UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Farmácia (Fisiopatologia e Toxicologia)
Área de Toxicologia

Estudo de degradação forçada e caracterização das principais
impurezas da cápsula líquida de ibuprofeno por LC-MS-QTOF

Fernanda Fernandes Farias

Dissertação para obtenção do Título de Mestre
Orientador: Prof. Dr. Ernani Pinto Junior

São Paulo
2020

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Farmácia (Fisiopatologia e Toxicologia)
Área de Toxicologia

Estudo de degradação forçada e caracterização das principais
impurezas da cápsula líquida de ibuprofeno por LC-MS-QTOF

Fernanda Fernandes Farias

Versão corrigida da Dissertação conforme resolução CoPGr 6018

Dissertação para obtenção do Título de Mestre
Orientador: Prof. Dr. Ernani Pinto Junior

São Paulo
2020

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

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

224e Farias, Fernanda Fernandes
Estudo de degradação forçada e caracterização das principais impurezas da cápsula líquida de ibuprofeno por LC-MS-QTOF / Fernanda Fernandes Farias. - São Paulo, 2020.
131 p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas.
Orientador: Pinto, Ernani

1. Produtos de degradação. 2. Ibuprofeno. 3. Degradação Forçada. 4. Caracterização de impurezas. I. T. II. Pinto, Ernani, orientador.

Fernanda Fernandes Farias

Estudo de degradação forçada e caracterização das principais
impurezas da cápsula líquida de ibuprofeno por LC-MS-QTOF

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do Título de Mestre

Prof. Dr. Ernani Pinto Junior
orientador/presidente

1º. examinador

2º. examinador

3º. examinador

4º. examinador

São Paulo, ____ de _____ de 2020.

*"Tudo aquilo que o homem ignora não existe para ele.
Por isso o universo de cada um se resume ao tamanho de seu saber".*

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo pelo ensino de excelência e por colocar à disposição a área experimental e o laboratório.

Ao Instituto Adolfo Lutz pela oportunidade de me capacitar profissionalmente e assim poder contribuir com os conhecimentos adquiridos.

Ao professor Ernani Pinto Junior pelo acolhimento, orientação e confiança demonstrada durante o desenvolvimento desse trabalho. Sou muito grata pela sua calma e compreensão, principalmente em relação ao tempo conciliado entre o projeto e meu trabalho como pesquisadora.

À minha chefe Luz Marina Trujillo, diretora do Núcleo de Ensaios Físicos e Químicos em Medicamentos (NFQM) do Instituto Adolfo Lutz por permitir a realização do meu mestrado. Obrigada pela compreensão de sempre, pelo incentivo com sua experiência, pelo apoio, pelas ideias que me fazem enxergar novos caminhos, pelo interesse no trabalho desenvolvido, pelas conversas, por tudo, sou muito grata.

À pesquisadora Valéria Adriana Pereira Martins, pela colaboração científica, pelas sugestões, por compartilhar seus conhecimentos, me auxiliar, me ouvir, pelo carinho e dedicação a todos do NFQM.

Às pesquisadoras Helena Miyoco Yano e Blanca Elena Ortega Markman por contribuírem com a minha formação científica no Instituto Adolfo Lutz, pelo exemplo de luta e paixão à pesquisa, pela colaboração e incentivo na carreira científica.

A todos os colaboradores do Núcleo de Ensaios Físicos e Químicos em Medicamentos do Instituto Adolfo Lutz, pelo auxílio durante a realização dessa pesquisa. Em especial a Beth, Edilene, Marcos, Fernando, que por vezes me ajudaram no preparo da fase móvel.

A amizade dos colaboradores do NBS e do NFQC, em especial da Ellen que compartilhou comigo, quase que no mesmo período, a realização do mestrado.

Aos amigos do LTPNA pela amizade e conhecimentos adquiridos. Aos Felipes, o Dorr pela colaboração, explicação e dedicação na execução das análises em espectrometria de massas, e o Garcia por ser sempre muito solícito, me ajudando com conselhos e questões burocráticas. Agradeço também à Fernanda, Eryka, Rhuana, Mariana e Vanessa, exemplos da força feminina na ciência.

À Mariah Ultramari pela disponibilidade em ajudar, por compartilhar seus conhecimentos específicos do tema, durante e após a qualificação.

Ao professor Dr. Mauricio Yonamine, por aceitar participar de minha qualificação e contribuir com seus conhecimentos.

Ao professor Dr. Humberto, por disponibilizar o uso da câmara de fotoestabilidade de seu laboratório, com auxílio da Nayara, que foi tão solícita.

Aos meus pais Vera e Roberto pela educação prestada, apoio, amor e dedicação. Agradeço por terem me proporcionado condições para eu conseguir estudar, pelo investimento, por terem acreditado em mim, por estarem ao meu lado, me incentivando e mostrando os melhores caminhos da vida.

À minha irmã Flávia, pelo amor, apoio, conselhos e preocupação de sempre.

Agradeço minha avó querida, Lucilla, pela generosidade, pelo carinho, pelo auxílio em minha criação e por ter transmitido valores que busco conservá-los. Aos meus avós Antônio, Josefina e Anibal *in memoriam* por terem colaborado com uma infância tão feliz e também aos meus primos e tios.

À Vanessa Comandini pela amizade, compreensão, companheirismo e por tornar os dias mais leves com seu bom humor.

À Vanessa Martins, pela amizade e companhia de todos os dias. Ao Vitor pela amizade e por providenciar alguns excipientes do placebo. À Thais, Júlia, Thiago, Gabriel, pela amizade sincera de tantos anos, parceria, finais de semana, viagens e a tantos outros e queridos amigos. Com vocês a vida é bem mais divertida!

RESUMO

FARIAS, Fernanda Fernandes. **Estudo de degradação forçada e caracterização das principais impurezas da cápsula líquida de ibuprofeno por LC-MS-QTOF.** 2020. 131f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

A indústria farmacêutica, os laboratórios públicos e os privados de análises em medicamentos têm se mobilizado para atender a norma RDC Nº 53/2015 da ANVISA, que estabelece parâmetros para a notificação, identificação e qualificação dos produtos de degradação. Esta é uma questão de saúde pública, uma vez que a instabilidade gera produtos de degradação que podem estar relacionados à ineficácia terapêutica ou à exposição do consumidor a seus efeitos potencialmente tóxicos. O ibuprofeno é um medicamento de venda livre, consumido mundialmente e por vezes de maneira indiscriminada. Embora seja um fármaco largamente estudado, até o momento não foi descrito o estudo de degradação forçada com caracterização de impurezas na apresentação em cápsula líquida, tornando este o principal objetivo do trabalho. Realizou-se estudo de degradação forçada expondo o produto acabado, placebo e padrão às condições estressantes: hidrólise ácida e básica, oxidação, calor seco, fotodegradação, umidade e íons metálicos. Para avaliar os produtos de degradação desenvolveu-se um método indicativo de estabilidade por HPLC/DAD, com coluna Poroshell C18 4,6 x 150 mm, 4 µm, a 25°C, fase móvel composta de ácido fosfórico 0,1% e acetonitrila em gradiente com fluxo a 1mL/min, com tempo de corrida de 25 minutos a 220nm. Para caracterizar as principais impurezas utilizou-se LC-MS-QTOF, com as mesmas condições, com exceção da troca na fase móvel de ácido fosfórico 0,1% por ácido fórmico 0,1%. A principal via de degradação do ibuprofeno observada foi por íons metálicos, porém a maior formação de produtos de degradação foi por calor seco. Observou-se pureza espectral satisfatória para os picos de ibuprofeno. O método demonstrou-se rápido e eficaz para notificação de oito impurezas observadas e caracterizaram-se aquelas acima do limite de identificação. Todas as impurezas identificadas surgiram da interação de ibuprofeno-excipientes, produto da esterificação de ibuprofeno com PEG, ibuprofeno com sorbitol/sorbitan, e da interação de ibuprofeno com

subprodutos do glicerol, este ainda não relatado em literatura. O método desenvolvido pode ser utilizado em diversas áreas farmacêuticas, desde o controle de qualidade de impurezas, estudos de degradação forçada até o desenvolvimento de futuras formulações.

Palavras-chave: Produtos de degradação. Ibuprofeno. Degradação Forçada. Caracterização de impurezas.

ABSTRACT

FARIAS, Fernanda Fernandes. **Study of forced degradation and characterization of the main impurities of ibuprofen soft capsules by LC-MS-QTOF**. 2020. 131f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

The pharmaceutical industry, the public, and the private drug analysis laboratories have been mobilizing to comply with ANVISA's RDC No. 53/2015, which establishes parameters for the reporting, identification, and qualification threshold of degradation products. This is a public health issue since instability generates degradation products and may be related to therapeutic inefficiency or consumer exposure to its potentially toxic effects. Ibuprofen is an over-the-counter medication, consumed worldwide, and sometimes indiscriminately. Although it is a widely studied drug, the study of forced degradation with the characterization of impurities in the liquid capsule presentation has not been described so far, making this the main objective of this study. A forced degradation study was carried out exposing the market product, placebo, and standard to stressful conditions: acidic and basic hydrolysis, oxidation, dry heat, photolytic, humidity, and metal ions. To evaluate the degradation products, an HPLC/DAD stability method was developed, with Poroshell C18 4.6 x 150 mm 4 μ m column at 25°C, a mobile phase of 0.1% phosphoric acid, and acetonitrile in gradient, the flow rate at 1mL/min, with a running time of 25 minutes at 220nm. To characterize the main impurities, LC-MS-QTOF was used, with the same conditions, except for the exchange in the mobile phase of 0.1% phosphoric acid to 0.1% formic acid. The main route of ibuprofen degradation observed was by metal ions, however, the greatest formation of degradation products was by dry heat. Satisfactory spectral purity was observed for ibuprofen peaks. The method proved to be fast and effective to report eight observed impurities and those above the identification threshold were characterized. All impurities identified arose from the interaction of ibuprofen-excipient, a product of the esterification of ibuprofen with PEG, ibuprofen with sorbitol/sorbitan, and from the interaction of ibuprofen with glycerol by-products, which has not yet been reported in the literature. The developed method can be used

in several pharmaceutical areas, from quality control of impurities, forced degradation studies to the development of future formulations.

Keywords: Degradation products. Ibuprofen. Forced Degradation. Characterization of impurities.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Cronologia em paralelo das legislações brasileiras e internacionais específicas para produtos de degradação.....	31
Figura 2 - Estrutura molecular do ibuprofeno.....	47
Figura 3 - pka do ibuprofeno.....	69
Figura 4 - Cromatogramas de padrão e amostra em gradiente exploratório (início de 95% ácido fórmico (0,1%) e acetonitrila (5%). Condições cromatográficas conforme Tabela 10.....	71
Figura 5 - Soluções padrões testadas em modo isocrático com fase móvel ACN: Ác. Fórmico a) 70:30; b) 60:40; c) 50:50. Condições cromatográficas conforme Tabela 10, com redução do tempo de corrida.....	72
Figura 6 - Cápsula líquida dentro e fora do blister após exposição térmica de 70°C por 48h.....	73
Figura 7 - Cromatogramas de testes em degradação térmica a 70°C. a) solução padrão em 48h; b) cápsula livremente exposta 48h; c) cápsula em blister 48h.....	73
Figura 8 - Cromatograma e extração dos íons da amostra de ibuprofeno 0,4mg/mL degradação térmica a 70°C por 48h. Condições cromatográficas conforme Tabela 11.....	75
Figura 9 - Cromatograma e extração dos íons da amostra de ibuprofeno 0,4mg/mL degradada com NaOH 1M por 48h. Condições cromatográficas conforme Tabela 11.....	76
Figura 10 - Cromatograma e extração dos íons da amostra de ibuprofeno 0,4mg/mL degradada com HCl 1M por 48h. Condições cromatográficas conforme Tabela 11.....	76
Figura 11 - Absorção máxima em 220 nm para maioria das impurezas com fase móvel constituída de ácido fórmico e acetonitrila.....	79

Figura 12 - Mudança na linha de base devido alteração do comprimento de onda para 220nm e uso da fase móvel ácido fórmico 0,1% e acetonitrila.....	80
Figura 13 - Alteração da fase móvel para ácido fosfórico 0,1% e acetonitrila.....	80
Figura 14 - Zoom do cromatograma exibido na Figura 13.....	81
Figura 15 - Absorção máxima em 220 nm para maioria das impurezas com fase móvel constituída de ácido fosfórico e acetonitrila.....	82
Figura 16 - Representação gráfica das respostas em função da concentração do analito, equação da reta e coeficiente de determinação.....	84
Figura 17 - Sobreposição dos cromatogramas da curva analítica, da menor concentração até a concentração máxima.....	85
Figura 18 - Cromatograma das amostras controles, sem degradação. A: Cromatograma do produto acabado; B: Cromatograma do padrão; C: Cromatograma do placebo; D: Cromatograma do diluente. Ordem por tempo de retenção dos picos encontrados no produto acabado: TRR 0,49; TRR 0,66; TRR 0,68; TRR 0,73; TRR 0,75; TRR 0,83; TRR 0,95.....	86
Figura 19 - Gráfico de pureza espectral do ativo ibuprofeno na amostra controle do produto acabado.....	87
Figura 20 - Cromatograma da degradação por hidrólise ácida. A: Cromatograma do produto acabado; B: Cromatograma do padrão; C: Cromatograma do placebo; D: Cromatograma do diluente. Ordem por tempo de retenção dos picos encontrados no produto acabado: TRR 0,49; TRR 0,68; TRR 0,73; TRR 0,75; TRR 0,95.....	88
Figura 21 - Gráfico de pureza espectral do ativo ibuprofeno por hidrólise ácida no produto acabado.....	89
Figura 22 - Cromatograma da degradação por hidrólise básica. A: Cromatograma do produto acabado; B: Cromatograma do padrão; C: Cromatograma do placebo; D: Cromatograma do diluente. Ordem por tempo de retenção dos picos encontrados no produto acabado: TRR 0,49; TRR 0,66; TRR 0,68; TRR 0,73; TRR 0,75; TRR 0,95.....	90

Figura 23 - Gráfico de pureza espectral do ativo ibuprofeno por hidrólise básica no produto acabado.....	91
Figura 24 - Cromatograma da degradação por oxidação. A: Cromatograma do produto acabado; B: Cromatograma do padrão; C: Cromatograma do placebo; D: Cromatograma do diluente. Ordem por tempo de retenção dos picos encontrados no produto acabado: TRR 0,49; TRR 0,66; TRR 0,68; TRR 0,73; TRR 0,75; TRR 0,95.....	92
Figura 25 - Gráfico de pureza espectral do ativo ibuprofeno por oxidação no produto acabado.....	93
Figura 26 - Formação dos produtos de degradação IBEP e IBAP a partir do ibuprofeno, por fotólise.....	94
Figura 27 - Cromatograma da fotodegradação ciclo 1. A: Cromatograma do produto acabado; B: Cromatograma do padrão; C: Cromatograma do placebo; D: Cromatograma do diluente. Ordem por tempo de retenção dos picos encontrados no produto acabado: TRR 0,49; TRR 0,66; TRR 0,68; TRR 0,73; TRR 0,75; TRR 0,95.....	95
Figura 28 - Cromatograma da fotodegradação ciclo 2. A: Cromatograma do produto acabado; B: Cromatograma do padrão; C: Cromatograma do placebo; D: Cromatograma do diluente. Ordem por tempo de retenção dos picos encontrados no produto acabado: TRR 0,49; TRR 0,66; TRR 0,68; TRR 0,73; TRR 0,75; TRR 0,95; TRR 1,28.....	96
Figura 29 - Gráfico de pureza espectral do ativo ibuprofeno por fotodegradação no ciclo 1 do produto acabado.....	97
Figura 30 - Gráfico de pureza espectral do ativo ibuprofeno por fotodegradação no ciclo 2 do produto acabado.....	97
Figura 31 - Cromatograma da degradação por calor seco. A: Cromatograma do produto acabado; B: Cromatograma do padrão; C: Cromatograma do placebo; D: Cromatograma do diluente. Ordem por tempo de retenção dos picos encontrados no	

produto acabado: TRR 0,49; TRR 0,66; TRR 0,68; TRR 0,73; TRR 0,75; TRR 0,95.....99

Figura 32 - Gráfico de pureza espectral do ativo ibuprofeno por degradação por calor do produto acabado.....100

Figura 33 - Cromatograma da degradação por umidade. A: Cromatograma do produto acabado; B: Cromatograma do padrão; C: Cromatograma do placebo; D: Cromatograma do diluente. Ordem por tempo de retenção dos picos encontrados no produto acabado: TRR 0,49; TRR 0,66; TRR 0,68; TRR 0,73; TRR 0,75; TRR 0,95.....101

Figura 34 - Gráfico de pureza espectral do ativo ibuprofeno por degradação de umidade do produto acabado.....102

Figura 35 - Cromatograma da degradação por íons metálicos. A: Cromatograma do produto acabado; B: Cromatograma do padrão; C: Cromatograma do placebo; D: Cromatograma do diluente. Ordem por tempo de retenção dos picos encontrados no produto acabado: TRR 0,75; TRR 0,95.....103

Figura 36 - Gráfico de pureza espectral do ativo ibuprofeno da degradação por íons metálicos do produto acabado.....104

Figura 37 - Comparação entre a injeção de ibuprofeno IFA 0,16mg.mL⁻¹ por HPLC-DAD e a injeção por LC-MS-QTOF.....107

Figura 38 - A) Espectro de massas no modo scan, ionização por ESI⁺ do ibuprofeno no IFA, relação m/z 207,1307; B) Espectro de massas no modo scan, ionização por ESI⁻ do ibuprofeno no IFA, relação m/z 205,1250; C) Espectro de massas no modo scan, ionização por ESI⁺ do ibuprofeno no produto acabado, relação m/z 207,1320; D) Espectro de massas no modo scan, ionização por ESI⁻ do ibuprofeno no produto acabado, relação m/z 205,1248.....108

Figura 39 - Descarboxilação do ibuprofeno, resultando em um íon com m/z aproximada de 161.....109

Figura 40 - Cromatograma pico base (LC-MS-QTOF) do ibuprofeno no produto acabado após 10 dias de degradação térmica a 60°C.....	110
Figura 41 – A) Espectro de massas ESI+ do pico TRR 0,49, com três íons majoritários m/z 353,1970, m/z 335,1867 e m/z 161,1330, destacados em vermelho. B) Espectro de massas ESI+ em MS2 dos picos majoritários.....	112
Figura 42 - Desidratação de sorbitol a sorbitan e isossorbido.....	112
Figura 43 - Formação de Ibu-sorbitol, Ibu-sorbitan e Ibu-isossorbido.....	113
Figura 44 - Espectro de massas ESI+ do pico TRR 0,65, com três íons majoritários m/z 335,1857, m/z 353,1965 e m/z 375,1771, destacados em vermelho. B) Espectro de massas ESI+ em MS2 dos picos majoritários.....	114
Figura 45 - Espectro de massas ESI+ do pico TRR 0,75, com três íons destacados em vermelho de m/z 263,1643, m/z 440,2303 e m/z 448,2179. B) Espectro de massas ESI+ em MS2 dos picos majoritários.....	115
Figura 46 - Hidrogenólise do glicerol com formação de acetol e 3-hidroxipropanal.....	116
Figura 47 - Reação de ibuprofeno com acetol e 3-hidroxipropanal.....	116
Figura 48 - A) Espectro de massas ESI+ do pico TRR 0,95, com três íons destacados em vermelho de m/z 664,4299, m/z 647,4019 e m/z 708,4546. B) Espectro de massas ESI+ em MS2 dos picos majoritários.....	117
Figura 49 - A) Espectro de massas ESI+ do pico TRR 0,95, com três íons destacados em vermelho de m/z 576,3771, m/z 559,3503 e m/z 532,3498. B) Espectro de massas ESI+ em MS2 dos picos majoritários.....	118
Figura 50 - A) Espectro de massas ESI+ do pico TRR 0,95, com três íons destacados em vermelho de m/z 488,3215, m/z 471,2949 e m/z 444,2949 B) Espectro de massas ESI+ em MS2 dos picos majoritários.....	119
Figura 51 - Representação do ibuprofeno ligado a etilenoglicol com perda de água.....	120

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Guias do ICH aplicáveis ao estudo de degradação forçada.....	32
Tabela 2 - Condições analíticas e justificativas para cada estudo de estabilidade....	35
Tabela 3 - Limites de identificação, notificação e qualificação para produtos de degradação.....	36
Tabela 4 - Classificação de impurezas em relação ao potencial mutagênico e carcinogênico e ações de controle resultante.....	37
Tabela 5 - Principais produtos de degradação do ibuprofeno relatados na literatura.....	51
Tabela 6 - Condições cromatográficas finais do MIE para cápsula líquida de ibuprofeno HPLC para estudo de degradação forçada.....	62
Tabela 7 - Condições cromatográficas finais do MIE para cápsula líquida de ibuprofeno no LC-MS-QTOF para caracterização das impurezas.....	63
Tabela 8 - Potência máxima dos excipientes utilizados no preparo do placebo de cápsula líquida.....	64
Tabela 9 - Procedimento de degradação em cada condição no estudo de degradação forçada.....	66
Tabela 10 - Condições cromatográficas em HPLC/DAD para análise de ibuprofeno cápsulas líquidas.....	70
Tabela 11 - Condições cromatográficas testes para LC-MS-QTOF em modo negativo para degradação ácida e básica.....	75
Tabela 12 - Curva analítica com seis concentrações do ativo e suas porcentagens e área do pico correspondente.....	84
Tabela 13 - Tempo de retenção relativo das impurezas desconhecidas encontradas.....	86

Tabela 14 - Resultado da degradação nas condições estressantes em maior período de exposição de ibuprofeno no IFA.....105

Tabela 15 - Mapa geral dos resultados encontrados em porcentagem da degradação do ativo e da formação dos produtos de degradação conforme condições estressantes em maior período de exposição.....105

Tabela 16 - Representação das possíveis massas que poderiam ser encontradas da ligação de ibuprofeno com etilenoglicol no espectro de massas, com destaque em vermelho para as identificadas.....120

Tabela 17 - Composição elementar dos principais íons do espectro de massas dos produtos de degradação de ibuprofeno identificados por LC-MS-QTOF.....121

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ACN	Acetonitrila
AINES	Anti-Inflamatórios Não Esteroides
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATD	Administração Total Diária
BPF	Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos
CAS	Chemical Abstracts Service
COIFA	Coordenação de Registro de Insumos Farmacêuticos Ativos
DAD	Detector por Arranjo de Diodos
DMF	Drug Master File
EMA	European Medicines Agency
FDA	Food and Drug Administration
GESEF	Gerência de Avaliação de Segurança e Eficácia
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HPMC	Hidroximetilpropilcelulose
IAL	Instituto Adolfo Lutz
IBPs	Inibidores da Bomba de Prótons
ICH	Internacional Conference on Harmonisation
IFA	Insumo Farmacêutico Ativo
IM	Impurezas Mutagênicas
INCQS	Instituto Nacional Controle Qualidade em Saúde
IPM	Impurezas Potencialmente Mutagênicas
LACEN	Laboratório Central de Saúde Pública
LC	Cromatografia Líquida
LPTNA	Laboratório de Toxinas e Produtos Naturais de Algas
MIE	Método Indicativo de Estabilidade
NFQM	Núcleo de Ensaios Físicos e Químicos em Medicamentos
OMS	Organização Mundial da Saúde
PEG	Polietilenoglicol
PVP	Polivinilpirrolidona
QSAR	Relação Estrutura-Atividade Quantitativa
MS-QTOF	Espectrômetro de massas do tipo quadrupolo-tempo de voo

RE	Resolução
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RENAME	Relação Nacional de Medicamentos Essenciais
SQR	Substância Química de Referência
TR	Tempo de Retenção
TRR	Tempo de Retenção Relativo
TTC	Threshold of Toxicological Concern
UR	Umidade Relativa
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	23
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	25
2.1. Aspectos da toxicologia relacionada às impurezas.....	25
2.2. Casos relacionados às impurezas em medicamentos.....	26
2.3. Cronologia das principais Legislações Farmacêuticas Brasileiras associadas ao estudo de produtos de degradação.....	28
2.4. Paralelo entre a ANVISA e os guias do ICH.....	30
2.5. Detalhes das Principais Legislações Internacionais.....	31
2.5.1. <i>Diretrizes do International Conference on Harmonisation (ICH).....</i>	<i>31</i>
2.5.2. <i>Diretrizes do European Medicines Agency (EMA).....</i>	<i>32</i>
2.5.3. <i>Diretrizes do Food and Drug Administration (FDA).....</i>	<i>32</i>
2.6. Impurezas e produtos de degradação.....	33
2.7. Estudos de estabilidade.....	34
2.8. Notificação, identificação e qualificação.....	36
2.8.1. <i>Qualificação de impurezas.....</i>	<i>36</i>
2.9. Estudo de degradação forçada.....	38
2.10. Etapas para condução do estudo de degradação forçada.....	40
2.10.1. <i>Pesquisa bibliográfica.....</i>	<i>40</i>
2.10.2. <i>Condução dos ensaios experimentais de degradação forçada.....</i>	<i>41</i>
2.10.3. <i>Hidrólise ácida e básica.....</i>	<i>41</i>
2.10.4. <i>Oxidação.....</i>	<i>42</i>
2.10.5. <i>Fotodegradação.....</i>	<i>42</i>
2.10.6. <i>Degradação térmica.....</i>	<i>43</i>
2.10.7. <i>Íons Metálicos.....</i>	<i>43</i>
2.11. Método indicativo de estabilidade (MIE).....	44
2.11.1. <i>Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas.....</i>	<i>44</i>
2.12. Pureza de pico.....	45
2.13. Balanço de massas.....	46
2.14. Objetos de estudo.....	47
2.14.1. <i>Ibuprofeno.....</i>	<i>47</i>
2.15. Estudos prévios com ibuprofeno e produtos de degradação conhecidos.....	48
2.16. Cápsulas líquidas (cápsula mole).....	53
2.17. Excipiente da formulação da cápsula líquida de ibuprofeno.....	54

3. JUSTIFICATIVA.....	58
4. OBJETIVOS.....	59
4.1. Objetivos gerais.....	59
4.2. Objetivos específicos.....	59
5. MATERIAIS E MÉTODOS.....	60
5.1. Amostras, reagentes e colunas.....	60
5.2. Equipamentos.....	61
5.3. Condições Cromatográficas.....	61
5.4. Preparo do placebo.....	64
5.5. Preparo do diluente e padrão.....	65
5.6. Preparo da amostra.....	65
5.7. Estudos de Degradação Forçada.....	65
5.8. Preparo da curva analítica.....	68
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	69
6.1. Ensaio iniciais.....	69
6.2. Segunda etapa dos ensaios	77
6.2.1. Seleção da coluna cromatográfica.....	77
6.2.2. Seleção do comprimento de onda.....	78
6.2.3. Seleção da fase móvel.....	79
6.2.4. Seleção da temperatura da coluna.....	82
6.2.5. Seleção do gradiente.....	82
6.3. Curva analítica.....	83
6.4. Amostra controle.....	85
6.5. Estudo de degradação forçada.....	87
6.5.1. Degradação por hidrólise ácida.....	87
6.5.2. Degradação por hidrólise básica.....	89
6.5.3. Degradação por oxidação.....	91
6.5.4. Degradação por fotodegradação.....	93
6.5.5. Degradação por calor seco.....	97
6.5.6. Degradação por umidade.....	100
6.5.7. Degradação por íons metálicos.....	102
6.6. Resumo da formação dos produtos de degradação.....	104
6.7. Caracterização das principais impurezas por LC-MS-QTOF.....	106
7. CONCLUSÃO.....	122
REFERÊNCIAS.....	124

1. INTRODUÇÃO

As impurezas presentes nos medicamentos são de conhecimento dos fabricantes há bastante tempo. Entretanto a preocupação com seu potencial toxicológico se intensificou à medida que casos de prejuízo ao paciente foram elucidados e associados a sua presença.

