

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**FACULDADE DE FARMÁCIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**TALITA SANTOS DO VALLE**

**ESTUDO DE DEGRADAÇÃO FORÇADA E DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO  
INDICATIVO DE ESTABILIDADE PARA DETERMINAÇÃO DE BENZNIDAZOL**

Belo Horizonte - MG

2019

**TALITA SANTOS DO VALLE**

**ESTUDO DE DEGRADAÇÃO FORÇADA E DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO  
INDICATIVO DE ESTABILIDADE PARA DETERMINAÇÃO DE BENZNIDAZOL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestra em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr Christian Fernandes – UFMG

Coorientadora: Dra. Maria Betânia de Freitas Marques  
– UFMG

Belo Horizonte - MG

2019

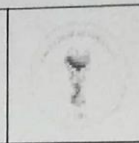
V181e Valle, Talita Santos do.  
Estudo de degradação forçada e desenvolvimento de método indicativo de estabilidade para determinação de benznidazol / Talita Santos do Valle. – 2019.  
130 f. : il.

Orientador: Christian Fernandes.  
Coorientadora: Maria Betânia de Freitas Marques.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

1. Chagas, Doença de – Teses. 2. Fármaco – Teses. 3. Cromatografia – Teses. 4. Análise térmica – Teses. 5. Medicamentos – Testes – Teses. I. Fernandes, Christian. II. Marques, Maria Betânia de Freitas. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. IV. Título.

CDD: 616.9393



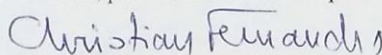
## FOLHA DE APROVAÇÃO

***Estudo de degradação forçada e desenvolvimento de método indicativo de estabilidade para determinação de benznidazol***

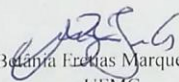
### TALITA SANTOS DO VALLE

Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, como requisito para obtenção do grau de Mestra em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, área de concentração CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS.

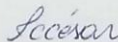
Aprovada em 25 de fevereiro de 2019, pela banca constituída pelos membros:



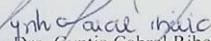
Prof. Christian Fernandes - Orientador  
UFMG



Dra. Maria Beatriz Freitas Marques - Coorientadora  
UFMG



Profa. Isabela da Costa César  
UFMG



Dra. Cynthia Cabral Ribeiro  
Labfar/Pesquisa e Serviços Ltda

Belo Horizonte, 25 de fevereiro de 2019.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço, sempre e primeiramente, a Deus, por todas as oportunidades que me foram e são dadas a todo momento. Por sua divina misericórdia e por colocar pessoas tão boas em minha vida.

Ao professor Christian Fernandes por sua dedicação e apoio nessa etapa do meu crescimento pessoal e profissional. Por todas as discussões, orientações, sugestões e ensinamentos. Pela sempre paciente conversa quando tudo parecia dar errado.

A Betânia Marques por sua coorientação tão paciente e enriquecedora.

Aos professores Cristina Duarte Vianna Soares, Isabela da Costa César, Gerson Antônio Pianetti e José Eduardo Gonçalves pela convivência e ensinamentos.

Aos professores que me proporcionaram um crescimento intelectual através das disciplinas ministradas durante esse tempo.

Ao Marton e ao Professor Lucas pelo auxílio dado pelo Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas.

À banca examinadora, Cyntia Cabral Ribeiro e Isabela da Costa César, por terem aceitado o convite e terem contribuído ainda mais para a melhoria desse trabalho.

A Júlia Gouvêa por toda a sua ajuda no dia-a-dia, compartilhando cada momento de vitória e de dias não tão fáceis. Por ter se envolvido, buscando aprender o máximo possível.

Aos meus grandes companheiros de laboratório: Ana Carolina, Juliana Veloso, Juliana Brêtas, Ingrid, Camila, Luan, Sarah, André, Vanessa, Naialy, Mateus, Pedro Reis e Pedro Franco, por todas as discussões enriquecedoras. Em especial ao Pedro Franco, Naialy e Ju Brêtas (junto com meu pé de coelho, Benício) pela amizade, paciência, por terem partilhado comigo cada momento desse projeto, terem sido fonte inesgotável de ideias, sugestões e discussões, além de todo apoio quando tudo parecia não dar certo. Com toda certeza esse trabalho não foi feito só por mim e é isso que o torna ainda mais importante.

À Ju Amorim por cada bate papo, sugestões e abraços pelos corredores da FaFar.

A Lúcia pelo café nosso de todos os dias e a Tânia pelo seu suporte no laboratório.

Aos meus pais, por não medirem esforços, apoio e amor para que eu lutasse pelos meus sonhos e objetivos. A minha irmã Julia por todo seu amor e ao meu sobrinho Luiz por deixar meus dias mais leves e felizes.

A toda a minha família, pelo amor e apoio incondicional. Aos meus avós por cada terço rezado em função das minhas conquistas.

Ao Vitor, pelo amor, companheirismo, força, incentivo e apoio em todos os momentos.

Aos meus sogros Liberalino e Clara por todo carinho sempre.

As minhas Girls por serem sempre tão presentes e por todo o suporte e apoio em todos os momentos. À Camila, por sua amizade, apoio e partilhas da vida acadêmica.

Ao LCQ pelo suporte estrutural para o desenvolvimento desse projeto.

Ao LAFAPE pela doação dos insumos farmacêuticos utilizados nesse trabalho.

A CAPES pelo suporte financeiro

.

**" Lute com determinação,  
abraçe a vida com paixão,  
perca com classe e vença com ousadia,  
porque o mundo pertence a quem se atreve e  
a vida é muito bela para ser insignificante.**

**Augusto Branco"**

**"Então não desista, sorria.  
Você é mais forte do que pensa e  
será mais feliz do que imagina.**

**Tati Bernardi"**

## RESUMO

Para garantir o sucesso do tratamento farmacológico, o medicamento precisa ter eficácia, segurança e qualidade. A falta de estabilidade pode prejudicar essa tríade, devido à perda do efeito terapêutico ou exposição do paciente aos produtos tóxicos de degradação. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) preconizou, por meio da RE N° 1 de 2005, o desenvolvimento de métodos indicativos de estabilidade que sejam seletivos para o fármaco e que permitam a quantificação e a identificação dele e de seus produtos de degradação. Para isso, são realizados estudos de degradação forçada, no qual o fármaco é submetido a situações de estresse definidas. Atualmente, não existe descrito na literatura nenhum método indicativo de estabilidade para o benznidazol (BZN), único fármaco utilizado no Brasil para tratamento da doença de Chagas. Esta doença é endêmica nos países da América Latina e é considerada uma doença negligenciada pela OMS. Diante desse contexto, realizou-se estudo de degradação forçada do placebo, insumo farmacêutico ativo e comprimidos contendo BZN, em todas as condições de degradação preconizadas. Um método indicativo de estabilidade foi desenvolvido e validado utilizando CLAE-DAD, em coluna C18 (150 x 4.6 mm, 5 µm). Além disso, realizaram-se degradações binárias (fármaco excipiente) e análises térmicas (termogravimetria e calorimetria exploratória diferencial) para avaliação da compatibilidade fármaco-excipiente. O fármaco foi suscetível à degradação alcalina e fotolítica. Na condição alcalina, houve a formação de um produto de degradação adicional, para os comprimidos. Foram observadas incompatibilidades do BZN com a lactose e estearato de magnésio, com uma diminuição da estabilidade térmica do fármaco na presença desses excipientes. O método cromatográfico foi seletivo para o BZN e seus produtos de degradação, com resolução de, pelo menos, 1,3 entre os picos. Também foi demonstrada homogeneidade espectral para o BZN nas condições testadas. Assim, o método indicativo de estabilidade desenvolvido poderá ser utilizado nos estudos de estabilidade e de aperfeiçoamento farmacotécnico, garantindo a qualidade do medicamento distribuído à população.

**Palavras chave:** Doença de chagas. Benznidazol. Degradação forçada. Método indicativo de estabilidade. Análise térmica



## ABSTRACT

A drug product must have efficacy, safety and quality to ensure the success of pharmacological treatment. Lack of stability can impair this triad due to the loss of the therapeutic effect or patient exposure to toxic degradation products. The Brazilian National Health Surveillance Agency (ANVISA) recommended, through RE N° 1 2005, the development of stability-indicating methods. These must be selective for the drug and allow the quantification and identification of the drug and of its degradation products. For this, studies of forced degradation are performed, in which the drug is subjected to defined stress conditions. Currently, no stability indicating method for benznidazole (BZN), the only drug used in Brazil for the treatment of Chagas disease, is described in the literature. This disease is endemic in Latin American countries and is considered a neglected disease by the WHO. In this context, a forced degradation study of placebo, active pharmaceutical ingredient and tablets containing BZN was carried out in all recommended degradation conditions. A stability indicating method was developed and validated using HPLC-DAD on C18 column (150 x 4.6 mm, 5 µm). In addition, binary degradations (drug-excipient) and thermal analyzes (thermogravimetry and differential scanning calorimetry) were performed to assess drug-excipient compatibility. The drug was susceptible to alkaline and photolytic degradation. In the alkaline condition, there was formation of an additional degradation product for the tablets. Incompatibilities of BZN with lactose and magnesium stearate were observed, with a decrease in the thermal stability of the drug in the presence of these excipients. The chromatographic method was selective for the BZN and its degradation products, with a resolution of at least 1.3 between the peaks. Spectral homogeneity was also demonstrated for BZN under the tested conditions. Thus, the stability indicating method developed can be used in the stability studies and to improve formulation, ensuring the quality of the drug product distributed to the population.

**Keywords:** Chagas's disease. Benznidazole. Forced degradation. Stability indicating method. Thermal analysis

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1 -</b>	Mecanismo envolvido nas três fases da auto-oxidação: iniciação.....	35
<b>Figura 2 -</b>	Mecanismo envolvido na formação do radical a partir do AIBN.....	35
<b>Figura 3 -</b>	Ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i> no triatomíneo e no ser humano.....	39
<b>Figura 4 -</b>	Distribuição dos casos de infecção por <i>T.cruzi</i> no mundo entre os anos de 2006-2009.....	40
<b>Figura 5 -</b>	Estrutura química do benznidazol.....	41
<b>Figura 6 -</b>	Mecanismo de ação farmacológico proposto para o BZN.....	42
<b>Figura 7 -</b>	Espectro na região do Infravermelho para o BZN IFA.....	67
<b>Figura 8 -</b>	Espectro de absorção na região do UV para o BZN.....	68
<b>Figura 9 -</b>	Padrão de difração ajustado do benznidazol (BZN) pelo método de Rietveld.....	69
<b>Figura 10 -</b>	Cromatograma obtido na degradação forçada em meio alcalino na presença e na ausência do BZN IFA.....	72
<b>Figura 11 -</b>	Reação da ACN em meio básico ocorrida na hidrólise alcalina.....	73
<b>Figura 12 -</b>	Cromatogramas obtidos para o cosolvente 1,4 dioxano após a degradação em meio alcalino na presença e ausência do BZN IFA na concentração de 50 µg/mL.....	73
<b>Figura 13 -</b>	Cromatogramas obtidos para o cosolvente THF após a degradação em meio alcalino na presença e ausência do BZN IFA na concentração de 50 µg/mL.....	74
<b>Figura 14 -</b>	Cromatograma referente ao gradiente exploratório para a degradação alcalina utilizando solução NaOH 0,1 M por 24h a 50 °C na concentração de 100 µg/mL nos comprimentos de onda 212 nm (A) e 316 nm (B).....	75
<b>Figura 15 -</b>	Cromatograma referente à corrida isocrática da degradação alcalina do BZN IFA utilizando solução NaOH 0,1 M por 8h a 50 °C na concentração de 100 µg/mL em 212 nm.....	76
<b>Figura 16 -</b>	Cromatograma do branco e do placebo antes e após degradação forçada por NaOH em 212 nm.....	77
<b>Figura 17 -</b>	Cromatograma BZN comprimidos na concentração de 100 µg/mL em 212 nm.....	77
<b>Figura 18 -</b>	Representação do mecanismo de reação geral que envolve a hidrólise de amidas.....	78
<b>Figura 19 -</b>	Estruturas químicas que representam dois dos prováveis produtos de degradação formados pela hidrólise em meio alcalino.....	78
<b>Figura 20 -</b>	BZN IFA, comprimido triturado e comprimido íntegro antes (A) e após degradação fotolítica (B).....	82
<b>Figura 21 -</b>	Cromatograma da degradação fotolítica do BZN IFA controle e após 9 dias de exposição à câmara fotolítica utilizando o método isocrático em 230 nm a concentração de 100 µg/mL.....	82

## LISTA DE FIGURAS (continuação)

<b>Figura 22</b> - Principais produtos de degradação propostos por Santos (2013) que podem ser formados após degradação fotolítica após análise por espectrometria de massas.....	83
<b>Figura 23</b> - Distribuição das microespécies de BZN em função do pH do meio.....	84
<b>Figura 24</b> - Cromatograma das condições em que houve degradação comprovando adequabilidade do método indicativo de estabilidade desenvolvido para IFA (A) e comprimidos (B).....	88
<b>Figura 25</b> - Cromatograma da degradação alcalina para BZN IFA e comprimido em 8h a 50 °C na concentração de 100 µg/mL.....	90
<b>Figura 26</b> - Cromatogramas obtidos para comprovação da seletividade do método.....	91
<b>Figura 27</b> - Gráfico que comprova a pureza de pico do BZN no teste da seletividade	92
<b>Figura 28</b> - Gráfico da dispersão dos resíduos para análise da homocedasticidade.....	94
<b>Figura 29</b> - Curva analítica para avaliação da linearidade do método indicativo de estabilidade para a BZN na faixa de 20 a 60 µg/mL.....	95
<b>Figura 30</b> - Gráfico de Lenth para avaliação da robustez nas amostras contendo BZN IFA contaminado com placebo.....	100
<b>Figura 31</b> - Gráfico de Lenth para avaliação da robustez nas amostras contendo BZN IFA.....	100
<b>Figura 32</b> - Gráfico do inverso do teor restante de BZN IFA em função do tempo após degradação alcalina.....	103
<b>Figura 33</b> - Gráfico da porcentagem do teor restante de BZN IFA e comprimido em função do tempo após degradação fotolítica.	103
<b>Figura 34</b> - Cromatogramas referentes ao estudo de cinética de degradação do BZN comprimidos em meio alcalino com coletas realizadas em intervalos de 2h a uma concentração de 50 µg/mL em 230 nm.....	104
<b>Figura 35</b> - Cromatogramas referentes ao estudo de cinética de degradação do BZN IFA em meio alcalino com coletas realizadas em intervalos de 2h a uma concentração de 50 µg/mL em 230 nm.....	105
<b>Figura 36</b> - Cromatogramas referentes ao estudo de cinética de degradação fotolítica do BZN IFA com coletas realizadas em intervalos de 48h a uma concentração de 50 µg/mL em 230 nm.....	105
<b>Figura 37</b> - Cromatogramas referentes ao estudo de cinética de degradação fotolítica do BZN comprimidos com coletas realizadas em intervalos de 48h em 230 nm.....	106
<b>Figura 38</b> - Cromatogramas obtidos em 230 nm para as misturas binárias as quais não foram observadas semelhanças com o perfil de degradação do comprimido.....	108
<b>Figura 39</b> - Cromatogramas obtidos em 230 nm para a mistura binária com as lactoses e a comparação com a mistura 1:1,5 (p/p) e o comprimido.....	108

## LISTA DE FIGURAS (conclusão)

- Figura 40 -** Curvas DSC obtidas para cada componente da formulação e das misturas binárias no tempo zero (T0, imediatamente após o preparo da mistura) e após 60 dias de armazenamento (T60). BZN: benznidazol; EMg: estearato de magnésio. Detalhe em círculo nas curvas T0 BZN+EMg e T60 BZN+EMg destaca a ausência do fenômeno da fusão do EMg. As curvas foram obtidas sob atmosfera dinâmica de nitrogênio 50 mL/min e razão de aquecimento de 10 °C/min..... 109
- Figura 41 -** Curvas TG obtidas para cada componente da formulação e das misturas binárias no tempo zero (T0, imediatamente após o preparo da mistura) e após 60 dias de armazenamento (T60). BZN: benznidazol; EMg: estearato de magnésio. As curvas foram obtidas sob atmosfera dinâmica de nitrogênio 50 mL/min e razão de aquecimento de 10 °C/min..... 109
- Figura 42 -** Curvas DSC (A) e TG (B) para a mistura de todos os componentes na proporção de 1:1,5 p/p (BZN/excipientes) e comprimido. As curvas foram obtidas sob atmosfera dinâmica de nitrogênio 50 mL/min e razão de aquecimento de 10 °C/min..... 115
- Figura 43 -** Difratogramas do BZN, dos excipientes da formulação e de suas respectivas misturas binárias obtidos imediatamente após o preparo (T0). BZN: benznidazol; EMg: estearato de magnésio..... 118
- Figura 44 -** Difratogramas obtidos para o comprimido íntegro e para o comprimido triturado..... 119

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Limites para notificação, identificação e qualificação dos produtos de degradação presentes em medicamentos.....	24
<b>Tabela 2 -</b>	Condições de estresse às quais os fármacos e medicamentos devem ser expostos.....	30
<b>Tabela 3 -</b>	Cosolventes que podem ser utilizados em diferentes condições de pH.....	31
<b>Tabela 4 -</b>	Mudanças na mortalidade, prevalência e incidência por transmissão vetorial da doença de Chagas em 21 países endêmicos da América Latina, nos anos de 1990, 2000, 2006 e 2010.....	40
<b>Tabela 5 -</b>	Métodos analíticos para quantificação de BZN em diferentes matrizes.....	43
<b>Tabela 6 -</b>	Excipientes utilizados na fabricação de comprimidos contendo benznidazol.....	44
<b>Tabela 7 -</b>	Composição estimada do placebo utilizado nos estudos de degradação forçada.....	50
<b>Tabela 8 -</b>	Condições cromatográficas utilizadas para gradiente exploratório.....	54
<b>Tabela 9 -</b>	Condições cromatográficas utilizadas para corrida isocrática.....	54
<b>Tabela 10 -</b>	Preparo das soluções de BZN IFA padronizado para avaliação da linearidade do método indicativo de estabilidade.....	57
<b>Tabela 11 -</b>	Preparo das amostras para determinação da precisão do método analítico.	58
<b>Tabela 12 -</b>	Variações utilizadas para a realização do teste de Youden.....	60
<b>Tabela 13 -</b>	Variáveis utilizadas nos experimentos de robustez para desenvolvimento do método indicativo de estabilidade para BZN.....	61
<b>Tabela 14 -</b>	Números de onda e atribuições das bandas de absorção obtida no espectro de infravermelho do BZN IFA.....	68
<b>Tabela 15</b>	Resultados obtidos no teste de determinação de peso dos comprimidos contendo BZN	70
<b>Tabela 16 -</b>	Resultado do teste de solubilidade para o BZN.....	71
<b>Tabela 17 -</b>	Tampões recomendados para utilização em cromatografia de acordo com sua faixa de tamponamento e compatibilidade com detector de massas.....	85
<b>Tabela 18 -</b>	Gradiente utilizado no método indicativo de estabilidade desenvolvido para BZN utilizando CLAE.....	87
<b>Tabela 19 -</b>	Condições cromatográficas definitivas do método indicativo de estabilidade desenvolvido para BZN utilizando CLAE.....	87
<b>Tabela 20 -</b>	Parâmetros do sistema cromatográficos utilizados para comprovar a adequabilidade do método indicativo de estabilidade desenvolvido utilizando CLAE.....	89
<b>Tabela 21 -</b>	Resultado da avaliação da adequabilidade do sistema cromatográfico.....	92
<b>Tabela 22 -</b>	Concentrações de BZN e valores de área para a construção da curva analítica do método indicativo de estabilidade.....	93
<b>Tabela 23 -</b>	Resultados dos testes para avaliação das premissas necessárias à utilização dos MMQO.....	94
<b>Tabela 24 -</b>	Valores de teor médio e DPR estimados para precisão intra-corrída.....	96
<b>Tabela 25 -</b>	Porcentagem de recuperação de BZN adicionada ao placebo para avaliação da exatidão do método indicativo de estabilidade.....	97

## LISTA DE TABELAS (conclusão)

<b>Tabela 26 -</b>	Efeito de cada variável calculada pelo método de Youden, os limites de cada uma e a conclusão da influência sobre o IFA fortificado com placebo..	98
<b>Tabela 27 -</b>	Efeito de cada variável calculada pelo método de Youden, os limites de cada uma e a conclusão da influência sobre o IFA.....	99
<b>Tabela 28 -</b>	Legendas para as variáveis representadas nos gráficos de Leth.....	99
<b>Tabela 29 -</b>	Parâmetros da curva analítica utilizados nos cálculos dos limites de quantificação e detecção.....	101
<b>Tabela 30 -</b>	Equações e coeficientes para os modelos matemáticos avaliados para cinética de degradação forçada em meio alcalino.....	102
<b>Tabela 31 -</b>	Equações e coeficientes para os modelos matemáticos avaliados para cinética de degradação forçada fotolítica.....	102
<b>Tabela 32 -</b>	Temperaturas do fenômeno (Tonset, °C) e fluxos de calor envolvidos ( $\Delta H$ - entalpia, J/g) para cada componente da formulação e misturas binárias avaliadas no tempo zero (T <sub>0</sub> , imediatamente após o preparo da mistura) obtidos por DSC.....	111
<b>Tabela 33 -</b>	Temperaturas do fenômeno (°C) e porcentagem de perda de massa (%) para cada componente da formulação e misturas binárias, avaliadas no tempo zero (T <sub>0</sub> , imediatamente após o preparo da mistura) obtidos por TG	112
<b>Tabela 34 -</b>	Temperaturas e entalpias associadas aos eventos térmicos observados na análise por DSC para a mistura de todos os componentes na proporção de 1:1,5 p/p (BZN/excipientes) e comprimido.....	116
<b>Tabela 35 -</b>	Temperaturas e perdas de massa observadas na análise por TG para a mistura de todos os componentes na proporção de 1:1,5 p/p (BZN/excipientes) e comprimido.....	116

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\alpha$	Nível de significância
ACN	Acetonitrila
AIBN	Azobisisobutironitrila
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BZN	Benznidazol
C <sub>18</sub>	Sílica ligada a grupos octadecilsilanos
CLAE	Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência
CLAE-EM/EM	Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas sequencial
CLUE	Cromatografia a Líquido de Ultra Eficiência
CuSO <sub>4</sub>	Sulfato de cobre
DAD	Diode Array detector
DPR	Desvio Padrão Relativo
DRX	Difração de raio-X
DSC	Calorimetria exploratória diferencial
EM	Espectrometria de Massas
eV	Eletrovolt
FB 5	Farmacopeia Brasileira 5ª edição
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
HCl	Ácido clorídrico
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogênio
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
ICH	<i>International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use</i>
IFA	Insumo Farmacêutico Ativo
ITD	Ingestão total diária
IV	Infravermelho
k	Fator de retenção
Log P	Coeficiente de partição
Lux	Unidade da intensidade de iluminação
M	Molar
MMQO	Método dos mínimos quadrados ordinários
NMP	Metilpirrolidona

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS (conclusão)

NaOH	Hidróxido de sódio
OMS	Organização Mundial de Saúde
pH	Potencial hidrogeniônico
pKa	Constante de dissociação
p/v	Peso por volume
p/p	Peso por peso
R <sup>2</sup>	Coefficiente de determinação
R	Coefficiente de correlação
RMN	Ressonância magnética nuclear
SBMT	Sociedade Brasileira de Medicina Tropical
SUS	Sistema Único de Saúde
T <sub>onset</sub>	Temperatura de início do evento térmico na DSC
T <sub>R</sub>	Tempo de Retenção
T <sub>start</sub>	Temperatura de início da degradação na TG
TG	Termogravimetria
USP	Farmacopeia Americana, do inglês <i>United States Pharmacopeia</i>
UR	Umidade relativa
UV	Ultravioleta
watt	Unidade de potência



## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	18
2 OBJETIVOS .....	21
2.1 Objetivo geral.....	21
2.2 Objetivos específicos.....	21
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	22
3.1 Estabilidade de fármacos.....	22
3.2 Estudos de degradação forçada e métodos indicativos de estabilidade.....	25
3.2.1 Interação excipientes e IFA.....	27
3.2.2 Delineamento dos testes de degradação forçada .....	29
3.3 Técnicas empregadas no desenvolvimento de métodos indicativos de estabilidade.....	36
3.4 Identificação dos produtos de degradação .....	37
3.5 Doença de Chagas .....	38
3.5.1 Aspectos gerais.....	38
3.5.2 Epidemiologia.....	39
3.5.3 Benznidazol.....	41
3.6 Métodos analíticos para determinação de benznidazol .....	42
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	44
4.1 Materiais .....	44
4.1.1 Insumo farmacêutico ativo, comprimidos e excipientes .....	44
4.1.2 Reagentes e vidrarias .....	44
4.1.3 Equipamentos e acessórios .....	45
4.2 Métodos .....	46
4.2.1 Identificação por espectrofotometria no infravermelho e no ultravioleta e por difração de raio-X.....	46
4.2.2 Determinação do peso médio dos comprimidos de BZN. ....	47
4.2.3 Determinação da solubilidade do BZN IFA .....	47
4.2.4 Testes de degradação forçada.....	48
4.2.5 Desenvolvimento de método indicativo de estabilidade por cromatografia líquida de alta eficiência.....	53
4.2.6 Validação .....	55
4.2.7 Estudo da cinética de degradação forçada do BZN IFA e comprimidos ...	63
4.2.8 Estudo da interação entre fármaco e excipientes. ....	64
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	67

5.1	Identificação por espectrofotometria de absorção no infravermelho, no ultravioleta e por difração de raio-X .....	67
5.2	Determinação do peso médio. ....	70
5.3	Determinação da solubilidade do BZN IFA .....	71
5.4	Testes de degradação forçada .....	71
5.4.1	Utilização de cosolvente.....	72
5.4.2	Degradação em meio alcalino.....	74
5.4.3	Degradação em meio ácido .....	79
5.4.4	Degradação em meio neutro (água).....	79
5.4.5	Degradação em meio oxidativo mediada por peróxido de hidrogênio.....	79
5.4.6	Degradação em meio oxidativo mediada por iniciador de auto-oxidação .	80
5.4.7	Degradação mediada por íons metálicos .....	80
5.4.8	Degradação úmida .....	81
5.4.9	Degradação térmica. ....	81
5.4.10	Degradação fotolítica. ....	81
5.5	Desenvolvimento de método indicativo de estabilidade por cromatografia líquida de alta eficiência.....	83
5.6	Validação .....	91
5.6.1	Seletividade e adequabilidade do sistema. ....	91
5.6.2	Linearidade .....	92
5.6.3	Precisão .....	96
5.6.4	Exatidão .....	97
5.6.5	Robustez .....	97
5.6.6	Limite de detecção .....	101
5.6.7	Limite de quantificação.....	101
5.7	Estudo da cinética de degradação forçada do BZN IFA e comprimidos.....	101
5.8	Estudo da interação entre fármaco e excipientes. ....	106
5.8.1	Estudo de degradação forçada com misturas binárias em meio alcalino. ....	106
5.8.2	Estudos de compatibilidade entre o benznidazol e os excipientes utilizando Análise Térmica e Difração de raios-X de pó.....	108
6	CONCLUSÕES .....	120
	REFERÊNCIAS .....	121
	ANEXO 1- Certificado de apresentação de trabalho no III SINCIFAR. ....	127
	ANEXO 2 - Certificado de apresentação de trabalho como co-autora no III SINCIFAR.....	128
	ANEXO 3 - Certificado de apresentação de trabalho no IV ABCF Congress.....	129

ANEXO 4 - Laudo fornecido pelo LAFEPE do teor de BZN a partir de um padrão trabalho .....	130
---	-----

## 1 INTRODUÇÃO

O sucesso do tratamento farmacológico está diretamente relacionado à tríade qualidade, segurança e eficácia de um medicamento. A qualidade é garantida pelo seguimento das normas de boas práticas de fabricação e assegurada pelos testes de controle de qualidade descritos nos principais compêndios oficiais. A segurança e a eficácia são avaliadas por meio de estudos clínicos e pela análise dos efeitos adversos causados não só pelos medicamentos, mas também pelas impurezas que neles estão contidas (JAIN; BASNIWAL, 2013).

A estabilidade de um fármaco é definida pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como a capacidade do produto farmacêutico manter suas propriedades químicas, físicas, microbiológicas e biofarmacêuticas dentro dos limites especificados, durante todo seu prazo de validade (WHO, 1996). A falta de estabilidade, portanto, pode causar alterações nas propriedades físicas e químicas do medicamento que podem ser perigosas para os pacientes devido a formação de produtos de degradação tóxicos ou podendo levar ao insucesso do tratamento devido à perda do efeito terapêutico. (KHAN *et al.*, 2010; LEITE, 2005).

Os produtos de degradação são um tipo de impureza oriunda da decomposição do fármaco ou dos excipientes presentes na formulação. Vários fatores podem favorecer a formação desses produtos, como: temperatura, umidade, pH, oxigênio, luz. Uma vez que os medicamentos estão expostos a todos esses fatores, é de extrema importância o desenvolvimento de estudos sobre a degradação de fármacos, a fim de se determinar não só o seu prazo de validade, mas também detectar potenciais produtos de degradação e as condições que são determinantes para a manutenção de sua estabilidade (KHAN *et al.*, 2010).

Para a realização dos estudos de estabilidade, vários guias internacionais e nacionais podem ser utilizados, como o guia ICH Q1A (R2) (ICH, 2003; KHAN *et al.*, 2010) e o guia da OMS (TRS No. 953) (WHO, 2009). Para uma abordagem mais específica sobre as impurezas em medicamentos e fármacos os guias ICH Q3B (R2) e ICH Q3A (R2), respectivamente, são utilizados (ICH, 2006[a] e [b]; MELO, 2012; KHAN *et al.*, 2010). No Brasil, as indústrias farmacêuticas devem seguir as normas descritas na Resolução nº 01, de 29 de julho de 2005 da Agência Nacional de

Vigilância Sanitária (ANVISA), que é um guia para a realização de estudos de estabilidade. Nessa mesma resolução, a realização de estudos de estresse e o desenvolvimento de métodos indicativos de estabilidade seletivos para a quantificação do fármaco de interesse frente a seus produtos de degradação é preconizado (BRASIL, 2005).

Em dezembro de 2015 a ANVISA publicou a RDC Nº 53/2015 que, além de estabelecer os parâmetros para a notificação, identificação e qualificação dos produtos de degradação formados em medicamentos com substâncias ativas sintéticas e semissintéticas, preconiza a realização de estudos de degradação forçada ou estudos de estresse. Esses testes devem ser realizados com o IFA e com a forma farmacêutica sob condições extremas de luz, temperatura, calor, umidade, hidrólise ácida/alcalina/neutra e agentes oxidantes e redutores (BRASIL, 2015). Os estudos de degradação forçada devem promover degradação em extensão suficiente a fim de permitir avaliação da formação de produtos de degradação. A degradação deve apresentar valor superior a 10% (dez por cento) e inferior àquela que levaria à degradação completa da amostra, comprometendo o teste. Recomenda-se um valor de no máximo 30%. (BRASIL, 2015).

As técnicas cromatográficas, principalmente a CLAE, são as mais utilizadas tanto no meio industrial quanto no meio acadêmico, devido à sua alta seletividade e sensibilidade, além das inúmeras opções de instrumentação, colunas e tipos de detectores que podem estar acoplados aos equipamentos, como detectores UV e espectrômetros de massas. Estima-se que 85 a 90% dos métodos indicativos de estabilidade desenvolvidos utilizam essa técnica (BAKSHI; SINGH, 2002). Além da CLAE, outras técnicas como a cromatografia gasosa e a cromatografia em camada delgada também podem ser utilizadas no desenvolvimento de métodos indicativos de estabilidade (BAKSHI; SINGH, 2002; TZANAVARAS, 2010). Apesar de já existirem técnicas mais avançadas como a cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE), a CLAE ainda é a técnica mais presente no desenvolvimento de métodos indicativos de estabilidade.

A doença de Chagas é uma doença parasito infecciosa, causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*. Foi descoberta em 1909 pelo cientista brasileiro Carlos Chagas e é classificada pela OMS como uma enfermidade negligenciada. Ela é transmitida

pelo inseto hemíptero hematofágo da família Reduviidae, sub-família Triatominae, conhecida popularmente no Brasil como barbeiro. É conhecida também como tripanossomíase Americana por ser uma doença endêmica dos países da América central e do Sul, devido à alta distribuição de mais de 140 espécies do inseto vetor (SBMT; 2016; WHO, 2013).

A doença possui duas fases: aguda e crônica. A fase aguda geralmente pode ou não apresentar sintomas, o que dificulta o diagnóstico e o tratamento, uma vez que os medicamentos disponíveis, benznidazol e nifurtimox, são eficazes somente nessa fase, com chances de 100% de cura. No Brasil, apenas o medicamento benznidazol está disponível para o tratamento da fase aguda da doença. Tal fato evidencia o caráter de negligência da doença (MALIK; SINGH; AMSTERDAM, 2015).

Estima-se que 6 a 7 milhões de pessoas encontram-se infectadas pelo *T. cruzi* no mundo e que 60 milhões estão em risco de contrair a doença, principalmente nos 21 países da América Latina nos quais a doença é endêmica. No Brasil, de acordo com dados de 2010, cerca de 1 milhão de pessoas estavam infectadas por *T. cruzi* (SBMT, 2015).

Atualmente, não foi encontrado descrito na literatura nenhum método indicativo de estabilidade para o benznidazol, por nenhuma técnica analítica. Tal fato demonstra a necessidade do desenvolvimento de método indicativo de estabilidade utilizando uma técnica amplamente utilizada nos laboratórios analíticos, como a cromatografia líquida de alta eficiência.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Desenvolver e validar método indicativo de estabilidade seletivo para o fármaco benznidazol e seus produtos de degradação por meio da realização de estudos de degradação forçada.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Submeter o fármaco, os comprimidos e o placebo aos testes de degradação forçada e realizar análise crítica do perfil de degradação, avaliando fatores que podem interferir na estabilidade do medicamento.
- Desenvolver método indicativo de estabilidade específico para o benznidazol e seus produtos de degradação, utilizando cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à detector de arranjo de diodos (DAD).
- Validar o método desenvolvido de acordo com a legislação vigente.
- Realizar estudos de cinética de degradação na condição de estresse em que houve degradação do fármaco para o insumo farmacêutico ativo benznidazol e para o produto acabado (comprimidos).
- Investigar interações existentes entre o IFA e os excipientes utilizados na produção dos comprimidos, empregando calorimetria exploratória diferencial, termogravimetria e difração de raio-X.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Estabilidade de fármacos

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), estabilidade é a capacidade do produto farmacêutico manter suas propriedades químicas, físicas, microbiológicas e biofarmacêuticas dentro dos limites especificados, durante todo seu prazo de validade (WHO, 1996). A falta de estabilidade, portanto, pode causar alterações nas propriedades físicas e químicas do medicamento, levando à perda do efeito terapêutico e/ou à formação de produtos de degradação tóxicos. (KHAN, 2010; LEITE, 2005). Tendo em vista que o sucesso do tratamento farmacoterapêutico depende da qualidade, segurança e eficácia de um medicamento, a estabilidade é um parâmetro que deve ser assegurado.

As impurezas são definidas pelo *International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use* (ICH), por meio dos guias ICH Q3A e ICH Q3B, como qualquer componente presente no medicamento que não possua a mesma composição química definida para o fármaco ou seus excipientes (ICH, 2006[a]; ICH, 2006[b]). Essas impurezas estão classificadas nos guias do ICH como sendo de origem inorgânica, orgânica, outros materiais e solventes residuais (JAIN, 2013). Como exemplos de impurezas inorgânicas podem-se citar os catalisadores, metais pesados, resíduos ou outros materiais empregados na síntese do insumo farmacêutico ativo (IFA). As de origem orgânica são os intermediários de síntese, subprodutos, substâncias relacionadas e produtos de degradação (MELO, 2012). Uma vez que não é possível a obtenção de produtos completamente livres de impurezas e que estas podem possuir efeitos farmacológicos e causar efeitos adversos, a concentração das impurezas deve ser controlada e estar em níveis aceitáveis (BOULDER, 2015; HOLM; ELDER, 2015).

