

Alisson Samuel Portes Caldeira

Estudo de degradação forçada, desenvolvimento e validação de método analítico de teor e substâncias relacionadas para avaliação da estabilidade de comprimidos de leflunomida

Rio de Janeiro

2014

Alisson Samuel Portes Caldeira

Estudo de degradação forçada, desenvolvimento e validação de método analítico de teor e substâncias relacionadas para avaliação da estabilidade de comprimidos de leflunomida

Dissertação apresentada, como um dos requisitos para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Gestão, Pesquisa e Desenvolvimento na Indústria Farmacêutica, do Instituto de Tecnologia em Fármacos – FIOCRUZ.

Orientador: Prof. Dr. Leonardo Luccheti Caetano da Silva (FIOCRUZ)

Co-orientadora: Dr^a. Sílvia Ligório Fialho (FUNED)

Rio de Janeiro

2014

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Medicamentos e Fitomedicamentos/ Farmanguinhos / FIOCRUZ - RJ

C145e

Caldeira, Alisson Samuel Portes

Estudo de degradação forçada, desenvolvimento e validação de método analítico de teor e substâncias relacionadas para avaliação da estabilidade de comprimidos de leflunomida / Alisson Samuel Portes Caldeira. – Rio de Janeiro, 2014.

xxviii , 193f. : il. 30 cm.

Orientador: Prof.Dr. Leonardo Luccheti Caetano da Silva
Co-orientadora: Dr^a Sílvia Ligório Fialho (FUNED)

Dissertação (mestrado) – Instituto de Tecnologia em Fármacos – Farmanguinhos, Pós-graduação em Gestão, Pesquisa e Desenvolvimento na Indústria Farmacêutica , 2014.

Bibliografia: f. 185-193

1. Degradação forçada. 2. Estabilidade. 3. Leflunomida. 4. Produtos de degradação.

I. Título.

CDD 615.1

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese/dissertação, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Alisson Samuel Portes Caldeira

Estudo de degradação forçada, desenvolvimento e validação de método analítico de teor e substâncias relacionadas para avaliação da estabilidade de comprimidos de leflunomida

Dissertação apresentada, como um dos requisitos para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Gestão, Pesquisa e Desenvolvimento na Indústria Farmacêutica, do Instituto de Tecnologia em Fármacos – Fundação Oswaldo Cruz.

Aprovado em 17 de fevereiro de 2014.

Banca examinadora:

Prof. Dr. Leonardo Luccheti Caetano da Silva
Instituto de Tecnologia em Fármacos – FIOCRUZ (Presidente da Banca)

Prof^ª. Dr^ª. Erika Martins de Carvalho
Instituto de Tecnologia em Fármacos – FIOCRUZ

Prof. Dr. Helvécio Vinícius Antunes Rocha
Instituto de Tecnologia em Fármacos – FIOCRUZ

Prof. Dr. José Luiz Mazzei da Costa
Instituto de Tecnologia em Fármacos – FIOCRUZ

Rio de Janeiro

2014

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, José Leonardo Caldeira e Edméia Maria Portes Caldeira por sua dedicação, amor e paciência.

AGRADECIMENTOS

A Deus por me amparar nos momentos difíceis e me dar força para superar os obstáculos.

Aos meus orientadores Prof. Dr. Leonardo Luccheti Caetano da Silva e Dr^a. Sílvia Ligório Fialho, por acreditarem em mim, me incentivarem na busca do conhecimento, por serem exemplos de profissional aos quais sem seus auxílios não conseguiria concretizar este trabalho.

À minha família, a qual amo muito, pelo incentivo, paciência e carinho.

À minha irmã Grazielle, que deu suporte na ponte aérea Rio-Belo Horizonte para que eu pudesse assistir às aulas do mestrado.

Aos ex-colegas de trabalho da Fundação Ezequiel Dias, Stela, Yhara, Amélia e Milena que sempre estiveram ao meu lado dando força e apoio.

Aos meus amigos do Laboratório de Desenvolvimento e Validação Analítica de Farmanguinhos, Luciana, Nelson e Fabiana por me receberem bem, me darem apoio nos momentos difíceis e me incentivarem a concluir este trabalho.

A todos os colegas e professores do mestrado profissional de Farmanguinhos pelo convívio e aprendizado.

Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível.

Charles Chaplin

RESUMO

CALDEIRA, Alisson Samuel Portes. Estudo de degradação forçada, desenvolvimento e validação de método analítico de teor e substâncias relacionadas para avaliação da estabilidade de comprimidos de leflunomida. 2014. 193f. Dissertação - Mestrado Profissional em Gestão, Pesquisa e Desenvolvimento na Indústria Farmacêutica – Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2014.

A leflunomida (LF) é um pró-fármaco antireumático pertencente ao grupo de fármacos modificadores do curso da doença, sendo empregada no tratamento da artrite reumatoide. Encontram-se disponíveis no mercado o medicamento referência ARAVA[®] produzido pela empresa Sanofi Aventis e as versões genéricas fabricadas pelas indústrias farmacêuticas Aché, Biosintética, Cristália, Marinha do Brasil e Zodiac. Para registro de um produto farmacêutico no Brasil deve-se seguir as exigências da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, que requer, dentre vários documentos, o estudo de estabilidade do medicamento em questão. Este estudo deve incluir diversos testes, sendo que a determinação do teor do fármaco e suas substâncias relacionadas são fundamentais para se compreender e determinar o prazo de validade de um produto. O objetivo deste trabalho foi desenvolver e validar uma metodologia analítica de teor e substâncias relacionadas que permitisse avaliar a estabilidade dos comprimidos de LF. Foram realizados estudos de degradação forçada no insumo farmacêutico ativo e no protótipo de comprimidos de LF proposto pela Fundação Ezequiel Dias (FUNED), empregando a hidrólise ácida, hidrólise alcalina, oxidação, degradação térmica e fotolítica. As amostras degradadas deram subsídio para o desenvolvimento e validação de um método, por cromatografia a líquido de alta eficiência, para determinação do teor e suas substâncias relacionadas. Uma coluna C18 (125x4,0mm, 5µm, a 25°C), uma fase móvel em eluição gradiente de acetato de amônio 10mM:acetonitrila (0min-70:30; 15min-20:80; 16min-70:30 e 20min-70:30) e um detector no ultravioleta (261nm) foram empregados para se atingir uma resolução adequada na separação da LF e suas substâncias relacionadas. Foram realizados os testes de degradação forçada, sendo que a hidrólise básica gerou apenas um produto de degradação ($r=0,33$), enquanto a ácida proporcionou o surgimento de dois ($r=0,33$ e $0,77$); onze substâncias surgiram após a oxidação ($r=0,16$; $0,21$; $0,41$; $0,48$; $0,58$; $0,64$; $0,67$; $0,73$; $0,78$; $0,82$ e $0,86$). O método em eluição gradiente foi então validado de acordo com as diretrizes da RE n° 899 de 05/2003 da ANVISA e do DOQ-CGCRE-008 do INMETRO. A linearidade, na faixa de 10-60 µg/mL, foi demonstrada utilizando ANOVA ($F_{\text{calculado}} < F_{\text{crítico}}$). Comprovou-se as precisões intra-corrída ($DPR \leq 3,3\%$) e inter-corrída ($DPR \leq 5,0\%$) nas concentrações de 20; 40 e 60 µg/mL aplicando ANOVA. A exatidão variou de 98,30% a 102,36% e a robustez foi satisfatória em todas condições avaliadas. A estabilidade dos comprimidos de LF, nas embalagens blíster de cloreto de polivinilideno e frasco de polietileno, foi então avaliada utilizando o método validado, sendo que em ambas foram quantificados os produtos da hidrólise alcalina ($r=0,33$) e da hidrólise ácida ($r=0,77$). Os resultados do estudo de estabilidade da formulação foram insatisfatórios para a LF devido à queda no seu teor superior a 5% no estudo acelerado e de longa duração em ambas embalagens. Pode-se concluir que o método indicativo de estabilidade foi desenvolvido e validado com sucesso para a quantificação do teor e substâncias relacionadas. Portanto, este método pode ser empregado na indústria farmacêutica tanto para o controle de qualidade quanto para a avaliação dos estudos de estabilidade de comprimidos de LF.

Palavras-chave: Degradação forçada. Estabilidade. Leflunomida. Produtos de degradação.

ABSTRACT

Leflunomide (LF) is a prodrug of the disease-modifying antirheumatic drug (DMARD) used in rheumatoid arthritis. It is commercially available in tablet presentations of 10, 20 and 100 mg. The reference drug ARAVA® manufactured by Sanofi Aventis and generic versions manufactured by pharmaceutical companies as Aché, Biosintética, Cristália, Brazil's Navy and Zodiac are available in the market. For registration of a pharmaceutical product in Brazil it must follow the requirements of Agência Nacional de Vigilância Sanitária, which demands, among many documents, the stability study of the product concerned. This study should include several tests, and the determination of drug content and its related substances are fundamental to determine the shelf life of a product. The aim of this study was to develop and validate an assay and related substances analytical methodology that allow evaluating the stability of LF tablets. Forced degradation studies were performed on active pharmaceutical ingredient and LF tablets prototype proposed by FUNED, employing acid hydrolysis, alkaline hydrolysis, oxidation, photolytic and thermal degradation. The degraded samples allowed the development and validation of a liquid chromatography high efficiency method to determine the drug and its related substances. A C18 column (125x4,0mm, 5µm, at 25°C), a gradient mobile phase of 10 mM ammonium acetate: acetonitrile (0min-70:30; 15min-20:80; 16min-70:30 e 20min-70:30) and an ultraviolet detector (261nm) were used to achieve adequate resolution in the separation of LF and its related substances. Forced degradation tests were performed, which generated only one basic hydrolysis degradation product ($r = 0.33$), while the acidic gave the rise of two ($r = 0.33$ and 0.77); eleven substances arose after oxidation ($r = 0.16, 0.21, 0.41, 0.48, 0.58, 0.64, 0.67, 0.73, 0.78, 0.82$ and 0.86). The gradient method was then validated according to ANVISA RE N° 899 05/2003 and INMETRO DOQ - CGCRE - 008 guidelines. The linearity in the range of 10-60 mg/mL was demonstrated using ANOVA ($F_{\text{calculated}} < F_{\text{critical}}$). Intra-run precision ($RSD \leq 3.3\%$) and inter-run precision ($RSD \leq 5.0\%$) at concentrations of 20, 40 and 60 mg/mL were satisfactory by applying ANOVA. The accuracy ranged from 98.30% to 102.36% and robustness was satisfactory in all conditions evaluated. The stability of LF tablets in polyvinylidene chloride blister and polyethylene vial packaging was then assessed using the validated method. Degradation products were found from alkaline hydrolysis ($r = 0.33$) and acid hydrolysis ($r = 0.77$). The stability results of the formulation were unsatisfactory for LF due to its content drop exceeding 5% in both packages on accelerated and long-term studies. It can be concluded that stability indicating method has been successfully developed and validated for assay and related substances measurement. Therefore, this method can be used for both quality control and stability studies evaluation of LF tablets in the pharmaceutical industry.

Keywords : Degradation products. Forced degradation. Leflunomide. Stability.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Artrite dos dedos das mãos.....	33
Figura 2 - Artrite dos dedos dos pés.....	34
Figura 3 - Estrutura química da LF e de seu metabólito ativo A77 1726.....	36
Figura 4 - Fluxograma para realização dos estudos de degradação hidrolítica em condições ácidas e alcalinas.....	48
Figura 5 - Fluxograma para realização dos estudos de degradação hidrolítica em condições neutras.....	49
Figura 6 - Fluxograma para realização dos estudos de degradação oxidativa.....	51
Figura 7 - Fluxograma para realização dos estudos de degradação fotolítica empregando a radiação visível.....	53
Figura 8 - Fluxograma para realização dos estudos de degradação fotolítica empregando a radiação ultravioleta.....	53
Figura 9 - Cromatograma da matéria-prima de LF após hidrólise ácida com HCl 1 M sob refluxo por 5 horas após análise pelo método por CLAE da USP 34 [Fase móvel composta de água:ACN:trietilamina (65:35:0,5) ajustada para pH 4,0 com ácido fosfórico; fluxo de 1,0 mL/min; coluna C18 (125x4,0) mm, 5 µm a 25°C; volume de injeção de 10 µL; detecção no UV/VIS em 210 nm].....	97
Figura 10 - Cromatograma da matéria-prima de LF após hidrólise básica com NaOH 0,005 M à temperatura ambiente por 25 segundos após análise pelo método por CLAE da USP 34 [Fase móvel composta de água:ACN:trietilamina (65:35:0,5) ajustada para pH 4,0 com ácido fosfórico; fluxo de 1,0 mL/min; coluna C18 (125x4,0) mm, 5 µm a 25°C; volume de injeção de 10 µL; detecção no UV/VIS em 210 nm].....	97
Figura 11 - Cromatograma da matéria-prima de LF após oxidação com H ₂ O ₂ 30% sob refluxo por 15 minutos após análise pelo método por CLAE da USP 34 [Fase móvel composta de água:ACN:trietilamina (65:35:0,5) ajustada para pH 4,0 com ácido fosfórico; fluxo de 1,0 mL/min; coluna C18 (125x4,0) mm, 5 µm a 25°C; volume de injeção de 10 µL; detecção no UV/VIS em 210 nm].....	98

Figura 12 - Cromatograma da matéria-prima de LF após hidrólise ácida com HCl 1 M sob refluxo por 5 horas após análise pelo método por CLAE isocrático A [Fase móvel composta de acetato de amônio 10 mM:ACN (40:60); fluxo de 1,0 mL/min; coluna C18 (125x4,0) mm, 5 µm a 25°C; volume de injeção de 20 µL; detecção no UV/VIS em 261 nm].....	100
Figura 13 - Cromatograma da matéria-prima de LF após hidrólise básica com NaOH 0,005 M à temperatura ambiente por 25 segundos após análise pelo método por CLAE isocrático A [Fase móvel composta de acetato de amônio 10 mM:ACN (40:60); fluxo de 1,0 mL/min; coluna C18 (125x4,0) mm, 5 µm a 25°C; volume de injeção de 20 µL; detecção no UV/VIS em 261 nm].....	100
Figura 14 - Cromatograma da matéria-prima de LF após oxidação com H ₂ O ₂ 30% sob refluxo por 15 minutos após análise pelo método por CLAE isocrático A [Fase móvel composta de acetato de amônio 10 mM:ACN (40:60); fluxo de 1,0 mL/min; coluna C18 (125x4,0) mm, 5 µm a 25°C; volume de injeção de 20 µL; detecção no UV/VIS em 261 nm].....	101
Figura 15 - Cromatograma da matéria-prima de LF após hidrólise ácida com HCl 1 M sob refluxo por 5 horas após análise pelo método por CLAE isocrático B [Fase móvel composta de acetato de amônio 10 mM:ACN (50:50); fluxo de 1,0 mL/min; coluna C18 (125x4,0) mm, 5 µm a 25°C; volume de injeção de 20 µL; detecção no UV/VIS em 261 nm].....	102
Figura 16 - Cromatograma da matéria-prima de LF após hidrólise básica com NaOH 0,005 M à temperatura ambiente por 25 segundos após análise pelo método por CLAE isocrático B [Fase móvel composta de acetato de amônio 10 mM:ACN (50:50); fluxo de 1,0 mL/min; coluna C18 (125x4,0) mm, 5 µm a 25°C; volume de injeção de 20 µL; detecção no UV/VIS em 261 nm].....	103
Figura 17 - Cromatograma da matéria-prima de LF após oxidação com H ₂ O ₂ 30% sob refluxo por 15 minutos após análise pelo método por CLAE isocrático B [Fase móvel composta de acetato de amônio 10 mM:ACN (50:50); fluxo de 1,0 mL/min; coluna C18 (125x4,0) mm, 5 µm a 25°C; volume de injeção de 20 µL; detecção no UV/VIS em 261 nm].....	103
Figura 18 - Cromatograma da matéria-prima de LF após hidrólise ácida com HCl 1 M sob refluxo por 5 horas após análise pelo método por CLAE gradiente A [Fase móvel composta de acetato de amônio 10 mM:ACN (0 min-65:35; 15 min-20:80; 16 min-65:35 e 20 min-65:35); fluxo de 1,0 mL/min; coluna C18 (125x4,0) mm, 5 µm a 25°C; volume de injeção de 20 µL; detecção no UV/VIS em 261 nm].....	105

