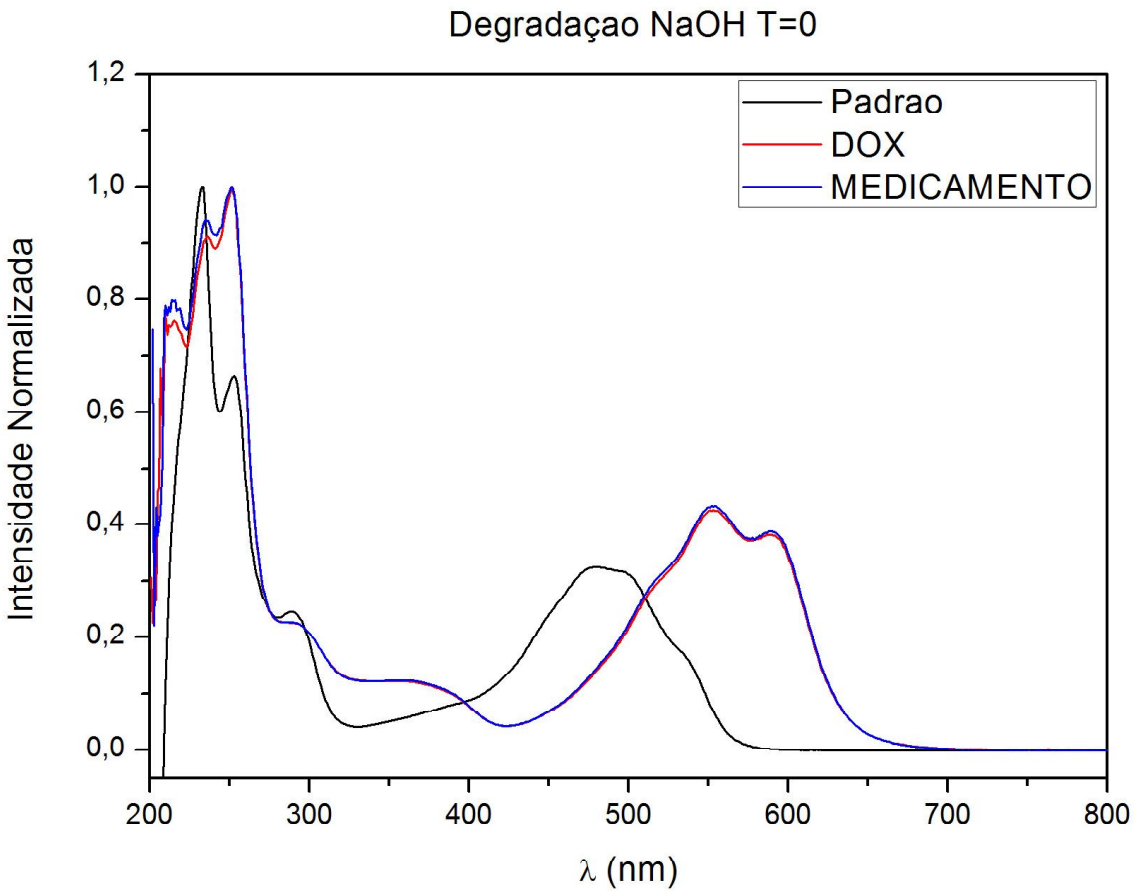


Figura 11 - Comparação entre os espectros de UV-Vis (200-800 nm) do padrão de DOX sem reação (preto), exposto à NaOH 0,01 mol.L^{-1} (vermelho) e do medicamento também exposto à hidrólise (azul), todos no tempo zero de reação.

O meio básico provoca um deslocamento batocrômico e também um efeito hipercrômico na absorção da DOX. Segundo Pavia et al. (2001) (42), a conjugação de grupos cromóforos é responsável pelo deslocamento batocrômico e pelo efeito hipercrômico, simultaneamente. Portanto, no caso da DOX, a desprotonação do grupo amino e também de um OH fenólico, conforme cita Anand et al. (2012) (35), ocasiona um efeito na ressonância da molécula, diminuindo a energia de transição requerida para que esta passe de um nível de menor energia para um de maior energia.

O padrão utilizado no ensaio de cinética se mostrou estável durante 48 horas. As amostras de DOX e medicamento degradaram consideravelmente ao longo das 48 horas de experimento, confirmando os dados encontrados por cromatograma líquida.

O espectro de absorção da DOX padrão durante a reação com NaOH obedece uma cinética estável de degradação, porém após 24 horas sua banda característica que se encontra deslocada em aproximadamente 550 nm, em razão do meio básico, volta para seu estado inicial que é em 480 nm, conforme figura abaixo.

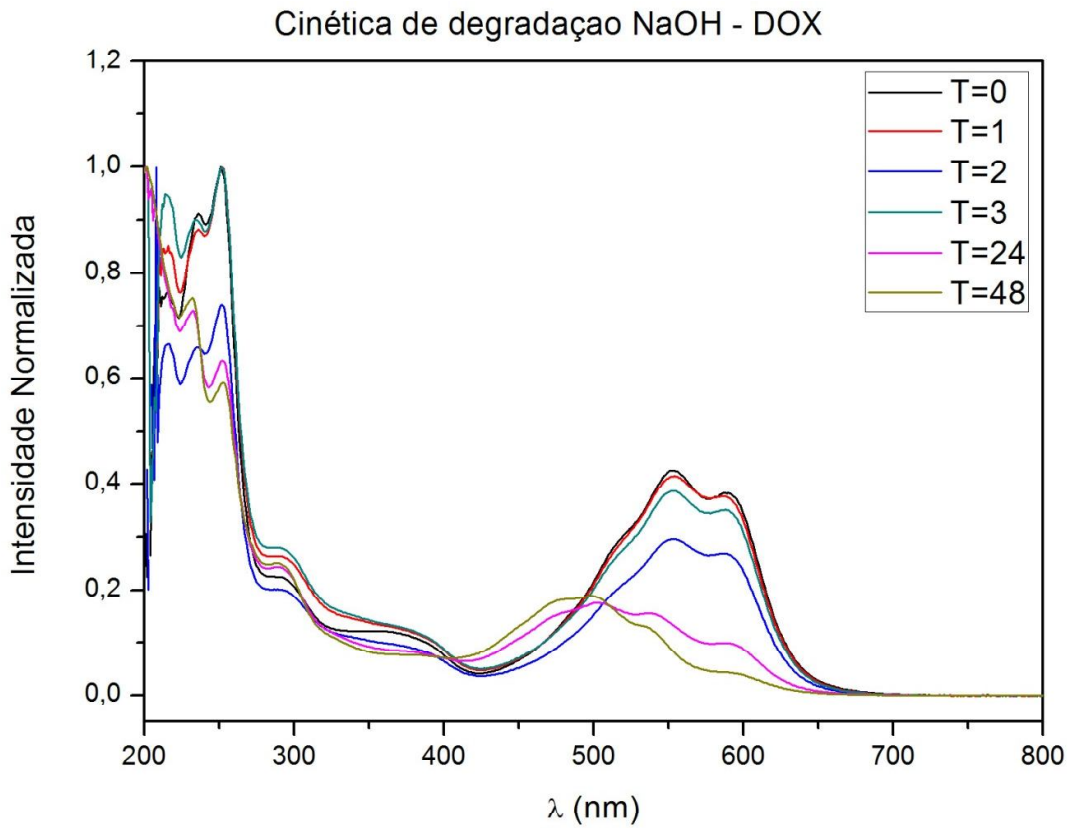


Figura 12 - Cinética de degradação básica do ativo doxorrubicina por UV-Vis (200-800 nm) nos tempos 0, 1, 2, 3, 24 e 48 horas.

Neste caso, o deslocamento da banda em λ 550 nm para seu estado original de maior energia (λ 480 nm), após 24 horas de exposição a meio extremamente básico, também conhecido como deslocamento hipsocrômico, pode ter ocorrido em razão da quebra da molécula da DOX, com consequente perda de parte importante para seu efeito cromóforo.

O deslocamento descrito anteriormente não acontece com a doxorrubicina quando no medicamento. A banda em 550 nm não volta para seu estado inicial após 24 horas de reação, mantendo o mesmo perfil do início ao fim do experimento, conforme mostra a

figura abaixo. Provavelmente, isto se deve ao fato de o medicamento ter seu pH inicial neutro e também em razão da presença de lactose na formulação.

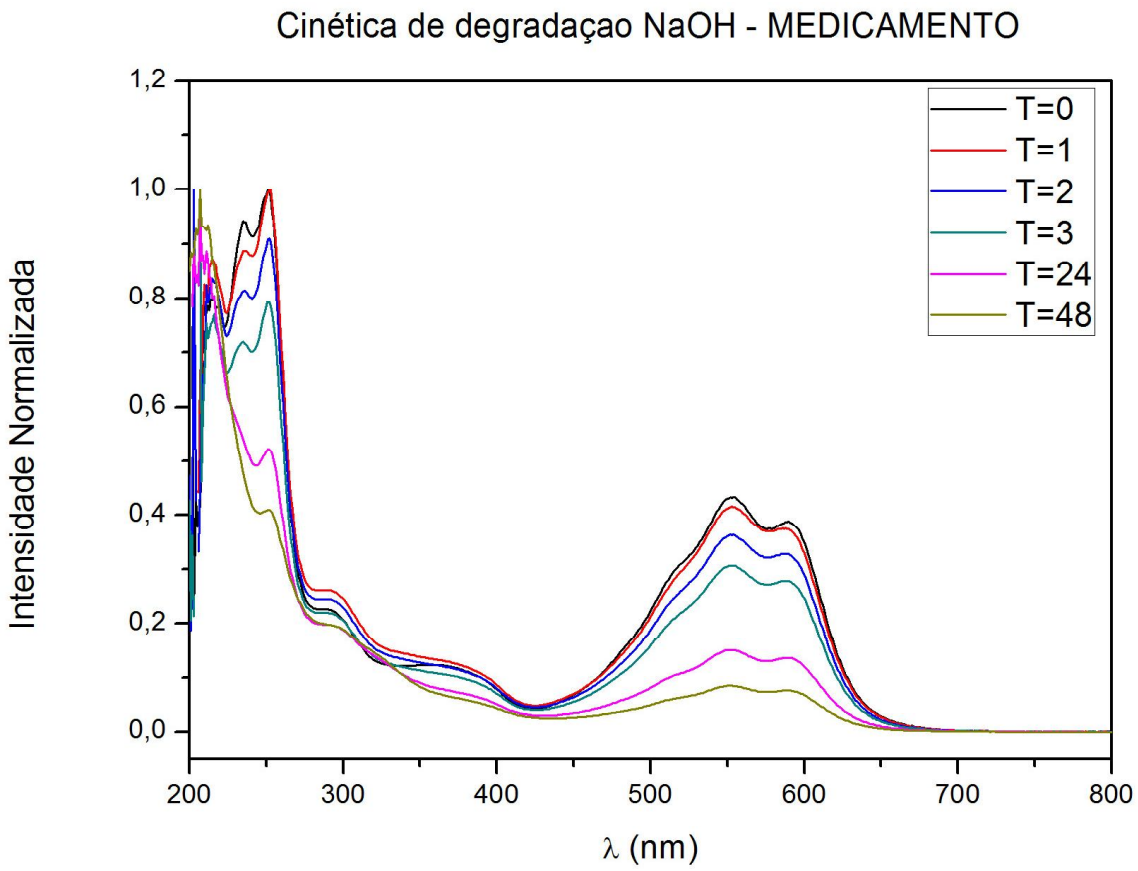


Figura 13 - Cinética de degradação básica do medicamento por UV-Vis (200–800 nm) nos tempos 0, 1, 2, 3, 24 e 48 horas.

Os resultados dos ensaios de hidrólise ácida da DOX, realizados com HCl em diferentes concentrações (0,05 e 0,01 mol.L^{-1}), mostraram que, em temperatura ambiente, tanto o padrão cloridrato de doxorrubicina quanto o medicamento, são estáveis nestas condições durante 5 horas, conforme figura 14.

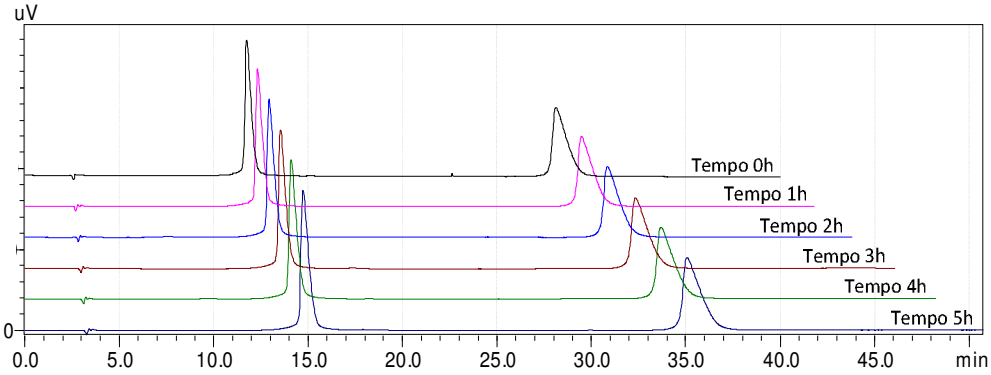


Figura 14 – Comparação entre os cromatogramas do teste de hidrólise ácida (HCl 0,05 mmoles.L^{-1}) com DOX (primeiro pico) e DAU (daunorrubicina) (segundo pico) nos tempos 0, 1, 2, 3, 4 e 5 h, mostrando que não houve diminuição significativa da área do pico. Cromatogramas analisados em λ 478 nm.

Esta estabilidade da DOX em meio ácido pôde ser confirmada, pois não há diminuição da área do pico da DOX (gráfico 4). Nos cromatogramas, não há o aparecimento de picos de produtos de degradação e tanto o pico da DOX quanto o da DAU (daunorrubicina) não apresentaram impurezas coeluindo. Em testes realizados com a DOX, Janssen et al. (1985) (43) concluíram que, quando em solução dos tampões Tris e fosfato pH 4 a DOX é mais estável que em meio de cultura celular pH 7,4. Os autores recomendam o uso de soluções de DOX com pH 4 para garantir uma maior estabilidade desta substância.