Os produtos de degradação são um tipo de impureza oriunda da decomposição do fármaco ou dos excipientes presentes na formulação. Vários fatores podem favorecer a formação desses produtos, como: temperatura, umidade, pH, oxigênio, luz e os excipientes. Uma vez que os medicamentos estão expostos a todos esses fatores, é de extrema importância o desenvolvimento de estudos para avaliar a degradação de fármacos, a fim de se determinar não só o seu prazo de validade,



mas também detectar potenciais produtos de degradação e as condições que são determinantes para a manutenção de sua estabilidade (KHAN *et al.*, 2010).

Como a estabilidade depende de fatores ambientais, para a realização de estudos de estabilidade, o planeta foi classificado em quatro zonas com diferentes especificações de temperatura e umidade (zona I: temperada; zona II: subtropical, mediterrânea; zona III: quente e seca e zona IV: quente e úmida), para possibilitar a comercialização dos produtos em outras zonas climáticas (GRIMM, 1998; BOTT; OLIVEIRA, 2007; SILVA, 2009). O Brasil encontra-se situado na zona climática IV, que é caracterizada por alta temperatura e umidade, padrões dominantes na maior parte do país, mesmo que com algumas diferenças inter-regionais.

Para a realização dos estudos de estabilidade, vários guias internacionais e nacionais podem ser utilizados. Em 1990, autoridades regulatórias e associações das indústrias farmacêuticas da Europa, Japão e EUA criaram um organismo denominado Comitê Internacional de Harmonização dos Requisitos Técnicos para Registro de Produtos Farmacêuticos para uso em Seres Humanos (ICH). Em 1993 foi publicado o primeiro guia que tratava de testes de estabilidade para novas substâncias e produtos (ICH Q1A), que foi substituído, em 2003 pela versão ICH Q1A (R2), que é ainda utilizada (ICH, 2003; KHAN, 2010). A OMS também estabeleceu guia para estudo de estabilidade (TRS No. 953), em 2009 (WHO, 2009). Para uma abordagem mais específica sobre as impurezas em medicamentos e fármacos os guias ICH Q3B (R2) e ICH Q3A (R2) respectivamente, são utilizados. (ICH, 2006[a] e [b]; MELO, 2012; KHAN, 2010)

No Brasil, as indústrias farmacêuticas devem seguir as normas descritas na Resolução nº 01, de 29 de julho de 2005 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), que é um guia para a realização de estudos de estabilidade. As principais aplicações desse guia são a previsão, determinação e acompanhamento do prazo de validade de produtos farmacêuticos por meio de três estudos: acelerado, longa duração e de acompanhamento. O primeiro é projetado para acelerar a degradação química e/ou mudança física de um produto farmacêutico e assim simular as condições drásticas de armazenamento, com temperatura e umidade mais altas. O estudo de longa duração é projetado para avaliar as características físicas, químicas e microbiológicas do produto farmacêutico ao longo do prazo de validade esperado.

Ele é realizado em condições de umidade e temperatura menos drásticas que aquelas empregadas no estudo acelerado. Já com os estudos de acompanhamento objetiva-se garantir a manutenção das características observadas nos estudos de longa duração. A avaliação desses estudos é realizada por meio de retirada de amostras nos tempos determinados pelo guia e realização de análises de doseamento, quantificação de produtos de degradação, dissolução e pH (quando aplicáveis) (BRASIL, 2005; SILVA *et al.*, 2009).

Em dezembro de 2015, a ANVISA publicou a RDC Nº 53/2015, que estabelece os parâmetros para a notificação, identificação e qualificação dos produtos de degradação formados em medicamentos com substâncias ativas sintéticas e semissintéticas, classificados como novos, genéricos e similares, ao longo do seu prazo de validade, e dá outras providências. Estabelece também as condições para realização dos estudos de degradação forçada, para o estabelecimento do perfil de degradação (BRASIL, 2015). Na **Tabela 1** estão descritos os limites adotados para a notificação, identificação e qualificação de impurezas de acordo com essa resolução.

**Tabela 1** - Limites para notificação, identificação e qualificação dos produtos de degradação presentes em medicamentos.

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

1 - Quantidade máxima do insumo farmacêutico ativo administrado por dia.

2 - Limites dos produtos de degradação são expressos como a percentagem do insumo farmacêutico ativo ou como a administração total diária (ATD) de um produto de degradação.

De acordo com essa resolução, o limite de notificação é o valor acima do qual um produto de degradação deverá ser reportado no(s) estudo(s) de estabilidade. O

limite de identificação é o valor acima do qual um produto de degradação deverá ter sua estrutura química identificada. Por fim, o limite de qualificação é o valor acima do qual um produto de degradação deverá ser qualificado, por meio de avaliação da genotoxicidade e estudos gerais de toxicidade utilizando metodologia validada e conforme guia específico (BRASIL, 2015).

Assim, para o registro de medicamentos nas agências regulatórias, esses limites devem ser obedecidos e a identificação e qualificação, quando necessárias, devem ser feitas utilizando-se técnicas analíticas adequadas, como cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) acoplada a detectores DAD e espectrômetro de massas, que é a técnica mais amplamente utilizada. Além dessas técnicas, também podem ser empregadas a cromatografia gasosa e a eletroforese capilar (GOROG, 2003).

### **3.2 Estudos de degradação forçada e métodos indicativos de estabilidade**

Os produtos de degradação são uma das fontes de impurezas encontradas nos medicamentos, tanto no insumo farmacêutico ativo (IFA) quanto no produto acabado (QUI; NORWOOD, 2007). De acordo com Reymond (2002), existem quatro principais mecanismos de degradação: hidrólise, fotólise, termólise e oxidação. Dessa forma, a legislação brasileira, por meio da RDC N° 53/2015, preconiza a realização de estudos de degradação forçada ou estudos de estresse com o IFA, placebo e com a forma farmacêutica, sob condições extremas de luz, temperatura, calor, umidade, hidrólise ácida/alcalina/neutra e agentes oxidantes e redutores. Um dos principais objetivos desse estudo é o desenvolvimento de métodos indicativos de estabilidade que demonstrem seletividade e especificidade adequadas. Além disso, é possível obter informações sobre as possíveis rotas de degradação dos produtos formados (BRASIL, 2015; SILVA *et al.*, 2009).

Para o monitoramento dos resultados obtidos nos estudos de degradação forçada, um método indicativo de estabilidade deve ser desenvolvido para identificação e quantificação de produtos de degradação formados. De acordo com o guia do *Food and Drug Administration* (FDA), um método indicativo de estabilidade pode ser definido como "método analítico validado capaz de quantificar com exatidão e precisão a substância ativa livre do processo de impurezas, excipientes e produtos de degradação" (FDA, 2000).

Assim, pode-se concluir que esse teste faz parte da avaliação da estabilidade intrínseca do fármaco, com objetivos mais específicos, como: determinar as transformações estruturais desses compostos; detectar potenciais produtos de degradação; facilitar o aprimoramento de formulações e processos em paralelo aos estudos de estabilidade acelerada conduzidos; determinar as condições acidentais de exposição que podem ser prejudiciais para os produtos; e auxiliar no estabelecimento de parâmetros específicos indicadores de estabilidade (KATS, 2005).

De acordo com a RDC N° 53/2015, os estudos de degradação forçada devem promover degradação em extensão suficiente a fim de permitir avaliação da formação de produtos de degradação. A degradação deve apresentar valor superior a 10% (dez por cento) e inferior àquela que levaria à degradação completa da amostra, comprometendo o teste. Além disso, o estudo pode ser realizado em um lote em escala laboratorial, piloto ou industrial. Deve também ser realizado, para fins de comparação, com a formulação, com o placebo e no insumo(s) farmacêutico(s) ativo(s) isolado(s) e associado(s), no caso de associações em dose fixa (BRASIL, 2015).

Um método indicativo de estabilidade pode ser definido conforme sua natureza específica ou seletiva. O método específico é aquele que consegue quantificar, de forma inequívoca, o analito de interesse na presença dos produtos de degradação, excipientes e aditivos, que se espera que estejam presentes na formulação. O método seletivo é aquele capaz de determinar qualitativa e quantitativamente o fármaco e também os outros componentes presentes (impurezas e produtos de degradação) (BAKSHI; SINGH, 2002). De acordo com as agências reguladoras, como a ANVISA, FDA e ICH, os métodos seletivos são mais recomendados, já que são capazes de separar os produtos de degradação formados do fármaco e quantificar tanto o fármaco quanto os produtos de degradação (KATS, 2005).

Existem, basicamente, três etapas necessárias para o desenvolvimento de um método indicativo de estabilidade: geração de produtos de degradação para testar a seletividade do método; desenvolvimento do método avaliando sua seletividade e especificidade e validação do método desenvolvido (CIONE, 2007). Além disso, é necessário realizar estudo crítico da estrutura química do analito e das possíveis

rotas de degradação. Para o desenvolvimento do método analítico, é importante coletar informações sobre as propriedades físico-químicas do fármaco como pKa, solubilidade, log P e capacidade de absorção na região UV-VIS, a fim de selecionar técnicas de separação e detectores adequados (BAKSHI, 2002).

Após a realização do estudo, é necessária a análise crítica dos resultados, que deve conter a verificação da pureza de pico do insumo farmacêutico ativo no medicamento e a avaliação dos fatores que podem interferir de alguma forma na estabilidade do medicamento (BRASIL, 2015).

### 3.2.1 Interação excipientes e IFA

A realização dos testes de estresse com o placebo se faz importante para análise da possível interferência deles com o princípio ativo. Apesar dos excipientes terem que se apresentar inertes química e fisicamente e inativos toxicologicamente, pesquisas vêm demonstrando que as propriedades finais do fármaco, como biodisponibilidade e estabilidade podem ser influenciadas pela presença de excipientes. Isso pode ser causado pelos processos de tecnologia de produção aos quais o medicamento é submetido, como granulação por via úmida, por via seca ou compressão direta (CHADHA, BHANDARI, 2014; ZHANG, 2018).

As interações entre fármaco e excipiente são classificadas como físicas ou químicas. Interações físicas são caracterizadas quando não ocorre uma reação química, mas parâmetros como solubilidade, dissolução e biodisponibilidade são alterados. Essas mudanças podem ocorrer devido a mudanças na cor, odor, gosto, mudança na forma polimórfica ou cristalina do fármaco na presença de excipientes (SILVA, 2017). Por outro lado, as interações químicas são caracterizadas por uma reação química entre o fármaco e o excipiente ou modificação do pH do meio, acelerando a reação química. Isso pode ocorrer também devido à presença de baixos níveis de impurezas que podem reagir com os princípios ativos, causando degradação e problemas de estabilidade, podendo causar, como dito anteriormente, efeitos tóxicos e indesejáveis aos pacientes (ZHANG *et al*, 2017).

A análise de compatibilidade entre fármaco e excipientes é feita, geralmente, no momento do desenvolvimento farmacotécnico do comprimido. É comumente

realizada com misturas físicas entre o fármaco e o excipiente na proporção 1:1 em massa, para que dessa forma as possíveis interações existentes possam ser maximizadas. A temperatura e a presença de água são dois fatores que podem acelerar a interação entre o fármaco e o excipiente, podendo provocar mudanças na cor e no estado físico que indiquem essa interação. Algumas técnicas analíticas são utilizadas para investigar a existência dessas interações e incompatibilidades, como a CLAE; análises térmicas, como termogravimetria (TG) e calorimetria exploratória diferencial (DSC); e difração de raio-X (DRX) (CHADHA, BHANDARI, 2014).

A TG é uma técnica na qual a variação da massa da substância é determinada em função do tempo e da temperatura, por meio de uma termobalança no equipamento. Essa técnica permite determinar a porcentagem de massa perdida por uma substância, sendo possível perceber perdas de água e de decomposição da substância. Assim, é possível comparar as curvas obtidas para a substância pura e para as misturas entre IFA e excipientes a fim de se perceber incompatibilidades como diminuição da estabilidade do IFA na presença do excipiente (GIRON, 1998; IONASHIRO, 2004).

Na DSC, uma substância de referência e a substância em análise são submetidas a uma programação controlada de temperatura e a diferença da energia fornecida a essas duas substâncias é medida em função da temperatura. Essa técnica permite acompanhar os efeitos de calor associados com alterações físicas ou químicas da amostra como: transições de fase (fusão, ebulição, sublimação, congelamento, inversões de estruturas cristalinas) ou reações de desidratação, de dissociação, de decomposição, de óxido-redução capazes de causar variações de calor, sendo possível a análise de efeitos endotérmicos e exotérmicos (IONASHIRO, 2004). Potenciais incompatibilidades podem ser apresentadas pelo aparecimento, mudanças ou desaparecimento de picos e variações nas entalpias de transições da substância sozinha e junto com o excipiente. (SILVA, 2017).

Por fim, a DRX é uma técnica não destrutiva que analisa a estrutura cristalina da substância. Ela pode ser utilizada de forma qualitativa ou quantitativa e juntamente com as técnicas de análise térmica, detecta incompatibilidades entre IFA e excipiente por meio do aparecimento ou desaparecimento de picos e variações em suas intensidades no difratograma (gráfico que mede a intensidade versus ângulo de

refração). Além disso, essa técnica é capaz de identificar interações que causam a modificação nas estruturas cristalinas e amorfas, assim como formas polimórficas do princípio ativo (NEWMAN, BYRN, 2003; SILVA, 2017).

### 3.2.2 *Delineamento dos testes de degradação forçada*

Na literatura não há uma padronização de como os estudos de degradação forçada devem ser conduzidos. Alsante (2003) demonstrou a grande variação existente nas condições de estresse utilizadas em estudo realizado com 20 indústrias farmacêuticas, nas quais os protocolos e as condições de degradação forçada utilizadas por eles, foram investigadas. Isso deve-se, principalmente, à diversidade das características estruturais e físico-químicas das substâncias que são submetidas a esses testes. Além disso, deve-se atentar que as condições impostas não devem ser muito severas, a fim de se evitar a formação de produtos de degradação improváveis (REYNOLDS *et. al*, 2002).

Considerando tal situação, autores como Bakshi e Singh (2002) e Baertschi e colaboradores (2011) elaboraram guias práticos e detalhados para escolha das condições a serem utilizadas. Fluxogramas de tomadas de decisões a partir dos resultados obtidos foram construídos por Singh e Bakshi (2000) com o objetivo de se alcançar a degradação exigida pela legislação por meio da realização do menor número de experimentos possíveis.

Na **Tabela 2** estão apresentadas as condições sugeridas por Baertschi e colaboradores (2011) para iniciar a realização dos testes de degradação forçada.

**Tabela 2** - Condições de estresse às quais os fármacos e medicamentos devem ser expostos.

Condição	Valor
Aquecimento	60 °C
Umidade	75% UR ou mais
Solução ácida	0,1 N HCl
Solução básica	0,1 N NaOH ou KOH
Solução oxidativa	0,3% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
Fotólise	UV-B fluorescente
Íons metálicos	0,05M Fe <sup>3+</sup> ou Cu <sup>2+</sup>

Todas as condições preconizadas são, de alguma forma, críticas para a estabilidade do IFA e do produto acabado.

### 3.2.2.1 Utilização de cosolvente

Os estudos de estresse são feitos em sua maioria em meios aquosos, como nas condições de hidrólise e oxidação. Assim, a solubilidade da substância é um fator limitante, uma vez que muitos fármacos são insolúveis em água em diferentes pHs. Dessa forma, o estudo pode ser conduzido em suspensão ou por meio da utilização de cosolvente, que é a adição da menor quantidade necessária de um solvente no qual a substância em análise é solúvel. Os dois solventes mais utilizados nessas situações são acetonitrila (ACN) e metanol (MeOH). O MeOH possui um maior potencial de participação nas reações de degradação, podendo funcionar como um nucleófilo, reagindo com sítios ativos da substância ou de intermediários, formando produtos de degradação que não seriam formados na sua ausência. A ACN é considerada um solvente mais inerte e tipicamente mais utilizado que o metanol. Entretanto, também pode participar das reações de degradação. Uma das reações descritas é a epoxidação na presença de peróxidos, na qual ela funciona como catalisadora em meio básico. A ACN também sofre degradação em meio alcalino ou ácido sob temperaturas elevadas, sendo detectados níveis de acetamida e ácido acético, que podem co-eluir com as substâncias em análise no método desenvolvido por CLAE. Para certificação da natureza desses picos, soluções em branco devem



ser submetidas às mesmas condições de degradação. Na presença de Azobisisobutironitrila (AIBN), ACN pode ser oxidada (BAERTSCHI; ALSANTE; REED, 2011). Na **Tabela 3** estão mostradas as opções de cosolventes que podem ser utilizados de acordo com a condição a ser estudada.

**Tabela 3** - Cosolventes que podem ser utilizados em diferentes condições de pH.

pH ácido	pH neutro	pH básico
		Acetonitrila
Acetonitrila		DMSO
DMSO	Acetonitrila	Dimethoxyethane (Glyme)
Ácido acético	Metanol	Diglicol metil éter (Diglyme)
Ácido propionico	Metilpirrolidona (NMP)	1,4 dioxano
THF		Metanol

Fonte: BAERTSCHI; ALSANTE; REED, 2011

### 3.2.2.2 Degradação termolítica (termólise)

A degradação termolítica pode ser definida como a quebra de ligação covalente, a pirólise, causada pela exposição da substância, em estado sólido, a temperaturas elevadas, suficientes para tal. No contexto da degradação de fármacos, pode-se também considerar esse termo para descrever reações que ocorrem em temperaturas mais elevadas, sendo ela um caminho para acelerar a degradação, como hidrólise, desidratação, isomerização, epimerização, descarboxilação, rearranjos e alguns tipos de reação de polimerização (BAERTSCHI; ALSANTE; REED, 2011). Nesse caso, dentre as condições descritas, a temperatura, por ser responsável por acelerar a velocidade de uma reação, é a condição mais crítica, principalmente considerando a localização do Brasil na zona IV de temperatura e umidade (LEITE, 2005).

O guia Q1A(R2) do ICH, que descreve os estudos de degradação forçada, sugere que seja feito um incremento de 10 °C acima das condições que devem ser testadas. Logo, temperaturas a partir de 60 °C devem receber aumentos de 10 °C até no máximo 80 °C para análise da decomposição (ICH-Q1A(R2), 2003).

### 3.2.2.3 Degradação hidrolítica (hidrólise)

Outra condição bastante crítica para a estabilidade é a umidade. Ela pode promover reações de hidrólise e afetar não somente fármacos higroscópicos, mas também os não higroscópicos. A água pode participar da reação de duas formas: como reagente ou por sua adsorção à superfície do produto, formando uma camada de água que pode dissolver a substância e degradá-la. Além disso, pode alterar seu estado físico, e assim sua reatividade. A utilização de embalagens impermeáveis pode dificultar a ação da umidade (LEITE, 2005).

A hidrólise é uma das reações mais observadas em produtos farmacêuticos, devido principalmente à presença de grupos funcionais como amidas, lactonas e ésteres que são muito susceptíveis a essas reações. Além disso, o pH, tampões, solvente e outros aditivos como agentes complexantes, surfactantes e excipientes influenciam diretamente o processo de degradação, podendo aumentar ou diminuir a velocidade das reações. Como a hidrólise e a oxidação são as principais reações observadas, essas podem ser catalisadas por ácidos e bases (BAERTSCHI; ALSANTE; REED, 2011; LEITE, 2005).

De acordo com Baertschi e colaboradores (2011), os testes de degradação hidrolítica devem ser realizados de forma a expor o IFA e produto acabado a condições ácidas, neutras e alcalinas, abrangendo uma faixa de pH que varie de 1 a 13. O uso de cosolvente deve ser feito quando o fármaco não apresenta solubilidade suficiente em meio aquoso, considerando as limitações que o uso de cada cosolvente possui. Temperaturas elevadas, até 70° C, são recomendadas para acelerar as reações de hidrólise e o período máximo de exposição a esses agentes estressantes é de uma semana (7 dias); entretanto, tempos mais longos podem ser utilizados, se desejado. A neutralização das amostras antes da sua análise não é recomendada devido à possibilidade de provocar precipitação ou reações secundárias. Entretanto, pode trazer um aumento na estabilidade das colunas cromatográficas e interrompe a reação de degradação que está em curso (BAERTSCHI; ALSANTE; REED, 2011).

Como descrito na **Tabela 2**, as condições iniciais dos estudos de hidrólise sugeridas são de 0,1 N tanto para o pH ácido, por meio da utilização de solução de HCl,

quanto para o meio básico, por meio da utilização de solução de NaOH ou KOH em temperatura ambiente. Se não houver degradação suficiente, acréscimos na temperatura (40 °C a 70 °C), seguidos de acréscimos no pH (até 1 N) e no tempo de exposição, podem ser feitos para se obter uma degradação suficiente.

#### 3.2.2.4 Degradação fotolítica (fotólise)

A luz é um fator que pode influenciar a degradação em determinados comprimentos de onda por meio da ativação de diferentes reações como polimerização, oxidação, rearranjo de anéis, redução, isomerização e ruptura de ligações. A reação de fotólise é resultado da absorção de radiação eletromagnética, principalmente na região do ultravioleta (UV) e visível, pela maioria das substâncias terapeuticamente ativas. De acordo com o guia de fotoestabilidade do ICH, estudos confirmatórios são responsáveis por determinar a necessidade da utilização de embalagens âmbar para se evitar a exposição dos fármacos a essa condição e conseqüentemente evitar sua degradação. Esse estudo é feito pela exposição do fármaco a 1,2 milhões de lux.h (visível) e 200 watt.h/m<sup>2</sup> (ultravioleta). Já nos testes de degradação forçada, a exposição deve ser de 3 a 5 vezes o valor empregado no estudo confirmatório. Além disso, uma amostra controle, ou seja, uma amostra exposta às mesmas condições exceto a luz, deve ser feita para comparação com a amostra em análise (ICH-Q1B, 1996; LEITE, 2005).

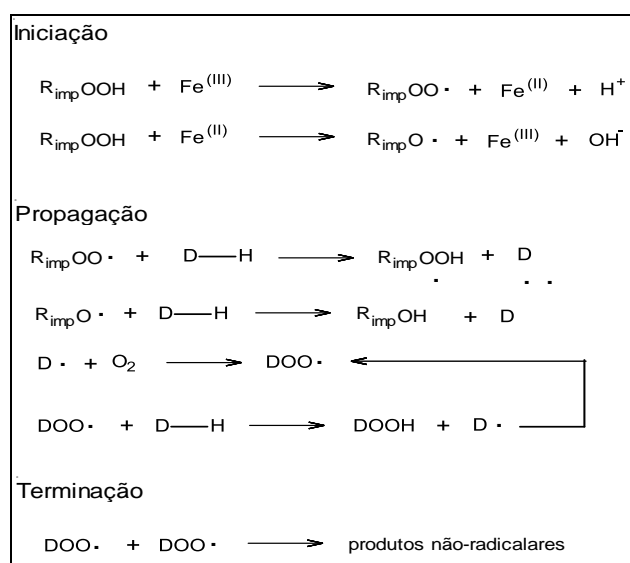
#### 3.2.2.5 Degradação oxidativa

As reações de oxidação são devidas principalmente à presença de oxigênio em abundância no ar atmosférico. Além dele, outros agentes como íons metálicos também promovem a oxidação e, por isso, são utilizados para os estudos de degradação forçada. Dessa forma, pode-se citar três principais vias oxidativa, que podem mediar a degradação do fármaco: oxidação iniciada por radicais (também conhecido como auto-oxidação); oxidação mediada por peróxido e oxidação mediada por transferência de elétrons (BAERTSCHI; ALSANTE; REED, 2011; LEITE, 2005).

### 3.2.2.5.1 Auto-oxidação

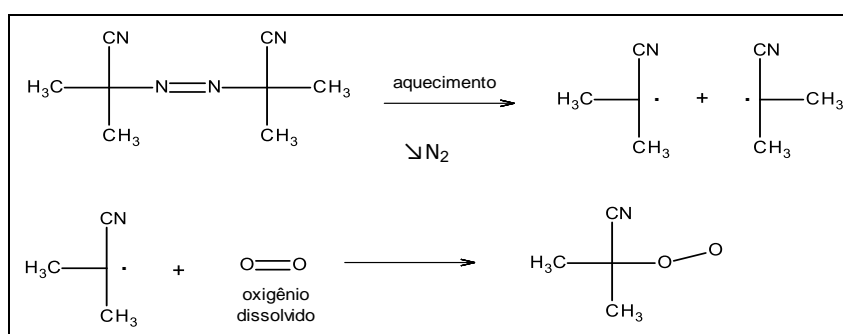
Na auto-oxidação, o processo é iniciado por radicais e deve-se principalmente à presença de impurezas nos excipientes presentes na formulação que agem como iniciadores, como hidroperóxidos orgânicos, metais e reagentes. Outros fatores como luz e temperatura podem influenciar a degradação, uma vez que os intermediários da reação são instáveis. Por isso, os estudos de degradação oxidativa devem ser realizados em temperatura ambiente. Além da etapa de iniciação, outras duas etapas estão envolvidas no processo de auto-oxidação: propagação e término, como mostrado na **Figura 1**. De maneira geral, a formação de radicais peroxi e alcoxi, por meio da reação entre íons de metais de transição e impurezas encontradas nos excipientes, é a responsável pela reação com o fármaco, originando radicais do próprio fármaco. Esses radicais, por sua vez, reagem com o oxigênio presente no meio, dando origem a radicais peróxidos derivados do fármaco, que reagem com outra molécula do fármaco a fim de formar hidroperóxidos do fármaco. O processo termina quando ocorre uma reação entre dois radicais derivados do fármaco. Uma forma de se avaliar a auto-oxidação é por meio da utilização de uma solução contendo iniciadores, como é o caso da azobisisobutironitrila (AIBN). A degradação nessa condição pode ser feita em temperatura de 40 a 60 °C por um período de até 7 dias (BAERTSCHI; ALSANTE; REED, 2011). Na **Figura 2** está mostrada a reação de formação do radical a partir de AIBN.

**Figura 1**– Mecanismo envolvido nas três fases da auto-oxidação: iniciação, propagação e terminação.



**Fonte:** adaptado e traduzido de Baertschi, Alsante e Reed (2011).  $R_{imp}$  = impurezas encontradas em níveis residuais nos excipientes; D = molécula do fármaco.

**Figura 2**– Mecanismo envolvido na formação do radical a partir do AIBN.



**Fonte:** adaptado e traduzido de Baertschi, Alsante e Reed (2011).

### 3.2.2.5.2 Oxidação mediada por peróxido

Outra forma de ocorrência de oxidação do fármaco é mediada por peróxido. Essa substância pode ser encontrada em diversos excipientes e, por isso, é de grande importância investigar a susceptibilidade do fármaco a essa condição. Diferentemente da auto-oxidação, esse mecanismo de degradação não envolve a formação de um radical. O estudo de degradação forçada nesse meio envolve a

utilização de solução de peróxido de hidrogênio, iniciando com uma concentração de 0,3% por 24h em temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Se não for observada degradação do fármaco, uma concentração de até 3%, por 72h, em temperatura ambiente e ao abrigo da luz, pode ser utilizada sem que produtos improváveis sejam formados. Se após essas condições não for observada degradação, o fármaco é considerado estável (BAERTSCHI; ALSANTE; REED, 2011).

#### 3.2.2.5.3 Oxidação mediada por transferência de elétrons

Outra via de oxidação na qual o fármaco está susceptível é aquela mediada por transferência de elétrons na presença de íons metálicos, como cobre (II) e ferro (III). Nessa via, o fármaco perde elétrons de seus grupos funcionais formando espécie catiônica radicalar instável. Essa espécie radicalar reage com o oxigênio formando produtos de degradação. Para a avaliação da estabilidade do fármaco nessa condição, amostras de IFA e produto acabado podem ser submetidas ao contato com soluções de cobre (II) e ferro (III), iniciando com concentração de 0,05 M em temperatura ambiente por 24h. Se não for observada degradação, pode ser utilizada temperatura de até 40 °C por 72h (BAERTSCHI; ALSANTE; REED, 2011).

### **3.3 Técnicas empregadas no desenvolvimento de métodos indicativos de estabilidade.**

Diferentes técnicas analíticas têm sido utilizadas para o desenvolvimento de métodos indicativos de estabilidade, como técnicas volumétricas, cromatográficas e espectrofotométricas. Porém, as técnicas cromatográficas, principalmente a CLAE, são as mais utilizadas tanto no meio industrial quanto no meio acadêmico, devido à sua alta seletividade e sensibilidade, além das inúmeras opções de instrumentação, colunas e tipos de detectores que podem estar acoplados aos equipamentos, como detectores UV e espectrômetros de massas. Além da CLAE, outras técnicas como a cromatografia gasosa e a cromatografia em camada delgada também podem ser utilizadas no desenvolvimento de métodos indicativos de estabilidade (BAKSHI, 2002; TZANAVARAS, 2010).

A CLAE é a técnica mais utilizada devido a sua alta capacidade de resolução, sensibilidade e especificidade, podendo ser utilizada para a separação de analitos

com diferentes características como substâncias não voláteis, termicamente instáveis e iônicas. Além disso, é a técnica mais presente nos laboratórios analíticos, o que permite a ampla aplicação dos métodos indicativos de estabilidade. Estima-se que 85 a 90% dos métodos descritos em estudos de degradação forçada utilizam essa técnica (BAKSHI, 2002).

### **3.4 Identificação dos produtos de degradação**

O detector de arranjo de diodos (DAD) é o mais largamente utilizado em cromatografia, podendo estar acoplado tanto à CLAE, quanto à CLUE. Uma grande vantagem é a avaliação da presença de produtos de degradação em diferentes comprimentos de onda do espectro UV, com o uso do DAD. Apesar de sua ampla aplicação, ele apresenta algumas limitações, principalmente em análise qualitativa, para identificação de impurezas e produtos de degradação. Nesse caso, a análise está limitada a substâncias conhecidas e que podem ter seus tempos de retenção e espectros comparados com substâncias de referência (LANÇAS, 2009). Outro fator crítico é que muitas vezes os produtos de degradação mantêm o mesmo grupo cromóforo do princípio ativo, assim como uma estrutura semelhante, podendo co-eluir com o fármaco de interesse, não sendo possível sua identificação e quantificação. Além disso, pode não possuir grupos cromóforos que absorvam na região do UV ou que absorvam fracamente no comprimento de onda utilizado, não sendo possível quantificar de forma correta, o que impossibilita o cálculo do balanço de massas (GOROG, 2003; SINGH, 2012). Dessa forma, a utilização de detectores capazes de identificar com mais segurança as impurezas e produtos de degradação são recomendados, como o espectrômetro de massas e a ressonância magnética nuclear (BAKSHI, 2002; FREED, 2004; PAN, 2010; SINGH, 2012).

A espectrometria de massas (EM) é uma técnica que possui como princípio físico a formação de íons de compostos orgânicos por um método adequado, separando-os de acordo com a sua razão massa/carga ( $m/z$ ). A abundância relativa dos íons formados é determinada, podendo ocorrer ou não a fragmentação da molécula. Se somente com a utilização da EM não for possível a elucidação das substâncias analisadas, outra técnica pode ser empregada, como é o caso da ressonância magnética nuclear (RMN), que explora as propriedades magnéticas dos núcleos

atômicos de hidrogênio e/ou carbono, determinando as propriedades físico-químicas dos átomos ou moléculas nos quais eles estão contidos. Assim é possível não só elucidar as estruturas das substâncias desconhecidas, como também identificar as conhecidas e quantificá-las (SINGH, 2014; RAMACHANDRA, 2016).

### 3.5 Doença de Chagas

#### 3.5.1 Aspectos gerais

A doença de Chagas é uma doença parasito infecciosa, causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*. Foi descoberta em 1909 pelo cientista brasileiro Carlos Chagas e é classificada pela OMS como uma enfermidade negligenciada. Ela é transmitida pelo inseto hemíptero hematófago da família Reduviidae, sub-família Triatominae, conhecida popularmente no Brasil como barbeiro. É conhecida também como tripanossomíase americana por ser uma doença endêmica dos países da América Central e do Sul, devido a alta distribuição de mais de 140 espécies do inseto vetor (SBMT; 2016; WHO, 2013).

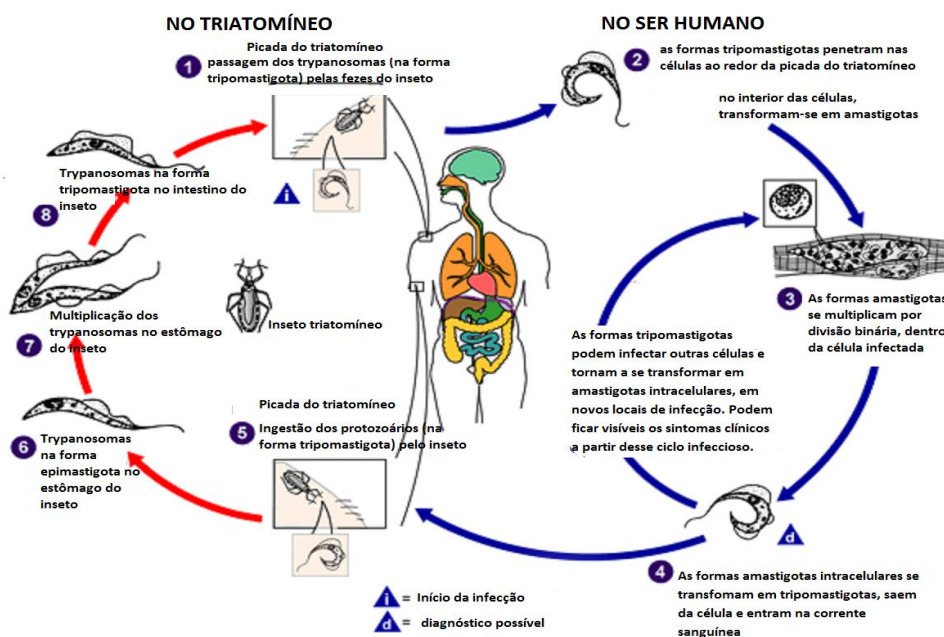
O mecanismo de transmissão é classificado como primário quando ocorre pela picada do vetor, por transfusão sanguínea, transmissão oral e congênita; e secundária quando ocorre por meio do transplante de órgãos, acidentes laboratoriais e transmissão sexual. Dentre essas, historicamente, a principal forma de transmissão é pela picada do vetor. Na **Figura 3** está mostrado o ciclo de vida do parasito no ser humano e no triatomíneo (CORRASA *et al.*, 2017; KIRCHHOFF, 2011).

A doença possui duas fases: aguda e crônica. Durante a fase aguda é possível visualizar o parasito em amostra de sangue do paciente, sendo o exame parasitológico o mais indicado nessa fase. Essa fase geralmente pode ou não apresentar sintomas, o que dificulta o diagnóstico e o tratamento, uma vez que os medicamentos disponíveis, benznidazol e nifurtimox, são eficazes somente nessa fase, com chances de 100% de cura. Os sintomas que podem aparecer, principalmente quando ocorre a infecção vetorial, são: sinal de porta de entrada da infecção, febre, edema subcutâneo, aumento do volume de linfonodos, hepatomegalia, esplenomegalia, além de evidências de miocardite e de



meningoencefalite. Se o tratamento não for realizado nessa fase, a doença avança para um estado crônico, que geralmente também é silenciosa, apresentando sintomas cardíacos em 30% dos casos e digestivos em 10% dos casos. Nessa fase o diagnóstico é essencialmente sorológico. Considera-se indivíduo infectado na fase crônica aquele que apresenta anticorpos anti-*T. cruzi* da classe IgG. A forma cardíaca da doença é chamada cardiopatia chagásica crônica (CCC) e é a forma clínica sintomática mais prevalente da doença de Chagas. Ela é responsável pela elevada carga de morbimortalidade, com grande impacto social e médico-trabalhista (SBMT, 2016; MSF, 2016).