Figura 19 - Cromatograma da matéria-prima de LF após hidrólise básica com NaOH 0,005 M à temperatura ambiente por 25 segundos após análise pelo método por CLAE gradiente A [Fase móvel composta de acetato de amônio 10 mM:ACN (0 min-65:35; 15 min-20:80; 16 min-65:35 e 20 min-65:35); fluxo de 1,0 mL/min; coluna C18 (125x4,0) mm, 5 µm a 25°C; volume de injeção de 20 µL; detecção no UV/VIS em 261 nm].....	105
Figura 20 - Cromatograma da matéria-prima de LF após oxidação com H ₂ O ₂ 30% sob refluxo por 15 minutos após análise pelo método por CLAE gradiente A [Fase móvel composta de acetato de amônio 10 mM:ACN (0 min-65:35; 15 min-20:80; 16 min-65:35 e 20 min-65:35); fluxo de 1,0 mL/min; coluna C18 (125x4,0) mm, 5 µm a 25°C; volume de injeção de 20 µL; detecção no UV/VIS em 261 nm].....	106
Figura 21 - Cromatograma da matéria-prima de LF após hidrólise ácida com HCl 1 M sob refluxo por 5 horas após análise pelo método por CLAE gradiente B [Fase móvel composta de acetato de amônio 10 mM:ACN (0 min-70:30; 15 min-20:80; 16 min-70:30 e 20 min-70:30); fluxo de 1,0 mL/min; coluna C18 (125x4,0) mm, 5 µm a 25°C; volume de injeção de 20 µL; detecção no UV/VIS em 261 nm].....	107
Figura 22 - Sobreposição com aproximação dos cromatogramas da matéria-prima de LF após hidrólise ácida com HCl 1 M sob refluxo por 5 horas; da solução branco da hidrólise ácida e da solução diluente após análise pelo método por CLAE gradiente B [Fase móvel composta de acetato de amônio 10 mM:ACN (0 min-70:30; 15 min-20:80; 16 min-70:30 e 20 min-70:30); fluxo de 1,0 mL/min; coluna C18 (125x4,0) mm, 5 µm a 25°C; volume de injeção de 20 µL; detecção no UV/VIS em 261 nm].....	108
Figura 23 - Cromatograma da matéria-prima de LF após hidrólise básica com NaOH 0,005 M à temperatura ambiente por 25 segundos após análise pelo método por CLAE gradiente B [Fase móvel composta de acetato de amônio 10 mM:ACN (0 min-70:30; 15 min-20:80; 16 min-70:30 e 20 min-70:30); fluxo de 1,0 mL/min; coluna C18 (125x4,0) mm, 5 µm a 25°C; volume de injeção de 20 µL; detecção no UV/VIS em 261 nm].....	108
Figura 24 - Sobreposição com aproximação dos cromatogramas da matéria-prima de LF após hidrólise básica com NaOH 0,005 M à temperatura ambiente por 25 segundos; da solução branco da hidrólise básica e da solução diluente após análise pelo método por CLAE gradiente B [Fase móvel composta de acetato de amônio 10 mM:ACN (0 min-70:30; 15 min-20:80; 16 min-70:30 e 20 min-70:30); fluxo de 1,0 mL/min; coluna C18 (125x4,0) mm, 5 µm a 25°C; volume de injeção de 20 µL; detecção no UV/VIS em 261 nm].....	109

Figura 25 - Cromatograma da matéria-prima de LF após oxidação com H ₂ O ₂ 30% sob refluxo por 15 minutos após análise pelo método por CLAE gradiente B [Fase móvel composta de acetato de amônio 10 mM:ACN (0 min-70:30; 15 min-20:80; 16 min-70:30 e 20 min-70:30); fluxo de 1,0 mL/min; coluna C18 (125x4,0) mm, 5 µm a 25°C; volume de injeção de 20 µL; detecção no UV/VIS em 261 nm].....	109
Figura 26 - Sobreposição com aproximação dos cromatogramas da matéria-prima de LF após oxidação com H ₂ O ₂ 30% sob refluxo por 15 minutos; da solução branco da oxidação e da solução diluente após análise pelo método por CLAE gradiente B [Fase móvel composta de acetato de amônio 10 mM:ACN (0 min-70:30; 15 min-20:80; 16 min-70:30 e 20 min-70:30); fluxo de 1,0 mL/min; coluna C18 (125x4,0) mm, 5 µm a 25°C; volume de injeção de 20 µL; detecção no UV/VIS em 261 nm].....	110
Figura 27 - Quantificação da LF e produtos de degradação obtidos após a hidrólise ácida com solução de HCl 1 M sob refluxo nos tempos de reação de 0,5; 1; 2; 3 e 5 horas.....	112
Figura 28 - Reação de hidrólise ácida da molécula de LF.....	113
Figura 29 - Curva de degradação relacionando o inverso do teor de LF em função do tempo de reação após hidrólise ácida da matéria-prima de LF.....	114
Figura 30 - Quantificação da LF e produtos de degradação obtidos após a hidrólise básica com solução de NaOH 0,005 M à temperatura ambiente nos tempos de reação de 0; 1; 5; 10; 15 e 30 minutos.....	115
Figura 31 - Reação de hidrólise básica da molécula de LF.....	116
Figura 32 - Curva de degradação relacionando o logaritmo neperiano do teor de LF em função do tempo de reação após hidrólise básica da matéria-prima de LF.....	117
Figura 33 - Quantificação da LF e produtos de degradação 3 a 7 obtidos após a oxidação com solução de peróxido de hidrogênio 30% sob refluxo nos tempos de reação de 5; 15; 30; 60; 120 e 180 minutos.....	119
Figura 34 - Quantificação da LF e produtos de degradação 8 a 13 obtidos após a oxidação com solução de peróxido de hidrogênio 30% sob refluxo nos tempos de reação de 5; 15; 30; 60; 120 e 180 minutos.....	120
Figura 35 - Reação de hidrólise da LF seguida da oxidação do produto intermediário 4-trifluorometilanilina.....	121

Figura 36 - Outras reações oxidativas da LF levando à formação dos derivados hidroperóxido, álcool e aldeído.....	122
Figura 37 - Curva de degradação relacionando o logaritmo neperiano do teor de LF em função do tempo de reação após oxidação da matéria- prima de LF.....	123
Figura 38 - Quantificação da LF e produtos de degradação após a degradação termolítica sob calor seco a 80°C nos tempos de reação de 24, 48, 72, 96 e 120 horas.....	124
Figura 39 - Quantificação da LF e produtos de degradação após a degradação fotolítica nas exposições ao visível de 1200, 2400, 3600, 4800 e 6000 Klux.h.....	125
Figura 40 - Quantificação da LF e produtos de degradação após a degradação fotolítica nas exposições ao ultravioleta de 200, 400, 600, 800 e 1000 W.h/m ²	125
Figura 41 - Quantificação da LF e produtos de degradação após a hidrólise ácida de comprimidos de LF com solução de ácido clorídrico 1 M sob refluxo por 5 horas.....	127
Figura 42 - Quantificação da LF e produtos de degradação após a hidrólise básica de comprimidos de LF com solução de hidróxido de sódio 0,005 M à temperatura ambiente por 25 segundos.....	129
Figura 43 - Quantificação da LF e produtos de degradação após a oxidação de comprimidos de LF com solução de H ₂ O ₂ 30% sob refluxo por 8 minutos.....	131
Figura 44 - Quantificação da LF e produtos de degradação obtidos após a degradação térmica de comprimidos de LF empregando o calor seco a 80°C por 120 horas.....	133
Figura 45 - Quantificação da LF e produtos de degradação obtidos após a degradação fotolítica de comprimidos de LF na forma de granel, frasco de polietileno e blíster de PVDC empregando as doses de 1200 Klux.h de radiação visível e as doses de 200 W.h/m ² de radiação ultravioleta.....	135
Figura 46 - Cromatograma da solução padrão de referência de LF da USP [Fase móvel composta de acetato de amônio 10 mM:ACN (0 min-70:30; 15 min-20:80; 16 min-70:30 e 20 min-70:30); fluxo de 1,0 mL/min; coluna C18 (125x4,0) mm, 5 µm a 25°C; volume de injeção de 20 µL; detecção no UV/VIS em 261 nm].....	138

Figura 47 -	Teste de pureza de pico da solução padrão de referência de LF da USP [Fase móvel composta de acetato de amônio 10 mM:ACN (0 min-70:30; 15 min-20:80; 16 min-70:30 e 20 min-70:30); fluxo de 1,0 mL/min; coluna C18 (125x4,0) mm, 5 µm a 25°C; volume de injeção de 20 µL; detecção no UV/VIS em 261 nm].....	139
Figura 48 -	Cromatograma da solução padrão de trabalho de LF [Fase móvel composta de acetato de amônio 10 mM:ACN (0 min-70:30; 15 min-20:80; 16 min-70:30 e 20 min-70:30); fluxo de 1,0 mL/min; coluna C18 (125x4,0) mm, 5 µm a 25°C; volume de injeção de 20 µL; detecção no UV/VIS em 261 nm].....	140
Figura 49 -	Teste de pureza de pico da solução padrão de trabalho de LF [Fase móvel composta de acetato de amônio 10 mM:ACN (0 min-70:30; 15 min-20:80; 16 min-70:30 e 20 min-70:30); fluxo de 1,0 mL/min; coluna C18 (125x4,0) mm, 5 µm a 25°C; volume de injeção de 20 µL; detecção no UV/VIS em 261 nm].....	141
Figura 50 -	Teste de análise espectral do padrão de trabalho de LF [Fase móvel composta de acetato de amônio 10 mM:ACN (0 min-70:30; 15 min-20:80; 16 min-70:30 e 20 min-70:30); fluxo de 1,0 mL/min; coluna C18 (125x4,0) mm, 5 µm a 25°C; volume de injeção de 20 µL; detecção no UV/VIS em 261 nm].....	141
Figura 51 -	Cromatograma com aproximação da solução do placebo da formulação de comprimidos de LF [Fase móvel composta de acetato de amônio 10 mM:ACN (0 min-70:30; 15 min-20:80; 16 min-70:30 e 20 min-70:30); fluxo de 1,0 mL/min; coluna C18 (125x4,0) mm, 5 µm a 25°C; volume de injeção de 20 µL; detecção no UV/VIS em 261 nm].....	142
Figura 52 -	Cromatograma da solução placebo fortificada com LF a 100% [Fase móvel composta de acetato de amônio 10 mM:ACN (0 min-70:30; 15 min-20:80; 16 min-70:30 e 20 min-70:30); fluxo de 1,0 mL/min; coluna C18 (125x4,0) mm, 5 µm a 25°C; volume de injeção de 20 µL; detecção no UV/VIS em 261 nm].....	143
Figura 53 -	Teste de pureza de pico da solução placebo fortificada com LF a 100% [Fase móvel composta de acetato de amônio 10 mM:ACN (0 min-70:30; 15 min-20:80; 16 min-70:30 e 20 min-70:30); fluxo de 1,0 mL/min; coluna C18 (125x4,0) mm, 5 µm a 25°C; volume de injeção de 20 µL; detecção no UV/VIS em 261 nm].....	144
Figura 54 -	Cromatograma com aproximação da solução diluente [Fase móvel composta de acetato de amônio 10 mM:ACN (0 min-70:30; 15 min-20:80; 16 min-70:30 e 20 min-70:30); fluxo de 1,0 mL/min; coluna C18 (125x4,0) mm, 5 µm a 25°C; volume de injeção de 20 µL; detecção no UV/VIS em 261 nm].....	145

Figura 55 - Cromatograma com aproximação da fase móvel [Fase móvel composta de acetato de amônio 10 mM:ACN (0 min-70:30; 15 min-20:80; 16 min-70:30 e 20 min-70:30); fluxo de 1,0 mL/min; coluna C18 (125x4,0) mm, 5 µm a 25°C; volume de injeção de 20 µL; detecção no UV/VIS em 261 nm].....	146
Figura 56 - Cromatograma do produto da hidrólise ácida de comprimidos de LF [Fase móvel composta de acetato de amônio 10 mM:ACN (0 min-70:30; 15 min-20:80; 16 min-70:30 e 20 min-70:30); fluxo de 1,0 mL/min; coluna C18 (125x4,0) mm, 5 µm a 25°C; volume de injeção de 20 µL; detecção no UV/VIS em 261 nm].....	147
Figura 57 - Teste de pureza de pico do produto de hidrólise ácida de comprimidos de LF [Fase móvel composta de acetato de amônio 10 mM:ACN (0 min-70:30; 15 min-20:80; 16 min-70:30 e 20 min-70:30); fluxo de 1,0 mL/min; coluna C18 (125x4,0) mm, 5 µm a 25°C; volume de injeção de 20 µL; detecção no UV/VIS em 261 nm].....	148
Figura 58 - Cromatograma do produto da hidrólise básica de comprimidos de LF [Fase móvel composta de acetato de amônio 10 mM:ACN (0 min-70:30; 15 min-20:80; 16 min-70:30 e 20 min-70:30); fluxo de 1,0 mL/min; coluna C18 (125x4,0) mm, 5 µm a 25°C; volume de injeção de 20 µL; detecção no UV/VIS em 261 nm].....	149
Figura 59 - Teste de pureza de pico do produto de hidrólise básica de comprimidos de LF [Fase móvel composta de acetato de amônio 10 mM:ACN (0 min-70:30; 15 min-20:80; 16 min-70:30 e 20 min-70:30); fluxo de 1,0 mL/min; coluna C18 (125x4,0) mm, 5 µm a 25°C; volume de injeção de 20 µL; detecção no UV/VIS em 261 nm]..	150
Figura 60 - Cromatograma do produto de oxidação de comprimidos de LF [Fase móvel composta de acetato de amônio 10 mM:ACN (0 min-70:30; 15 min-20:80; 16 min-70:30 e 20 min-70:30); fluxo de 1,0 mL/min; coluna C18 (125x4,0) mm, 5 µm a 25°C; volume de injeção de 20 µL; detecção no UV/VIS em 261 nm].....	151
Figura 61 - Teste de pureza de pico do produto de oxidação de comprimidos de LF [Fase móvel composta de acetato de amônio 10 mM:ACN (0 min-70:30; 15 min-20:80; 16 min-70:30 e 20 min-70:30); fluxo de 1,0 mL/min; coluna C18 (125x4,0) mm, 5 µm a 25°C; volume de injeção de 20 µL; detecção no UV/VIS em 261 nm].....	153
Figura 62 - Cromatograma do produto de degradação térmica de comprimidos de LF [Fase móvel composta de acetato de amônio 10 mM:ACN (0 min-70:30; 15 min-20:80; 16 min-70:30 e 20 min-70:30); fluxo de 1,0 mL/min; coluna C18 (125x4,0) mm, 5 µm a 25°C; volume de injeção de 20 µL; detecção no UV/VIS em 261 nm].....	154