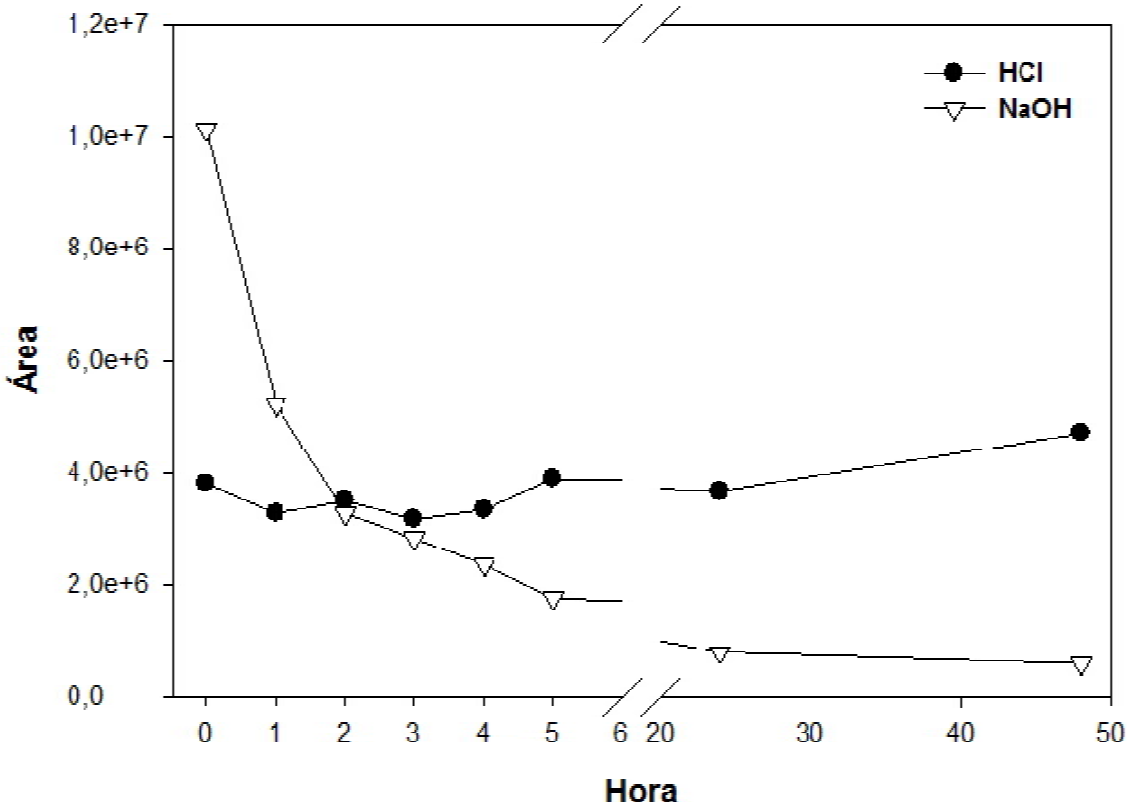


Gráfico 4 – Gráfico comparando a diminuição da área do pico da DOX em meio ácido e básico em função do tempo de reação.

O gráfico 5 também mostra que a DAU não é susceptível a meios ácidos, pois a área de seu pico não diminui significativamente ao longo das 5 horas de reação. Além disso, avaliando-se os cromatogramas, também não é possível identificar nenhum pico de produto de degradação.

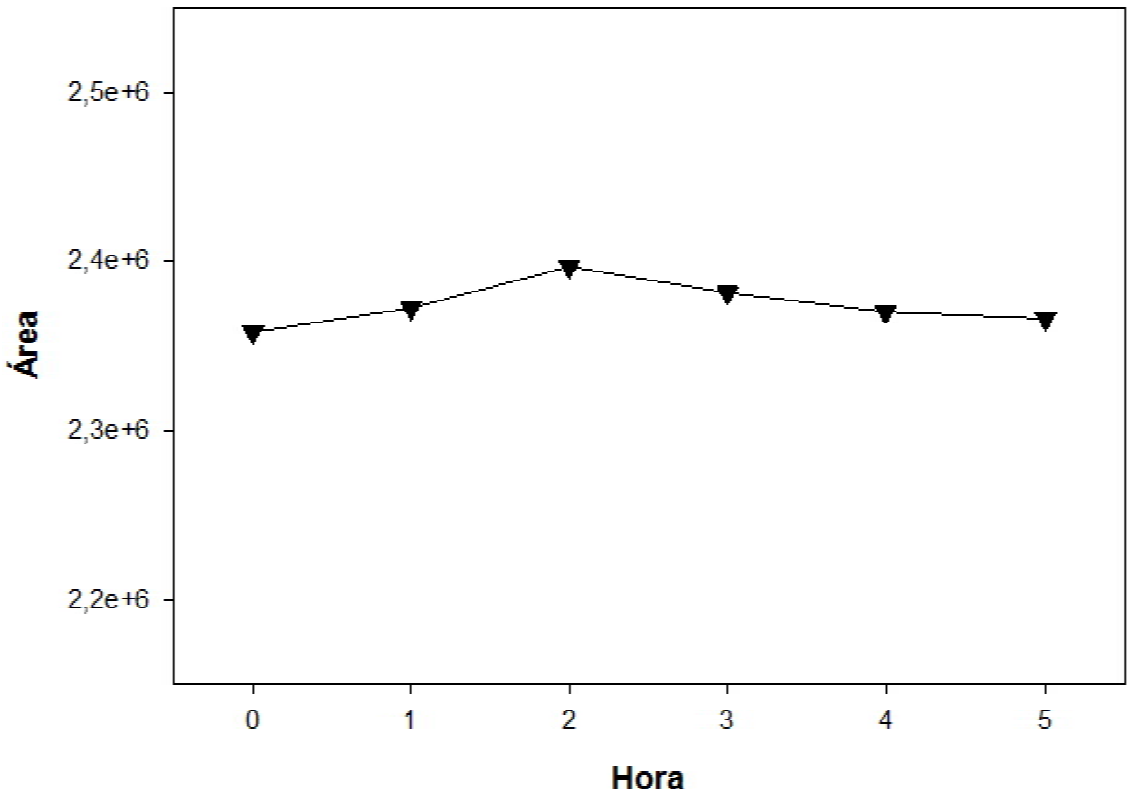


Gráfico 5 - Gráfico mostrando que não houve diminuição significativa (teste KW, p>0,05) na área do pico da DAU quando submetida à degradação por hidrólise ácida por 5h.

Avaliando-se a cinética de degradação da DOX em pHs baixos por espectrofotometria, também é possível concluir que não há degradação significativa da molécula ao longo de 23 horas de exposição a HCl em temperatura ambiente. Como ilustrado na figura 15 abaixo, em pH 2 não há diminuição nem deslocamento relevante das principais bandas no espectro da DOX.

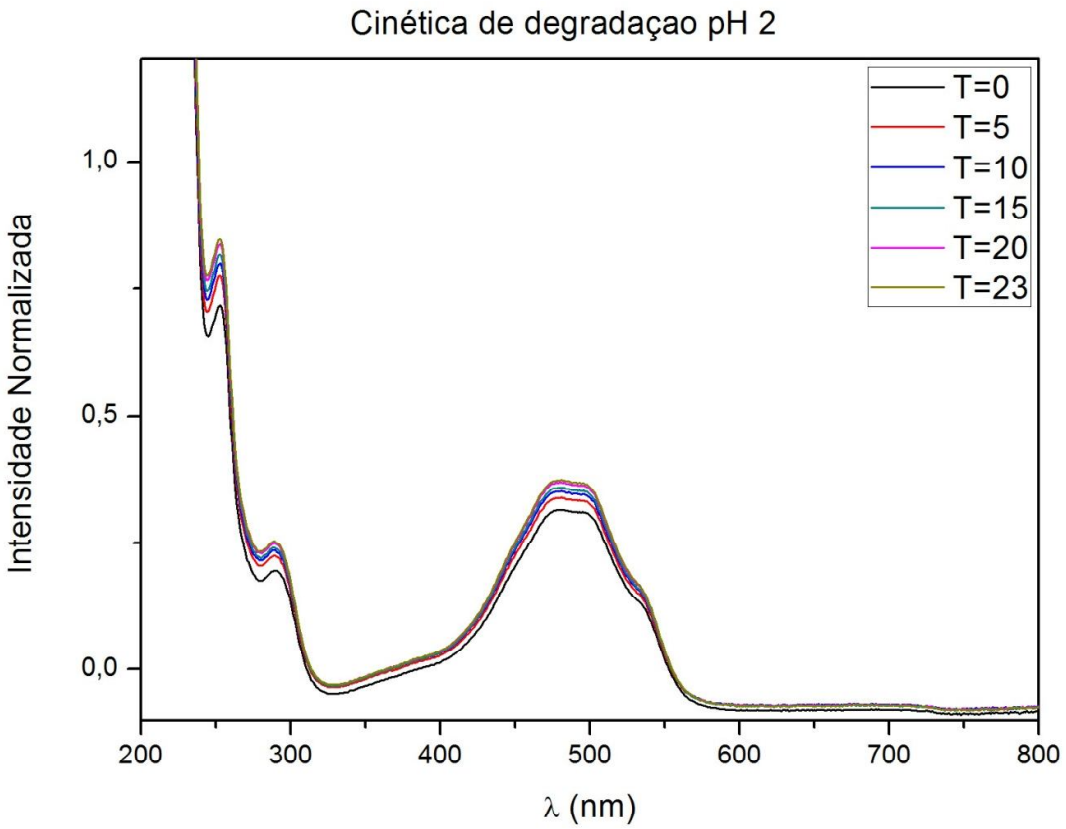


Figura 15 - Cinética de reação da DOX por UV-Vis em pH 2 e temperatura ambiente nos tempos 0, 5, 10, 15, 20 e 23 horas.

Apesar de apresentar uma ligação glicosídica em sua estrutura molecular e esta ser suscetível à hidrólise ácida, nos resultados obtidos a temperatura ambiente não foi possível confirmar a quebra da molécula e consequente formação de seu principal produto de degradação ácida. Estes resultados se assemelham aos reportados por Wassermann et al. (1983) (44), no qual os autores concluem que a doxorrubicina é estável a pHs baixos e sua porcentagem de degradação em meio aquoso à 22°C equivale a 1% em 80 min.

Estas informações também são relevantes para sustentar o uso da fase móvel ácida (tampão formiato 5 mmoles.L^{-1}, pH 3) nas análises por HPLC e LC-MS realizadas ao longo de todo o estudo.

A fim de confirmar a suscetibilidade da doxorrubicina e principalmente da ligação glicosídica a pHs baixos foram realizados ensaios de hidrólise com HCl 0,1 moles.L^{-1} com temperatura constate de 50°C durante 48 horas.

Os dados obtidos revelaram uma diferença significativa da DOX e do medicamento. Quando exposto a meio ácido, o padrão apresentou uma degradação de 43% na primeira hora de reação (figura 16), enquanto que o medicamento degradou 92% (figura 17). Após três horas de reação ainda foi possível notar a degradação de aproximadamente 50% do padrão, porém o ativo no medicamento já havia degradado 100%. Tamanha degradação se notou somente após cinco horas de reação do padrão com HCl à 50°C.

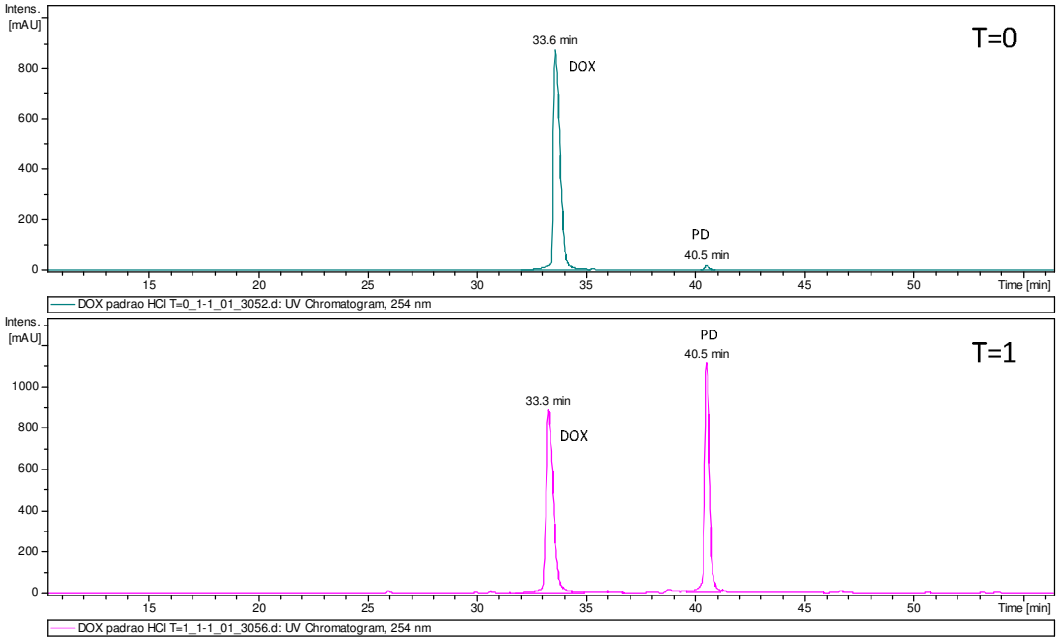


Figura 16 - Cromatograma em λ 254 nm do padrão de DOX exposto a HCl 0,1 moles.L^{-1} à 50°C nos tempos 0 e 1 hora, indicando formação de um único produto de degradação após 1 horas de reação.

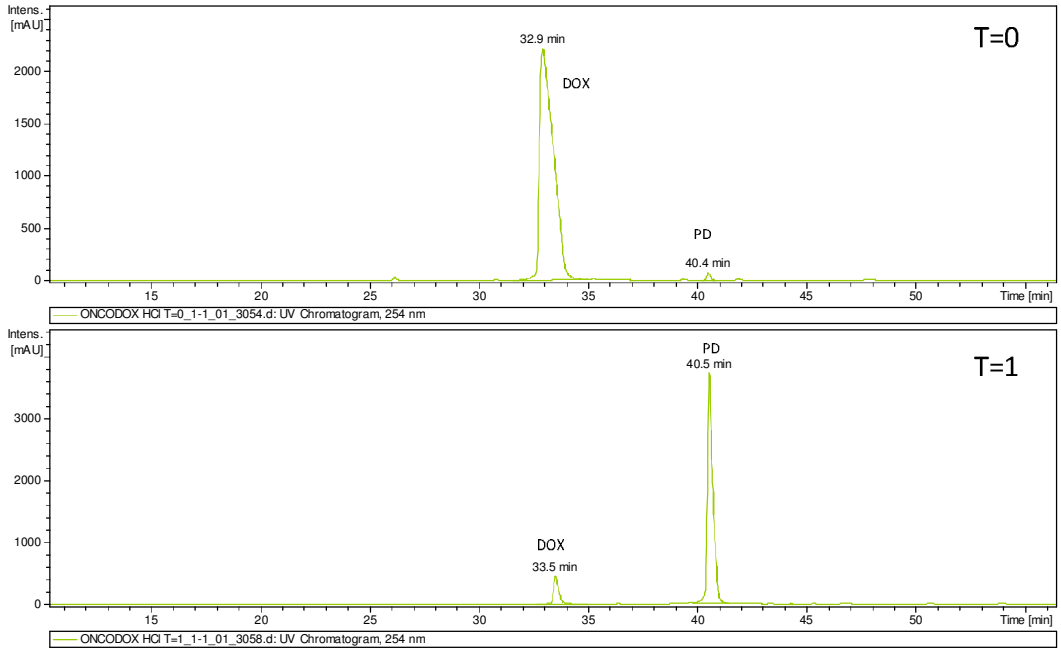


Figura 17 - Degradação do medicamento em HCl 0,1 moles.L-1 à 50°C nos tempos 0 e 1 hora (λ 254 nm), demonstrando alta taxa de degradação da doxorrubicina após apenas 1 hora.

Esta degradação acelerada do medicamento quando comparado ao padrão pode ter sido ocasionada pela lactose, presente como excipiente da formulação. A lactose possui a habilidade de sofrer reação de escurecimento não enzimático (reação de Maillard), principalmente na presença de aminas primárias (45). Esta reação é favorecida por umidade e por temperaturas mais elevadas. A coloração marrom escura foi observada nas amostras de medicamento e do ativo durante a reação em meio ácido a 50°C, o que evidencia o possível acontecimento da reação de Maillard da DOX com a lactose.