**Figura 3-** Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi* no triatomíneo e no ser humano



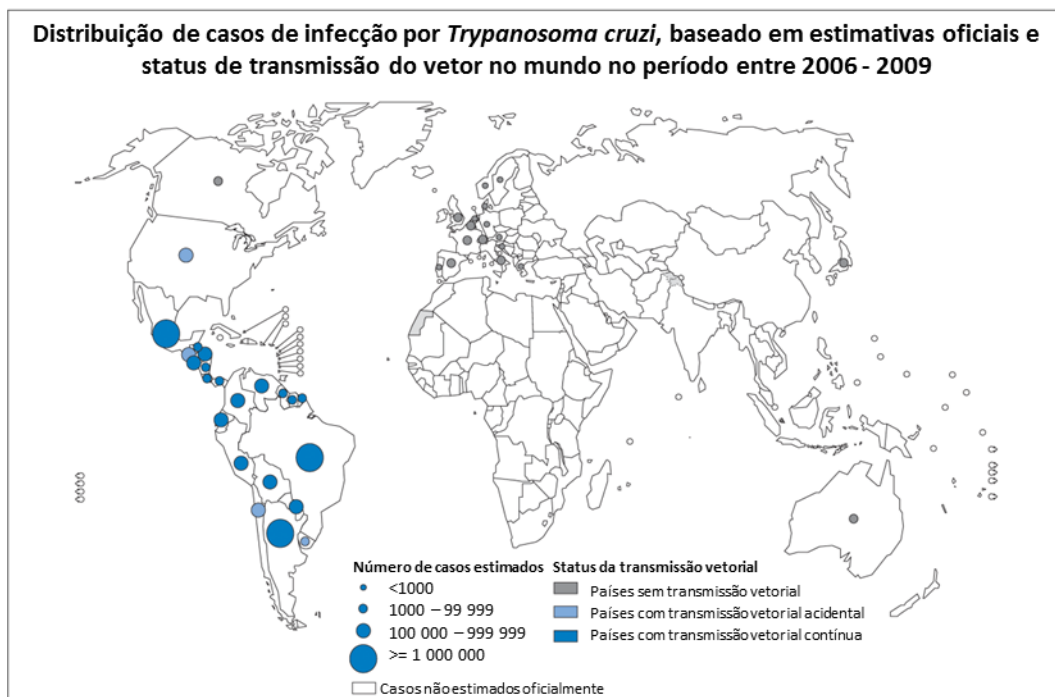
FONTE: <https://www.cdc.gov/parasites/chagas/biology.html>

### 3.5.2 Epidemiologia

Estima-se que 6 a 7 milhões de pessoas encontram-se infectadas pelo *T. cruzi* no mundo e que 60 milhões estão em risco de contrair a doença, principalmente nos 21 países da América Latina nos quais a doença é endêmica. No Brasil, de acordo com dados de 2010, cerca de 1 milhão de pessoas estavam infectadas por *T. cruzi* (SBMT, 2016). Na **Figura 4** está mostrado o mapa de distribuição dos casos de infecção baseados em estimativas e na transmissão vetorial no mundo entre os anos

de 2006 e 2009. Por meio da análise desses dados é possível perceber que o número de infectados é muito expressivo, apesar de haver estimativa de uma queda de 32% no número de novos casos e de 40% no número de pessoas em risco entre os anos de 2006 e 2010, como mostrado na **Tabela 4**.

**Figura 4** - Distribuição dos casos de infecção por *T.cruzi* no mundo entre os anos de 2006-2009.



Fonte: [http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Global\\_chagas\\_2009.png](http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Global_chagas_2009.png)

**Tabela 4** - Mudanças na mortalidade, prevalência e incidência por transmissão vetorial da doença de Chagas em 21 países endêmicos da América Latina, nos anos de 1990, 2000, 2006 e 2010.

Parâmetros- estimativas	1990	2000	2006	2010
Número mortes/ano	>45.000	21.000	12.500	12.000
Número de pessoas infectadas	30.000.000	18.000.000	15.000.000	5.742.167
Casos novos/ano - transmissão vetorial	700.000	200.000	41.200	29.925
População total sob risco	100.000.000	40.000.000	28.000.000	70.199.360

Fonte: SBMT, 2016

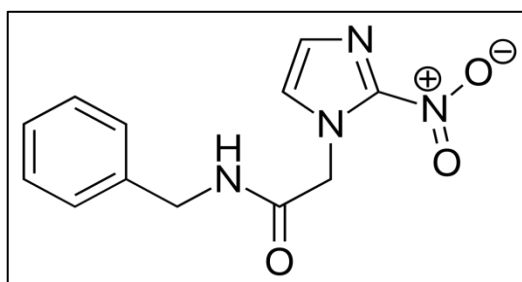
Apesar de se observar uma diminuição em todos os parâmetros no decorrer dos anos, oriundos de avanços, principalmente, do controle do vetor e garantia da qualidade das transfusões sanguíneas, o número de pessoas infectadas e a população em risco ainda são elevados, mostrando que a doença de Chagas é um problema de saúde pública, tanto para o Brasil quanto para outros países da América Latina. Outros fatores que favorecem a disseminação da doença são as migrações não controladas, a degradação ambiental, as alterações climáticas, uma maior concentração da população em áreas urbanas e a precariedade de condições socioeconômicas. Assim, é de grande necessidade a busca pelo desenvolvimento de ações integradas para o enfrentamento da doença (SBTM, 2016).

### 3.5.3 Benznidazol

No Brasil, apenas o medicamento benznidazol está disponível para o tratamento da fase aguda da doença. Tal fato evidencia o caráter de negligência da doença. Ele está disponível apenas em sua forma de comprimidos de administração oral nas dosagens de 100 mg (adulto) e 12,5 mg (pediátrico) e deve ser administrado duas a três vezes ao dia, por 60 dias. Apenas o Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco (LAFEPE), que é um laboratório farmacêutico público, produz esse medicamento no mundo desde 2004, quando houve a transferência da tecnologia de produção pela Roche, que até aquele momento era quem produzia o medicamento (LAFEPE, 2019).

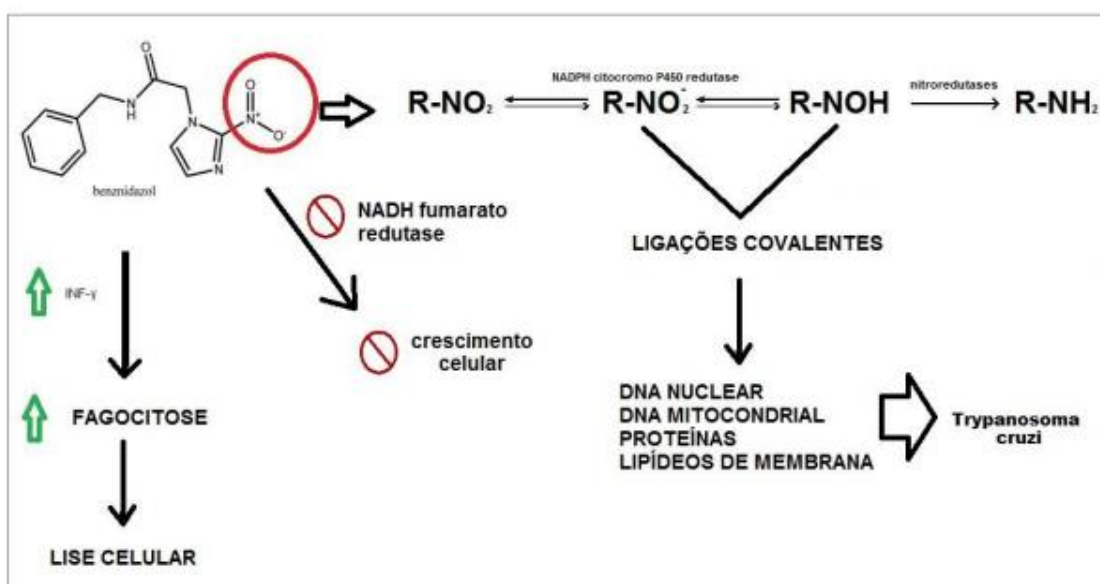
O benznidazol (2-Nitro-*N*-(fenilmetil)-1*H*-imidazol-1-acetamida) é um pó cristalino, levemente amarelado, inodoro, insípido e estável ao ar. Apresenta fórmula molecular  $C_{12}H_{12}N_4O_3$ , massa molar de 260,25 g/mol e logP de 1,64. Sua estrutura química está representada na **Figura 5** (WHO, 2017).

**Figura 5** - Estrutura química do benznidazol.



Existem alguns mecanismos de ação propostos para o benznidazol. De forma geral, acredita-se que o benznidazol esteja envolvido com a ligação de seus intermediários nitroreduzidos a vários componentes celulares como DNA, proteínas e lipídeos, provocando a inibição do crescimento dos parasitos (CAMPOS, 2007). Além disso, o benznidazol poderia agir no aumento da fagocitose atuando na elevação da produção da citocina interferon gama (INF- $\gamma$ ), causando lise celular (DAVANÇO, 2015). Na **Figura 6** estão demonstrados esses principais mecanismos descritos na literatura.

**Figura 6-** Mecanismo de ação farmacológico proposto para o BZN.



Fonte: DAVANÇO, 2015.

### 3.6 Métodos analíticos para determinação de benznidazol

É possível encontrar métodos analíticos para determinação de BZN, com diferentes aplicações, como doseamento do fármaco em matérias-primas, em comprimidos e em matrizes biológicas. Entretanto, até o momento, ainda não foi descrito na literatura método indicativo de estabilidade para o BZN. Na **Tabela 5** estão referenciados alguns métodos já publicados, assim como a sua aplicação.

**Tabela 5** - Métodos analíticos para quantificação de BZN em diferentes matrizes.

<b>Fonte</b>	<b>Técnica</b>	<b>Aplicação do método</b>
Farmacopeia Internacional (THE INTERNATIONAL, 2018)	Volumetria (em meio não aquoso)	Doseamento IFA
Farmacopeia Brasileira 5ª edição (FARMACOPEIA, 2010)	Espectrofotometria na região do UV	Doseamento IFA
SILVA <i>et al.</i> , 2007	CLAE-UV/DAD	Doseamento em comprimidos
BEDOR <i>et al.</i> , 2018	CLAE-MS	Método bioanalítico para quantificação em amostras de pequenos volumes de sangue total coletadas pela técnica <i>dried blood spot</i>
MARTINEZ <i>et al.</i> , 2015	CLAE-MS/MS	Método bioanalítico para quantificação em urina
DAVANÇO <i>et al.</i> , 2014	CLUE-UV/DAD	Método bioanalítico para quantificação em plasma para aplicação em estudo pré-clínico de farmacocinética

A técnica mais amplamente utilizada para quantificação de BZN é a CLAE, seja acoplada ao detector UV/DAD ou ao espectrômetro de massas. Isso demonstra a importância desta técnica no desenvolvimento de métodos analíticos e a sua eficiência para aplicação em métodos com diferentes aplicações e análise em diferentes matrizes.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Materiais

#### 4.1.1 Insumo farmacêutico ativo, comprimidos e excipientes

- Benznidazol insumo farmacêutico ativo (IFA) - fabricado por Nortec Química. Lote: 603218 - fornecido por LAFEPE. Lote: 17710. Teor: 100,2%. Válido até 31/03/2018.
- Benznidazol comprimidos (100 mg) – fabricados por LAFEPE. Lote 17060017. Válido até 06/2020.
- Excipientes utilizados na produção dos comprimidos e fornecidos pela LAFEPE (**Tabela 6**).

**Tabela 6** - Excipientes utilizados na fabricação de comprimidos contendo benznidazol.

Excipiente	Lote	Validade	Função farmacotécnica
Lactose monoidratada	17841	29/11/19	Diluyente
Talco	17510	28/02/19	Deslizante
Amido de milho	17805	12/04/18	Desintegrante
Estearato de magnésio	17808	28/10/19	Lubrificante

#### 4.1.2 Reagentes e vidrarias

- Reagentes grau analítico:
  - Ácido clorídrico (HCl) –Sigma Aldrich (Saint Louis, EUA)
  - Ácido acético glacial – Merck (Darmstadt, Alemanha).
  - 1,4 Dioxano – Grupo Química (Rio de Janeiro, Brasil).

- Sulfato de cobre pentahidratado Sigma Aldrich (Saint Louis, EUA).
- Hidróxido de sódio (NaOH) – Êxodo científica (São Paulo, Brasil)
- Peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) – Synth (Diadema, Brasil)
- Acetato de amônio J. T. Baker (Philipsburg, EUA)
- Reagentes grau cromatográfico:
  - Acetonitrila – J. T. Baker (Xalostoc, México), Merck (Darmstadt, Alemanha) e Scharlau (Gato Pérez, Espanha).
  - Água ultrapura obtida em sistema Millipore
- Pipetas, buretas, e balões volumétricos calibrados.
- Béqueres, placas de petri, erlenmeyers, tubos de ensaio, gral de porcelana, pistilo de porcelana, seringas e kit de filtração.

#### 4.1.3 Equipamentos e acessórios

- Coluna cromatográfica Agilent HC-C18(2) (150 x 4,6 mm, 5 µm).
- Coluna cromatográfica Agilent ZORBAX XDB (150 x 4,6 mm, 5 µm)
- Centrífuga Jouan, modelo MR23i.
- Aparelho de ultrassom Unique, modelo 1400.
- Balança analítica Sartorius com precisão de 0,01 mg, modelo BP211D.
- Banho-maria Tecnal, modelo TecVap TE-0194.
- Bomba de vácuo Laboport, modelo KNF N842.
- Cromatógrafo a líquido de alta eficiência Thermo Scientific Surveyor, composto de bomba quaternária, injetor automático, forno para coluna, detector de arranjo de diodos e software Chromquest<sup>®</sup>.
- Espectrofotômetro IV com transformada de Fourier, Perkin-Elmer, modelo Spectrum One.
- Espectrofotômetro UV-Visível Shimadzu, modelo UV-180.

- Estufa Nabertherm, modelo TR 60
- Célula Libror AEG-45SM, Shimadzu
- Difratorômetro Shimadzu® XRD-7000
- Termobalança DTG60 Shimadzu
- Filtros de membrana celulose regenerada Sartorius 47 mm x 0,45 µm
- Filtros de PVDF para seringa Sartorius 0,45 µm
- Lâmpada luz do dia plus Sylvania 20 W
- Lâmpada UV SCT 8 W
- Potenciômetro Metrohm, modelo 827 pH Lab
- Sistema de purificação de água Millipore, modelo Direct Q3
- Software Excell 2007
- Software Action Stat Pro

## 4.2 Métodos

### *4.2.1 Identificação por espectrofotometria no infravermelho e no ultravioleta e por difração de raio-X*

O benznidazol (BZN) IFA foi identificado utilizando espectrofotometria na região do infravermelho e do ultravioleta. O espectro de absorção na região do infravermelho foi obtido na faixa de 4000 a 500  $\text{cm}^{-1}$ , utilizando-se pequena quantidade da amostra no espectrofotômetro IV Perkin-Elmer, modelo Spectrum One com medição por refletância total atenuada. As principais bandas referentes aos grupos funcionais do BZN foram identificadas.

O espectro de absorção no ultravioleta foi obtido na faixa de 200 a 400 nm. Também foi feita a leitura da absorvância em 316 nm. A solução de BZN IFA foi preparada da seguinte forma: transferiu-se, exatamente, cerca de 0,12 g da amostra para balão volumétrico de 200 mL, adicionou-se 150 mL de metanol e agitou-se até completa solubilização do fármaco. Completou-se o volume com metanol e homogeneizou-se. Diluiu-se, sucessivamente, em ácido clorídrico 0,1 M, até concentração de 0,0012%



(p/v). As leituras foram feitas em cubetas de 1 cm e ácido clorídrico 0,1 M foi utilizado para ajuste do zero.

A medida de difração de raios-X do IFA foi feita no difratômetro Shimadzu XRD-7000 a 40 KV, 30 mA usando radiação de  $\text{CuK}\alpha$  ( $\lambda = 1.54056 \text{ \AA}$ ), equipado com policapilar para obtenção de difratogramas em geometria paralela, acoplado a um monocromador de grafite a 30 rpm para minimizar qualquer orientação preferencial. Os experimentos foram conduzidos na faixa angular  $5 - 35^\circ$  ( $2\theta$ ) com tamanho do passo  $0.01^\circ$  ( $2\theta$ ) e constante de tempo  $2 \text{ s.step}^{-1}$ . Foi feito refinamento da medida para o BZN pelo método de Rietveld pelo programa FullProf. Para avaliação do ajuste foi gerado um fator numérico que determina a qualidade do refinamento, além da demonstração gráfica.

#### *4.2.2 Determinação do peso médio dos comprimidos de BZN.*

Vinte comprimidos foram pesados, individualmente, em balança analítica. Determinou-se o peso médio desses comprimidos para a realização dos experimentos de degradação forçada e desenvolvimento e validação do método indicativo de estabilidade. O critério de aceitação foi que cada unidade poderia variar até 10% do valor do peso médio. (FARMACOPEIA, 2010)

#### *4.2.3 Determinação da solubilidade do BZN IFA*

Avaliou-se a solubilidade do BZN IFA nos seguintes solventes: água, acetonitrila, etanol, metanol, ácido clorídrico 0,1 e 1 M, hidróxido de sódio 0,1 e 1 M, peróxido de hidrogênio 3% (v/v) e sulfato de cobre 0,05 M.

Pesou-se cerca de 10 mg de BZN IFA e transferiu-se para erlenmeyer de 125 mL. Adicionaram-se quantidades crescentes de cada solvente. Após a adição de cada quantidade, agitou-se manualmente e manteve-se em banho de ultrassom por 1 minuto. As alíquotas de solvente foram adicionadas até ser observada completa solubilização do IFA. Quando foi necessário adição de mais de 100 mL de solvente, classificou-se o IFA como insolúvel, como descrito na FB 5 (FARMACOPEIA, 2010). Os testes foram realizados em temperatura ambiente.

#### *4.2.4 Testes de degradação forçada*

Após a verificação da solubilidade do BZN IFA em diversos solventes, foi necessária a utilização de acetonitrila como cosolvente. Para isso, determinou-se a menor quantidade necessária de acetonitrila capaz de solubilizar 10,0 mg de BZN IFA e comprimidos, adicionando-se 1 mL de ACN e deixando-se em banho de ultrassom por 10 minutos até que uma solução fosse formada. Todos os estudos de degradação forçada foram realizados com a utilização de acetonitrila como cosolvente. Posteriormente, foi necessária a troca do cosolvente a ser utilizado na condição alcalina. Assim, THF e 1,4 dioxano foram testados da mesma maneira como foi feito para ACN, sendo o 1,4 dioxano utilizado nas condições onde houve degradação e na validação do método. A detecção no método cromatográfico foi feita inicialmente no comprimento de onda de 316 e 212 nm, sendo posteriormente utilizado o comprimento de onda de 230 nm.

O BZN IFA, comprimidos e placebo foram submetidos a soluções de degradação em meios alcalino, ácido, neutro, oxidação por peróxido de hidrogênio e AIBN e íons metálicos. Para avaliação da degradação térmica, úmida e fotolítica utilizou-se o comprimido íntegro e triturado e os pós do IFA e placebo. Para que fosse atingida uma degradação mínima de 10% do ativo, iniciou-se com condições intermediárias ou drásticas de cada agente de degradação, uma vez que, não havendo degradação nessa condição, o produto já seria considerado estável e caso houvesse degradação, uma condição mais branda seria aplicada. Após a realização dos testes, optou-se por não neutralizar as amostras, quando necessário, uma vez que poderia significar a adição de outro agente à mistura que poderia interferir de alguma forma na formação de produtos irrealis (BAERTSCHI; ALSANTE; REED, 2011).

As amostras de BZN IFA e comprimidos foram injetadas a uma concentração de 100 µg/mL para melhor análise dos produtos de degradação formados durante o desenvolvimento do método. Soluções branco das amostras foram submetidas às mesmas condições que àquelas em que o fármaco foi submetida para confirmação da proveniência dos picos que foram formados. O preparo das soluções, assim como as condições utilizadas para cada estudo de estresse, estão descritos a seguir.

#### 4.2.4.1 Solução padrão de benznidazol

Para o preparo da solução padrão de BZN utilizou-se o BZN IFA devidamente padronizado e certificado pelo LAFEPE a partir de um padrão de trabalho. Pesou-se exatamente, cerca de, 10,0 mg de BZN IFA e transferiu-se para balão volumétrico de 10 mL com auxílio de 3 mL de 1,4 dioxano. Deixou-se em ultrassom por 10 minutos e aguardou-se o resfriamento da solução. Completou-se o volume com água ultrapura. Pipetou-se uma alíquota de 1,0 mL e transferiu-se para balão de 10 mL, completou-se com água ultrapura obtendo-se uma solução a 100 µg/mL. Filtrou-se a amostra com filtro de seringa de 0,45 µm e transferiu-se para vial. Injetou-se em quintuplicata no cromatógrafo.

#### 4.2.4.2 Solução amostra IFA, comprimidos e placebo.

Para o preparo da solução amostra IFA procedeu-se da mesma forma que descrito no item **4.2.4.1** para solução padrão de BZN.

Para o preparo da solução amostra dos comprimidos determinou-se primeiramente o peso médio dos comprimidos, pesando-se 20 comprimidos de BZN que foram triturados (peso médio: 249,96 mg). Pesou-se quantidade de pó equivalente a cerca de 10,0 mg de BZN no comprimido (24,99 mg) e transferiu-se para balão volumétrico de 10 mL com auxílio de 3 mL de ACN. Deixou-se em ultrassom por 10 minutos e aguardou-se o resfriamento da solução. Completou-se o volume com água ultrapura e transferiu-se para tubo falcon de 15 mL. Centrifugou-se a solução por 10 minutos a 5886 x g. Pipetou-se alíquota de 1,0 mL, transferiu-se para balão de 10 mL obtendo-se uma solução a 100 µg/mL. Completou-se com água ultrapura, filtrou-se a amostra com filtro de seringa de 0,45 µm e transferiu-se para vial e injetou-se em triplicada no cromatógrafo.

O preparo da solução amostra controle do placebo foi feita da mesma forma que para a amostra controle dos comprimidos, entretanto, substituiu-se o pó dos comprimidos por 10 mg de pó do placebo estimado de acordo com o descrito na **Tabela 7**. As concentrações dos excipientes foram definidas de acordo com as funções farmacotécnicas descritas em HandBook (ROWE, 2009)

**Tabela 7** - Composição estimada do placebo utilizado nos estudos de degradação forçada.

<b>Excipiente</b>	<b>Função farmacotécnica</b>	<b>Faixa utilizada</b>	<b>Composição estimada</b>
Lactose monoidratada	Diluyente	-	110,35 mg
Talco	Deslizante	5 – 30%	18,60 mg
Amido de milho	Desintegrante	3 - 25%	16,40 mg
Estearato de magnésio	Lubrificante	0,25 – 5%	3,60 mg

#### 4.2.4.3 Degradação em meio alcalino

Optou-se por iniciar a degradação da amostra em meio alcalino utilizando-se uma condição média com solução de NaOH 0,1 M em temperatura ambiente e a 50 °C durante 24h. Em seguida, realizou-se testes com solução de NaOH 0,1 M por 4, 8 e 12h a 40° C e a 50 °C, até que uma degradação entre 10% e 20% fosse atingida.

O preparo da amostra foi realizado da seguinte maneira: pesou-se exatamente, cerca de, 10,0 mg de BZN IFA, o equivalente a essa massa no pós dos comprimidos e 10,0 mg de placebo e transferiu-se para balões volumétricos de 10 mL com auxílio de 3 mL de 1,4 dioxano. Deixou-se em ultrassom por 10 minutos e aguardou-se o resfriamento da solução. Completou-se o volume com solução de NaOH 0,1 M e manteve-se em banho-maria a 50 °C pelos tempos previamente determinados. Após os tempos, pipetou-se uma alíquota de 1,0 mL da solução contendo IFA e transferiu-se para balão volumétrico de 10 mL obtendo-se uma solução a 100 µg/mL. Para a solução contendo comprimidos e placebo, transferiu-se para tubo falcon de 15 mL, centrifugou-se por 10 min a 5886 x g e por fim pipetou-se uma alíquota de 1,0 mL e transferiu-se para balão de 10 mL. Completou-se com água ultrapura, filtrou-se a amostra com filtro de seringa de 0,45 µm, transferiu-se para vial e injetou-se em triplicata no cromatógrafo.

#### 4.2.4.4 Degradação em meio ácido

A degradação da amostra em meio ácido foi feita, inicialmente, utilizando-se condição intermediária com solução de HCl 0,1 M na temperatura ambiente e a 50 °C durante 24h. Em seguida, realizou-se testes com solução de HCl 1 M por 24h, 72h e 7 dias a 70 °C, até que uma degradação entre 10% e 20% fosse atingida ou o ativo fosse considerado estável naquela condição. O preparo da amostra foi realizado da mesma maneira que para o meio alcalino (4.2.4.4), exceto pela utilização de ACN como cosolvente e substituindo-se a solução de NaOH 0,1 M pela solução de HCl 1 M.

#### 4.2.4.5 Degradação em meio neutro (água)

Para análise da degradação em meio neutro utilizou-se água ultrapura e testou-se em temperatura ambiente por 24h. Em seguida, realizou-se testes nos tempos 24h e 72h a 50 °C, até que uma degradação entre 10% e 20% fosse atingida ou o ativo fosse considerado estável naquela condição. O preparo da amostra foi realizado da mesma maneira que para o meio alcalino (4.2.4.4), exceto pela utilização de ACN como cosolvente e substituindo-se apenas a solução de NaOH 0,1 M pela água ultrapura.

#### 4.2.4.6 Degradação em meio oxidativo com peróxido de hidrogênio.

Peróxido de hidrogênio 0,3% por 24h em temperatura ambiente foi a condição utilizada para iniciar a degradação da amostra em meio oxidativo. Posteriormente, realizaram-se testes com solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3,0% por 24h até que uma degradação entre 10% e 20% fosse atingida ou o ativo fosse considerado. O preparo da amostra foi realizado da mesma maneira que para o meio alcalino (4.2.4.4), exceto pela utilização de ACN como cosolvente e substituindo-se apenas a solução de NaOH 0,1 M pela solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,3 e 3,0%.

#### 4.2.4.7 Degradação em meio oxidativo com AIBN.

A degradação forçada nesse meio foi feita empregando-se solução de AIBN 5 mM por 48h em temperatura de 40°C, que já é considerada a condição mais drástica. O

preparo da amostra foi realizado da mesma maneira que para o meio alcalino (4.2.4.4), exceto pela utilização de ACN como cosolvente e substituindo-se apenas a solução de NaOH 0,1 M pela solução de AIBN 5 mM.

Para o preparo da solução AIBN 5 mM, pesou-se exatamente cerca de 41 mg de AIBN e transferiu-se para balão de 50 mL com auxílio de 30 mL de acetonitrila. Deixou-se em ultrassom por 20 minutos. Esperou-se o resfriamento e adicionou-se 7 ml de metanol. Completou-se o volume com água ultrapura.

#### 4.2.4.8 Degradação com íons metálicos.

Para a degradação com íons metálicos, utilizou-se solução de  $\text{CuSO}_4$  0,05 M pelo período de 24 h a 40 °C, inicialmente. Depois, testou-se nas mesmas condições por 72 h, para que uma degradação entre 10% e 20% pudesse ser observada ou o ativo fosse considerado estável. O preparo da amostra foi realizado da mesma maneira que para o meio alcalino (4.2.4.4), exceto pela utilização de ACN como cosolvente e substituindo-se apenas a solução de NaOH 0,1 M pela solução de  $\text{CuSO}_4$  0,05 M.

#### 4.2.4.9 Degradação úmida

Preparou-se 200 mL de solução saturada de NaCl, que foi colocado em béquer dentro de um dessecador. Essa solução foi usada para saturar o dessecador.(GREENSPAN, 1976). A seguir, pesou-se cerca de 25,0 mg de IFA e placebo que foram dispostos em uma fina camada em uma placa de petri. Cinco comprimidos íntegros, dentro e fora de sua embalagem primária, também foram dispostos na mesma placa. Essa placa foi colocada dentro de dessecador saturado pela solução de NaCl concentrada, formando uma umidade relativa de 75% aproximadamente. O dessecador foi colocado dentro de estufa a 70 °C por 21 dias.

Para o preparo da amostra do BZN IFA e placebo, depois de decorrido os 21 dias, pesou-se cerca de 10,0 mg de cada um e transferiu-se para balões volumétricos de 10,0 mL. Para o comprimido, triturou-se em gral de porcelana e pesou-se exatamente, cerca do equivalente a 10,0 mg de BZN. Adicionou-se 3,0 mL de ACN e deixou-se em ultrassom por 10 minutos. Após resfriamento das soluções, completou-se o volume com água ultrapura e os comprimidos foram levados para centrífuga por

10 min a 5886 x g. Pipetou-se alíquota de 1,0 mL da solução contendo IFA, placebo e comprimido e transferiu-se para balões volumétricos de 10 mL obtendo-se uma solução a 100 µg/mL. Completou-se com água ultrapura, filtrou-se a amostra com filtro de seringa de 0,45 µm, transferiu-se para vial e injetou-se em triplicata no cromatógrafo.

#### 4.2.4.10 Degradação térmica

Pesou-se cerca de 25,0 mg de IFA e placebo que foram dispostos em fina camada em uma placa de petri. Cinco comprimidos íntegros, dentro e fora de sua embalagem primária, também foram dispostos na mesma placa. Essa placa foi colocada em estufa a 70 °C por 21 dias. Após o término desse tempo, o preparo da amostra foi realizado da mesma forma que aquele descrito para degradação úmida **(4.2.4.10)**.

#### 4.2.4.11 Degradação fotolítica.

Para o estudo de fotodegradação, as amostras de comprimido íntegro e triturado, do pó do IFA e do placebo foram dispostos em uma fina camada em placas de petri e submetidas à degradação na câmara de fotoestabilidade. Amostras controle foram submetidas também a exposição de maneira que a placa de petri foi coberta por papel alumínio. A exposição foi de três ciclos a mais do que é exigido nas legislações de fotoestabilidade (ICH-Q1B, 1996), ou seja, as amostras foram expostas a 3,6 milhões lux.h (visível) e 600 watt.h/m<sup>2</sup> (ultravioleta), levando a uma exposição de 9 dias. Após essa exposição, o preparo das amostras foi realizado conforme descrito para as amostras expostas a umidade relativa elevada **(4.2.4.10)**.

#### *4.2.5 Desenvolvimento de método indicativo de estabilidade por cromatografia líquida de alta eficiência.*

Para o desenvolvimento do método indicativo de estabilidade empregou-se, inicialmente, gradiente exploratório para triagem das amostras. A fim de se reduzir o tempo de triagem, passou-se a empregar uma eluição isocrática, com o objetivo de se analisar a ocorrência de formação de novos picos e diminuição da área sob o

pico do BZN. Nas **Tabelas 8 e 9** estão descritas as condições cromatográficas para o gradiente exploratório e corrida isocrática utilizada nessa etapa de triagem, respectivamente.

**Tabela 8** - Condições cromatográficas utilizadas para gradiente exploratório.

<b>Parâmetros</b>	<b>Condições</b>
Coluna	HC-C18(2) (150 x 4,6 mm, 5 µm)
Composição da fase móvel	Acetonitrila: água – eluição em gradiente 5:95% em 60 minutos
Comprimento de onda	212 e 316 nm
Vazão da fase móvel	1,0 mL/min
Temperatura do forno	30 °C
Volume de injeção	20,0 µL
Tempo de corrida	60 minutos

**Tabela 9** - Condições cromatográficas utilizadas para corrida isocrática.

<b>Parâmetros</b>	<b>Condições</b>
Coluna	HC- C18(2) (150 x 4,6 mm, 5 µm)
Composição da fase móvel	Acetonitrila: água (30:70)
Comprimento de onda	212 e 316 nm
Vazão da fase móvel	1,0 mL/min
Temperatura do forno	30 °C
Volume de injeção	20,0 µL
Tempo de corrida	20 minutos

A partir dos resultados obtidos com os gradientes exploratórios e a corrida isocrática, diversos métodos com eluição em gradiente foram testados até que aquele que permitisse uma melhor resolução, no menor tempo entre os picos do BZN e dos produtos de degradação formados, fosse obtido. Além dos gradientes, testou-se a utilização de tampão acetato de amônio 10 mM pH 5,7 (ajustado com ácido acético glacial) e acetonitrila em diferentes proporções.



#### 4.2.6 Validação

O método indicativo de estabilidade desenvolvido para a separação do BZN e seus produtos de degradação e quantificação do BZN foi validado de acordo com a RDC 166/2017 da ANVISA. (BRASIL, 2017), Guia ICH Q2(R1) (ICH-Q2(R1), 2005) e procedimento de validação intralaboratorial definido por Souza (2007). Todos os cálculos foram realizados com auxílio do software Microsoft Excel 2007 e Action Stat Pro. Os parâmetros seletividade, linearidade, precisão, exatidão, robustez e limites de quantificação e detecção foram analisados.

##### 4.2.6.1 Preparo das soluções amostra de BZN e placebo.

Definiu-se a concentração de 50 µg/mL como concentração de trabalho. Para o preparo dela, pesou-se exatamente, cerca de, 6,25 mg de BZN IFA padronizado e certificado pelo LAFEPE a partir de padrão de trabalho. Transferiu-se para balão volumétrico de 10,0 mL com o auxílio de 3,0 mL de 1,4 dioxano. Deixou-se em banho de ultrassom por 10 minutos. Após o tempo, aguardou-se resfriamento da solução e completou-se o volume com água ultra pura e homogeneizou-se. Pipetou-se 0,8 mL dessa solução e transferiu-se para balão volumétrico de 10,0 mL, completando-se com água ultra pura.

Para o comprimido, determinou-se o peso médio de 20 comprimidos que foram triturados em gral de porcelana. Pesou-se quantidade de pó equivalente a 6,25 mg de BZN e transferiu-se para balão volumétrico de 10,0 mL com o auxílio de 1,9 mL de 1,4 dioxano. Deixou-se em banho de ultrassom por 10 minutos. Após o tempo, aguardou-se resfriamento da solução e completou-se o volume com água ultrapura e homogeneizou-se. Transferiu-se o conteúdo para tubo falcon de 15 mL e centrifugou-se a solução por 10 minutos a 5886 x g. Pipetou-se 0,8 mL dessa solução e transferiu-se para balão volumétrico de 10,0 mL completando-se com água ultra pura.

Para o preparo da solução placebo, pesou-se exatamente, cerca de, 9,31 mg da mistura de excipientes previamente preparada. Prosseguiu-se conforme descrito para o preparo da solução dos comprimidos.

#### 4.2.6.2 Seletividade e adequabilidade do sistema.

Para verificar a adequabilidade do sistema cromatográfico, preparou-se solução padrão de BZN a 50 µg/mL e injetou-se cinco vezes consecutivas no cromatógrafo. Em seguida avaliou-se os seguintes parâmetros para o pico principal da solução padrão: fator de retenção ( $k$ ), fator de cauda, desvio padrão relativo da área sob o pico da BZN (DPR área) e desvio padrão relativo do tempo de retenção (DPR  $t_R$ ).

A seletividade do método, que é a capacidade de separar o fármaco de todos os produtos de degradação formados e de possíveis interferentes provenientes das soluções branco e placebo, foi avaliada por meio da homogeneidade espectral do pico de BZN nas soluções contendo o IFA e comprimidos nas condições em que ocorreram degradação (hidrólise alcalina com NaOH 0,1 M a 40 °C por 8h e degradação fotolítica por 9 dias), da solução placebo, das soluções diluente e de degradação. As amostras foram preparadas conforme descrito nos testes de degradação forçada (4.2.4.4 e 4.2.4.10).