Adicionalmente a indústria farmacêutica, laboratórios públicos e privados de análises em medicamentos têm se mobilizado para atender a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) Nº 53, de 4 de dezembro de 2015 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) que estabelece parâmetros para a verificação de produtos de degradação em medicamentos, para elaboração do perfil de degradação correspondente e para a notificação, identificação e qualificação dos produtos de degradação formados ao longo do prazo de validade do medicamento.

A RDC Nº 53/2015 da ANVISA, baseada em guias do *Internacional Conference on Harmonisation* (ICH), foi elaborada com o intuito de regulamentar o setor, definir métodos mais seletivos e específicos para a determinação de impurezas em medicamentos. Tem a finalidade de instituir melhores práticas a fim de assegurar ainda mais a qualidade dos produtos dispensados a população. Entretanto, a nova adequação tem gerado dúvidas tanto por agentes públicos quanto privados, referentes à sua aplicação.

Embora seja de obrigatoriedade da indústria farmacêutica a realização destes ensaios, cabe aos pesquisadores, seja acadêmicos ou institucionais, promoverem a divulgação científica dos conhecimentos adquiridos com o desenvolvimento de um método indicativo de estabilidade e com os resultados obtidos em estudos de degradação forçada, uma vez que estas informações ficam retidas com o detentor da patente.

Diante deste cenário, este estudo visa contribuir tecnicamente na identificação e caracterização de impurezas em medicamentos. Foi utilizado como objeto de estudo a cápsula líquida de ibuprofeno, um medicamento consumido mundialmente. Realizou-se o estudo de degradação forçada com base na RDC Nº 53/2015, além do desenvolvimento de método indicativo de estabilidade e identificação das principais impurezas presentes, por meio da técnica de cromatografia líquida acoplada à

espectrometria de massas. Assim este trabalho poderá ser utilizado como referência para auxiliar profissionais da área na condução de estudos semelhantes.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Aspectos da toxicologia relacionada às impurezas

A toxicologia enquanto ciência tem a preocupação de estudar efeitos adversos de substâncias químicas aos organismos vivos. Paracelsus, o pai da toxicologia moderna, possui uma constatação clássica de que todas as substâncias são venenos e que somente sua dose o diferencia de um remédio (OGA; CAMARGO; BATISTUZZO, 2014).

Outra consideração da toxicologia é que existem substâncias perigosas, mas que não necessariamente causem um risco, pois este está atrelado à exposição. A partir do momento em que existe o contato com um componente químico, deve-se avaliar qual o limite permitido de exposição, com o intuito de evitar um efeito adverso. Portanto, é necessária uma determinada dose e uma determinada exposição para que se tenha um efeito, uma resposta, seja ela farmacológica ou toxicológica. Neste mesmo princípio baseia-se a ação dos fármacos. O organismo será exposto a uma determinada dose, por um período de tempo e via de administração, para causar uma resposta, seja ela efetiva ou não (OGA; CAMARGO; BATISTUZZO, 2014).

Neste sentido é realizado um paralelo entre os medicamentos e suas impurezas. Um medicamento tem o propósito de trazer um benefício supostamente maior que qualquer prejuízo associado. Entretanto, as impurezas presentes no medicamento não estão associadas a nenhum benefício, mas sim a possíveis malefícios (JOHNSTON; HOLT, 2014).

Diante de tal paradigma, as indústrias, os fabricantes de medicamentos, os órgãos reguladores e fiscalizadores preocupam-se em avaliar, a partir de dados científicos, se os componentes químicos de uma formulação representam um risco suficientemente baixo para serem comercializados com efeitos previsíveis (BRASIL, 2015).

Este propósito de estimar o risco de concentração das impurezas para que seja definido o limite de exposição, sem que haja nenhum risco para saúde humana, é uma preocupação global. Isso porque já aconteceram casos ao redor do mundo de problemas sérios causados pela falta de controle da presença de impurezas em

medicamentos. Alguns causaram apenas efeitos adversos passageiros, outros levaram diversas pessoas a óbito (JOHNSTON; HOLT, 2014).

2.2. Casos relacionados às impurezas em medicamentos

Em 1954, a Alemanha desenvolveu a talidomida prescrita para ansiedade, tensão e náuseas, e muito bem aceita por gestantes da época. Quatro anos depois, em 1958, ela foi introduzida no mercado mundial em 146 países, exceto nos EUA. O Food and Drug Administration (FDA) considerou a necessidade de testes mais aprofundados, devido a ocorrências de neurite periférica e alterações tireoidianas. Após três anos, foi constatado que seu uso durante a gravidez provocava efeitos severos nos recém-nascidos, como a focomelia, síndrome caracterizada pela aproximação ou encurtamento dos membros junto ao tronco do feto, tornando-os semelhantes aos de uma foca (BORGES; FRÖEHLICH, 2003).

O problema estava associado a uma impureza quiral do isômero da talidomida. A atividade terapêutica ocorre por conta do enantiômero *R*-(+), entretanto o enantiômero *S*-(+) é teratogênico. Quando feita esta descoberta, a talidomida já havia sido responsável pelo nascimento de mais de 10 mil crianças com má-formações, levando diversas agências regulatórias a proibir seu uso. No entanto, em 1965, foi constatado o seu efeito benéfico no tratamento da hanseníase, fazendo com que fosse reintroduzida no mercado, porém com a impureza enantiomérica removida (BORGES; FRÖEHLICH, 2003; AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2019a).

Desde 1963, por meio de um relato de caso, evidenciou-se a associação do consumo de tetraciclina vencida ao desenvolvimento da Síndrome de Fanconi. Esta síndrome é caracterizada pelo distúrbio da reabsorção na tubulopatia renal proximal de glicose, aminoácidos, fosfato, bicarbonato e potássio, além de proteinúria tubular, deficiente concentração urinária e distúrbios no processo de acidificação. Entre os sintomas apresentados pelo paciente estavam fraqueza e anorexia desenvolvida, seguido de náusea e vômito profuso (GROSS, 1963). Dois produtos de degradação a anidrotetraciclina e 4-epianidrotetraciclina já possuem toxicidade comprovada e associação com os efeitos deletérios no uso do antimicrobiano vencido (PENA et al., 1998).

Em 1989, ocorreu um surto epidêmico de mortes causadas por uma doença autoimune que aumentava a produção sanguínea de eosinófilos e mialgia. Foi constatado na época que poderia estar associado ao consumo de suplementos alimentares contendo L-triptofano. Uma indústria japonesa da época modificou a bactéria utilizada para a produção de L-triptofano, causando mais de 1500 casos de síndrome de eosinofilia-mialgia (SGA) e pelo menos 37 mortes. Este caso foi associado à presença da impureza L-5-hidroxitriptofano. Entretanto, mesmo antes de 1989, outros casos de SGA foram relatados e por pessoas que consumiram o L-triptofano de diferentes marcas. Com base nos dados epidemiológicos, demais impurezas, incluindo 1,1'-etilidenebis, também poderiam estar relacionadas a indução de SGA, ou combinação delas (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2001).

Entre 2007 e 2008 foram identificados vários casos de reações alérgicas e mortes em Missouri, nos Estados Unidos, associados ao uso de heparina. Foi constatado que continham o contaminante sulfato de condroitina supersulfatado que causava hipotensão, náusea e falta de ar após trinta minutos da administração, podendo em alguns casos ser fatal. Os ensaios de controle de qualidade utilizados na época não conseguiam diferenciar heparina de sua impureza. No entanto, o FDA implementou mudanças nos padrões de referência de heparina e desenvolveu um novo método capaz de identificar suas impurezas (JOHNSTON; HOLT, 2014; BLOSSOM et al., 2008).

Em meados de 2018, a Agência Europeia de Medicamentos (EMA), identificou a presença da impureza N-nitrosodimetilamina (NDMA) no fármaco valsartana produzido por uma distribuidora chinesa. Com isso, a EMA passou a investigar esta impureza em outros ativos de mesma classe. Detectaram outras nitrosaminas como N-nitrosodiethylamine (NDEA), N-Nitrosodiisopropylamine (NDIPA) e N-Nitrosomethyl-nbutylamine (NMBA) em diversos outros fabricantes de insumos. O reflexo desta identificação chegou ao Brasil. A ANVISA, por sua vez, passou a investigar se os medicamentos da classe “sartanas” estavam contaminados. No total, foram efetuadas 14 suspensões de três insumos (losartana, valsartana e irbesartana) de dez fabricantes internacionais (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2019b).

As nitrosaminas são classificadas como prováveis ou potenciais carcinogênicos para seres humanos. As autoridades europeias calcularam que o risco de câncer associado ao consumo contínuo do medicamento é de 0,00017%, ou seja, a cada 6000 pessoas que tomaram o medicamento contaminado na dose máxima, todos os dias, por 5 (cinco) anos seguidos, 1 (uma) delas poderia desenvolver câncer. Em janeiro de 2019, foram detectadas nitrosaminas no medicamento ranitidina, destinado ao tratamento de problemas estomacais (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2019c).

Todos esses casos, ao longo dos anos, geraram uma falta de confiança da população em relação à produção de medicamentos. Com o intuito de prevenir acidentes como estes, as legislações exigem métodos de controle cada vez mais seletivos e específicos, demonstrando a relevância de se conhecer melhor os medicamentos dispensados à população.

2.3. Cronologia das principais Legislações Farmacêuticas Brasileiras associadas ao estudo de produtos de degradação

A primeira grande mudança na regulamentação dos medicamentos foi a instituição da Política Nacional de Medicamentos no Brasil com a Portaria Nº 3.916/1998, que teve por objetivo garantir a segurança, eficácia e qualidade dos medicamentos. Este avanço regulatório se fez perceber por meio da regulação sanitária, da assistência farmacêutica na promoção da pesquisa e do desenvolvimento e produção de insumos e medicamentos ditos essenciais (BRASIL, 1998).

Neste cenário ocorreu a criação da ANVISA, por meio da Lei Nº 9.782/1999, cuja missão é proteger e promover a saúde da população com o intuito de garantir a segurança sanitária de produtos e serviços (BRASIL, 1999). Comparada a órgãos reguladores de outros países, a agência brasileira é bastante nova e mantém uma busca de aprimoramento constante.

Com o tempo começou a surgir a necessidade de garantir a estabilidade dos produtos farmacêuticos, por ser um importante parâmetro para avaliar a segurança de uso, qualidade e eficácia. Em 2005, a ANVISA publicou o primeiro Guia para a Realização de Estudos de Estabilidade pela Resolução (RE) Nº 1/2005, que

estabeleceu a realização de testes de estabilidade a fim de prever, determinar ou acompanhar o prazo de validade dos medicamentos (BRASIL, 2005).

Em 2013, ocorreu a publicação da RDC Nº 58/2013, a qual tornou obrigatória a notificação, identificação e qualificação de produtos de degradação em medicamentos com substâncias ativas sintéticas e semissintéticas, classificados como novos, genéricos e similares (BRASIL, 2013). Esta resolução nem entrou em vigência e já foi revogada pela RDC Nº 53/2015, na qual está fundamentado este estudo (BRASIL, 2015). Esta é mais uma ferramenta da ANVISA com o intuito de contribuir com a distribuição e comercialização de medicamentos para a população, visando garantir quesitos fundamentais de segurança, qualidade e eficácia. Juntamente com a RDC Nº 53/2015, foi publicado o Guia Nº 04/2015, uma diretriz para auxiliar a aplicação do estudo de degradação forçada e desenvolvimento do método indicativo de estabilidade (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2015).

Em 2016, a ANVISA se tornou membro do ICH, intensificando a implementação dos estudos conforme suas diretrizes (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2016).

O estudo do perfil de degradação abrange todas as concentrações e formas farmacêuticas na inclusão, no momento do registro e nas alterações pós-registro do medicamento. Em 22 de agosto de 2017, a RDC Nº 171/2017 revisou a aplicabilidade da RDC Nº 53/2015 para alterações pós-registro e os prazos para produtos já registrados (BRASIL, 2017a).

Logo após, em 4 de outubro de 2017, foi publicado o Perguntas e Respostas baseado no Guia Nº 04/2015 e na RDC Nº 53/2015. Em 2019, diante das dificuldades apresentadas para a elaboração dos testes toxicológicos para qualificação dos produtos de degradação, ocorreu um direcionamento da ANVISA para a Gerência de Avaliação de Segurança e Eficácia (GESEF), a qual traz diretrizes de como realizar o estudo. No ano seguinte, em julho de 2019 foi publicado outro Perguntas e Respostas focado na qualificação de produtos de degradação, intitulado: “Fluxo de análise de qualificação de impurezas e produtos de degradação de medicamentos classificados como sintéticos e semissintéticos” (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2019d, 2019e).

Em novembro de 2019, a ANVISA revogou a RE Nº 1/2005 e publicou a RDC Nº 318/2019 que estabelece critérios para a realização de estudos de estabilidade de insumos farmacêuticos ativos (IFAs) e medicamentos, exceto os biológicos. Esta resolução também aborda estudos de fotoestabilidade, além de ressaltar a importância do emprego do método indicativo de estabilidade (BRASIL, 2019).

2.4. Paralelo entre a ANVISA e os guias do ICH

Mesmo antes da criação da ANVISA, em 1999, o ICH já havia publicado o Guia Q3A que trata sobre impurezas em fármacos no ano de 1995, e o Guia Q3B relativo a impurezas em produtos acabados no ano de 1996. Dez anos depois, em 2006, estes dois guias já se encontravam na segunda revisão. Assim, em paralelo, a ANVISA publicou em 2005 a primeira discussão sobre o tema, o Guia Nº 1/2005 sobre estabilidade de medicamentos (BRASIL, 2005; INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION, 2006a, 2006b).

Em 2014, ocorreu a publicação do ICH M7, único guia no mundo específico para tratativa de impurezas mutagênicas. Este guia sofreu sua primeira revisão em 2017 e um ano depois deram início à segunda revisão, e a própria ANVISA indica seu uso como referência para impurezas mutagênicas.

Paralelamente, em 2013, quando o ICH já havia abordado as impurezas mutagênicas, no Brasil foi publicado a RDC Nº 58/2013, início da discussão sobre produtos de degradação em medicamentos, a qual foi revogada, antes mesmo de entrar em vigor com a publicação da RDC Nº 53/2015 (BRASIL, 2015; INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION, 2017). Na Figura 1 é possível observar a evolução das publicações de normas no mundo e no Brasil com o passar do tempo.

Figura 1 - Cronologia em paralelo das legislações brasileiras e internacionais específicas para produtos de degradação

Nota: círculos vermelhos - normas internacionais; círculos verdes - normas nacionais.
 Fonte: Próprio autor (2019)

Esta resolução trouxe algumas mudanças em relação aos guias internacionais. Entre as contribuições, este guia dá ênfase ao parâmetro de degradação forçada com íons metálicos, indica uma meta em 10% de degradação do ativo, e exige que o estudo seja conduzido concomitante com o placebo. No caso de associações de ativos, sugere que o estudo de degradação seja realizado individualmente e na forma combinada, entre outras especificações (BRASIL, 2015).

A ANVISA teve pouco tempo para se adequar às resoluções e exigências sobre produtos de degradação que aconteciam ao redor do mundo. No entanto, hoje o cenário está mais promissor, considerando que os produtos de degradação são uma das principais preocupações das indústrias farmacêuticas, órgãos reguladores e fiscalizadores.

2.5. Detalhes das Principais Legislações Internacionais

2.5.1. Diretrizes do International Conference on Harmonisation (ICH)

O ICH elaborou diretrizes que trazem ótimas definições e ressaltam a importância da condução dos estudos de estabilidade e de degradação forçada (Tabela 1). Com exceção do ICH Q1B, que trata sobre fotoestabilidade, os demais guias não possuem condições experimentais detalhadas, trazendo informações bem gerais. Não definem, por exemplo, o tempo de exposição das substâncias, o pH indicado, temperaturas ideais, ou ainda o material oxidante a ser empregado. Na literatura justifica-se que cada molécula é única, e a formulação com a escolha dos

excipientes também, portanto o estudo conduzido deve ser individualizado (INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION, 1998; SENGUPTA; CHATTERJEE; TEKADE, 2018).

Tabela 1 - Guias do ICH aplicáveis ao estudo de degradação forçada

Código	Título do Guia
ICH Q1A	Stability Testing of New Drug Substances and Products
ICH Q1B	Photostability Testing of New Drug Substances and Products
ICH Q2B	Validation of Analytical Procedures: Methodology
ICH Q3A	Impurities in New Drug Substances
ICH Q3B	Impurities in New Products
ICH M7	Assessment and control of DNA reactive (mutagenic) impurities in pharmaceuticals to limit potential carcinogenic risk

Fonte: Adaptado de Sengupta, Chatterjee e Tekade (2018).

2.5.2. Diretrizes do European Medicines Agency (EMA)

O EMA exige apenas que seja feito o estudo de degradação forçada caso a substância não possua monografia em compêndio oficial, ou se nenhum dado científico for encontrado em literatura adequada (SENGUPTA; CHATTERJEE; TEKADE, 2018).

No caso de medicamentos em desenvolvimento, dificilmente é encontrada uma literatura extensa. Assim para medicamentos em fase experimental são exigidos parâmetros de estabilidade, fotossensibilidade e umidade, além do delineamento dos possíveis mecanismos de degradação (SENGUPTA; CHATTERJEE; TEKADE, 2018).

2.5.3. Diretrizes do Food and Drug Administration (FDA)

Segundo o FDA, assim como o ICH, os estudos de degradação forçada foram pensados para degradar propositadamente a substância e devem ser utilizados principalmente no momento de desenvolvimento do produto. Assim é possível avaliar o impacto das embalagens e sua fotossensibilidade, além da determinação das vias de degradação (SENGUPTA; CHATTERJEE; TEKADE, 2018)

Nas diretrizes do FDA também é indicado que os estudos de degradação forçada possam ser usados para fins de validação de métodos analíticos adequados usando diferentes condições de exposição. Entretanto, da mesma forma que os demais guias, as diretrizes do FDA não são claras quanto à condução dos parâmetros testados para garantir que o método seja indicativo de estabilidade. Ainda assim, na documentação oficial é exigido que as condições sejam adequadamente justificadas quanto à extensão da degradação realizada (SENGUPTA; CHATTERJEE; TEKADE, 2018).

2.6. Impurezas e produtos de degradação

A produção de medicamentos e a síntese de fármacos exigem a utilização de produtos químicos reativos, solventes, catalisadores entre outras substâncias. Como consequência, estes processos levam a formação de impurezas que são encontradas nas substâncias medicamentosas e em produtos farmacêuticos associados (INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION, 2006a, 2006b).

Existem diferentes definições para impurezas, assim como a forma de classificá-las. De acordo com a definição da ANVISA (2015), impureza é qualquer substância presente no produto que não seja o ativo ou excipiente. O Guia “Q3A *Impurities in New Drug Substances*” do ICH, por exemplo, classifica as impurezas em três grupos: impurezas orgânicas, inorgânicas e solventes residuais (INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION, 2006a).

- **Impurezas orgânicas** podem ser oriundas do processo de produção e/ou estocagem do fármaco. Podem ser impurezas identificadas ou desconhecidas, voláteis e não voláteis, e incluem: materiais de partida, subprodutos, intermediários sintéticos e produtos de degradação, reagentes, ligantes e catalisadores.
- **Impurezas inorgânicas** podem resultar do processo de produção. Normalmente são conhecidas e identificadas, e incluem: reagentes, ligantes e catalisadores, metais pesados ou outros metais residuais, sais inorgânicos, outros materiais (por exemplo, auxiliares de filtragem, carvão).
- **Solventes residuais** são líquidos orgânicos ou inorgânicos usados como veículo no preparo de soluções e suspensões na síntese de uma nova substância ativa. Desde que sejam de toxicidade conhecida, a seleção do controle apropriado é facilmente atendida (ICH, 2008, tradução nossa).

Conforme a classificação do Guia Q3A, os produtos de degradação encontrados em produtos farmacêuticos são considerados impurezas orgânicas. Além de serem provenientes da rota química da síntese de fabricação, os produtos de degradação são resultantes de alterações químicas que surgem do armazenamento dos produtos, efeitos da luz, pH, umidade, temperatura, ou seja, por exposição. Podem ainda ser originados por características inerentes ao fármaco, da reação com os excipientes, do contato com a embalagem primária e do próprio envelhecimento do produto (INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION, 2006a; BRASIL, 2015).

2.7. Estudos de estabilidade

O prazo de validade de um produto farmacêutico é o período no qual o mesmo mantém suas características de qualidade de quando foi fabricado, dentro de especificações preconizadas por legislação, ou seja, o prazo limite para se utilizar determinado produto farmacêutico (BRASIL, 2019).

A determinação do prazo de validade é baseada em estudos de estabilidade, os quais avaliam a interferência de fatores ambientais, como temperatura, umidade e luz (extrínsecos), e de outros relacionados ao próprio produto (intrínsecos), como propriedades físicas e químicas de substâncias ativas e excipientes farmacêuticos, forma farmacêutica e sua composição, processo de fabricação, além de prever condições adequadas de armazenamento (BRASIL, 2015, 2019).

No Brasil, os estudos de estabilidade são preconizados pela ANVISA por meio da RDC Nº 318/2019, e devem ser conduzidos de três formas, de acordo com as definições:

- **Estudo de Estabilidade Acelerado:** estudo projetado para avaliar possíveis alterações físicas, químicas e microbiológicas de IFA ou medicamentos, em condições forçadas de armazenamento, visando a auxiliar na determinação do Prazo de Reteste do IFA ou Prazo de Validade do IFA e do medicamento e a avaliar o efeito de curtas excursões fora dos Cuidados de Conservação preconizados.
- **Estudo de Estabilidade de Acompanhamento:** estudo realizado com o objetivo de monitorar e confirmar o Prazo de Validade para medicamento ou IFA e o Prazo de Reteste de IFA.
- **Estudo de Estabilidade de Longa Duração:** estudo projetado para verificação das características físicas, químicas e microbiológicas de IFA ou medicamento, nas Condições de Armazenamento e Prazo de

Validade propostos, podendo também ser utilizado para definição do prazo de reteste do IFA.