Em todos os tempos de reação observou-se a formação de um único produto de degradação, com tempo de retenção 40,5 min, tanto para o medicamento quanto para o padrão. A análise deste pico por espectrometria de massas confirma a estrutura do derivado aglicônico da DOX, como uma possível 7-deoxidehidrodoxorrubicinona (m/z 397) (figura 18).

Diferentemente do que descreveu Wasserman et al (1983) (44) e Beijnen et al (1986) (46), que encontraram a doxorrubicinona como sendo o principal produto da hidrólise da doxorrubicina, a estrutura proposta para o produto de degradação encontrado, apesar de bastante semelhante à doxorrubicinona, possui uma molécula a menos de água (figura 19).

Este fato pode ter ocorrido em razão da alta temperatura utilizada ao longo do experimento (50°C), já que os ensaios de Wasserman et al (1983) (44) foram realizados à temperatura de 37°C.

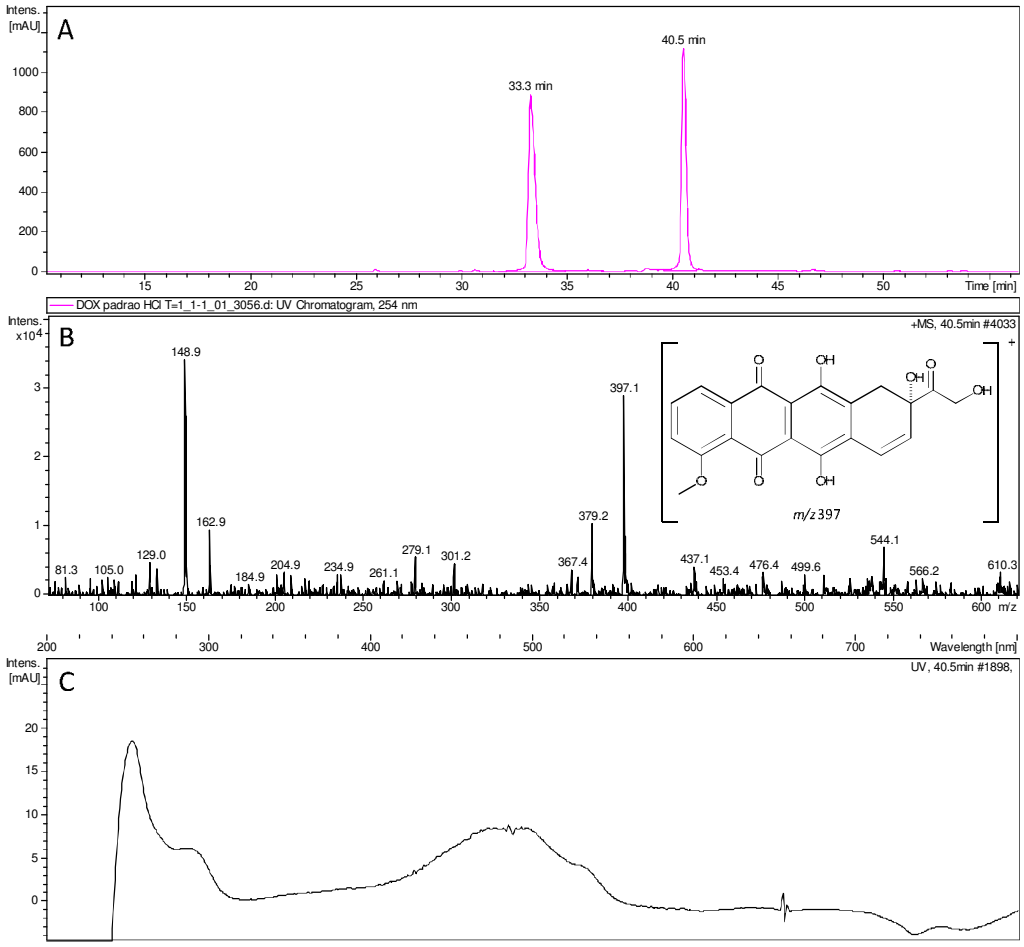


Figura 18 - A) Cromatograma em λ 254 nm da degradação ácida com pico do produto de degradação em Tr 40,5 min e pico da DOX em 33,3 min; A) Espectro de massas em modo *scan* obtido por ionização ESI modo positivo do pico em Tr 40,5 min confirmando a estrutura prosposta como sendo a 7-deoxidehidrodoxorrubicinona (*m/z* 397) e o amino-açúcar daunosamina (*m/z* 148); C) Espectro de UV-Vis da 7-deoxidehidrodoxorrubicinona.

Na figura acima é possível perceber que o espectro de UV-Vis da 7-deoxidehidrodoxorrubicinona é bem semelhante ao da doxorrubicina (figura 4). Isto

acontece, pois as estruturas responsáveis pela absorção no UV-Vis da DOX se mantiveram intactas no produto de hidrólise.

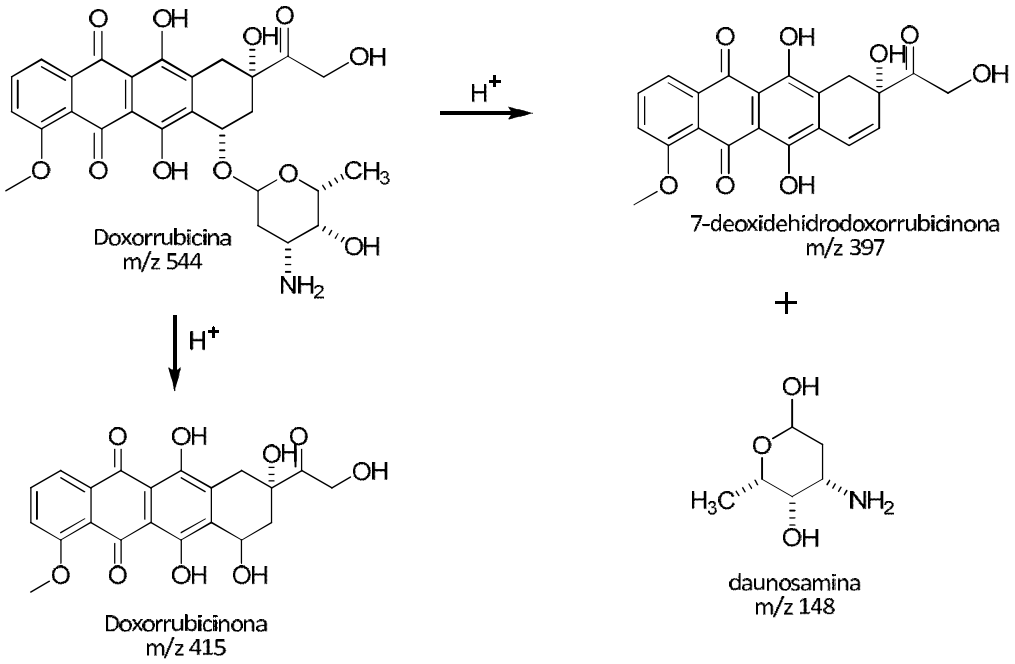


Figura 19 – Estruturas moleculares da doxorrubicina e os produtos de hidrólise ácida, 7-deoxidehidrodoxorrubicinona (*m/z* 397) e o amino-açúcar daunosamina (*m/z* 148), encontrados ao longo dos experimentos e a doxorrubicinona (*m/z* 415) citada por Wasserman et al (1983) (44).

Muito se discute na literatura científica sobre a doxorrubicinona ser ou não ser um metabólito da DOX. Andersen et al. (1999) (47) concluiu em seus experimentos de farmacocinética em humanos que o metabólito da DOX é a 7-deoxidoxorrubicinolona e não a doxorrubicinona. Já Sokolove (1994) (48) aponta em sua revisão que muitos autores encontram o derivado aglicônico da DOX, a doxorrubicinona, nos instantes iniciais do metabolismo e com o passar do tempo se encontra apenas outros derivados como a 7-deoxidoxorrubicinolona. Segundo Sokolove (1994) (48) esta variação depende de vários fatores como preparo da amostra, tipo de análise, tempo de armazenamento da amostra, dentre outros. Apesar da discussão científica, os derivados aglicônicos da DOX são

conhecidos e a maioria deles está associada ao principal efeito tóxico da DOX, a cardiotoxicidade (48).

Caso um produto de degradação encontrado no medicamento seja identificado como sendo um metabólito conhecido da DOX, não haveria a necessidade de se realizar os testes toxicológicos para a qualificação do mesmo, já que a própria RDC nº 58 (5) traz em seu artigo 10º que se o produto de degradação for um metabólito significativo encontrado durante estudos em humanos ou animais este será considerado qualificado.

5.2.1.2.Oxidação

A oxidação juntamente com as reações de hidrólise catalisadas por ácidos ou bases são as maiores responsáveis pela diminuição da concentração dos ativos farmacêuticos nos medicamentos, e consequentemente, pela maior formação de produtos de degradação (37). O principal objetivo do teste de estresse por oxidação é detectar os fatores que controlam estas reações e também identificar os principais produtos de degradação gerados. Em formas farmacêuticas sólidas a reação de oxidação por autoxidação dificilmente segue a sequência de iniciação, propagação e término, muito provavelmente pela falta de mobilidade dos compostos e principalmente dos radicais responsáveis pela reação. Esta reação é muito difícil de prever em razão da complexidade natural da oxidação, na qual os intermediários oxidativos são muitas vezes termicamente instáveis e podem se decompor por diferentes vias quando expostos a temperaturas elevadas. O aumento da temperatura, por consequência, não irá levar a mudanças previsíveis na taxa de degradação, e a dinâmica e vias de oxidação são diferentes daquelas observadas nas reações de oxidação em temperaturas menores (37).

Em solução os mecanismos e a dinâmica da reação por oxidação irão depender da quantidade de oxigênio dissolvido. Com isso, a velocidade de reação será diretamente influenciada pelo aumento da temperatura, já que este aumento irá diminuir a concentração de oxigênio dissolvido, diminuindo, assim, a probabilidade de acontecer esta degradação (37).

Os ensaios de oxidação com a DOX foram realizados com solução de peróxido de hidrogênio 30% a temperatura ambiente e a reação foi avaliada durante 48h. Os resultados demonstraram a susceptibilidade da DOX ao meio oxidativo, com decréscimo gradativo da área do pico do ativo com o passar do tempo (teste KW, $p<0,05$). Após 48h de reação a degradação foi completa (gráfico 6).

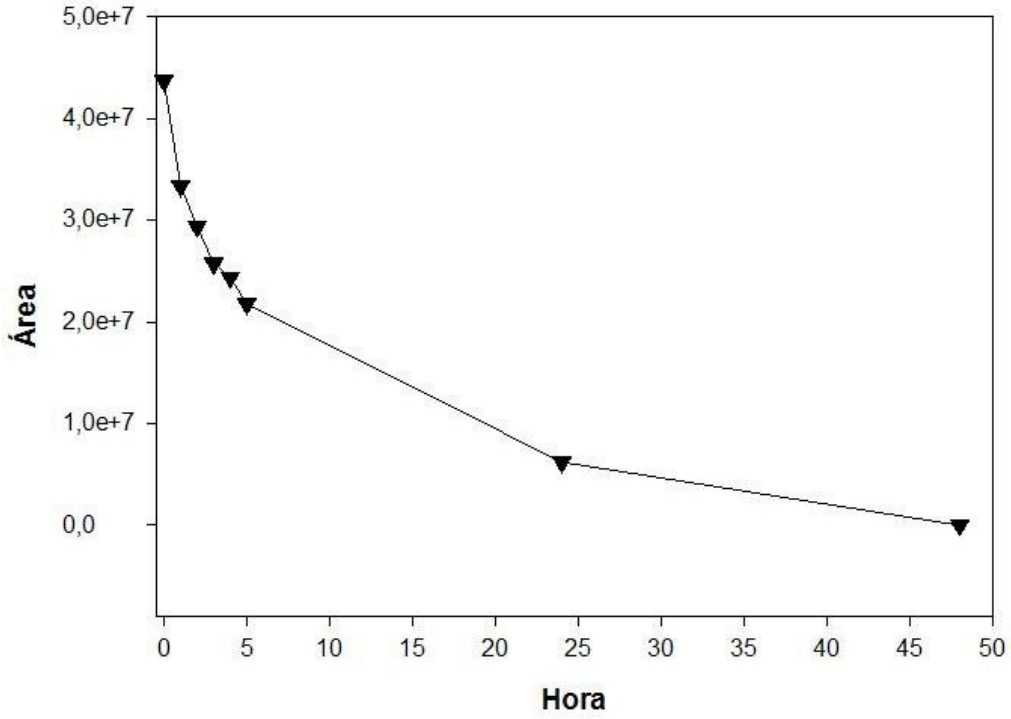


Gráfico 6 – Gráfico demonstrando a diminuição gradual da área do pico da DOX quando submetida à oxidação por H_2O_2 30%.

Na cinética de degradação ilustrada na figura acima se percebe que as primeiras horas de reação da DOX em meio oxidativo obedecem certa linearidade e a velocidade de reação é controlada. Após 5 horas de reação a degradação total observada é de 25% tanto para o ativo quanto para o medicamento, sendo possível notar uma degradação gradual para ambos de aproximadamente 5% por hora.

Esta mesma cinética de degradação pode ser observada quando a solução oxidante está a 3%. Nesta condição a DOX padrão e medicamento também degradam aproximadamente 5% por hora durante as primeiras 5 horas. Porém, a diferença entre os

ensaios se dá após 48 horas, visto que, quando utilizado H_2O_2 3% ainda é possível identificar o pico de DOX no cromatograma, diferentemente de quando se usa H_2O_2 30% que a degradação é total (figura 20).

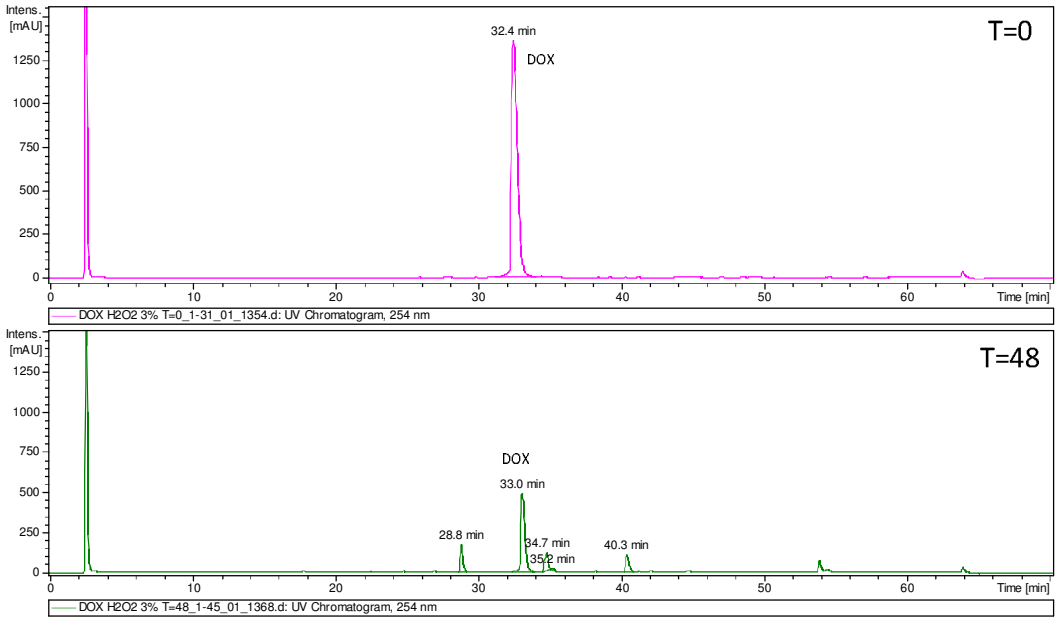


Figura 20 - Cromatogramas do ensaio de estresse com H_2O_2 3% nos tempos 0 e 48 horas (λ 254 nm), indicando a não degradação total da DOX após 48 h de reação.