Figura 63 -	Teste de pureza de pico do produto de degradação térmica de comprimidos de LF [Fase móvel composta de acetato de amônio 10 mM:ACN (0 min-70:30; 15 min-20:80; 16 min-70:30 e 20 min-70:30); fluxo de 1,0 mL/min; coluna C18 (125x4,0) mm, 5 µm a 25°C; volume de injeção de 20 µL; detecção no UV/VIS em 261 nm]..	155
Figura 64 -	Cromatograma do produto de degradação fotolítica na radiação visível de comprimidos de LF [Fase móvel composta de acetato de amônio 10 mM:ACN (0 min-70:30; 15 min-20:80; 16 min-70:30 e 20 min-70:30); fluxo de 1,0 mL/min; coluna C18 (125x4,0) mm, 5 µm a 25°C; volume de injeção de 20 µL; detecção no UV/VIS em 261 nm]..	156
Figura 65 -	Teste de pureza de pico do produto de degradação fotolítica na radiação visível de comprimidos de LF [Fase móvel composta de acetato de amônio 10 mM:ACN (0 min-70:30; 15 min-20:80; 16 min-70:30 e 20 min-70:30); fluxo de 1,0 mL/min; coluna C18 (125x4,0) mm, 5 µm a 25°C; volume de injeção de 20 µL; detecção no UV/VIS em 261 nm].....	157
Figura 66 -	Cromatograma do produto de degradação fotolítica na radiação ultravioleta de comprimidos de LF [Fase móvel composta de acetato de amônio 10 mM:ACN (0 min-70:30; 15 min-20:80; 16 min-70:30 e 20 min-70:30); fluxo de 1,0 mL/min; coluna C18 (125x4,0) mm, 5 µm a 25°C; volume de injeção de 20 µL; detecção no UV/VIS em 261 nm].....	158
Figura 67 -	Teste de pureza de pico do produto de degradação fotolítica na radiação ultravioleta de comprimidos de LF [Fase móvel composta de acetato de amônio 10 mM:ACN (0 min-70:30; 15 min-20:80; 16 min-70:30 e 20 min-70:30); fluxo de 1,0 mL/min; coluna C18 (125x4,0) mm, 5 µm a 25°C; volume de injeção de 20 µL; detecção no UV/VIS em 261 nm].....	159
Figura 68 -	Curva de calibração relacionando a concentração de soluções de LF na faixa de 10,00 a 60,00 µg/mL versus a resposta obtida em unidades de área (mAU) na análise cromatográfica.....	162
Figura 69 -	Curva matrizada relacionando a concentração de soluções matrizadas de LF na faixa de 10,00 a 60,00 µg/mL versus a resposta obtida em unidades de área (mAU) na análise cromatográfica.....	165
Figura 70 -	Resultados do estudo de estabilidade acelerada de comprimidos de LF acondicionados em blíster PVDC.....	177
Figura 71 -	Resultados do estudo de estabilidade de longa duração de comprimidos de LF acondicionados em blíster PVDC.....	177

Figura 72 - Resultados do estudo de estabilidade acelerada de comprimidos de LF acondicionados em frasco plástico opaco.....	180
Figura 73 - Resultados do estudo de estabilidade de longa duração de comprimidos de LF acondicionados em frasco plástico opaco.....	181

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Métodos por CLAE em eluição isocrática da USP 34, A e B.....	77
Tabela 2 -	Métodos por CLAE em eluição gradiente A e B.....	77
Tabela 3 -	Esquema de diluições realizadas a partir das soluções-mãe padrão.....	88
Tabela 4 -	Esquema de diluições realizadas a partir da solução-mãe padrão e solução-mãe placebo.....	89
Tabela 5 -	Esquema de preparo das amostras fortificadas a 50, 100 e 150% com LF estoque.....	91
Tabela 6 -	Esquema para execução dos testes de precisão e exatidão.....	92
Tabela 7 -	Combinação de variáveis para realização do teste de <i>Youden Steiner</i>	93
Tabela 8 -	Variáveis e limites superiores e inferiores para avaliação da robustez.....	94
Tabela 9 -	Resultados dos coeficientes de correlação encontrados a partir das equações de cada um dos modelos matemáticos avaliados para a curva de degradação ácida.....	114
Tabela 10 -	Resultados dos coeficientes de correlação encontrados a partir das equações de cada um dos modelos matemáticos avaliados para a curva de degradação básica.....	117
Tabela 11 -	Resultados dos coeficientes de correlação encontrados a partir das equações de cada um dos modelos matemáticos avaliados para a curva de degradação oxidativa.....	122
Tabela 12 -	Resultados dos testes para avaliação das premissas básicas.....	161
Tabela 13 -	Análise de variância (ANOVA) para determinação da significância da regressão e desvio da linearidade.....	163
Tabela 14 -	Resultados dos testes para avaliação das premissas básicas.....	164
Tabela 15 -	Análise de variância (ANOVA) para determinação da significância da regressão e desvio da linearidade da curva matrizada.....	166
Tabela 16 -	Resíduos (e_i) da curva da linearidade.....	167
Tabela 17 -	Resíduos (e_i) da curva matrizada.....	167
Tabela 18 -	Resultados da avaliação da homocedasticidade das variâncias dos resíduos através do teste de F.....	168

Tabela 19 -	Resultados dos testes de efeito matriz de comparação das inclinações e interseções das curvas usual e curva matrizada.....	169
Tabela 20 -	Resultados das recuperações das soluções placebo adicionadas com o fármaco nas concentrações de 20, 40 e 60 µg/mL	170
Tabela 21 -	Resultados dos testes de Ryan-Joiner, F de Levene e ANOVA.....	171
Tabela 22 -	Resultados dos limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) teóricos.....	173
Tabela 23 -	Resultados de recuperação média para as 8 análises do teste de robustez...	174
Tabela 24 -	Impacto de cada uma das 7 variáveis avaliadas no teste de robustez.....	174
Tabela 25 -	Resultados do teste de estabilidade das soluções padrão de referência da USP, padrão de trabalho e placebo fortificado com LF a 100%	175
Tabela 26 -	Avaliação dos resultados após 6 meses de estabilidade acelerada em blíster PVDC considerando os critérios de reporte, identificação e qualificação	178
Tabela 27 -	Avaliação dos resultados após 12 meses de estabilidade de longa duração em blíster PVDC considerando os critérios de reporte, identificação e qualificação	179
Tabela 28 -	Avaliação dos resultados após 6 meses de estabilidade acelerada em frasco plástico opaco considerando os critérios de reporte, identificação e qualificação	181
Tabela 29 -	Avaliação dos resultados após 12 meses de estabilidade de longa duração em frasco plástico opaco considerando os critérios de reporte, identificação e qualificação	182

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN	–	Acetonitrila
AINEs	–	Anti-inflamatórios não esteroidais
ANOVA	–	<i>Analysis of Variance</i>
ANVISA	–	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AR	–	Artrite reumatoide
A77 1726	–	Teriflunomida
CCD	–	Cromatografia em camada delgada
CLAE	–	Cromatografia a líquido de alta eficiência
COX-2	–	Ciclo-oxigenase-2
C8	–	Octilsilano
C18	–	Octadecilsilano
d	–	Estatística de Durbin-Watson calculada
DPR	–	Desvio padrão relativo
d_u	–	Estatística de Durbin-Watson (limite superior)
EDF	–	Estudo de degradação forçada
e_i	–	Resíduos ordenados de uma amostra de tamanho n
EM	–	Espectrometria de massas
F	–	Razão entre variâncias
$F_{\text{calculado}}$	–	Razão entre variâncias calculada
$F_{\text{crítico}}$	–	Razão entre variâncias crítica
FMCD	–	Fármaco modificador do curso da doença
FR	–	Fator reumatóide
FUNED	–	Fundação Ezequiel Dias

ICH	–	<i>The International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use</i>
INMETRO	–	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
IV	–	Infra-vermelho
J_{ei}	–	Resíduo padronizado Jackknife
$J_{crítico}$	–	Resíduo padronizado Jackknife crítico
K	–	Fator de capacidade
LF	–	Leflunomida
MTX	–	Metotrexato
OMS	–	Organização Mundial de Saúde
P.A.	–	Para análise
pH	–	Potencial hidrogeniônico
p_i	–	Resíduos dispostos em ordem crescente
PTFE	–	Politetrafluoretileno
PVDC	–	Poli (cloro de vinilideno)
PVDF	–	Fluoreto de polivinilideno
q_i	–	Pontos percentis de uma distribuição normal reduzida
r	–	Tempo de retenção
$R_{crítico}$	–	Coefficiente de correlação de Ryan-Joiner crítico
RDC	–	Resolução de Diretoria Colegiada
RE	–	Resolução Específica
R_{eq}	–	Coefficiente de correlação de Ryan-Joiner calculado
RMN	–	Ressonância magnética nuclear
S_p^2	–	Variância combinada
t_a	–	Estatística t para contrastes entre inclinações
t_b	–	Estatística t para contrastes entre interseções

$t_{\text{crítico}}$	–	Estatística t de Levene crítica
t_L	–	Estatística t de Levene calculada
UR	–	Umidade relativa
USP	–	United States Pharmacopeia
UV	–	Ultravioleta
VIS	–	Visível
x_i	–	Concentração conhecida do analito
y_i	–	Resposta medida

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO.....	29
1	REVISÃO DA LITERATURA.....	32
1.1	Artrite reumatoide.....	32
1.1.1	<u>Definição, etiologia e epidemiologia da doença.....</u>	32
1.1.2	<u>Diagnóstico.....</u>	33
1.1.3	<u>Tratamento.....</u>	34
1.2	Leflunomida.....	36
1.3	Estudo de estabilidade.....	38
1.3.1	<u>Estudo de estabilidade e a legislação brasileira.....</u>	39
1.3.1.1	Estudo de estabilidade aplicado ao produto LF comprimidos.....	40
1.3.1.2	Teste de teor indicativo de estabilidade.....	41
1.4	Estudos de degradação forçada.....	43
1.4.1	<u>Estudos de degradação forçada e a legislação brasileira.....</u>	44
1.4.2	<u>Descrição dos testes de degradação forçada.....</u>	45
1.4.2.1	Degradação hidrolítica.....	46
1.4.2.2	Degradação oxidativa.....	49
1.4.2.3	Degradação fotolítica.....	51
1.4.2.4	Degradação termolítica.....	53
1.5	Desenvolvimento do método de teor indicativo de estabilidade.....	54
1.5.1	<u>Preparo das amostras degradadas para análise por CLAE.....</u>	55
1.5.2	<u>Desenvolvimento preliminar do método de teor indicativo de estabilidade por CLAE.....</u>	55
1.5.3	<u>Desenvolvimento final e otimização do método de teor indicativo de estabilidade por CLAE.....</u>	57
1.5.4	<u>Identificação e caracterização dos produtos de degradação.....</u>	58
1.6	Validação do método indicativo de estabilidade para análise de teor e substâncias relacionadas em comprimidos de LF por CLAE.....	59
1.6.1	<u>Definições.....</u>	59
1.6.2	<u>Validação intralaboratorial de métodos analíticos.....</u>	59
1.6.3	<u>Parâmetros de desempenho a serem avaliados.....</u>	60
1.6.3.1	Especificidade/seletividade.....	61

1.6.3.2	Teste de efeito matriz.....	62
1.6.3.3	Linearidade.....	62
1.6.3.4	Precisão e exatidão.....	64
1.6.3.5	Limites de detecção e quantificação.....	65
1.6.3.6	Robustez.....	66
2	RELEVÂNCIA DO TRABALHO	67
3	OBJETIVOS	68
3.1	Objetivo geral	68
3.2	Objetivos específicos	68
4	MATERIAL E MÉTODOS	69
4.1	Material	69
4.1.1	<u>Formulações, matérias-primas e padrões</u>	69
4.1.2	<u>Solventes e reagentes</u>	69
4.1.3	<u>Equipamentos</u>	69
4.1.4	<u>Vidrarias</u>	70
4.1.5	<u>Material diverso</u>	71
4.2	Métodos	72
4.2.1	<u>Estudo de cinética de degradação forçada da matéria prima de LF e desenvolvimento de método analítico indicativo de estabilidade por CLAE</u>	72
4.2.1.1	<u>Preparo e degradação das amostras de matéria-prima de LF</u>	72
4.2.1.1.1	Preparo da solução de acetato de amônio.....	72
4.2.1.1.2	Preparo da solução diluente.....	72
4.2.1.1.3	Preparo da amostra padrão de LF.....	73
4.2.1.1.4	Preparo da amostra controle da matéria-prima de LF.....	73
4.2.1.1.5	Teste de hidrólise ácida da matéria-prima de LF.....	73
4.2.1.1.6	Teste de hidrólise básica da matéria-prima de LF.....	74
4.2.1.1.7	Teste de oxidação da matéria-prima de LF.....	74
4.2.1.1.8	Teste de degradação termolítica da matéria-prima de LF.....	75
4.2.1.1.9	Teste de degradação fotolítica da matéria-prima de LF.....	75
4.2.1.1.10	Preparo das soluções branco dos agentes estressantes.....	76
4.2.1.1.11	Preparo da solução diluente e fases móveis para análise.....	76
4.2.1.2	Métodos de análise por CLAE.....	76

4.2.1.2.1	Métodos por CLAE em eluição isocrática.....	77
4.2.1.2.2	Métodos por CLAE em eluição gradiente.....	77
4.2.2	<u>Estudo de degradação forçada de comprimidos de LF utilizando método analítico indicativo de estabilidade por CLAE.....</u>	78
4.2.2.1	Determinação do peso médio e pulverização dos comprimidos de LF.....	78
4.2.2.2	Preparo e degradação das amostras de comprimidos de LF.....	78
4.2.2.2.1	Preparo da amostra padrão de LF.....	78
4.2.2.2.2	Preparo da amostra controle de comprimidos de LF.....	79
4.2.2.2.3	Teste de hidrólise ácida de comprimidos de LF.....	79
4.2.2.2.3.1	Hidrólise ácida da formulação de comprimidos de LF.....	79
4.2.2.2.3.2	Hidrólise ácida do placebo puro da formulação.....	80
4.2.2.2.4	Teste de hidrólise básica de comprimidos de LF.....	80
4.2.2.2.4.1	Hidrólise básica da formulação de comprimidos de LF.....	80
4.2.2.2.4.2	Hidrólise básica do placebo puro da formulação.....	81
4.2.2.2.5	Teste de oxidação de comprimidos de LF.....	81
4.2.2.2.5.1	Oxidação da formulação de comprimidos de LF.....	81
4.2.2.2.5.2	Oxidação do placebo puro da formulação.....	82
4.2.2.2.6	Teste de degradação termolítica de comprimidos de LF.....	82
4.2.2.2.6.1	Degradação termolítica da formulação de comprimidos de LF.....	82
4.2.2.2.6.2	Degradação termolítica do placebo puro da formulação.....	83
4.2.2.2.7	Teste de degradação fotolítica de comprimidos de LF.....	83
4.2.2.2.7.1	Degradação fotolítica da formulação de comprimidos de LF.....	83
4.2.2.2.7.2	Degradação fotolítica do placebo puro da formulação.....	84
4.2.2.2.8	Preparo das soluções branco dos agentes estressantes.....	84
4.2.2.2.9	Preparo da solução diluente e fase móvel para análise.....	84
4.2.2.3	Método de análise por CLAE.....	84
4.2.3	<u>Validação do método analítico indicativo de estabilidade para quantificação do teor e substâncias relacionadas em comprimidos de LF por CLAE.....</u>	85
4.2.3.1	Preparo das amostras.....	85
4.2.3.1.1	Amostras para avaliação da seletividade/especificidade do método.....	85
4.2.3.1.1.1	Preparo das soluções padrão de referência e de trabalho de LF.....	86
4.2.3.1.1.2	Preparo da solução do placebo puro da formulação de comprimidos de LF.....	86

4.2.3.1.1.3	Preparo da solução placebo fortificada a 100% com LF.....	86
4.2.3.1.1.4	Preparo das amostras de hidrólise ácida, hidrólise básica, oxidação, degradação termolítica e degradação fotolítica de comprimidos de LF.....	87
4.2.3.1.1.5	Preparo da solução diluente e fase móvel para análise.....	87
4.2.3.1.2	Amostras para avaliação da linearidade do método.....	87
4.2.3.1.2.1	Preparo das soluções-mãe padrão.....	87
4.2.3.1.2.2	Esquema de diluições realizadas a partir das soluções-mãe padrão.....	88
4.2.3.1.3	Amostras para avaliação do efeito matriz.....	88
4.2.3.1.3.1	Preparo das soluções-mãe padrão.....	88
4.2.3.1.3.2	Preparo da solução-mãe placebo.....	88
4.2.3.1.3.3	Esquema de diluições realizadas a partir da solução-mãe padrão e solução-mãe placebo.....	89
4.2.3.1.4	Amostras para avaliação da exatidão, precisão, limites de detecção e quantificação.....	89
4.2.3.1.4.1	Preparo das amostras brancas.....	90
4.2.3.1.4.2	Preparo das amostras fortificadas a 50, 100 e 150% com LF.....	90
4.2.3.1.4.3	Condução dos ensaios para avaliação da exatidão, precisão, limites de detecção e quantificação.....	92
4.2.3.1.5	Amostras para avaliação da robustez.....	93
4.2.3.1.5.1	Preparo da solução padrão de trabalho e da solução placebo fortificada a 100% com LF.....	94
4.2.3.1.6	Amostras para avaliação da estabilidade das soluções.....	95
4.2.3.2	Método de análise por CLAE.....	95
4.2.4	<u>Avaliação do estudo de estabilidade de comprimidos de LF.....</u>	95
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	96
5.1	Desenvolvimento do método analítico para quantificação do teor e substâncias relacionadas por CLAE a partir da análise das amostras do estudo de cinética de degradação forçada da matéria-prima de LF.....	96
5.1.1	<u>Método por CLAE da USP 34.....</u>	96
5.1.2	<u>Método por CLAE isocrático A.....</u>	99
5.1.3	<u>Método por CLAE isocrático B.....</u>	102
5.1.4	<u>Método por CLAE gradiente A.....</u>	104
5.1.5	<u>Método por CLAE gradiente B.....</u>	107