As condições analíticas dos estudos de estabilidade (Tabela 2) estão de acordo com as zonas climáticas do país que requisita o registro do medicamento. O Brasil se classifica como zona climática IVB, designado para países de clima quente e úmido (BRASIL, 2019).

Tabela 2 - Condições analíticas e justificativas para cada estudo de estabilidade

Estudo de estabilidade	Temperatura e umidade	Condição de armazenamento	Período	Principais objetivos	Principais finalidades
Acelerado	40°C ± 2°C / 75% UR ± 5% UR	Forçada	6 meses	Determinar prazo de validade provisório e condições de armazenamento	Desenvolvimento do produto; documentação de registro
Longa Duração	30°C ± 2°C / 75% UR ± 5% UR	Ambiente	24 meses	Comprovar prazo de validade e condições de armazenamento pelo estudo acelerado	Documentação de registro
Acompanhamento	30°C ± 2°C / 75% UR ± 5% UR	Ambiente	De 6 até 24 meses	Verificar mudanças na formulação ou no processo de fabricação que afete a estabilidade	Garantia de qualidade/ controle de qualidade

Fonte: Adaptado de Brasil (2019).

Segundo a ANVISA, para se obter o registro de um medicamento é obrigatório que o estudo de estabilidade acelerado esteja concluído, que o estudo de longa duração esteja em andamento e que o estudo de acompanhamento já esteja projetado para que aconteça assim que se dê o término do estudo de longa duração. Para o estudo de longa duração, o prazo de 24 meses pode ser prolongado caso necessário, podendo na prática chegar até 36 meses (BRASIL, 2019).

A concessão de um prazo de validade provisório por meio do estudo de estabilidade acelerado é possível, uma vez que este vem demonstrando empiricamente o que ocorre com um produto armazenado por um longo período de tempo, ou seja, confirmam posteriormente os resultados obtidos com estudo de longa duração (BRASIL, 2019).

2.8. Notificação, identificação e qualificação

Segundo as definições da RDC Nº 53/2015, o limite de notificação é o valor acima do qual um produto de degradação deverá ser reportado; o limite de identificação é o valor acima do qual um produto de degradação deverá ter sua estrutura química identificada; e o limite de qualificação é o valor acima do qual um produto de degradação deverá ser qualificado (BRASIL, 2015).

Estes critérios são aplicados para os resultados encontrados no final do estudo de estabilidade, entretanto podem servir de referência para o método analítico indicativo de estabilidade, após o estudo de degradação forçada (Tabela 3).

Tabela 3 - Limites de identificação, notificação e qualificação para produtos de degradação

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

Nota: ATD- Administração Total Diária
Fonte: Brasil (2015).

2.8.1. Qualificação de impurezas

Caso a porcentagem obtida do produto de degradação esteja nos níveis de qualificação, é necessário que sejam realizados ensaios para avaliação do potencial tóxico destas substâncias. Por enquanto, a recomendação da própria ANVISA é que estes ensaios de qualificação e testes de genotoxicidade sejam baseados na diretriz “ICH guideline M7(R1) on assessment and control of DNA reactive (mutagenic) impurities in pharmaceuticals to limit potential carcinogenic risk” (INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION, 2017).

Este guia traz providências para avaliação e controle de impurezas mutagênicas presentes ou esperadas no ativo, ou medicamento, para evitar o risco de causar câncer, as quais devem ser controladas com base na avaliação específica para cada composto. Sabendo-se da dificuldade de encontrar dados sobre os riscos de impurezas genotóxicas, o guia propõe o Limite de Risco Toxicológico, ou *Threshold of Toxicological Concern* (TTC). Este é um limite de exposição, ou ingestão aceitável do composto por dia, ao longo da vida, que não implicaria nenhum risco carcinogênico ou toxicológico, um risco insignificante.

O guia ICH M7 indica um TTC de composto em 1,5 µg/ dia, como valor preventivo, correspondendo a um excesso de risco teórico de câncer ao longo da vida de 10^{-5} , ou seja, 0,0001 g/ dia. Por segurança, 1,5 µg/ dia está acima do valor teórico. Isto representaria um risco menor que 1 em 100.000 da substância causar câncer, considerado justificável pelo guia (INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION, 2017).

Segundo a diretriz M7, toda impureza real ou potencial em que a estrutura é conhecida, deve-se ter seu potencial mutagênico avaliado e classificado em umas das 5 classes, conforme Tabela 4.

Tabela 4 - Classificação de impurezas em relação ao potencial mutagênico e carcinogênico e ações de controle resultante

Classe	Definição	Ação proposta para controle
1	Mutagênico cancerígeno conhecido	Controlar abaixo ou no limite aceitável específico do composto
2	Mutagênico conhecido com potencial cancerígeno desconhecido (mutagenicidade bacteriana positiva ⁽¹⁾ , sem dados de carcinogenicidade em roedores)	Controlar abaixo ou no limite aceitável (TTC apropriado)
3	Estrutura alerta, não relacionada à estrutura do fármaco; sem dados de mutagenicidade	Controlar abaixo ou no limite aceitável (TTC apropriado) ou realizar ensaio de mutagenicidade bacteriana. Se não mutagênico = classe 5 Se mutagênico = classe 2
4	Estrutura alerta, relacionado 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

Nota: ⁽¹⁾ Ou outros dados relevantes de mutagenicidade positiva indicativos de reatividade ao DNA relacionada à indução de mutações gênicas (por exemplo, resultados positivos em estudos de mutação genética *in vivo*).

Fonte: ICH (2017)

Esta abordagem normalmente seria usada para impurezas mutagênicas presentes em produtos farmacêuticos para tratamento de longo prazo (> 10 anos) e onde não há dados de carcinogenicidade disponíveis (Classes 2 e 3) (INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION, 2017).

As classes 3, 4 e 5 incluem impurezas cujos dados de mutagenicidade bacteriana e carcinogenicidade não estão disponíveis nos bancos de dados e literatura. Nestes casos, é necessário lançar mão da avaliação Relação Estrutura-Atividade Quantitativa (QSAR), a qual prediz a mutagenicidade bacteriana, definindo se a impureza será tratada como mutagênica (INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION, 2017).

Caso o resultado desta pesquisa apresente indicação de risco de mutagenicidade, devem-se realizar ensaios *in vitro* e *in vivo*. Entretanto, somente nos casos em que a indicação do risco somada a uma avaliação final do perfil de degradação e nenhum subproduto considerado potencialmente tóxico, se ausenta a necessidade de realizar o estudo experimental toxicológico (INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION, 2017).

Existem impurezas genotóxicas ou com alertas estruturais que podem estar abaixo do nível de qualificação, mas que devem ser reportadas, dadas o potencial do risco associado. Portanto, o conhecimento da estrutura molecular e seu estudo teórico são os primeiros passos para uma boa condução do estudo de degradação forçada (INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION, 2017).

2.9. Estudo de degradação forçada

Além do principal objetivo dos estudos de estabilidade em determinar o prazo de validade e condições de armazenamento de novos medicamentos, estes também são realizados com o intuito de garantir a integridade química, física, microbiológica, terapêutica e toxicológica do fármaco e da forma farmacêutica dentro de limites especificados, ou seja, comprovar segurança e eficácia dos medicamentos (ALLEN; POPOVICH; ANSEL, 2013).

Em termos de eficácia, geralmente o primeiro efeito que ocorre devido à instabilidade do medicamento é a diminuição da potência, no entanto, se os produtos de degradação formados são tóxicos, seu acúmulo é tão importante

quanto, ou mais que, a diminuição da potência (KOMMANABOYINA; RHODES, 1999).

O método de estudo de estabilidade para produtos de degradação é desenvolvido e validado com a intenção de que seja capaz de detectar todos os produtos de degradação reais, ou seja, aqueles produtos encontrados com a análise do produto de estabilidade de longa duração. Entretanto, se torna uma tarefa muito árdua desenvolver este método apenas com as amostras obtidas com o final do estudo de estabilidade, pois em geral a degradação é branda (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2015).

Assim, o estudo de degradação forçada em fármacos e medicamentos, ou estudo de estresse, é diferente do estudo de estabilidade acelerada, pois utiliza condições mais extremas. Segundo a RDC Nº 53/2015, as indústrias farmacêuticas devem apresentar estudos submetendo a amostra às seguintes condições de degradação forçada: aquecimento, umidade, solução ácida, solução básica, solução oxidante, exposição fotolítica, e íons metálicos (ALCÂNTARA et al., 2013; BRASIL, 2015).

Segundo o Guia Nº 4/2015, o estudo de degradação deve ser empregado com condições mais severas tanto no Insumo Farmacêutico Ativo (IFA) como no placebo e produto acabado. Este causa intencionalmente degradações maiores se comparado ao estudo de estabilidade, além de garantir maior especificidade ao método, uma vez que intensifica a correta separação dos ativos dos produtos de degradação. Por tal motivo, utiliza-se o estudo de degradação forçada como ferramenta para o desenvolvimento do método indicativo de estabilidade (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2015).

Além disso, os estudos de estresse fornecem informações quanto à rota de degradação e os potenciais produtos que podem ser formados durante o armazenamento. Idealmente, estes estudos devem ser empregados no início do processo, pois podem facilitar o desenvolvimento de formulações, na produção do medicamento e na escolha de embalagens (REYNOLDS et al., 2002; MUSMADE et al., 2012).

Entretanto, com a implantação da RDC Nº 53/2015, tornou-se obrigatório no pedido de registro e pós-registro, a indústria farmacêutica realizar a análise crítica quanto ao perfil de degradação forçada para que a petição seja aprovada. Ainda que

o procedimento experimental de todas as condições não seja obrigatório, por características inerentes à amostra ou que não sejam aplicáveis, deve-se justificar tecnicamente cada parâmetro não realizado do estudo de degradação forçada (BRASIL, 2015).

O estudo de degradação forçada será, portanto, um desafio ao método e nele espera-se encontrar os produtos de degradação; em contrapartida, o estudo de estabilidade é um desafio ao produto, e sendo uma condição realista, os produtos de degradação não são desejáveis.

2.10. Etapas para condução do estudo de degradação forçada

2.10.1. Pesquisa bibliográfica

O estudo de degradação forçada inicia-se por uma pesquisa bibliográfica prévia utilizando bases de dados científicas, compêndios oficiais disponíveis, buscadores diretos e caso possível no próprio *Drug Master File* (DMF) do fármaco. Estes documentos podem fornecer informações essenciais ligadas às características físico-químicas do fármaco e seus produtos de degradação, como pKa, solubilidade, peso molecular, estrutura molecular, rotas de degradação e perfil de impurezas. Em especial o DMF traz a composição química do ativo, sua rota de síntese, estabilidade, pureza e perfil de impurezas, dados de embalagem, estudo de produtos de degradação realizado pelo fabricante (DA COSTA et al., 2018).

Esta pesquisa será importante para avaliar métodos analíticos já desenvolvidos e alertas de toxicidade. Com a informação da composição da formulação também é possível investigar se existe uma possível interação dos excipientes com os ativos, gerando produtos degradados com o tempo. A coleta de todas as informações é de suma relevância e servirá como base para o planejamento do estudo de degradação forçada e, por consequência para o desenvolvimento do método indicativo de estabilidade (DA COSTA et al., 2018).

2.10.2. Condução dos ensaios experimentais de degradação forçada

A condução do estudo deve ser realizada em um lote, em escala laboratorial, piloto ou industrial do medicamento e recomenda-se que as mesmas condições de degradação também sejam empregadas ao placebo, insumo farmacêutico além da formulação acabada, para fins de comparação. A RDC Nº 53/2015 sugere que o estudo seja aplicado em todas as concentrações do medicamento disponível no mercado (BRASIL, 2015).

Recomenda-se a obtenção de degradação do ativo de no mínimo 10% do pico principal, portanto, tal degradação não deve ser nem muito branda, nem gerar produtos de degradação de segunda ordem (produtos originados a partir de substâncias já degradadas) (BRASIL, 2015).

Os resultados dos produtos de degradação encontrados serão base para o desenvolvimento e validação do método indicativo de estabilidade e para análise crítica do perfil de degradação do medicamento. O desenvolvimento do método deve contemplar a verificação da pureza cromatográfica do pico do insumo farmacêutico ativo no medicamento e avaliar os fatores que podem interferir de alguma forma na estabilidade do medicamento (BRASIL, 2015).

2.10.3. Hidrólise ácida e básica

As hidrólises são as reações mais comuns que levam a formação de produtos degradados, sob uma larga faixa de pH. Esta reação é mais frequente em medicamentos líquidos, pois a água é um dos principais catalisadores de reações químicas. Diferentes pHs devem ser avaliados para verificar a instabilidade do medicamento, pois a presença de íons hidrogênio e hidroxila podem acelerar ou retardar o processo de degradação (SILVA et al., 2009; BLESSY et al., 2014).

Medicamentos com presença de água possuem, em sua maioria, prazo de validade inferior aos dos medicamentos sólidos, mesmo com intervenções durante a formulação e armazenamento, para garantir a eficácia e estabilidade da forma farmacêutica final. Mesmo assim, medicamentos sólidos não estão isentos de sofrer hidrólise, uma vez que podem estar suscetíveis a diferentes umidades, considerando um país tão extenso como o Brasil. Recomenda-se a utilização de hidróxido de sódio

e ácido clorídrico entre 0,01N e 1N em diferentes tempos de exposição (SILVA et al., 2009; BLESSY et al., 2014).

2.10.4. Oxidação

A oxidação envolve um mecanismo de transferência de elétrons de modo a criar moléculas carregadas, ânions e cátions. Essa reação pode ocorrer em cadeia sob influência do oxigênio molecular, chamada de auto-oxidação. As funções orgânicas mais suscetíveis são as aminas, sulfetos e o fenol, levando a formação de *N*-óxidos, hidroxilamina, sulfonas e sulfóxido. Outras funções com presença de hidrogênio lábil são sensíveis a oxidação (SILVA et al., 2009; BLESSY et al., 2014).

Os fármacos em estado sólido dificilmente sofrem oxidação, entretanto na formulação existem grandes chances de serem oxidados. Isso ocorre por conta dos excipientes que contêm impurezas capazes de iniciar a oxidação, entre os principais hidroperóxidos orgânicos. Estes são geralmente encontrados em excipientes como Polisorbato 80, Polietilenoglicol (PEG) 400, Hidroximetilpropilcelulose (HPMC) e Polivinilpirrolidona (PVP) (BAERTSCHI; ALSANTE; REED, 2011).

O reagente mais utilizado para forçar a degradação oxidativa é o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Além deste, a azobisisobutironitrila (AIBN) tem sido bastante utilizada. É recomendável o uso do H_2O_2 em temperatura ambiente, (instável a altas temperaturas), em concentrações entre 0,1 e 3,0%, sendo bastante comum a 0,3%. Normalmente, o tempo de exposição é de 24 horas, podendo-se prolongar até 72 horas (BLESSY et al., 2014).

2.10.5. Fotodegradação

A luz ultravioleta (UV) ou fluorescente tem a capacidade de levar a formação de degradantes primários dos fármacos quando expostos. O teste de fotodegradação tem como princípio investigar qual é a intensidade e o efeito da exposição à luz na propriedade físico-química dos medicamentos analisados. Moléculas que possuem grupos cromóforos são ativadas fotoquimicamente por radiação UV ou visível. Esta alteração na molécula pode ser bastante danosa, interferindo no seu efeito terapêutico, ou pior, gerando fototoxicidade (KLEINMAN et al., 2010; SENGUPTA; CHATTERJEE; TEKADE, 2018).

O teste de fotodegradação é o único que possui parâmetros claros para a sua condução, os quais estão descritos no guia Q1B. O medicamento e o fármaco devem ficar submetidos a um mínimo de 1,2 milhões de lux-h e de 200 Wh/m² de luz, sendo o comprimento de onda aceito na faixa de 300 a 800nm para causar degradação fotolítica. O máximo de exposição recomendada é de uma iluminação de 6 milhões de lux-h até quatro dias. A exposição também pode ser testada com exposição à luz solar, sendo os produtos de degradação monitorados ao longo também de quatro dias (INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION, 1998; BLESSY et al., 2014).

2.10.6. Degradação térmica

A elevação da temperatura acelera a taxa de reação química, aumentando os níveis de degradação das substâncias. O guia da ICH Q1A recomenda que a exposição térmica seja feita com temperaturas acima das utilizadas no estudo de estabilidade acelerado de 40°C e 75% de umidade relativa (UR). Sugere-se que seja elevada a temperatura de 10 em 10° graus. Para produtos sólidos é recomendado utilizar calor seco (estufa) e úmido a 75% de UR. Connors et al. recomendam a utilização de câmara climática ou dessecador com solução salina saturada para testes em calor úmido (CONNORS; AMIDON; STELLA, 1986; BLESSY et al., 2014).

2.10.7. Íons Metálicos

A degradação com íons metálicos é um teste obrigatório pela RDC Nº 53/2015, pois sua adição em soluções contendo o fármaco é uma ferramenta para avaliar possível oxidação da molécula. Segundo o Guia nº4 de 2015, geralmente utiliza-se soluções de Ferro (III) ou Cobre (II). Entretanto, Baertschi (2011) demonstrou a relevância de estudar as degradações com Fe II ou Cu III. Ainda existem divergências na literatura a respeito da solução empregada para este tipo de degradação (BAERTSCHI; ALSANTE; REED, 2011; AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2015; BRASIL, 2015).

De qualquer forma, não se considera relevante a variação na concentração da solução metálica estressante, sendo geralmente empregado 0,05M, assim como

variações na temperatura da amostra não são aconselhadas. O teste deve ser feito apenas em um parâmetro estabelecido e, caso não haja degradação após um dia, o produto é considerado estável para este tipo de degradação (BAERTSCHI; ALSANTE; REED, 2011).

2.11. Método Indicativo de Estabilidade (MIE)

Segundo o FDA, o método indicativo de estabilidade é um procedimento analítico quantitativo validado utilizado para detectar a estabilidade dos fármacos e dos produtos acabados ao longo do tempo. Este método deve ser capaz de medir as mudanças nas concentrações dos fármacos sem interferência de outros produtos degradados, das impurezas e dos excipientes, ou seja, deve ser seletivo e específico (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2015).

Além disso, o método indicativo de estabilidade deve ser desenvolvido para detectar e quantificar os produtos de degradação encontrados mais relevantes. É uma tarefa bastante complexa desenvolvê-lo utilizando apenas o IFA ou a amostra de medicamento final do estudo de estabilidade. Por isso, são realizados os estudos de degradação forçada, em que as concentrações dos produtos degradados são mais expressivas. Assim é possível diferenciar os produtos de degradação real dos potenciais (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2015; FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2015).

A ferramenta mais utilizada para o desenvolvimento do MIE é o HPLC com DAD (detector de arranjo de diodos). Caso os produtos formados não possuam cromóforos, é necessário o emprego de outros detectores, como os de fluorescência e espectrômetro de massas, os quais ampliam a detecção dos produtos formados, de modo que não prejudique a especificidade do método. Comumente lança-se mão de métodos ortogonais (NARAYANAM et al., 2013).

2.11.1. Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas

Em razão da sua sensibilidade e a gama de componentes analisáveis, a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa (LC-MS) é a técnica de escolha entre todas as outras técnicas hífenadas. Além disso, ela possui potencial

para fornecer uma caracterização inequívoca da estrutura da maioria dos produtos de degradação em baixas concentrações (NARAYANAM et al., 2013).

Atualmente, há uma variedade de espectrômetros de massas disponíveis comercialmente que podem ser acoplados à cromatografia líquida. Podem variar quanto à fonte de ionização, entre os mais comuns: ionização por electrospray (ESI), ionização química por pressão atmosférica (APCI) e fotoionização por pressão atmosférica (APPI). Quanto aos analisadores de massas, os mais conhecidos são: quadrupolo, armadilha de íons (IonTrap), tempo de voo (TOF) e orbitrap (NARAYANAM et al., 2013).

O sucesso da elucidação da estrutura dos componentes dá-se pela obtenção da m/z do fármaco pela geração de íons moleculares protonados ($[M+H]^+$) ou desprotonados ($[M-H]^-$) (adutos não são desejáveis, mas podem acontecer), seguida da obtenção do espectro de fragmentos do ativo e de suas substâncias relacionadas; determinação precisa e exata de sua massa; fórmula elementar; presença de anel ou ligações duplas e número de nitrogênios; estudo de vias de fragmentação, entre outras abordagens (NARAYANAM et al., 2013).

Desta forma a espectrometria de massas acoplada à cromatografia líquida, principalmente com analisador de massas de alta resolução, como o por tempo de voo LC-MS-QTOF, é uma ferramenta que traz informações preciosas na identificação de substâncias desconhecidas, principalmente por fornecer m/z com alta acurácia (BLESSY et al., 2014).

2.12. Pureza de pico

De acordo com a RDC Nº 166/ 2017, pureza cromatográfica é a ausência de interferência no sinal cromatográfico do analito. Já pureza de pico é a homogeneidade espectral de um pico cromatográfico, indicativa de sua pureza cromatográfica. Os critérios para concluir se existe homogeneidade espectral e os parâmetros adotados para o cálculo da pureza são estabelecidos pelo software utilizado ou por meio de avaliação técnica cientificamente embasada (BRASIL, 2017b).

A pureza de pico é um indício de que interferentes estão ausentes, ou seja, que dois picos podem não estar sobrepostos. Como no método indicativo de

estabilidade, existe um grande número de impurezas que serão separadas, a intenção é demonstrar que existe pureza de pico e que os componentes não estão sofrendo coeluição. Entretanto, é necessário considerar que em caso de enantiômeros, ou isômeros, essa diferenciação não é possível de ser feita por pureza de pico (CASTLEDINE; FELL, 1993).

A pureza de pico está intimamente relacionada à metodologia utilizada para a determinação de identidade de pico, em que dois ou mais picos sobrepostos são distinguidos. Essa abordagem utiliza a tecnologia do Detector por Arranjo de Diodos (DAD) ou *photodiode-array* compatível com a cromatografia de fase reversa, extensivamente utilizada em análises de medicamentos. Uma das maneiras de demonstrar que existe um potencial de pureza de pico é avaliando o valor de *purity angle*, o qual deve ser menor que *purity threshold*. Isto se baseia em comparações entre espectros obtidos do pico analisado em uma faixa de UV-VIS definida (CASTLEDINE; FELL, 1993).

A RDC Nº 53/2015 exige que a pureza de pico seja determinada apenas para o pico cromatográfico do insumo farmacêutico ativo. No entanto, comumente é realizado o teste com as impurezas presentes, para garantir que não esteja ocorrendo coeluições indesejadas (BRASIL, 2015).

2.13. Balanço de massas

Conceitualmente, balanço de massas é a somatória do teor e dos níveis de produtos de degradação encontrados para avaliar a proximidade deles a 100% do valor inicial de teor, levando em consideração a margem de precisão e exatidão analítica. Esta definição foi baseada no guia do ICH Q1A. Entretanto, sabe-se que o conceito de balanço de massas é muito útil para a avaliação de dados, mas nem sempre é factível na prática (INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION, 2003; AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2015).

O cálculo pode ser obtido por meio do balanço de massas absoluto ou do balanço de massas relativo. O primeiro é basicamente a subtração de 100% menos a somatória da porcentagem de degradação do fármaco mais a porcentagem dos produtos de degradação formados. Já para o cálculo do relativo, seria a

porcentagem dos produtos de degradação formados dividido pela porcentagem da degradação do fármaco, multiplicando-se o resultado por 100% (INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION, 2003).

Um dos principais motivos de desvios no balanço de massas é o preparo da amostra. Outro ponto a ser considerado é a diferença de absorvidade molar dos produtos de degradação gerados em relação ao IFA. Além disso, na prática muitas vezes será necessário realizar uma integração manual do pico, em detrimento da automática para atingir o balanço de massas (INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION, 2003).

2.14. Objeto de estudo

2.14.1 Ibuprofeno

O ibuprofeno (IBU), ácido 2-(4-isobutilfenil)propanoico, Figura 2, é um fármaco pertencente ao grupo dos anti-inflamatórios não esteroides (AINES) de ação moderada, com efeitos analgésicos e antipiréticos. Apesar da metila em beta a carbonila ser quiral, o IBU é comercializado como mistura racêmica. Possui ação farmacológica ao inibir não seletivamente as enzimas ciclooxigenase-1 (COX-1) e ciclooxigenase-2 (COX-2), fazendo com que haja uma redução na produção de prostaglandinas e assim a diminuição da formação de mediadores da febre e dor. Faz parte da lista de medicamentos essenciais da Organização Mundial da Saúde (OMS) e da Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (RENAME) em que são classificados os medicamentos mais relevantes para o Sistema Básico de Saúde (RAINSFORD, 2009).

Figura 2- Estrutura molecular do ibuprofeno

Chemical Formula: $C_{13}H_{18}O_2$

Exact Mass: 206,1307

Fonte: Estrutura obtida pelo software ChemDraw (2019) pelo autor.