Nas análises por espectrofotometria também foi possível verificar certo controle da reação nas primeiras horas seguido de uma degradação mais significativa em 24 e 48 horas, conforme mostra a figura abaixo.

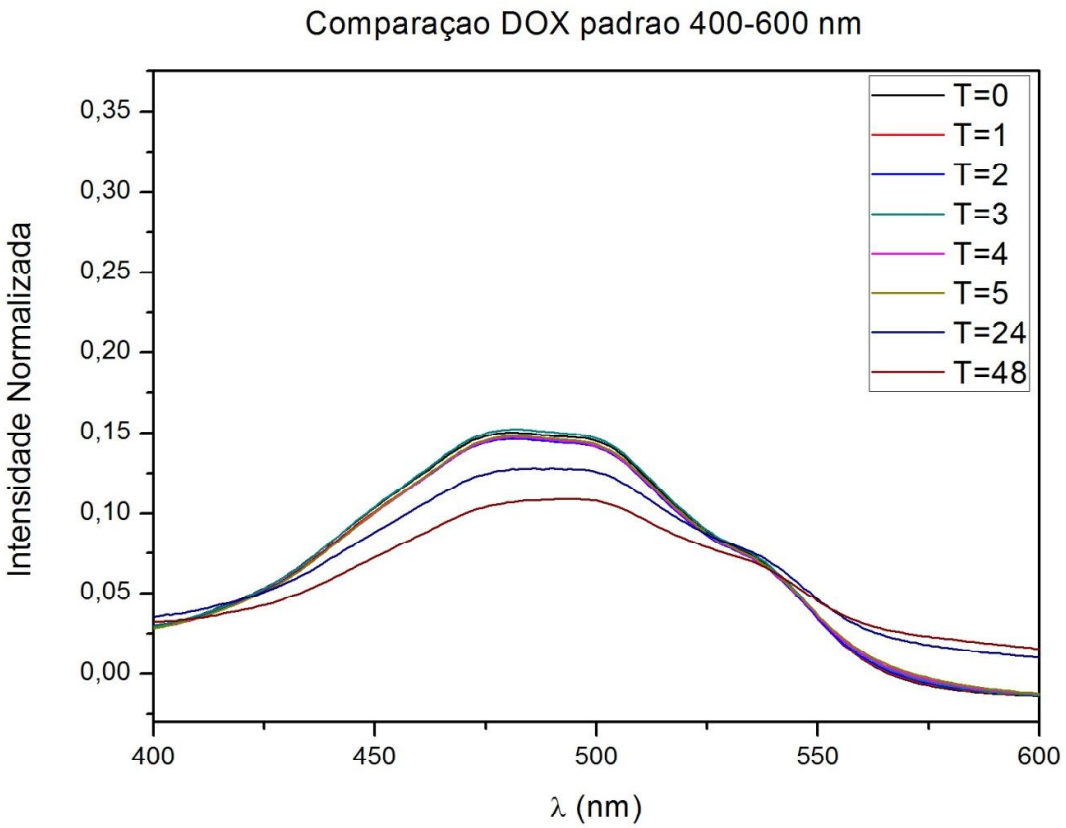


Figura 21 - Cinética de reação da DOX com H_2O_2 3% por UV-Vis à temperatura ambiente durante 48 horas.

Após 24 horas de reação, tanto o padrão quanto o medicamento, apresentaram o mesmo produto de degradação encontrado na hidrólise ácida, a 7-deoxidehidrodoxorrubicinona, com tempo de retenção de aproximadamente 40,5 min, e relação m/z 397, identificada por espectrometria de massas.

5.2.1.3.Degradação térmica

No clássico artigo de Kennon, publicado em 1964 (49), o autor discute a influência do aumento da temperatura (ambiente a 85°C) sobre a taxa de degradação dos produtos farmacêuticos, no sentido de prever a validade dos medicamentos. Além de ter sido um marco histórico e base para muito outros trabalhos publicados, este artigo subsidiou o que se conhece como "A regra de Joel Davis", a qual assume que a exposição de um produto a

40°C e 75% de umidade relativa (UR) por 3 meses é equivalente a 24 meses a temperatura ambiente (37). Esta é a condição atualmente empregada nos estudos de estabilidade acelerada, que, juntamente com os ensaios de degradação forçada, conseguem prever os prováveis produtos de degradação dos medicamentos ao final de seus prazos de validade.

No guia Q1A (R2) do ICH é recomendado que o estudo de estresse seja realizado com temperaturas maiores que as empregadas no estudo de estabilidade acelerada, devendo-se aumentar os valores de 10 em 10°C. Não há nenhuma justificativa clara do uso deste incremento, mas, segundo Reynolds (2002) (50) e Alsante (2007) (51), a cada aumento de 10°C na temperatura a taxa de reação aproximadamente dobra.

O estudo de degradação da doxorrubicina expôs soluções do ativo, do medicamento e do placebo a temperatura de 50°C na ausência de luz e com umidade relativa controlada. Após 3 horas de reação não foi observada nenhuma diminuição significativa na área da DOX e nem picos de produtos de degradação nos cromatogramas. A partir de 4 horas, o ativo apresenta diminuição de 10% na área e alguns picos de impurezas podem ser notados. O medicamento começa a degradar apenas após 5 horas de reação, na qual apresenta 7% de queda de teor. Em 48 horas a 50°C tanto o ativo quanto o medicamento degradaram 26%. O placebo apresentou queda de apenas 4% após 48 horas de estudo.

Um único pico de degradação foi observado após 24 horas, com tempo de retenção de 35,1 min. Este mesmo pico também foi encontrado no cromatograma de 48 horas, conforme mostra a figura 22.

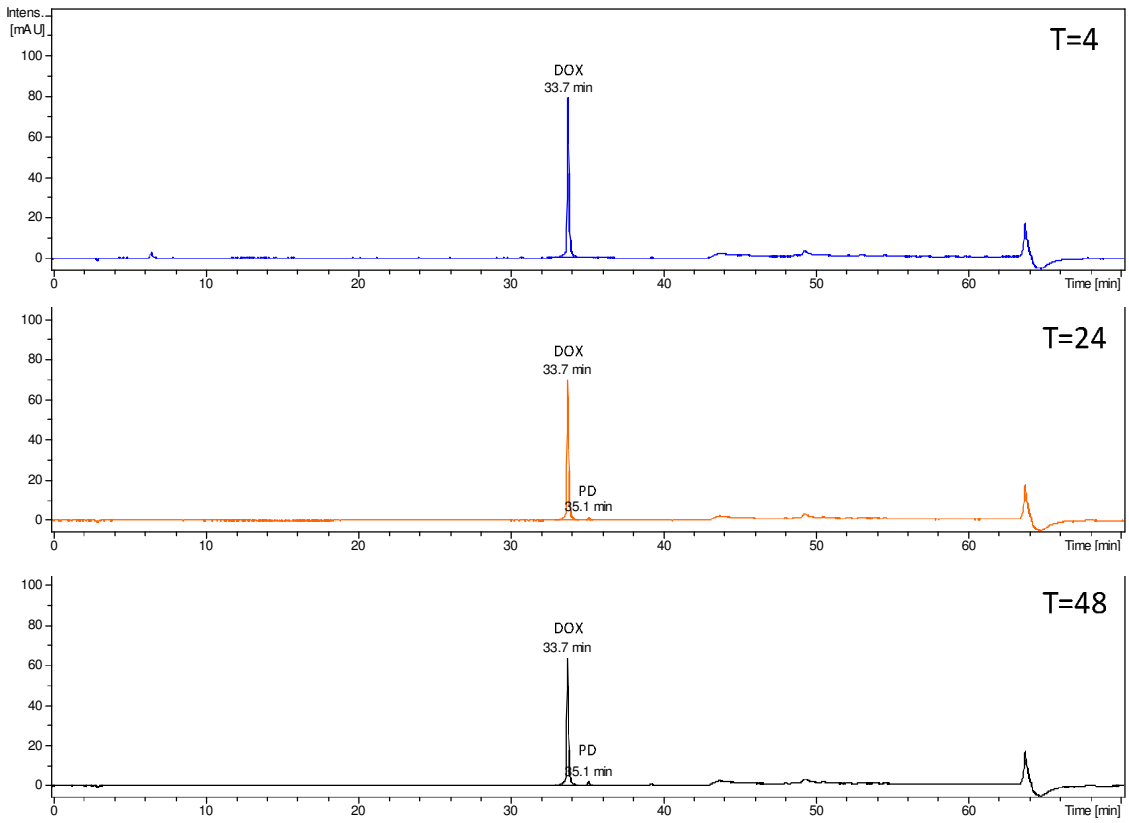


Figura 22 - Cromatogramas nos tempos 4, 24 e 48 horas (λ 254 nm) do padrão de DOX exposto a 50°C. Os cromatogramas nos tempos 24 e 48 horas indicam a presença de um único produto de degradação com Tr em 35,1 min.

Uma possível estrutura molecular para este composto com Tr em 35,1 min pôde ser proposta por meio dados obtidos pela espectrometria de massas. Sua relação *m/z* de 530 indica a presença do amino-açúcar na molecular, o que infere em uma mudança na cadeia lateral do composto. Sendo assim, a estrutura mais provável seria a descrita abaixo.

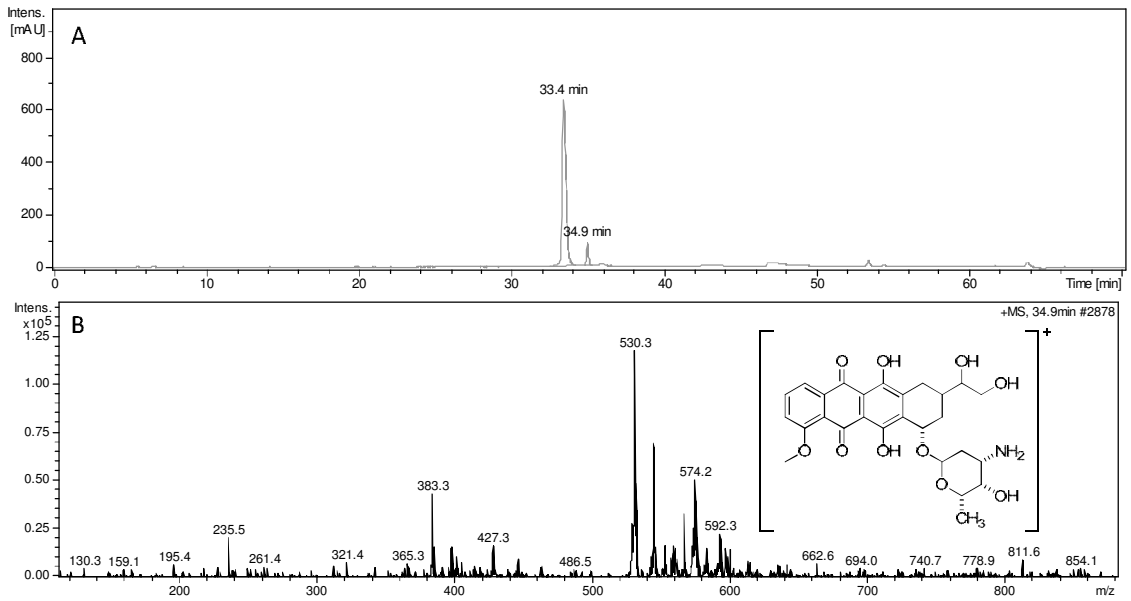


Figura 23 - A) Cromatograma do medicamento (λ 254 nm) após 48 horas de exposição ao calor (50°C) ilustrando pico do principal produto de degradação; B) Espectro de massas obtido no modo scan por ESI modo positivo do pico do produto de degradação por temperatura (Tr 34,9 min) com sua possível estrutura molecular.

5.2.1.4.Fotodegradação

O estudo de fotodegradação é o único que possui diretrizes descritas pelo ICH, dispostas no guia Q1 B (64), teste de fotoestabilidade para novos insumos farmacêuticos e medicamentos. Neste guia há descrito as condições que se deve submeter às amostras a fim de simular uma exposição à luz ao longo do tempo de vida do medicamento.

A avaliação do comportamento do ativo frente à fotoexposição é de extrema importância, pois substâncias capazes de absorver luz, consequentemente, são capazes de sofrer reações fotoquímicas que podem resultar em transformações intra e intermoleculares. Segundo Kleinman et al. (2010) (52), moléculas que possuem grupos cromóforos (partes da molécula capazes de absorver luz UV e visível na faixa de 290 a 700 nm, como, por exemplo, duplas conjugadas ou anéis aromáticos), podem ser ativadas fotoquimicamente por radiação UV ou visível. Consequentemente, esta ativação pode

alterar sistemas biológicos e, se a exposição for suficiente, pode causar efeitos danosos, incluindo fototoxicidade.

Kleinman (2010) (52) ainda correlaciona algumas características fotoquímicas, como o coeficiente de absorção molar (ε), o rendimento quântico de fluorescência e o tempo de vida de fluorescência, das moléculas com a probabilidade de serem fototóxicas. Em seu estudo com 40 compostos, ele conclui que todos os resultados positivos para toxicidade *in vitro* foram de substâncias com que possuem, pelo menos, uma absorção máxima no UV-Vis entre 290 e 700 nm com ε maiores que 1000 $L.mol^{-1}.cm^{-1}$.

Diante destas informações, deve se atentar para o fato do composto em estudo possuir um ε de aproximadamente 11000 $L.mol^{-1}.cm^{-1}$ em λ 480 nm. Além disso, o amplo espectro de absorção da doxorrubicina chama atenção para possíveis reações fotoquímicas.

A fotoestabilidade da doxorrubicina foi avaliada conforme apresentado no item 4.3.1 da seção materiais e métodos e os resultados tanto para o padrão quanto para o medicamento foram bastante semelhantes. Após 48 horas de exposição o padrão degradou 32% e o medicamento 23%. A fim de garantir a confiabilidade dos resultados, foram avaliados também seus respectivos controles escuros, que se mantiveram estáveis após o tempo total de exposição, indicando que a degradação observada neste ensaio foi única e exclusivamente devido à luz e não a temperatura ou umidade, por exemplo. Também é possível notar uma degradação de apenas 10% após 5 horas de exposição tanto para o padrão quanto para o medicamento.

Para avaliar a influência do oxigênio do meio sobre a fotodegradação foram analisadas amostras ambientadas com nitrogênio. Não foi possível observar nenhuma diferença significativa na degradação das amostras. 48 horas de exposição à luz em meio nitrogenado, as amostras degradaram 26%.