Soluções em branco contendo os reagentes estressantes e o cosolvente utilizado nos testes de degradação forçada (NaOH 1 M, 1,4 dioxano e água) foram preparadas e injetadas. Na análise destas soluções, não devem aparecer picos interferentes nos mesmos tempos de retenção do pico do BZN e dos produtos de degradação formados.

#### 4.2.6.3 Linearidade

A faixa de trabalho foi definida pela área sob o pico obtida com a solução na concentração de trabalho, de tal forma que não ocorresse saturação do detector, impossibilitando a quantificação. Outro fator foi que, tratando-se de um método específico para a quantificação do BZN, não era necessário uma concentração que representasse uma degradação acima 60%, que representa a menor concentração da faixa. Assim, a linearidade foi avaliada construindo-se curva analítica para benznidazol em 5 níveis de concentração, na faixa de 40% a 120% da concentração de trabalho (50,0 µg/mL). As diluições foram realizadas em triplicata a partir de *Solução padrão estoque*, conforme descrito na **Tabela 10**. O preparo e a injeção em

cromatógrafo a líquido de alta eficiência das soluções foram feitas de forma aleatória.

#### *Solução padrão estoque*

Pesou-se, exatamente, cerca de, 12,5 mg de benznidazol IFA e transferiu-se para balão volumétrico de 25 mL com auxílio de 3,8 mL de 1,4 dioxano, resultando numa solução de 500 µg/mL. Deixou-se em banho de ultrassom por 10 minutos. Esperou-se esfriar e completou-se o volume com água ultrapura.

**Tabela 10** - Preparo das soluções de BZN IFA padronizado para avaliação da linearidade do método indicativo de estabilidade

Nível	Intervalo linear (%)	Volume da solução estoque (mL)	Volume final (mL)	Concentração de benznidazol (µg/mL)
1	40	1,0	25,0	20
2	60	1,5	25,0	30
3	80	2,0	25,0	40
4	100	2,5	25,0	50
5	120	3,0	25,0	60

Para avaliação da linearidade foi utilizado o Método dos Mínimos Quadrados Ordinários (MMQO), também conhecido como regressão linear simples. Para que ele possa ser aplicado, algumas premissas como a existência de *outliers*, a normalidade, variância e independência dos resíduos devem ser comprovadas.

A existência de *outliers* foi verificada utilizando-se o teste de resíduo padronizado de *Jackknife* ( $\alpha=0,05$ ). O critério de aceitação utilizado foi que no máximo 22% dos dados originais da curva de calibração podem ser excluídos; além disso, se o ponto for a terceira e última replicata do nível de concentração, não pode ser excluído (SOUZA, 2007). A normalidade dos resíduos foi verificada pelo teste de *Ryan-Joiner*, a homoscedasticidade pelo teste de *Levene* modificado por *Brown e Forsythe* e a independência dos resíduos da regressão pelo teste de *Durbin-Watson*. Utilizando-se a análise de variância (ANOVA) verificou-se a adequação dos dados ao modelo

linear, ou seja, se a regressão é significativa e se o desvio da linearidade não é significativo (INMETRO 2011; SOUZA, 2007; SOUZA; JUNQUEIRA, 2005).

Após essas verificações, construiu-se a curva analítica com os valores de área sob o pico do BZN obtida para cada nível de concentração, determinou-se o coeficiente de determinação ( $R^2$ ), coeficiente de correlação (R), coeficiente angular (b), coeficiente linear (a), seus respectivos desvios e o gráfico de distribuição dos resíduos. A regressão linear foi calculada pelo MMQO e a linearidade foi avaliada por meio da estimativa de todos esses parâmetros.

#### 4.2.6.4 Precisão

Avaliou-se a repetibilidade (corrida intra-dia) e precisão intermediária (corrida inter-dias) do método quantificando-se o BZN IFA fortificado com o placebo nas concentrações de 40, 100 e 120% da concentração de trabalho (50,0  $\mu\text{g/mL}$ ). Três replicatas independentes para cada nível foram preparadas. Para avaliação da precisão intermediária, as mesmas amostras foram preparadas em dia diferente e determinadas por analista diferente.

A amostra foi preparada como descrito no item **4.2.6.1** para comprimido, pesando-se as massas descritas na **Tabela 11**.

**Tabela 11-** Preparo das amostras para determinação da precisão do método analítico.

Solução fortificada	Massa de BZN na amostra (mg)	Vol. de 1,4 dioxano (mL)	Vol. de solução pipetada (mL)	Concentração teórica final de BZN ( $\mu\text{g/mL}$ )	Nível de concentração
1	5,00	1,50	0,40	20	40%
2	6,25	1,90	0,80	50	100%
3	7,50	2,30	0,80	60	120%

Para análise dos resultados realizou-se cálculo dos desvios padrões relativos entre os valores obtidos para as concentrações no mesmo dia e nos dois dias.

#### 4.2.6.5 Exatidão

A exatidão foi avaliada utilizando o método do placebo fortificado, no qual quantidades conhecidas de BZN IFA foram adicionadas à mistura dos componentes da formulação (excipientes) com o intuito de determinar a porcentagem de recuperação. A exatidão foi avaliada a partir de nove determinações contemplando os níveis 40% (baixo), 100% (médio) e 120% (alto) da concentração de trabalho do BZN IFA e comprimidos, sendo realizada em triplicata para cada nível de concentração.

Transferiu-se quantidade de pó do placebo equivalente a 1/16 do peso médio dos comprimidos no que se refere ao placebo (9,31 mg) para 9 balões volumétricos de 10,0 mL. Adicionou-se quantidade de benznidazol IFA estabelecida na **Tabela 11** para preparar as soluções a 40%, 100% e 120% da concentração de trabalho (50,0 µg/mL). A amostra foi preparada como descrito no item **4.2.6.1** para comprimidos.

As porcentagens de recuperação foram calculadas pela relação entre as concentrações de BZN obtidas experimentalmente e as concentrações teóricas do mesmo fármaco nas preparações fortificadas, de acordo com a equação descrita a seguir:

$$\text{Recuperação} = \frac{\text{Concentração média experimental}}{\text{Concentração teórica}} \times 100$$

#### 4.2.6.6 Robustez

A robustez foi avaliada pelo Teste de Youden. Para isso, foram escolhidas 6 variáveis que foram testadas em 8 ensaios, de acordo com o descrito na **Tabela 12**. Essas variáveis foram denominadas de A a F em letras maiúscula e minúscula. Para as letras maiúsculas (A, B, C... F) foram utilizados os valores menores que aqueles nominais do método. Já para as letras minúsculas (a, b, c... g) foram utilizados valores maiores que a nominal do teste, todas com uma pequena alteração.

**Tabela 12** - Variações utilizadas para a realização do teste de Youden.

	<b>Parâmetro</b>		<b>Variação (-)</b>		<b>Condição nominal</b>	<b>Variação (+)</b>	
A/a	Temperatura da coluna	A	37 °C		40°C	a	43 °C
B/b	Vazão da fase móvel	B	0,9 mL/min		1,0 mL/min	b	1,1 mL/min
C/c	Volume de injeção	C	18 µL		20 µL	c	22 µL
D/d	pH do eluente aquoso	D	5,5		5,7	d	5,9
E/e	Tempos de ultrassom	E	8 minutos		10 minutos	e	12 minutos
F/f	Fabricante de coluna	F	Zorbax XDB (150 x 4,6 mm ; 5µm)		HC C18 (150 x 4,6 mm ; 5µm)	f	HC C18 (150 x 4,6 mm ; 5µm)

Após determinação das variáveis a serem analisadas no teste da robustez, uma matriz abrangendo todas as condições foi construída e está demonstrada na **Tabela 13**.

**Tabela 13**–Variáveis utilizadas nos experimentos de robustez para desenvolvimento do método indicativo de estabilidade para BZN.

Parâmetro	Combinação fatorial							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Temperatura da coluna (°C)	A 37	A 37	A 37	A 37	a 43	a 43	a 43	a 43
Vazão da fase móvel (mL/min)	B 0,9	B 0,9	b 1,1	b 1,1	B 0,9	B 0,9	b 1,1	b 1,1
Volume de injeção (µL)	C 18	c 22	C 18	c 22	C 18	c 22	C 18	c 22
pH do eluente aquoso	D 5,5	D 5,5	d 5,9	d 5,9	d 5,9	d 5,9	D 5,5	D 5,5
Tempo de ultrassom (min)	E 8	e 12	E 8	e 12	e 12	E 8	e 12	E 8
Coluna	F Zorbax XDB	f HC C18	f HC C18	F Zorbax XDB	f HC C18	F Zorbax XDB	F Zorbax XDB	f HC C18
<b>Resultado</b>	<b>s</b>	<b>t</b>	<b>u</b>	<b>v</b>	<b>w</b>	<b>x</b>	<b>y</b>	<b>z</b>

O cálculo do efeito de cada variável foi realizado subtraindo-se a média dos resultados obtidos nos quatro experimentos em que determinada variável foi utilizada em nível alto, pela média dos resultados obtidos nos quatro experimentos em que a mesma variável foi utilizada em nível baixo, conforme demonstrado na equação descrita a seguir (YOUNDEN; STEINER, 1975).

$$\text{Efeito da variável } A/a = \frac{(S + T + U + V)}{4} - \frac{(W + X + Y + Z)}{4}$$

#### 4.2.6.7 Limite de detecção

O limite de detecção foi estimado com base no desvio padrão da resposta e da inclinação da curva analítica (ICH-Q2(R1), 2005), conforme a equação a seguir.

$$LD = \frac{3,3 \delta}{S}$$

em que:

LD = limite de detecção;

$\delta$  = desvio padrão da resposta (desvio padrão do coeficiente linear);

S = inclinação da curva analítica (valor de b para  $y=bx+a$ ).

Para confirmar o limite de detecção teórico obtido a partir da equação, injetou-se uma solução de BZN IFA padronizado na mesma concentração obtida pela equação (ICH-Q2(R1), 2005).

#### 4.2.6.8 Limite de quantificação

O limite de quantificação foi estimado com base no desvio padrão da resposta e da inclinação da curva analítica (ICH-Q2(R1), 2005), conforme a equação descrita a seguir.

$$LQ = \frac{10 \delta}{S}$$

em que:

LQ = limite de quantificação;

$\delta$  = desvio padrão da resposta (desvio padrão do coeficiente linear);

S = inclinação da curva analítica (valor de b para  $y=bx+a$ ).



Confirmou-se o limite de quantificação teórico obtido por meio da equação injetando-se uma solução de BZN IFA na mesma concentração obtida pelo cálculo (ICH-Q2(R1), 2005).

#### *4.2.7 Estudo da cinética de degradação forçada do BZN IFA e comprimidos*

Determinou-se a cinética de degradação do BZN IFA e comprimidos nas condições em que foram observadas degradação do fármaco: alcalina (NaOH 0,1 M) e fotolítica.

Para a determinação da cinética na condição alcalina, pesou-se exatamente, cerca de, 6,25 mg de BZN IFA, padronizado e certificado pelo LAFEPE a partir de padrão de trabalho, em triplicata. Transferiu-se para balão volumétrico de 10,0 mL com o auxílio de 1,9 mL de 1,4 dioxano. Deixou-se em banho de ultrassom por 10 minutos. Após o tempo, aguardou-se resfriamento da solução e completou-se o volume com solução de NaOH 0,1 M e homogeneizou-se. Transferiu-se essa solução para tubo falcon de 15 mL e deixou-se em banho com aquecimento a 50 °C. Pipetou-se alíquotas de 0,8 mL dessa solução nos tempos 0, 2, 4, 6, 8, 10 e 24h e transferiu-se para balão volumétrico de 10,0 mL. Completou-se com água ultrapura a fim de se obter uma solução de 50 µg/mL. Filtrou-se a amostra com filtro 0,45 µm, transferiu-se para vial e injetou-se em cromatógrafo líquido de alta eficiência.

Para o comprimido contendo BZN, pesou-se o equivalente a 6,25 mg de BZN de pó dos comprimidos previamente triturados em gral de porcelana. Transferiu-se para balão volumétrico de 10,0 mL com o auxílio de 1,9 mL de 1,4 dioxano. Deixou-se em banho de ultrassom por 10 minutos. Após o tempo, aguardou-se resfriamento da solução e completou-se o volume com solução de NaOH 0,1 M e homogeneizou-se. Transferiu-se essa solução para tubo falcon de 15 mL e deixou-se em banho com aquecimento a 50 °C. Antes da retirada de cada alíquota, centrifugou-se a solução por 10 min a 5886 x g. Pipetou-se alíquotas de 0,8 mL dessa solução nos tempos 0, 2, 4, 6, 8, 10 e 24h e transferiu-se para balão volumétrico de 10,0 mL. Completou-se com água ultrapura a fim de se obter uma solução de 50 µg/mL. Filtrou-se a amostra com filtro 0,45 µm, transferiu-se para vial e injetou-se em cromatógrafo líquido de alta eficiência.

Para determinação da cinética de degradação na condição fotolítica, uma fina camada contendo aproximadamente 150 mg de BZN IFA e outra camada de comprimido triturado foram dispostos em placa de petri e colocados em câmara de fotoestabilidade. Alíquotas diárias foram retiradas durante 9 dias. Para o preparo da amostra, exatamente, cerca de, 6,25 mg de BZN IFA e do pó do comprimido, em triplicata, foram pesados. Transferiu-se para balão volumétrico de 10,0 mL com o auxílio de 1,9 mL de 1,4 dioxano. Deixou-se em banho de ultrassom por 10 minutos. Após o tempo, aguardou-se resfriamento da solução e completou-se o volume com água ultrapura e homogeneizou-se. Para o comprimido, transferiu-se a solução para tudo falcon de 15 mL e centrifugou-se por 10 min a 5886 x g. Pipetou-se alíquota de 0,8 mL de cada solução (BZN IFA e comprimido) e transferiu-se para balão volumétrico de 10,0 mL. Completou-se com água ultra pura a fim de se obter uma solução de 50 µg/mL. Filtrou-se a amostra com filtro 0,45 µm, transferiu-se para vial e injetou-se em cromatógrafo líquido de alta eficiência.

Os dados obtidos foram plotados em gráfico concentração versus tempo, inverso da concentração versus tempo e logaritmo normal versus tempo para avaliação de qual equação se ajustava melhor ao modelo linear. Considerou-se o valor mais próximo de 1 para o coeficiente de determinação.

#### *4.2.8 Estudo da interação entre fármaco e excipientes.*

##### 4.2.8.1 Estudo de degradação forçada com misturas binárias em meio alcalino

Para uma melhor avaliação do resultado obtido na degradação forçada em meio alcalino para o comprimido, investigou-se as possíveis interações existentes entre o fármaco e os excipientes presentes na formulação (lactose monoidratada, talco, amido de milho e estearato de magnésio). Para isso, realizou-se o estudo de degradação forçada com NaOH 0,1 M por 8h a 50 °C (mesma condição de degradação em que se observou degradação no comprimido) com misturas binárias na proporção de 1:1 (p/p) do fármaco com cada excipiente, além de misturas 1:1,5 (p/p) fármaco-excipientes.

As amostras das misturas binárias (IFA + excipiente) foram preparadas da seguinte maneira: pesou-se, exatamente, cerca de, 100 mg de cada componente, que foram

misturados em gral de cerâmica. Após a mistura, pesou-se exatamente, cerca de, 12,5 mg de cada uma das misturas e transferiu-se para balão volumétrico de 10 mL com o auxílio de 1,9 mL de 1,4 dioxano. Deixou-se em banho de ultrassom por 10 minutos. Após resfriamento, completou-se o volume com solução de NaOH 0,1 M. Transferiu-se para tubo falcon de 15 mL. Para o preparo da amostra no tempo zero, centrifugou-se por 10 minutos em 5886 x g. Uma alíquota de 0,8 mL foi pipetada e transferida para balão volumétrico de 10 mL. Completou-se com água ultrapura a fim de se obter uma solução de 50 µg/mL. Filtrou-se a amostra com filtro 0,45 µm, transferiu-se para vial e injetou-se em cromatógrafo líquido de alta eficiência. As soluções foram resuspensas e deixadas em banho de aquecimento a 50 °C por 8h. Depois de passado esse tempo, o procedimento de centrifugação foi repetido, uma alíquota de 0,8 mL foi pipetada e transferida para balão volumétrico de 10 mL. Completou-se com água ultrapura a fim de se obter uma solução de 50 µg/mL. Filtrou-se a amostra com filtro 0,45 µm, transferiu-se para vial e injetou-se em cromatógrafo líquido de alta eficiência.

Para o preparo das misturas com todos os componentes na mesma proporção, pesou-se exatamente, cerca de, 50 mg de cada excipiente e do IFA. A mistura foi feita em gral de porcelana e depois exatamente, cerca de, 31, 24 mg dessa mistura foi pesado (o equivalente a 6,25 mg de BZN IFA). Repetiu-se todo o procedimento realizado para as misturas binárias.

Para o preparo das misturas com todos os componentes na proporção 1:1,5 de BZN, pesou-se exatamente, cerca de, 100 mg de BZN IFA e 37,5 mg de cada excipiente. A mistura foi feita em gral de porcelana e depois exatamente, cerca de, 15,55 mg dessa mistura foi pesado (o equivalente a 6,25 mg de BZN IFA). Repetiu-se todo o procedimento realizado para as misturas binárias.

#### 4.2.8.2 Estudos de compatibilidade entre o benznidazol e os excipientes utilizando Análise Térmica e Difração de raios-X de pó.

Para avaliar se os excipientes poderiam estar causando mudanças nos eventos térmicos do fármaco, como mudanças na faixa de fusão, diminuição da estabilidade e mudança na sua forma cristalina, foram realizadas análises por TG, DSC e DRX nas misturas binárias e nas misturas de todos os componentes da formulação na

proporção 1 de BZN para 1,5 de excipientes (p/p). As misturas foram feitas da mesma forma que descritas no item **4.2.8.1** para o estudo de degradação forçada.

Para essas análises, todos os componentes foram analisados separadamente e depois em cada mistura, para que fosse possível a comparação entre os resultados obtidos.

As curvas DSC foram obtidas na célula DSC60 Shimadzu sob atmosfera dinâmica de nitrogênio com vazão de 50 mL/min, razão de aquecimento de 10 °C/min, aquecimento até 400 °C, cadinho de alumínio fechado e massa de amostra exatamente cerca de 1,5 mg, pesadas em balança analítica (Libror AEG-45SM, Shimadzu).

As curvas TG foram obtidas na termobalança DTG60 Shimadzu com razão de aquecimento de 10 °C/min, aquecimento até 600 °C, atmosfera dinâmica de nitrogênio com vazão de 50 mL/min, cadinho de alumina e massa de amostra exatamente cerca de 2,5 mg.

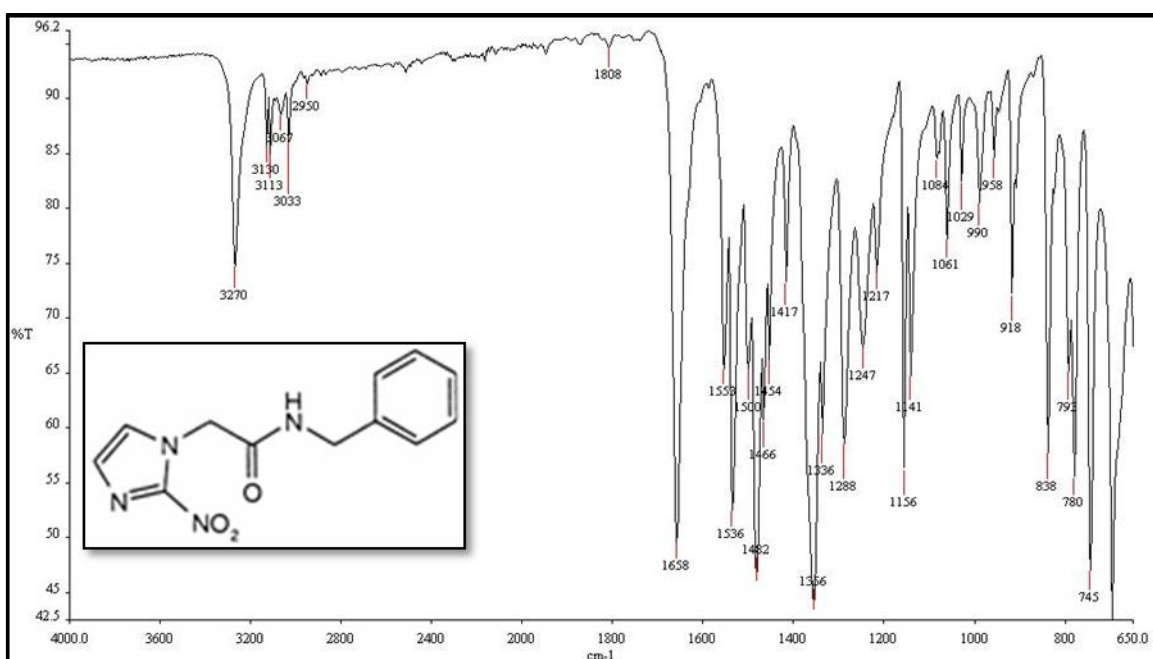
As medidas de difração de raios X das amostras foram feitas no difratômetro Shimadzu XRD-7000 a 40 KV, 30 mA usando radiação de  $\text{CuK}\alpha$  ( $\lambda = 1.54056 \text{ \AA}$ ), equipado com policapilar para obtenção de difratogramas em geometria paralela, acoplado a um monocromador de grafite a 30 rpm para minimizar qualquer orientação preferencial. Os experimentos foram conduzidos na faixa angular 5 - 35° ( $2\theta$ ) com tamanho do passo 0.01° ( $2\theta$ ) e constante de tempo 2 s.step<sup>-1</sup>. Foi feito refinamento da medida para o BZN pelo método de Rietveld pelo programa FullProf. Para avaliação do ajuste foi gerado um fator numérico que determina a qualidade do refinamento, além da demonstração gráfica.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Identificação por espectrofotometria de absorção no infravermelho, no ultravioleta e por difração de raio-X

O espectro de absorção na região do infravermelho para o BZN IFA está mostrado na **Figura 7**. Não foi possível obter o espectro para o BZN padrão, já que este não estava disponível. Entretanto, em alguns trabalhos já publicados na literatura é possível encontrar o espectro do BZN, que é similar ao obtido neste trabalho (SOARES-SOBRINHO, 2010). As principais bandas características dos estiramentos das ligações presentes na molécula do BZN foram identificadas e estão descritas na **Tabela 14**.

**Figura 7** - Espectro na região do Infravermelho para o BZN IFA.

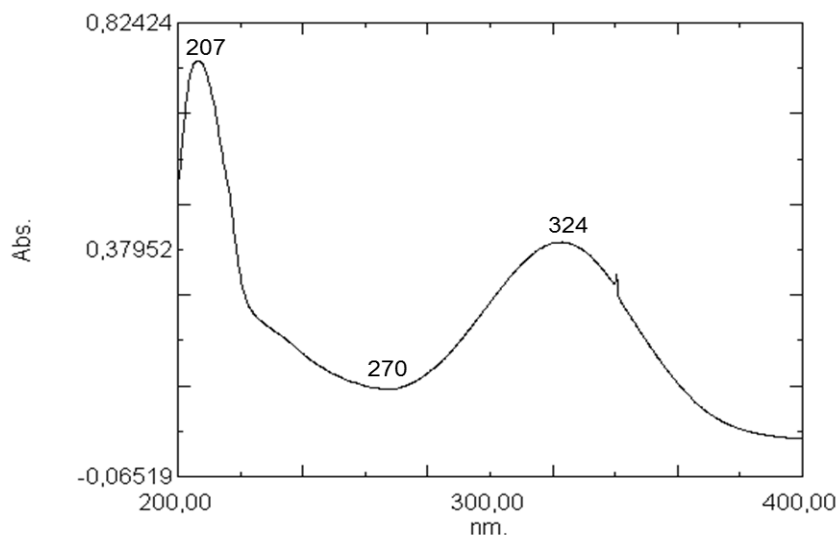


**Tabela 14** - Números de onda e atribuições das bandas de absorção obtida no espectro de infravermelho do BZN IFA.

Número de onda	Atribuição e grupo funcional
1466 cm <sup>-1</sup>	Deformação axial da ligação dupla carbono-carbono de compostos aromáticos
1536 e 1356 cm <sup>-1</sup>	Deformação axial assimétrica e simétrica, respectivamente, de ligação NO <sub>2</sub> conjugada
1658 cm <sup>-1</sup>	Deformação axial da ligação carbono-oxigênio de amida
3100 cm <sup>-1</sup>	Deformação axial da ligação carbono-hidrogênio de aromático (carbono sp <sup>2</sup> )
3270 cm <sup>-1</sup>	Deformação axial da ligação nitrogênio-hidrogênio de amida

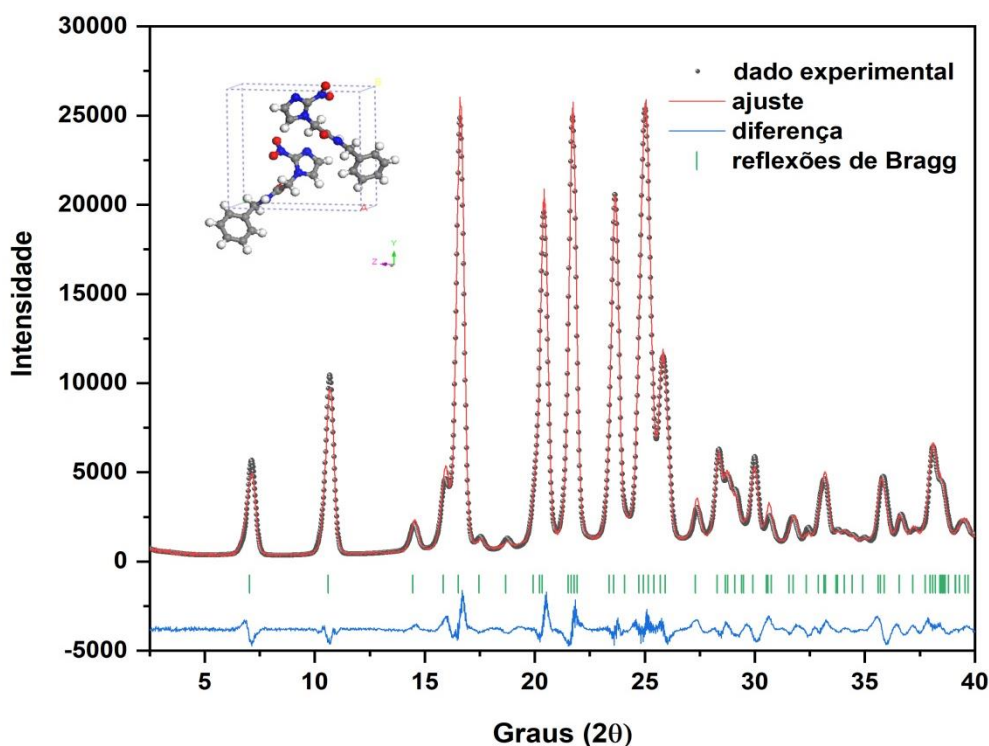
Na **Figura 8** está demonstrado o espectro do UV obtido para o BZN IFA. Nele é possível identificar dois máximos de absorção em 207 e 324 nm e um vale em 270 nm. De acordo com a Brasileira 5<sup>a</sup> edição, (FARMACOPEIA, 2010) existe um máximo de absorção em 316 nm. Entretanto, outros trabalhos, como o de Melo e colaboradores (2012) e o de Bezerra e colaboradores (2014), demonstraram um máximo de absorção em 324 nm, assim como encontrado neste trabalho. Dessa forma, podemos afirmar que se trata do espectro do BZN.

**Figura 8**– Espectro de absorção na região do UV para o BZN.



Outra forma utilizada para a identificação do BZN foi utilizando difração de raio-X de pó. Existe uma fase cristalina descrita para o BZN. Através da comparação dos valores em graus  $2\theta$  observados experimentalmente com aqueles previstos pela Lei de Bragg, o IFA em estudo apresentou  $RW = 3,1\%$ , valor menor que 15% como recomendado por Mccusker e colaboradores (1999), confirmando a cristalinidade do material com reflexões intensas em  $7,1^\circ$ ;  $10,7^\circ$ ;  $16,6^\circ$ ;  $20,4^\circ$ ;  $21,7^\circ$ ;  $23,7^\circ$  e  $25^\circ$  ( $2\theta$ ). O padrão de difração ajustado do BZN pelo método de Rietveld (**Figura 9**) indicou os parâmetros de rede: tipo de rede monoclinica, grupo espacial  $P 1 21 1$ ,  $a$  ( $\text{\AA}$ )  $4,66 \pm 0,00$ ;  $b$  ( $\text{\AA}$ )  $10,94 \pm 0,00$ ;  $c$  ( $\text{\AA}$ )  $11,97 \pm 0,00$ ;  $\alpha$  ( $^\circ$ )  $90,00$ ;  $\beta$  ( $^\circ$ )  $91,23 + 0,00$ ;  $\gamma$  ( $^\circ$ )  $90,00$ . Dessa forma, pode-se afirmar que o IFA utilizado se trata do BZN.

**Figura 9** – Padrão de difração ajustado do benznidazol (BZN) pelo método de Rietveld



## 5.2 Determinação do peso médio.

Determinou-se o peso médio por meio da pesagem de 20 comprimidos contendo BZN. Na **Tabela 15** estão descritos os resultados obtidos assim como as variações individuais, o valor do peso médio encontrado e o DPR (%) das variações.

**Tabela 15** - Resultados obtidos no teste de determinação de peso dos comprimidos contendo BZN.

<b>Peso Comprimido BZN (mg)</b>	<b>% em relação a média</b>	<b>Variação</b>
248,56	99,84	0,16
249,96	100,40	-0,40
250,74	100,71	-0,71
248,23	99,71	0,29
248,50	99,82	0,18
251,60	101,06	-1,06
253,47	101,81	-1,81
249,78	100,33	-0,33
249,31	100,14	-0,14
254,21	102,11	-2,11
246,61	99,06	0,94
249,72	100,31	-0,31
250,36	100,56	-0,56
246,66	99,08	0,92
243,56	97,83	2,17
250,77	100,73	-0,73
246,04	98,83	1,17
247,14	99,27	0,73
244,72	98,30	1,70
249,31	100,14	-0,14
<b>Média</b>		<b>248,96</b>
<b>Desvio padrão</b>		<b>2,68</b>

Após avaliação dos resultados, obteve-se que nenhuma das variações se encontram fora da especificação descrita na FB 5.



## 5.2 Determinação da solubilidade do BZN IFA

A solubilidade do BZN IFA foi testada em diversos solventes, para se analisar, principalmente, a necessidade da utilização de cosolvente. Na **Tabela 16** estão descritos os resultados encontrados para esse teste.

**Tabela 16** - Resultado do teste de solubilidade para o BZN.

<b>Solvente</b>	<b>Volume necessário para solubilizar 10 mg</b>	<b>Classificação</b>
Água	Mais de 100 mL	Muito pouco solúvel
Acetonitrila	Menos de 1 mL	Muito Solúvel
Ácido clorídrico 0,1 M	Mais de 100 mL	Muito pouco solúvel
Ácido clorídrico 1 M	Mais de 100 mL	Muito pouco solúvel
Hidróxido de sódio 0,1 M	Mais de 100 mL	Muito pouco solúvel
Hidróxido de sódio 1 M	Mais de 100 mL	Muito pouco solúvel
Metanol	5 mL	Ligeiramente solúvel
Peróxido de hidrogênio 3% (v/v)	Mais de 100 mL	Muito pouco solúvel
Sulfato de cobre 0,05 M	Mais de 100 mL	Muito pouco solúvel

Como pode ser observado, o BZN é muito pouco solúvel na maior parte dos solventes que seriam utilizados nos testes de degradação forçada. Portanto, foi necessária a utilização de cosolvente em todas as condições do estudo de degradação.

## 5.3 Testes de degradação forçada

Avaliou-se, inicialmente, cada uma das condições de degradação forçada por meio de gradientes exploratórios, nos quais a concentração de modificador orgânico (ACN) variou de 5 a 95% em 60 minutos com relação à água. Com o objetivo de se obter resultados mais rápidos para análise da existência de degradação das amostras, passou-se a empregar corrida isocrática com fase móvel composta por 30% de ACN e 70% de água. Todas as soluções foram injetadas numa

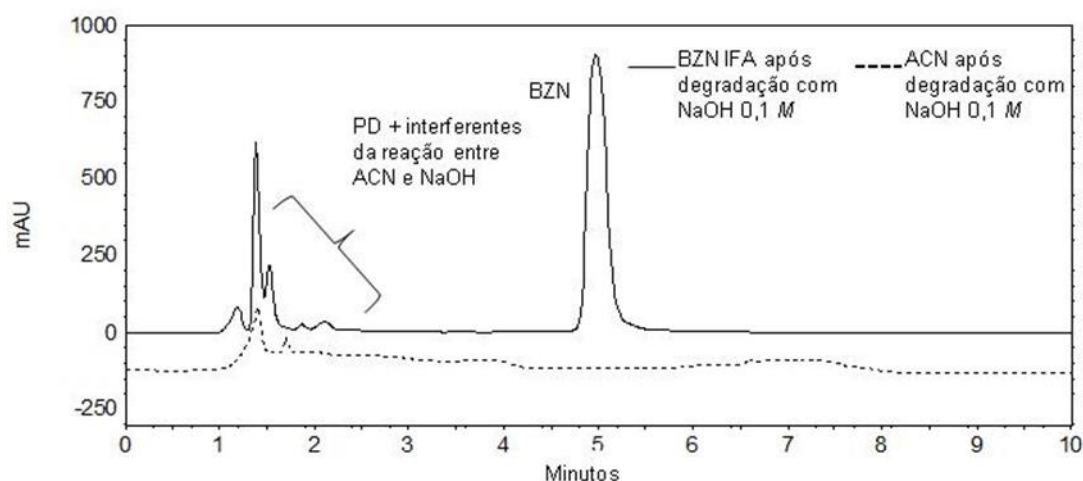
concentração de 100 µg/mL, para melhor visualização dos produtos de degradação que poderiam ser formados. Somente após a determinação das condições em que houve degradação é que se iniciou, de fato, os testes para desenvolvimento do método.

### 5.3.1 Utilização de cosolvente

A partir dos resultados obtidos para a solubilidade do BZN IFA, concluiu-se que seria necessária a utilização de cosolvente para a realização dos estudos de degradação forçada e desenvolvimento do método indicativo de estabilidade, uma vez que o BZN IFA não apresentou solubilidade em nenhuma solução aquosa. Optou-se por utilizar a acetonitrila como cosolvente, devido à alta solubilidade do BZN IFA nesse solvente, e por ser considerado um solvente praticamente inerte, devendo ser preferencialmente utilizado nos testes de degradação hidrolíticas. A menor quantidade necessária para a completa solubilização do BZN IFA em acetonitrila foi de menos que 1 mL, como descrito na **Tabela 16**. Entretanto, para a garantia total da solubilização, 3 mL de ACN foram utilizados para solubilizar 10 mg de BZN IFA.

Após condução dos estudos de degradação forçada, observou-se a formação de pico proveniente da degradação da ACN em meio básico, que coeluiu com um dos produtos de degradação formados. Na **Figura 10** está mostrado o cromatograma obtido após a realização do estudo com NaOH 0,1 M.

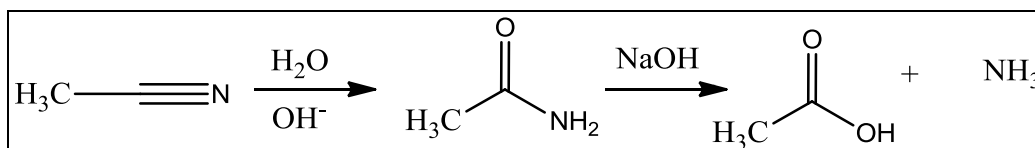
**Figura 10-** Cromatograma obtido após degradação forçada em meio alcalino na presença e na ausência do BZN IFA na concentração de 100 µg/mL em 212 nm.