Derivado do ácido fenilpropionico, o ibuprofeno possui massa molecular de 206,28g, e segundo o Sistema de Classificação Biofarmacêutica (BCS) possui baixa solubilidade e alta permeabilidade, pertencendo assim à classe II. O ácido carboxílico do ibuprofeno possui $pK_a = 4,85$ e na forma não dissociada o ativo possui $\text{LogP} = 3,84$. Apresenta-se em pó cristalino branco ou cristais incolores, com odor característico, ponto de fusão entre 75 a 78°C, sendo praticamente insolúvel em água, facilmente solúvel em solventes orgânicos como etanol, acetona, clorofórmio, ligeiramente solúvel em acetato de etila, e solúvel em soluções aquosas de hidróxidos alcalinos (SILVA et al., 2012).

O uso prolongado de ibuprofeno está relacionado a casos de gastrite e úlcera gástrica estomacal, uma vez que bloqueia a proteção da mucosa gástrica. Pode provocar reações alérgicas como manchas na pele, urticária, edema de face e reações mais sérias como dificuldade em respirar. Quando utilizado em associação a diuréticos potencializa seus efeitos tóxicos. Uma superdosagem pode levar a ocorrência de vômitos, diarreia, dificuldade em respirar e taquicardia (MARQUES, 2009).

O ibuprofeno é um medicamento de venda livre, utilizado mundialmente e disponível no mercado nacional nas formas farmacêuticas de comprimidos, suspensão oral e suspensão em gotas. A apresentação líquida facilita a adesão ao tratamento pediátrico por melhor deglutição. Mais recentemente passou a ser disponível na forma de cápsula líquida (cápsula mole) (RAINSFORD, 2009).

2.15. Estudos prévios com ibuprofeno e produtos de degradação conhecidos

Este estudo será baseado na análise dos produtos de degradação de ibuprofeno 400mg na forma farmacêutica de cápsula líquida. Diversos estudos, conforme citados abaixo, já foram realizados com o ativo ibuprofeno, inclusive sobre a química de degradação do ativo, entretanto não se encontrou na literatura uma abordagem que contemple o estudo de degradação forçada para o desenvolvimento do método indicativo de estabilidade e caracterização do perfil de impurezas na forma de cápsulas líquidas.

A farmacopeia americana (2020) e a farmacopeia brasileira (2019) apresentam métodos para determinação de ibuprofeno em matéria-prima, teor de ibuprofeno na forma de comprimidos e suspensão oral, e determinação de impurezas. Os métodos de impurezas possuem fase móvel, detecções, coluna completamente distintos e têm como objetivo a identificação de ibuprofeno e suas impurezas J, C (compostos 3 e 4, respectivamente da Tabela 5), além de outra desconhecida, sendo exceção o ácido benzoico, exigido apenas para o método de impurezas da suspensão oral (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2019; UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2019).

O grupo italiano de Caviglioli et al. (2002) investigou a degradação de ibuprofeno em condições oxidativas e térmicas. Puderam identificar 13 degradantes, dentre os quais seis já haviam sido relatados (compostos 3, 4, 5, 6, 12 e 13 da Tabela 5) e sete novos até 2002 (compostos 1, 2, 7, 8, 9, 10 e 11 da Tabela 5). Para detectar todos os produtos de degradação, os pesquisadores desenvolveram dois métodos por HPLC e outro por CG-MS. Muitos dos componentes relatados são resultantes de degradações de segunda ordem (CAVIGLIOLI et al., 2002).

Em 2010, os pesquisadores americanos, Cory, Harris e Martinez, desenvolveram um estudo de degradação forçada com 11 marcas diferentes disponíveis no mercado de ibuprofeno na forma de comprimidos. Descreveram uma incompatibilidade do ativo ibuprofeno com dois excipientes comumente utilizados (polietilenoglicol e polisorbato 80), os quais demonstraram acelerar a degradação térmica. A fim de investigar o papel do PEG e do polissorbato 80 na degradação do ibuprofeno armazenado a 70°C/ 75% UR, foi realizado um estudo de amostras binárias de IFA com excipientes. Observou-se que o PEG combinado com ibuprofeno levou ao aumento da degradação, possivelmente devido a peróxidos residuais formados por oxidação (CORY; HARRIS; MARTINEZ, 2010).

Neste mesmo estudo, é descrito um dos degradantes mais conhecidos de ibuprofeno, o 4-isobutilacetofenona (4-IBAP) (composto 20 da Tabela 5), já de neurotoxicidade conhecida na literatura. Além deste, o 1-(4-Isobutylphenyl)-1-ethanol (4-IBEP) (composto 1 da Tabela 5) também já foi relatado por apresentar toxicidade. A deprotonação do composto 4-IBEP resulta na formação do composto 4-IBAP (RAO et al., 2016).

Embora muitas substâncias da Tabela 5 sejam compostos secundários, algumas possuem alertas de mutagenicidade em sua estrutura. A carbonila conjugada com a dupla ligação do anel representa um destes alertas, como exemplo o composto 12, que vem da oxidação do 4-IBAP.

A Farmacopeia Americana possui métodos de teor e determinação de impurezas completamente diferentes para a associação de ibuprofeno e cloridrato de difenidramina, tanto em cápsulas duras quanto em comprimidos. Para cápsulas não são detectadas impurezas do ibuprofeno, enquanto para os comprimidos, são reportadas seis impurezas conhecidas (compostos 15, 17, 18, 19, 21 e 22) e uma desconhecida.

Existem diversos artigos com desenvolvimento de método analítico em formas farmacêuticas sólidas, principalmente em comprimidos de ibuprofeno em associação com outros ativos. Entre eles, um estudo de ibuprofeno combinado a cloridrato de difenidramina e suas impurezas. Neste estudo, Rao, Sait e Mukkanti (2011) utilizaram seis padrões de impurezas conhecidas de ibuprofeno (compostos 15, 17, 18, 19, 21 e 22, os mesmos da Farmacopeia Americana), e duas de cloridrato de difenidramina. Com o objetivo de identificar as impurezas desconhecidas, realizaram estudo de estresse sob as condições de oxidação, ácido, base, térmica, hidrolítica e fotolítica e desenvolveram um método por LC-MS-MS. Pela degradação oxidativa foi encontrado uma impureza proveniente do cloridrato de difenidramina, formando um N-óxido, estrutura com alerta de mutagenicidade, porém não foi encontrada nenhuma impureza relativa ao ibuprofeno (RAO; SAIT; MUKKANTI, 2011).

O grupo de Jahan et al. (2014) também desenvolveu, validou método e realizou estudo de degradação forçada para quantificação simultânea de ibuprofeno e paracetamol associados em comprimidos. Embora os picos tenham boa resolução, não foram identificadas as substâncias relacionadas (JAHAN et al., 2014).

Nesta mesma linha, foi o trabalho do grupo de Vijay Kumar et al. (2015). Desenvolveram um método indicativo de estabilidade por UPLC para a associação de ibuprofeno e cloridrato de drotaverina na presença impurezas conhecidas; três de ibuprofeno (compostos 3, 15 e 16) e quatro de cloridrato de drotaverina. O trabalho não envolveu estudo de degradação forçada, porém teve destaque para a validação de método único com separação de todos os componentes (KUMAR et al., 2015).

Huidobro, Rupérez e Barbas (2006) determinaram concomitantemente arginina e ibuprofeno e três impurezas relacionadas de ibuprofeno (J, B, E, respectivamente os compostos 3, 17 e 20) por um método isocrático. Embora estas substâncias tenham polaridades muito distantes, o que se torna um problema cromatográfico, a solução foi colocar colunas em tandem. Uma C18, fornecendo a separação do ibuprofeno e suas impurezas por mecanismo hidrofóbico, e outra coluna aminopropil que ofereceu retenção seletiva de arginina pelo mecanismo de interação dipolar (HUIDOBRO; RUPÉREZ; BARBAS, 2006).

Com enfoque em cápsulas líquidas, dois artigos foram fundamentais: a revisão de Gullapalli (2010) e a esterificação das cápsulas líquida de ibuprofeno provenientes do estudo de estabilidade de longa duração de Douša (2017). Novamente, não foram encontrados outros estudos com desenvolvimento de método indicativo de estabilidade baseado no estudo de degradação forçada em cápsulas de ibuprofeno para caracterização de impurezas (GULLAPALLI, 2010; DOUŠA et al., 2017).

Na Tabela 5, é possível observar todas as impurezas relacionadas aos trabalhos citados, a fórmula molecular, sua estrutura, pKa, LogP e o CAS (Chemical Abstracts Service). Existe na literatura um grande número de produtos de degradação associados ao ibuprofeno, entretanto, muitos deles são de segunda ordem. A formação destes produtos deve-se a condição e tempo de exposição submetida.

Tabela 5 – Principais produtos de degradação do ibuprofeno relatados na literatura

Composto	Nome IUPAC	Estrutura Molecular	Fórmula Molecular	Massa Molecular	pKa	LogP	CAS
1	1-(4-Isobutylphenyl)-1-ethanol		C ₁₂ H ₁₈ O	178,271	14,83	3,43	40150-92-03
2	2-[4-(1-Hydroxy-2-methylpropyl)phenyl]propanoic acid		C ₁₃ H ₁₈ O ₃	222,284	4,55 14,24	2,73	53949-53-4
3	2-(4-Isobutyrylphenyl)propanoic acid (Imp J)		C ₁₃ H ₁₆ O ₃	220,268	4,23	2,96	65813-55-0
4	1-(4-Isobutylphenyl)-1-ethanone ou 4-isobutylacetophenone ou 4-IBAP (Imp C)		C ₁₂ H ₁₆ O	176,259	-	3,22	38861-78-8

Composto	Nome IUPAC	Estrutura Molecular	Fórmula Molecular	Massa Molecular	pKa	LogP	CAS
5	2-(4-Formylphenyl)propanoic acid (Imp K)		C ₁₀ H ₁₀ O ₃	178,187	3,95	1,87	43153-07-7
6	4-Isobutylbenzoic acid		C ₁₁ H ₁₄ O ₂	178,228	4,32	3,24	38861-88-0
7	4-(1-Carboxyethyl)benzoic acid		C ₁₀ H ₁₀ O ₄	194,184	4,11	1,66	67381-50-4
8	Hydratropic acid		C ₉ H ₁₀ O ₂	150,174	4,34	2,1	492-37-5
9	4-Isobutylphenol		C ₁₀ H ₁₄ O	150,218	9,84	3,3	4167-74-2
10	4-Ethylbenzaldehyde		C ₉ H ₁₀ O	134,175	-7,1	2,69	4748-78-1
11	1-Isobutyl-4-vinylbenzene		C ₁₂ H ₁₆	160,255	-	4,32	63444-56-4
12	1-(4-Acetylphenyl)-2-methyl-1-propanone		C ₁₂ H ₁₄ O ₂	190,238	-	1,88	103931-20-0
13	4-Acetylbenzoic acid		C ₉ H ₈ O ₃	164,158	3,70	0,9	586-89-0
14	3-(4-(1-carboxyethyl)phenyl)-2-methylpropanoic acid (Carboxybuprofen)		C ₁₃ H ₁₆ O ₄	236,264	4,39	2,78	15935-54-3
15	2-[3-(2-Methylpropyl)phenyl]propanoic acid (Imp A)		C ₁₃ H ₁₈ O ₂	206,281	4,35	3,75	66622-47-7
16	2-(4-ethylphenyl)-propanoic acid (Imp N)		C ₁₁ H ₁₄ O ₂	178,228	4,43	3,01	3585-52-2
17	2-(4-butylphenyl) propanoic acid (Imp B)		C ₁₃ H ₁₈ O ₂	206,281	4,41	3,84	3585-49-7
18	2-(4-propylphenyl)propanoic acid		C ₁₂ H ₁₆ O ₂	192,254	4,44	3,42	3585-47-5

Composto	Nome IUPAC	Estrutura Molecular	Fórmula Molecular	Massa Molecular	pKa	LogP	CAS
19	2-(4-isopropylphenyl)propanoic acid		C ₁₂ H ₁₆ O ₂	192,254	-	3,34	3585-48-6
20	1-(4-isobutylphenyl)ethanone (Imp E)		C ₁₂ H ₁₆ O	176,255	-	3,54	38861-78-8
21	2-(p-tolyl)propanoic acid		C ₁₀ H ₁₂ O ₂	164,201	4,44	2,59	938-94-3
22	2-(4-isobutylphenyl)propanamide		C ₁₃ H ₁₉ NO	205,296	-	3,1	59512-17-3

Fonte: Estruturas e informações obtidas com as referências descritas no texto, e pelos softwares ChemDraw, PubChem (2019) pelo autor.

2.16. Cápsula líquida (cápsula mole)

As cápsulas líquidas ou moles são preparadas a base de gelatina e substâncias emolientes, como a glicerina; o que difere das cápsulas duras que são preparadas apenas com base de gelatina. O conteúdo das cápsulas líquidas é constituído de líquidos ou semissólidos, entretanto, podem ser preenchidas também com pós e outros sólidos secos menos comuns (ALLEN; POPOVICH; ANSEL, 2013).

Dependendo dos componentes da formulação, será feita a escolha entre a produção de cápsula dura ou líquida. Os excipientes proporcionam as melhores características de absorção, características físicas, como a viscosidade da formulação e a temperatura na qual ocorre enchimento do produto. Esta decisão deve ser concomitante ao fármaco empregado, que possui características físico-químicas que podem ser limitantes (COLE; CADÉ; BENAMEUR, 2008).

A produção de cápsulas líquidas tornou-se crescente nos últimos anos. Mais de 40% das novas entidades químicas vindas do processo de descoberta de medicamentos têm propriedades biofarmacêuticas pobres, como baixa solubilidade e/ou permeabilidade aquosa. Tais características se tornam um desafio para o desenvolvimento de medicamentos biodisponíveis oralmente. A forma farmacêutica em cápsula líquida é uma boa alternativa para a distribuição oral de compostos fracamente solúveis em água, como é o caso do ibuprofeno (GULLAPALLI, 2010).

Como vantagem, as cápsulas líquidas são diferenciadas, pois oferecem elegância ao produto final, impedem adulterações no produto, por estarem seladas, e são bem aceitas pelos consumidores finais pela facilidade na deglutição, se comparado aos comprimidos, além de mascarar sabores desagradáveis de preenchimento (ROBERSON, 2016).

Entretanto, pela natureza muito dinâmica da forma de dosagem, o desenvolvimento e estabilidade das cápsulas líquidas sofrem desafios para fabricação e tempo de prateleira. Durante sua produção é necessária elevada temperatura para a selagem das duas partes que unem uma cápsula líquida. Desta forma, este pode ser um fator limitante para matérias de preenchimento e ativos sensíveis ao calor e umidade (DE LUCCA et al., 2005).

Outro ponto a ser considerado na escolha da cápsula líquida é que os equipamentos empregados na sua fabricação possuem custo bastante elevado e exigem conhecimento de técnicas específicas, se comparado à produção de cápsulas duras, conduzindo assim a terceirização da produção e consequente aumento do valor agregado ao produto final (COLE; CADÉ; BENAMEUR, 2008).

As interações entre o ativo e os excipientes de uma formulação podem afetar a estabilidade final do produto e biodisponibilidade e, consequentemente, sua eficácia terapêutica e segurança. Desta forma, é necessário conhecer a natureza química de cada excipiente da formulação, evitando possíveis degradações (GULLAPALLI, 2010).

2.17. Excipientes da formulação da cápsula líquida de ibuprofeno

Os excipientes são substâncias adjuvantes com diferentes propriedades no medicamento e podem ser classificados quanto à sua finalidade como conservantes, corantes, aromatizantes, edulcorantes, espessantes, emulsificantes, estabilizantes, antioxidantes, diluentes, umectantes, solventes, promotores de absorção e matrizes de liberação prolongada. De modo geral a função dos excipientes é converter um fármaco isolado em uma forma farmacêutica com perfil de liberação apropriado (SENA et al., 2014).

A cápsula líquida, objeto de estudo deste trabalho, possui como excipientes: macrogol (polietilenoglicol - PEG), hidróxido de potássio, gelatina, glicerol, sorbitol,

corante vermelho FD&C nº. 40 e água purificada (MEDICAMENTO: IBUPROFENO, 2019).

Uma das vantagens do uso de polietilenoglicol se deve a sua capacidade de ser miscível em todas as proporções com fluidos aquosos e compostos farmacêuticos pouco solúveis em cápsulas líquidas. O emprego de polietilenoglicol tem proporcionado melhor biodisponibilidade e menor variação da concentração plasmática de ativos de baixa biodisponibilidade e alta variação intrínseca. Entretanto, por ter alta solubilização em água, pode potencialmente levar à precipitação de compostos dissolvidos quando a formulação entra em contato com um ambiente aquoso *in vitro* ou *in vivo*. Este fenômeno é dose dependente, quanto menor for a dose do ativo, melhor será sua biodisponibilidade (GULLAPALLI, 2010).

O emprego de excipientes como propilenoglicol, glicerina e água em cápsulas líquidas é restrito a 10% do enchimento total da formulação, e podem atuar como plastificantes para a gelatina da concha. O mesmo ocorre no uso de polietilenoglicóis de baixo peso molecular, como PEG 200, PEG 300, sendo o uso de PEG 400 e 600 mais comuns (ROBERSON, 2016).

A solubilidade de alguns compostos em PEG pode ser melhorada em 40–400% usando um agente ionizante. Por exemplo, para fármacos ácidos como o ibuprofeno a solubilidade em PEG aumenta quando ocorre ionização parcial do ativo em íon hidróxido. A cápsula líquida, objeto deste estudo, possui em sua formulação o hidróxido de potássio, o qual foi utilizado como agente ionizante. Entretanto, este uso deve ser bastante consciente, pois agentes ionizantes são altamente reativos, podendo reagir adversamente com outros excipientes da formulação. Caso isto ocorra, recomenda-se sua substituição por algum sal, como acetato de amônio ou acetato de metal alcalino (GULLAPALLI, 2010).

Na formulação final é importante manter o pH entre 2,5 e 7,5, uma vez que em pHs abaixo de 2,5 a gelatina é hidrolisada e ocorre vazamento do líquido da cápsula; e em pHs acima de 7,5 podem ocorrer a formação de polietileno reticulado, ou seja, ligações cruzadas, diminuindo a solubilidade da cápsula líquida (GULLAPALLI, 2010).

Propilenoglicol ou glicerina são diluentes conceitualmente utilizados em preparações farmacêuticas. Existem evidências que a substituição por dietilenoglicol (DEG) levou a intoxicações graves nos últimos 70 anos. Embora o mecanismo de

toxicidade do DEG não tenha sido claramente elucidado, pesquisas sugerem que o metabolito ácido 2-hidroxi-etoxiacético (HEAA) seja o principal contribuinte para as toxicidades renais e neurológicas associadas ao seu uso. O uso de DEG como diluente de uma solução de sulfanilamida para produção de xarope culminou na Lei Federal de Alimentos, Drogas e Cosméticos de 1938 nos EUA, criando o papel regulador do FDA (BARR et al., 2007).

O sorbitol é um edulcorante largamente utilizado em formulações farmacêuticas, assim como os adoçantes (sacarina, aspartame e frutose). Por conferir um sabor adocicado, embora 50% menor que o da sacarose, geralmente é empregado em apresentações destinadas à pediatria. Existem relatos de reações adversas, que em quantidades excessivas, estão associadas a transtornos gastrointestinais como diarreia e dores abdominais. Portanto, nota-se assim a presença de excipientes com potencial para indução de reações adversas (BALBANI; STELZER; MONTOVANI, 2006).

O sorbitol tem outras funções como umectante, estabilizador, diluente e plastificante, sendo este último o motivo pelo qual foi empregado na formulação estudada (SENA et al., 2014).

O corante utilizado na cápsula de ibuprofeno é o vermelho 40 ou vermelho allura. Seu uso deu-se no início na década de 80 nos Estados Unidos, com o intuito de substituir o amaranto, que também conferia cor avermelhada, mas que havia sido banido do mercado. Inicialmente, este corante foi utilizado pela indústria alimentícia, sendo introduzido posteriormente na indústria farmacêutica. É o principal corante vermelho utilizado em bebidas por ser resistente ao ácido ascórbico, substância que pode desestabilizar compostos presentes no alimento. Além disso, é consideravelmente estável quando exposto ao calor, luz e pH entre 3 a 8 e na presença de oxigênio, não oxidando com facilidade (ESMAEILI et al., 2016).

O vermelho 40 faz parte do grupo de azocorantes, que representa cerca de 60% dos corantes disponíveis no mercado. Seu nome IUPAC é sal dissódico de 6-hidróxi-5-[(2-metóxi-5-metil-4-sulfofenil) 29 azo]-2-naftaleno sulfonato e por apresentar dois grupos sulfonados se torna bastante solúvel em água (STEFANI et al., 2009; SENA et al., 2014).

A toxicologia do corante vermelho 40 é bastante discutida na literatura, e muitos testes *in vitro* foram realizados para avaliar sua genotoxicidade, porém não

foram observados efeitos negativos (BASTAKI et al., 2017). Entretanto, em 2010, estudos feitos em camundongos e ratos pelo grupo de Shimada et al. demonstraram maior potência dos efeitos. Conseguiram avaliar o dano ao DNA causado pelo corante, e aferiram que o epitélio do cólon do camundongo é a parte mais afetada (SHIMADA et al., 2010).

A nova descoberta da toxicidade de corantes é a habilidade em inibir enzimas. Este processo pode ocasionar efeitos metabólicos, a exemplo do corante vermelho 40 que é capaz de inibir a enzima anidrase carbônica II, responsável pela conversão de CO_2 em HCO_3^- , levando a diminuição do pH e dilatação vascular, que podem resultar em doenças como a osteoporose e a acidose renal tubular (KHODARAHMI; KOOSHK; KHALEDIAN, 2015; ESMAEILI et al., 2016).

Particularmente os corantes que contém grupo químico AZO, como a tartrazina e o vermelho 40, podem determinar reações adversas em até 2% da população. Como corantes e edulcorantes não desempenham funções primordiais nos medicamentos, o seu uso deve ser evitado em produtos destinados a pacientes suscetíveis, como crianças e indivíduos com reconhecida alergia (STEFANI et al., 2009).

3. JUSTIFICATIVA

A caracterização do perfil de impurezas de uma substância e o desenvolvimento de métodos indicativos de estabilidade fundamentam-se não somente como um critério necessário aos cumprimentos da legislação vigente, mas também configuram um interesse sanitário. A instabilidade gera a presença de certos produtos de degradação que podem estar relacionados à ineficácia terapêutica ou exposição do consumidor a seus efeitos potencialmente tóxicos.

Este trabalho utilizou como objeto de estudo a cápsula líquida de ibuprofeno 400 mg, um medicamento consumido mundialmente em alguns casos de maneira indiscriminada. Diversos estudos já foram realizados com o ibuprofeno, inclusive sobre a química de degradação do ativo, entretanto, não se encontrou na literatura uma abordagem que contemple a caracterização do perfil de impurezas baseado no estudo de degradação forçada com desenvolvimento do método indicativo de estabilidade na forma farmacêutica de cápsulas líquidas.

As indústrias farmacêuticas geralmente desenvolvem um método indicativo de estabilidade com base no estudo de degradação forçada, o qual será aplicado para avaliar as impurezas no final do estudo de estabilidade de longa duração. Entretanto, o conhecimento científico obtido normalmente fica protegido e retido com o detentor da patente. Cabe aos pesquisadores, acadêmicos ou institucionais, desenvolverem o racional para publicar os métodos obtidos.

Por se tratar de uma normativa recentemente publicada, ainda existem muitas dúvidas em relação a condução do estudo de degradação forçada e o desenvolvimento de método indicativo de estabilidade. A falta de guias também é uma dificuldade encontrada para propor as condições analíticas de estresse necessárias. Por tal razão, a divulgação do conhecimento é de fundamental importância para os profissionais da área para o desenvolvimento de métodos com respaldo científico.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivos gerais

Caracterizar as principais impurezas obtidas com o estudo de degradação forçada do ibuprofeno em cápsula líquida por meio de metodologia indicativa de estabilidade.

4.2 Objetivos específicos

- Realizar revisão bibliográfica do ibuprofeno.
- Realizar o estudo de degradação forçada, incluindo condições de estresse como: hidrólise ácida e básica, oxidação, calor seco, umidade, fotólise e íons metálicos para se obter um perfil de degradação.
- Desenvolver um método analítico indicativo de estabilidade para identificar e quantificar os produtos de degradação por HPLC/DAD.
- Caracterizar os produtos de degradação encontrados por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. Amostras, reagentes e colunas

Foram adquiridas em farmácias de comércio regular nacional cerca de 200 cápsulas líquidas (10 cartuchos com 20 unidades cada) do mesmo lote de ibuprofeno 400mg. A substância química de referência do ibuprofeno (lote 1068, pureza de 100,0%) proveniente do Instituto Nacional Controle Qualidade em Saúde (INCQS) foi cedida pelo Núcleo de Ensaios Físicos e Químicos em Medicamentos (NFQM) do Instituto Adolfo Lutz (IAL).