Avaliando-se os cromatogramas deste estudo, não foi possível detectar nenhum pico de produto de degradação, mesmo com a diminuição do pico do ativo (figura 24). Isto também foi observado por Williams e Tritton (1981) (53), que não conseguiram detectar os degradantes da DOX após sua fotodegradação, nem por HPLC tão pouco por fluorescência e RMN (ressonância magnética nuclear).

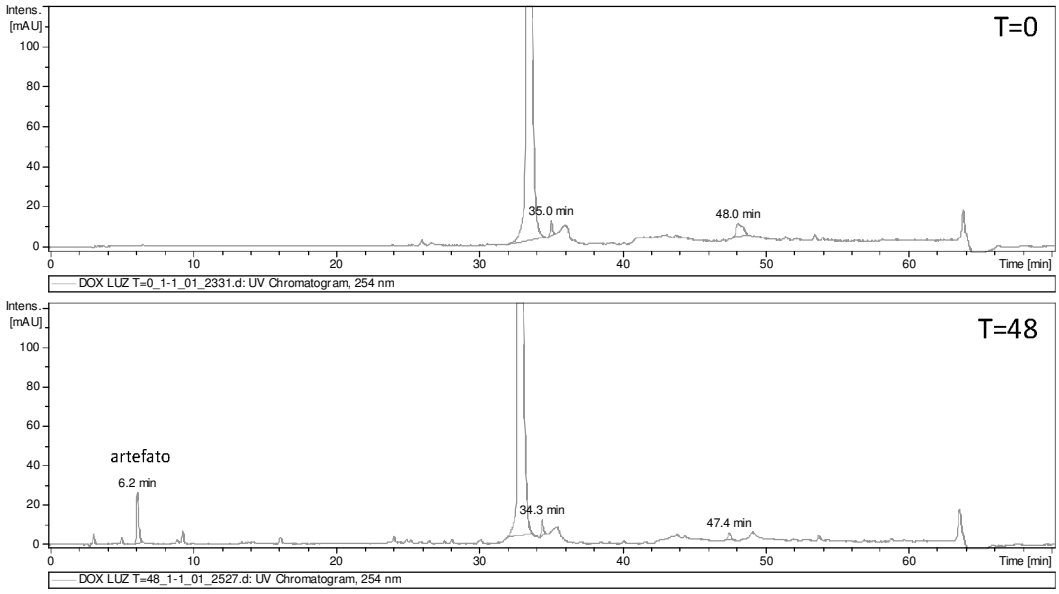


Figura 24 – Cromatogramas da fotodegradação da DOX nos tempos 0 e 48 horas em λ 254 nm constatando nenhum aparecimento de produto de fotodecomposição.

A suscetibilidade da DOX à radiação UV-A (400 – 315 nm) também foi avaliada. Após 48 horas de reação, tanto o ativo quanto o medicamento apresentaram degradação de apenas 10%, mostrando pouca suscetibilidade do composto a esta radiação. Estes dados corroboram com os resultados do estudo realizado por Bomgaars et al. (1997) (54), no qual os autores avaliam a inativação da DOX por luz UV-A e constatam que o ativo só apresenta degradação quando na presença de riboflavina dos meios de cultura de ensaios *in vitro*, já que esta atua como um agente fotossensibilizador que interage com a DOX através da formação de espécies reativas de oxigênio.

5.2.2. Validação do método indicativo de estabilidade

O objetivo da validação é demonstrar que o método é apropriado para a finalidade pretendida, no caso, a determinação quantitativa de produtos de degradação no medicamento, e também garantir a confiabilidade dos resultados (28).

Seguindo a legislação vigente, a RE nº 899 (28), foram validados os seguintes parâmetros: especificidade, linearidade, precisão e exatidão.

A especificidade do método foi avaliada ao longo dos estudos de estresse, e demonstraram a capacidade do método em separar os produtos de degradação encontrados, como mostra a figura abaixo (figura 25), referente ao ensaio de degradação com H_2O_2 por 24 horas, temperatura ambiente, que degradação a DOX em 50%

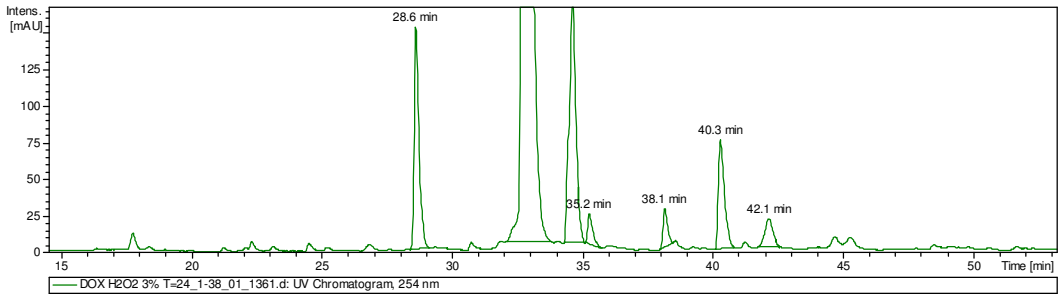


Figura 25 - Ensaio de degradação da DOX por H_2O_2 3% por 24 horas a temperatura ambiente (λ 254 nm).

A precisão intra-corrida foi avaliada através da injeção de 6 amostras de placebo contaminados na concentração da especificação do produto, ou seja, no limite de identificação (0,2% de 1mg.mL^{-1}). Os resultados estão descritos na tabela abaixo.

Tabela 12 - Resultados do teste de precisão intra-corrida

Precisão Intra-corrida	
Solução	**Concentração (mg.mL^{-1})**
Intra 1	0,002221
Intra 2	0,002217
Intra 3	0,002232
Intra 4	0,002222
Intra 5	0,002232
Intra 6	0,002224
Média	**0,002371**
Desvio Padrão	**0,000013**
DPR (%)	**0,56%**

Segundo Snyder et al. (2010) (38), quando um método possui um desvio padrão relativo (DPR) abaixo de 1%, este é considerado adequado. O autor ainda aponta que métodos de detecção de baixas concentrações de impureza o DPR pode ser de 5 a 10%. Portanto, o resultado expresso acima indica que o método é preciso, ou seja, capaz de determinar resultados próximos obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra (28).

Os resultados obtidos no ensaio de precisão em dias diferentes e sendo as amostras preparadas por um analista diferente, também indicaram a precisão inter-corrida do método, conforme a tabela abaixo.

Tabela 13 - Resultados do ensaio de precisão inter-corrida

Precisão Inter-corrida	
Solução	**Concentração ($mg.mL^{-1}$)**
Intra 1	0,002221
Intra 2	0,002217
Intra 3	0,002232
Intra 4	0,002222
Intra 5	0,002232
Intra 6	0,002224
Inter 7	0,002355
Inter 8	0,002357
Inter 9	0,002370
Inter 10	0,002386
Inter 11	0,002380
Inter 12	0,002381
Média	**0,002298**
Desvio Padrão	**0,000077**
DPR (%)	**3,36%**

Os resultados do ensaio de exatidão, indicados na tabela 14, demonstram a capacidade do método indicativo de estabilidade desenvolvido de detectar concentrações próximas as reais.

Tabela 14 - Resultados do ensaio de exatidão para os pontos 50%, 100% e 120%

Exatidão				
Solução	**Intervalo**	**Concentração Teórica (mg.mL^{-1})**	**Concentração Experimental (mg.mL^{-1})**	**Recuperação (%)**
Exatidão 1A	BAIXO (50%)	0,0010448	0,0009413	90,09
Exatidão 2A		0,0010448	0,0009405	90,02
Exatidão 3A		0,0010448	0,0009378	89,76
Exatidão 1B	MÉDIO (100%)	0,0020880	0,0024597	117,80
Exatidão 2B		0,0020880	0,0024248	116,13
Exatidão 3B		0,0020880	0,0024524	117,45
Exatidão 1C	ALTO (120%)	0,0025056	0,0030073	120,02
Exatidão 2C		0,0025056	0,0030005	119,75
Exatidão 3C		0,0025056	0,0030098	120,12
			Média	**109,02**
			Desvio Padrão	**14,36**
			DPR (%)	**13,17%**

O valor de DPR no teste de exatidão pode variar de acordo com a finalidade do método. Para métodos de quantificação de impurezas, como se trabalha com concentrações muito baixas, próximas ao limite de quantificação a variação que pode ser encontrada é maior quando comparada com outros ensaios, como o de teor, por exemplo. Portanto, DPR de até 15% são aceitáveis para métodos indicativos de estabilidade (55).

5.3. Avaliação do medicamento

Conforme mencionado no item 5.2 desenvolvimento do método indicativo de estabilidade, o principal objetivo de se desenvolver um método indicativo de estabilidade

(MIE) é para que este seja aplicado nas amostras provenientes dos estudos de estabilidade tanto acelerada quanto prolongada, a fim de se determinar os reais produtos de degradação presentes. Depois de desenvolvido, devidamente desafiado e validado o MIE este está apto a ser aplicado no estudo de estabilidade.

De posse de amostras de medicamentos vencidos apenas, análises foram realizadas com o objetivo de avaliar o comportamento do ativo ao longo do tempo de vida do medicamento, a fim de avaliar a formação de produtos de degradação de acordo com as condições de transporte e, principalmente, armazenamento do produto.

O cromatograma abaixo indica a presença de um único produto de degradação no medicamento (figura 26).

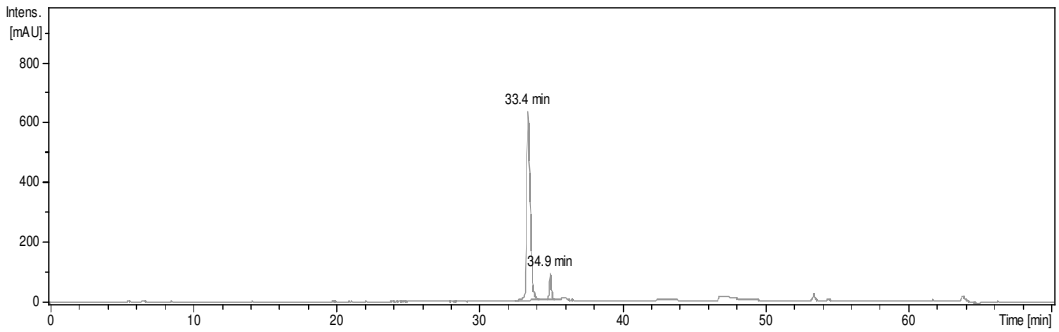


Figura 26 - Cromatograma da análise do medicamento em λ 254 nm após prazo de validade expirado indicando a presença de um único produto de degradação em Tr 34,9 min.

Existem algumas maneiras de se calcular a concentração dos produtos de degradação nas amostras. Dentre elas as mais comuns são por correlação entre as áreas dos picos de impurezas e o pico do padrão do ativo na concentração da especificação, ou seja, injeta-se no cromatógrafo uma solução do padrão do ativo na concentração da especificação do produto para impurezas individuais, geralmente esta concentração é o limite de identificação, e compara-se as áreas do padrão com as dos produtos de degradação. Outra forma de calcular é por porcentagem área, na qual se avalia qual a porcentagem correspondente da área do pico da impureza com relação à área do pico do ativo.

Através da medida de área relativa é possível determinar que o produto de degradação encontrado na análise do medicamento (figura 26) após seu prazo de validade é

de aproximadamente 7%, o que significa que, se este produto estivesse disponível no mercado, seu limite para produto de degradação estaria fora da especificação. Porém, o mesmo encontra-se vencido, provavelmente, por isso esta porcentagem esteja acima dos níveis esperados.

Analisando o espectro de massas do pico da impureza encontrado no medicamento, é possível caracterizá-la como sendo a mesma molécula descrita nos ensaios de degradação térmica, já que seus espectros de massas são bem semelhantes (figura 27).

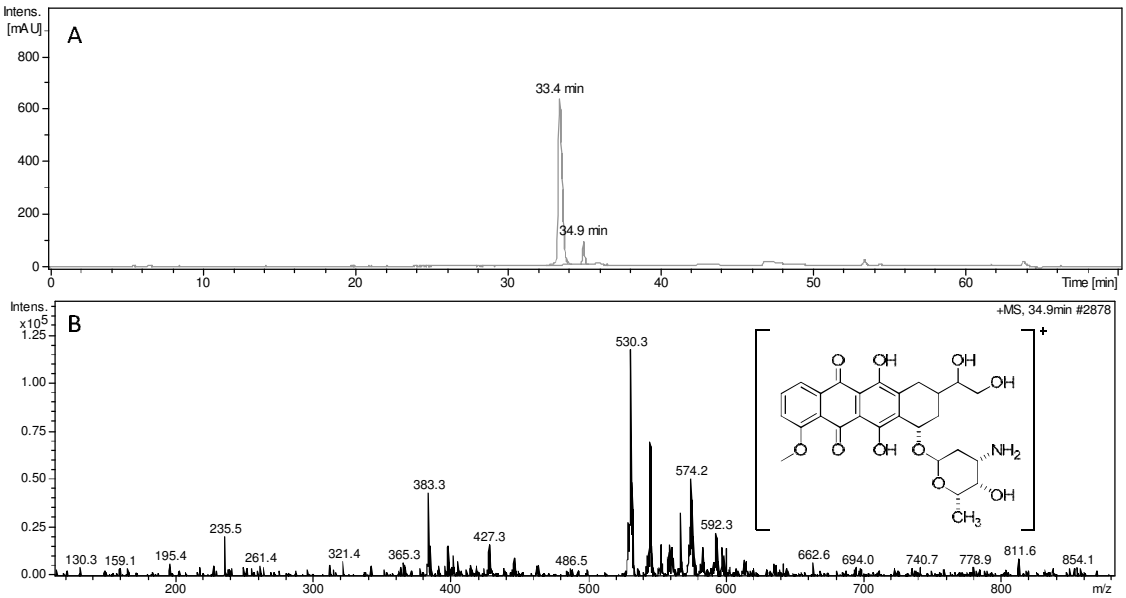


Figura 27 – A) Cromatograma da análise do medicamento vencido (λ 254 nm) contendo produto de degradação em Tr 34,9 min; B) Espectro de massas na modo scan, ionização por ESI+ referente ao pico em Tr 34,9 min ilustrando a possível estrutura do principal produto de degradação do medicamento.

A estrutura proposta pode ser confirmada avaliando-se o espectro de massas originado da fragmentação do íon *m/z* 530, que dá origem ao fragmento com *m/z* 383, que corresponde à perda do aminoaçúcar daunosamina da molécula principal, conforme ilustram as figuras abaixo.