5.2	Estudo de cinética de degradação forçada da matéria-prima de LF	110
5.2.1	<u>Hidrólise ácida da matéria-prima de LF</u>	111
5.2.2	<u>Hidrólise básica da matéria-prima de LF</u>	115
5.2.3	<u>Oxidação da matéria-prima de LF</u>	118
5.2.4	<u>Degradação termolítica da matéria-prima de LF</u>	123
5.2.5	<u>Degradação fotolítica da matéria-prima de LF</u>	124
5.3	Estudo de degradação forçada de comprimidos de LF	126
5.3.1	<u>Hidrólise ácida de comprimidos de LF</u>	126
5.3.2	<u>Hidrólise básica de comprimidos de LF</u>	128
5.3.3	<u>Oxidação de comprimidos de LF</u>	130
5.3.4	<u>Degradação térmica de comprimidos de LF</u>	132
5.3.5	<u>Degradação fotolítica de comprimidos de LF</u>	134
5.4	Validação do método analítico indicativo de estabilidade para quantificação do teor e substâncias relacionadas em comprimidos de LF por CLAE	137
5.4.1	<u>Avaliação da seletividade do método</u>	137
5.4.1.1	Avaliação da solução padrão de referência.....	138
5.4.1.2	Avaliação da solução padrão de trabalho.....	139
5.4.1.3	Avaliação da solução do placebo da formulação de comprimidos de LF.....	142
5.4.1.4	Avaliação da solução placebo fortificada a 100% com LF.....	143
5.4.1.5	Avaliação da solução diluente e fase móvel.....	145
5.4.1.6	Avaliação do produto de hidrólise ácida de comprimidos de LF.....	146
5.4.1.7	Avaliação do produto de hidrólise básica de comprimidos de LF.....	149
5.4.1.8	Avaliação do produto de oxidação de comprimidos de LF.....	151
5.4.1.9	Avaliação do produto de degradação térmica de comprimidos de LF.....	153
5.4.1.10	Avaliação dos produtos de degradação fotolítica de comprimidos de LF.....	156
5.4.1.10.1	Avaliação do produto de degradação fotolítica na radiação visível de comprimidos de LF.....	156
5.4.1.10.2	Avaliação do produto de degradação fotolítica na radiação ultravioleta de comprimidos de LF.....	158
5.4.1.11	Conclusão da avaliação da seletividade/especificidade do método.....	160
5.4.2	<u>Avaliação da linearidade</u>	160
5.4.2.1	Avaliação das premissas básicas.....	161

5.4.2.2	Teste de linearidade e significância da regressão.....	162
5.4.3	<u>Avaliação do efeito matriz</u>	163
5.4.3.1	Avaliação das premissas básicas da curva matrizada.....	164
5.4.3.2	Avaliação da linearidade da curva matrizada.....	165
5.4.3.3	Avaliação da homocedasticidade dos resíduos das curvas.....	166
5.4.3.4	Teste de efeito matriz.....	169
5.4.4	<u>Avaliação da exatidão e recuperação</u>	169
5.4.4.1	Avaliação das recuperações.....	170
5.4.5	<u>Avaliação da precisão</u>	171
5.4.6	<u>Avaliação dos limites de detecção e quantificação</u>	172
5.4.7	<u>Avaliação da robustez</u>	173
5.4.8	<u>Avaliação da estabilidade das soluções</u>	175
5.4.9	<u>Conclusão da validação do método analítico</u>	176
5.5	Avaliação da estabilidade dos comprimidos de LF	176
5.5.1	<u>Estabilidade do produto na embalagem blíster PVDC</u>	176
5.5.2	<u>Estabilidade do produto na embalagem frasco plástico opaco</u>	180
5.5.3	<u>Conclusão da avaliação da estabilidade</u>	183
6	CONCLUSÃO	184
7	REFERÊNCIAS	185

INTRODUÇÃO

A artrite reumatoide (AR) é uma doença auto-imune de etiologia desconhecida, caracterizada por poliartrite periférica, simétrica, que leva à deformidade e à destruição das articulações em virtude de erosões ósseas e da cartilagem. Afeta mulheres duas a três vezes mais do que homens, sendo que sua prevalência aumenta com a idade (BÉRTOLO et al., 2007).

Com o objetivo de se controlar a progressão da doença e prevenir uma possível incapacidade funcional ou lesão articular irreversível, deve-se realizar um diagnóstico precoce e iniciar imediatamente o tratamento da AR (ALBERS et al., 2001).

Existem atualmente dois tipos de medicamento para o tratamento da AR: fármacos anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) e os fármacos antirreumáticos modificadores do curso da doença (GOLDENBERG, 1999).

Os fármacos modificadores do curso da doença (FMCD) devem ser indicados para todo paciente diagnosticado com AR. Os mais usualmente empregados na terapêutica são: hidroxicloroquina, difosfato de cloroquina, sulfassalazina, metotrexato, azatioprina, ciclosporina e leflunomida (LF) (MADDISON et al., 2005; MONCUR; WILLIAMS, 1995).

A LF insere-se nesse contexto como um fármaco antirreumático da classe dos isoxazóis pertencente ao grupo de fármacos modificadores do curso da doença (SCHATTENKIRCHNER, 2000). No entanto, a LF é raramente detectada no plasma; seu metabólito ativo (A77 1726) é o responsável por toda a atividade *in vivo* (MEHTA; KISALAY; BALACHANDRAN, 2009).

No Brasil, o medicamento referência (ARAVA[®]) produzido pela empresa Sanofi Aventis encontra-se disponível em apresentações de comprimidos revestidos de 10 mg, 20 mg e 100 mg. Versões genéricas encontram-se disponíveis em apresentações de comprimidos de 20 mg fabricados pelas indústrias farmacêuticas Aché, Biosintética, Cristália, Laboratório Farmacêutico da Marinha e Zodiac (BRASIL, 2014).

Para registro de um produto farmacêutico no Brasil deve-se seguir a legislação determinada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), que exige a apresentação de diversos documentos, dentre eles o estudo de estabilidade do medicamento em questão (BRASIL, 2005, 2010).

As diretrizes específicas para a realização do estudo de estabilidade do produto farmacêutico LF comprimidos estão preconizadas pela RE n°1/2005 dentro do escopo das

formas farmacêuticas sólidas armazenadas nas condições ambientais de temperatura (15 a 30°C). Devem ser implementados os estudos de estabilidade acelerada e de longa duração, os quais devem ser realizados em câmaras climáticas, capazes de manter as condições em seu interior dentro dos parâmetros aceitáveis de $\pm 2^\circ\text{C}$ e $\pm 5\%$ de temperatura e umidade relativa, respectivamente (BRASIL, 2005).

Os ensaios preconizados para realização do estudo de estabilidade do produto LF comprimidos são: aparência, teor do princípio ativo, quantificação dos produtos de degradação, limites microbianos, dissolução e dureza (SILVA et al., 2009).

Com o objetivo de se quantificar o teor do princípio ativo e seus produtos de degradação no produto farmacêutico submetido a um programa de estabilidade, a ANVISA exige que sejam desenvolvidas metodologias analíticas de teor indicativas de estabilidade adequadas para esse propósito (BRASIL, 2005).

De acordo com a literatura são encontradas metodologias analíticas para quantificação do metabólito da LF (A77 1726) no plasma por cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE) (SOBHANI et al., 2010) e por cromatografia a líquido acoplada à espectrometria de massas (CLAE-EM) (PAREKH et al., 2010); metodologia para quantificação da LF matéria-prima por CLAE (USP 34); metodologia para quantificação de LF comprimidos por CLAE (YENICELI; DOGRUKOL; TUNCEL, 2006) e metodologia para quantificação de LF e produtos relacionados por espectrofotometria (ABBAS et al., 2006).

Foram encontrados também alguns registros na literatura de metodologias analíticas por CLAE para quantificação da LF e seus produtos de degradação, as quais foram denominadas pelos seus respectivos autores como sendo indicativas de estabilidade. No entanto, essa denominação pode ser questionada visto que foram observados nesses artigos EDFs incompletos (apenas degradação básica) e não controlados (degradação completa do fármaco) (SHOKRY; KAWY; WESHAHY, 2012); EDFs incompletos (apenas fotodegradação) (MIRON; SOLDATTELLI; SCHAPOVAL, 2006) e EDFs com degradações insuficientes em determinadas condições (degradação do fármaco inferior a 10%) (JOSHI et al., 2011; KHER et al., 2011).

O presente trabalho tem como objetivo, assim, desenvolver e validar uma metodologia de teor indicativa de estabilidade, empregando CLAE para quantificar a LF e seus produtos de degradação, através da realização de EDFs completos.

Para que seja desenvolvida essa metodologia, propõe-se a execução dos testes de degradação forçada utilizando o fármaco LF e um protótipo de comprimidos de LF proposto pela Fundação Ezequiel Dias (FUNED). Subsequentemente, após a etapa de desenvolvimento

do método indicativo de estabilidade, propõe-se também nesse trabalho a validação da metodologia indicativa de estabilidade por CLAE utilizando como referência a resolução RE 899/2003 da ANVISA e o guia DOQ-CGRE-008 do Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO).

Em uma última etapa, pretende-se avaliar a estabilidade da formulação de LF comprimidos proposta pela FUNED, com o objetivo de se monitorar e quantificar os principais produtos de degradação formados durante os estudos de estabilidade acelerada e de longa duração.

1 REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Artrite reumatoide

1.1.1 Definição, etiologia e epidemiologia da doença

A artrite reumatoide (AR) é uma doença auto-imune, caracterizada por poliartrite periférica, simétrica, que leva à deformidade e à destruição das articulações em virtude de erosões ósseas e da cartilagem. Geralmente a AR compromete grandes e pequenas articulações estando associada com manifestações sistêmicas como: rigidez matinal, fadiga e perda de peso (BÉRTOLO et al., 2007).

Com a evolução da doença, os pacientes com AR se tornam incapazes de realizar normalmente suas atividades diárias e profissionais, gerando um significativo impacto econômico para o paciente e para a sociedade (BÉRTOLO et al., 2007). Quando a doença compromete outros órgãos tais como pulmões, coração e vasos sanguíneos, a morbidade e gravidade da doença são maiores, podendo diminuir a expectativa de vida em cinco a dez anos (GOOLSBY; NEWSOME, 2002).

A etiologia da AR permanece desconhecida; entretanto, os pesquisadores focam em três pontos de investigação promissores: fatores genéticos, anormalidades autoimunes e infecções microbianas agudas ou crônicas. Acredita-se atualmente que a AR resulta da apresentação de antígenos endógenos ou exógenos em hospedeiros imunogeneticamente susceptíveis. Possíveis antígenos endógenos incluem colágenos, mucopolissacarídeos e fatores reumatóides, enquanto os exógenos são compostos de alguns agentes infecciosos como micoplasmas, micobactérias, espiroquetas e vírus (WORTMANN, 1991).

Estudos epidemiológicos da AR indicam uma prevalência da doença de cerca de 0,5% a 1,0% da população mundial e uma incidência anual bastante variável de 12 a 1200 casos da doença a cada 100000 indivíduos dependendo do sexo, raça/etnia e época do ano (GABRIEL, 2001). Levando em consideração a idade, a incidência da AR se acentua por volta dos 50 anos de vida. Já em relação ao gênero, a incidência da AR é cerca de duas a três vezes maior em mulheres do que em homens. Essa diferença sugere a influência de fatores reprodutivos e hormonais na ocorrência da doença. Além disso, as significativas variações geográficas da

ocorrência da doença e uma maior incidência observada em determinadas raças sugerem a relação da AR com a etnia (ALAMANOS; DROSOS, 2005).

1.1.2 Diagnóstico

O diagnóstico da AR leva em consideração uma série de fatores tais como: sintomas, sinais clínicos, resultados de exames laboratoriais e radiográficos. O Colégio Americano de Reumatologia utiliza esses fatores como critérios de classificação para o diagnóstico da AR, sendo que podem ser definidos como: 1 – Rigidez matinal: rigidez articular durando pelo menos uma hora; 2 – Artrite de três ou mais áreas: pelo menos três áreas articulares com edema de partes moles ou derrame articular, observado pelo médico; 3 – Artrite de articulações das mãos (punho, interfalangeanas proximais e metacarpofalangeanas); 4 – Artrite simétrica; 5 – Nódulo reumatoide; 6 – Presença do fator reumatoide (FR) no sangue; 7 – Alterações radiográficas: erosões ou descalcificações localizadas de mãos e punhos (BÉRTOLO, 2007).

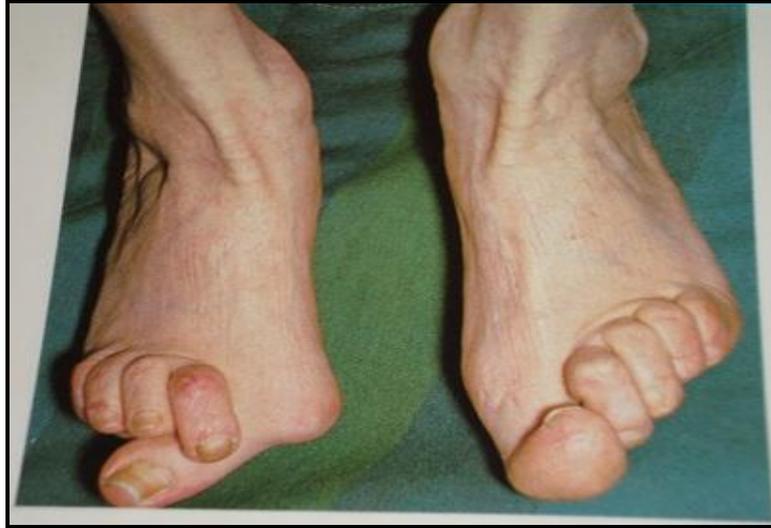
Nas figuras 1 e 2 a seguir, pode-se visualizar as deformações articulares provocadas pela AR nos dedos das mãos e pés respectivamente.

Figura 1 - Artrite dos dedos das mãos



Fonte: (BÉRTOLO, 2007)

Figura 2 - Artrite dos dedos dos pés



Fonte: (BÉRTOLO, 2007)

O diagnóstico da AR necessita que o paciente apresente pelo menos 4 dos 7 critérios descritos anteriormente, sendo que os mesmos devem estar presentes por pelo menos seis semanas. O fato de um paciente possuir apenas dois ou três critérios não exclui a possibilidade de que o mesmo venha desenvolver a doença no futuro (BÉRTOLO, 2007).

1.1.3 Tratamento

Com o objetivo de se controlar a progressão da doença e prevenir uma possível incapacidade funcional ou lesão articular irreversível, deve-se realizar um diagnóstico precoce e iniciar imediatamente o tratamento da AR (ALBERS et al., 2001).

Os principais objetivos do tratamento de um paciente com AR são: prevenir ou controlar a lesão articular, prevenir a perda de função e minimizar a dor, na tentativa de se proporcionar melhor qualidade de vida para esses pacientes. Apesar do objetivo final do tratamento consistir na remissão total da doença, este estágio raramente é alcançado (GOOLSBY; NEWSOME, 2002).