Para o estudo de degradação forçada foram utilizados solventes grau P.A. e em análises HPLC e LC-MS-QTOF, os solventes grau cromatográfico Metanol (Vetec®) e Acetonitrila (Merck®). Foram utilizados: ácido clorídrico e fosfórico (Merck®), hidróxido de sódio (Synth®), ácido fórmico (Scharlau®), cloreto de ferro III (LabSynth®), peróxido de hidrogênio (Dinâmica®), cloreto de sódio (Synth®). O placebo foi formulado com os seguintes reagentes: hidróxido de potássio (Merck®), sorbitol, glicerol e polietilenoglicol 400 – PEG 400 (Synth®), gelatina (Poly Comercial®) e corante vermelho Allura (Cosmoquímica®).

Para filtração de fase móvel tanto no sistema HPLC quanto LC-MS-QTOF foram utilizadas membranas HV em PVDF com poros de 0,45 µm de diâmetro; para as amostras, previamente a injeção, foram utilizadas unidades filtrantes de 0,22 para LC-MS-QTOF e para HPLC de 0,45 µm de poro (ambas da marca Durapore, Millipore®).

As colunas cromatográficas foram fornecidas pelo NFQM e pelo Laboratório de Toxinas e Produtos Naturais de Algas (LTPNA) do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Universidade de São Paulo (USP). Para desenvolver a metodologia indicativa de estabilidade em HPLC/DAD foram testadas diferentes colunas: Spherisorb ODS2 4,6 x 150 mm, 5 µm (Waters®), Zorbax Eclipse Plus C18 3,0 x 100 mm, 1,8 µm; Zorbax Eclipse XDB- Rapid Resolution Phenyl 4,6 x 150 mm, 3,5 µm; Poroshell HPH-C18 4,6 x 150 mm, 4 µm (todas da Agilent®).

5.2. Equipamentos

Os equipamentos utilizados incluíram as balanças analíticas Mettler Toledo® MT5 e AL 204, o ultrassom Unique Ultrasonic Cleaner®, o agitador mecânico da Burrell® e a estufa de secagem Binder® do laboratório do NFQM do IAL. Para o estudo de fotodegradação utilizou-se a câmara de fotoestabilidade Nova Ética® modelo 424/CF, gentilmente disponibilizada pelo Laboratório de Desenvolvimento e Inovação Farmacotécnica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP.

Para o preparo das soluções foi utilizada água ultrapurificada em sistema Purelab Classic DI Elga®. Para o desenvolvimento do método indicativo de estabilidade: cromatógrafo líquido da marca Waters® modelo Alliance 2695 (Mildford, MA, USA), com degaseificador, forno de colunas, bomba quaternária, detector com arranjo de diodos (DAD), controlado pelo *software* Empower 3 (Waters Corp.) localizados no laboratório do NFQM.

Para caracterização do perfil de impurezas: cromatógrafo líquido Shimadzu Prominence® (Shimadzu, Kyoto, Japão) constituído por uma controladora, bomba quaternária, degaseificador, amostrador automático, DAD e *software* LC solutions. Este sistema é acoplado a um espectrômetro de massas de alta resolução, do tipo QTOF (MicroTOF QII, Bruker Daltonics, MA, EUA) com ionização por electrospray (ESI), e com *software* de processamento DataAnalysis, localizado no LTPNA.

As análises em LC-MS-QTOF foram analisadas tanto em modo negativo, quanto positivo. Realizou-se modo *Scan* com intervalo de 50 a 800 m/z com voltagem do capilar 4000V para positivo e 3500V para negativo e vazão do gás de secagem em 6,0 L.min⁻¹, temperatura do gás de secagem em 200°C e nebulizador a 35,0 psi para ambos. Ao realizar MS/MS no modo positivo, alterou-se para intervalo de 50 a 1200 m/z , selecionado 3 íons percursores com exclusão de m/z no intervalo de 50 a 150 m/z , mantendo os demais parâmetros.

5.3. Condições cromatográficas

Muitos foram os testes para o desenvolvimento do método indicativo de estabilidade. Foram testadas inúmeras combinações de fases móveis, com diferentes ácidos, sais, tampões, solventes. Diferentes fluxos, temperatura da

coluna, volumes de injeção. Foram realizadas corridas em modo isocrático e diferentes gradientes. As principais tentativas de desenvolvimento do método estão descritas no item 6.1 Ensaios Iniciais, em Resultados e Discussão.

As condições finais definidas como ideais para o método indicativo de estabilidade estão descritas na Tabela 6 para HPLC e na Tabela 7 para LC-MS-QTOF.

Tabela 6 - Condições cromatográficas finais do MIE para cápsula líquida de ibuprofeno no HPLC para estudo de degradação forçada

Condições Cromatográficas			
Equipamento	Waters Alliance 2695		
Coluna	Poroshell HPH-C18 4,6 x 150 mm, 4 µm (Agilent®)		
Temperatura da coluna	25 °C		
Detector	220 nm		
Fluxo	1,0 mL.min ⁻¹		
Volume de injeção	20 µL		
Fase móvel	A. Ácido Fosfórico 0,1%		
	B. Acetonitrila		
Gradiente	Tempo (min)	%A	%B
	0	65	35
	3	65	35
	6	50	50
	15	45	55
	19	35	65
	20	65	35
	25	65	35

Fonte: Próprio autor (2019)

Tabela 7 - Condições cromatográficas finais do MIE para cápsula líquida de ibuprofeno no LC-MS-QTOF para caracterização das impurezas

Condições Cromatográficas			
Equipamento	Shimadzu Prominence®		
Coluna	Poroshell HPH-C18 4,6 x 150 mm, 4 µm (Agilent®)		
Temperatura da coluna	25 °C		
Detector	220 nm		
Fluxo	1,0 mL.min ⁻¹		
Volume de injeção	20 µL		
Fase móvel	A. Ácido fórmico 0,1% B. Acetonitrila		
Gradiente	Tempo (min)	%A	%B
	0	65	35
	3	65	35
	6	50	50
	15	45	55
	19	35	65
	20	65	35
	25	65	35
Condições do Espectrômetro de massas			
Equipamento	MicroTOF QII, Bruker Daltonics		
Fluxo	0,2 mL.min ⁻¹		
Fonte de ionização	Electrospray (ESI), modo +		
Intervalo de m/z	50 a 800 em modo scan 50 a 1200 em MS/MS; seleção de 3 íons precursores		
Voltagem do capilar	4000 V		
Vazão do gás de secagem	6,0 L/min		
Temperatura do gás de secagem	200 °C		
Nebulizador	35,0 psi		

Fonte: Próprio autor (2019)

As mesmas condições cromatográficas foram aplicadas para a caracterização das impurezas por LC-MS-QTOF, exceto pela troca de ácido fosfórico 0,1% (pH 2,7) por ácido fórmico 0,1% na fase móvel, por ser uma solução indicada para a espectrometria de massas pela facilidade de volatilização. Além disso, ao entrar no espectrômetro de massas o fluxo é reduzido para 0,2 mL/min para facilitar o processo de formação de spray e consequente ionização da amostra.

5.4. Preparo do placebo

A formulação de uma forma farmacêutica é segredo de indústria. Embora a bula do medicamento traga os excipientes que o compõe, as quantidades não são declaradas. Segundo a bula da cápsula líquida de ibuprofeno 400 g, objeto deste estudo, seus constituintes são: macrogol, hidróxido de potássio, gelatina, glicerol, sorbitol, corante vermelho FD&C n.40 e água purificada (MEDICAMENTO: IBUPROFENO, 2019). Sabe-se que macrogol é também conhecido como polietilenoglicol (PEG), e um dos mais utilizados em formulações farmacêuticas é o PEG 400 (ROBERSON, 2016).

Como base para preparo do placebo foram utilizados os limites estipulados pelo FDA *“Inactive Ingredient Search for Approved Drug Products”*, em que são descritas as potências máximas por dose unitária dos excipientes de uma formulação, conforme a Tabela 8 (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2019).

Tabela 8- Potência máxima dos excipientes utilizados no preparo do placebo de cápsula líquida

Excipiente	Via de administração	Forma farmacêutica	CAS	Potência máxima por dose unitária
Sorbitol	Oral	cápsula líquida	50704	75,16 mg
Polietilenoglicol 400	Oral	cápsula líquida	25322683	324,5 mg
Glicerina (glicerol)	Oral	cápsula líquida	56815	63,29 mg
FD&C vermelho nº 40	Oral	cápsula líquida	25956176	0,07 mg
Hidróxido de potássio	Oral	cápsula líquida	1310583	25,6 mg
Gelatina	Oral	cápsula líquida	9000708	260,6 mg
Total				749,22 mg

Fonte: Food and Drug Administration (2019).

A soma destes excipientes corresponde a 749,22 mg e o peso médio da cápsula utilizada de ibuprofeno foi de 1281 mg, ou seja, a diferença de 531,78 mg corresponde a 400 mg do ativo de ibuprofeno e 131,78 mg de água purificada.

Desta forma, todos os excipientes da Tabela 8 foram pesados em sua potência máxima e misturados em balão volumétrico de 100 mL para a formulação de uma dose unitária. Para aqueles que se apresentava na forma líquida (sorbitol, PEG 400, glicerina e a água), a massa foi corrigida com a densidade e foram então

pipetados no balão. Para melhor solubilização dos excipientes, foram adicionados no balão na seguinte ordem: água, hidróxido de potássio, corante, PEG 400, sorbitol, glicerol e gelatina. A segunda diluição segue a mesma do preparo da amostra, 4 mL para balão volumétrico de 25 mL.

5.5. Preparo do diluente e padrão

Uma mistura de ácido fórmico 0,1% com acetonitrila (65:35 v/v) foi preparada como diluente para todas as amostras. Esta proporção se justifica pela condição inicial do gradiente. Para o padrão foi preparada uma solução estoque de 1 mg.mL^{-1} , diluindo 10 mg do padrão em balão volumétrico de 10 mL. A solução de injeção foi diluída em 4 mL para balão volumétrico de 25 mL, obtendo-se a concentração final de $0,16 \text{ mg.mL}^{-1}$. Este é o preparo de uma solução de padrão controle.

5.6. Preparo da amostra

Uma cápsula líquida de ibuprofeno 400 mg foi adicionada em balão volumétrico de 100 mL. Adicionou-se 20 mL do diluente e levou-se a ultrassom por 20 minutos, adicionando-se gelo para evitar aquecimento do banho. Em seguida, o balão permaneceu por mais 20 minutos em agitação mecânica. Após solubilização da cápsula, completou-se com diluente. Esta solução é diluída em 1 mL para balão volumétrico de 25 mL, obtendo-se concentração final de ibuprofeno em $0,16 \text{ mg.mL}^{-1}$.¹ Este é o preparo de uma solução amostra controle.

5.7. Estudos de Degradação Forçada

O estudo de degradação forçada foi conduzido expondo-se nas mesmas condições de estresse a cápsula líquida de ibuprofeno 400 mg, o padrão de ibuprofeno, o placebo formulado e um branco (diluente). As condições estipuladas para o estudo de degradação foram baseadas na RDC Nº 53/2015: hidrólise ácida e básica, oxidação, fotodegradação, degradação térmica, umidade e íons metálicos, conforme condições da Tabela 9.

Tabela 9 - Procedimento de degradação em cada condição no estudo de degradação forçada

Condição estressante	Modo de degradação	Temperatura	Coletas
Hidrólise ácida	Solução de HCl a 1M	ambiente	coletas de 0h, 5 dias, 8 dias, 10 dias
Hidrólise básica	Solução de NaOH a 0,1M (presença de ACN acima de 20%)	ambiente	coletas de 0h, 5 dias, 8 dias, 10 dias
Oxidação	Solução de H ₂ O ₂ a 3,0%	ambiente	coletas de 0h, 3h, 24h
Fotodegradação	Câmara de fotoestabilidade Luz branca- 1,2 milhões de lux/hora Luz UV 200 watts-hora por m ²	ambiente	Um e Dois ciclos
Calor seco	Em estufa	60°C	coletas de 0h, 24h, 48h, 6 dias, 10 dias
Umidade	Dessecador com solução salina saturada. Em estufa. UR 75%	30°C	coletas de 0h, 5 dias, 10 dias
Íons Metálicos	Solução de FeCl ₃ a 0,05M	ambiente	24h

Nota: UR umidade relativa

Fonte: Próprio autor (2019)

Para as condições de hidrólise básica, ácida, oxidação e íons metálicos, foi adicionado 10% do volume dos balões volumétricos das soluções degradantes, respectivamente HCl 1M, NaOH 0,1M, H₂O₂ 3%, FeCl₃ 0,05M. Em seguida, adicionou-se 5% de acetonitrila para solubilização da cápsula. Assim como descrito no preparo da amostra, os balões ficaram em ultrassom por 20 minutos e mais 20 minutos em agitação magnética.

Para a coleta de 0h, os balões foram diluídos imediatamente para 0,16 mg.mL⁻¹. Porém para os demais tempos aguardou-se atingir o momento da coleta para diluição completa da solução, com a solução diluente.

Na degradação oxidativa foi empregado 10% de metanol para evitar a formação de compostos secundários, isto é usualmente utilizado (BAERTSCHI; ALSANTE; REED, 2011). As amostras de hidrólise não foram neutralizadas, pois pode ocasionar reações secundárias. Todos os ensaios realizados de degradação forçada foram desenvolvidos com proteção de luz.

Para o estudo de fotodegradação, as amostras foram expostas a luz branca e a luz UV concomitantemente, em câmara de fotoestabilidade com temperatura controlada de 25°C. Tanto o padrão, a amostra e o placebo foram acondicionados em balão volumétrico, e os controles revestidos com papel alumínio.

Realizaram-se dois experimentos, expondo as amostras a um ciclo de luz branca, que equivale a 1200 klux.hora e também a dois ciclos consecutivos de luz (2x 1200 klux.hora). A câmara tem a capacidade de realizar ao mesmo tempo a exposição em luz UV, em um ciclo que equivale a 200 Watt.hora/m², e também a dois ciclos consecutivos (2 x 200Watt.hora/m²).

Para o ensaio de umidade, a amostra, o placebo e o padrão foram acondicionados em balão volumétrico aberto dentro de dessecador. Este se encontrava fechado com solução salina saturada de NaCl na parte inferior (abaixo do suporte para os frascos). Esta solução foi preparada pesando-se 400g de NaCl em 1000 mL de água. O dessecador foi levado à estufa com temperatura controlada de 30°C. Esta foi uma alternativa proposta por Connors (1986) ainda comumente utilizada na ausência de estufas com controle de umidade para degradação com calor úmido (CONNORS; AMIDON; STELLA, 1986).

Conforme as soluções foram sendo obtidas de cada condição, em cada tempo de coleta, foram analisadas por HPLC/DAD. Estas mesmas amostras foram analisadas em LC-MS-QTOF com o intuito de caracterizar e identificar as substâncias degradadas encontradas.

Os tempos máximos de exposição, ou seja, o *end-point* para cada condição estressante, principalmente de 10 dias para a hidrólise ácida, básica, calor seco e umidade, foram definidos com base no guia da WHO TRS 929 – Anexo 5. Este guia ressalta que se após 10 dias de exposição, em determinadas condições, não ocorrer degradação, é uma indicação de que o medicamento pode ser considerado estável (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2005).

Muito embora a RDC Nº 53/2015 exija uma degradação mínima do ativo em 10%, prolongar excessivamente o período de degradação, para a obtenção desta porcentagem, pode não condizer com a realidade de degradação do medicamento em prateleira. Ademais, provavelmente serão encontrados compostos de degradação secundários, o qual não é a intenção deste estudo, a menos que se tenha o conhecimento que são estes os compostos relevantes encontrados no estudo de estabilidade de longa duração.

5.8. Preparo da curva analítica

Para a solução mãe pesou-se 10 mg de ibuprofeno para um balão de 10 mL. Em seguida, diluiu-se 4 mL para balão volumétrico de 25 mL, e esta foi a solução de partida para as demais diluições. Com micropipeta, aliquotou-se 20, 25 e 50 μL para diferentes balões de 50mL e 20, 30, 40 μL para diferentes balões de 10 mL, obtendo-se as concentrações desejadas da curva analítica: 0,064, 0,08, 0,16, 0,32, 0,48, 0,64 $\mu\text{g/mL}$ de ibuprofeno.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. Ensaios iniciais

O ibuprofeno é uma molécula ácida com $pK_a = 4,85$, e em pH abaixo deste valor, o ibuprofeno se encontra na forma molecular (Figura 3). Em cromatografia de fase reversa, a fase estacionária possui caráter apolar, enquanto para a fase móvel são selecionados aditivos mais polares. Para que o ibuprofeno tivesse uma boa interação com a coluna cromatográfica, deu-se preferência para trabalhar na sua forma molecular.

Desta forma, selecionou-se uma fase móvel com caráter ácido. Geralmente é selecionado um pH com duas unidades de distância do pK_a para evitar formação de picos cromatográficos duplos (espécies ionizadas e não ionizadas). Portanto, a fase móvel selecionada deveria ter um pH em torno de 2,8.

Figura 3 - pK_a do ibuprofeno

Fonte: ChemAxon (2019)

Assim, a primeira escolha da fase móvel para desenvolvimento do método indicativo de estabilidade foi o ácido fórmico 0,1%, o qual possui pH em torno de 2,7. Também se testou tampão fosfato de potássio monobásico com ajuste de pH em 3,0. Entretanto, priorizou-se o ácido fórmico 0,1% por ser uma solução que possui compatibilidade, tanto em HPLC/DAD quanto LC-MS-QTOF. Ambos foram testados em associação com acetonitrila, por ser um solvente orgânico com alto poder

eluotrópico. No sentido de facilitar a eluição e diminuir a resistência da fase móvel pela fase estacionária, utilizou-se inicialmente uma temperatura de 30°C na coluna.

De acordo com o método de teor de ibuprofeno da Farmacopeia Americana 2019, tanto para cápsulas quanto para suspensão oral, a detecção de ibuprofeno é feita em 254 nm, selecionando-se assim este comprimento de onda inicialmente.

O racional utilizado para o desenvolvimento do MIE foi baseado principalmente nas características físico-químicas do ibuprofeno, porém não deixando de levar em consideração seus prováveis produtos de degradação. A escolha das fases estacionárias testadas justifica-se pela própria estrutura da molécula, desta forma optou-se por colunas com interações aromáticas e hidrofóbicas, devido a alta lipofilicidade do ibuprofeno, LogP 3,84.

Neste sentido, o primeiro método testado possuía as condições cromatográficas da Tabela 10.

Tabela 10 - Condições cromatográficas em HPLC/DAD para análise de ibuprofeno cápsulas líquidas

Condições cromatográficas	
Equipamento	HPLC-UV/DAD (Waters)
Coluna	Spherisorb ODS2 150 mm x 4,6 mm 5 µm
Temperatura da coluna	30° C
Detecção	254 nm
Fluxo	1,0 mL/min
Volume de injeção	20 µL
Tempo de corrida	23 min
Tempo de retenção	14 min
FM	Ácido Fórmico 0,1%
	Acetonitrila

Fonte: Próprio autor (2019)

Uma das grandes dificuldades encontradas foi a solubilização da amostra. Foram testadas diversas combinações de solventes capazes de solubilizar a cápsula líquida, sem a necessidade de cortá-la, para evitar a perda de ativo. Dentre os diluentes testados estavam água purificada; água: acetonitrila (1:1 v/v); água: metanol (1:1 v/v); somente acetonitrila; éter: água (0,5:0,95); apenas solução ácido fórmico 0,1%; e solução ácido fórmico 0,1%: acetonitrila (1:1). Como o ibuprofeno é solúvel em clorofórmio e etanol, estes solventes também foram testados como diluentes.

A mistura que melhor solubilizou a cápsula foi justamente a utilizada na fase móvel com acetonitrila e ácido fórmico 0,1% (1:1). Diluiu-se uma cápsula 400mg para balão volumétrico de 100 mL durante 45 minutos de ultrassom, resultando em concentração de 4 mg/mL. O padrão foi preparado com mesmo diluente e mesma concentração final.

Inicialmente testou-se um gradiente com início de 95% da proporção aquosa até atingir 5% ao final da corrida, com retorno para as condições iniciais, como observado na Figura 4.

Figura 4 - Cromatogramas de padrão e amostra em gradiente exploratório (início de 95% ácido fórmico (0,1%) e acetonitrila (5%). Condições cromatográficas conforme Tabela 10.

Fonte: Próprio autor (2019)

O pico apresentou assimetria menor que dois e boa reprodutibilidade. Além deste teste inicial, outras condições foram avaliadas, trocando o gradiente exploratório para início de 90% de ácido fórmico até 10%. Testou-se também em modo isocrático (Figura 5) nas proporções de ACN: Ácido fórmico (0,1%) em 70:30; 60:40 e 50:50. As condições com maior porcentagem de fase aquosa apresentaram alargamento dos picos.

Figura 5 - Soluções padrões testadas em modo isocrático com fase móvel ACN: Ác. Fórmico a) 70:30; b) 60:40; c) 50:50. Condições cromatográficas conforme Tabela 10, com redução do tempo de corrida

Fonte: Próprio autor (2019)

O método isocrático não é o mais indicado para o desenvolvimento de um método indicativo de estabilidade, pois dificulta a separação de moléculas de polaridades semelhantes, muito frequentes em estudos de degradação forçada. Geralmente ocorrem coeluições, entretanto, esta ainda era uma etapa inicial dos testes que contribuiu com informações da molécula sob diferentes proporções de fase móvel.

Para determinar-se 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. A maneira mais eficaz de se desafiar o MIE é realizando estudos de estresse com consequente degradação do ativo e formação de produtos de degradação reais.

Alguns ensaios prévios de degradação térmica foram realizados para avaliar o comportamento do ativo. Iniciou-se com a amostra em cápsula líquida e o padrão de ibuprofeno em estufa a 70°C por 48h. A princípio as amostras foram expostas em placa de petri, dentro e fora do blister. Na Figura 6 pode-se observar que a amostra em blister funde em 70°C no período de 48h, entretanto a cápsula líquida exposta demonstra apenas início de fundição.

Figura 6 - Cápsula líquida dentro e fora do blister após exposição térmica de 70°C por 48h.

Fonte: Próprio autor (2019)

Uma das hipóteses para a diferença de estabilidade da amostra seria um microambiente aquecido proporcionado pelo blister que contém alumínio, metal que favorece a condução de calor. Essas amostras foram diluídas e testadas em HPLC/DAD. Em relação às condições cromatográficas da Tabela 10, ampliou-se a corrida para 33 minutos e utilizou-se gradiente exploratório com início de 90% de ácido fórmico (0,1%) e 10% de acetonitrila, retornando as condições iniciais ao final da corrida. Os resultados podem ser visualizados na Figura 7.

Figura 7 - Cromatogramas de testes em degradação térmica a 70°C. a) solução padrão em 48h; b) cápsula livremente exposta 48h; c) cápsula em blister 48h.

Fonte: Próprio autor (2019)

De acordo com os resultados obtidos, os picos gerados no cromatograma do padrão também são encontrados na amostra (impurezas desconhecidas 2, 7, 8 e 10). Comparando o cromatograma da cápsula líquida livremente exposta, com a cápsula em blister, neste último são encontrados também as impurezas desconhecidas 4 e 11. Estas mesmas amostras foram testadas por LC-MS-QTOF.

Existem controvérsias a respeito do emprego da amostra dentro e fora da embalagem primária durante a degradação térmica. Como os resultados deste ensaio podem trazer informações sobre a interação da amostra com a embalagem, pode ser vantajoso no período de desenvolvimento do produto para melhor selecionar o armazenamento. Entretanto não é o foco deste estudo.

Adicionalmente, o estudo de extraíveis e lixiviáveis já preveem as possíveis impurezas associadas à embalagem, e considerá-las no estudo de degradação forçada pode gerar incertezas desnecessárias para este momento do estudo. Assim para os ensaios posteriores foram previstos apenas a degradação com a cápsula livremente exposta diretamente em balão volumétrico, para evitar qualquer perda da cápsula.

Outros ensaios foram realizados a título de investigação. As cápsulas líquidas foram expostas a degradação de hidrólise ácida com HCl e básica com NaOH. Foram preparadas soluções em diferentes molaridades (0,01M; 0,1M e 1M) com coleta nos tempos 0, 1, 2, 3, 4, 5, 24, 48h. Todas as amostras foram solubilizadas com o mínimo de volume de ACN e Ác. Fórmico 0,1% (20% do balão) completando o balão com as soluções degradantes. Em seguida, realizou-se diluição de 1:10, injetando as soluções na concentração de 0,4 mg/mL. Para as soluções ácidas e básicas a 1M, corrigiu-se o pH da solução final para 4, por motivos de conservação do sistema cromatográfico. Realizou-se concomitantemente a degradação do padrão de ibuprofeno nas mesmas condições e concentrações das amostras. Todo procedimento foi realizado com proteção da luz.

Tanto as amostras de degradação térmica a 70°C em estufa, quanto de hidrólise ácida e básica, foram injetadas em sistema LC-MS-QTOF em gradiente exploratório, iniciando com 90% de ácido fórmico (0,05%) e 10% de acetonitrila, conforme as condições cromatográficas da Tabela 11. As piores condições de degradação ácida e básica foram as soluções de HCl e NaOH 1M por 48h. Os resultados podem ser observados nas Figuras 8, 9 e 10.