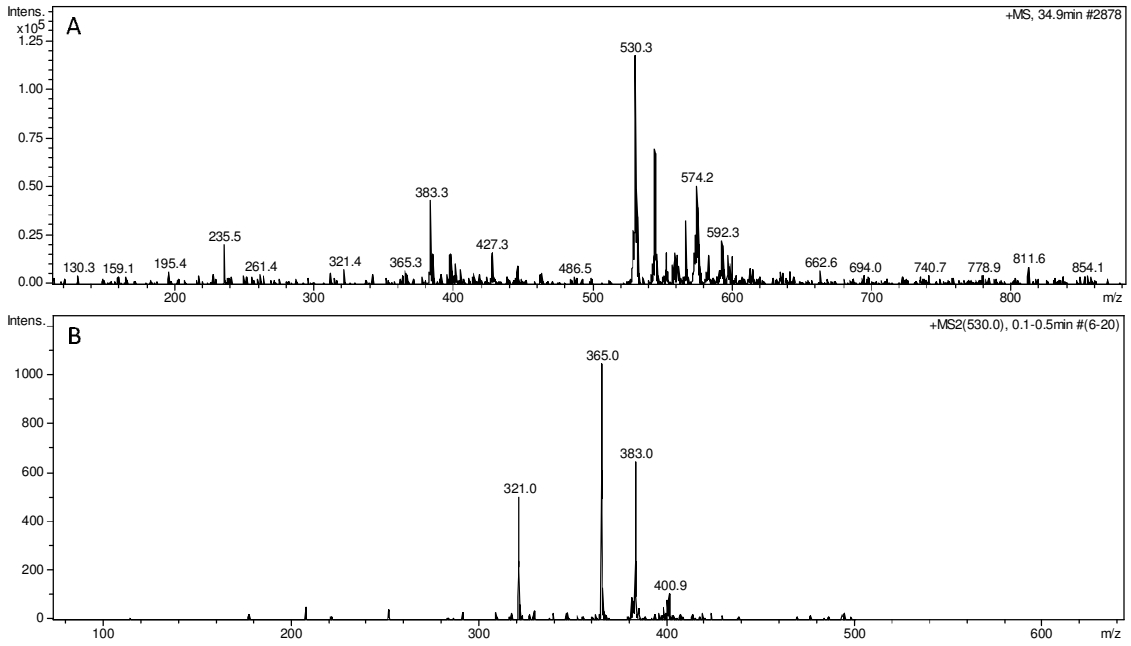


Figura 28 – A) Espectro de massas no modo scan com ionização por ESI+ do principal produto de degradação do medicamento; B) Espectro de massas MS2 do íon m/z 530, confirmando a estrutura proposta para o principal produto de degradação presente no medicamento.

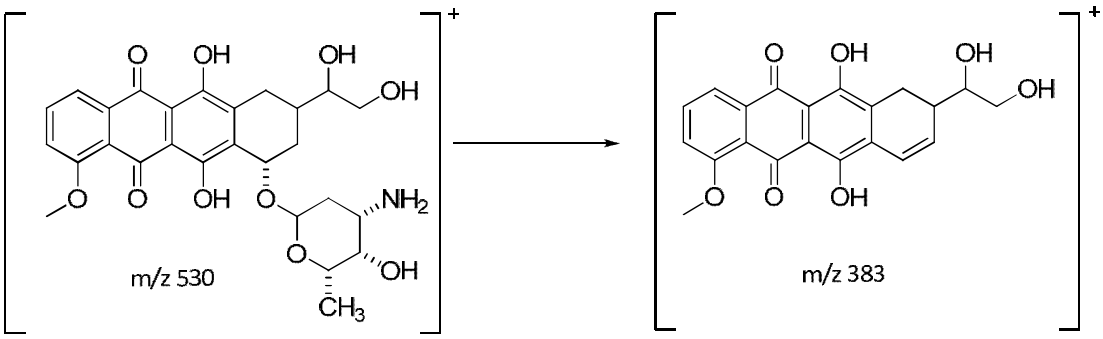


Figura 29 – Estrutura molecular do principal produto de degradação do medicamento (íon *m/z* 530) e seu principal fragmento (íon *m/z* 383).

Portanto, o único produto de degradação real encontrado no medicamento é proveniente da sua exposição à temperatura.

5.4. Teste de congelamento

A fim de garantir a estabilidade das soluções utilizadas ao longo do estudo, foram realizados testes de congelamento das amostras de padrão de doxorrubicina em água, tampão MOPS 10 mmoles.L^{-1} pH 7 e soro fisiológico 0,9%, e três ciclos de congelamento e descongelamento foram avaliados. Também foi avaliada a influência de oxigênio (O_2) na amostra.

Os coeficientes de variação entre as áreas das amostras, na presença e ausência de O_2, nos ciclos de congelamento estão descritos na tabela a seguir. Através dos valores encontrados pode-se concluir que não houve diminuição da área da DOX durante o período de congelamento e nenhuma interferência foi encontrada nos cromatogramas que pudesse inferir a instabilidade da molécula frente à condição de descongelamentos consecutivos.

Tabela 15 - Variação entre as áreas do padrão de doxorrubicina após três ciclos de congelamento e descongelamento, em diferentes diluentes e na presença e ausência de O_2. Áreas avaliadas em λ 480 nm.

	Média das Áreas	Desvio Padrão	CV (%)
DOX H_2O O_2	3354254	9256,41	0,28%
DOX H_2O N_2	3471836	52723,7	1,52%
DOX SORO O_2	3644618	11838,5	0,32%
DOX SORO N_2	3766736	50367,24	1,34%
DOX MOPS O_2	658796,5	4051,286	0,61%
DOX MOPS N_2	653622,3	7179,989	1,10%

Na tabela acima é possível perceber que a presença de O_2 na amostra ao invés de acelerar a degradação, ajuda a conservar a integridade da amostra.

5.5. Avaliação da Toxicidade dos Produtos de Degradação da Doxorrubicina

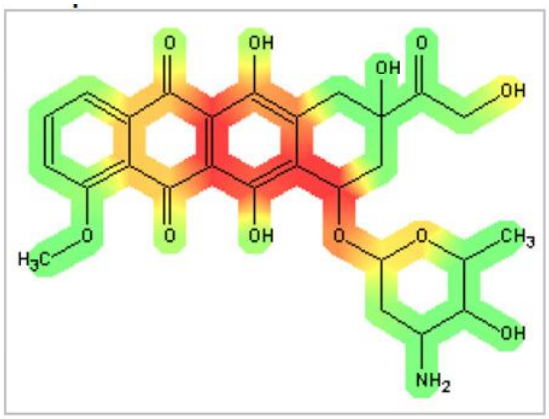
Um dos ensaios mais utilizados para avaliar a genotoxicidade dos compostos, como descrito no item 1.4. da introdução, é o teste de Ames. Este teste consiste em avaliar se a substância em análise possui efeito mutagênico sobre cepas específicas de *Salmonella sp.* dependentes de histidina. Caso o composto seja mutagênico ele irá causar uma mutação nos genes da bactéria tornando-a, assim, capaz de capturar histidina do meio, favorecendo, consequentemente, o crescimento das colônias (56).

Segundo Kenyon et al. (2007) (57), a toxicidade do ativo quando presente nas amostras contendo as impurezas de interesse pode comprometer o resultados dos testes de Ames. Por isso, não foi possível realizar este ensaio com os produtos de degradação da DOX, já que estes não foram isolados do ativo e também em razão da alta toxicidade da DOX.

A fim de estimar a mutagenicidade do principal produto de degradação encontrado nas análises do medicamento foi realizado um teste de Ames *in silico* através do software ACD/Percepta (ACD/Labs). O resultado deste teste indica a probabilidade de 89% do composto em questão gerar resultado positivo para o teste de Ames, com margem de segurança de 48%, conforme mostra a figura 36.

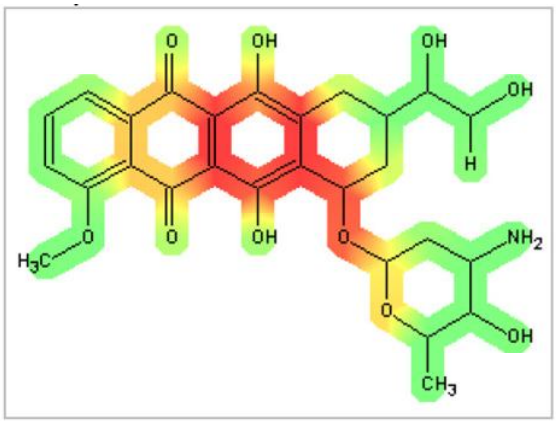
Para avaliar a confiabilidade dos resultados obtidos neste ensaio *in silico*, a doxorrubicina também foi testada (figura 30), esperando-se encontrar resultado positivo, já que esta é comprovadamente carcinogênica. O resultado obtido para a DOX confirmou sua mutagenicidade com margem de segurança de 95%, o que garante a confiabilidade dos dados obtidos.

Doxorrubicina



Probabilidade de resultados positivo para teste de Ames: **0,95**
Confiabilidade: **Alta (RI=0,95)**

Produto da degradação térmica



Probabilidade de resultados positivo para teste de Ames: **0,89**
Confiabilidade: **Limite (RI=0,48)**

Figura 30 – Resultado do ensaio *in silico* para mutagenicidade (teste de Ames) da doxorrubicina e de seu principal produto de degradação.

A figura 30 também ilustra em vermelho a principal parte da estrutura da molécula responsável pela possível ação mutagênica. Comparando-se a estrutura do produto de degradação em análise com a da DOX, é possível notar grande semelhança entre as partes responsáveis pela toxicidade.

A doxorrubicina é bastante conhecida por sua importante cardiotoxicidade, porém seu efeito tóxico para a medula óssea também é bastante relevante. Em estudo conduzido por Nurgalieva (2011) (58), foi constatado que, perante vários tratamentos contra o câncer de mama, o regime que utiliza antraciclina e os que utilizam agentes alquilantes, são os mais mielotóxicos. A mielossupressão induza por medicamento não só limita o tratamento com os agentes citostáticos, como também é um fator de risco para um prognóstico ruim, devido à diminuição significativa da imunidade e de outros sistemas contra a doença. Além disso, há crescente evidência de que a resistência adquirida pelos tumores ao tratamento pode advir de danos em células-tronco (59).

A quimioterapia mata as células cancerosas mais diferenciadas em tumores, porém, as células-tronco sobreviventes podem causar metástase disseminada ou reincidência de tumores agressivos após falha do tratamento (59). Segundo Calcagno (2010) (60),

tratamentos prolongados com doxorrubicina aumenta a proliferação de células-tronco características de câncer de mama, o que, consequentemente, aumenta a resistência ao fármaco.

A fim de avaliar a ação tóxica da DOX foram realizados ensaios de viabilidade celular em células mononucleares (PBMC), conforme descrito no item 4.7.2. na seção materiais e métodos. O objetivo destes testes foi avaliar se há diferença entre a toxicidade de amostras de doxorrubicina e do medicamento utilizado no tratamento do câncer, e o ativo e o medicamento contendo quantidades significativas de produtos de degradação.

Avaliando-se os resultados do efeito citotóxico da doxorrubicina e de seu medicamento em células mononucleares foi possível concluir, conforme ilustra o gráfico abaixo e através do tratamento estatístico dos dados, que não houve morte significativa das células quando estas foram expostas às concentrações descritas do ativo.

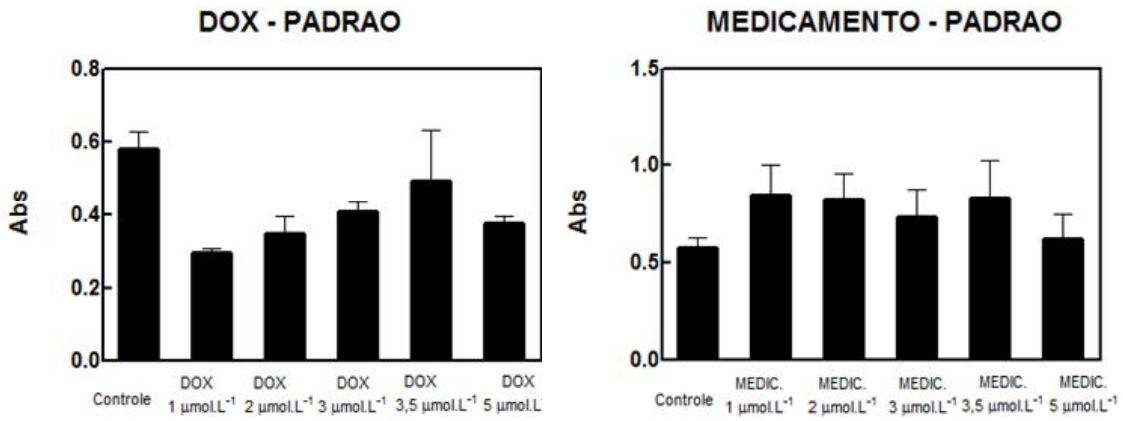


Gráfico 7 – Resultado da avaliação da ação citotóxica da doxorrubicina e de seu medicamento em células mononucleares (PBMC) indicando que não houve morte significativa das células com as concentrações descritas.

Quando avaliados os resultados obtidos tratando-se as células mononucleares com amostras contendo quantidade significativa de produtos de fotodegradação, não foi possível encontrar morte celular significativa (gráfico 8). Com isso, pode-se concluir que os produtos de degradação formados por fotólise não são citotóxicos.

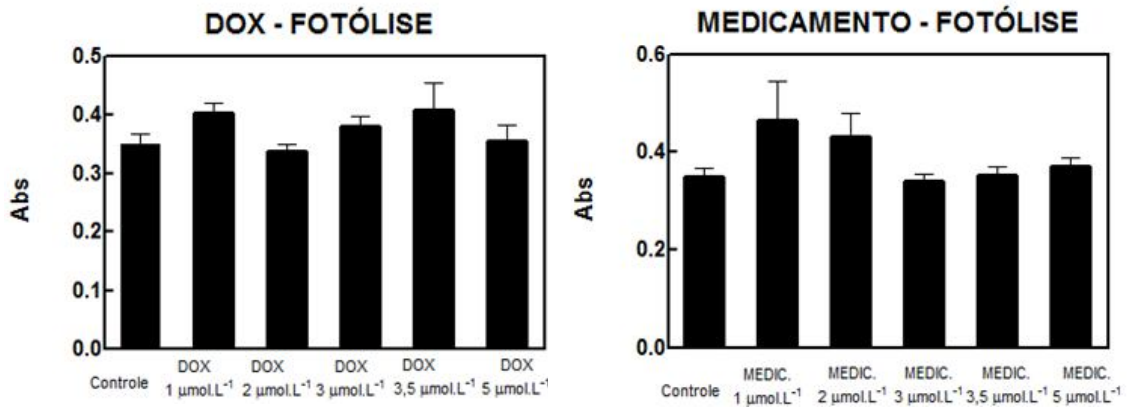


Gráfico 8 - Resultado da avaliação da ação citotóxica de amostras de doxorrubicina e de seu medicamento contendo quantidade significativa de produtos de degradação formados por fotólise em células mononucleares (PBMC) indicando que não houve morte celular significativa.

O resultado mais importante deste estudo foi obtido quando as células mononucleares foram tratadas com as amostras de doxorrubicina e de medicamento contendo produtos de sua termodegradação. Mesmo utilizando-se as mesmas concentrações de doxorrubicina que os padrões do ativo e do medicamento, foi possível identificar morte celular significativa no tratamento das células (gráfico 9).