Existem três tipos de tratamentos disponíveis atualmente para o controle e remissão da AR: tratamento cirúrgico, tratamento não medicamentoso e tratamento medicamentoso. Cada um deles será discutido a seguir.

O tratamento cirúrgico está indicado para aqueles pacientes portadores de AR na qual os sintomas não são controlados com o emprego de medidas clínicas e fisioterápicas. Devem ser feitos testes de avaliação da qualidade de vida para se recomendar ou não uma possível intervenção cirúrgica (BÉRTOLO, 2007).

O tratamento não medicamentoso consiste basicamente no acompanhamento desses pacientes do ponto de vista funcional, aplicando orientações e programas terapêuticos dirigidos à proteção articular, à manutenção do estado funcional do aparelho locomotor e do sistema cardiorrespiratório. A fisioterapia e terapia ocupacional contribuem para que o paciente mantenha suas atividades diárias. Atenção especial deve ser dada na proteção articular através do fortalecimento da musculatura periarticular empregando cargas moderadas. O condicionamento físico também é importante, envolvendo exercícios aeróbicos, alongamentos e relaxamento (GOOLSBY; NEWSOME, 2002).

A terapêutica medicamentosa a ser empregada varia de acordo com o estágio da doença, sua evolução e gravidade (ALBERS et al., 2001). Existem atualmente dois tipos de medicamentos para o tratamento da AR: fármacos anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) e os fármacos antirreumáticos modificadores do curso da doença (GOLDENBERG, 1999).

Os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) associados ou não a doses baixas de glicocorticoides (no máximo 15 mg de prednisona) são utilizados no manejo da dor e do processo inflamatório articular, constituindo assim uma importante terapêutica de base (GOTZSCHE; JOHANSEN, 2002).

Os fármacos modificadores do curso da doença (FMCDs) devem ser indicados para todo paciente diagnosticado com AR. Os FMCDs mais usualmente empregados na terapêutica são: hidroxicloroquina, difosfato de cloroquina, sulfassalazina, metotrexato, azatioprina, ciclosporina e LF. De acordo com a relação benefício-toxicidade o metotrexato (MTX) é o fármaco de eleição no tratamento inicial da AR (MADDISON et al., 2005; MONCUR; WILLIAMS, 1995).

O tratamento inicial da AR consiste na utilização de AINEs combinados com um FMCD (MTX como primeira escolha) e, caso necessário, deve-se considerar também o uso de glicocorticoide em baixa dose por via oral, ou infiltração intra-articular. Entretanto, não havendo resposta clínica com as doses máximas de MTX ou na presença de efeitos adversos, recomenda-se a troca ou o uso de combinações de FMCDs. As combinações mais utilizadas são MTX + cloroquina ou sulfassalazina, MTX + LF e MTX + ciclosporina (BÉRTOLO et al., 2007).

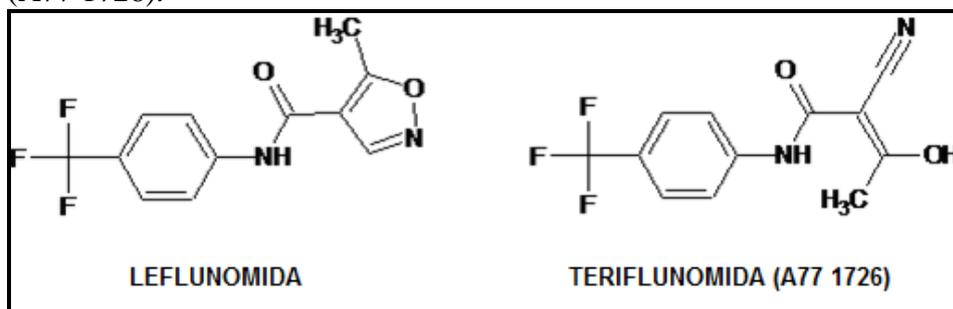
1.2 Leflunomida

A LF insere-se nesse contexto como um fármaco antirreumático da classe dos isoxazóis pertencente ao grupo dos agentes modificadores do curso da doença (SCHATTENKIRCHNER, 2000).

O nome químico da LF é 5-metil-*N*-[4-trifluorometilfenil]-4-isoxazolcarboxamida. A sua fórmula molecular é $C_{12}H_9F_3N_2O_2$, sua massa molar é 270,21 g/mol e o seu valor de pK_a é de 10,8. Além disso a LF obtida a partir da recristalização em tolueno possui um ponto de fusão de 166,5°C e uma solubilidade em água a 25°C de 25 a 27 mg/L. Essa forma cristalina é livremente solúvel em metanol, etanol, acetona, 2-propanol, acetato de etila, acetonitrila e clorofórmio (WILLIAMS, 2006).

A LF é um pró-fármaco e, após a sua administração oral, é convertida no metabólito ativo teriflunomida (A77 1726) após sofrer metabolismo de primeira passagem no intestino delgado, plasma e fígado. A LF é raramente detectada no plasma sendo que é o metabólito ativo A77 1726 o responsável por toda a atividade *in vivo* (MEHTA; KISALAY; BALACHANDRAN, 2009). As estruturas químicas da LF e de seu metabólito ativo encontram-se representadas na figura 3.

Figura 3 - Estrutura química da LF e de seu metabólito ativo teriflunomida (A77 1726).



A ação antiproliferativa do metabólito A77 1726 baseia-se na inibição da enzima mitocondrial di-hidro-ototato desidrogenase, a qual possui um papel fundamental na síntese da pirimidina ribonucleotídeo. Uma vez que um aumento de cerca de oito vezes nos níveis de pirimidina nucleotídeo é necessário para que os linfócitos ativados completem a transição da

fase G1 para a fase S do ciclo celular, a inibição da síntese de pirimidina nucleotídeo impede a expansão clonal dos linfócitos ativados, o que explica a ação do fármaco como um agente imunomodulador no tratamento da AR (FOX et al., 1999).

O metabólito A77 1726 exerce também ação anti-inflamatória ao inibir diretamente a atividade da enzima ciclo-oxigenase 2 (Cox-2), inibindo dessa forma o acúmulo das prostaglandinas (HAMILTON; VOJNOVIC; WARNER, 1999). Outro mecanismo de ação anti-inflamatória do metabólito A77 1726 consiste na redução dos níveis de citocinas inflamatórias produzidas pelas células T ao bloquear a ativação e expressão gênica do fator nuclear kB, o qual consiste em um fator de transcrição fundamental para as células do sistema imune (MANNA; AGGARWAL, 1999).

No que se refere à posologia para o tratamento da AR, a dose de ataque inicial de LF de 100 mg/dia durante 3 dias deve ser administrada por via oral para se atingir rapidamente uma concentração plasmática estável (SCOTT et al., 2001). Esta dose inicial deve ser seguida de uma dose de manutenção de LF de 10 a 20 mg/dia. A duração total do tratamento pode variar de 1 a 2 anos (LI; TAM; TOMLINSON, 2004).

Nos Estados Unidos, o medicamento referência (ARAVA[®]) produzido pela empresa Sanofi Aventis encontra-se disponível em apresentações de comprimidos revestidos de 10 mg, 20 mg e 100 mg. Versões genéricas encontram-se disponíveis em apresentações de comprimidos revestidos de 10 mg e 20 mg fabricados pelas empresas Sandoz, Teva Pharms dentre outras (FDA, 2012).

No Brasil, o medicamento referência (ARAVA[®]) encontra-se disponível em apresentações de comprimidos revestidos de 10 mg, 20 mg e 100 mg. Versões genéricas encontram-se disponíveis em apresentações de comprimidos de 20 mg fabricados pelas indústrias farmacêuticas Aché, Biosintética, Cristália, Marinha do Brasil e Zodiac (BRASIL, 2014).

Para registro de um produto genérico ou similar no Brasil deve-se seguir a legislação determinada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), que exige a apresentação de diversos documentos, dentre eles o estudo de estabilidade do medicamento em questão (BRASIL, 2005).

1.3 Estudo de estabilidade

A estabilidade pode ser definida como o tempo durante o qual o produto farmacêutico ou mesmo a matéria-prima considerada isoladamente mantém, dentro dos limites especificados e durante todo o período de estocagem e uso, as mesmas condições e características que possuía quando da época de sua fabricação. Pode também ser definida como o período de tempo compreendido entre o momento no qual o produto está sendo fabricado e aquele em que sua potência está reduzida a não mais do que 10%, desde que os produtos de degradação estejam todos seguramente identificados e previamente reconhecidos seus efeitos (SILVA et al., 2009).

O propósito do estudo de estabilidade é fornecer evidências sobre como a qualidade de um fármaco ou de um produto farmacêutico pode variar com o tempo em função de uma variedade de fatores ambientais tais como temperatura, umidade e luz, e possibilita também estabelecer as condições de armazenamento, os períodos de reteste e os prazos de validade recomendados (YOSHIOKA; STELLA; NETLIBRARY, 2002).

A definição das condições do estudo de estabilidade é baseada na análise dos efeitos das condições climáticas existentes. As temperaturas médias em qualquer parte do planeta são derivadas dos dados climáticos coletados, e o mundo pode dessa forma ser dividido em quatro zonas climáticas (I-IV). Os países que se encontram nas zonas climáticas I e II são constituídos pelos Estados Unidos, países da União Européia e Japão. Esses países adotam uma temperatura de $(25\pm 2)^{\circ}\text{C}$ combinada com umidade relativa de $(60\pm 5)\%$ ou uma temperatura de $(30\pm 2)^{\circ}\text{C}$ combinada com umidade relativa de $(65\pm 5)\%$ em seus estudos de estabilidade de longa duração [ICH-Q1A(R2), 2003].

As zonas climáticas III (quente e seca) e IV (quente e úmida) englobam aqueles países que não foram cobertos pelo guia do “International Conference of Harmonization” (ICH Q1A-R2), estando o Brasil localizado na zona climática IV. No ano de 2003, o ICH, em conjunto com a Organização Mundial de Saúde (OMS), realizou uma pesquisa entre os países membros das zonas III e IV para harmonizar uma condição de temperatura e umidade com o objetivo de reduzir as inúmeras condições adotadas até então. Como não houve objeção entre os participantes dessa pesquisa foi adotada a condição de temperatura de $(30\pm 2)^{\circ}\text{C}$ combinada com umidade $(65\pm 5)\%$ para os estudos de estabilidade de longa duração dos países pertencentes às zonas climáticas III e IV (ICH-Q1F, 2003).

No entanto, com base em novos cálculos e discussões, alguns países da zona climática IV expressaram seu desejo de incluir uma margem maior de segurança em relação às já preconizadas pelo guia ICH Q1F e, como consequência, vários países e regiões, incluindo o Brasil, revisaram suas próprias legislações de estabilidade e definiram a condição de temperatura de $(30\pm 2)^{\circ}\text{C}$ combinada com umidade $(75\pm 5)\%$ para os seus estudos de estabilidade de longa duração. Devido a esta divergência dos requisitos globais para realização dos estudos de estabilidade, o comitê diretivo do ICH decidiu suprimir o guia ICH Q1F e deixar a definição das condições de armazenamento em zonas climáticas III e IV para os respectivos países membros e a OMS (ICH, 2012).

Em relação aos estudos de estabilidade acelerada conduzidos nos países pertencentes às zonas climáticas I, II, III e IV, todos seguem as mesmas condições de armazenamento empregando uma temperatura de $(40\pm 2)^{\circ}\text{C}$ combinada com umidade relativa de $(75\pm 5)\%$ (SINGH; KUMAR, 2006).

1.3.1 Estudo de estabilidade e a legislação brasileira

No Brasil, para atender aos novos requisitos de condições de estabilidade relativos à zona climática IV, a ANVISA publicou a RE n°1/2005 a qual regulamentou a realização dos testes de estabilidade de produtos farmacêuticos com a finalidade de prever, determinar ou acompanhar seu prazo de validade. A resolução em questão aplicou-se a todas as formas farmacêuticas, sejam elas sólidas, semissólidas, líquidas ou gasosas (BRASIL, 2005).

As indústrias farmacêuticas brasileiras, ao seguirem a RE n°1/2005, conduzem os seus testes de estabilidade através da realização de três tipos de estudos: estudo de estabilidade acelerada, estudo de estabilidade de longa duração e estudo de estabilidade de acompanhamento (SILVA et al., 2009).

O estudo de estabilidade acelerado foi concebido para aumentar a velocidade de degradação química e mudança física de um produto farmacêutico usando condições forçadas de armazenamento. Os dados assim obtidos, em conjunto com aqueles obtidos dos estudos de estabilidade de acompanhamento, podem ser usados para avaliar os efeitos químicos a longo prazo sob condições não aceleradas e para avaliar o impacto a curto prazo do transporte fora das condições ideais de armazenamento (ICH, 2012).

O estudo de estabilidade de longa duração é empregado para verificação das características físicas, químicas, biológicas e microbiológicas de um produto farmacêutico durante e, opcionalmente, depois do prazo de validade esperado, ou seja, os resultados são usados para estabelecer ou confirmar o prazo de validade e recomendar as condições de armazenamento. O estudo de estabilidade de acompanhamento foi projetado para verificar se o produto mantém suas características físicas, químicas, biológicas e microbiológicas conforme os resultados obtidos nos estudos de longa duração (BRASIL, 2005).

1.3.1.1 Estudo de estabilidade aplicado ao produto LF comprimidos

De acordo com a RDC (Resolução de Diretoria Colegiada) n° 17 de 2010, que dispõe sobre as boas práticas de fabricação de medicamentos, deve ser desenvolvido e implementado um programa de estudo de estabilidade para o produto farmacêutico incluindo os seguintes elementos: descrição completa do produto envolvido no estudo e de sua embalagem primária; descrição de todos os parâmetros dos métodos e dos ensaios, que devem incluir os procedimentos dos ensaios de potência, pureza, características físicas, testes microbiológicos (quando aplicável), bem como as evidências documentadas de que os ensaios realizados são indicadores da estabilidade do produto; previsão quanto à inclusão de um número suficiente de lotes; cronograma de ensaio para cada produto; instruções sobre condições especiais de armazenamento; instruções quanto à retenção adequada de amostras; e um resumo de todos os dados obtidos incluindo a avaliação e as conclusões do estudo (BRASIL, 2010).

As diretrizes específicas para a realização do estudo de estabilidade do produto farmacêutico LF comprimidos estão preconizadas pela resolução (RE) n°1/2005 dentro do escopo das formas farmacêuticas sólidas armazenadas nas condições ambientais de temperatura (15 a 30°C). Para formas farmacêuticas sólidas acondicionadas em embalagens semipermeáveis, o estudo de estabilidade acelerado deve ser conduzido nas condições de $(40\pm 2)^{\circ}\text{C}$ e $(75\pm 5)\%$ de temperatura e umidade relativa, respectivamente, por um período de 6 meses, com uma frequência de retirada de amostras nos tempos zero, 3 meses e 6 meses. O estudo de estabilidade de longa duração deve ser conduzido nas condições de $(30\pm 2)^{\circ}\text{C}$ e $(75\pm 5)\%$ de temperatura e umidade relativa, respectivamente, geralmente por um período de, no mínimo, 24 meses com uma frequência de retirada de amostras nos tempos zero, 3, 6, 9, 12, 18 e 24 meses (BRASIL, 2005).

Com o objetivo de se quantificar o teor do princípio ativo e de seus produtos de degradação no produto farmacêutico submetido a um programa de estabilidade, a ANVISA exige que sejam desenvolvidas metodologias analíticas de teor indicativas de estabilidade adequadas para esse propósito (BRASIL, 2005).

1.3.1.2 Teste de teor indicativo de estabilidade

Um método de teor indicativo de estabilidade pode ser definido como um método analítico quantitativo baseado nas propriedades químicas, estruturais e/ou biológicas peculiares a cada princípio ativo de um medicamento e que permite diferenciar cada um deles de seus produtos de degradação de modo que o teor do princípio ativo possa ser determinado com precisão (FDA, 1987).