Tabela 11 - Condições cromatográficas testes para LC-MS-QTOF em modo negativo para degradação ácida e básica.

Condições cromatográficas	
Equipamento	MicroTOF-QII LC/MS (Brucker)
Coluna	Luna® C18 150 mm x 2 mm 3 µm
Temperatura da coluna	30° C
Detecção	254 nm
Fluxo	0,2 mL/min
Volume de injeção	1 µL
Tempo de corrida	30 min
FM	Ácido Fórmico 0,05%
	Acetonitrila

Fonte: Próprio autor (2019)

Figura 8 - Cromatograma e extração dos íons da amostra de ibuprofeno 0,4mg/mL degradação térmica a 70°C por 48h. Condições cromatográficas conforme Tabela 11.

Fonte: Próprio autor (2019)

Figura 9 - Cromatograma e extração dos íons da amostra de ibuprofeno 0,4mg/mL degradada com NaOH 1M por 48h. Condições cromatográficas conforme Tabela 11.

Fonte: Próprio autor (2019)

Figura 10 - Cromatograma e extração dos íons da amostra de ibuprofeno 0,4mg/mL degradada com HCl 1M por 48h. Condições cromatográficas conforme Tabela 11.

Fonte: Próprio autor (2019)

Na Figura 8, na degradação térmica da amostra a 70°C por 48h ocorre a formação de um segundo pico, que quando extraído fornece a m/z de 369,1990. Em hipótese este poderia ser um produto formado da composição de ibuprofeno (205,1222 m/z) com sorbitol (182,17 g/mol), o qual é excipiente da formulação de ibuprofeno.

Como observado na Figura 9 e 10, os íons extraídos estão no mesmo tempo de retenção da molécula de ibuprofeno, ou seja, este é um grande indício que está ocorrendo formação de dímeros com aduto de sódio (433,2356 m/z e 433,2352 m/z) e quebra formando complexos gasosos, mas não se pode afirmar que são produtos de degradação.

Após estes ensaios exploratórios iniciais, tanto por HPLC/DAD quanto por espectrometria de massas, priorizou-se a otimização do ensaio por HPLC/DAD, realização do estudo de degradação forçada completo, determinação dos produtos de degradação relevantes e a utilização da espectrometria de massas como ferramenta para elucidação das estruturas químicas das principais impurezas relacionadas.

6.2. Segunda etapa dos ensaios

O desenvolvimento de método para a análise de ativos farmacêuticos por HPLC é uma tarefa desafiadora. Envolve a triagem de uma gama de parâmetros cromatográficos para gerar resolução suficiente e separações robustas. Embora existam muitas abordagens para o desenvolvimento de métodos, como “um fator por vez” e o *Quality by Design*, os objetivos e os fatores usados para otimizar as separações são os mesmos.

Dentre os fatores que afetam a resolução cromatográfica está a eficiência (influenciada pelo tamanho das partículas, morfologia das partículas e comprimento da coluna), fator de retenção (controlado pela resistência do solvente) e um dos mais influentes, a seletividade (controlada pela escolha da fase estacionária, o tipo de modificador orgânico, a inclinação do gradiente, a vazão e a temperatura da fase estacionária e pela fase móvel).

6.2.1. Seleção da coluna cromatográfica

Diante do exposto optou-se por substituir a coluna previamente utilizada em ensaios iniciais, Spherisorb ODS2 4,6 x 150 mm, 5 μm (Waters®), por uma fase estacionária com características mais modernas. A coluna poroshell (Agilent®) HPH-C18 4,6 x 150 mm, 4 μm foi selecionada por apresentar a tecnologia chamada de

core-shell ou *fused-core* de núcleo de sílica sólido e uma camada externa porosa, quando comparada com as colunas tradicionais totalmente porosas. Tal característica confere maior eficiência cromatográfica, quando comparada com partículas porosas de mesmo tamanho, e possibilita separações rápidas e de alta resolução. Promove redução da difusão longitudinal de Eddy, ou seja, caminhos de fluxo uniformes, baixa resistência à transferência de massa, menor difusão longitudinal, permitindo análises mais rápidas com maiores fluxos.

Além disso, a coluna selecionada Poroshell HPH-C18 (*High pH*) permite a análise com pHs mais altos, com range de 2 a 10. Tal fato evita a necessidade de neutralização das amostras, permitindo vida útil longa e menos alterações na coluna.

6.2.2. Seleção do comprimento de onda

O comprimento de onda, que antes era 254 nm, passou para 220 nm. Após realizar leitura em varredura DAD, de 190 a 400nm, observou-se que este é o comprimento de onda de maior absorção do ibuprofeno e da maioria das impurezas (Figura 11). Esta alteração permitiu que o pico de ibuprofeno ficasse mais intenso (maior número de pratos teóricos), e apresentasse pureza de pico.

Anteriormente, a amostra estava sendo injetada a 4mg/mL e ainda assim o pico não tinha boa intensidade, com o uso de um comprimento de onda em 220 nm, absorção máxima do ibuprofeno, a concentração injetada passou para 0,16mg/mL com melhora na sensibilidade.

Figura 11 - Absorção máxima em 220 nm para maioria das impurezas com fase móvel constituída de ácido fórmico e acetonitrila

Fonte: Próprio autor (2019)

6.2.3. Seleção da fase móvel

Ao selecionar o comprimento de onda 220 nm, a linha de base apresentou mudanças. A condição cromatográfica com a coluna Poroshell e a fase móvel com ácido fórmico 0,1% e acetonitrila resultaram em uma queda na linha de base que acompanha a proporção do gradiente (Figura 12). Isto ocorre, pois o ácido fórmico possui um cut-off de absorção alto em 210 nm, muito próximo do comprimento de onda selecionado em 220 nm, ou seja, ele possui absorção nesta faixa do UV. Além disso, poucos picos degradados aparecem no cromatograma.

Figura 12 - Mudança na linha de base devido alteração do comprimento de onda para 220nm e uso da fase móvel ácido fórmico 0,1% e acetonitrila

Fonte: Próprio autor (2019)

Por esta razão, optou-se por trocar a fase móvel pelo ácido fosfórico 0,1%, que possui cut-off menor que 200 nm e ainda assim é capaz de acidificar a fase móvel (Figura 13). Além disso, o cut-off mais baixo permite que picos pouco intensos de degradação possam aparecer no cromatograma, o qual pode ser melhor observado na Figura 13 e seu zoom na Figura 14. Como vantagem, a pressão do sistema também diminuiu.

Figura 13 - Alteração da fase móvel para ácido fosfórico 0,1% e acetonitrila

Fonte: Próprio autor (2019)

Figura 14 - Zoom do cromatograma exibido na Figura 13

Fonte: Próprio autor (2019)

Após a substituição da composição de fase móvel de ácido fórmico por ácido fosfórico, foi verificado novamente o comprimento máximo de absorção do ibuprofeno e suas impurezas em DAD, para garantir que a absorção não era influência do ácido fórmico na fase móvel. Como observado na Figura 15, com exceção do pico 2, os demais picos mantêm alta absorbância em 220 nm.

Figura 15 - Absorção máxima em 220 nm para maioria das impurezas com fase móvel constituída de ácido fósfórico e acetonitrila

Fonte: Próprio autor (2019)

6.2.4. Seleção da temperatura da coluna

Foi realizada uma alteração da temperatura da coluna, de 30°C para temperatura ambiente em 25°C. Foi observado que após mudanças anteriores de coluna cromatográfica e fase móvel, passou a ocorrer coeluição de impureza desconhecida com o pico principal. Em temperatura ambiente possuem resolução acima de 1,5.

6.2.5. Seleção do gradiente

O tempo de corrida foi prolongado para 1h para garantir que todos os produtos de degradação fossem resolvidos e aparecessem com uma mudança mais lenta de gradiente. Em seguida, foram realizados diversos ensaios com 45 minutos de corrida. Os mesmos produtos de degradação foram bem resolvidos. Após alguns

testes com mais amostras degradadas, observou-se que a maior parte dos picos que apareciam depois da retenção do ibuprofeno, eram relativos ao placebo e ao branco. Desta forma, o gradiente foi alterado novamente, estabelecendo-se por fim 25 minutos de corrida com resolução mínima de 1,5 entre todos os picos.

A redução para uma corrida de 25 minutos confere rapidez ao estudo. Este tempo foi possível devido ao emprego da coluna poroshell, que agrega eficiência ao método desenvolvido, além das mudanças simultâneas feitas ao gradiente. Após diversas tentativas, o novo gradiente foi capaz de resolver os pares críticos. Muito embora nem todas as impurezas sejam relevantes, a melhor resolução entre elas garante um método mais seletivo. Na Tabela 6 e na Tabela 7, previamente demonstrada em Materiais e Métodos, é possível observar as condições cromatográficas finais e o gradiente definido como melhor condição para separação dos componentes.

6.3. Curva analítica

Para quantificar os produtos de degradação encontrados foi utilizado padrão de ibuprofeno na concentração da especificação, que no caso é o limite de identificação. Conforme a bula do medicamento estudado, a dose máxima diária de ibuprofeno é de 1200mg. De acordo com a Tabela 3 e com base na calculadora disponível pela Coordenação de Registro de Insumos Farmacêuticos Ativos (COIFA) da ANVISA, o limite de notificação, identificação e qualificação são respectivamente 0,05%, 0,17% e 0,2% (MEDICAMENTO: IBUPROFENO, 2019; COORDENAÇÃO DE REGISTRO DE INSUMOS FARMACÊUTICOS ATIVOS, 2020).

Conforme a RDC N° 166/2017, o limite de quantificação deve ser menor ou igual ao limite de notificação. Assim para a construção da curva analítica, optou-se por testar um ponto abaixo do limite de notificação, sendo o primeiro ponto 0,04% (BRASIL, 2017b).

O limite de identificação deve ser o ponto 100% da curva analítica. Embora o limite de identificação seja 0,17%, adotou-se o valor 0,2% para facilitar o preparo das diluições, e ao mesmo tempo 0,17% está dentro da faixa de trabalho. Considerando 0,2% de 0,16 mg/mL correspondente a concentração de trabalho do ativo (0,32

µg/mL), os pontos definidos foram de 0,04%, 0,05%, 0,1%, 0,2%, 0,3%, 0,4%, de acordo com a Tabela 12, Figura 16 e Figura 17.

Tabela 12 - Curva analítica com seis concentrações do ativo e suas porcentagens e área do pico correspondente

Ponto da Curva analítica	Faixa de trabalho (%)	Concentração de trabalho (%)	µg/mL (teórico)	µg/mL (real)	Área do pico
1	20%	0,04%	0,064	0,0644864	3091
2	25%	0,05%	0,08	0,080608	3842
3	50%	0,10%	0,16	0,161216	7223
4	100%	0,20%	0,32	0,322432	14257
5	150%	0,30%	0,48	0,483648	22194
6	200%	0,40%	0,64	0,644864	29146

Fonte: Próprio autor (2020)

Figura 16 - Representação gráfica das respostas em função da concentração do analito, equação da reta e coeficiente de determinação

Fonte: Próprio autor (2020)

Figura 17 - Sobreposição dos cromatogramas da curva analítica, da menor concentração até a concentração máxima

Fonte: Próprio autor (2020)

6.4. Amostra controle

Foram injetadas amostras sem degradação, as amostras controles, como referência de comparação para aquelas que foram estressadas. Estas foram utilizadas para fins de cálculo da queda do teor do ibuprofeno e na formação dos produtos de degradação.

Estas amostras apresentaram alguns produtos de degradação em baixas concentrações, os quais se tornam expressivos em condições de estresse. Estas áreas foram descontadas no cálculo, ou seja, a concentração definida como aumento na degradação é a subtração do valor final menos o inicial.

As amostras controle também foram utilizadas para marcar o tempo de retenção relativo (TRR) de cada impureza desconhecida em relação ao tempo de retenção do ibuprofeno (Tabela 13 e Figura 18). A impureza desconhecida TRR 1,28 aparece apenas na condição de fotodegradação.

Tabela 13 - Tempo de retenção relativo das impurezas desconhecidas encontradas

Pico	Tempo de retenção (TR)	Tempo de Retenção Relativo (TRR)
Imp 1	5,673	0,49
Imp 2	7,595	0,66
Imp 3	7,818	0,68
Imp 4	8,434	0,73
Imp 5	8,669	0,75
Imp 6	9,579	0,83
Imp 7	10,982	0,95
Ibuprofeno	11,570	1,00
Imp 8	14,804	1,28

Nota: Imp – impureza desconhecida

Fonte: Próprio autor (2020).

Figura 18 - Cromatograma das amostras controles, sem degradação. A: Cromatograma do produto acabado; B: Cromatograma do padrão; C: Cromatograma do placebo; D: Cromatograma do diluente. Ordem por tempo de retenção dos picos encontrados no produto acabado: TRR 0,49; TRR 0,66; TRR 0,68; TRR 0,73; TRR 0,75; TRR 0,83; TRR 0,95.

Nota: TRR – tempo de retenção relativo

Fonte: Próprio autor (2020)

Na amostra controle foram considerados e integrados todos os picos, entretanto, apenas os picos TRR 0,75 e TRR 0,95 se encontravam acima do limite de notificação.

O pico de ibuprofeno apresentou pureza espectral satisfatória para a amostra controle no produto acabado, uma vez que o *purity angle* foi menor que *purity threshold*, indicando não haver coeluição com os produtos de degradação, como demonstrado na Figura 19.

Figura 19 - Gráfico de pureza espectral do ativo ibuprofeno na amostra controle do produto acabado

Nota: PA: purity angle; TH: purity threshold

Fonte: Próprio autor (2020)

6.5. Estudo de degradação forçada

6.5.1. Degradação por hidrólise ácida

Muitos medicamentos possuem água em sua formulação, fazendo com que a hidrólise seja uma degradação muito comum de ocorrer. Geralmente as indústrias farmacêuticas priorizam o estudo de degradação com a condição de hidrólise ácida e básica em preparações de soluções e suspensões (BAERTSCHI; ALSANTE; REED, 2011).

Muito embora a cápsula líquida de ibuprofeno seja considerada uma forma farmacêutica sólida, possui água como excipiente em sua formulação, sendo assim, muito importante submetê-la aos testes de hidrólise.

Após 10 dias de exposição em meio ácido (HCl 1M), o produto acabado apresentou degradação de 6,84% e o IFA de 3,17%, demonstrando baixa susceptibilidade do ativo nesta formulação em meio ácido. Tal estabilidade pode ser justificada pela presença de hidróxido de potássio na formulação, o qual mantém o pH entre 2,5 a 7,5, prevenindo degradações mais intensas do ativo. Em pHs abaixo de 2,5, a gelatina é hidrolisada e ocorre vazamento do líquido da cápsula (GULLAPALLI, 2010).

Na Figura 20 é possível observar a presença das impurezas desconhecidas. Foram considerados os picos acima do limite de notificação de 0,05%.

Figura 20 - Cromatograma da degradação por hidrólise ácida. A: Cromatograma do produto acabado; B: Cromatograma do padrão; C: Cromatograma do placebo; D: Cromatograma do diluente. Ordem por tempo de retenção dos picos encontrados no produto acabado: TRR 0,49; TRR 0,68; TRR 0,73; TRR 0,75; TRR 0,95.

Nota: TRR – tempo de retenção relativo

Fonte: Próprio autor (2020)

Conforme Jahan et al. (2014), em um estudo realizado de degradação forçada com comprimido em associação de ibuprofeno e paracetamol, verificou-se que o primeiro permaneceu completamente estável após 24 horas de exposição em meio ácido (HCl 1M) (JAHAN et al., 2014). O mesmo foi observado em um estudo de

desenvolvimento de método para determinação simultânea de ibuprofeno, arginina e suas substâncias relacionadas. O ativo ibuprofeno se manteve estável em meio ácido HCl 0,1M exposto por 24h (HUIDOBRO; RUPÉREZ; BARBAS, 2006). Tal fato corrobora com a escolha da fase móvel em meio ácido, com pH ao redor de 2,8, tanto para as análises em HPLC/DAD (ácido fosfórico 0,1%) quanto em LC-MS-QTOF (ácido fórmico 0,1%).

O pico de ibuprofeno apresentou pureza espectral satisfatória no produto acabado por hidrólise ácida, indicando não haver coeluição com os produtos de degradação, como demonstrado na Figura 21.

Figura 21 - Gráfico de pureza espectral do ativo ibuprofeno por hidrólise ácida no produto acabado

Nota: PA: purity angle; TH: purity threshold

Fonte: Próprio autor (2020)

6.5.2. Degradação por hidrólise básica

Além das impurezas relatadas na hidrólise ácida, na hidrólise básica existe a formação de uma impureza desconhecida a mais, a TRR 0,66. A impureza TRR 0,75 demonstra maior formação em meio básico, com 0,355% se comparada a degradação de 0,272% em meio ácido. A somatória das impurezas também é superior com 2,487% para a hidrólise básica e de 1,483% para ácida.

A degradação do ativo no produto acabado apresentou 4,88% em relação a amostra controle e o IFA de 1,16%. Sendo uma degradação abaixo de 10%, assim

como na hidrólise ácida, não apresenta alta susceptibilidade da formulação estudada em meio básico.

Na Figura 22 é possível observar a presença das impurezas desconhecidas. Foram considerados os picos acima do limite de notificação de 0,05%.

Figura 22 - Cromatograma da degradação por hidrólise básica. A: Cromatograma do produto acabado; B: Cromatograma do padrão; C: Cromatograma do placebo; D: Cromatograma do diluente. Ordem por tempo de retenção dos picos encontrados no produto acabado: TRR 0,49; TRR 0,66; TRR 0,73; TRR 0,75; TRR 0,95; TRR 0,95.

Nota: TRR – tempo de retenção relativo

Fonte: Próprio autor (2020)

Em outros estudos com degradação forçada de ibuprofeno na forma de comprimidos, foi relatado alta degradação do produto acabado em meio alcalino em exposição de NaOH 1M por 24 horas (JAHAN et al., 2014). Isto ressalta a necessidade do estudo de degradação forçada ser realizado individualmente para cada apresentação e formulação, tendo os excipientes grande influência no controle da estabilidade do medicamento (CORY; HARRIS; MARTINEZ, 2010).

O pico de ibuprofeno apresentou pureza espectral satisfatória no produto acabado por hidrólise básica, indicando não haver coeluição com os produtos de degradação, como demonstrado na Figura 23.

Figura 23 - Gráfico de pureza espectral do ativo ibuprofeno por hidrólise básica no produto acabado

Nota: PA: purity angle; TH: purity threshold

Fonte: Próprio autor (2020)

6.5.3. Degradação por oxidação

Juntamente com a hidrólise ácida e básica, a reação de oxidação em formulações farmacêuticas são as principais responsáveis pela diminuição do ativo e por consequência maior formação de produtos de degradação em medicamentos. As reações de oxidação são muito difíceis de se prever, principalmente se associadas a altas temperaturas. Isso se justifica em razão da complexidade natural da reação e formação de compostos intermediários termicamente instáveis, que podem se decompor em diferentes vias (BAERTSCHI; ALSANTE; REED, 2011).

Neste estudo, a reação de oxidação ocorreu com o uso de H_2O_2 a 3% em solução a temperatura ambiente. A dinâmica da reação é diretamente relacionada a quantidade de oxigênio dissolvido em solução. Em altas temperaturas a velocidade de reação tende a diminuir, pela diminuição de oxigênio dissolvido. Por esta mesma razão, a reação foi realizada apenas durante 24h, pois após este período ocorre perda de oxigênio na solução (BAERTSCHI; ALSANTE; REED, 2011).

A degradação do ativo por oxidação no produto acabado apresentou queda de 6,86% enquanto no IFA foi de 0,89%. Em relação aos demais ensaios de degradação a impureza TRR 0,49 demonstrou a maior porcentagem na oxidação, com 0,166%.

Na figura 24 é possível observar a presença das impurezas desconhecidas. Foram considerados os picos acima do limite de notificação de 0,05%.

Figura 24 - Cromatograma da degradação por oxidação. A: Cromatograma do produto acabado; B: Cromatograma do padrão; C: Cromatograma do placebo; D: Cromatograma do diluente. Ordem por tempo de retenção dos picos encontrados no produto acabado: TRR 0,49; TRR 0,66; TRR 0,68; TRR 0,73; TRR 0,75; TRR 0,95.

Nota: TRR – tempo de retenção relativo

Fonte: Próprio autor (2020)

O pico de ibuprofeno apresentou pureza espectral satisfatória no produto acabado por oxidação, indicando não haver coeluição com os produtos de degradação, como demonstrado na Figura 25.

Figura 25 - Gráfico de pureza espectral do ativo ibuprofeno por oxidação no produto acabado

Nota: PA: purity angle; TH: purity threshold

Fonte: Próprio autor (2020)

6.5.4. Degradação por fotodegradação

Dentre todos os ensaios de degradação, o único com condições experimentais definidas pelo ICH é a fotodegradação explicada no guia Q1B. Recomenda-se a exposição do placebo, fármaco e produto acabado em câmara de fotoestabilidade a um mínimo de 1,2 milhões de lux-h e de 200 Wh/m² de luz (INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION, 1998). Usualmente na indústria farmacêutica também é realizada a exposição em duas vezes a recomendada, passando assim por dois ciclos consecutivos.

Moléculas como o ibuprofeno, que possuem grupos cromóforos, como o anel aromático e carboxila, podem absorver radiação UV ou visível e serem ativadas fotoquimicamente.

Iovino et al. (2016) avaliaram a fotodegradação de ibuprofeno em soluções aquosas de águas residuais. Sugeriram a formação de 1-(4-isobutylphenyl)ethanol (IBEP) e 4-isobutylacetophenone (IBAP) por fotólise, a partir da descarboxilação do ibuprofeno, com a reação subsequente entre O₂ e o radical carbono, seguida pela hidroxilação do anel benzeno (Figura 26) (IOVINO et al., 2016).

Estudos realizados com ibuprofeno e outros ativos em águas residuais e efluentes de laboratórios farmacêuticos são cada vez frequentes, uma vez que o descarte muitas vezes não precede de tratamentos eficazes. Dentre os ativos

encontrados, a presença de ibuprofeno é bastante comum por ser um medicamento amplamente utilizado (MADHAVAN; GRIESER; ASHOKKUMAR, 2010; MENDEZ-ARRIAGA; ESPLUGAS; GIMENEZ, 2010; HAMA AZIZ et al., 2017).

Figura 26 - Formação dos produtos de degradação IBEP e IBAP a partir do ibuprofeno, por fotólise

Fonte: adaptado de IOVINO et al., 2016

Tanto o produto de degradação IBEP quanto o IBAP já foram avaliados em outros estudos com relação a sua toxicidade. Foi observado em um teste bacteriano que estes subprodutos do ibuprofeno provocavam um aumento da inibição de bactérias, ou seja, citotoxicidade, até atingir um valor máximo, seguido da redução da inibição pelo aumento do tempo de irradiação, ou seja, da continuação do teste de fotodegradação. Desta forma, concluiu-se que estes subprodutos podem ser mais tóxicos que o próprio ibuprofeno, porém com o tempo podem ser removidos com a própria fotodegradação (MENDEZ-ARRIAGA; ESPLUGAS; GIMENEZ, 2010; LI et al., 2015; IOVINO et al., 2016).

Após a condução da fotodegradação com ibuprofeno em cápsula líquida, o ciclo 1 apresentou 9,28% de degradação do ativo e 7,72% no ciclo 2. A somatória dos produtos de degradação formados são respectivamente, 2,583% e 2,533% e para o IFA a degradação foi de 1,72% e 0,97%, para o ciclo 1 e 2, respectivamente.

Estes resultados demonstram que neste caso uma exposição consecutiva não resultou em maior degradação. É possível que a fotólise atinja um ponto limite em

que maior exposição não seja correspondente a maior concentração dos produtos de degradação.

Nas Figuras 27 e 28 é possível observar a presença das impurezas desconhecidas no ciclo 1 e 2, respectivamente. Foram considerados os picos acima do limite de notificação de 0,05%.

Figura 27 - Cromatograma da fotodegradação ciclo 1. A: Cromatograma do produto acabado; B: Cromatograma do padrão; C: Cromatograma do placebo; D: Cromatograma do diluente. Ordem por tempo de retenção dos picos encontrados no produto acabado: TRR 0,49; TRR 0,66; TRR 0,68; TRR 0,73; TRR 0,75; TRR 0,95.

Nota: TRR – tempo de retenção relativo

Fonte: Próprio autor (2020)

Figura 28 - Cromatograma da fotodegradação ciclo 2. A: Cromatograma do produto acabado; B: Cromatograma do padrão; C: Cromatograma do placebo; D: Cromatograma do diluente. Ordem por tempo de retenção dos picos encontrados no produto acabado: TRR 0,49; TRR 0,66; TRR 0,68; TRR 0,73; TRR 0,75; TRR 0,95; TRR 1,28.