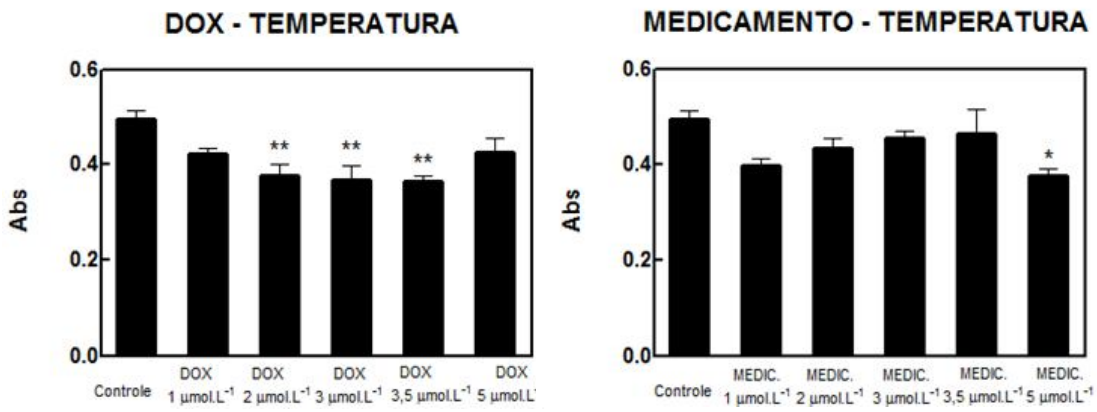


Gráfico 9 – Resultados do tratamento de células mononucleares com amostras de doxorrubicina e de medicamento contendo produtos de termodegradação, indicando morte significativa das células nas concentrações de ativo 2, 3 e 3,5 $\mu ml.L^{-1}$ (**) e de medicamento 5 $\mu mol.L^{-1}$ (*).

O tratamento com o padrão de DOX degradado por temperatura nas concentrações de 2, 3 e 3,5 $\mu mol.L^{-1}$ matou as células em estudo. O mesmo não ocorreu quando se tratou as células com DOX apenas, conforme mostra o gráfico 1. Isto, provavelmente ocorreu em razão da presença de produtos de degradação na amostra, ou seja, é possível concluir que os produtos de degradação formados por temperatura são mais citotóxicos do que a própria doxorrubicina.

Os ensaios realizados com o medicamento identificaram que houve morte celular apenas no tratamento com a amostra de concentração 5 $\mu mol.L^{-1}$. Com isso, é possível concluir que, apesar do medicamento contendo produtos de degradação térmica induzir citotoxicidade nas células mononucleares, isto ocorre somente em concentrações mais altas tanto de DOX quanto de produto de degradação.

Este dado é bastante relevante, pois a análise do medicamento após expirado seu prazo de validade, descrita no item 5.3. desta seção, identificou o produto de degradação térmica como sendo a principal impureza encontrada no medicamento. Portanto, conclui-se com os resultados dos ensaios de viabilidade celular que a presença do produto de termodegradação da DOX é mais citotóxico do que o ativo isolado.

Em experimentos de toxicidade *in vitro* realizados com 7 metabólitos da DOX em células da medula óssea, Dessypris et al. (1986) (61) concluíram que estes os compostos aglicônicos da DOX são menos prejudiciais do que o ativo, inferindo, portanto, que a daunosamina possui papel importante na toxicidade da DOX. Um dos metabólitos avaliados foi o doxorrubicinol, que possui estrutura bastante semelhante ao produto de termodegradação presente no medicamento. Este metabólito foi considerado tóxico pelos autores e este resultado corrobora com o resultado encontrado neste estudo, apesar de as células avaliadas terem sido diferentes.

6. CONCLUSÕES

Por meio do método indicativo de estabilidade desenvolvido e validado, foi possível avaliar a suscetibilidade da doxorrubicina a diferentes condições de estresse, e este composto se mostrou bastante instável, pois apresentou degradação significativa em quase todos os testes realizados.

A hidrólise básica do ativo foi praticamente total após apenas 1 hora de reação, indicando extrema suscetibilidade do composto a esta condição.

Apesar de possuir um grupo acetal em sua estrutura molecular, sendo este instável a meio ácido, sua hidrólise só foi possível quando a reação ocorreu com temperatura de 50°C, inferindo certa estabilidade da molécula a meio ácido. Com o auxílio da técnica de espectrometria de massas foi possível identificar o único produto de degradação formado por esta condição, sendo este a 7-deoxixehidrodoxorrubicinona, um dos derivados aglicônico da doxorrubicina.

Comparando-se o padrão de DOX com o medicamento nota-se uma diferença significativa nos resultados encontrados para hidrólise ácida com temperatura, confirmando o que se discutiu anteriormente sobre a influência da lactose da formulação.

Os resultados de oxidação indicaram a instabilidade do ativo a meios oxidativos, já que, em apenas 5 horas de contato com solução de H_2O_2 3% houve uma degradação de 25%. Temperatura e luz fluorescente também foram capazes de degradar o fármaco em quantidade suficiente para classificá-lo com termo e fotoinstável. A condição menos degradante encontrada foi a exposição à radiação UV-A, a qual degradação apenas 10% do composto após 48 horas.

O produto de degradação formado por temperatura foi caracterizado e sua estrutura proposta, conforme figura abaixo.

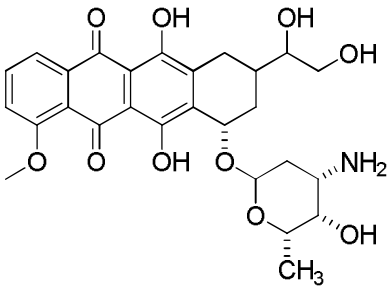


Figura 31 – Estrutura molecular proposta para o produto de termodegradação da doxorrubicina

As tabelas seguir trazem os resultados compilados de todas as condições avaliadas durante o estudo.

Tabela 16 - Resultados das degradações da DOX padrão

Ensaio	Condição	Temperatura	Tempo	Degradação
NaOH	0,01 mol.L^{-1}	-	1 h	100%
HCl	0,01 mol.L^{-1}	-	23 h	-
HCl	0,1 mol.L^{-1}	50°C	1 h	43%
H_2O_2	30%	-	5 h	25%
H_2O_2	30%	-	48 h	100%
H_2O_2	3%	-	5 h	25%
H_2O_2	3%	-	48 h	85%
Temperatura	-	50°C	48 h	26%
Luz branca	4,0 kluz	25°C	48 h	32%
UV-A	1,0 W/m²	25°C	48 h	10%

Tabela 17 - Resultados das degradações do medicamento

Ensaio	Condição	Temperatura	Tempo	Degradação
NaOH	0,01 mol.L^{-1}	-	1 h	100%
HCl	0,01 mol.L^{-1}	-	5 h	-
HCl	0,1 mol.L^{-1}	50°C	1 h	92%
H_2O_2	30%	-	5 h	24%
H_2O_2	30%	-	48 h	78%
H_2O_2	3%	-	5 h	25%
H_2O_2	3%	-	48 h	89%
Temperatura	-	50°C	48 h	20%
Luz branca	4,0 kluz	25°C	48 h	23%
UV-A	1,0 W/m²	25°C	48 h	10%

A análise do medicamento após expirado seu prazo de validade identificou o produto de degradação térmica como sendo a principal impureza presente no medicamento. Com isso, conclui-se que a temperatura é um fator muito importante para a degradação da DOX e, portanto, deve ser controlada ao longo do tempo de vida do medicamento.

Os estudos de toxicidade realizados indicaram que a única amostra capaz de causar morte celular de células mononucleares foram as que continham os produtos de degradação térmica. Este dado enfatiza a importância do controle da temperatura para o produto. Além disso, a avaliação *in silico* da mutagenicidade do principal produto de degradação da DOX indicou alta probabilidade deste possuir características mutagênicas, assim como a DOX.

Por fim, o presente trabalho desenvolveu um novo método indicativo de estabilidade para o antineoplásico cloridrato de doxorrubicina, o qual poderá ser empregado pelas indústrias detentoras deste medicamento para avaliar as amostras dos estudos de estabilidade e melhor prever a formação de impurezas não desejadas. Além disso, através deste método, foi possível identificar a principal via de degradação do medicamento como sendo a via térmica, capaz de formar um produto de degradação caracterizado e qualificado como tóxico para células mononucleares e provável mutagênico pelo teste de Ames.

7. *REFERÊNCIAS*[i]

1. BRASIL. Presidência da República. Casa Civil. Subchefia para Assuntos Jurídicos. 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.

2. BERRIDGE, J C. **Impurities in drug substance and drug product**: new approaches to quantification and qualification. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, v.14, p. 7-12, 1995.

3. INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION (ICH) – **Q3A (R2) - Impurities in New Drug Substances**, v.4, 2006.

4. INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION (ICH) – **Q3B (R2) - Impurities in New Drug Products**, v.4, 2006.

5. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **RDC nº 58**, 20 de dezembro de 2013. Diário Oficial da União, nº 248, de 23 de dezembro de 2013. Seção 1, p. 127.

6. INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION (ICH) – **Q3C (R5) – Impurities: Guideline for Residual Solvents**, step 4, 2011.

7. INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION (ICH) – Draft Consensus Guideline – M7 – **Assessment and control of DNA reactive (mutagenic) impurities in pharmaceuticals to limit potential carcinogenic risk.** Step 2, fev.2013.

8. JACOBSON-KRAM, D. and McGOVERN, T. **Toxicological overview of impurities in pharmaceutical products.** Advanced Drug Delivery Reviews, v. 59, p. 38-42, 2007.

9. AHUJA, S. **Assuring quality of drugs by monitoring impurities**. Advanced Drug Delivery Reviews, USA, v. 59, p. 3-11, 2007.

10. KLICK, S., MUIJSELAAR, P.G., WATERVAL, J. **Toward a generic approach for stress testing of drug substances and drug products.** Pharmaceutical Technology, fev. 2005. Disponível em <www.pharmtech.com>

11. KOVALESKI, J., KRAUT, B., MATTIUZ,A. *et al.* **Impurities in generic pharmaceutical development.** Advanced Drug Delivery Reviews, v. 59, p. 56-63, 2007.

12. DOLAN, J.W. **Stability indicating assays.** LCGC North America, v. 20(4), p.346–349, 2002.

13. ALSANTE, K. M., HATAJIK, T. D., LOHR, L. L. E SHARP, T. R. **Isolation and identification of process related impurities and degradation products from pharmaceutical drug candidates, Part I.** Pfizer Global Research & Development Division, Analytical Research and Development Department—Groton, Connecticut.

14. INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION (ICH) – S2 (R1) – **Guidance on genotoxicity testing and data interpretation for pharmaceuticals intended for human use,** Nov. 2011.

15. KRUHLAK, N. L., CONTRERA, J. F., BENZ, R. D., MATTHEW, E. J. **Progress in QSAR toxicity screening of pharmaceuticals impurities and other FDA regulated products. A**dvanced Drug Delivery Reviews, v. 59, p. 43 – 55, 2007.

16. DEARDEN, J. C. ***In silico* prediction of drug toxicity.** Journal of Computer-Aided Molecular Design, v. 17, p. 119–127, 2003.

17. MÜLLER, L. *et al.* **A rationale for determining, testing, and controlling specific impurities in pharmaceuticals that possess potential for genotoxicity.** Regulatory Toxicology and Pharmacology, v. 44, p. 198–211, 2006.

18. BINASCHI, M., BIGIONI, M., CIPOLLONE, A., ROSSI, C., GOSO, C., MAGGI, C.A., CAPRANICO,G. E ANIMATI, F. **Anthracyclines: Selected New Developments. C**urrent Medicinal Chemistry – Anti-Cancer Agents, v. 1, p. 113-130, 2001.

19. KEIZER, H. G., PINEDO, H. M., SCHUURHUIS, G. J. e JOENJE, H. **Doxorubicin (adriamycin): a critical review of free radical-dependent mechanisms of cytotoxicity.** Pharmacology and Therapeutics, v. 47, p. 219-231, 1990.

20. MEDICAMENTO: cloridrato de doxorrubicina. Farmacêutica Responsável:confidencial. Barueri:confidencial. Bula de remédio.

21. BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA). **Estimativa 2012:** incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro, 2011. Disponível em < http://www1.inca.gov.br/estimativa/2012/estimativa20122111.pdf>

22. LAZO, J.S. **Goodman & Gilman. As bases farmacológicas da terapêutic*a,*** ed. Mcgraw-hill Interamericana, v. 11, 2007.

23. IARC – Internacional Angency for Research on Cancer – IARC Monographs Supplement 7 - Adriamycin Monography (Group 2A).

24. CIELECKA-PIONTEKA, J., JELINSKAA, A., ZAJACA, M., SOBCZAKA, M., BARTOLDA, A., OSZCZAPOWICZB, I. **A comparison of the stability of doxorubicin and daunorubicin in solid state.** Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, v. 50, p. 576–579, 2009.

25. BOSANQUET, A. G. **Stability of solutions of antineoplastic agents during preparation and storage for in vitro assays.** Cancer Chemotherapy and Pharmacology, v. 17, p. 1-10, 1986.

26. MARTIN, M. M. AND LINDQVIST, L. **The pH dependence of fluorescein fluorescence.** Journal of Luminescence, v.10, p. 381-390, 1975.

27. DHAMI, S., DE MELLO, A. J., RUMBLES, G., BISHOP, S. M., PHILLIPS, D., BEEBY, A. **Phthalocyanine fluorescence at high concentration: dimers or reabsorption effect?** Photochemistry and Photobiology, v.61 (4), p. 341-346, 1995.

28. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – **Resolução RE nº 899**, de 29 de maio de 2003. Diário Oficial da União, de 02 de junho de 2003. Seção 1, p. 56.

29. DUBOIS D., DUBOIS E.F. **A formula to estimate the approximate surface area if height and weight be known.** Arch. Intern. Med., v.17, p.862, 1916.

30. MOSMANN, T. **Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays.** Journal of Immunological Methods, v. 65, p. 55-63, 1983

31. SILVERSTEIN, R.M., WEBSTER, F.X. E KIEMLE, D.J. **Spectrometric identification of organics compounds.** 7ªed. Nova Iorque: College of Environmental Science and Forestry, 2005.

32. GOOD, N. E., WINGET, G. D., WINTER, W, CONNOLLY, T. N., IZAWA, S., SING, S. M. M. **Hydrogen ion buffers for biological research**. Biochemistry, v. 5(2), p. 467-477, fev 1966.

33. BARENHOLZ, Y., AMSELEM, S., GOREN, D., COHEN, R., GELVAN, D., SAMUNI, A., GOLDEN, E. B., GABIZON, A. **Stability of liposomal doxorubicin formulations: problems and prospects.** Medicinal Research Reviews, v. 13 (4), p. 449-491, 1993.

34. AGRAWAL, P., BARTHWAL, S.K., BARTHWAL, R. **Studies on self-aggregation of anthracycline drugs by restrained molecular dynamics approach using nuclear magnetic resonance spectroscopy supported by absorption, fluorescence, diffusion ordered spectroscopy and mass spectrometry.** European Journal of Medicinal Chemistry, v. 44, p. 1437–1451, 2009.

35. ANAND R., OTTANI S., MANOLI F., MANET I. E MONTI S. **A close-up on doxorubicin binding to c-cyclodextrin: an elucidating spectroscopic, photophysical and conformational study.** RSC Advances, v. 2, p. 2346–2357, 2012.

36. LAKOWICZ, J. R. **Principles of Fluorescence Spectroscopy.** 3ªed. Baltimore: University of Maryland School of Medicine, 2006.

37. BAERTSCHI, S.W. (Ed.). **Pharmaceutical Stress Testing:** Predicting Drug Degradation. 2ªed. V.210. Nova Iorque: Informa Healthcare, 2011.

38. SNYDER, L.R, KIRKLAND, J.J., DOLAN, J.W. **Introduction to Modern Liquid Chromatography.** 3ªed. New Jersey: John Wiley & Sons, 2010.

39. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Informe Técnico nº 1** de 15 de julho de 2008.

40. ALSANTE, K., MARTIN, L., BAERTSCHI, S.W. **A Stress Testing Benchmarking Study**. Pharmaceutical Technology, fev. 2003. Disponível em: < http://www.pharmtech.com/pharmtech/data/articlestandard/pharmtech/082003/47384/article.pdf>. Acesso em: 13 fev. 2012.

41. SINGH, S. e BAKSHI, M. **Guidance on conduct of stress tests to determine inherent stability of the drug.** Pharmaceutical Technology On-Line, 2000.

42. PAVIA, D.L., LAMPMAN, G.M., KRIZ, G.S. **Introduction to spectroscopy:** a guide for students of organic chemistry. 3ªed. Washington: Department of Chemistry, Western Washington University, 2001.

43. JANSSEN, M.J.H., CROMMELIN, D.J.A., STORM, G., HULSHOFF, A. **Doxorubicin decomposition on storage. Effect of pH, type of buffer and liposome encapsulation.** International Journal of Pharmaceutics, v. 23, p.1-11, 1985.

44. WASSERMANN K., BUNDGAARD H. **Kinetics of the acid-catalyzed hydrolysis of doxorubicin.** International Journal of Pharmaceutics, v. 14, p. 73-8, 1983.

45. WIRTH, D. D., BAERTSCHI, S. W., JOHNSON, R. J., MAPLE, S. R.,MILLER, M. S., HALLENBECK, D. K. E GREGG, S. M. **Maillard Reaction of Lactose and Fluoxetine Hydrochloride, a Secondary Amine.** Journal of Pharmaceutical Science, v. 87 (1), 1997.

46. BEIJNEN J.H., VAN DER HOUWEN O.A.G.J, UNDERBERG W.J.M. **Aspects of the degradation kinetics of doxorubicin in aqueous solution.** International Journal of Pharmaceutics, v. 32, p. 123-31. 1986.

47. ANDERSEN, A., HOLTE, H., SLÙRDAL, L. **Pharmacokinetics and metabolism of doxorubicin after short-term infusions in lymphoma patients.** Cancer Chemother Pharmacol, v. 44, p. 422-426, 1999

48. SOKOLOVE PM. **Interactions of Adriamycin aglycones with mitochondria may mediate Adriamycin cardiotoxicity.** International Journal of Biochemistry, v.26, p. 1341-50, 1994.

49. KENNON, L. **Use of models in determining chemical pharmaceutical stability.** Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 53 (7), p. 815–818, julho de 1964.

50. REYNOLDS, D.W., FACCHINE, K.L., MULLANEY, J.F., ALSANTE, K.M., HATAJIK, T.D. E MOTTO, M.G. **Available Guidance and Best Practices for Conducting Forced Degradation Studies.** Pharmaceutical Technology, v. 26, p.48-54, 2002.

51. ALSANTE K.M., ANDO A., BROWN R., et al. **The role of degradant profiling in active pharmaceutical ingredients and drug products.** Advanced Drug Delivery Reviews, v. 59, p. 29-37, 2007.

52. KLEINMAN, M.H., SMITH, M.D., KURALI, E., KLEINPETER, S., JIANG, K., ZHANG, Y., KENNEDY-GABB, S.A., LYNCH, A.M., GEDDES, C.D. **An evaluation of chemical photoreactivity and the relationship to phototoxicity.** Regulatory Toxicology and Pharmacology, v. 58, p. 224–232, 2010.

53. WILLIAMS, B.A. E TRITTON, T.R. **Photoinactivation of anthracyclines.** Photochemistry and Photobiology, v. 34 (1), p. 131–134, 1981.

54. BOMGAARS, L., GUNAWARDENA, S., KELLEY, S.E., RAMU, A. **The inactivation of doxorubicin by long ultraviolet light.** Cancer Chemother Pharmacol, v. 40, p. 506-512, 1997.

55. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Curso validação e incerteza na medição analítica.** Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/0ab34b00474579a486b4d63fbc4c6735/validacao_incertezas_pierre_2.pdf?MOD=AJPERES. Acesso em: 28 de julho de 2012.

56. AMES, B.N., MCCANN, J., YAMASAKI, E. **Methods for detecting carcinogens and mutagens with Salmonella/Mammalian-microsome mutagenicity test.** Mutation research, v.31, p.347-364, 1975.

57. KENYON, M.O, CHEUNG, J.R., DOBO, K.L., KU, W.W. **An evaluation of the sensitivity of the Ames assay to discern low-level mutagenic impurities.** Regulatory Toxicology and Pharmacology, v. 48, p. 75–86, 2007.

58. NURGALIEVA, Z., LIU, C., DU, X.L. **Chemotherapy use and risk of bone marrow suppression in a large population-based cohort of older women with breast and ovarian cancer.** Med Oncol, v. 28, p. 716–725, 2011.

59. BHINGE, N.K., GUPTA, V., HOSAIN, S.B., SATYANARAYANAJOIS, S.D., MEYER, S.A., BLAYLOCK, B., ZHANG, Q., LIU, Y. **The opposite effects of doxorubicin on bone marrow stem cells versus breast cancer stem cells depend on glucosylceramide synthase.** The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, v. 44, p. 1770–1778, 2012.

60. CALCAGNO A.M., SALCIDO C.D., GILLET J.P., WU C.P., FOSTEL J.M., MUMAU M.D., GOTTESMAN M.M., VARTICOVSKI L., AMBUDKAR S.V. **Prolonged drug selection of breast cancer cells and enrichment of cancer stem cell characteristics.** J Natl Cancer Inst., v. 102(21), p.1637-52, 2010.

61. DESSYPRIS, E.N., BRENNER, D.E. AND HANDE, K.R. **Toxicity of Doxorubicin Metabolites to Human Marrow Erythroid and Myeloid Progenitors In Vitro.** Cancer Treat Rep, v. 70, p, 487-490, 1986.

62. WADA, R., HYON, S.-H, IKADA, Y. **Lactic acid oligomer microspheres containing hydrophilic drugs.** Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 79, October 10th, 1990.

63. BANDAK, S. RAMU, A., BARENHOLZ, Y., GABIZON, **A. Reduced UV-induced degradation of doxorrubicinencapsulated in polyethyleneglycol-coated liposomes.** Pharmaceutical Research, v.16 (6), p. 841-846, 1999.

64. INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION (ICH) – Q1B – **Stability Testing: Photostability Testing of New Drug Substances and Products**, v.4, 1996.

65. BARTH, H. G., CONNER, A. Z. **Determination of doxorubicin hydrochloride in pharmaceutical preparations using high-pressure liquid chromatography**. Journal of Chromatography, v. 131, p. 375-38, 1997.

66. EKSBORG, S. **Reversed-phase liquid chromatography of adriamycin and daunorubicin and their hydroxyl metabolites adriamycinol and daunorubicinol.** Journal of Chromatography, v. 149, p. 225-232, 1978.

67. ___ EHRSSON, H., ANDERSSON, I. **Reversed-phase liquid chromatographic determination of plasma levels of adriamycin and adriamycinol.** Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications, v. 164, p. 479-86, 1979.

68. SEPANIAK, M.J., YEUNG, E.S. **Determination of adriamycin and daunorubicin in urine by high-performance liquid chromatography with laser fluorometric detection.** Journal of Chromatography A, v. 190, p. 377-83, 1980.

69. VAN LANCKER, M.A., NELIS, H.J.C.F., DE LEENHEER, A.P. **Reversed-phase ion-pair chromatography of anthracyclines.** Journal of Chromatography A, v. 254, p. 45-52, 1983.

70. CUMMINGS, J., STUART, J.F.B., CALMAN, K.C. **Determination of adriamycin, adriamycinol and their 7-deoxy aglycones in human serum by high-performance liquid chromatography.** Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications, v. 311, p. 125-33, 1984.

71. COX, S.K., WILKE, A.V., FRAZIER, D. **Determination of adriamycin in plasma and tissue biopsies.** Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications, v. 564, p. 322-9, 1991.

72. NICHOLLS, G., CLARK, B.J., BROWN, J.E. **Solid-phase extraction and optimized separation of doxorubicin, epirubicin and their metabolites using reversed-phase high-performance liquid chromatography.** Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, v. 10, p. 949-57, 1992.

73. ROSSI, D.T., PHILLIPS, B.A., BALDWIN, J.R., NARANG, P.K. **Improved methodology for subnanogram quantitation of doxorubicin and its 13-hydroxy metabolite in biological fluids by liquid chromatography.** Anal Chim Acta, v. 271, p. 59-68, 1993.

74. CASTEGNARO, M., DE MÉO, M., LAGET, M., *et al.* **Chemical degradation of wastes of antineoplastic agents.** International Archives of Occupational and Environmental Health, v.70, p. 378-84, 1997.

75. VAN ASPEREN, J., VAN TELLINGEN, O., BEIJNEN, J.H. **Determination of doxorubicin and metabolites in murine specimens by high-performance liquid chromatography.** Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications, v. 712, p. 129-43, 1998.

76. ZHAO, P., DASH, A.K. **A simple HPLC method using a microbore column for the analysis of doxorubicin.** Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, v. 20, p. 543-8, 1999.

77. LACHÂTRE, F., MARQUET, P., RAGOT, S., GAULIER, J.M., CARDOT, P., DUPUY, J.L. **Simultaneous determination of four anthracyclines and three metabolites in human serum by liquid chromatography–electrospray mass spectrometry.** Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications, v. 738, p. 281-91, 2000.

78. LOADMAN, P.M., CALABRESE, C.R. **Separation methods for anthraquinone related anti-cancer drugs.** Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications, v. 764, p. 193-206, 2001.

79. ZHOU, Q., CHOWBAY, B. **Determination of doxorubicin and its metabolites in rat serum and bile by LC: application to preclinical pharmacokinetic studies.** Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, v. 30, p. 1063-74, 2002.

80. LARSON, R.R., KHAZAELI, M.B., DILLON, H.K. **Development of an HPLC Method for Simultaneous Analysis of Five Antineoplastic Agents.** Applied Occupational and Environmental Hygiene, v. 18, p. 109-19, 2003.

81. ARNOLD, R.D., SLACK, J.E., STRAUBINGER, R.M. **Quantification of Doxorubicin and metabolites in rat plasma and small volume tissue samples by liquid chromatography/electrospray tandem mass spectroscopy.** Journal of Chromatography B, v. 808, p. 141-52, 2004.

82. GILBERT, C.M., MCGEARY, R.P., FILIPPICH, L.J., NORRIS, R.L.G., CHARLES, B.G. **Simultaneous liquid chromatographic determination of doxorubicin and its major metabolite doxorubicinol in parrot plasma.** Journal of Chromatography B, v. 826, p. 273-6, 2005.

83. MAHNIK, S.N., RIZOVSKI, B., FUERHACKER, M., MADER, R.M. **Development of an analytical method for the determination of anthracyclines in hospital effluents.** Chemosphere, v. 65, p. 1419-25, 2006.

84. DiFRANCESCO, R., GRIGGS, J.J., DONNELLY, J., DiCENZO, R. **Simultaneous analysis of cyclophosphamide, doxorubicin and doxorubicinol by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry.** Journal of chromatography B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences, v. 852, p. 545-53, 2007.

85. SOTTANI, C., RINALDI, P., LEONI, E., *et al.* **Simultaneous determination of cyclophosphamide, ifosfamide, doxorubicin, epirubicin and daunorubicin in human urine using high-performance liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry: bioanalytical method validation.** Rapid Communications in Mass Spectrometry, v. 22, p. 2645-59, 2008.

86. WANG, J., REIJMERS, T., CHEN, L., *et al.* **Systems toxicology study of doxorubicin on rats using ultra performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry based metabolomics.** Metabolomics, v. 5, p. 407-18, 2009.

87. SAKAI-KATO, K., SAITO, E., ISHIKURA, K., KAWANISHI, T. **Analysis of intracellular doxorubicin and its metabolites by ultra-high-performance liquid chromatography.** Journal of Chromatography B, v. 878, p. 1466-70, 2010.

88. CHEMICALIZE.ORG[beta]. Produzido por ChemAxon. Disponível em <www.chemicalize.org>

89. COLLINS, C.H., BRAGA, G.L., BONATO, P.S. **Fundamentos de cromatografia.** Campinas: Editora da UNICAMP, 2006. 452p.

90. TONNESEN, H. H. **Formulation and stability testing of photolabile drugs.** International Journal of Pharmaceutics, v. 225, p. 1 – 14, 2001.

91. BAERTSCHI, S. W., ALSANTE, K., TONNESEN, H. H. **A Critical Assessment of the ICH Guideline on Photostability Testing of New Drug Substances and Products (Q1B)**: Recommendation for Revision. USA, 2009. Disponível em: <www.interscience.wiley.com>. DOI 10.1002/jps.22076. Acesso em: 06 jun. 2011.

92. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Resolução RE nº 1 de 29 de julho de 2005 – Guia para realização de Estudos de Estabilidade**. Diário Oficial da União, 01 ago. 2005.

93. INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION (ICH) – **Q1A(R2) – Stability Testing of New Drug Substances and Products.** V.4, 2003.

94. WATERMAN, K. C., ADAMI, R. C., ALSANTE, K., *et al.* **Hydrolysis in Pharmaceutical Formulations**. Pharmaceutical Development Technology, v. 7(2), p. 133-146, 2002.

95. UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ). **Publicação destinada ao ensino de ciências** – Química. Disponível em: < http://ce.esalq.usp.br/arquimedes/Atividade09.pdf>. Acesso em: 15 fev. 2012.

96. SMITH, R. J. AND WEBB, M. L. **Analysis of drug impurities**. UK: Blackwell Publishing, 2007, 275p. (Analytical Chemistry). Bibliografia: p. 1. ISBN 978-14051-3358-6.

97. BAERTSCHI, S. W., THATCHER, S. R. **Pharmaceutical Photostability and Stabilization Technology**. 1ªed. 2006. 470p. ISBN: 9781420014136

98. INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION (ISO). **Photography - Processed Photographic Colour Films and Paper Prints - Methods for Measuring Image Stability.** ISO 10977. Geneve, Switzerland, 1993 .

99. CONNORS, K.A., AMIDON, G.L., STELLA, V.L. **Chemical Stability of Pharmaceutical**: A Handbook for Pharmacists. 2ª ed. Nova Iorque: Wiley and Sons, 1986.

100. WATERMAN, K.C., ADAMI, R.C. **Accelerated aging:** Prediction of chemical stability of pharmaceuticals. International Journal of Pharmaceutics, v. 293, p. 101–125, 2005.

101. HEIDEMANN, D. R., JAROSZ, P. J. **Preformulation studies involving moisture uptake in solid dosage forms.** Pharmaceutical Research, v. 8 (3), 1991.

102. ARNOLD, R. D., SLACK, J. E., STRAUBINGER, R. M. **Quantification of Doxorubicin and metabolites in rat plasma and small volume tissue samples by liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry.** Journal of Chromatography B, v. 808, p. 141-152, 2004.

103. QIU, F., NORWOOD, D. L. **Identification of Pharmaceutical Impurities**. Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies, USA, v. 30 (5-7), p. 877-935, 2007.

104. Suzuki, J.H. **Impurezas em medicamentos: análise crítica sobre a atual situação brasileira.** 2013. 22f. Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia-Bioquímica – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

[i] De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 6023.