Complementando a definição anterior, uma metodologia indicativa de estabilidade pode ser entendida como qualquer método analítico quantitativo validado capaz de detectar com o passar do tempo, as alterações das propriedades físicas, químicas ou microbiológicas específicas do princípio ativo e do produto de modo que o teor do princípio ativo, dos produtos de degradação e de outros componentes de interesse possam ser adequadamente determinados sem interferência (FDA, 1998).

De acordo com a literatura são encontrados estudos empregando técnicas titulométricas, espectrofotométricas e cromatográficas para avaliação da estabilidade dos princípios ativos e produtos farmacêuticos (BAKSHI; SINGH, 2002).

Normalmente, o objetivo da utilização das técnicas analíticas titulométricas e espectrofotométricas é analisar o fármaco de interesse na matriz de excipientes, aditivos, produtos de degradação e impurezas. Sua vantagem é o baixo custo e simplicidade de execução. Entretanto, devido à sua limitação quanto à sensibilidade e principalmente especificidade, praticamente não existem relatos do seu uso para análise de estabilidade de produtos. A espectrofotometria derivada de primeira ordem tem sido estudada como uma alternativa para contornar esta limitação quanto à especificidade (FORSYTH; IP, 1994).

A CLAE, utilizando colunas de fase reversa, é a técnica mais empregada para se desenvolver metodologias analíticas indicativas de estabilidade, pois permite a separação de substâncias químicas com uma ampla faixa de polaridade (DOLAN, 2002). Devido à própria exigência no que diz respeito à separação de múltiplos componentes durante as análises de

amostras em estudo de estabilidade, os métodos cromatográficos tornaram-se preferíveis dentre os demais métodos convencionais de análise. Além de terem maior seletividade, os métodos cromatográficos possuem maior precisão, exatidão e sensibilidade tornando possível a detecção de pequenas quantidades de produtos de degradação (BAKSHI; SINGH, 2002).

Por definição, um método indicativo de estabilidade deve ser capaz de determinar os componentes da amostras em uma faixa de concentração de 1000 vezes, ou seja, numa faixa de 100% a 0,10%-0,05% do analito original. Este intervalo se encontra dentro do desempenho confiável dos detectores de ultravioleta (UV). O detector na região do UV continua a ser bastante utilizado para o desenvolvimento dos métodos indicativos de estabilidade. Além disso, existe também a possibilidade do uso dos detectores de UV com arranjo de diodos, que permitem adquirir um espectro no UV para cada componente separado facilitando assim o monitoramento deste, além de permitir também obter informações sobre a pureza espectrofotométrica que, por sua vez, possibilita avaliar a coeluição de dois ou mais componentes no cromatograma registrado (DOLAN, 2002).

Existem ainda as técnicas analíticas hifenadas que combinam o uso da CLAE com a espectrometria de massas (CLAE-EM) ou com a ressonância magnética nuclear (CLAE-RMN) (LOVDAHL; PRIEBE, 2000).

A técnica de CLAE-EM combina a capacidade de resolução e separação da CLAE com a sensibilidade não restrita da espectrometria de massas. A fonte de ionização por *electrospray* fornece um processo de ionização suave e, portanto, a probabilidade de não ocorrerem fragmentações da molécula original é maior. Desta forma a técnica de CLAE-EM provê uma medida da massa molecular das espécies químicas presentes, enquanto a técnica de CLAE-EM-EM (dupla fragmentação) revela a fragmentação estrutural de cada íon molecular resolvido. Desta maneira as técnicas de CLAE-EM e CLAE-EM-EM se constituem em ferramentas analíticas bem estabelecidas para a uma rápida identificação e caracterização de cada componente presente na amostra (FENG et al., 2001).

A espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) fornece uma elucidação a nível molecular dos compostos presentes em uma amostra complexa, incluindo os seguintes tipos de análises: teor, configuracional, pureza e estereoquímica. Com o advento da técnica de CLAE-RMN, que permitiu a análise direta das frações separadas pelo cromatógrafo, os limites de detecção foram reduzidos para menos de um micrograma de material, resolvendo desta forma as limitações quanto à sensibilidade. À medida que a técnica de CLAE-RMN se tornar comercialmente viável, as indústrias farmacêuticas começarão a utilizá-la com maior frequência (PENG, 2000).

Com o objetivo de se desenvolver uma metodologia de teor indicativa de estabilidade, empregando qualquer uma das técnicas cromatográficas mencionadas anteriormente, devem ser executados os testes de degradação forçada, principalmente quando se têm poucas informações disponíveis sobre os potenciais produtos de degradação derivados de um determinado fármaco (REYNOLDS et al., 2002).

1.4 Estudos de degradação forçada

O estudo de degradação forçada (EDF) pode ser definido como uma ferramenta importante para prever problemas de estabilidade, desenvolver metodologias analíticas e para identificar e propor as rotas de degradação de um fármaco (BAERTSCHI; ALSANTE; REED, 2005). De acordo com o guia do ICH Q1A(R2), o EDF de um princípio ativo pode ajudar a identificar os seus prováveis produtos de degradação que, por sua vez, podem contribuir para avaliar a estabilidade intrínseca da molécula, as suas vias de degradação e também ajudam no desenvolvimento de métodos analíticos indicativos de estabilidade (ICH, 2003).

A natureza do EDF utilizado para o fármaco depende de suas características intrínsecas e da forma farmacêutica a ser desenvolvida. Para o medicamento, o planejamento do estudo deve ser baseado nas propriedades do fármaco e dos excipientes utilizados na formulação, assim como nas condições de armazenamento. Neste caso, são utilizadas condições mais severas do que as condições do estudo de estabilidade acelerado, como estratégia para a fase de desenvolvimento da forma farmacêutica (SILVA et al., 2009).

Os guias regulatórios existentes fornecem definições úteis e comentários gerais sobre os EDFs, entretanto não disponibilizam informações importantes sobre a aplicabilidade, tempo de execução e sobre as melhores práticas para execução desses testes. Por exemplo, os guias disponíveis discutem várias questões como estabilidade estereoquímica, limites de identificação para os produtos de degradação, polimorfismo, formas cristalinas, estabilidade de produtos em dose combinada e até mesmo sobre balanço de massas, mas não abordam as questões mais importantes que dizem respeito à execução propriamente dita dos estudos de degradação (REYNOLDS et al., 2002).

Muitas indústrias farmacêuticas desenvolveram seus próprios procedimentos operacionais padrão e diretrizes internas para a execução dos EDFs. Entretanto, não há um

consenso geral sobre quais seriam as condições de degradação adequadas. Este fato foi confirmado através de uma extensa análise comparativa, na qual 20 empresas forneceram informações sobre o projeto do EDF, as condições empregadas e os respectivos procedimentos. Os autores concluíram que as empresas estavam aplicando abordagens bastante diversificadas (KLICK et al., 2005).

1.4.1 Estudos de degradação forçada e a legislação brasileira

No Brasil, a ANVISA, por meio do Informe Técnico nº1, define as diretrizes a serem seguidas durante os EDFs, visto que a identificação e quantificação dos produtos de degradação já eram exigidas no item 2.2.6 da RE nº 560/2002 e no item 2.8 da RE nº 398/2004 – regulamentações específicas sobre estudos de estabilidade, vigentes à época, além dos estudos de fotoestabilidade exigidos no item 2.6 da Resolução RE nº 398/2004, assim como as recomendações para a sua realização no Anexo II da mesma (BRASIL, 2008). Também no item 2.9 do anexo da RE nº 1, de 29/07/2005 - Guia para Realização dos Estudos de Estabilidade, já era preconizada a realização do ensaio de identificação e quantificação de produtos de degradação e método analítico correspondente no estudo de estabilidade, para todos os produtos a serem registrados (BRASIL, 2005).

A resolução RE 899/2003, que trata do Guia de Validação de métodos analíticos, preconiza que “quando a impureza ou padrão do produto de degradação não estiverem disponíveis, pode-se comparar os resultados do teste das amostras contendo impurezas ou produtos de degradação com os resultados de um segundo procedimento bem caracterizado (por exemplo, metodologia farmacopeica ou outro procedimento validado). Estas comparações devem incluir amostras sob condições de estresse (por ex. luz, calor, umidade, hidrólise ácida/básica, oxidação)” (BRASIL, 2003).

Mais recentemente, a ANVISA publicou a resolução RDC nº58 de 20 de dezembro de 2013, na qual esclarece as condições a serem seguidas para realização do EDF em medicamentos, além de estabelecer os parâmetros para notificação, identificação e qualificação dos produtos de degradação (BRASIL, 2013).

As principais diferenças em relação ao informe técnico nº1 são que a resolução RDC nº58 define as seguintes diretrizes para os EDFs: os testes devem ser conduzidos em um lote, em escala laboratorial, piloto ou industrial do medicamento; os estudos devem ser feitos

utilizando o placebo, fármaco isolado e na formulação; define, de uma maneira geral, as condições de estresse a serem utilizadas nos testes de aquecimento, umidade, solução básica, solução ácida, solução oxidante, exposição fotolítica e íons metálicos sem, no entanto, fixar as condições para execução desses testes; exige que seja feita análise crítica do perfil de degradação do fármaco contemplando a análise da pureza cromatográfica, fatores que influenciam na estabilidade do medicamento e avaliação da perda de teor frente às condições de estresse. Dentre as diferenças existentes em relação aos limites de notificação, identificação e qualificação dos produtos de degradação podemos citar: avaliação dos produtos de degradação para todos os lotes em estabilidade; avaliação crítica dos resultados dos ensaios de quantificação dos produtos de degradação frente à redução do teor do fármaco observada durante os estudos de estabilidade; e diretrizes para estabelecimento das especificações dos limites de aceitação dos produtos de degradação existentes para os medicamentos e para os resultados do estudo de estabilidade (BRASIL, 2008, 2013).

A resolução RDC nº58 preconiza que o medicamento deve ser submetido às condições de estresse de hidrólise ácida, básica, oxidação, aquecimento, umidade, fotólise e íons metálicos, sendo que a não utilização de qualquer uma dessas condições deve ser justificada tecnicamente. O objetivo dos testes é promover uma degradação superior a 10% e inferior àquela que levaria à degradação completa da amostra, o que poderia comprometer o estudo. O estresse da amostra deve gerar produtos de degradação em quantidade suficiente para se desenvolver e validar uma metodologia analítica para quantificação do fármaco e dos produtos de degradação (BRASIL, 2013).

1.4.2 Descrição dos testes de degradação forçada

Os testes de degradação forçada para desenvolvimento de metodologias indicativas de estabilidade podem ser encontrados em inúmeros trabalhos disponíveis na literatura. Esses estudos, de uma forma geral, citam o uso da hidrólise em meio neutro, ácido e básico; oxidação; degradação fotolítica; efeito da umidade e degradação térmica como agentes estressantes úteis na geração de produtos de degradação oriundos de diversos fármacos utilizados na terapêutica (BEDSE; KUMAR; SINGH, 2009; RAO et al., 2010; REDDY et al., 2009).

O que se observa a partir dos trabalhos existentes é que não há uma abordagem padronizada para a execução desses estudos. Na ausência de uma orientação padrão, os profissionais enfrentam dificuldades sobre quais condições de estresse devem ser empregadas na realização do EDF de um novo fármaco. Dessa forma, os autores Singh e Bakshi elaboraram um guia para facilitar a execução dos EDFs, no qual propuseram um sistema onde os fármacos são classificados de acordo com o comportamento inerente à sua estabilidade química. Nesse trabalho foram desenhados fluxogramas que facilitam a escolha das condições de estresse a serem empregadas na hidrólise (neutra, ácida e básica), oxidação e fotólise (SINGH; BAKSHI, 2000).

1.4.2.1 Degradação hidrolítica

A degradação do fármaco que envolve a reação com a água é chamada de hidrólise, constituindo-se em um dos mecanismos de reação existentes mais comuns. A hidrólise é afetada pela temperatura, pH, sais, tampão, força iônica, solventes e outros aditivos tais como agentes complexantes, agentes tensoativos e excipientes (STEWART; TUCKER, 1985).

As reações de hidrólise são tipicamente catalisadas por ácidos ou bases que, por conseguinte, devem ser empregados para induzir estas reações hidrolíticas. Essas reações são especialmente importantes quando a molécula a ser testada tiver grupos funcionais que possam existir em diferentes estados de ionização em meio aquoso. Nesses casos, uma abordagem prática é expor a amostra a uma ampla faixa de pH em incrementos definidos. Uma faixa de pH de 1 (HCl 0,1 M) a 13 (NaOH 0,1 M) tem sido amplamente empregada por um grande número de empresas farmacêuticas na maioria de seus testes de hidrólise ácida e básica em meio aquoso. A escolha do pH adequado para a degradação hidrolítica em uma extensão aceitável dependerá da reatividade química de cada molécula de fármaco avaliado (BAERTSCHI; ALSANTE; REED, 2005).

Um problema que é frequentemente encontrado ao se planejar um estudo de degradação hidrolítica consiste na solubilidade do composto. Muitas moléculas pequenas de fármacos não são solúveis nas concentrações utilizadas para avaliação analítica (0,1 a 1 mg/mL) em uma ampla faixa de pH. Então, deve-se usar uma suspensão do fármaco no teste de hidrólise ou deve-se empregar um artifício que consiste na utilização de solventes auxiliares para facilitar a dissolução do fármaco em condições de baixa solubilidade. Os

solventes mais empregados são o metanol e a acetonitrila. No entanto, como o metanol atua como um nucleófilo, podendo participar dos mecanismos de degradação do fármaco, têm-se preferido utilizar a acetonitrila em virtude de ser um solvente menos reativo (ALSANTE; MARTIN; BAERTSCHI, 2003).

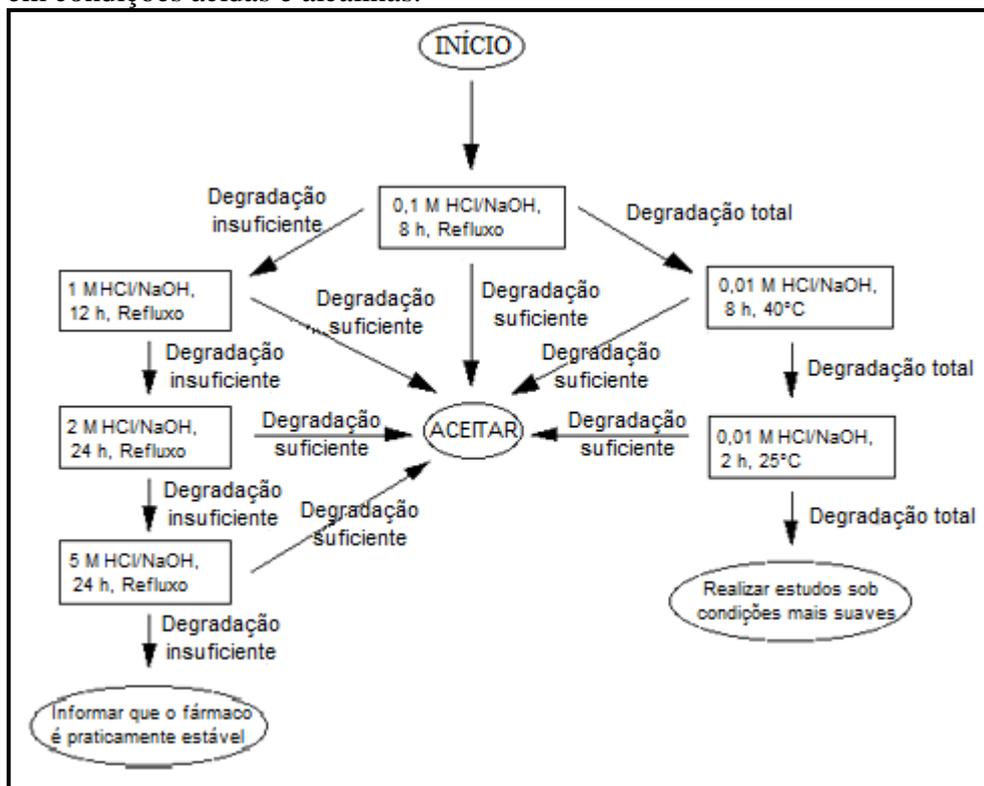
Portanto, pode-se afirmar que os testes de degradação hidrolítica devem compreender a exposição do fármaco a condições ácidas, neutras e básicas no intervalo de pH de 1-13, de preferência em 100% de meio aquoso, exceto quando seja realmente necessário o uso de um solvente para melhorar a solubilidade do fármaco. O uso de temperaturas elevadas até um limite de aproximadamente 70°C é recomendado para acelerar as reações hidrolíticas, sendo que o período máximo de tempo de estresse de 2 semanas é o recomendado (BAERTSCHI; ALSANTE; REED, 2005).