PD = Produtos de degradação

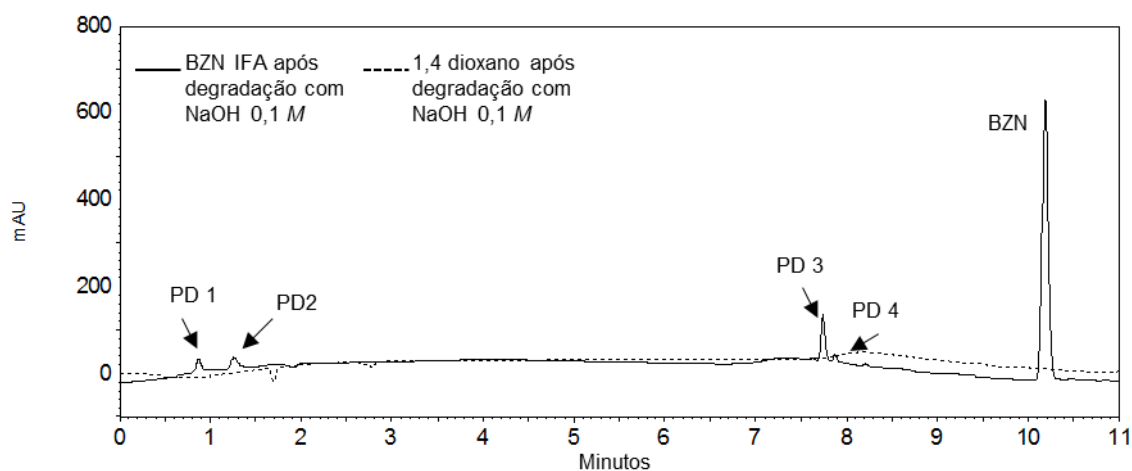
Como descrito por Baertschi (2011) o pico que coeluiu com o produto de degradação formado é proveniente de uma reação entre ACN e NaOH sob temperatura elevada, formando acetamida, ácido acético e amônia, como demonstrado pela **Figura 11**:

**Figura 11-** Reação da ACN em meio básico ocorrida na hidrólise alcalina.



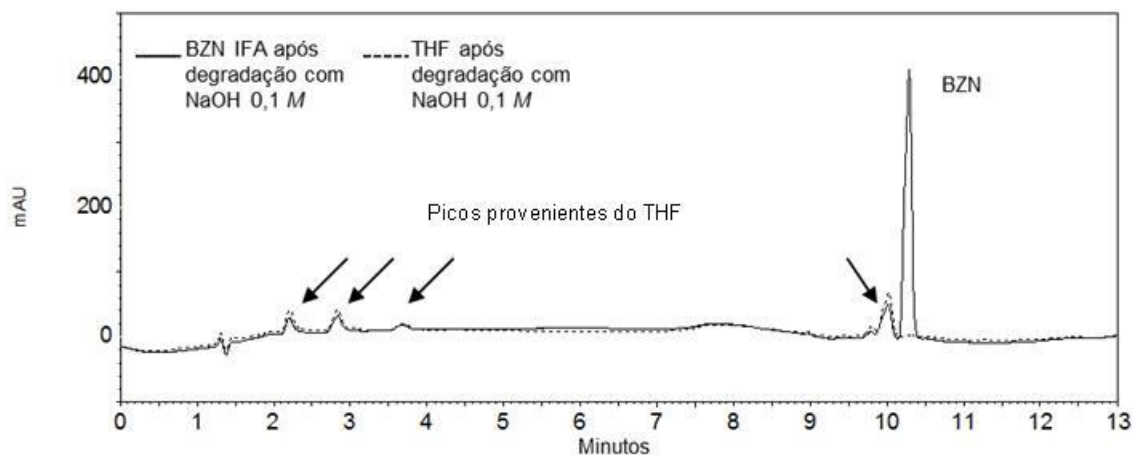
Diante disso, testou-se a utilização de outros dois cosolventes: THF e 1,4 dioxano. Para isso, determinou-se a menor quantidade de THF e 1,4 dioxano necessários para solubilizar o BZN IFA. Além disso, foram feitas injeções de soluções branco antes e após serem submetidos à degradação em meio alcalino. Os resultados são mostrados nas **Figuras 12 e 13**, que apresentam os cromatogramas obtidos após a degradação na presença e na ausência do IFA, para 1,4 dioxano e THF respectivamente, já no método em gradiente definitivo desenvolvido.

**Figura 12-** Cromatogramas obtidos para o cosolvente 1,4 dioxano após a degradação em meio alcalino na presença e ausência do BZN IFA na concentração de 50 µg/mL em 230 nm.



PD = Produtos de degradação

**Figura 13-** Cromatogramas obtidos para o cosolvente THF após a degradação em meio alcalino na presença e ausência do BZN IFA na concentração de 50 µg/mL em 230 nm.

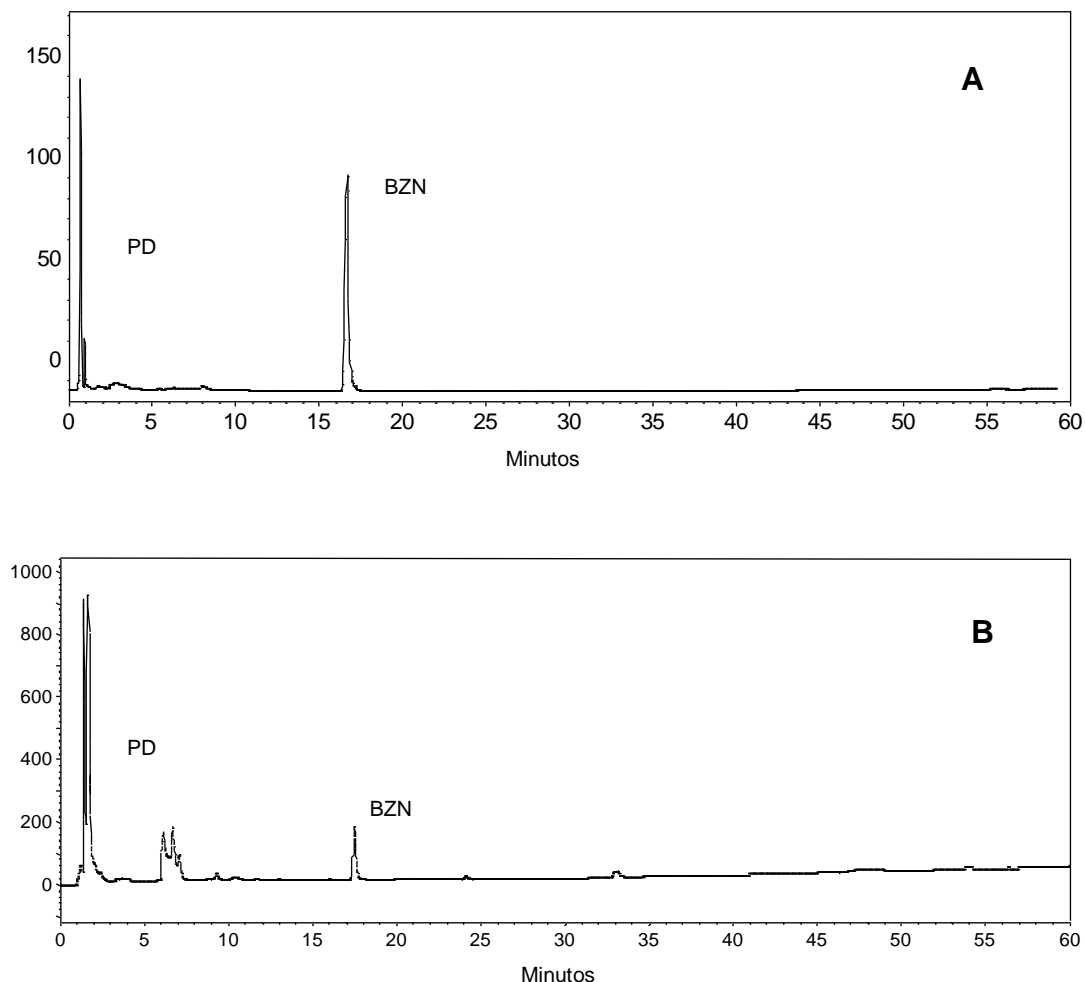


Após análise dos cromatogramas obtidos para os dois cosolventes, observou-se que quando o THF foi utilizado, houve a formação de novos picos oriundos do solvente e não foi possível observar os picos dos produtos de degradação que são formados, podendo estar ocorrendo uma co-eluição entre eles. Já para o 1,4 dioxano não se observou a formação de novos picos e os picos dos produtos de degradação foram mantidos. Dessa forma, concluiu-se que o 1,4 dioxano é uma melhor opção para ser empregado como cosolvente. Portanto, este solvente foi empregado nos estudos de degradação alcalina e fotolítica e no desenvolvimento e validação do método indicativo de estabilidade.

### 5.3.2 Degradação em meio alcalino

O estudo da degradação forçada em meio alcalino para BZN IFA foi iniciado em uma condição intermediária, com solução de NaOH 0,1 M em temperatura ambiente e em 50 °C durante 24h. Observou-se a formação de produtos de degradação no comprimento de onda próximo ao máximo de absorção do BZN (316 nm) e em comprimento de onda mais baixo (212 nm). Na **Figura 14** estão apresentados os cromatogramas obtidos nesses dois comprimentos de onda, empregando o gradiente exploratório.

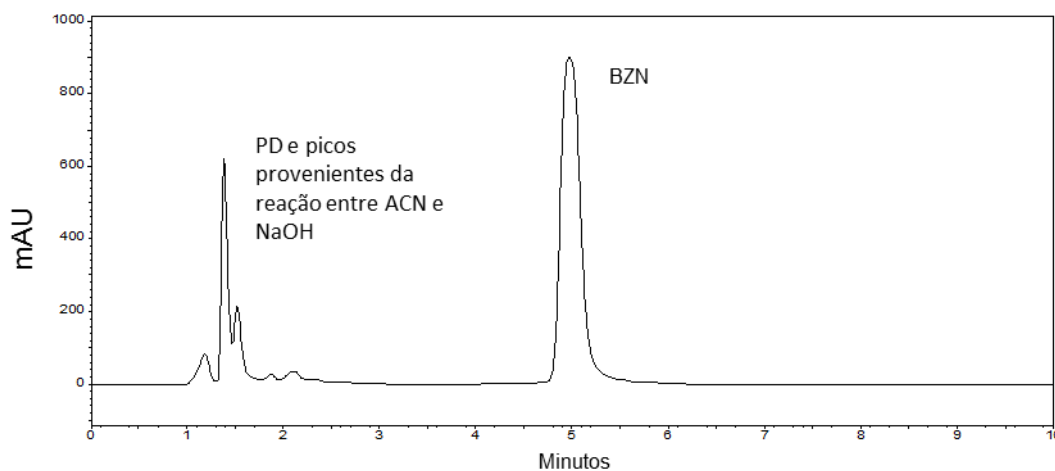
**Figura 14-** Cromatograma referente ao gradiente exploratório para a degradação alcalina utilizando solução NaOH 0,1 M por 24h a 50 °C na concentração de 100 µg/mL nos comprimentos de onda 212 nm (A) e 316 nm (B).



PD = Produtos de degradação BZN = benznidazol

Foi observada uma porcentagem de degradação do fármaco acima de 30% durante esse tempo para a temperatura de 50 °C e uma degradação insuficiente para a temperatura ambiente. Assim, optou-se por manter a concentração de 0,1 M e a temperatura de 50 °C e realizar coletas em 4, 8 e 12 h até ser observada uma degradação entre 10 e 20%. Para essa triagem, empregou-se a corrida isocrática composta por 70% de água e 30% de ACN, descrita anteriormente, nos comprimentos de onda 212 e 316. O cromatograma obtido para essa condição final está demonstrado na **Figura 15**. Por se tratar da triagem que estava sendo realizada inicialmente, a ACN ainda era utilizada como cosolvente. Somente depois de alguns testes é que ela foi substituída por 1,4 dioxano.

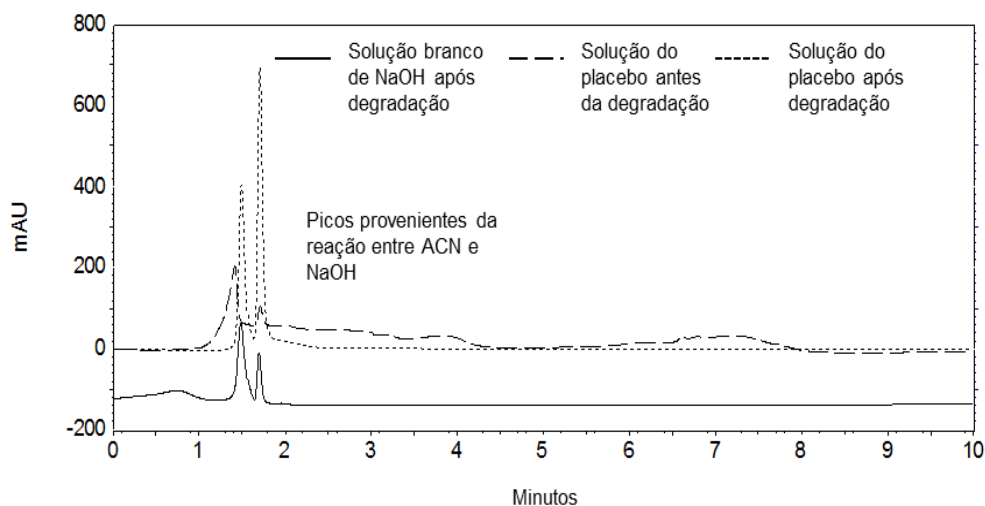
**Figura 15-** Cromatograma referente à corrida isocrática utilizada na triagem da degradação alcalina do BZN IFA utilizando solução NaOH 0,1 M por 8h a 50 °C na concentração de 100 µg/mL em 212 nm.



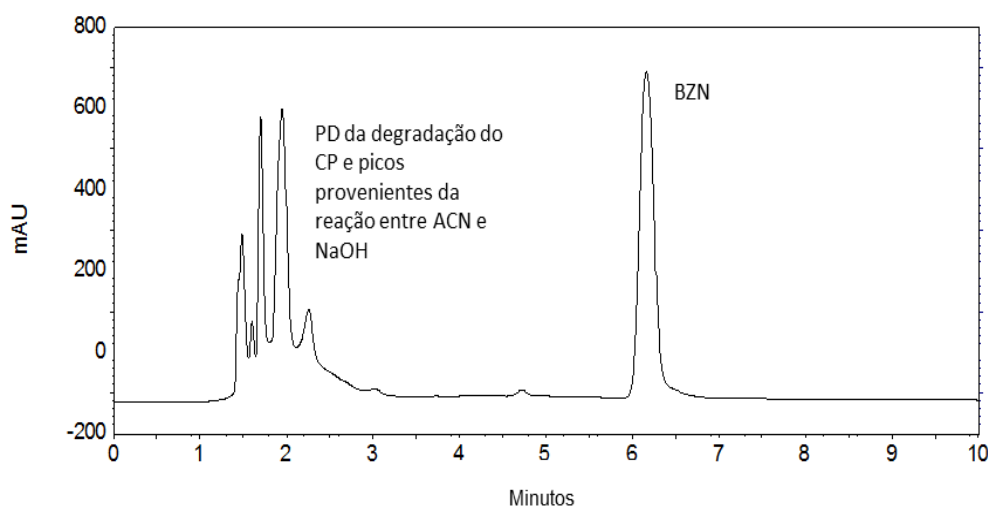
PD = Produtos de degradação BZN = benznidazol

Após a análise do BZN IFA, placebo e comprimidos foram submetidos a essa mesma condição. Não foi observado formação de novos produtos para o placebo, como mostrado no cromatograma da **Figura 16**. Entretanto, um perfil de degradação diferente foi observado no cromatograma obtido para o BZN comprimido, demonstrando que os excipientes podem estar influenciando de alguma maneira na degradação do comprimido. Tais interações foram melhor investigadas e os resultados descritos posteriormente nesse trabalho. O cromatograma obtido para o comprimido está mostrado na **Figura 17**.

**Figura 16** - Cromatograma referente à corrida isocrática utilizada na triagem da degradação alcalina do branco e do placebo antes e após degradação forçada utilizando solução NaOH 0,1 M por 8h a 50 °C na concentração de 100 µg/mL em 212 nm.



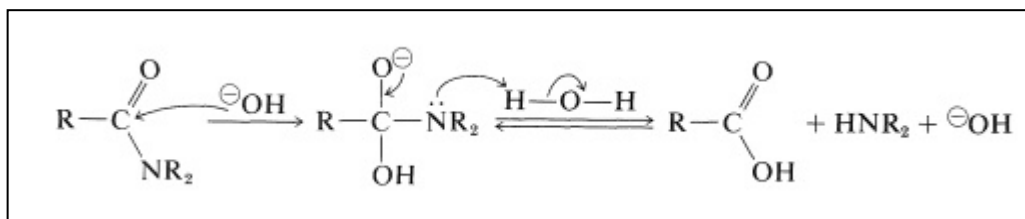
**Figura 17**- Cromatograma referente à corrida isocrática utilizada na triagem da degradação alcalina do comprimido após degradação forçada utilizando solução NaOH 0,1 M por 8h a 50 °C na concentração de 100 µg/mL em 212 nm.



PD = Produtos de degradação BZN = benznidazol

Analisando a estrutura química do BZN é possível identificar grupos funcionais que são suscetíveis à reação de hidrólise, como é o caso do grupamento amida. Na **Figura 18** está demonstrado o mecanismo de reação geral de hidrólise que ocorre com amidas em meio básico.

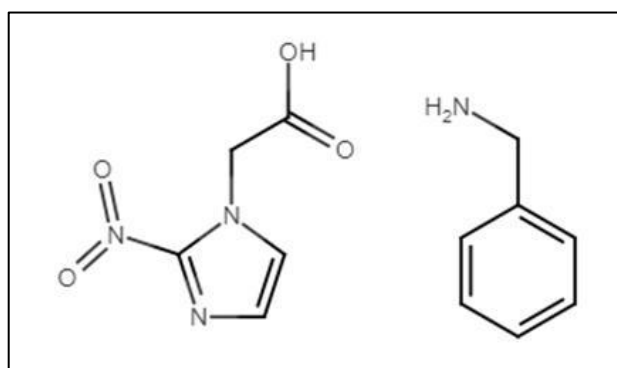
**Figura 18** - Representação do mecanismo de reação geral que envolve a hidrólise de amidas.



Fonte: (ROBERT; CASERIO, 2017).

Dessa forma, pode-se inferir que dois dos produtos de degradação formados se tratam de um ácido carboxílico e uma amina. As prováveis estruturas químicas desses dois compostos estão demonstradas na **Figura 19**. Entretanto, seria necessária a utilização de técnicas de caracterização para a confirmação dos produtos de degradação formados.

**Figura 19**- Estruturas químicas que representam dois dos prováveis produtos de degradação formados pela hidrólise em meio alcalino.



Uma vez que foi observada a formação de produtos de degradação para essa condição, algumas medidas devem ser tomadas para se evitar a formação desses produtos. A hidrólise em meio alcalino é apenas uma forma de se acelerar o processo de hidrólise que pode ocorrer apenas pela presença de água (BAERTSCHI, ALSANTE, REED, 2011). Dessa forma, seria ideal evitar o contato do produto com água, como por exemplo, não utilizar a granulação por via úmida para o processo de fabricação do comprimido e utilizar embalagens impermeáveis.



### 5.3.3. Degradação em meio ácido

Assim como para a degradação alcalina, optou-se por utilizar uma condição experimental intermediária para iniciar os testes em meio ácido para BZN IFA, comprimidos e placebo. A primeira condição testada foi utilizando uma solução de HCl 0,1 M por 24h em temperatura ambiente e 50 °C. Não foi observada a diminuição da área sob o pico do BZN e nem a formação de novos produtos de degradação no gradiente exploratório. Aumentou-se então a concentração da solução de HCl para 1 M mantendo-se a temperatura e o tempo (50 °C e 24h). Novamente, não foi observada degradação. Uma condição mais drástica foi escolhida, sendo o fármaco submetido a uma solução de HCl 1 M, temperatura de 70 °C, por 7 dias. Nenhum produto de degradação foi observado, assim como não houve diminuição da área sob o pico do BZN. Essa foi considerada a condição mais drástica que poderia ser aplicada. Dessa forma, o fármaco foi considerado estável frente à hidrólise ácida, o que pode ser explicado pela protonação da amida, que dificulta a reação de hidrólise.

### 5.3.4 Degradação em meio neutro (água)

Para o teste na condição neutra, optou-se por deixar o BZN IFA, placebo e comprimidos em água por 48h a 50 °C. Não foi observada redução da área sob o pico do BZN IFA e comprimidos e não houve a formação de novos picos em nenhum dos casos analisados. O fármaco foi considerado estável para hidrólise em meio neutro.

### 5.3.5 Degradação em meio oxidativo mediada por peróxido de hidrogênio.

Para avaliação da estabilidade do BZN IFA, placebo e comprimidos em meio oxidativo com peróxido de hidrogênio, iniciou-se utilizando a condição mais branda com solução de peróxido de hidrogênio a 0,3% v/v por 24h, em temperatura ambiente. Após esse tempo, não foi observado redução no pico do BZN IFA e comprimidos e não houve a formação de novos picos para eles e para o placebo. Uma condição mais drástica foi empregada, aumentando-se a concentração do peróxido de hidrogênio para 3% v/v por 24 h a temperatura ambiente. Ainda sim, não foi observada degradação. Por fim, testou-se a mesma concentração anterior, por

um período de 72 h. Novamente, não foram observados novos picos e nem diminuição da área sob o pico do BZN IFA e comprimidos. Assim, o BZN foi considerado estável na presença de peróxido de hidrogênio.

#### *5.3.6 Degradação em meio oxidativo mediada por iniciador de auto-oxidação*

Para avaliação da estabilidade do BZN IFA, placebo e comprimidos em meio oxidativo com AIBN, iniciou-se utilizando a condição recomendada por Baertschi (2011), com uma solução de AIBN composta por 10% de metanol e acetonitrila e 80% de água de concentração de 5 mM, por 24h a 40 °C. Após esse tempo, não foi observada redução no pico do BZN IFA e comprimidos e não houve a formação de novos picos para eles e para o placebo. Aumentou-se o tempo de exposição para 48h. Ainda sim, não foi observada degradação. O BZN no IFA e nos comprimidos, bem como o placebo foram considerados, então, estáveis para a condição de auto-oxidação com AIBN.

#### *5.3.7 Degradação mediada por íons metálicos*

A degradação do BZN IFA, comprimidos e placebo por íons metálicos foi avaliada, inicialmente, na condição mais branda recomendada, com solução de  $\text{CuSO}_4$  0,05 M a 40 °C, por 24h. Como não foi observada redução na área do pico e nem a formação de novos picos em nenhum dos casos, manteve-se a solução por mais 24h. Obteve-se o mesmo resultado anterior e a solução foi mantida por mais 24h, totalizando 72h. Esse é o tempo, temperatura e concentração máximos recomendados para análise dessa condição, de acordo com Baertschi (2011). Dessa forma, o BZN foi considerado estável nessa condição.

Dessa forma, não foi observada degradação oxidativa mediada por nenhuma das vias existentes. De maneira geral, alguns grupos funcionais são mais suscetíveis a esse tipo de degradação, como alcenos, aldeídos, heteroátomos adjacentes ao anel benzenico e compostos de enxofre não totalmente oxidados. Observando a estrutura química do BZN, nenhum desses grupos estão presentes, o que pode explicar sua estabilidade frente a oxidação.

### 5.3.8 Degradação úmida

A degradação por via úmida foi avaliada na condição máxima descrita por Baertschi (2011). A amostra foi mantida por 21 dias, de acordo com o calculado para a energia de ativação equivalente a duração de um experimento de 24 meses a 25 °C, em temperatura de 70 °C, em dessecador saturado com solução de NaCl saturada. Após esse tempo, não observou-se a redução da área sob o pico do BZN no IFA e nos comprimidos e nem a formação de novos picos nos cromatogramas do IFA, comprimidos e placebo. Dessa forma, considerou-se o BZN estável nessa condição.

### 5.3.9 Degradação térmica.

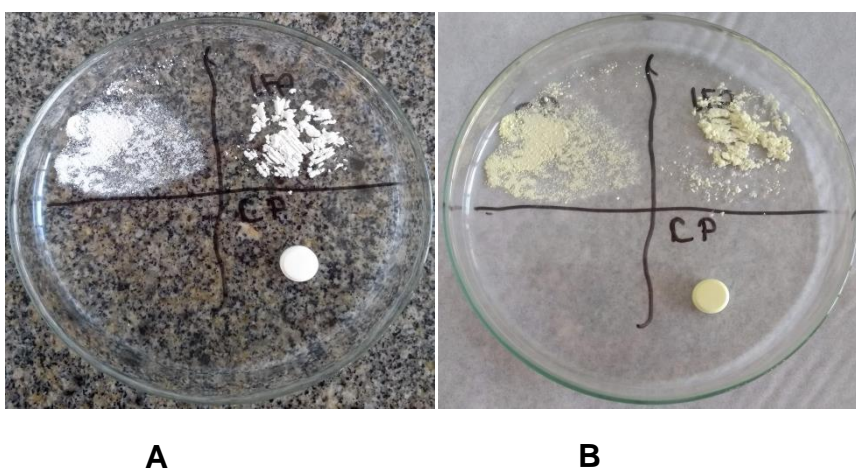
A degradação térmica também foi avaliada na condição máxima descrita por Baertschi (2011). A amostra foi mantida por 21 dias em temperatura de 70 °C em estufa, de acordo com o calculado para a energia de ativação equivalente à duração de um experimento de 24 meses a 25 °C. Após esse tempo, não se observou a redução sob a área do pico do BZN no IFA e nos comprimidos e nem a formação de novos picos nos cromatogramas. Dessa forma, considerou-se o BZN estável nessa condição.

### 5.3.10 Degradação fotolítica.

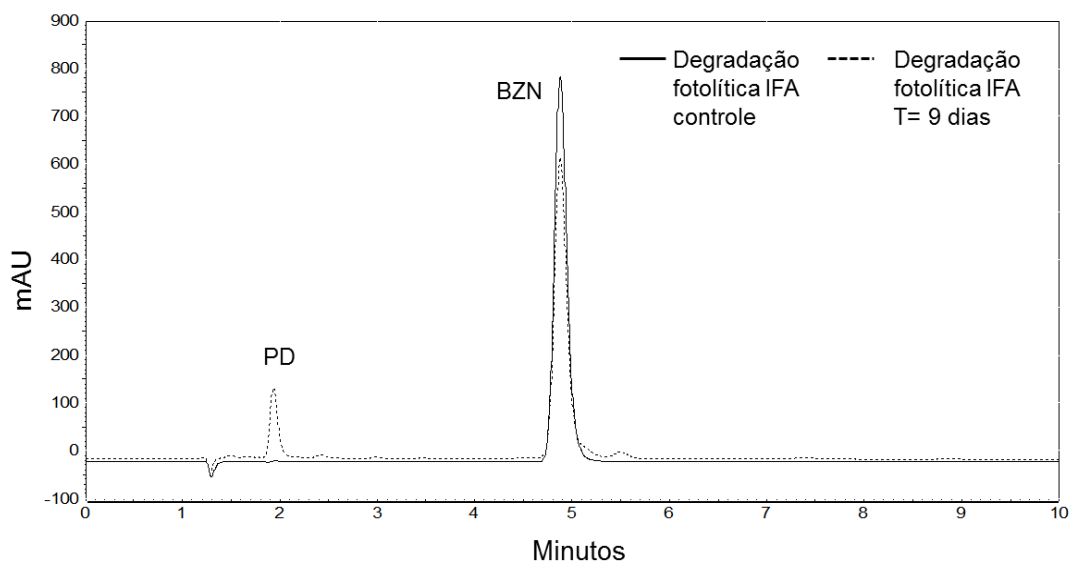
As amostras da degradação fotolítica foram mantidas em câmara de fotoestabilidade por 15 dias, o que representa 5 ciclos a mais do que é exigido nas legislações de fotoestabilidade (ICH-Q1B, 1996). Após esse tempo, as amostras foram analisadas utilizando corrida isocrática empregando ACN:água (30:70). Observou-se mudança na coloração da amostra de BZN IFA, comprimidos triturados e comprimido íntegro, como mostrado na **Figura 20**. Além disso, ocorreu uma degradação do fármaco maior que 30% e a formação de novos produtos de degradação. Optou-se então pela diminuição no tempo de exposição da amostra na câmara para 9 dias, o que representa 3 ciclos. Uma degradação maior que 20% ocorreu, além da formação de novos produtos, como mostrado no cromatograma da **Figura 21**. Assim, concluiu-se que o BZN, no IFA e nos comprimidos, é susceptível à degradação fotolítica, seguindo o mesmo perfil de degradação, ou seja, não foram observados diferentes

produtos e nem uma porcentagem diferente de degradação para BZN IFA e comprimidos.

**Figura 20-** BZN IFA, comprimido triturado e comprimido íntegro antes (A) e após degradação fotolítica (B)



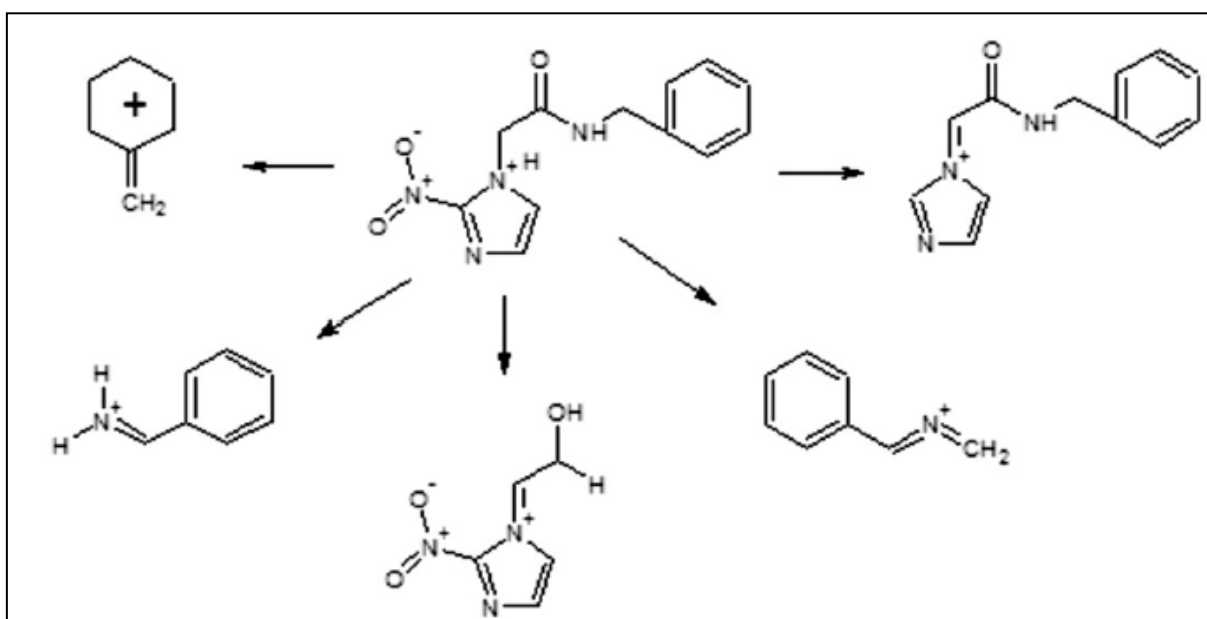
**Figura 21-** Cromatograma da degradação fotolítica do BZN IFA controle e após 9 dias de exposição à câmara fotolítica utilizando o método isocrático em 230 nm a concentração de 100  $\mu\text{g/mL}$ .



As reações fotolíticas envolvem mecanismos mais complexos que o apresentado para a hidrólise do fármaco. Entretanto, inúmeras reações podem estar envolvidas e, por isso, é mais difícil inferir os prováveis produtos de degradação que estão sendo formados, nessa condição, sem o auxílio de técnicas de caracterização.

Santos (2013) realizou estudo de fotoestabilidade para o BZN, utilizando análise térmica e método cromatográfico, além da espectrometria de massas para tentativa de identificação dos produtos de degradação, supondo assim, rotas de degradação para o fármaco. Na **Figura 22** estão demonstrados os prováveis produtos de degradação proposto em seu trabalho.

**Figura 22** - Principais produtos de degradação propostos por Santos (2013) que podem ser formados após degradação fotolítica após análise por espectrometria de massas.



Assim como para a hidrólise alcalina, algumas medidas devem ser tomadas para se evitar a formação dos produtos de degradação provenientes da degradação fotolítica. A principal delas é a utilização de embalagens que protejam o comprimido da luz externa, como blisters âmbar ou laminado.

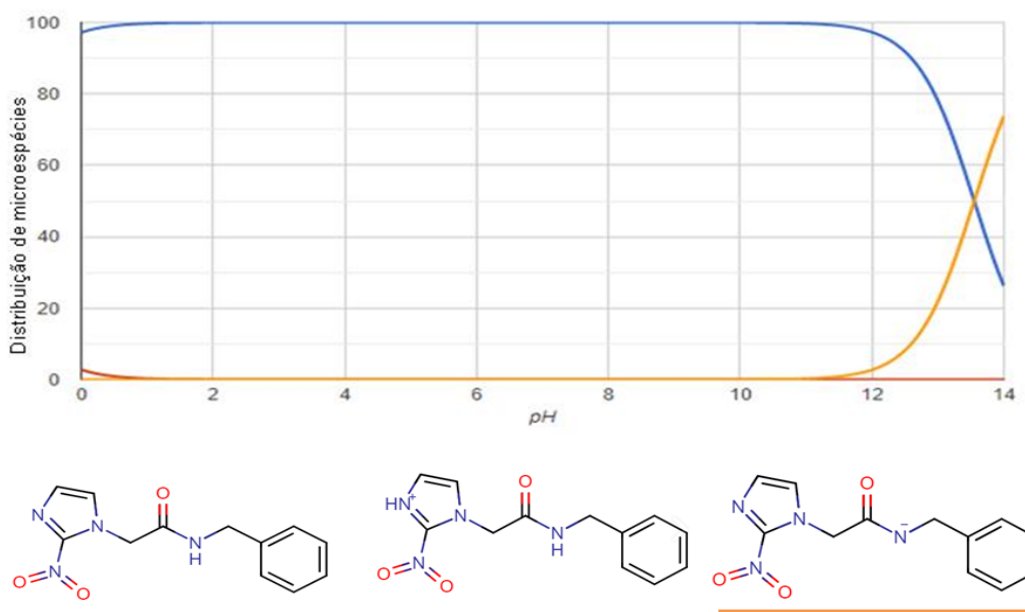
#### 5.4 Desenvolvimento de método indicativo de estabilidade por cromatografia líquida de alta eficiência.

O desenvolvimento de um método indicativo de estabilidade requer que ele seja seletivo para o fármaco de interesse e que, em alguns casos, seja possível a identificação dos produtos de degradação, sendo a espectrometria de massas o sistema de detecção mais comumente usado para esse fim. Além disso, para

garantir uma melhor repetibilidade do método, é recomendado o uso de tampões e que esses sejam, então, compatíveis com o detector de massas. Outra característica desse tipo de método é a utilização de eluição em gradiente, uma vez que esse modo permite uma eluição diferenciada dos diferentes produtos formados, que poderão apresentar diferentes características estruturais e, conseqüentemente, diferentes tempos de retenção.