Nota: TRR – tempo de retenção relativo

Fonte: Próprio autor (2020)

Cory et al., (2010) também relataram que a exposição duplicada, ou seja, duas vezes a condição do ICH foi insignificante para a fotodegradação de ibuprofeno. Entretanto, como em outros estudos demonstraram relevância, concluiu-se que esta degradação pode ocorrer apenas com ibuprofeno em solução. Além disso, a radiação necessária para induzir esse processo pode ser maior (ou o tempo de exposição mais longo) do que o fornecido pelas condições $2 \times$ ICH (CORY; HARRIS; MARTINEZ, 2010).

O pico de ibuprofeno apresentou pureza espectral satisfatória no produto acabado por fotodegradação, tanto no ciclo 1 quanto no ciclo 2, indicando não haver coeluição com os produtos de degradação, como demonstrado nas Figuras 29 e 30.

Figura 29 - Gráfico de pureza espectral do ativo ibuprofeno por fotodegradação no ciclo 1 do produto acabado

Nota: PA: purity angle; TH: purity threshold
 Fonte: Próprio autor (2020)

Figura 30 - Gráfico de pureza espectral do ativo ibuprofeno por fotodegradação no ciclo 2 do produto acabado

Nota: PA: purity angle; TH: purity threshold
 Fonte: Próprio autor (2020)

6.5.5. Degradação por calor seco

O emprego de altas temperaturas para a degradação de ativos foi proposta inicialmente por Kennon, em 1964. Neste estudo é demonstrada a importância de forçar a degradação por aumento de temperatura de um medicamento para prever

sua validade. Este trabalho foi base para outros estudos além de subsidiar “A Regra de Joel Davis” em que a exposição a 40° C e 75 % de umidade relativa por três meses é equivalente à temperatura ambiente em 24 meses. Esta regra é aplicada até hoje para os estudos de estabilidade acelerada, que juntamente aos estudos de degradação forçada, conseguem prever o perfil de impurezas e os prováveis produtos de degradação encontrados ao final da validade (KENNON, 1964; BAERTSCHI; ALSANTE; REED, 2011).

O estudo de degradação empregou calor seco, ou seja, estufa a 60° C por até 10 dias consecutivos, expondo simultaneamente, placebo, produto acabado e padrão de ibuprofeno. O guia da ICH Q1A recomenda que a exposição térmica seja feita com temperaturas acima das utilizadas no estudo de estabilidade acelerado de 40°C e 75% de umidade relativa (UR). Sugere-se que seja elevada a temperatura de 10 em 10° graus. Inicialmente foram feitos testes com 70°C, porém a cápsula se desintegrou, considerando mais adequado o emprego de 60°C para o estudo final.

As coletas foram realizadas após 24h, 48h, 6 dias e ao final de 10 dias. Esta foi a condição estressante que apresentou maior formação de produtos de degradação com 3,73% de impurezas formadas no produto acabado, com redução do teor de ibuprofeno em 7,86% e em 9,45% no IFA. Nesta degradação, as impurezas desconhecidas TRR 0,49, TRR 0,75 e TRR 0,95 obtiveram as maiores porcentagens de formação se comparada as outras condições. Ainda assim, conforme a RDC Nº 53/2015, uma degradação significativa do ativo seria acima de 10%.

Na Figura 31 é possível observar a presença das impurezas desconhecidas. Foram considerados os picos acima do limite de notificação de 0,05%.

Figura 31 - Cromatograma da degradação por calor seco. A: Cromatograma do produto acabado; B: Cromatograma do padrão; C: Cromatograma do placebo; D: Cromatograma do diluente. Ordem por tempo de retenção dos picos encontrados no produto acabado: TRR 0,49; TRR 0,66; TRR 0,68; TRR 0,73; TRR 0,75; TRR 0,95.

Nota: TRR – tempo de retenção relativo

Fonte: Próprio autor (2020)

O pico de ibuprofeno apresentou pureza espectral satisfatória no produto acabado na degradação por calor seco, indicando não haver coeluição com os produtos de degradação, como demonstrado na Figura 32.

Figura 32 - Gráfico de pureza espectral do ativo ibuprofeno por degradação por calor do produto acabado

Nota: PA: purity angle; TH: purity threshold

Fonte: Próprio autor (2020)

6.5.6. Degradação por umidade

Assim como no estudo de degradação térmica, em que a temperatura é controlada durante o estudo de estabilidade, a umidade também é um fator relevante nestas condições. Para países de clima quente e úmido, como no caso do Brasil, zona climática IVB, o estudo de estabilidade acelerado, longa duração e acompanhamento exigem controle de umidade relativa em $75\% \pm 5\%$ (BRASIL, 2019).

Durante o estudo de degradação forçada é recomendando que a umidade também seja de 75%, com um prazo máximo de 10 dias. O uso de solução salina saturada em dessecador com controle de temperatura a 30°C em estufa foi realizado neste estudo, atingindo as condições ideais de 75% UR (CONNORS; AMIDON; STELLA, 1986).

No estudo conduzido para degradação por umidade a somatória dos produtos de degradação foi de 2,710%, com degradação de ibuprofeno no produto acabado em 7,82% e de 2,96% no IFA.

Na Figura 33 é possível observar a presença das impurezas desconhecidas. Foram considerados os picos acima do limite de notificação de 0,05%.

Figura 33 - Cromatograma da degradação por umidade. A: Cromatograma do produto acabado; B: Cromatograma do padrão; C: Cromatograma do placebo; D: Cromatograma do diluente. Ordem por tempo de retenção dos picos encontrados no produto acabado: TRR 0,49; TRR 0,66; TRR 0,68; TRR 0,73; TRR 0,75; TRR 0,95.

Nota: TRR – tempo de retenção relativo

Fonte: Próprio autor (2020)

O pico de ibuprofeno apresentou pureza espectral satisfatória no produto acabado por degradação de umidade, indicando não haver coeluição com os produtos de degradação, como demonstrado na Figura 34.

Figura 34 - Gráfico de pureza espectral do ativo ibuprofeno por degradação de umidade do produto acabado

Nota: PA: purity angle; TH: purity threshold

Fonte: Próprio autor (2020)

6.5.7. Degradação por íons metálicos

Metais como Fe (II) e Cu (I), devem ser usados para avaliar a suscetibilidade do ativo à oxidação catalisada por metais. Essa condição passou a ser estabelecida pela RDC N° 53/2015, embora nenhuma das diretrizes da ICH incluíssem recomendações ou requisitos para realizar um teste com íons metálicos.

A reação de fenton ocorre quando íons ferro (Fe^{+2}) ou cobre (Cu^{+}) fazem a redução do oxigênio, transferindo elétrons para o oxigênio e formando radicais peróxido, como o peróxido de hidrogênio. Estes são reduzidos para radical hidroxila, o qual começa a oxidar a molécula, ciclo redox (BARBOSA et al., 2010).

Íons metálicos de cobre e ferro são catalisadores extremamente eficazes com capacidade de acelerar a reação oxidativa até milhares de vezes. Portanto diversas reações podem ocorrer na sua presença, devendo assim fazer parte do estudo de degradação forçada (TATTERSALL et al., 2016).

Durante o processo produtivo a formulação pode entrar em contato com equipamentos metálicos ou então ser armazenado em embalagens com íons metálicos, que é o caso do medicamento em estudo, armazenado em blister.

A degradação por íons metálicos foi a condição estressante com maior porcentagem de degradação do ibuprofeno tanto no produto acabado com 11,64% quanto no IFA em 22,41%. Entretanto essa degradação não é acompanhada pela

formação de produtos de degradação. Tal constatação indica que possivelmente o produto originado não pode ser visualizado pela cromatografia em fase reversa com absorção UV.

O mecanismo de ação dos metais podem envolver outras vias que não somente a decomposição de peróxidos, como descrito anteriormente. Pode ser também pela oxidação direta do substrato através de um radical ou mecanismo iônico, ou então pela ativação do oxigênio molecular por complexação. As reações de complexação afetam a geoquímica dos íons metálicos, modificando a sua solubilidade, carga e potencial redox, talvez por este motivo não foi possível enxergar os produtos de degradação formados no cromatograma (BAERTSCHI; ALSANTE; REED, 2011).

Na Figura 35 é possível observar a presença das impurezas desconhecidas. Foram considerados os picos acima do limite de notificação de 0,05%.

Figura 35 - Cromatograma da degradação por íons metálicos. A: Cromatograma do produto acabado; B: Cromatograma do padrão; C: Cromatograma do placebo; D: Cromatograma do diluente. Ordem por tempo de retenção dos picos encontrados no produto acabado: TRR 0,75; TRR 0,95

Nota: TRR – tempo de retenção relativo

Fonte: Próprio autor (2020)

O pico de ibuprofeno apresentou pureza espectral satisfatória no produto acabado por degradação de íons metálicos, indicando não haver coeluição com os produtos de degradação, como demonstrado na Figura 36.

Figura 36 - Gráfico de pureza espectral do ativo ibuprofeno da degradação por íons metálicos do produto acabado

Nota: PA: purity angle; TH: purity threshold

Fonte: Próprio autor (2020)

6.6. Resumo da formação dos produtos de degradação

De um modo geral o perfil das impurezas desconhecidas nas diferentes condições estressantes foi bastante similar, com exceção da degradação por íons metálicos que apresentou apenas duas impurezas desconhecidas acima do limite de notificação de 0,05%.

Na Tabela 14, é demonstrado o teor e a degradação de ibuprofeno no IFA em cada condição estressante realizada. O cálculo foi realizado com base na degradação de maior período de exposição. Na Tabela 15, é possível observar em porcentagem os resultados obtidos com as diferentes condições de degradação do maior tempo de exposição, os principais produtos de degradação encontrados, a somatório dos produtos formados e balanço de massas, que idealmente se encontra acima de 80%.

Tabela 14 - Resultado da degradação nas condições estressantes em maior período de exposição de ibuprofeno no IFA

Condição estressante	Teor de Ibuprofeno (%)	Degradação do IFA (%)
Hidrólise ácida	96,83	3,17
Hidólise básica	98,84	1,16
Oxidação	99,11	0,89
Fotodegradação Ciclo 1	98,28	1,72
Fotodegradação Ciclo 2	99,03	0,97
Calor seco	90,55	9,45
Umidade	97,04	2,96
Íons Metálicos	77,59	22,41

Fonte: Próprio autor (2020)

Tabela 15 - Mapa geral dos resultados encontrados em porcentagem da degradação do ativo e da formação dos produtos de degradação conforme condições estressantes em maior período de exposição

Condição estressante	Amostra Controle (%)	Hidrólise Ácida (%)	Hidrólise Básica (%)	Oxidação (%)	Fotodegradação Ciclo 1 (%)	Fotodegradação Ciclo 2 (%)	Calor seco (%)	Umidade (%)	Íons Metálicos (%)
Teor de ibuprofeno	102,20	95,36	97,33	95,34	92,92	94,48	94,35	94,38	90,56
TRR 0,49	0,036	0,028	0,121	0,166	0,154	0,152	0,254	0,157	-
TRR 0,66	0,014	-	-	-	-	-	-	-	-
TRR 0,68	0,032	0,036	0,054	0,066	0,029	0,024	0,035	0,032	-
TRR 0,73	0,026	0,036	0,102	0,117	0,085	0,087	0,123	0,086	-
TRR 0,75	0,272	0,355	0,826	0,971	0,950	0,949	1,250	0,981	0,025
TRR 0,83	0,011	-	-	-	-	-	-	-	-
TRR 0,95	0,397	1,027	1,383	1,426	1,365	1,275	2,068	1,454	0,013
TRR 1,28	-	-	-	-	-	0,046	-	-	-
Degradação do fármaco⁽¹⁾		6,84	4,88	6,86	9,28	7,72	7,86	7,82	11,64
Σ produtos de degradação		1,483	2,487	2,747	2,583	2,533	3,730	2,710	0,037
Balanço de Massas⁽²⁾		94,64	97,61	95,89	93,30	94,81	95,87	94,89	88,39

Notas:

⁽¹⁾ Degradação do fármaco: (Teor de ibuprofeno amostra controle – Teor de ibuprofeno da condição estressada)

⁽²⁾ Balanço de massas: 100% + (Σprodutos de degradação – degradação do fármaco)

Fonte: Próprio autor (2020)

Como pode ser observado a impureza TRR 0,83 é encontrada na amostra controle, mas não reportada nas amostras estressadas, pois se encontrava em concentração abaixo do limite de notificação. Já a impureza desconhecida TRR 1,28 não se encontra na amostra controle, e aparece apenas na condição de fotodegradação no segundo ciclo.

Os produtos de degradação majoritários, de maior intensidade, são TRR 0,95 e em seguida o TRR 0,75, e também TRR 0,49, observados em maior concentração em calor seco, ou seja, a 60°C por 10 dias. Esta foi a condição estressante que apresentou maior porcentagem de formação de produtos de degradação. Conforme a RDC Nº 53/2015, como se encontram acima do limite de identificação de 0,17%, devem ter sua estrutura molecular identificada (BRASIL, 2015).

O ibuprofeno demonstrou maior susceptibilidade na condição estressante com íons metálicos, 11,64% de degradação e com 22,41 % no IFA. Entretanto, esta degradação não é acompanhada em mesma proporção pela formação de produtos de degradação. A segunda condição mais estressante para o ativo foi a fotodegradação e arbitrariamente no primeiro ciclo, onde se esperava menor degradação que no segundo ciclo.

6.7. Caracterização das principais impurezas por LC-MS-QTOF

Ao todo, foram encontradas 8 impurezas desconhecidas. Os picos acima do limite de identificação de 0,17% foram: TRR 0,49, TRR 0,75 e TRR 0,95, portanto estas impurezas, conforme a RDC Nº 53/2015, além de notificadas devem ter suas estruturas identificadas. Desta forma, utilizou-se o LC-MS-QTOF (Bruker Daltonics®) como ferramenta de alta resolução para investigar e propor as estruturas das impurezas desconhecidas.

Foram aplicadas as mesmas condições cromatográficas de análise por HPLC-DAD (Waters) e LC-MS-QTOF (Bruker Daltonics®), sendo também as mesmas amostras injetadas nos dois equipamentos. Existe uma pequena diferença no tempo de retenção, (Figura 37) justificada por diferenças no tamanho das tubulações entre os equipamentos. Entretanto, ao avaliar as impurezas foi possível observar que obedecem ao mesmo tempo de retenção relativo (TRR) ao ibuprofeno.

Figura 37 - Comparação entre a injeção de ibuprofeno IFA 0,16mg.mL⁻¹ por HPLC-DAD e a injeção por LC-MS-QTOF

Fonte: Próprio autor (2020)

Para caracterização do ativo ibuprofeno, obteve-se o espectro de massas do IFA e do produto acabado, sem degradações, tanto no modo positivo, quanto no modo negativo, como observado na Figura 38.

Figura 38 - A) Espectro de massas no modo scan, ionização por ESI+ do ibuprofeno no IFA, relação m/z 207,1307; B) Espectro de massas no modo scan, ionização por ESI- do ibuprofeno no IFA, relação m/z 205,1250; C) Espectro de massas no modo scan, ionização por ESI+ do ibuprofeno no produto acabado, relação m/z 207,1320; D) Espectro de massas no modo scan, ionização por ESI- do ibuprofeno no produto acabado, relação m/z 205,1248

Fonte: Próprio autor (2020)

Por possuir massa de $206,1307 \text{ g.mol}^{-1}$, o ibuprofeno, quando protonado na fonte de *electrospray*, no modo positivo, adquire um próton e passa a apresentar a relação m/z de $207,1307$, portanto a figura anterior corrobora com a massa molecular do ativo protonado em questão. Da mesma forma, quando avaliado em modo desprotonado, apresenta perda de um próton, ficando com m/z de $205,125$.

Na maioria dos espectros aparecem uma massa nominal de 161, sendo a relação m/z 161,1278 e 161,1277, no modo positivo, e de 161,1368 e 161,1339, no modo negativo. Provavelmente este íon está relacionado com a descarboxilação do ibuprofeno. A molécula pode ser observada na Figura 39.

Figura 39 - Descarboxilação do ibuprofeno, resultando em um íon com m/z aproximada de 161

Fonte: IOVINO et al., 2016

Na fonte de ionização ESI, devido a altas voltagens, pode ocorrer a quebra da molécula de ibuprofeno, sendo comum a presença da m/z 161 na maioria dos espectros observados. Além disso, na própria fonte de ionização também pode ocorrer a formação de adutos e dímeros. No modo negativo, Figura 34 (B,C), é possível observar a presença de m/z 433, o que sugere a formação de dímero de ibuprofeno com aduto de sódio ($206 \times 2 + 22$), com perda de um próton.

A condição de degradação com maior porcentagem de formação de produtos de degradação foi por calor seco. Desta forma, por apresentar maior intensidade dos picos, foi selecionada esta condição para propor as estruturas moleculares desconhecidas, Figura 40.

Figura 40 - Cromatograma pico base (LC-MS-QTOF) do ibuprofeno no produto acabado após 10 dias de degradação térmica a 60°C

Fonte: Próprio autor (2020)

O pico 2 da Figura 40, refere-se ao pico de tempo de retenção em 5,6 minutos, ou TRR 0,49. O espectro de massas deste pico em modo positivo pode ser observado na Figura 41.

Figura 41 – A) Espectro de massas ESI+ do pico TRR 0,49, com três íons majoritários m/z 353,1970, m/z 335,1867 e m/z 161,1330, destacados em vermelho. B) Espectro de massas ESI+ em MS2 dos picos majoritários

Com auxílio do software *Compass DataAnalysis*, verificou-se que a medida do íon de m/z 353,1970 tem como uma das propostas de fórmula molecular $[M+H]^+$ $C_{19}H_{29}O_6$, com m/z teórica de 353, 1959, erro de massa de -3,1 ppm. Como está na forma protonada, sua massa molecular é 352.

Entre os excipientes de ibuprofeno 400mg cápsula líquida, está o sorbitol, o qual foi empregado na formulação como plastificante. Yamaguchi et al. (2011) demonstraram que a desidratação de sorbitol pode ocorrer em água a altas temperaturas sem a adição de catalisadores ácidos. Sua desidratação ocorre em duas etapas, primeiro em sorbitan, e em seguida em isossorbido (Figura 42), sendo a primeira etapa de desidratação predominante (YAMAGUCHI et al., 2011).

Figura 42 - Desidratação de sorbitol a sorbitan e isossorbido

Fonte: Próprio autor (2020)

Douša et al. (2017) evidenciaram a interação de ibuprofeno com sorbitol e sorbitan, em cápsula líquida de ibuprofeno, após condução do estudo de estabilidade de longa duração. Desta forma, entende-se que a m/z 353,1959 pode estar relacionada com a reação de ibuprofeno com sorbitan (Ibu-sorbitan), o qual possui massa exata de 352,189 e quando protonado ganha uma carga. Já a m/z 335,1867 pode referir-se a ibuprofeno com isossorbide (Ibu-isossorbide) de massa exata 334,178. A interação das moléculas pode ser observada na Figura 43.

Figura 43 - Formação de Ibu-sorbitol, Ibu-sorbitan e Ibu-isossorbido

Fonte: Próprio autor (2020)

No espectro de massas do pico 3 da Figura 40, tempo de retenção 7,2 minutos, correspondente ao TRR 0,65, é possível observar três picos majoritários, sendo o pico base 335,1857 (Figura 44). Este íon possivelmente refere-se a molécula Ibu-isossordido de LogP = 2,62, mais apolar que o Ibu-sorbitan com LogP = 1,99, assim possui maior interação com a fase estacionária C18, saindo com maior tempo de retenção.

Figura 44 – A) Espectro de massas ESI+ do pico TRR 0,65, com três íons majoritários m/z 335,1857, m/z 353,1965 e m/z 375,1771, destacados em vermelho. B) Espectro de massas ESI+ em MS2 dos picos majoritários

Fonte: Próprio autor (2020)

Os três picos destacados em vermelho do espectro são aqueles que sofreram fragmentação em MS2. O íon de m/z 375,1771 pode estar relacionado com a ligação Ibu-sorbitan de massa exata 352,189 com aduto de sódio (22) $[M+Na]^+$. E a m/z de 393,1874, na Figura 38, com Ibu-sorbitol com aduto de sódio $[M+Na]^+$.

O pico 4 da Figura 40, com tempo de retenção de 8,2 e TRR 0,75 possui o espectro de massas em modo positivo da Figura 45.

Figura 45 – A) Espectro de massas ESI+ do pico TRR 0,75, com três íons destacados em vermelho de m/z 263,1643, m/z 440,2303 e m/z 448,2179. B) Espectro de massas ESI+ em MS2 dos picos majoritários

Fonte: Próprio autor (2020)

Pode-se observar que embora a m/z 303,1562 seja o pico base, não foi ele que sofreu fragmentação em MS/MS. Isto é um grande indício de que seja uma molécula estável, um exemplo é a formação de aduto. Dentre as possibilidades a massa de 303 pode ter formado um aduto de potássio, $[M+K]^+$ a partir da m/z 263,1643.

O glicerol é um excipiente usado na formulação da cápsula que possui grandes chances de interação com o ibuprofeno, pela ampla possibilidade de transformação catalítica. Entre elas, podem ser destacadas a transformação química em acetais, éteres e ésteres do glicerol, com amplas aplicações tecnológicas, a hidrogenólise do glicerol a propeno e a desidratação à acroleína e ácido acrílico. Na

etapa de hidrogenólise o glicerol forma acetol e 3-hidroxipropanal. A hidrogenólise pode ocorrer na presença de metais ou da lise pelo hidrogênio (Figura 46) (MOTA; PINTO, 2017).

Figura 46 - Hidrogenólise do glicerol com formação de acetol e 3-hidroxipropanal

Fonte: Mota e Pinto (2017)

A m/z 263,1643 corresponde a fórmula molecular $C_{16}H_{23}O_3$, com erro de -0,4 ppm. A ligação de ibuprofeno com acetol ou 3- hidroxipropanal resulta em moléculas de fórmula molecular como as sugeridas pelo software e massa molecular 262 g/mol, que quando protonada recebe uma carga ficando com m/z 263. Assim, a proposta para este íon seria a ligação de ibuprofeno com um dos subprodutos da transformação de glicerol, Ibu-acetol ou Ibu-3-hidroxipropanal (Figura 47).

Figura 47 - Reação de ibuprofeno com acetol e 3-hidroxipropanal

Fonte: Próprio autor (2020)

Para descobrir qual das duas ligações o ibuprofeno estaria fazendo, com acetol ou 3-hidroxipropenal, foram investigados os fragmentos de MS2. O primeiro caso seria a perda de COCH_3 , gerando um fragmento de massa molecular aproximadamente de 219 e protonado m/z de 220. No segundo caso, a perda seria de CHO , gerando um fragmento de 233 de massa e protonado m/z de 234. Embora a busca tenha sido realizada, não foram encontrados estes íons para confirmar qual das duas ligações o ibuprofeno estaria fazendo.

Os picos 5, 6 e 7 do cromatograma da Figura 40, relativos ao TRR 0,95, correspondem ao espectro de massas e fragmentação da Figura 48, 49 e 50, respectivamente.

Figura 48 - A) Espectro de massas ESI+ do pico TRR 0,95, com três íons destacados em vermelho de m/z 664,4299, m/z 647,4019 e m/z 708,4546 B) Espectro de massas ESI+ em MS2 dos picos majoritários

Fonte: Próprio autor (2020)

De acordo com Douša et al. (2017), o ibuprofeno pode formar um éster com o PEG, um dos excipientes da formulação, utilizado para preenchimento das cápsulas líquidas. Este é constituído de uma cadeia de polímeros, sua menor unidade, o monômero, é o etilenoglicol, que possui fórmula molecular C_2H_4O e massa molecular de aproximadamente 44 g/mol. Segundo o software, a fórmula molecular proposta para a m/z 647,4019 é $C_{33}H_{59}O_{12}$. Desta forma o composto identificado pode ser a ligação de ibuprofeno com unidades repetidas de etilenoglicol.

A fórmula molecular geral proposta por Douša et al. (2017), consiste em $C_{2n+13}H_{4n+18}O_{n+2}$, representando a ligação de ibuprofeno com unidades repetidas de etilenoglicol. Neste caso, 647,4019, seriam 10 unidades de etilenoglicol ($n=10$), resultando em m/z 646, mais a carga protonada.

Esta hipótese pode ser comprovada pela sequência de espectros obtidos no tempo de retenção entre 10,5 e 10,7 minutos, como segue nas Figuras 49 e 50.

Figura 49 - A) Espectro de massas ESI+ do pico TRR 0,95, com três íons destacados em vermelho de m/z 576,3771, m/z 559,3503 e m/z 532,3498 B) Espectro de massas ESI+ em MS2 dos picos majoritários

Fonte: Próprio autor (2020)

Figura 50 - A) Espectro de massas ESI+ do pico TRR 0,95, com três íons destacados em vermelho de m/z 488,3215, m/z 471,2949 e m/z 444,2949 B) Espectro de massas ESI+ em MS2 dos picos majoritários

Fonte: Próprio autor (2020)

Os espectros com m/z 559,3503 e m/z 471,2949 corroboram a teoria da ligação de ibuprofeno com unidades repetidas de PEG. Aplicando a fórmula de Douša et al. (2017), o primeiro representaria a ligação IBU-PEG com $n=8$ e na sequência $n=6$. A Tabela 16 exemplifica as possíveis m/z que poderiam ser encontradas.