Com a finalidade de facilitar a escolha das condições ideais para se executar as reações de hidrólise, podemos utilizar as árvores de decisão que se encontram nas figuras 2 e 3 (páginas 45 e 46 respectivamente). De acordo com o esquema da figura 2, para se estudar a degradação hidrolítica (sob condições básicas e ácidas) de um novo fármaco cuja estabilidade é desconhecida, pode-se começar utilizando um refluxo do fármaco em HCl ou NaOH 0,1 M por um período de 8 horas. Caso seja observada uma degradação satisfatória (de 10 a 30%) nessas condições, não há necessidade de se executar nenhum estudo adicional.

No entanto, se a degradação for insuficiente, deve-se realizar o refluxo em HCl ou NaOH 1 M por 12 horas (SINGH; BAKSHI, 2000). Caso o fármaco ainda possa suportar condições mais drásticas deve-se tentar um refluxo com HCl ou NaOH 2 M por 24 horas. Se após o monitoramento ainda não houver degradação satisfatória pode-se usar condições ainda mais severas como o refluxo em HCl ou NaOH 5 M por 24 horas. Caso não haja degradação satisfatória do fármaco (10% a 30%) mesmo nessas condições, ele pode ser declarado como praticamente estável.

Seguindo pelo outro lado da árvore de decisão, caso haja uma total degradação nas condições iniciais de refluxo em HCl ou NaOH 0,1 M por 8 horas, a força do ácido ou da base pode ser reduzida para 0,01 M, juntamente com uma diminuição de temperatura para 40°C, mantendo o tempo de 8 horas. Se o fármaco exibir degradação completa mesmo nessas condições suaves deverá ser tratado com HCl ou NaOH 0,01 M a 25°C durante duas horas. Se a degradação completa ainda estiver ocorrendo trata-se de um fármaco extremamente lábil, e deve ser testado sob condições muito suaves de temperatura e pH (SINGH; BAKSHI, 2000).

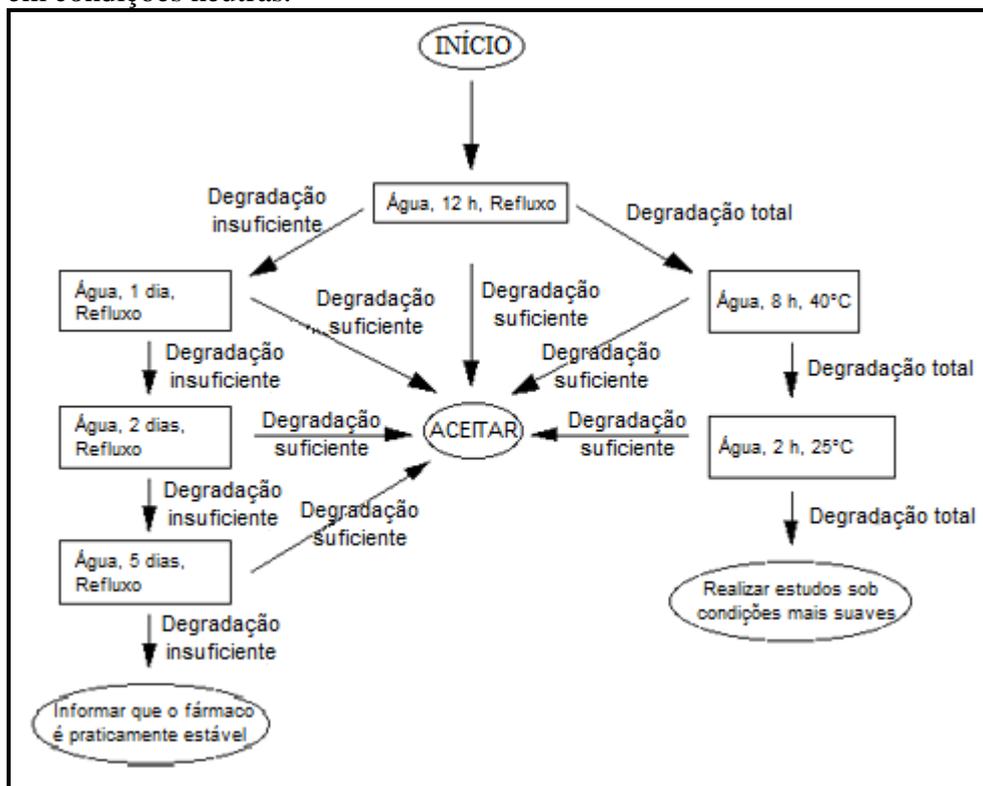
Figura 4 - Fluxograma para realização dos estudos de degradação hidrolítica em condições ácidas e alcalinas.



Fonte: (Singh e Bakshi, 2000 – adaptado).

O estudo de degradação hidrolítica sob condições neutras, de acordo com o esquema da figura 3, pode ser iniciado realizando refluxo do fármaco em água por 12 horas. Caso não haja degradação do composto o tempo de refluxo pode ser dobrado. Se ainda não for observada degradação suficiente (10% a 30%) o tempo de refluxo deve ser alterado para 2 ou 5 dias, conforme a necessidade. Se o fármaco ainda demonstrar ser estável, pode-se considerá-lo não degradável em condições neutras. Caso haja uma completa degradação do fármaco nas condições iniciais de refluxo em água por 12 horas, tanto a temperatura quanto o tempo de exposição devem ser reduzidos para 40°C e 8 horas respectivamente. Condições mais suaves, como manter o fármaco em meio aquoso por até duas horas a uma temperatura de 25°C, devem ser testadas se ainda houver degradação total do composto (SINGH; BAKSHI, 2000).

Figura 5 - Fluxograma para realização dos estudos de degradação hidrolítica em condições neutras.



Fonte: (Singh e Bakshi, 2000 – adaptado).

1.4.2.2 Degradação oxidativa

A oxidação também é considerada um dos mecanismos de degradação existentes mais comuns. As reações de oxidação dos fármacos são conhecidas como auto-oxidações sendo iniciadas via radicalar. Essas reações começam com uma fase de iniciação que envolve a formação de radicais (passo limitante da velocidade da reação), seguida por uma fase de propagação e, por fim, uma fase de terminação. Portanto, a cinética de reação irá seguir na maioria das vezes uma curva de forma tipo “S”, quando se plota a degradação da molécula em função do tempo, ao invés de seguir uma cinética de pseudo-primeira ordem, a qual fornece uma relação linear quando se plota o logaritmo neperiano da degradação da molécula em função do tempo (RUBINO; SWARBRICK; BOYLAN, 1988a).

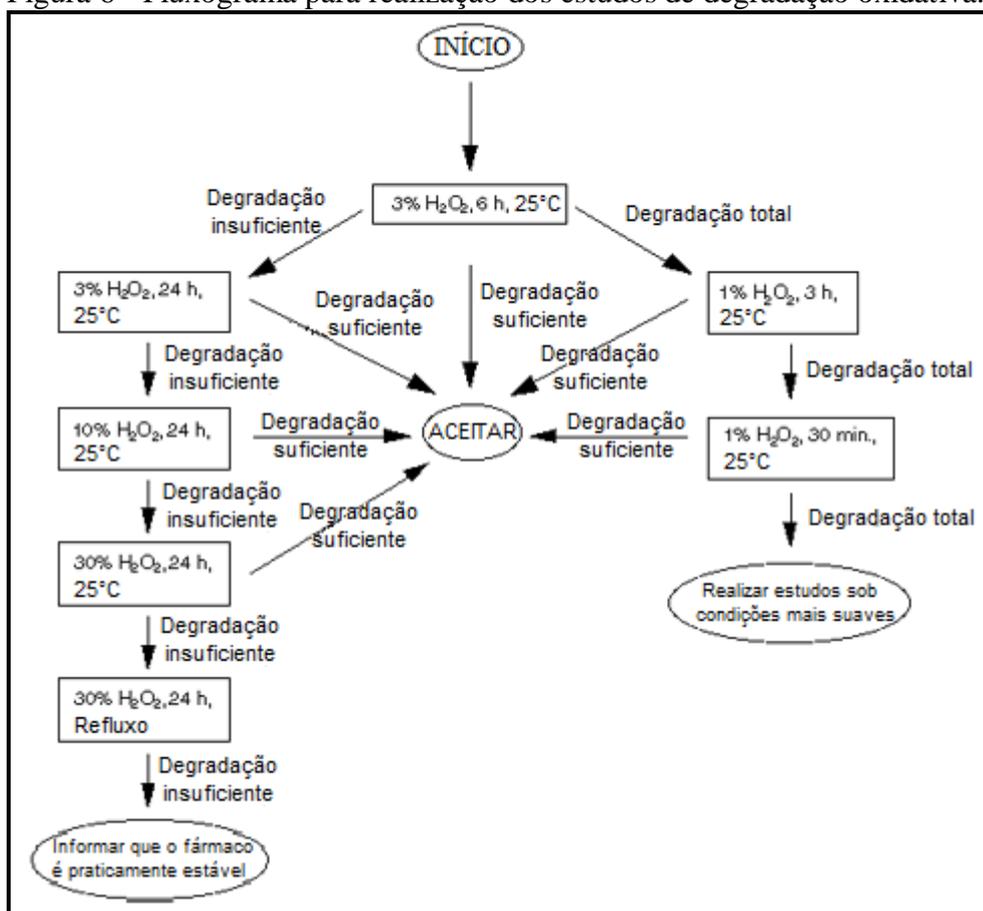
A degradação oxidativa precisa ser bem controlada devido à natureza das reações químicas, pois os intermediários da oxidação são, com frequência, termicamente instáveis e podem se decompor através de vias alternativas em temperaturas elevadas (BOCCARDI,

1994). O aumento da temperatura pode, portanto, conduzir a mudanças não previsíveis nas taxas de degradação, levando a taxas e vias de degradação diferentes daquelas observadas em temperaturas mais baixas. Em solução, as taxas e vias de oxidação podem ser dependentes da concentração de oxigênio dissolvida e em, temperaturas elevadas, a velocidade das reações pode ser reduzida devido à diminuição da quantidade de oxigênio dissolvida no solvente. Em vez disso, a degradação oxidativa de um fármaco pode ser avaliada em solução utilizando um radical iniciador como o azobisisobutironitrila a uma temperatura de 40°C por um período de até uma semana ou exposição ao peróxido de hidrogênio como uma solução de peróxido de hidrogênio a 0,3% v/v por até uma semana, à temperatura ambiente e no escuro. O uso de temperaturas mais elevadas com peróxido de hidrogênio deve ser feito com cautela porque a ligação O-O é fraca e pode ser clivada e levar à formação de radicais hidroxila, que são agentes oxidantes mais severos. O uso de metais de transição como cobre (II) e ferro (III) por um período de 1-3 dias também é recomendado para avaliar a suscetibilidade à oxidação (BAERTSCHI; ALSANTE; REED, 2005).

A escolha das condições satisfatórias para avaliação da degradação oxidativa pode ser feita através da utilização da árvore de decisão descrita na figura 4 (página 48). O teste pode ser iniciado mantendo o fármaco em uma solução de H₂O₂ a 3% v/v por um período de 6 horas à temperatura ambiente. Caso não haja uma degradação suficiente (10% a 30%), o período de reação deve ser aumentado para até 24 horas. Caso ainda não haja degradação suficiente, a reação deve ser conduzida em uma solução de H₂O₂ a 10% v/v por 24 horas. No caso dos fármacos, que mesmo nessas condições não se oxidam adequadamente, condições mais severas devem ser usadas, utilizando solução de H₂O₂ a 30% v/v por até 24 horas, à temperatura ambiente ou utilizando refluxo a temperaturas maiores (Singh; Bakshi, 2000). Caso não haja degradação adequada nessas condições (10% a 30%) o fármaco pode ser considerado praticamente estável.

No entanto, caso o fármaco seja totalmente degradado nas condições iniciais, a concentração da solução de H₂O₂ deve ser diminuída de 3% v/v para 1% v/v e o tempo de reação deve ser monitorado para garantir uma porcentagem de degradação desejada. Se mesmo nessas condições houver total degradação do composto, devem ser testados agentes oxidantes ainda mais diluídos e por um curto período de exposição (SINGH; BAKSHI, 2000).

Figura 6 - Fluxograma para realização dos estudos de degradação oxidativa.



Fonte: (Singh e Bakshi, 2000 – adaptado).

1.4.2.3 Degradação fotolítica

A degradação fotolítica é aquela que resulta da exposição à luz ultravioleta ou visível na gama de comprimento de onda compreendida entre 300 e 800 nm. A exposição à radiação nos comprimentos de onda inferiores a 300 nm não é necessária porque um composto farmacêutico não sofreria tal exposição durante seu ciclo de vida. A primeira lei da fotoquímica afirma que “apenas a radiação que é absorvida por uma molécula pode efetivamente produzir mudanças químicas na molécula” (ANDERSON; BYARD, 2004). Isso significa que as taxas de fotodegradação são diretamente dependentes da quantidade de radiação incidente e da quantidade de radiação que é absorvida pelo fármaco ou pela formulação. É importante frisar que um composto pode sofrer fotodegradação, mesmo que não absorva por si só a radiação UV ou na região do visível. Isso pode acontecer se existir

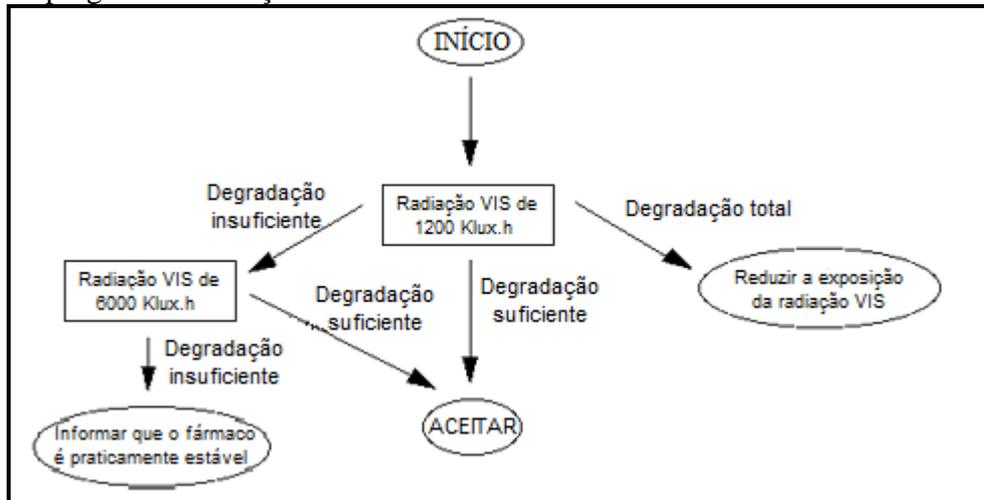
algum agente adicional na formulação que acidentalmente facilite essa absorção (BAERTSCHI; ALSANTE, REED, 2005).

O guia de fotoestabilidade do ICH (Q1B) dá duas opções para a seleção da fonte de irradiação. A primeira opção pode ser alcançada pelo uso de uma lâmpada fluorescente que combina as emissões visível e ultravioleta, ou através do uso de uma lâmpada de xenônio ou de halogênio metálico. Essas fontes de radiação são combinadas com um filtro de vidro que elimina a radiação com comprimentos de onda abaixo de 320 nm. A segunda opção é obtida através do uso de lâmpadas de maneira separada, ou seja, empregando lâmpadas fluorescentes que emitem luz branca fria e lâmpadas que emitem na região do ultravioleta (RUBINO; SWARBRICK; BOYLAN, 1988b).