Assim, a primeira etapa no desenvolvimento de um método analítico é uma pesquisa bibliográfica sobre as características do fármaco que são relevantes para a cromatografia como, por exemplo, o pKa de seus grupos ionizáveis e os pHs nos quais cada forma, ionizada e não ionizada, estarão presentes. Essa informação é importante para determinar pH do tampão que será utilizado e qual tampão deverá ser utilizado para tal faixa. Na **Figura 23** está demonstrado o gráfico de pKa para cada microespécie do fármaco em função do pH do meio.

**Figura 23** - Distribuição das microespécies de BZN em função do pH do meio.



Fonte: CHEMAXON, acesso em 25 de janeiro de 2019.

Por meio da análise da distribuição das microespécies de BZN, concluiu-se que o pH do meio que poderia ser utilizado seria dentro de uma faixa entre 2 e 10. Dentro dessa faixa ocorre o favorecimento da existência de apenas de uma espécie, sendo

ela a não ionizada. Nessa situação, problemas como cauda no pico cromatográfico, devido à existência de outras espécies que podem possuir interações diferentes com a coluna, seriam evitados.

O próximo passo foi a escolha de um tampão que possuísse essa faixa de tamponamento e fosse compatível com o detector de massas. Na **Tabela 17** estão descritos alguns dos principais tampões utilizados em cromatografia, sua faixa de tamponamento e sua compatibilidade com o detector de massas.

**Tabela 17-** Tampões recomendados para utilização em cromatografia de acordo com sua faixa de tamponamento e compatibilidade com detector de massas.

Tampão	Faixa de tamponamento	UV Cut-off	Compatibilidade com detector de massas
Trifluoroacético	1.5-2.5	210 nm (0,1%)	Sim
Ácido fosfórico	1.5-3.5	<200nm (10 mM)	Não
Ácido fórmico	2.7	210	Sim
Fosfato (pk1)	1.1-3.1	200	Não
Fosfato (pk2)	6.2-8.2	200	Não
Fosfato (pk3)	11.3-13.3	200	Não
Acetato	3.8-5.8	210	Sim
Citrato (pk 1)	2.1-4.1	230	Sim
Citrato (pk 2)	3.7-5.7	230	Sim
Citrato (pk 3)	4.4-6.4	230	Sim
Formiato de amônio	2.7-4.7	210	Sim
Bicarbonato de amônio	6.6-8.6	200	Sim

**Fonte:** adaptado de SNYDER, 2011 e ROMANO, 2018

Após análise da **Tabela 17**, nota-se que dois tampões apresentam uma faixa de tamponamento ideal para o BZN e são compatíveis com o detector de massas: acetato e citrato (pk 3). Optou-se pela utilização do tampão acetato devido a um menor UV *cut-off* e por possuir uma faixa de tamponamento ampla e dentro daquela ideal para o BZN. Assim, um pH próximo a 5,7 foi escolhido, por estar próximo a

uma faixa neutra, visando uma maior conservação da coluna, já que pH extremos diminuem o tempo de vida útil delas. O tampão citrato possui um UV *cut-off* no mesmo comprimento de onda escolhido para o desenvolvimento do método indicativo de estabilidade (230 nm), não sendo possível a visualização de todos os produtos de degradação formados.

A partir dos resultados obtidos que mostraram que o BZN IFA e comprimidos foram suscetíveis a degradação alcalina com solução de NaOH 0,1 M por 8h a uma temperatura de 50 °C e a degradação fotolítica por 9 dias em câmara de fotoestabilidade, a determinação do tampão e de um pH ótimo para análise, foi possível iniciar o desenvolvimento do método indicativo de estabilidade para o BZN. Para isso, utilizou-se coluna cromatográfica Agilent HC-C18(2) (150 x 4,6 mm, 5 µm) em corrida isocrática composta por água:acetonitrila 70:30 (v:v), em 212 nm. Optou-se então pela utilização de solução tampão 10 mM de acetato de amônio, ainda nessa corrida isocrática. Com a mudança para solução tampão, observou-se um deslocamento batocrômico dos produtos de degradação e do fármaco, sendo escolhido um comprimento mais alto para análise: 230 nm.

Durante as análises da degradação em meio alcalino, observou-se, como já descrito na escolha do cosolvente, a formação de um pico proveniente da reação entre ACN e o meio alcalino. Porém, antes da opção pela mudança de cosolvente, testou-se a mudança da ACN por metanol na fase móvel, objetivando-se mudança na seletividade. Além disso, diversos gradientes foram testados a fim de se obter a separação entre os picos dos produtos de degradação e o pico interferente, sem resultados satisfatórios.

Outra tentativa foi a mudança no tipo de coluna, visando também mudança na seletividade. Foram testadas colunas com fase móvel composta por amino e colunas do tipo HILIC. Também não foi observado resultado satisfatório para a separação do interferente e os produtos de degradação, além dos produtos passarem a co-eluir com o pico do fármaco, como foi o caso do teste com a coluna HILIC. Como não foi possível a obtenção de bons resultados com a mudança de colunas, outros cosolventes foram testados, como descrito na seção 5.3.1, sendo 1,4 dioxano o solvente de escolha, por não apresentar interferências significativas com os picos dos produtos de degradação e com o pico do fármaco.



Após escolha do cosolvente, da coluna, da composição da fase móvel e do comprimento de onda, iniciou-se o teste com diversos gradientes. Outros parâmetros como temperatura do forno da coluna e vazão foram também testados. Uma vez que na degradação em meio alcalino surgiram produtos de degradação muito polares, foi necessário iniciar as corridas com apenas 5% de ACN para permitir a separação entre eles. O gradiente definitivo no qual se obteve uma melhor resolução entre os picos, com boa assimetria e menor tempo, se encontra descrito na **Tabela 18** e as condições cromatográficas definitivas se encontram descritas na **Tabela 19**. Na **Figura 24** estão apresentados os cromatogramas obtidos com o método indicativo de estabilidade desenvolvido nas condições em que houve degradação.

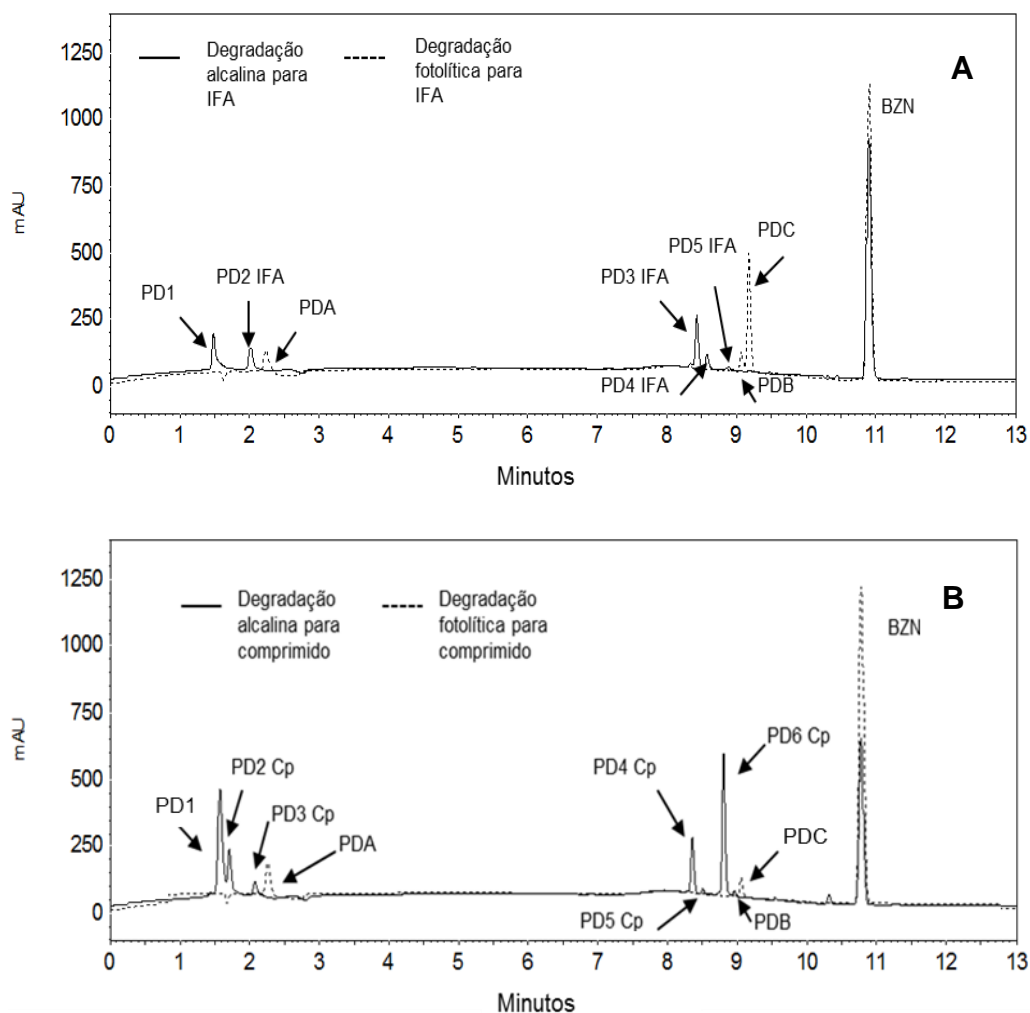
**Tabela 18-** Gradiente utilizado no método indicativo de estabilidade desenvolvido para BZN utilizando CLAE

Tempo (min)	A % (v/v) (fase aquosa)	B % (v/v) (acetonitrila)	Eluição
0 – 4	95% → 91.5%	5% → 8,5%	Gradiente linear
4 – 7,0	91.5%→60%	8.5%→40%	Gradiente linear
7 – 11	60%	40%	Isocrática
11 – 11,5	60%→95%	40%→5%	Gradiente linear
11,5 – 13	95%	5%	Re-equilíbrio

**Tabela 19** - Condições cromatográficas definitivas do método indicativo de estabilidade desenvolvido para BZN utilizando CLAE

Parâmetros	Condições
Coluna	HC- C18(2) (150 x 4,6 mm, 5 µm)
Composição da fase móvel	ACN: Tampão Acetato pH 5,7– gradiente (Tabela 16)
Comprimento de onda	230 nm
Vazão da fase móvel	1,0 mL/min
Temperatura do forno	40 °C
Volume de injeção	20,0 µL

**Figura 24** - Cromatograma das condições em que houve degradação comprovando adequabilidade do método indicativo de estabilidade desenvolvido para IFA (A) e comprimidos (B).

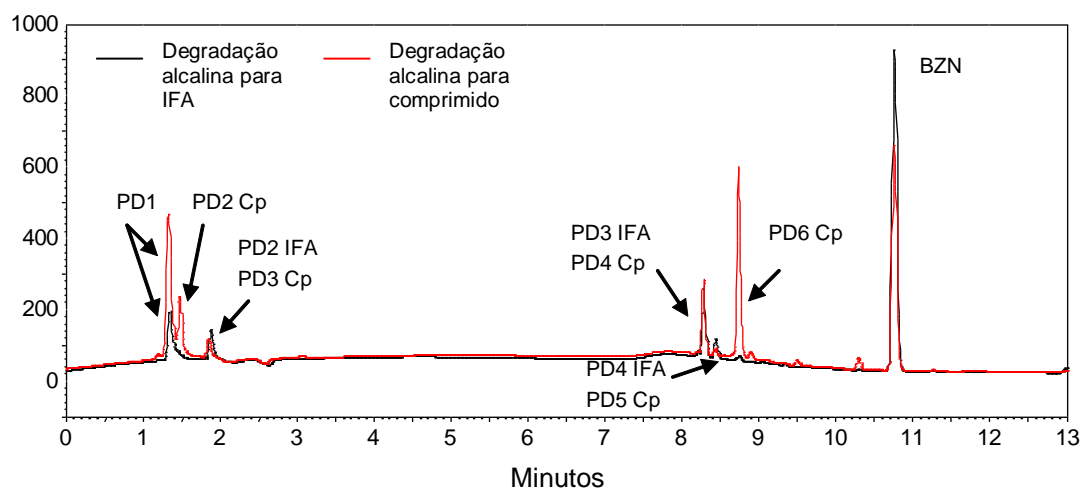


Os valores dos parâmetros do sistema cromatográfico, utilizados para comprovar a adequabilidade do método indicativo de estabilidade desenvolvido, estão descritos na **Tabela 20** para o BZN e os produtos de degradação majoritários formados. Como houve a formação de produtos de degradação diferentes para BZN IFA e comprimidos na degradação em meio alcalino, os parâmetros para eles foram descritos separadamente. Na **Figura 25** está demonstrada essa diferença entre os resultados obtidos para IFA e comprimidos nessa condição.

**Tabela 20** - Parâmetros do sistema cromatográficos utilizados para comprovar a adequabilidade do método indicativo de estabilidade desenvolvido utilizando CLAE.

Amostra	Analito	Tempo de retenção (t <sub>R</sub> ) (min)	Fator de retenção (k)	Número de pratos teóricos (N)	Fator de cauda	Resolução (R)
IFA após degradação básica com NaOH 0,1 M a 50 °C, durante 8h	PD1	1,70	0,13	4062	2,17	0
	PD2 IFA	2,23	0,48	7840	1,22	5,15
	PD3 IFA	8,64	4,76	174930	0,80	69,74
	PD4 IFA	8,78	4,85	172783	1,31	1,77
	PD5 IFA	9,11	5,07	131999	0	3,24
	BZN	11,11	6,40	131933	1,06	17,43
CP após degradação básica com NaOH 0,1 M a 50 °C, durante 8h	PD1	1,45	0,03	4379	1,21	0
	PD2 Cp	1,85	0,23	6920	0	1,85
	PD3 Cp	2,23	0,48	7913	1,18	3,91
	PD4 Cp	8,65	4,76	178757	1,20	70,55
	PD5 Cp	8,80	4,85	222980	0	1,87
	PD6 Cp	9,11	5,07	181087	1,20	3,91
	BZN	11,13	6,40	138035	1,06	19,65
IFA e comprimido após degradação fotolítica durante 9 dias	PDA	2,29	0,53	4049	1,21	0
	PDB	9,12	5,08	225750	1,00	61,69
	PDC	9,23	5,15	179238	1,06	1,30
	BZN	10,95	6,30	121574	1,06	16,23

**Figura 25** - Cromatograma da degradação alcalina para BZN IFA e comprimido em 8h a 50 °C na concentração de 100 µg/mL



Por meio da análise da **Tabela 19** pode-se perceber que alguns produtos de degradação formados têm característica mais polares (PD1, PD2 e PD3) que o BZN e os outros produtos de degradação apresentaram fator de retenção menor que o recomendado (valores entre 1 e 10). Durante o desenvolvimento do método, várias tentativas de aumentar a retenção foram feitas sem sucesso e, por isso, o método se inicia com uma baixa porcentagem de solvente orgânico.

Comparando os produtos de degradação obtidos para IFA e comprimidos é possível perceber, devido ao alto fator de assimetria do PD1 no IFA, que existe um outro produto co-eluído com ele e que no comprimido houve uma maior formação desse produto, que foi denominada PD2 Cp. Outro produto de degradação que apresentou perfil distinto no IFA e comprimido foi o PD5 no IFA que representa o PD6 no comprimido. Percebe-se um grande aumento na área dele no comprimido, enquanto no IFA foi o produto de degradação formado de menor área. Já os outros produtos de degradação formados apresentaram perfil de degradação semelhante para IFA e comprimidos.

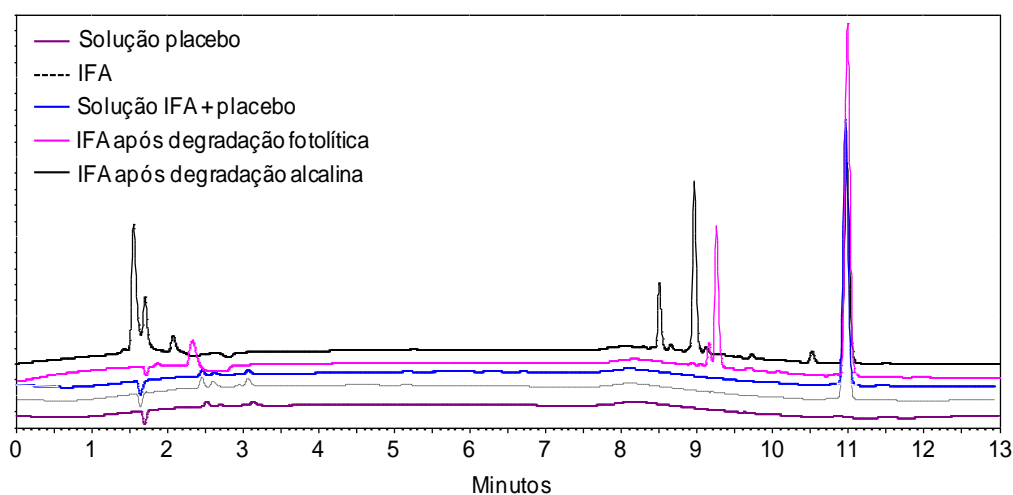
## 5.5 Validação

### 5.5.1 Seletividade e adequabilidade do sistema.

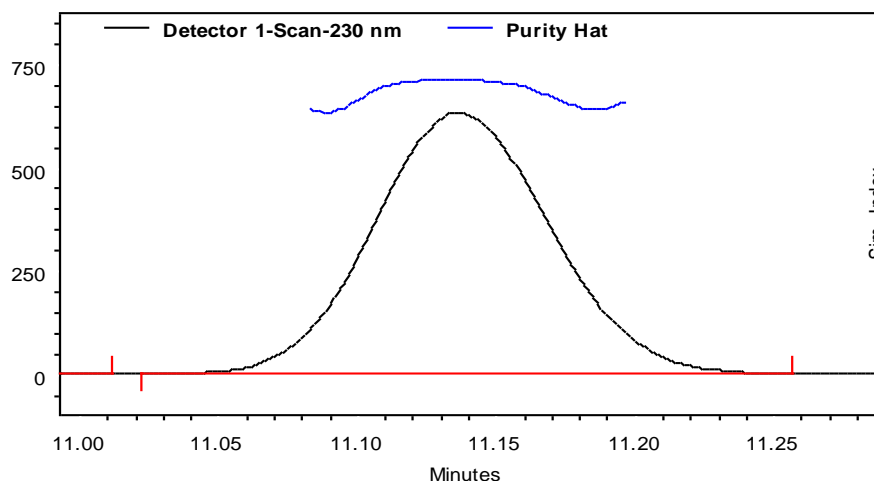
Avaliou-se a seletividade do método por meio da obtenção dos cromatogramas de degradação forçada para as condições: hidrólise ácida, alcalina e neutra; oxidação por peróxido de hidrogênio e AIBN; análise térmica seca e úmida e fotodegradação. Além disso, analisou-se a seletividade também frente ao placebo e às soluções branco. O método se apresentou seletivo em todas as condições, principalmente para as condições de hidrólise alcalina e fotodegradação, nas quais houve a formação de produtos de degradação. Na **Figura 26** estão mostrados os cromatogramas sobrepostos das condições alcalina e de fotodegradação, além do placebo e IFA fortificado com placebo, comprovando que o método se mostrou seletivo para os produtos de degradação e o BZN.

Além da utilização dos cromatogramas, a pureza de pico foi testada para o pico do BZN em todas as condições, obtendo-se valores acima de 99%. Na **Figura 27** está demonstrado o gráfico que comprova a pureza de pico no teste da seletividade. Pode-se observar que Purity hat se encontra acima da linha do detector, comprovando uma pureza de pico. Esse teste não garante que o pico do BZN contém somente essa substância, uma vez que outras substâncias que possuem o mesmo grupo cromóforo pode estar co-eluído sem que seja considerado uma impureza. Entretanto, ele demonstra que outras substâncias que possuam grupos cromóforos diferentes, não estão co-eluído.

**Figura 26-** Cromatogramas obtidos para comprovação da seletividade do método.



**Figura 27** - Gráfico que comprova a pureza de pico do BZN no teste da seletividade.



Para comprovação da adequabilidade do sistema, injetou-se cinco vezes a mesma solução a 50 µg/mL e avaliaram-se os seguintes parâmetros: fator de retenção ( $k$ ), fator de cauda, desvio padrão relativo da área sob o pico da BZN (DPR área) e desvio padrão relativo do tempo de retenção (DPR  $t_R$ ). Os resultados obtidos estão descritos na **Tabela 21**. O tempo morto da coluna foi calculado teoricamente.

**Tabela 21**- Resultado da avaliação da adequabilidade do sistema cromatográfico.

	Fator de retenção ( $k$ )	Fator de cauda	Área	$t_R$
<b>Média</b>	6.35	1.063	3683348	11.016
<b>DPR (%)</b>	0.16	0.54	0.70	0.14

Após avaliação dos resultados obtidos para a adequabilidade do sistema, concluiu-se que o método é adequado para a realização das análises, uma vez que o DPR da área e do tempo de retenção foi menor que 1%, o fator de cauda próximo a 1 e o fator de retenção entre 1 e 10 (GUILLARME *et al.*, 2007; GUILLARME *et al.*, 2010; MCMASTER, 2007).

### 5.5.2 Linearidade

A linearidade do método foi avaliada por meio de curva de calibração construída com 5 concentrações, igualmente espaçadas, que variava de 20 a 60 µg/mL, o que

representa 40 a 120% da concentração de trabalho, que é de 50 µg/mL. Os valores das áreas e as concentrações encontradas estão descritos na **Tabela 22**.

**Tabela 22-** Concentrações de BZN e valores de área para a construção da curva analítica do método indicativo de estabilidade

Replicata	Nível de Concentração	Área (mAu)	Concentração real de BZN (µg/mL)
1	40%	1873387	19,992
2		1844337	19,992
3		1749173	19,992
1	60%	2543689	29,988
2		2441681	29,988
3		2479382	29,988
1	80%	3237212	39,984
2		3224826	39,984
3		3144609	39,984
1	100%	3938778	49,98
2		3919978	49,98
3		3800226	49,98
1	120%	4490575	59,976
2		4322213	59,976
3		4376514	59,976

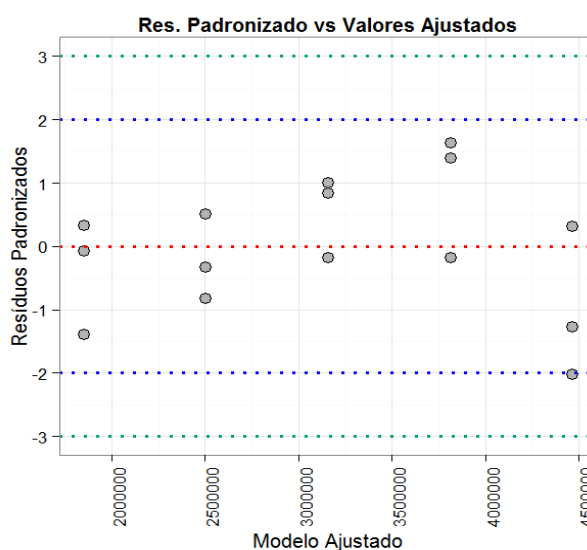
Após a construção da curva, aplicaram-se testes estatísticos para avaliação das premissas dos resíduos. Como não foi detectado nenhum *outlier*, todos os dados obtidos foram mantidos para análise. Os resultados dos testes se encontram descritos na **Tabela 23**. Como pode ser observado, os resíduos seguem a normal, são independentes e homoscedásticos. A homoscedasticidade dos resíduos foi comprovada também por meio do gráfico de dispersão dos resíduos, demonstrado na **Figura 28**. Os dados apresentados mostraram-se dispersos, sem nenhuma tendência, comprovando a homocedasticidade dos resíduos.

**Tabela 23-** Resultados dos testes para avaliação das premissas necessárias à utilização dos MMQO.

Premissa	Especificação	Resultado obtido	Conclusão
Teste de <i>outliers</i> pelo método <i>Jackknife</i>	$ J_{ei}  > J_{crítico}$ para $\alpha=0,05$	Nenhum <i>outlier</i> detectado	Nenhum ponto foi excluído.
Avaliação da normalidade pelo teste de Ryan-Jones	$R_{eq} \geq R_{crítico}$ para $\alpha=0,05$	$R_{eq} = 0,9929$ $R_{crítico} = 0,9798$	Os resíduos seguem a distribuição normal
Avaliação da independência dos resíduos pelo teste de <i>Durbin-Watson</i>	P-valor $>0,05$	P-valor = 0.0834	Não há correlação entre os resíduos (os resíduos são independentes)
Avaliação da homocedasticidade pelo teste de <i>Brown-Forsythe</i> ou <i>Levene modificado</i>	P-valor $>0,05$	P-valor = 0,1699	Há homoscedasticidade entre os resíduos.

**Fonte:** tabela construída com base nas informações disponíveis em SOUZA, 2007 e software Action Stat

**Figura 28** - Gráfico da dispersão dos resíduos para análise da homocedasticidade.

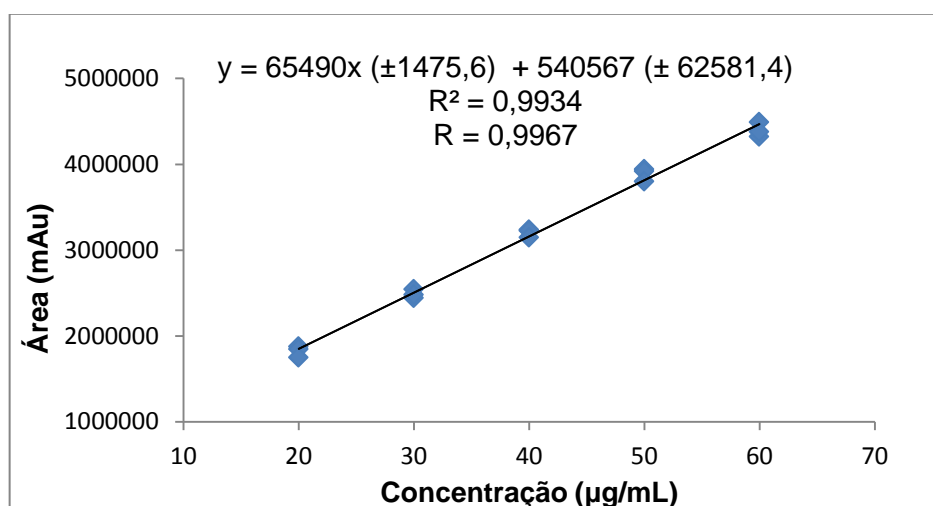


Portanto, o método dos mínimos quadrados ordinários pode ser aplicado. Assim, o gráfico para a curva analítica, a equação da reta, com os desvios padrão dos



coeficientes e o coeficiente de determinação ( $R^2$ ), foram obtidos, como demonstrado na **Figura 29**.

**Figura 29-** Curva analítica para avaliação da linearidade do método indicativo de estabilidade para a BZN na faixa de 20 a 60  $\mu\text{g/mL}$ .



De acordo com as normas preconizadas pela RDC 166/2017, para avaliação da linearidade, o coeficiente de determinação deve ser maior que 0,99. Entretanto, essa análise não garante a relação linear da curva e sim indica o grau de ajuste dos dados à curva, independente do modelo (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002). A forma mais adequada de se investigar se não há desvio na linearidade e a significância da regressão é por meio de teste ANOVA. Como resultado, obteve-se que a regressão linear é estatisticamente significativa e não há desvio de linearidade ( $p > 0,05$ ) em um nível de significância de 0,05.

Outro critério preconizado pela RDC 166/17 é de que o coeficiente angular seja significativamente diferente de zero, fato que também foi analisado e comprovado estatisticamente. Dessa forma, após cumprir todas as recomendações previstas na legislação, o método indicativo de estabilidade para determinação de BZN foi considerado linear na faixa entre 40 e 120% da concentração de trabalho.

### 5.5.3 Precisão

A precisão foi avaliada por meio de ensaios de repetibilidade (análises intra-dia) utilizando doze determinações que contemplaram os níveis de 40, 100 e 120% da concentração de trabalho (50 µg/mL), com três replicatas para cada nível. O mesmo ensaio foi realizado em dia posterior, por outro analista para a determinação da precisão intermediária (inter-dias). Realizou-se também a injeção de uma curva nas concentrações de 80, 100 e 120% da solução de BZN IFA a 50 µg/mL, preparada conforme o item 4.2.4.1. O teor médio de cada nível foi determinado, assim como o DPR para cada nível e para a precisão intermediária. Os resultados se encontram descritos na **Tabela 24**.

**Tabela 24-** Valores de teor médio e DPR estimados para precisão intra-corrída e inter-corrídas para BZN IFA e placebo contaminado.

	Nível*	Teor médio (%)	DPR (%)
1º dia de análise (intra-corrída)	40%	96,89	0,84
	100%	96,68	1,16
	120%	96,26	0,69
2º dia de análise (inter-corrídas)	40%	98,92	0,31
	100%	100,07	0,44
	120%	96,65	0,93
Inter-corrídas	40%	98,26	1,04
	100%	98,37	1,81
	120%	96,52	0,74

A partir da análise dos resultados, pode-se concluir que o método se apresentou preciso na faixa entre 40 e 120% da concentração de trabalho, uma vez que o DPR apresentou valores abaixo de 2,0%, como recomendado pelo guia da AOAC e por Green (1996), para essa faixa de concentração.

#### 5.5.4 Exatidão

A exatidão do método foi avaliada por meio do método do placebo fortificado em nove determinações em 3 níveis de concentração: 40, 100 e 120% da concentração de trabalho (50 µg/mL). A média da porcentagem de recuperação foi avaliada para cada nível estudado. Na **Tabela 25** estão demonstrados os resultados da exatidão.

**Tabela 25-** Porcentagem de recuperação de BZN adicionada ao placebo para avaliação da exatidão do método indicativo de estabilidade.

Nível	n	Porcentagem de recuperação	Médias (%)	DPR (%)
40% (20 µg/mL)	1	98,94	99,05	0,30
	2	98,82		
	3	99,39		
100% (50 µg/mL)	1	101,25	101,80	0,47
	2	102,18		
	3	101,94		
120% (60 µg/mL)	1	97,89	99,55	1,46
	2	100,65		
	3	100,11		

De acordo com Green (1996), os valores de recuperação devem estar entre 98 e 102%. Esse valor foi encontrado para todos os níveis de concentração. Assim, pode-se concluir que o método apresentou exatidão na faixa de concentração de 40 a 120% da concentração de trabalho.

#### 5.5.5 Robustez

A robustez de um método é avaliada por meio de variações pequenas e deliberadas nas condições cromatográficas do método como variação do pH da fase móvel, composição da fase móvel, diferentes lotes ou fabricantes de colunas, temperatura e

fluxo da fase móvel (BRASIL, 2017). Essa avaliação deve ser feita por meio de análise multivariada, como o teste de Youden, que permite, além de avaliar a robustez do método, ordenar a influência das variáveis no resultado final (YOU DEN, STEINER, 1975; INMETRO, 2011). Para o BZN IFA e para o BZN IFA fortificado com o placebo ela foi avaliada utilizando o método de Youden, com auxílio do software Action Stat. Foram calculadas a média dos efeitos das variáveis maiores e menores que os valores nominais do método e comparou-se com o efeito maior. Além disso, foram plotados pelo Software Action Stat gráficos que apresentam a influência das variáveis no método. Nas **Tabelas 26 e 27** estão demonstrados o efeito de cada variável calculado utilizando as áreas sob o pico de BZN encontrados em cada experimento e o efeito maior, além da conclusão sobre a influência de cada variável no método para BZN IFA e BZN IFA fortificado com placebo. Na **Tabela 28** estão as legendas das variáveis demonstradas no gráfico de Lenth.

Para que a variável seja considerada influente para o método, ela tem que estar fora dos limites inferior e superior calculados, como mostrado também pelo gráfico de Lenth nas **Figuras 30 e 31**.

**Tabela 26-** Efeito de cada variável calculada pelo método de Youden, os limites de cada uma e a conclusão da influência sobre o IFA fortificado com placebo.

Variavel avaliada	Efeito (IFA + PL)	Limite Inferior	Limite superior	Conclusão
Temperatura da coluna	21593,81	-2021370,59	1978182,967	Não influencia
Vazão da fase móvel	827023,13	-1172753,65	2826799,91	Não influencia
Volume de injeção	974594,14	-2974370,92	1025182,641	Não influencia
pH do eluente aquoso	434235,60	-1565541,18	2434012,38	Não influencia
Tempos de ultrassom	179093,01	-2178869,79	1820683,771	Não influencia
Fabricante de coluna	354181,97	-1645594,81	2353958,747	Não influencia

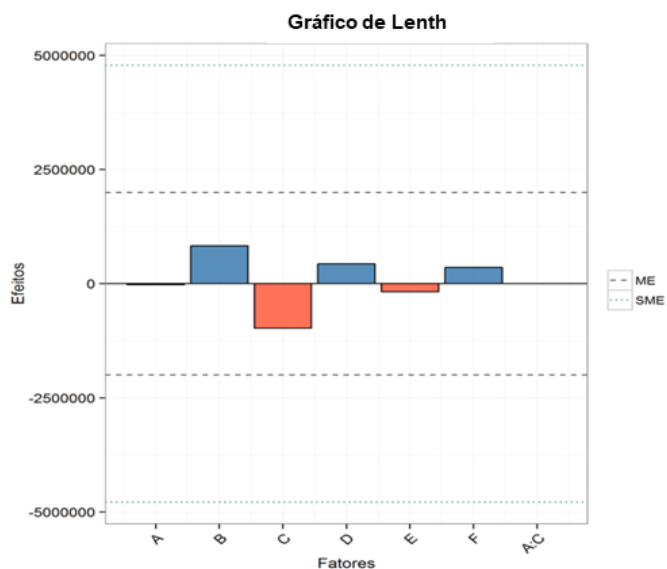
**Tabela 27-** Efeito de cada variável calculada pelo método de Youden, os limites de cada uma e a conclusão da influência sobre o IFA.

Variável avaliada	Efeito IFA	Limite Inferior	Limite superior	Conclusão
Temperatura da coluna	-500,33	-1924510,60	1922509,271	Não influencia
Vazão da fase móvel	389360,15	-1144789,64	2702230,237	Não influencia
Volume de injeção	-472916,96	-2869343,86	977676,0131	Não influencia
pH do eluente aquoso	229006,29	-1465497,35	2381522,528	Não influencia
Tempo de ultrassom	-13611,54	-1950733,01	1896286,861	Não influencia
Fabricante da coluna	170337,14	-1582835,65	2264184,228	Não influencia

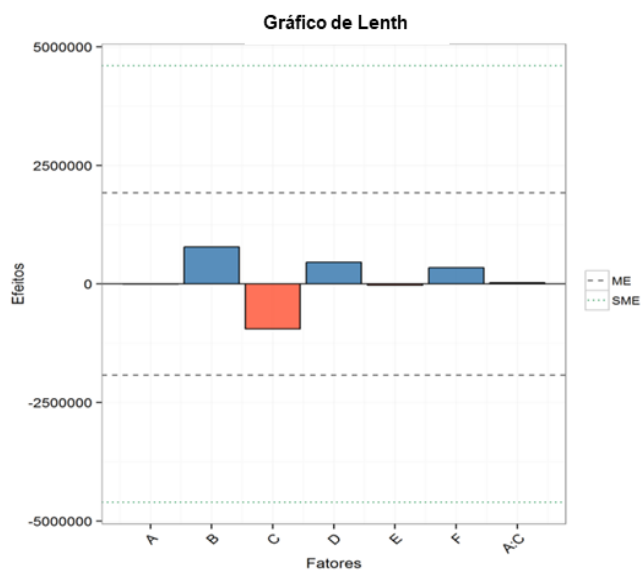
**Tabela 28-** Legendas para as variáveis representadas nos gráficos de Lenth.

Legenda	
A	Temperatura da coluna
B	Vazão da fase móvel
C	Volume de injeção
D	pH do eluente aquoso
E	Tempos de ultrassom
F	Fabricante de coluna

**Figura 30-** Gráfico de Lenth para avaliação da robustez nas amostras contendo BZN IFA contaminado com placebo



**Figura 31-** Gráfico de Lenth para avaliação da robustez nas amostras contendo BZN IFA



Por meio da análise dos gráficos de Lenth é possível visualizar como cada variável pode influenciar no método, entretanto sem ainda chegar ao limite de ser considerada significativa. Dessa forma, conclui-se que o método é robusto com relação às variáveis analisadas.