Tabela 16 - Representação das possíveis massas que poderiam ser encontradas da ligação de ibuprofeno com etilenoglicol no espectro de massas, com destaque em vermelho para as identificadas

n (unidades de etilenoglicol)	IBU+44	IBU+44+1 [M+H] ⁺
1	250	251
2	294	295
3	338	339
4	382	383
5	426	427
6	470	471
7	514	515
8	558	559
9	602	603
10	646	647
11	690	691
12	734	735
13	778	779
14	822	823
15	866	867
16	910	911
17	954	955
18	998	999

Fonte: Próprio autor (2020)

Adicionalmente, a hipótese é sustentada pela fragmentação MS2 dos íons. Em todos os espectros de MS2 é observado o fragmento de m/z 233, Figura 51, o qual pode ser representado pela ligação de ibuprofeno com uma unidade etilenoglicol e perda de H₂O, com sugestão de fórmula molecular C₁₅H₂₁O₂.

Figura 51 - Representação do ibuprofeno ligado a etilenoglicol com perda de água

Fonte: Próprio autor (2020)

Os íons representados nos espectros de m/z aproximada de 444, 488, 532, 576, 664, 708, também são ligações de ibuprofeno com unidades de PEG, porém

são íons com adutos de amônia $[M+NH_4]$. Na Tabela 17 é possível observar a composição elementar dos principais íons encontrados.

Tabela 17 – Composição elementar dos principais íons do espectro de massas dos produtos de degradação de ibuprofeno identificados por LC-MS-QTOF

Impureza	Pico	TR	TRR	m/z Medido	Fórmula Molecular proposta	m/z teórica	Erro de massa (ppm)	Fragmentos MS2
Ibu-sorbitan	2	5,6	0,49	353,1970	$C_{19}H_{29}O_6$	353,1959	-3,1	161,1338
				335,1857	$C_{19}H_{27}O_5$	335,1826	-2,7	129,0576
				161,1330	$C_{12}H_{17}$	161,1325	-3,1	890,1536
Ibu-isossorbido	3	7,2	0,65	335,1857	$C_{19}H_{27}O_5$	335,1826	-2,7	161,1329
				353,1965	$C_{19}H_{29}O_6$	353,1972	2,0	161,1344
				375,1771	NA	NA	NA	375,1806; 518,2162
Ibu-acetol ou Ibu-3-hidroxipropanal	4	8,2	0,75	263,1643	$C_{16}H_{23}O_3$	263,1642	-0,4	161,1334; 263,1644
				440,2303	NA	NA	NA	161,1356; 206,0904; 300,1437
				448,2179	NA	NA	NA	161,1335; 263,1646; 335,0924
Ibu-PEG	5	10,3	0,95	664,4299	$C_{33}H_{62}NO_{12}$	664,4267	-5	133,0863; 233,1544; 669,3836
				647,4019	$C_{33}H_{59}O_{12}$	647,4001	-2,8	133,0883; 233,1547
				708,4546	$C_{35}H_{66}NO_{13}$	708,4529	-2,5	133,0874; 233,1547; 365,2204; 713,4057
Ibu-PEG	6	10,5	0,95	576,3771	$C_{29}H_{54}NO_{10}$	576,3742	-5,0	161,1325; 233,1541; 581,3310
				559,3503	$C_{29}H_{51}O_{10}$	559,3477	-4,7	161,1332; 233,1541
				532,3498	$C_{27}H_{50}NO_9$	532,348	-3,4	161,1330; 233,1543; 537,3045
Ibu-PEG	7	10,7	0,95	488,3215	$C_{25}H_{46}NO_8$	488,3218	0,5	161,1326; 233,1544; 493,2772
				471,2949	$C_{25}H_{43}O_8$	471,2952	0,7	161,1329; 233,1543
				444,2949	$C_{23}H_{42}NO_7$	444,2956	1,6	161,1346; 233,1542; 449,2514

Nota: NA: Não Aplicável

Fonte: Próprio autor (2020)

Douša et al. (2017) realizaram a síntese e purificação das impurezas encontradas, sendo elas Ibu-PEG, Ibu-sorbitol e Ibu-sorbitan e a identificação pelas técnicas de Espectroscopia no Infravermelho (IR) e Ressonância Magnética Nuclear (RMN), o que comprova a formação destes produtos de degradação. Este foi o único estudo encontrado na literatura com degradação de ibuprofeno na forma de cápsula líquida.

Outro grupo de pesquisadores também evidenciou que dentre diversas marcas testadas de comprimidos de ibuprofeno disponíveis no mercado, um dos excipientes mais problemáticos, com potencial de degradação, presente em todas as marcas testadas foi PEG, possivelmente devido a peróxidos residuais (CORY; HARRIS; MARTINEZ, 2010).

7. CONCLUSÃO

O método analítico foi desenvolvido por cromatografia líquida em fase reversa com o uso da fase estacionária Poroshell C18, a qual agrega vantagens de sensibilidade e seletividade, considerando que o objetivo era identificar impurezas em baixas concentrações. A fase móvel selecionada foi o ácido fosfórico 0,1% em gradiente com acetonitrila por HPLC-DAD, com a troca para ácido fórmico 0,1% por compatibilidade ao LC-MS-QTOF, também em gradiente com acetonitrila. O comprimento máximo de absorvância do ibuprofeno em 220 nm, temperatura ambiente da coluna e tempo de corrida de 25 minutos.

Este método analítico foi empregado para avaliar as impurezas resultantes do estudo de degradação forçada com cápsula líquida de ibuprofeno 400mg com as condições estressantes: ácida, básica, oxidação, calor seco, fotodegradação, umidade e íons metálicos.

O método desenvolvido foi rápido e eficaz para notificação de oito impurezas observadas. O poder indicativo de estabilidade foi adequado e suficiente para a geração do perfil de degradação potencial do produto cápsula líquida de ibuprofeno. Foi observada pureza espectral satisfatória para os picos de ibuprofeno, bem como eficiência cromatográfica em todas as condições de exposição. A principal via de degradação do ibuprofeno observada foi por íons metálicos, porém a maior formação de produtos de degradação foi por calor seco. Considerando a alta degradação do ibuprofeno na condição de íons metálicos e o fato do medicamento ser acondicionado em blister, embalagem que contém alumínio em sua constituição, novos estudos devem ser conduzidos para avaliar interação do ativo com a embalagem primária.

Todas as impurezas identificadas e caracterizadas por LC-MS-QTOF surgiram da interação ibuprofeno-excipiente. A esterificação de ibuprofeno com PEG e sorbital/sorbitan havia sido relatada na literatura após desenvolvimento de estudo de estabilidade de longa duração, o que corrobora os achados pelo estudo de degradação forçada. A interação de ibuprofeno com subprodutos do glicerol ainda não havia sido demonstrada. Estudos de qualificação dos produtos de degradação encontrados são necessários para evidenciar seu potencial toxicológico.

Os resultados demonstram que existe interação do ibuprofeno com os excipientes utilizados para formulação de cápsula líquida, sendo este fato relevante para a proposta de novas formulações. Por fim, o método desenvolvido pode ser utilizado áreas farmacêuticas, desde controle de qualidade de impurezas, estudos de degradação forçada e para desenvolvimento de futuras formulações.

REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Medicamentos- Guia n ° 4, versão 1, de 04 de dezembro de 2015.** Guia para obtenção do perfil de degradação, e identificação e qualificação de produtos de degradação em medicamentos. 2015. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2738062/Perfil+e+produtos+de+degradacao+em+medicamentos.pdf/c18a4857-9a5c-4292-a1bf-07af6cad6902?version=1.01bf-07af6cad6902>>. Acesso em: 17 fev. 2018.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Anvisa é novo membro do ICH.** 2016. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/noticias/-/asset_publisher/FXrpx9qY7FbU/content/com-o-inicio-da-reforma-do-ich-a/219201?p_p_auth=uizAsWb2&inheritRedirect=false>. Acesso em: 15 ago. 2018.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Talidomida.** Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/talidomida>>. Acesso em: 15 maio. 2019a.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Adoção de medidas para medicamentos para pressão alta.** 2019. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/noticias/-/asset_publisher/FXrpx9qY7FbU/content/adocao-de-medidas-para-medicamentos-para-pressao-alta/219201?inheritRedirect=false&redirect=http%3A%2F%2Fportal.anvisa.gov.br%2Fnoticias%3Fp_p_id%3D101_INSTANCE_FXrpx9qY7FbU%26p_p>. Acesso em: 14 jun. 2019b.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Esclarecimento quanto a presença de impurezas em medicamentos para hipertensão arterial.** 2019. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/219201/4340788/Sartanas+Portal_+07-05-2019+%28003%29.pdf/bf14105c-136b-47e5-b94e-161b0e659e73>. Acesso em: 15 jun. 2019c.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Roteiro de Análise de Eficácia e Segurança para Avaliação de Registro de Medicamento Sintético.** 2019. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/documents/Roteiro+de+Análise+de+Eficácia+e+Segurança+para+Avaliação+de+Registro+de+Medicamento+Sintético.pdf>>. Acesso em: 26 out. 2019d.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Perguntas e Respostas. Assunto : Fluxo de análise de qualificação de impurezas e produtos de degradação de medicamentos classificados como sintéticos e semissintéticos.** 2019. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/documents/33836/418522/Perguntas+e+Respostas+-+qualificação+de+impurezas/34fbde77-57aa-44d9-a1f5-f01b4fb36284>>. Acesso em: 15 out. 2019e.

ALCÂNTARA, F. C. et al. Testes De Degradação Forçada Para Fármacos e Medicamentos. **Revista de Pesquisa e Inovação Farmacêutica**, v. 5, n. 1, p. 38–48, 2013.

ALLEN, L. V. J.; POPOVICH, N. G.; ANSEL, H. C. **Formas Farmacêuticas e Sistemas de Liberação de Fármacos**. 9. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013.

BAERTSCHI, S. W.; ALSANTE, K. M.; REED, R. . **Pharmaceutical stress testing: predicting drug degradation**. 2. ed. London: Informa Healthcare, 2011.

BALBANI, A. P. S.; STELZER, L. B.; MONTOVANI, J. C. Excipientes de medicamentos e as informações da bula. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, v. 72, n. 3, p. 400–406, 2006.

BARBOSA, K. B. F. *et al.* Estresse oxidativo: Conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutricao**, v. 23, n. 4, p. 629–643, 2010.

BARR, D. B. et al. Identification and quantification of diethylene glycol in pharmaceuticals implicated in poisoning epidemics: An historical laboratory perspective. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 31, n. 6, p. 295–303, 2007.

BASTAKI, M. et al. Lack of genotoxicity in vivo for food color additive Allura Red AC. **Food and Chemical Toxicology**, v. 105, p. 308–314, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2017.04.037>>.

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

BLOSSOM, D. B. et al. Outbreak of adverse reactions associated with contaminated heparin. **New England Journal of Medicine**, v. 359, n. 25, p. 2674–2684, 2008.

BORGES, L. de G.; FRÖEHLICH, P. E. Talidomida: novas perspectivas para utilização como antiinflamatório, imunossupressor e antiangiogênico. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 49, n. 1, p. 96–102, 2003.

BRASIL. Portaria nº 3.916, de 30 de outubro de 1998. Aprova a Política Nacional de Medicamentos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**. Poder Executivo; Brasília; DF; 10 nov. 1998. Seção 1; p. 18–22, 1998.

BRASIL. Lei nº 9.782, de 26 de janeiro de 1999. Define o Sistema Nacional de Vigilância Sanitária, cria a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**. Poder Executivo; Brasília; DF; 27 jan. 1999. Seção 1; p. 1, 1999.

BRASIL. RE nº 1, de 29 de julho de 2005. Guia para a Realização de Estudos de Estabilidade. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**. Poder Executivo;

Brasília; DF; 01 ago.2005. Seção 1; p. 1, 2005.

BRASIL. RDC n° 58, de 20 de dezembro de 2013. Estabelece parâmetros para a notificação, identificação e qualificação de produtos de degradação em medicamentos com substâncias ativas sintéticas e semissintéticas, classificados como novos, genéricos e similares, e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**. Poder Executivo; Brasília; DF; 23 dez. 2013. Seção 1; p. 127, 2013.

BRASIL. RDC n° 53, de 4 de dezembro de 2015. Estabelece parâmetros para a notificação, identificação e qualificação de produtos de degradação em medicamentos com substâncias ativas sintéticas e semissintéticas, classificados como novos, genéricos e similares, e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, v. 233. Poder Executivo; Brasília; DF; 07 dez. 2015. Seção 1; p.48, 2015.

BRASIL. RDC n° 171, de 22 de agosto de 2017. Revisa a aplicabilidade da Resolução da Diretoria Colegiada – RDC n° 53, de 4 de dezembro de 2015, para alterações pós-registro e os prazos desta Resolução para produtos já registrados. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**. Poder Executivo; Brasília; DF; 24 ago. 2017. Seção 1; p. 51, 2017a.

BRASIL. RDC n° 166, de 24 de julho de 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**. Poder Executivo; Brasília; DF; 25 jul. 2017. Seção 1; p. 87, 2017b.

BRASIL. RDC n° 318, de 6 de novembro de 2019. Estabelece os critérios para a realização de Estudos de Estabilidade de insumos farmacêuticos ativos e medicamentos, exceto biológicos, e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**. Poder Executivo; Brasília; DF; 07 nov. 2019. Seção 1; p. 97, 2019.

CASTLEDINE, J. B.; FELL, A. F. Strategies for peak-purity assessment in liquid chromatography. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 11, n. 1, p. 1–13, 1993.

CAVIGLIOLI, G. et al. Identification of degradation products of Ibuprofen arising from oxidative and thermal treatments. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 30, n. 3, p. 499–509, 2002.

CHEMDRAW. Produzido por **CambridgeSoft**, versão Ultra 12.0.

COLE, E. T.; CADÉ, D.; BENAMEUR, H. Challenges and opportunities in the encapsulation of liquid and semi-solid formulations into capsules for oral administration. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 60, n. 6, p. 747–756, 2008.

CONNORS, K. A.; AMIDON, G. L.; STELLA, V. J. **Chemical Stability of**

Pharmaceuticals: A Handbook for Pharmacists. 2. ed. New York: John Wiley & Sons, 1986.

COORDENAÇÃO DE REGISTRO DE INSUMOS FARMACÊUTICOS ATIVOS. **COIFA**. Disponível em: <<https://www20.anvisa.gov.br/coifa/calculos.html>>. Acesso em: 17 abr. 2020.

CORY, W. C.; HARRIS, C.; MARTINEZ, S. Accelerated degradation of ibuprofen in tablets. **Pharmaceutical Development and Technology**, v. 15, n. 6, p. 636–643, 2010.

DA COSTA, G. N. et al. Diretrizes Para Elaboração De Um Protocolo E Relatório De Estudo De Degradação Forçada De Medicamentos De Acordo Com a RDC 53/2015. **Infarma - Ciências Farmacêuticas**, v. 30, n. 3, p. 194–202, 2018.

DE LUCCA, J. M. et al. Cápsulas duras com enchimento líquido ou semi-sólido: Uma revisão sobre sua produção e aplicação na liberação de fármacos. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 24, n. 3, p. 458–467, 2005.

DOUŠA, M. et al. Esterification of ibuprofen in soft gelatin capsules formulations-identification, synthesis and liquid chromatography separation of the degradation products. **Journal of Chromatographic Science**, v. 55, n. 8, p. 790–797, 2017.

ESMAEILI, S. et al. Degradation products of the artificial azo dye, Allura red, inhibit esterase activity of carbonic anhydrase II: A basic in vitro study on the food safety of the colorant in terms of enzyme inhibition. **Food Chemistry**, v. 213, p. 494–504, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.06.078>>.

FARMACOPEIA BRASILEIRA. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. 6. ed. Brasília: ANVISA, 2019.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Information Paper on L-tryptophan and 5-hydroxy-L-tryptophan**. 2001. Disponível em: <<http://www.nemsr.org/Articles/FDA-Info.pdf>>. Acesso em: 25 ago. 2019.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Analytical Procedures and Methods Validation for Drugs and Biologics. **Guidance for Industry**, 2015. Disponível em: <<https://www.fda.gov/downloads/drugs/guidances/ucm386366.pdf>>. Acesso em: 30 ago. 2019.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Inactive Ingredient Search for Approved Drug Products**. 2019. Disponível em: <<https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/iig/index.cfm>>. Acesso em: 20 ago. 2019.

GROSS, J. M. Fanconi syndrome (adult type) developing secondary to the ingestion

of outdated tetracycline. **Annals of internal medicine**, v. 58, n. 3, p. 523–528, 1963.

GULLAPALLI, R. P. Soft Gelatin Capsules (Softgels). **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 99, n. 10, p. 4107–4148, 2010.

HAMA AZIZ, K. H. et al. Degradation of pharmaceutical diclofenac and ibuprofen in aqueous solution, a direct comparison of ozonation, photocatalysis, and non-thermal plasma. **Chemical Engineering Journal**, v. 313, p. 1033–1041, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cej.2016.10.137>>.

HUIDOBRO, A. L.; RUPÉREZ, F. J.; BARBAS, C. Tandem column for the simultaneous determination of arginine, ibuprofen and related impurities by liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1119, n. 1–2, p. 238–245, 2006.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION. ICH Q1B Photostability Testing of New Active Substances and Medicinal Products. **European Medicines Agency**. January, p. 1–9, 1998. Disponível em: <http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500002647.pdf>.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION. Q1A(R2) Stability Testing of New Drug Substances and Products. **Guidance for Industry**. Revision 2, p. 1–22, 2003.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION. Impurities in New Drug Substances Q3A (R2). **ICH Harmonised Tripartite Guideline**. October, p. 118–122, 2006a.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION. Impurities in New Drug Products Q3B(R2). **ICH Harmonised Tripartite Guideline**. June, p. 1–16, 2006b.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION. Assessment and control of DNA reactive (mutagenic) impurities in pharmaceuticals to limit potential carcinogenic risk M7 (R1). **ICH Harmonised Guideline**, v. 7, March, p. 1–119, 2017.

IOVINO, P. et al. Ibuprofen photodegradation in aqueous solutions. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 22, p. 22993–23004, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s11356-016-7339-0>>.

JAHAN, M. S. et al. A study of method development, validation, and forced degradation for simultaneous quantification of paracetamol and ibuprofen in pharmaceutical dosage form by RP-HPLC method. **Analytical Chemistry Insights**, v. 9, n. 1, p. 75–81, 2014.

JOHNSTON, A.; HOLT, D. W. Substandard drugs: A potential crisis for public health. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 78, n. 2, p. 218–243, 2014.

KENNON, L. Use of Models in Determining Chemical Pharmaceutical Stability. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 53, n. 7, p. 815–818, 1964.

KHODARAHMI, R.; KOOSHK, M. R. A.; KHALEDIAN, K. Allura Red, the Artificial Azo Dye, Inhibits Esterase Activity of Carbonic Anhydrase II: A Preliminary Study on the Food Safety in Term of Enzyme Inhibition. **Journal of Reports in Pharmaceutical Sciences**, v. 4, n. 1, p. 43–52, 2015.

KLEINMAN, M. H. et al. An evaluation of chemical photoreactivity and the relationship to phototoxicity. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 58, n. 2, p. 224–232, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.yrtph.2010.06.013>>.

KOMMANABOYINA, B.; RHODES, C. T. Trends in Stability Testing, with Emphasis on Stability During Distribution and Storage. **Drug Development and Industrial pharmacy**, v. 25, n. 7, p. 857–68, 1999.

KUMAR, R. V. et al. A novel, rapid, and validated stability-indicating UPLC method for the estimation of drotaverine hydrochloride and ibuprofen impurities in oral solid dosage form. **Scientia Pharmaceutica**, v. 83, n. 4, p. 567–581, 2015.

LI, F. H. et al. Photodegradation of ibuprofen under UV-VIS irradiation: Mechanism and toxicity of photolysis products. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 94, n. 4, p. 479–483, 2015.

MADHAVAN, J.; GRIESER, F.; ASHOKKUMAR, M. Combined advanced oxidation processes for the synergistic degradation of ibuprofen in aqueous environments. **Journal of Hazardous Materials**, v. 178, p. 202–208, 2010.

MARQUES, L. O Ibuprofeno : Um fármaco com sucesso. **Centro de Química e Universidade de Évora**, p. 1–3, 2009.

MEDICAMENTO: IBUPROFENO. Farmacêutica responsável: confidencial. **Bula de remédio**, 2019.

MENDEZ-ARRIAGA, F.; ESPLUGAS, S.; GIMENEZ, J. Degradation of the emerging contaminant ibuprofen in water by photo-Fenton. **Water research**, v. 11, p. 589–595, 2010.

MOTA, C. J. A.; PINTO, B. P. Transformações Catalíticas do Glicerol para Inovação na Indústria Química. **Revista Virtual de Química**, v. 9, n. 1, p. 135–149, 2017.

MUSMADE, D. S. et al. A Review on Stress Testing of Drug Substances and Drug Product. **Inventi Rapid: Pharmaceutical Process Development**, v. 2013, n. 1, p. 1–11, 2012.

NARAYANAM, M. et al. Critical practical aspects in the application of liquid

chromatography-mass spectrometric studies for the characterization of impurities and degradation products. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 87, p. 191–217, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2013.04.027>>.

OGA, S.; CAMARGO, M. M. D. A.; BATISTUZZO, J. A. D. O. **Fundamentos de toxicologia**. 4. ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2014.

PENA, A. et al. Determination of tetracycline and its major degradation products by liquid chromatography with fluorescence detection. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 18, n. 4–5, p. 839–845, 1998.

PUBMED. produzido por **National Library of Medicine**. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>>.

RAINSFORD, K. D. Ibuprofen: Pharmacology, efficacy and safety. **Inflammopharmacology**, v. 17, n. 6, p. 275–342, 2009.

RAO, D. D.; SAIT, S. S.; MUKKANTI, K. Development and validation of an UPLC method for rapid determination of ibuprofen and diphenhydramine citrate in the presence of impurities in combined dosage form. **Journal of Chromatographic Science**, v. 49, n. 4, p. 281–286, 2011.

RAO, Y. F. et al. Degradation of ibuprofen by a synergistic UV/Fe(III)/Oxone process. **Chemical Engineering Journal**, v. 283, p. 65–75, 2016.

REYNOLDS, D. W. et al. Conducting forced degradation studies. **Pharm. Technol.**, v. 26, n. 2, p. 48–56, 2002.

ROBERSON, A. Liquid-filled capsules: Formulating with liquids: Two-piece or softgel capsules? **CSC Publishing. Tablets & Capsules**, n. January, p. 10–13, 2016.

SENA, L. C. S. et al. Excipientes farmacêuticos e seus riscos à saúde: uma revisão da literatura. **Rev. Bras. Farm. Hosp. Serv. Saúde São Paulo**, v. 5, n. 4, p. 25–34, 2014. Disponível em: <<http://www.sbrafh.org.br/rbfhss/public/artigos/2014050405000621BR.pdf>>.

SENGUPTA, P.; CHATTERJEE, B.; TEKADE, R. K. Current regulatory requirements and practical approaches for stability analysis of pharmaceutical products: A comprehensive review. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 543, n. 1–2, p. 328–344, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.04.007>>.

SHIMADA, C. et al. Differential colon DNA damage induced by azo food additives between rats and mice. **Journal of Toxicological Sciences**, v. 35, n. 4, p. 547–554, 2010.

SILVA, J. R. et al. Comparação da degradabilidade do ibuprofeno em suspensão oral armazenada em embalagem primária de polietileno e de vidro. **Ensaio e**

Ciência: Ciências Biológicas, Agrárias e da Saúde, v. 16, n. 6, p. 39–49, 2012.

SILVA, K. E. R. et al. Modelos de avaliação da estabilidade de fármacos e medicamentos para a indústria farmacêutica. **Revista de Ciencias Farmaceuticas Basica e Aplicada**, v. 30, n. 2, p. 1–8, 2009.

STEFANI, G. P. et al. Presença de corantes e lactose em medicamentos: avaliação de 181 produtos. **Rev. bras. alerg. imunopatol.**, v. 32, n. 1, p. 18–26, 2009.

TATTERSALL, P. et al. Impact from the Recent Issuance of ANVISA Resolution RDC-53/2015 on Pharmaceutical Small Molecule Forced Degradation Study Requirements. **Review American Pharmaceutical**, 2016.

UNITED STATES PHARMACOPEIA. **The United States Pharmacopeia and National Formulary**. 42. ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2019.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO Technical report series 929, Annex 5. **WHO EXPERT COMMITTEE ON SPECIFICATIONS FOR PHARMACEUTICAL PREPARATIONS**, n. 39, 2005.

YAMAGUCHI, A. et al. Sorbitol dehydration in high temperature liquid water. **Green Chemistry**, v. 13, n. 4, p. 873–881, 2011.