### 5.5.6 Limite de detecção

O limite de detecção foi determinado pelos parâmetros da curva analítica, descritos na **Tabela 29** e de acordo com a fórmula descrita no item **4.2.6.7**

**Tabela 29-** Parâmetros da curva analítica utilizados nos cálculos dos limites de quantificação e detecção.

Desvio Padrão dos Resíduos	Inclinação da curva
80792,27	65489,66

O limite de detecção encontrado, 4,07 µg/mL, está bem abaixo do último ponto da curva analítica.

### 5.5.7 Limite de quantificação

O limite de quantificação foi determinado pelos parâmetros da curva analítica, descritos na **Tabela 29** e de acordo com a fórmula descrita no item **4.2.6.8**. O valor encontrado foi 12,33 µg/mL.

Por meio da análise do limite de quantificação, pode-se concluir que o primeiro ponto da curva analítica se encontra acima desse limite, provando que é possível a quantificação do BZN até mesmo próximo ao menor ponto da curva.

## 5.6 Estudo da cinética de degradação forçada do BZN IFA e comprimidos

Após a realização do estudo de cinética da degradação forçada para IFA e comprimidos em meio alcalino e fotolítico, calculou-se a porcentagem de BZN remanescente em cada coleta. A regressão linear foi utilizada para investigar se o decaimento na porcentagem de teor do BZN ao longo do tempo seguia uma relação linear. Essa análise foi feita considerando-se o resultado obtido para o coeficiente de determinação, buscando-se valores mais próximos de 1. Transformações nos valores de teor remanescente de BZN, como a aplicação do inverso da resposta ( $1/x$ ) e o logaritmo da resposta ( $\text{Log } x$ ) foram utilizados para avaliar qual coeficiente de determinação seria maior e qual equação melhor se ajustaria aos dados. As equações e os coeficientes de determinação obtidos para o teor as transformações

matemáticas realizadas para o BZN IFA e comprimidos e se encontram descritos nas **Tabelas 30 e 31**.

**Tabela 30-** Equações e coeficientes para os modelos matemáticos avaliados para cinética de degradação forçada em meio alcalino.

Amostra	Modelo matemático avaliado	Equações obtidas	Coefficiente de determinação ( $R^2$ )
IFA a 50 °C	Teor de BZN	$y = -2,4524x + 96,603$	0,9702
	Inverso do teor	$y = 0,0003x + 0,0101$	0,9816
	Log <sub>10</sub> do teor	$y = -0,0123x + 1,9955$	0,9771
Comprimidos a 50 °C	Teor de BZN	$y = -2,7794x + 95,468$	0,8982
	Inverso do teor	$y = 0,0004x + 0,0104$	0,944
	Log <sub>10</sub> do teor	$y = -0,0144x + 1,9806$	0,9228

**Tabela 31-** Equações e coeficientes para os modelos matemáticos avaliados para cinética de degradação forçada fotolítica.

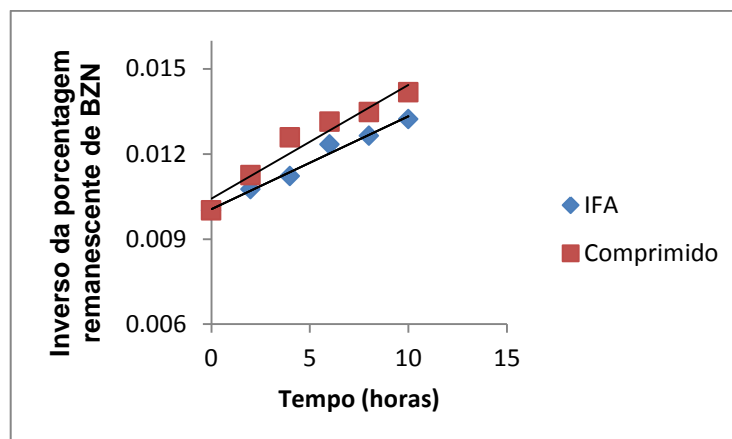
Amostra	Modelo matemático avaliado	Equações obtidas	Coefficiente de determinação ( $R^2$ )
IFA	Teor de BZN	$y = -3,7095x + 97,471$	0,979
	Log <sub>10</sub> do teor	$y = 0,0011x + 0,0092$	0,8728
	Inverso do teor	$y = -0,0213x + 1,9965$	0,9668
Comprimidos	Teor de BZN	$y = -4,8672x + 96,858$	0,9718
	Log <sub>10</sub> do teor	$y = 0,0007x + 0,0098$	0,9635
	Inverso do teor	$y = -0,0316x + 2,0023$	0,9429

Após análise das **Tabelas 30 e 31**, concluiu-se que os modelos que mais se ajustaram aos dados foram: o inverso do teor para o IFA e para comprimido na condição alcalina e teor para IFA e comprimido na condição fotolítica. Entretanto, em todos os casos obteve-se um coeficiente de determinação menor que 0,99, mostrando que, ainda sim, os modelos não são totalmente adequados aos dados. Dessa forma, as equações que obtiveram maior coeficiente de determinação podem ser utilizadas somente para estimar o tempo necessário para que uma determinada porcentagem de degradação seja obtida. Os gráficos correspondentes às equações

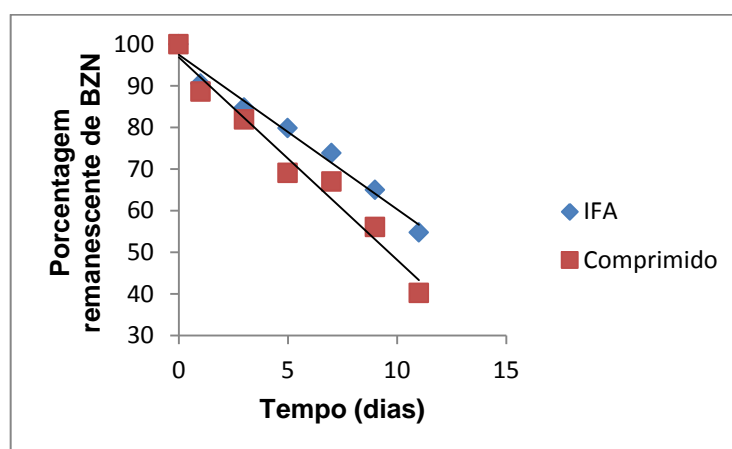


que se ajustaram melhor ao modelo estão demonstrados nas **Figuras 32 e 33** para IFA, comprimido na degradação alcalina e IFA e comprimido na degradação fotolítica, respectivamente.

**Figura 32-** Gráfico do inverso do teor restante de BZN IFA em função do tempo após degradação alcalina.



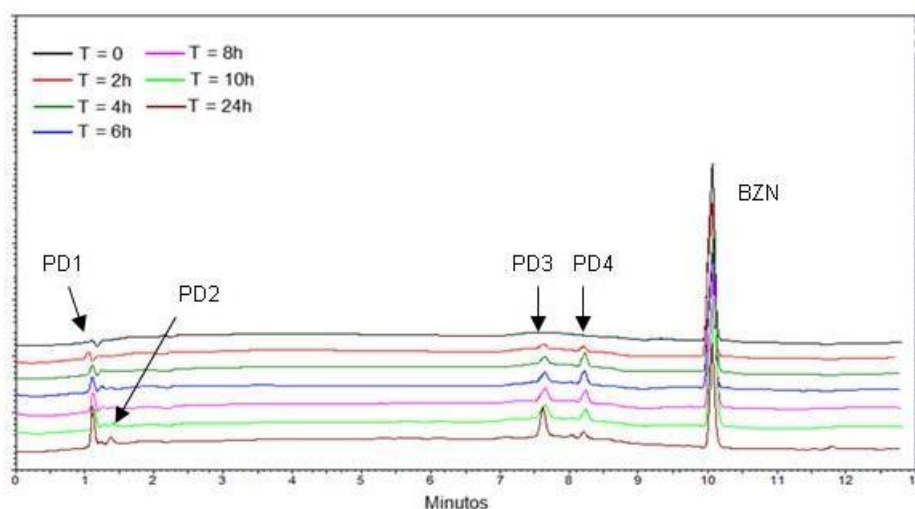
**Figura 33-** Gráfico da porcentagem do teor restante de BZN IFA e comprimido em função do tempo após degradação fotolítica.



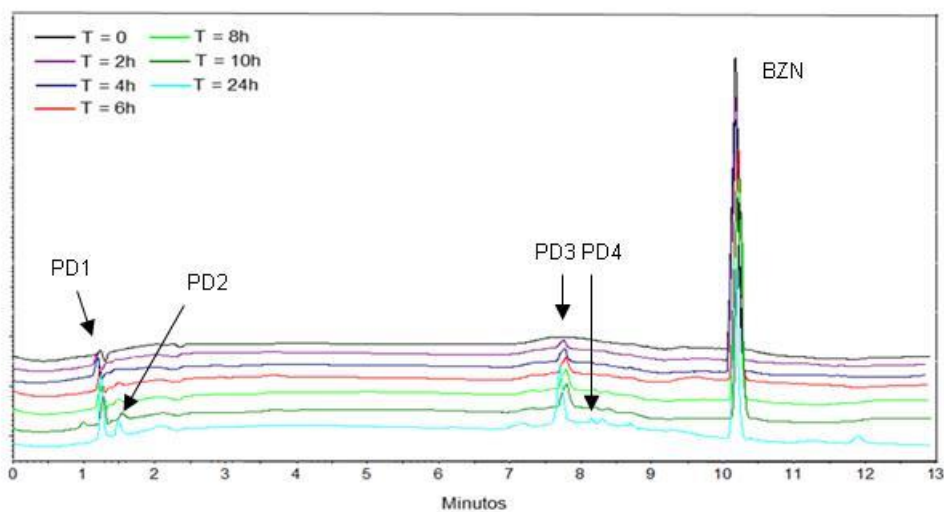
Por meio da análise dos gráficos de cinética também é possível determinar a ordem da cinética de degradação. Porém, a degradação do BZN, tanto para o meio alcalino quanto para o meio fotolítico, apresenta a formação de inúmeros produtos de degradação, o que dificulta a determinação da ordem da cinética. Além disso, os estudos foram conduzidos em condições irreais, uma vez que foi um estudo de degradação forçada. Sendo assim, para a determinação dessa ordem é necessária a realização de um estudo de cinética de longa duração com condições mais realistas.

Nas **Figuras 34** e **35** estão demonstrados os cromatogramas obtidos para a degradação do BZN comprimido e IFA, respectivamente, em meio alcalino a cada 2 horas e em 24h. É possível observar a formação de um produto de degradação a mais (PD4) no comprimido, que não é formado durante o mesmo tempo para o IFA, assim como observado no desenvolvimento do método (**Figura 24**). Percebe-se também que esse mesmo produto começa a reduzir a partir do tempo 8h no comprimido, podendo-se concluir que já começa a haver um degradação do próprio produto de degradação. Para o IFA no tempo 24h é possível perceber o início da formação do PD4, o que nos leva a crer que um dos excipientes presentes no comprimido pode estar agindo como catalisador para a formação desse produto de degradação.

**Figura 34-** Cromatogramas referentes ao estudo de cinética de degradação do BZN comprimidos em meio alcalino com coletas realizadas em intervalos de 2h a uma concentração de 50 µg/mL em 230 nm

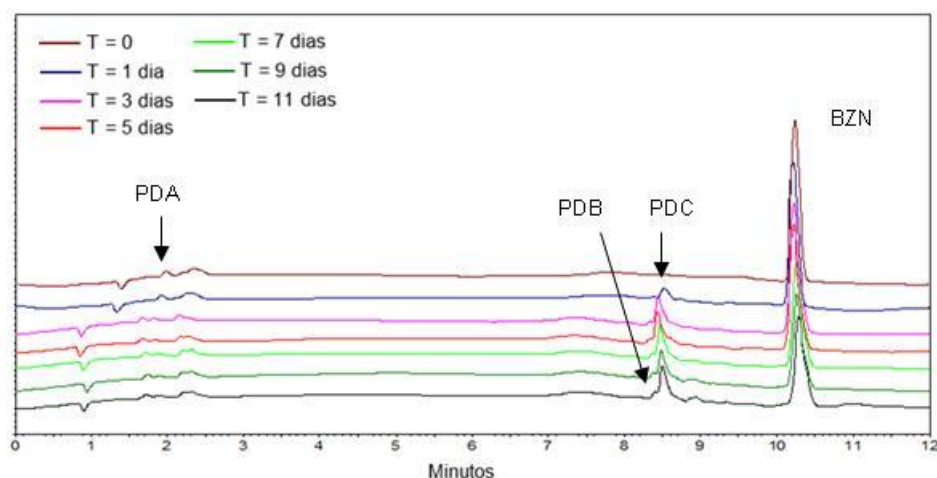


**Figura 35-** Cromatogramas referentes ao estudo de cinética de degradação do BZN IFA em meio alcalino com coletas realizadas em intervalos de 2h a uma concentração de 50 µg/mL em 230 nm.

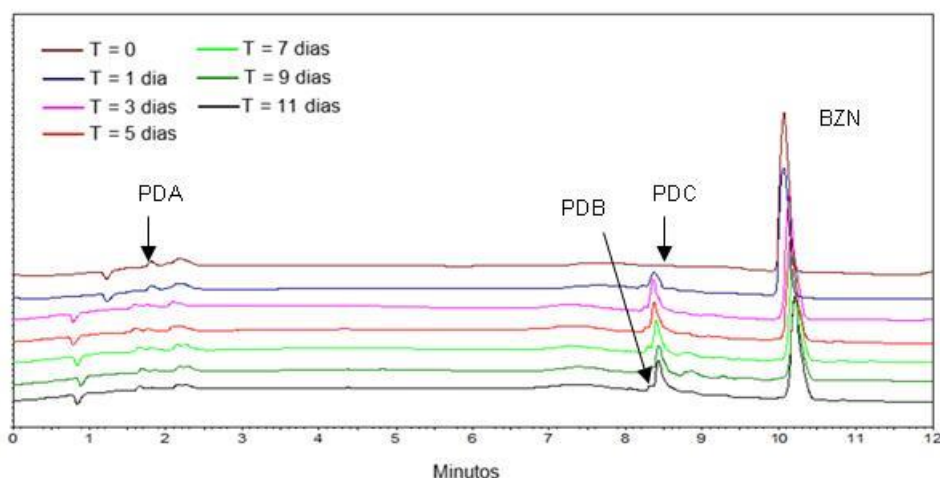


Diferentemente da degradação em meio alcalino, não foi observada diferenças do perfil de degradação para o BZN IFA e comprimidos, como é possível perceber pela análise das **Figuras 36 e 37** que representam os cromatogramas obtidos para a degradação fotolítica do IFA e comprimido, respectivamente, ao longo de 11 dias.

**Figura 36-** Cromatogramas referentes ao estudo de cinética de degradação fotolítica do BZN IFA com coletas realizadas em intervalos de 48h a uma concentração de 50 µg/mL em 230 nm.



**Figura 37-** Cromatogramas referentes ao estudo de cinética de degradação fotolítica do BZN comprimidos com coletas realizadas em intervalos de 48h em 230 nm.



As diferenças observadas na quantidade e área dos produtos de degradação formados durante o estudo da cinética com relação àquelas observadas no desenvolvimento do método se deve à concentração utilizada no estudo, que foi a de trabalho (50 µg/mL), enquanto que no desenvolvimento do método se utilizou uma concentração de 100 µg/mL. Assim, a legenda para os produtos de degradação não correspondem necessariamente aos mesmos produtos denominados anteriormente no desenvolvimento do método.

## 5.7 Estudo da interação entre fármaco e excipientes.

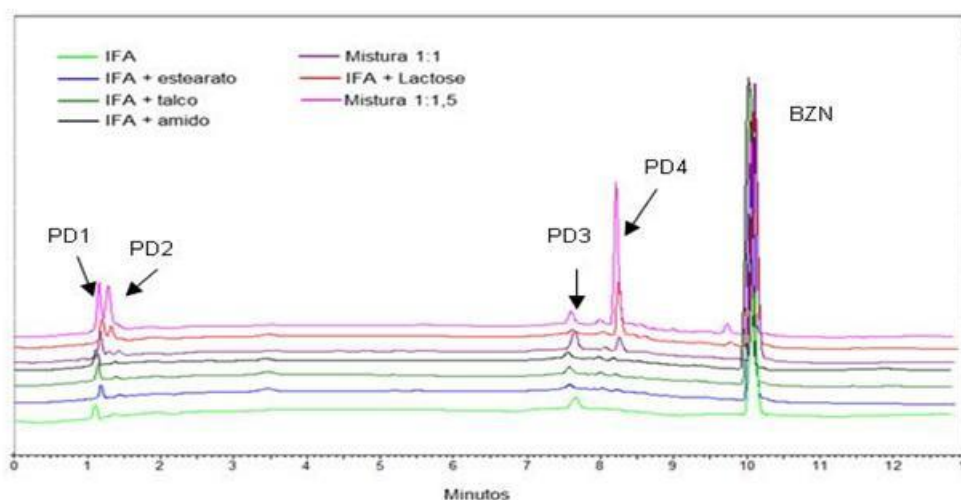
### 5.7.1 Estudo de degradação forçada com misturas binárias em meio alcalino.

Após a realização do estudo de degradação forçada com as misturas binárias e misturas de todos os componentes, observou-se que o perfil de degradação para as misturas binárias do BZN IFA com os excipientes estearato de magnésio, talco e amido, se manteve semelhante à degradação observada para o IFA, ou seja, não foi observada a formação de outro produto de degradação, como ocorre na degradação com o comprimido. A mistura na proporção 1:1 também apresentou perfil de degradação semelhante ao encontrado para o BZN IFA. Na **Figura 38** estão mostrados os cromatogramas obtidos para essas amostras.

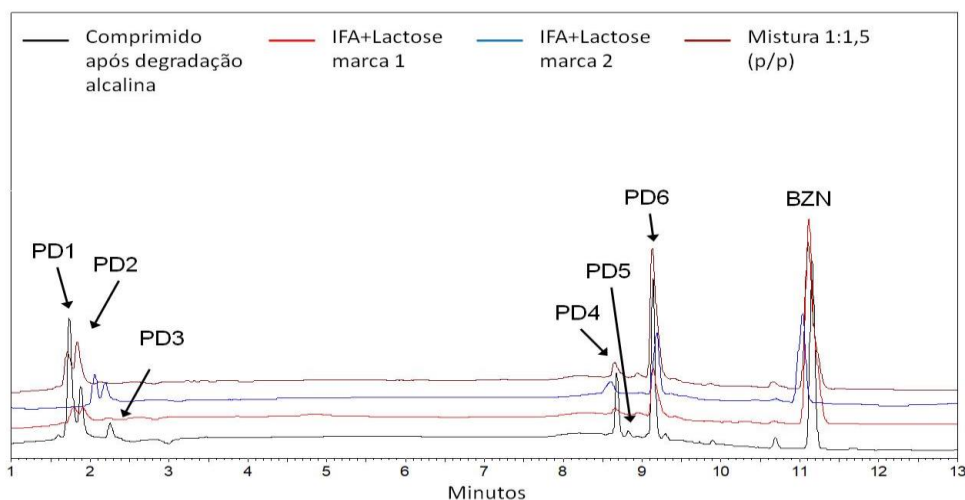
Já para a mistura binária com a lactose e a mistura na proporção de 1:1,5 de BZN IFA, observou-se um perfil de degradação semelhante ao perfil encontrado para o comprimido, como mostrado na **Figura 39**. Dessa forma, acredita-se que a lactose pode ter um efeito catalisador na formação do produto de degradação PD4, uma vez que comparando os dados da cinética de degradação do comprimido e do IFA, o PD4 passa a aparecer mais tardiamente no IFA.

A fim de se verificar se o resultado seria proveniente apenas da lactose utilizada na fabricação desse medicamento, devido a impurezas presentes nela, como metais, que podem acelerar o processo de hidrólise, testou-se outra lactose de fabricante diferente. O resultado, entretanto, foi o mesmo, o que demonstra que a lactose pode estar influenciando na degradação e não algum contaminante presente no lote utilizado para a fabricação. Outro fator a se considerar é de uma possível hidrólise da lactose em meio básico; entretanto, essa hipótese foi desconsiderada por não se observar a formação de produtos de degradação quando a lactose foi exposta individualmente a essa condição. Na literatura encontra-se extensivamente descrita a reação da lactose com aminas primárias e secundárias, por meio da reação de Millard. Soares-Sobrinho e colaboradores (2010), investigaram a compatibilidade térmica entre diversos excipientes e o BZN, dentre eles a lactose. Descreveram nessa ocasião a existência dessa incompatibilidade e a reação de Millard como a possível causa, que foi ainda, favorecida pelo estado líquido em que a lactose e o BZN se encontravam, após sua fusão. No caso do estudo de degradação binário, tal reação pode ser favorecida pela solubilização de ambos insumos. Entretanto, para melhor entender esse fenômeno é necessário, primeiramente, identificar o produto de degradação que está sendo formado e assim afirmar com maior certeza qual tipo de reação está ocorrendo entre a lactose e o BZN.

**Figura 38-** Cromatogramas obtidos em 230 nm para as misturas binárias as quais não foram observadas semelhanças com o perfil de degradação do comprimido.



**Figura 39-** Cromatogramas obtidos em 230 nm para a mistura binária com as lactoses e a comparação com a mistura 1:1,5 (p/p) e o comprimido.

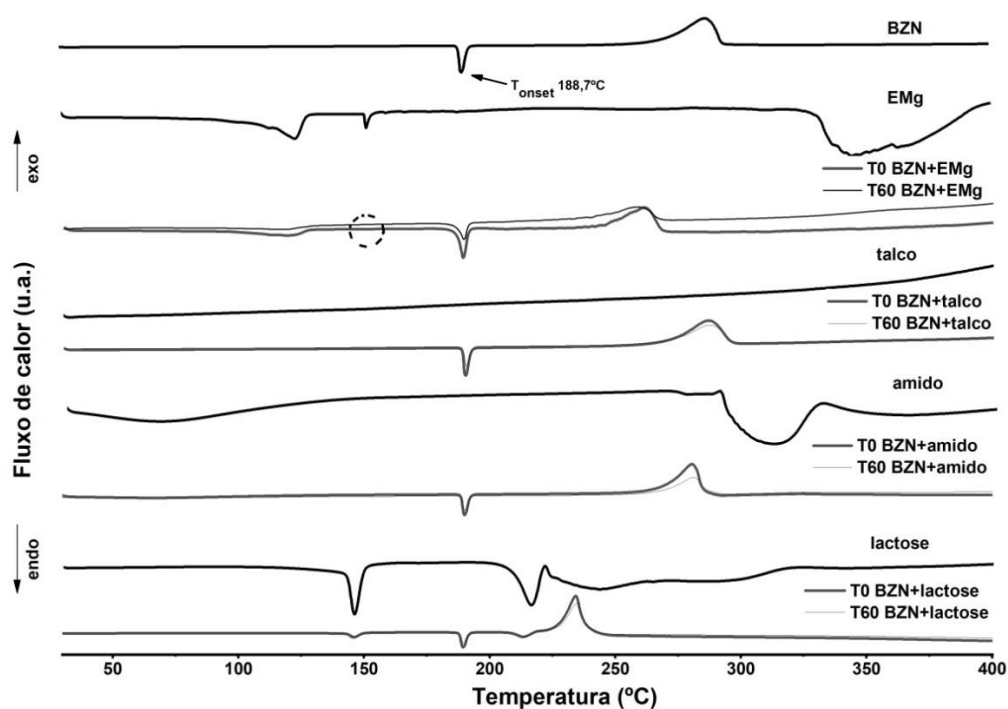


### 5.8.2 Estudos de compatibilidade entre o benznidazol e os excipientes utilizando Análise Térmica e Difração de raios-X de pó.

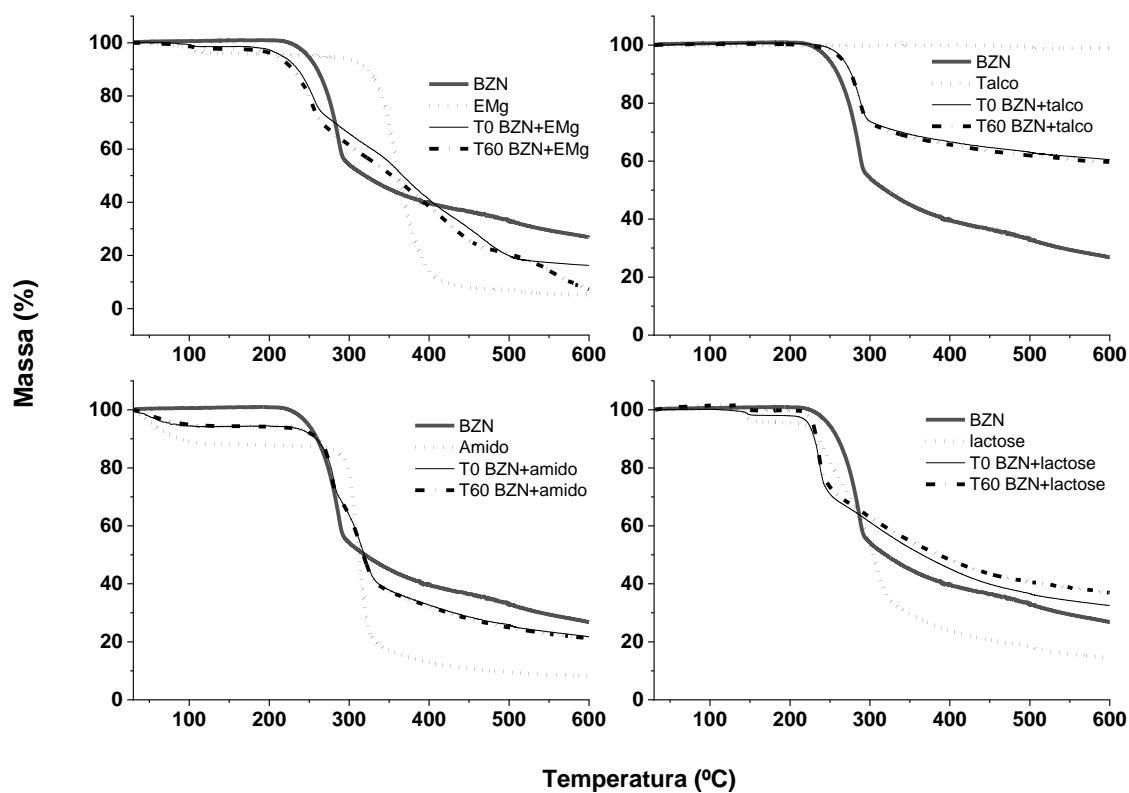
Utilizando a Análise Térmica foi possível avaliar a compatibilidade entre o BZN e os excipientes usados para a produção do comprimido. Na **Figura 40** estão demonstradas as curvas de DSC obtidas para cada componente da formulação e as misturas binárias, avaliadas no tempo zero (T0, imediatamente após o preparo da mistura) e após 60 dias de armazenamento (T60). Na **Figura 41** estão

demonstrados as curvas TG obtidas para cada componente e para as misturas binárias, avaliadas no tempo zero (T0, imediatamente após o preparo da mistura) e após 60 dias de armazenamento (T60). As temperaturas nas quais foram observados os eventos térmicos ( $T_{\text{onset}}$ , °C) e fluxos de calor envolvidos ( $\Delta H$  - entalpia, J/g) estão descritos na **Tabela 32**, bem como, a porcentagem de perda de massa (%) e temperatura do fenômeno (C°) estão descritas na **Tabela 33**.

**Figura 40** – Curvas DSC obtidas para cada componente da formulação e das misturas binárias no tempo zero (T0, imediatamente após o preparo da mistura) e após 60 dias de armazenamento (T60). BZN: benznidazol; EMg: estearato de magnésio. Detalhe em círculo nas curvas T0 BZN+EMg e T60 BZN+EMg destaca a ausência do fenômeno da fusão do EMg. As curvas foram obtidas sob atmosfera dinâmica de nitrogênio 50 mL/min e razão de aquecimento de 10 °C/min.



**Figura 41** – Curvas TG obtidas para cada componente da formulação e das misturas binárias no tempo zero (T0, imediatamente após o preparo da mistura) e após 60 dias de armazenamento (T60). BZN: benznidazol; EMg: estearato de magnésio. As curvas foram obtidas sob atmosfera dinâmica de nitrogênio 50 mL/min e razão de aquecimento de 10 °C/min.





**Tabela 32-** Temperaturas do fenômeno ( $T_{\text{onset}}$ , °C) e fluxos de calor envolvidos ( $\Delta H$  - entalpia, J/g) para cada componente da formulação e misturas binárias avaliadas no tempo zero ( $T_0$ , imediatamente após o preparo da mistura) obtidos por DSC.

<b>Amostra</b>	<b><math>T_{\text{onset}}</math> (°C)</b>	<b><math>\Delta H</math> (J/g)</b>
<b>Benznidazol</b>	188,77	141,55
<b>(BZN)</b>	246,06	978,83
<b>Estearato de magnésio</b>	109,49	178,64
<b>(EMg)</b>	150,51	9,85
<b>Amido</b>	41,77	99,11
	272,18	14,01
<b>Talco</b>	-	-
<b>Lactose</b>	142,78	153,41
	208,68	144,40
<b>BZN+EMg</b>	103,94	66,94
	186,74	62,89
	235,00	212,74
<b>BZN+amido</b>	41,62	44,08
	188,58	63,28
	242,98	537,39
<b>BZN+talco</b>	188,63	66,52
	245,75	453,71
<b>BZN+lactose</b>	143,28	39,66
	187,92	73,68
	208,82	67,01
	220,63	615,46

**Tabela 33** - Temperaturas do fenômeno (°C) e porcentagem de perda de massa (%) para cada componente da formulação e misturas binárias, avaliadas no tempo zero (T<sub>0</sub>, imediatamente após o preparo da mistura) obtidos por TG.

<b>Amostra</b>	<b>T<sub>start</sub> (°C)</b>	<b>Perda de massa (%)</b>
<b>Benznidazol (BZN)</b>	216,12	43,96
		20,26
<b>Estearato de magnésio (EMg)</b>	96,41	2,11
	308,15	82,00
<b>Amido</b>	34,41	9,45
	274,54	73,36
<b>Talco</b>	-	-
		3,25
<b>Lactose</b>	139,97	20,90
	226,34	33,60
<b>BZN + EMg</b>		21,96
	94,24	0,93
<b>BZN + amido</b>	183,77	23,99
		54,43
<b>BZN + talco</b>		4,04
	35,01	21,63
<b>BZN + lactose</b>	233,01	29,48
		15,78
<b>BZN + talco</b>	232,12	26,15
		11,79
<b>BZN + lactose</b>	139,7	1,32
	205,7	24,39
		38,07

A curva DSC do BZN apresenta um único evento endotérmico próximo a 188 °C que, não é acompanhado de perda de massa na curva TG indicando tratar-se de um fenômeno físico referente à fusão do BZN, dado coerente ao encontrado na monografia do fármaco da FB 5 ed. (188 °C a 190 °C). A partir de 220 °C nota-se o início de um evento exotérmico característico da decomposição do fármaco, o que

pode ser confirmado pelo início da perda de massa na curva TG, fenômeno que ocorre em duas etapas, totalizando ~64% de perda de massa diante do aquecimento.

A curva DSC para o amido apresenta um evento endotérmico alargado (40-80 °C) característico, correspondendo à sua gelatinização, fenômeno no qual ocorre liberação de água, dilatação e rompimento dos grânulos liberando cadeias de amilose ao meio aquoso e, posteriormente, amilopectina, fazendo com que a água livre seja absorvida formando uma pasta viscosa. Com o decorrer do aquecimento ocorre perda de água como mostrado na curva TG, ~100°C, e posterior decomposição a partir de 270 °C com perda de massa de 73%, majoritariamente em rampa única. Não foram observadas interações entre o BZN e o amido. Os mesmos eventos térmicos que são observados para a curva de DSC da mistura binária são observados na curva para o BZN, não havendo, assim, mudança na estabilidade térmica do BZN. Além disso, nas curvas de TG não são demonstradas diferenças significativas nas perdas de massa para a mistura com relação ao encontrado para os componentes sozinhos, sendo uma média entre as curvas do amido e do BZN.

A lactose presente na formulação, na forma monoidratada, perde água de cristalização em ~142 °C, primeiro evento endotérmico da curva DSC, confirmado pela perda de ~3% de massa, como observado na curva TG. Posteriormente observa-se a sua fusão em 208,68 °C (próximo ao descrito na literatura que é de 202 °C de acordo com ROWE, 2009) seguida imediatamente pela sua decomposição que ocorre em três etapas de perda de massa. Comparando as curvas DSC obtidas para o BZN e o BZN+lactose, observa-se uma diminuição na estabilidade térmica do fármaco, uma vez que, houve uma redução da temperatura em que se inicia a degradação do BZN, de ~246 °C para ~220 °C. Com relação à perda de massa, observou-se um perfil para a mistura diferente do obtido para os componentes individuais nos gráficos de TG. Apesar de ter ocorrido uma menor perda de massa total, essa perda ocorre em temperaturas menores, indicando, também, a diminuição da estabilidade do BZN na presença da lactose.

O EMg passa por desidratação próximo a 109°C, observado por um evento endotérmico na curva DSC, coerente à perda de massa ~2% como visto na curva TG. O segundo evento endotérmico corresponde à fusão desse excipiente, dado

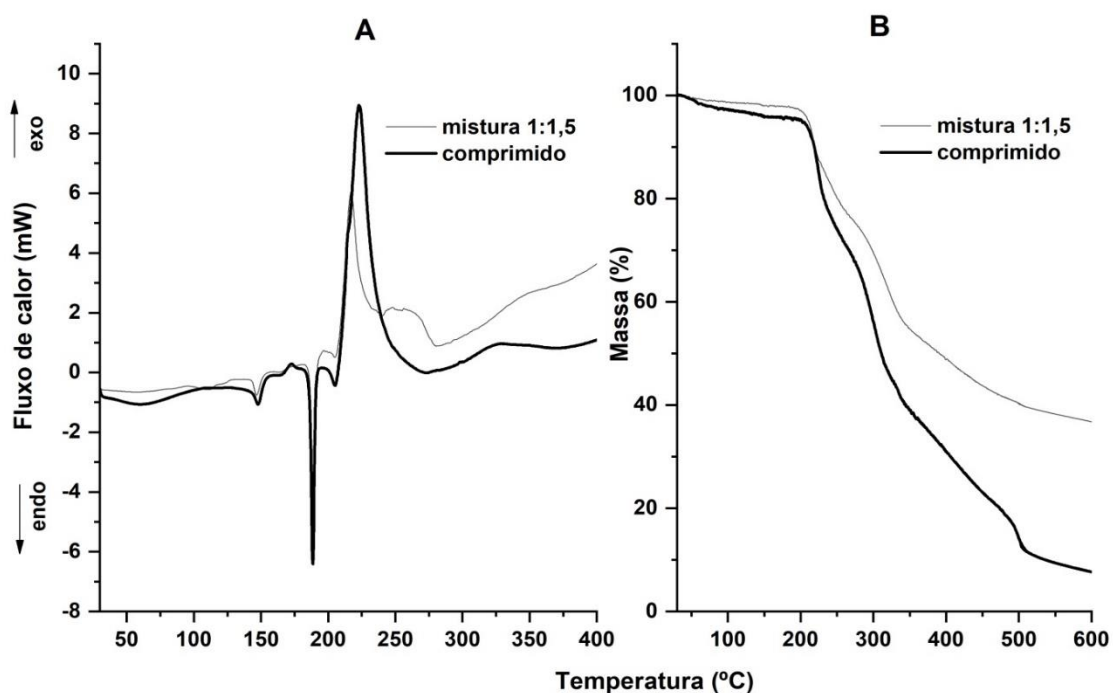
compatível à especificação técnica do fabricante (148 - 152 °C) (ROWE, 2009). A decomposição térmica do EMg ocorre em rampa única com ~82% de perda de massa total, a partir de 308 °C. Para a curva de TG da mistura entre BZN+EMg, assim como para a lactose, foi observada mudança no perfil da curva com relação às curvas obtidas para os componentes individuais. Nesse caso, é possível perceber uma maior perda de massa total do BZN na presença de estearato, de 63,9% para 78,4%. Além disso, foi identificado o desaparecimento do evento térmico de fusão do estearato de magnésio na mistura binária, como sinalizado no gráfico de DSC por um círculo. Tal fato pode indicar a existência de uma reação entre BZN e estearato de magnésio, formando outro ou outros componentes. Entretanto, o evento térmico que simboliza a faixa de fusão do BZN se manteve presente na mistura binária o que nos faz pensar que a reação entre BZN e estearato de magnésio não obedece a uma proporção de 1:1 e o evento existente é marcado pela existência de BZN remanescente. O gráfico de DSC para o BZN e estearato também demonstrou uma diminuição na estabilidade do BZN, já que a temperatura que se iniciou a degradação passou de 246,06 para 235.

Diferentemente da lactose e do estearato de magnésio que demonstraram interagir com o BZN diminuindo sua estabilidade térmica, o talco demonstrou ser capaz de aumentar sua estabilidade, apresentando um comportamento “refratário” na mistura BZN+talco. No gráfico de DSC para o talco não se observou nenhum evento térmico, uma vez que se trata de uma substância inorgânica e que possui faixa de fusão mais alta que a do experimento. Na curva DSC para a mistura, portanto, só foi possível observar os eventos térmicos inerentes ao BZN, que se mantiveram como o observado para a curva do BZN. Para a curva TG, foi possível observar uma redução significativa na perda de massa para o BZN estando em mistura binária (26,15% e 11,79%), se comparado à curva do BZN isolado (43,96% e 20,26%), bem como um aumento na temperatura de início de decomposição, ~232 °C BZN+talco e ~216 °C BZN, indicativos que o talco proporciona um aumento na estabilidade térmica do BZN.

Portanto, os resultados obtidos através da Análise Térmica (**Figuras 40 e 41, Tabelas 32 e 33**) indicam a existência de interação do BZN com o estearato de magnésio, com o talco e com a lactose, quando é fornecido calor ao sistema.

Além das curvas de DSC e TG dos componentes isolados e das misturas binárias, as curvas para a mistura 1:1,5 p/p e comprimido foram, também, obtidas. Na **Figura 42** estão demonstrados os gráficos de DSC (A) e de TG (B) para essas amostras. Nas **Tabelas 34** e **35** estão descritos os valores das temperaturas em que é possível observar eventos térmicos e a variação de entalpia existente na DSC e a temperatura em que ocorre perda de massa e a porcentagem de perda de massa que ocorreu na TG, respectivamente

**Figura 42**– Curvas DSC (A) e TG (B) para a mistura de todos os componentes na proporção de 1:1,5 p/p (BZN/excipientes) e comprimido. As curvas foram obtidas sob atmosfera dinâmica de nitrogênio 50 mL/min e razão de aquecimento de 10 °C/min.



**Tabela 34-** Temperaturas e entalpias associadas aos eventos térmicos observados na análise por DSC para a mistura de todos os componentes na proporção de 1:1,5 p/p (BZN/excipientes) e comprimido.

Amostra	T <sub>onset</sub> (°C)	ΔH (J/g)
<b>Mistura 1:1,5</b>	39,69	6,74
	100,91	4,42
	143,47	9,88
	160,37	1,39
	187,12	58,04
	202,58	6,83
	208,00	147,12
<b>Comprimido</b>	43,60	13,59
	143,74	12,21
	159,81	2,90
	186,53	53,61
	201,17	9,41
	209,00	399,47

**Tabela 35 -** Temperaturas e perdas de massa observadas na análise por TG para a mistura de todos os componentes na proporção de 1:1,5 p/p (BZN/excipientes) e comprimido.

Amostra	T <sub>start</sub> (°C)	Perda de massa (%)
<b>Mistura 1:1,5</b>		10,56
	198,12	13,78
		17,88
<b>Comprimido</b>		1,95
	36,24	14,75
	208,96	14,42
		19,62
		25,75

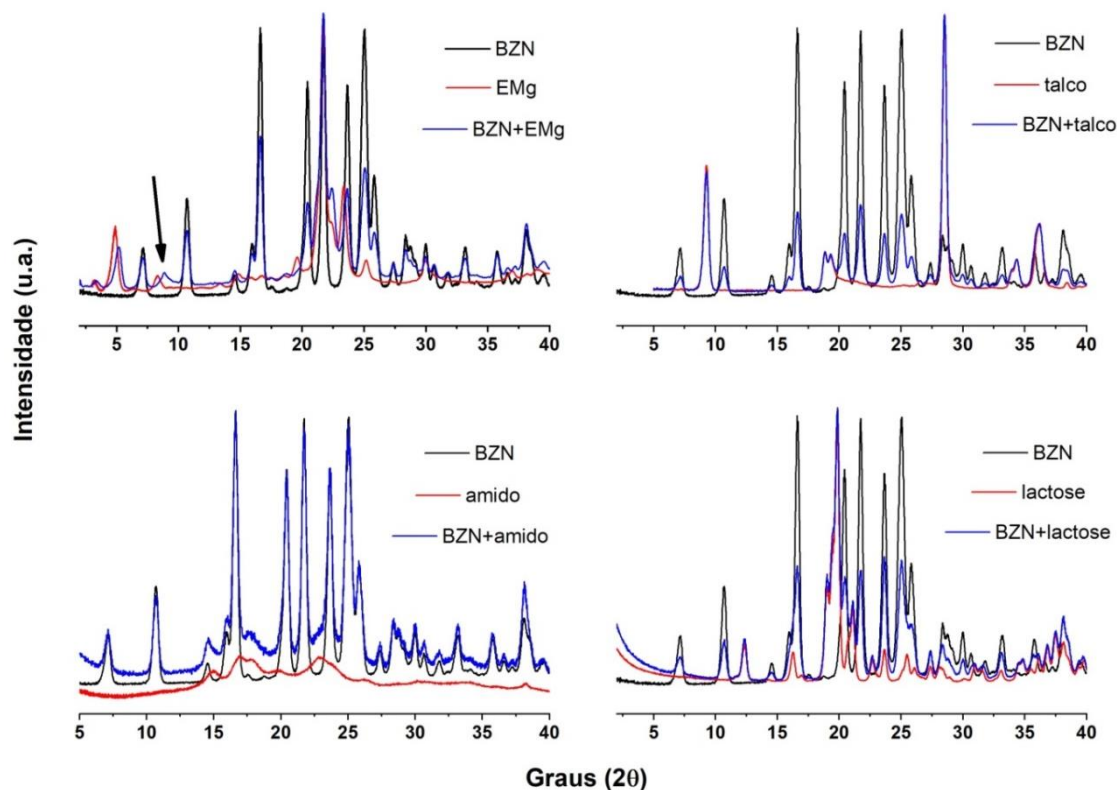
Por meio da análise das curvas obtidas (**Figura 38**) é possível perceber uma semelhança no perfil do comportamento térmico para a mistura 1:1,5 p/p e o comprimido. Entretanto, a porcentagem de perda de massa e o fluxo de calor foram

maiores para o comprimido. Isso pode estar associado à tecnologia de obtenção da formulação, compressão indireta via úmida (dado fornecido pelo fabricante), na qual o agente aglutinante pode atuar favoravelmente na propagação e transferência de calor, o que implica em maior perda de massa decorrente da decomposição e, o processo de compressão que afeta negativamente na entropia do sistema, ou seja, ocorre maior organização e ordenamento dos pós, o que requer maior fluxo de calor para induzir os fenômenos decorrentes do aquecimento (DESCAMPS, 2016)

Comparando a curva de DSC obtida para o comprimido e para o BZN, observa-se uma redução significativa na estabilidade térmica do BZN, pois há diminuição da temperatura de decomposição de 246 °C para 209 °C

Outra técnica utilizada na análise da compatibilidade entre o BZN e os excipientes foi a difração de raio-X. Por meio dela foi possível verificar se ocorrem mudanças na estrutura cristalina das substâncias para materiais amorfos ou se outras substâncias estão sendo formadas devido a interação entre eles. Além disso, foi possível comparar a estrutura cristalina dos componentes no comprimido íntegro e no pó, a fim de se obter informações sobre a homogeneidade da formulação. Na **Figura 43** estão demonstrados os difratogramas de cada componente comparando com as respectivas misturas binárias

**Figura 43** – Difratogramas do BZN, dos excipientes da formulação e de suas respectivas misturas binárias obtidos imediatamente após o preparo (T0). BZN: benznidazol; EMg: estearato de magnésio.



Ao analisar os difratogramas pode-se perceber que o estearato de magnésio e a lactose são compostos orgânicos que possuem estrutura cristalina, assim como o BZN, uma vez que difratam. O talco também apresenta estrutura cristalina, entretanto, por ser um material inorgânico, sua difração ocorre em alto ângulo (acima de 30 graus  $2\theta$ ), diferentemente dos materiais orgânicos, que difratam em ângulos mais baixos. Para o amido, não foi possível observar a formação de picos que correspondem à difração, indicando que se trata de um material amorfo.

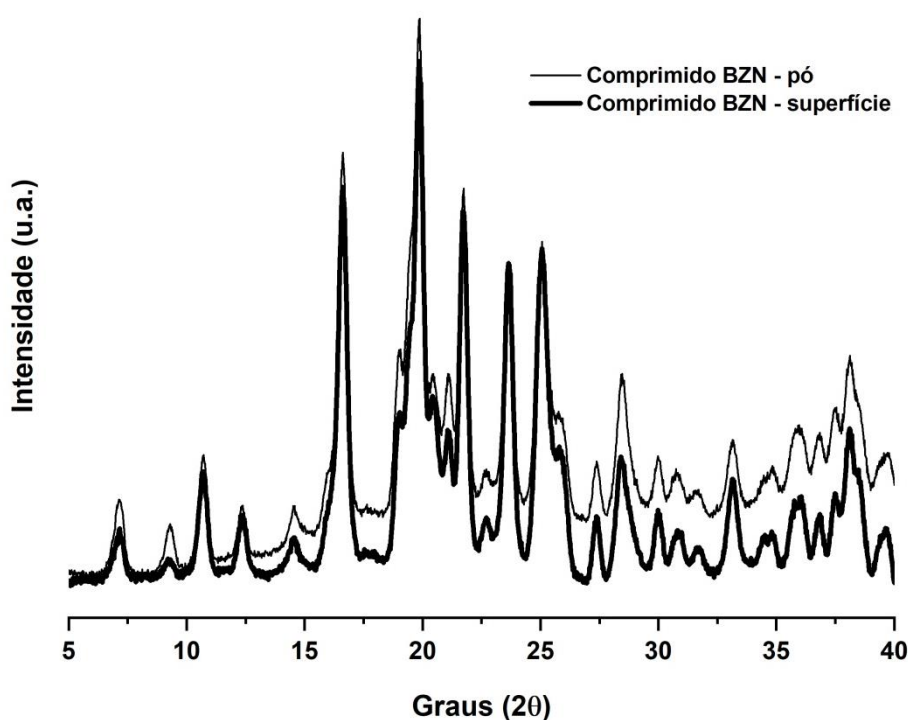
Observando os picos obtidos para as misturas, é possível perceber a existência tanto de picos provenientes dos excipientes, quanto os picos do BZN, materiais que apresentam cristalinidade. Entretanto, na mistura entre BZN e estearato de magnésio observou-se a formação de um novo pico (indicado por uma seta na figura) que não é proveniente de nenhum dos dois componentes. Tal fato sugere a



possível formação de uma nova fase decorrente da interação entre BZN e EMg, o que corrobora com os resultados obtidos na Análise Térmica.

Na **Figura 44** estão demonstrados os difratogramas obtidos para o comprimido íntegro e para o comprimido triturado. É possível perceber que há sobreposição entre as medidas indicando similaridade cristalina entre a superfície do comprimido e o seu interior, indicativo de homogeneidade na tecnologia do processo de obtenção, em especial nas operações unitárias de cominuição, mistura e compressão.

**Figura 44** - Difratogramas obtidos para o comprimido íntegro e para o comprimido triturado



A partir dos resultados obtidos nas análises de interação entre fármaco e excipientes por degradação binária, análise térmica e de raio-X de pó pode-se concluir que existe uma interação entre o BZN e os excipientes lactose e estearato de magnésio, de forma que uma diminuição de sua estabilidade foi observada. O talco, entretanto apresentou efeito refratário, aumentando a estabilidade do BZN. Esses resultados podem servir de guia para estudos de possíveis melhorias na formulação, considerando uma possível troca de diluente e no processo de produção desse comprimido.

## 6 CONCLUSÕES

Com os estudos de degradação forçada realizados foi possível concluir que o benznidazol IFA e na formulação em comprimidos é suscetível à degradação em meio alcalino e fotolítico, devendo, portanto, serem observadas as características adequadas de produção e armazenamento dos produtos farmacêuticos a fim de se evitar a formação desses produtos de degradação.

A partir dos estudos de degradação forçada, foi desenvolvido e validado método indicativo de estabilidade específico para o benznidazol, de acordo com a legislação brasileira vigente. Este método poderá ser utilizado na rotina dos estudos de estabilidade de longa duração para avaliação da formação de produtos de degradação e, quando necessário, a notificação, identificação ou qualificação deles.

Além disso, a análise térmica de compatibilidade fármaco-excipientes revelou a existência de incompatibilidades entre o benznidazol e a lactose e entre o benznidazol e o estearato de magnésio, em condições de alta temperatura. Esse fato pode ser um indicativo de perda de estabilidade por parte do produto farmacêutico, podendo ser necessária a busca por melhorias na formulação farmacotécnica.

Por fim, estudos por difração de raio-X indicaram homogeneidade da formulação do comprimido, já que o mesmo grau de cristalinidade que existe na superfície do comprimido também existe no seu interior.

Como perspectiva futura, pretende-se identificar os produtos de degradação formados na degradação fotolítica e alcalina empregando técnicas de caracterização como a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas.

## REFERÊNCIAS

ALSANTE, K. M.; MARTIM, L.; BAERTSCHI, S. W. A. Stress Testing Benchmarking Study. *Pharmaceutical Technology*, v. 27, n. 2, p. 60–72, 2003.

BAERTSCHI, S. W.; ALSANTE, K. M.; REED, R. A. *Pharmaceutical stress testing: predicting drug degradation*. Taylor & Francis Group, 2nd ed., 2011.

BAKSHI M.; SINGH S. Development of validated stability indicating assay methods: critical review. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. v. 28, p. 1011-1040, 2002.

BEDOR, D. C.G; BEDOR, N.C.T.C; SILVA, J.W.V; SOUSA, G.D; SANTANA, D.P; GARCIA-BOURNISSEN, F; ALTCHER, J; BLUM, B; ALVES, F; RIBEIRO, I. Dried Blood Spot Technique-Based Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Method as a Simple Alternative for Benznidazole Pharmacokinetic Assessment. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 62, n. 12, p.1-12, 2018.

BEZERRA, E.M; BEZERRA-NETO J.R; SALES F. A. M; SANTOS R.P; MARTINS A.M.C.; LIMA-NETO P; CAETANO E.W.S; ALBUQUERQUE E.L.; FREIRE V.N. Optical Absorption of the Antitrypanocidal Drug Benznidazole in Water. *Molecules*, v. 19, n. 4, p.4145-4156, 2014.

BRASIL. Resolução nº 01, de 29 de julho de 2005. *Guia para a realização de estudos de estabilidade*. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Poder Executivo, Brasília, DF, Diário Oficial da União, 2005.

BRASIL. Resolução da diretoria colegiada nº 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*. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Poder Executivo, Brasília, DF, Diário Oficial da União, 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Resolução da diretoria colegiada 166, de 24 de julho de 2017*. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Brasília, 2017.

BOULDER, F. Regulating impurities in pharmaceutical products: a tolerability of risk approach? Presentation at Joint Pharmaceutical and Analysis symposium, at GSK Ware on 05th February 2015.

BOTT R. F., OLIVEIRA W., P. Storage conditions for stability testing of pharmaceuticals in hot and humid regions. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. v. 33(4), p. 393-341, 2007.

CAMPOS, F.M.G. *Caracterização do gene que codifica a enzima álcool desidrogenase (tcadh) e associação da sua baixa expressão com o fenótipo de resistência in vitro do trypanosoma cruzi ao benzonidazol*. 2007. 93 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências na Área de Concentração Biologia Celular e Molecular, Instituto René Rachou, Belo Horizonte, 2007.

CHADHA, R; BHANDARI, S. Drug–excipient compatibility screening—Role of thermoanalytical and spectroscopic techniques. *Journal Of Pharmaceutical And Biomedical Analysis*, v. 87, p.82-97, 2014.

CHEMAXON (United States). Chemicalize. Disponível em <<http://www.chemicalize.org/>>. Acesso em 27 de abril de 2017.

CIONE, A. P.; TONHI, E; SILVA P. Stability Indicating Methods. Quality Control of Herbal Medicines and Related Areas, *Yukihiro Shoyama* (Ed.), ISBN: 978-953-307-682-9, 2007.

CORASSA, R.B; ACEIJAS, C; ALVES, P. A. B; GARELICK, H. Evolution of Chagas' disease in Brazil. Epidemiological perspective and challenges for the future: a critical review. *Perspectives In Public Health*, v. 137, n. 5, p.289-295, 2016.

DAVANÇO, M.G; CAMPOS, M.L; PECCININI, R.G. Rapid and sensitive ultra-high-pressure liquid chromatography method for quantification of antichagasic benznidazole in plasma: application in a preclinical pharmacokinetic study. *Biomedical Chromatography*, v. 29, n. 7, p.1008-1015, 2014.

DAVANÇO, M.G. *Farmacocinética do benznidazol administrado em coelhos na forma de comprimidos de liberação imediata e comprimidos de liberação prolongada*. 2015. 151 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Farmacêuticas, Unesp, Araraquara, 2015.

DESCAMPS, M. *Disordered Pharmaceutical Materials*. John Wiley & Sons; 2016.

FARMACOPEIA Brasileira, 5ª edição. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2010.

FDA. Food and Drug Administration. *Guidance for Industry: Analytical Procedures and Methods Validation*, 2000.

FREED, A.L; KALE, U; ANDO, H; ROSSI, D. T; KINGSMILL, C. A. Improving the detection of degradants and impurities in pharmaceutical drug products by applying mass spectral and chromatographic searching. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, USA, v. 35, n. 4, p.727-738, 2004.

GIRON, D. Contribution of thermal methods and related techniques to the rational development of pharmaceuticals—Part 1. *Pharmaceutical Science & Technology Today*, v. 1, n. 5, p.191-199, 1998.

GREEN, J. M. A practical guide to analytical method validation. *Analytical Chemistry*, Washington, v. 68, p. 305A-309A, 1996.

GREENSPAN, L. Humidity fixed points of binary saturated aqueous solutions. *Journal Of Research Of The National Bureau Of Standards Section A: Physics and Chemistry*, [s.l.], v. 81, n. 1, p.89-96, 1977. National Institute of Standards and Technology (NIST).

GRIMM, W. Extension of the International Conference on Harmonisation Tripartite Guidelines for stability testing of new drug substances and products to countries of Climatic Zones III and IV. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, v. 24, p. 313-325, 1998.

GOROG, S. Chemical and analytical characterization of related organic impurities in drugs. *Analytical And Bioanalytical Chemistry*, v. 377, n. 5, p.852-862, 2003.

GUILLARME, D.; RUTA J.; RUDAZ, J.; VEUTHEY, J. New trends in fast and high-resolution liquid chromatography: a critical comparison of existing approaches. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. v. 397, p. 1069-1082, 2010.

HOLM, R; ELDER, D P. Analytical advances in pharmaceutical impurity profiling. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 87, p.118-135, 2015.

ICH. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, *Guideline Q1B – stability testing: photostability testing of new drug substances and products*, 1996.

ICH. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, *Guideline Q1A(R2) – Stability Test of New Drug Substances and Products*, Geneva, 2003.

ICH. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, *Guideline Q3A(R2) – Impurities in New Drug Substances*, 2006[a].

ICH. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, *Guideline Q3B(R2) – Impurities in New Drug Substances*, 2006[b].

INMETRO. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial DOQ-CGCRE-OO8, revisão 04. *Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos*. Rio de Janeiro, 2011.

IONASHIRO, M. *Giolito: Fundamentos da Termogravimetria, Análise Térmica Diferencial e Calorimetria Exploratória Diferencial*. São Paulo: Giz Editorial, 2004, 82 p.

JAIN, D; BASNIWAL, P. K. Forced degradation and impurity profiling: Recent trends in analytical perspectives. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 86, p.11-35 2013.

KATS, M. *Forced Degradation Studies: Regulatory Considerations and Implementation*. 2005. Disponível em: <<http://www.biopharminternational.com/forced-degradation-studies-regulatory-considerations-and-implementation>>. Acesso em: 15 abr. 2017.

KHAN, H; ALI, M; AHUJA, A; ALI, J. Stability Testing of Pharmaceutical Products - Comparison of Stability Testing Guidelines. *Current Pharmaceutical Analysis*, Nova Deli, v. 6, n. 2, p.142-150, 2010

KIRCHHOFF, L.V.. Epidemiology of American Trypanosomiasis (Chagas Disease). *Advances In Parasitology*, p.1-18, 2011.

LAFEPE (Pernambuco). *Guia de compras do benznidazol LAFEPE*. Disponível em: <<http://www.lafepe.pe.gov.br/downloads/guia-de-compras-do-benznidazol-lafepe.pdf>>. Acesso em: 25 jan. 2019.

LANÇAS, F.M. A Cromatografia Líquida Moderna e a Espectrometria de Massas: finalmente “compatíveis”? *Scientia Chromatographica*, São Carlos, v. 1, n. 2, p.35-61, 2009.

LEITE, E., G. *Estabilidade: importante parâmetro para avaliar a qualidade, segurança e eficácia de fármacos e medicamentos*. 2005. 199f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre – RS, 2005.

MALIK, L. H.; SINGH, G. D.; AMSTERDAM, E.A.. The Epidemiology, Clinical Manifestations, and Management of Chagas Heart Disease. *Clinical Cardiology*, v. 38, n. 9, p.565-569, 2015.

MARTÍNEZ, N; MARSON, M.E; MASTRANTONIO, G.E; RABA, J; CERUTTI, S. Development of a LC–MS/MS methodology for the monitoring of the antichagasic drug benznidazole in human urine. *Talanta*, v. 131, p.656-660, 2015.

MCCUSKER, L. B.; VON-DREELE, R. B.; COX, D. E.; LOUER, D.; SCARDI, P. Rietveld refinement guidelines. *J. Appl. Cryst.*, v.32, p.36-50, 1999

MCMMASTER, M. C. *HPLC A Pratical User’s Guide*. 2<sup>nd</sup> ed. *New York: John Wiley & Sons*, 238 p., 2007.

MÉDICOS SEM FRONTEIRAS (MSF). *Doença de Chagas*. 2016. Disponível em: <<https://www.msf.org.br/o-que-fazemos/atividades-medicas/doenca-de-chagas>>. Acesso em: 01 dez. 2017.

MELO, O. R. S. *Produtos de degradação: regulamentação sanitária e proposta de monografia para qualificação*. 2012. 115f. Dissertação (Mestrado em Ciências da saúde) – Universidade de Brasília, Brasília-DF, 2012.

MELO, P.N; BARBOSA E.G; CALAND L. B; CARPEGIANNI H; GARNERO C; LONGHI M; PEDROSA M.F. F; SILVA-JÚNIOR A.A. Host–guest interactions between benznidazole and beta-cyclodextrin in multicomponent complex systems involving hydrophilic polymers and triethanolamine in aqueous solution. *Journal Of Molecular Liquids*, v. 186, p.147-156, 2013.

NEWMAN, A.W.; BYRN, S. R.. Solid-state analysis of the active pharmaceutical ingredient in drug products. *Drug Discovery Today*, v. 8, n. 19, p.898-905, 2003.

PAN, C; LIU, F; MOTTO, M. Identification of Pharmaceutical Impurities in Formulated Dosage Forms. *Journal Of Pharmaceutical Sciences*, New Jersey, v. 100, n. 4, p.1228-1259, 2011.

QIU, F; NORWOOD, D.L.. Identification of Pharmaceutical Impurities. *Journal Of Liquid Chromatography & Related Technologies*, Connecticut, v. 30, n. 5-7, p.877-935, 2007.

RAMACHANDRA, B. Development of Impurity Profiling Methods Using Modern Analytical Techniques. *Critical Reviews In Analytical Chemistry*, Andhra Pradesh, v. 47, n. 1, p.24-36, 2016.

REYNOLDS DW, FACCHINE KL, MULLANEY FJ, ALSANTE KM, HATAJIK TD, MICHEL MG. Available guidance and best practices for conducting forced degradation studies. *Pharm Technol.* 26(2): p 48-56, 2002.

ROBERT, J.D.; CASERIO, M. *Hydrolysis of Amides*. Disponível em: <[https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Organic\\_Chemistry/Book%3A\\_Basic\\_Principles\\_of\\_Organic\\_Chemistry\\_\(Roberts\\_and\\_Caserio\)/24%3A\\_Organonitrogen\\_Compounds\\_II%3A\\_Amides%2C\\_Nitriles%2C\\_and\\_Nitro\\_Compounds/24.4%3A\\_Hydrolysis\\_of\\_Amides](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Organic_Chemistry/Book%3A_Basic_Principles_of_Organic_Chemistry_(Roberts_and_Caserio)/24%3A_Organonitrogen_Compounds_II%3A_Amides%2C_Nitriles%2C_and_Nitro_Compounds/24.4%3A_Hydrolysis_of_Amides)>. Fev 2017. Acesso em: 06 fev de 2019.

ROMANO, R.L 2018. **Fase móvel**. Apostila do curso de desenvolvimento de método indicativo de estabilidade da US Pharmacopoeia. São Paulo, 2018.

SBMT. Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. II Consenso Brasileiro em doenças de Chagas. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*, v. 25, n. 21, p.1-10, 2016. Instituto Evandro Chagas.

SANTOS, F.L. A; ROLIM, L. A; FIGUEIRÊDO, C. B. M; . LYRA, M. A. M; PEIXOTO, M. S; FERRAZ, L R. M; SOARES-SOBRINHO, J. L; LIMA, L. A .A. N; LEITE, A. C. L; ROLIM NETO, P J. A study of photostability and compatibility of the anti-chagas drug Benznidazole with pharmaceuticals excipients. *Drug Development And Industrial Pharmacy*, v. 41, n. 1, p.63-69, 2013.

SILVA, A.L.M; SOARES-SOBRINHO, J.L; ROLIM NETO, P.J. Desenvolvimento de método analítico por CLAE e comprimidos de benznidazol para doença de Chagas. *Química Nova*, v. 30 n. 5, p 1163-1166, 2007.

SILVA K, ALVES LDS, SOARES M, PASSOS R, FARIA A, ROLIM NETO P. Modelos de Avaliação da Estabilidade de Fármacos e Medicamentos para a Indústria Farmacêutica. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básicas e Aplicada*. v. 30(2). P. 129-135, 2009.

SILVA C.R.G; *Estudos de compatibilidade fármaco-excipiente da azatioprina e da losartana potássica através de análise térmica*, 2017. 71 f. Dissertação (Mestrado) - Departamento de Química, ICEX, UFMG, Belo Horizonte, 2017.

SINGH, S.; HANDA, T.; NARAYANAM, M.; SAHU, A.; JUNWAL, M.; SHAH, R.A critical review on the use of modern sophisticated hyphenated tools in the characterization of impurities and degradation products. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 69, p. 148– 173, 2012.

SOARES-SOBRINHO, J.L.; SOARES, M. F. R.; LOPES, P. Q.; CORREIA, L. P.; SOUZA, F.S; MACÊDO, R. O; ROLIM NETO, P J. A Preformulation Study of a New Medicine for Chagas Disease Treatment: Physicochemical Characterization, Thermal Stability, and Compatibility of Benznidazole. *Aaps Pharmscitech*, v. 11, n. 3, p.1391-1396, 2010.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; DOLAN, J. W. *Introduction to modern liquid chromatography*. 3<sup>rd</sup> ed. New York: John Wiley & Sons, p 912 Inc. 2010.

SOUZA, S. V. C.; JUNQUEIRA, R. G. A procedure to assess linearity by ordinary least squares method. *Analytica Chimica Acta*, v. 552, p. 25-35, 2005.

SOUZA, S. V. C. *Procedimento para validação intralaboratorial de métodos de ensaio: delineamento e aplicabilidade em análise de alimentos*. 2007. 297f. Tese de doutorado (Programa de Pós-Graduação em Ciências de Alimentos) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte– MG, 2007.

THOMPSON, M.; ELLISON, S. L. R.; WOOD, R. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis. *Pure and Applied Chemistry*. v. 74, p. 835-855, 2002.

TZANAVARAS, P. D. Recent Advances in the Analysis of Organic Impurities of Active Pharmaceutical Ingredients and Formulations: A Review. *Current Organic Chemistry*, Thessaloniki, v. 14, n. 19, p.2348-2364, 2010.

WHO. Internacional Stability Testing: guidelines for stability testing of pharmaceutical products containing well established drug substances in conventional dosage forms. Anex 5, WHO Technical Report Series. 863, 1996.

WHO. Stability Testing of Active Pharmaceutical Ingredients and Finished Pharmaceutical Products. Technical Report Series, No. 953, 2009 - Annex 2.

WHO. Sustaining the drive to overcome the global impact of neglected tropical diseases: second WHO report in neglected tropical diseases. Geneva: World Health Organization; 2013.

WHO. *The International Pharmacopoeia*. 17 ed. Geneva: World Health Organization; 2017.

YOU DEN, W. J.; STEINER, E. H. *Statistical Manual of the Association of Official Analytical Chemists*. 48<sup>th</sup> ed. Arlington: AOAC, 88 p., 1975.

ZHANG, K. PELLETT. D.J; NARANG. A.S; WANG Y.J; ZHANG Y.T. Reactive impurities in large and small molecule pharmaceutical excipients – A review. *Trac Trends In Analytical Chemistry*, [s.l.], v. 101, p.34-42, abr. 2018.



**ANEXO 1- Certificado de apresentação de trabalho no III SINCIFAR.**

## Certificado

Certificamos que **Talita Santos do Valle** apresentou o trabalho intitulado **ESTUDO DE DEGRADAÇÃO FORÇADA E DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO INDICATIVO DE ESTABILIDADE PARA DETERMINAÇÃO DE BENZNIDAZOL** do(s) autor(es) **VALLE, T.S<sup>1</sup>; GOUVÊA, J.O<sup>1</sup>; FRANCO, P.H.C<sup>1</sup>; FERNANDES, C<sup>1</sup>** na modalidade de **pôster** durante o **III Simpósio em Ciências Farmacêuticas – SINCIFAR**.

Belo Horizonte, 09 de novembro de 2018.

  
\_\_\_\_\_  
**Lucas Antônio Miranda Ferreira**  
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas  
Faculdade de Farmácia – UFMG

  
\_\_\_\_\_  
**Saulo Fehelberg Pinto Braga**  
Membro da Comissão Organizadora  
III SINCIFAR

UFMG



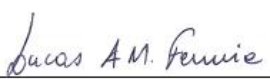
**ANEXO 2 - Certificado de apresentação de trabalho como co-autora no III SINCIFAR.**



## Certificado

Certificamos que **Júlia Oliveira Gouvêa** apresentou o trabalho intitulado **AValiação DO EFEITO DE DIFERENTES COSOLVENTES NA DEGRADAÇÃO ALCALINA DO BENZNIDAZOL** do(s) autor(es) **GOUVÊA, J.O<sup>1</sup>; VALLE, T.S<sup>1</sup>; FERNANDES, C<sup>1</sup>**, na modalidade de **pôster** durante o **III Simpósio em Ciências Farmacêuticas – SINCIFAR**.

Belo Horizonte, 09 de novembro de 2018.

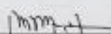
  
\_\_\_\_\_  
**Lucas Antônio Miranda Ferreira**  
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas  
Faculdade de Farmácia – UFMG

  
\_\_\_\_\_  
**Saulo Fehelberg Pinto Braga**  
Membro da Comissão Organizadora  
III SINCIFAR

**ANEXO 3** - Certificado de apresentação de trabalho no IV ABCF Congress.

# CERTIFICATE

We certify that the work PRELIMINARY STUDIES OF FORCED DEGRADATION FOR THE DEVELOPMENT OF A STABILITY-INDICATING HPLC METHOD FOR BENZNIDAZOLE., authorship of TALITA SANTOS DO VALLE , JULIA OLIVEIRA GOUVEIA, PEDRO HENRIQUE CAVALCANTI FRANCO, CHRISTIAN FERNANDES, was presented as POSTER PRESENTATION at the IV Congress of the Brazilian Association of Pharmaceutical Sciences - Biological Drugs: From Technology to Pharmaceutical Care, held in São Paulo (SP), Brazil, from September 6 to 8, 2018.

  
Maria José Soares Mendes Giannini  
President Congress

  
Teresa Dalla Costa  
President ABCF



**ABCF - 2018**  
BRAZILIAN ASSOCIATION OF PHARMACEUTICAL SCIENCES  
*Biological Drugs: from Technologies to Pharmaceutical Care*  
**September 06 to 08, 2018**  
CENTRO Fecomércio de Eventos, SÃO PAULO, SP

**ANEXO 4 - Laudo fornecido pelo LAFEPE do teor de BZN a partir de um padrão trabalho**



Governo de Pernambuco

Diretoria Técnica  
Coordenadoria do Controle de Qualidade  
Divisão de Físico-Química

CERTIFICADO DE ANÁLISE		Nº 00007313	DATA	23.05.2016
MATÉRIA PRIMA	BENZNIDAZOL		CÓDIGO:	02.254
Nº/DANFE:	000014825	QUANTIDADE:	99,5100Kg	VOLUMES:
Data Fabricação:	31.03.2016	Data Validade:	31.03.2018	04 Barricas
FORNECEDOR:	NORTEC QUÍMICA	LOTE LAFEPE:	17710	LOTE FABRICANTE:
				603218

DETERMINAÇÕES	ESPECIFICAÇÕES	RESULTADOS
Caracteres	Pó cristalino, levemente amarelado, inodoro, insípido e estável ao ar.	Atende as especificações
Solubilidade	Muito pouco solúvel em água, muito solúvel em dimetilsulfóxido, facilmente solúvel em dimetilformamida, solúvel em hexano, ligeiramente solúvel em etanol, metanol, acetato de etila e diclorometano, pouco solúvel em acetona, muito pouco solúvel em clorofórmio, isopropanol, isopropanol, glicerina. Muito pouco solúvel em hidróxido de sódio 0,1 M e em ácido clorídrico 0,1 M.	Atende as especificações
Faixa de Fusão	Entre 188°C e 190°C.	190°C
Identificação:	Atende as especificações.	Atende as especificações
Cloretos	Não ocorre turvação.	Atende as especificações
Perda por Dessecação	No máximo 0,5%.	0,01%
Doseamento	Espectrofotômetro	100,2%
	CLAE	
Contagem Microbiológica	No máximo 10 <sup>3</sup> UFC/g	Menor que 10 UFC/g
Contagem de Fungos e Leveduras	No máximo 10 <sup>3</sup> UFC/g	Menor que 10 UFC/g
Patógenos	Ausência	Ausência

**OBSERVAÇÕES**  
Conservar em recipiente bem fechado

**CONCLUSÃO**  
APROVADO  X REPROVADO

*Valéria*  
Analista da microbiologia

*[Assinatura]*  
Chefe da Microbiologia

*Alexandra*  
Analista da Físico Química

*[Assinatura]*  
Chefe da Divisão

*[Assinatura]*  
Coordenador

Referência: POP DIFIQ MP 131