De acordo com o guia de fotoestabilidade do ICH (Q1B) existem dois tipos de estudos: testes confirmatórios e estudos de degradação forçada. Os testes confirmatórios são aqueles realizados sob condições padronizadas com o objetivo de fornecer as informações necessárias para a manipulação, embalagem e rotulagem. Nesses testes o mínimo de exposição recomendada pelo guia é de 1200 Klux.h (visível) e 200 W.h/m² (ultravioleta). Já os estudos de degradação forçada são realizados para avaliar a fotossensibilidade global do material com o propósito de se desenvolver uma metodologia analítica e para elucidar as vias de degradação do fármaco. Este teste pode consistir na radiação do fármaco sozinho, ou na forma de soluções/suspensões para se validar os procedimentos analíticos, sendo que os recipientes contendo as amostras devem ser inertes e transparentes (ICH, 1996). Nesses estudos de degradação forçada não existe uma exposição mínima de radiação padronizada, mas devido a uma publicação de um dos membros do grupo de trabalho do guia ICH Q1B recomenda-se a utilização de uma exposição de 3 a 5 vezes a radiação mínima utilizada nos testes confirmatórios (ANDERSON; BYARD, 2004).

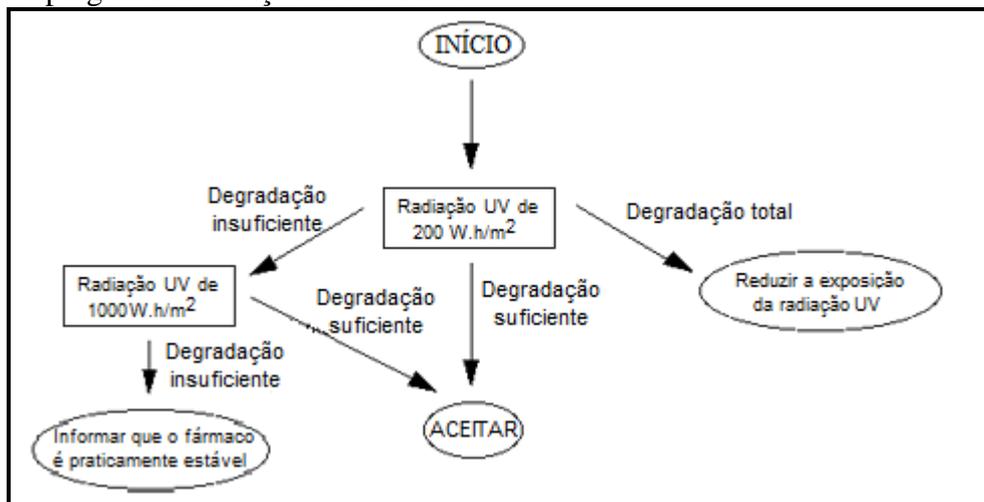
Com o objetivo de se definir as condições adequadas para o estudo de degradação fotolítica, deve-se utilizar os passos descritos nas figuras 5 e 6 (página 50). Inicialmente, deve-se submeter o fármaco a uma dose de radiação visível de 1200 Klux.h e de radiação ultravioleta de 200 W.h/m², que são as radiações mínimas preconizadas pelo guia do ICH para os estudos confirmatórios. Este estudo inicial é empregado para se ter uma ideia da extensão da degradação fotolítica. Caso não haja uma degradação significativa (10% a 30%), pode-se aumentar em até 5 vezes a dose de radiação, ou seja, pode-se submeter o fármaco a uma dose de radiação visível de 6000 Klux.h e de radiação ultravioleta de 1000 W.h/m². Caso mesmo assim não haja uma degradação considerada satisfatória (10% a 30%) o fármaco pode ser considerado fotoestável (SINGH; BAKSHI, 2000).

Figura 7 - Fluxograma para realização dos estudos de degradação fotolítica empregando a radiação visível.



Fonte: (Singh e Bakshi, 2000 – adaptado).

Figura 8 - Fluxograma para realização dos estudos de degradação fotolítica empregando a radiação ultravioleta.



Fonte: (Singh e Bakshi, 2000 – adaptado).

1.4.2.4 Degradação termolítica

A degradação termolítica pode ser definida como a degradação causada por exposição a temperaturas elevadas o suficiente para induzir a ruptura de ligações químicas, isto é, pirólise. Para efeitos de simplificação, no contexto de degradação do fármaco, pode-se usar o termo termólise para descrever as reações que são movidas pelo calor ou temperatura. Desta

forma, qualquer mecanismo de degradação que possa ser acelerado em função do aumento da temperatura pode ser considerado como uma via termolítica. Como exemplo dessas vias termolíticas podemos citar: hidrólise/desidratação, isomerização/epimerização, descarboxilação, rearranjos e alguns tipos de reações de polimerização (BAERTSCHI; ALSANTE; REED, 2005).

A expressão mais utilizada para avaliar a relação entre a velocidade das reações químicas e a temperatura para uma dada ordem de reação é a equação de Arrhenius (GRIMM; KRUMMEN, 1993). Caso a degradação do fármaco obedeça a equação de Arrhenius ($K=A^{(E_a/RT)}$, onde “K” é a constante de velocidade, “A” é o fator de frequência, “R” é a constante universal dos gases e “T” a temperatura em Kelvin) é possível estimar o efeito da temperatura sobre a velocidade de degradação de um composto, conhecendo-se a energia de ativação (E_a) para a substância (JERUSSI, 1999).

O guia de estabilidade do ICH sugere que o EDF deve incluir o efeito da temperatura em incrementos de 10°C acima das condições de temperatura preconizadas para o estudo de estabilidade acelerada, ou seja, deve-se empregar temperaturas tais como 60°C, 70°C e assim por diante até que seja obtida uma degradação satisfatória de 10% a 30% (ICH, 2003).

Com base na avaliação da literatura e das considerações sobre a cinética de reação, em conjunto com a experiência na execução dos testes de degradação forçada nos últimos 15 anos, temperaturas de até 70°C (em altas e baixas umidades) podem proporcionar uma avaliação rápida e razoavelmente previsível das vias de degradação e estabilidades relativas da maioria dos fármacos no estado sólido. Geralmente é recomendado um período de 1 a 2 meses sob essas condições de degradação (BAERTSCHI; ALSANTE; REED, 2005).

1.5 Desenvolvimento do método de teor indicativo de estabilidade

Com o objetivo de desenvolver o método de teor indicativo de estabilidade, amostras obtidas dos estudos de degradação forçada devem ser adequadamente analisadas. Nesse contexto, um aspecto prático que gera bastante dúvida entre os analistas consiste nas melhores práticas a serem adotadas para preparar essas amostras contendo altas concentrações de ácidos, bases ou agentes oxidantes antes de injetá-las no cromatógrafo ou se desenvolver uma corrida de cromatografia em camada delgada (CCD) (SINGH; BAKSHI, 2000).

1.5.1 Preparo das amostras degradadas para análise por CLAE

Após os testes de degradação forçada empregando os agentes estressantes, as amostras contendo o fármaco devem ser adequadamente diluídas ou neutralizadas antes de serem injetadas no sistema cromatográfico. A diluição das amostras é indicada aos testes de degradação oxidativa, enquanto a neutralização das amostras é recomendada aos testes de degradação ácida e básica (BAKSHI; SINGH, 2002).

Se for empregado o método de diluição, pode-se utilizar nas análises por CLAE a diluição empregando a própria fase móvel, enquanto nas análises por CCD deve-se utilizar na diluição um solvente adequado como metanol ou etanol. Deve-se tomar o cuidado para que no processo de diluição (geralmente de até 100 vezes ou mais) a concentração das substâncias de interesse caia dentro da faixa detectável dos métodos. Caso seja empregado o método de neutralização, deve-se utilizar soluções ácidas ou alcalinas que permitam a neutralização até um valor de pH próximo da neutralidade. Os inconvenientes em relação à neutralização são que, além de ser mais difícil de executá-la em ensaios quantitativos, ela pode levar à precipitação dos ingredientes dissolvidos na amostra. Apesar dos problemas, do ponto de vista químico a neutralização é mais efetiva pois interrompe imediatamente o processo de degradação química pelo agente estressante (SINGH; BAKSHI, 2000).

1.5.2 Desenvolvimento preliminar do método de teor indicativo de estabilidade por CLAE

O primeiro passo para se desenvolver um método analítico indicativo de estabilidade é caracterizar o tipo de amostra em estudo. Como se trata de amostras contendo o fármaco e uma gama de produtos de degradação, elas podem ser classificadas como amostras contendo compostos ácidos, básicos ou sais orgânicos de composição inicialmente desconhecida. Em virtude da composição da amostra, pode-se utilizar, como ponto de partida no desenvolvimento do método, as seguintes condições cromatográficas iniciais: coluna cromatográfica C8 ou C18, de comprimento 150 mm ou 250 mm e tamanho de partícula 5 µm; fase móvel constituída por uma mistura de água-acetonitrila; fluxo da fase móvel em torno de 1 a 2 ml/min; temperatura da coluna de 35°C a 40°C; e volume de injeção de 20 a 50 µL (BAKSHI; SINGH, 2002).

A utilização de tampões na fase móvel nesse estágio inicial não é recomendada, visto que muitos analistas necessitam estender a metodologia para estudos de CLAE-EM. Caso haja algum problema na separação cromatográfica ou na simetria dos picos, pode-se utilizar fases móveis com pH controlado através do uso de tampões apropriados para CLAE-EM como acetato ou formato de amônio (MENDHAM, 2006).

A corrida inicial para tentar encontrar condições seletivas na análise cromatográfica pode ser realizada utilizando uma eluição isocrática ou em gradiente. A separação utilizando gradiente é geralmente recomendada na fase inicial; entretanto, corridas isocráticas também são aceitáveis. O gradiente inicial deve ser realizado com uma composição de 5% a 100% de acetonitrila (ACN) em um tempo de corrida de 60 minutos. Esse gradiente servirá de base para determinar se a corrida poderá ser feita no modo isocrático ou não. Após a corrida, deve-se avaliar então se os tempos de retenção estão adequados para todos os picos que foram eluídos no cromatograma. Isso significa que todos os picos do cromatograma devem possuir um fator de capacidade k maior que 0,5 e menor que 20 ($0,5 < k < 20$). Caso o valor de k exceda esses limites, deve-se tentar adiantar ou retardar o tempo de retenção dos picos através da utilização de um reagente de par iônico ou através da modificação do pH da fase móvel. Se mesmo assim o valor de k não estiver dentro da faixa aceitável, então a eluição isocrática não será possível e mais corridas deverão ser realizadas para se definir a melhor condição para eluição em gradiente (SNYDER; KIRKLAND; GLAJCH, 1997).

Caso se opte por realizar a corrida exploratória inicial em modo isocrático, deve-se realizar uma corrida utilizando uma mistura de água com modificador orgânico na proporção fixa de 50:50. Caso essa proporção não seja adequada deve-se modificá-la de maneira a se obter um fator de capacidade k para o fármaco na faixa de 4 a 10. Como os produtos de degradação são geralmente de natureza polar, ao retardar o pico do fármaco no cromatograma em uma coluna de 250 milímetros de comprimento por exemplo, de forma que ele tenha um tempo de retenção próximo a 15 minutos, pode-se facilitar a separação dos produtos de degradação formados. O tempo de retenção pode ser adiantado ou retardado ao se alterar a proporção do modificador orgânico na fase móvel. No entanto, deve-se tomar o cuidado para não retardar demasiadamente o tempo de retenção do fármaco, visto que isso implica em alta contribuição da difusão do fármaco levando ao achatamento dos sinais resultando em diminuição da sensibilidade e da simetria dos mesmos (HONG; SHAH, 2000).

Normalmente o tempo total da corrida deve ser duas vezes e meia maior que o tempo de retenção do pico do fármaco, pelo menos nos estudos iniciais, para que qualquer pico que elua com tempo de retenção maior que o fármaco possa ser identificado. O comprimento de

onda de detecção pode ser ajustado de acordo com os espectros obtidos das amostras degradadas. O volume de injeção e o fluxo da fase móvel devem ser ajustados de acordo com o comprimento da coluna (SNYDER; KIRKLAND; GLAJCH, 1997).

Após serem definidas as condições cromatográficas iniciais, as amostras precisam ser analisadas em função do tempo de degradação sob todas as condições de estresse. Após comparação dessas amostras estressadas com as respectivas soluções branco injetadas nas mesmas condições, deve-se monitorar quantitativamente a diminuição do pico do fármaco e o aumento dos respectivos produtos de degradação. No entanto, caso não haja correspondência entre a degradação do fármaco e o aparecimento dos produtos de degradação, dois motivos podem ser colocados em questão: a absorvidade do fármaco e dos seus produtos de degradação podem ser diferentes e/ou o fármaco pode originar produtos de degradação não cromofóricos, ou seja, que não absorvem na região do ultravioleta ou do visível. Nesses casos deve-se utilizar a detecção em múltiplos comprimentos de onda ou outras técnicas analíticas tais como CLAE-EM, CLAE-RMN ou CLAE-IV (BAKSHI; SINGH, 2002).

1.5.3 Desenvolvimento final e otimização do método de teor indicativo de estabilidade por CLAE

Após os estudos cromatográficos preliminares, os tempos de retenção e respectivos tempos de retenção relativos de todos os produtos de degradação formados devem ser tabulados para cada condição de degradação empregada. Em seguida, pode-se comparar, para todas as condições de degradação, os tempos de retenção relativos dos produtos de degradação obtidos, sendo que atenção especial deve ser dada nesse momento para aqueles que possuem um valor muito próximo. Nessa etapa devem ser utilizados os espectros de arranjo de diodos ou espectros de massa desses componentes para se avaliar criticamente se os produtos obtidos são os mesmos ou diferentes. Caso se confirme que esses produtos de degradação são diferentes mas estão coeluinto, devem ser feitas modificações nas condições cromatográficas para alcançar uma resolução adequada (BAKSHI; SINGH, 2002).

Após essa avaliação crítica final, com o objetivo de se separar picos próximos ou que estejam coeluinto, o método cromatográfico deve ser otimizado, permitindo alterações na proporção da fase móvel, pH da fase móvel, alteração no gradiente, fluxo, temperatura da coluna, tipo de modificador orgânico utilizado ou tipo de coluna. Dessa forma pode-se

estabelecer as condições cromatográficas definitivas (HONG; SHAH, 2000; BAKSHI et al., 2001).

1.5.4 Identificação e caracterização dos produtos de degradação

Antes de se validar o método, é necessário identificar os produtos de degradação provenientes do fármaco e providenciar os seus padrões de modo a validar a especificidade/seletividade do método. Um método convencional de identificação baseia-se no isolamento desses produtos utilizando uma técnica de separação conhecida como CCD preparativa (GORMAN; JIANG, 2004). Em seguida deve-se determinar a estrutura química de cada substância isolada, através do emprego de técnicas analíticas complementares como espectrometria de massas, ressonância magnética nuclear e espectrofotometria no infravermelho (LOVDAHL; PRIEBE, 2000; DING et al., 2008). Entretanto, essa abordagem é muito tediosa e demorada visto que são formadas inúmeras substâncias por várias vias de degradação.

Ao invés disso, a utilização de técnicas hifenizadas como CLAE acoplada à espectrometria de massas do tipo CLAE-EM ou CLAE-EM-EM, estão se tornando cada vez mais populares para se obter o peso molecular e o perfil de fragmentação dos compostos presentes nas amostras. Esse sistema fornece uma identificação rápida e inequívoca dos produtos de degradação através de uma única técnica (XU; BARTLETT; STEWART, 2001).

Em relação aos padrões dos produtos de degradação, uma maneira simples consiste na sua obtenção direta a partir de fontes comerciais; entretanto, caso não seja possível a sua compra, deve-se isolá-los a partir das soluções degradadas ou sintetizá-los em laboratório. Na impossibilidade de se proceder ao isolamento ou síntese, deve-se utilizar as próprias amostras degradadas durante a validação do parâmetro seletividade/especificidade, como maneira de comprovar a resolução adequada da metodologia na separação desses compostos (BAKSHI; SINGH, 2002).

1.6 Validação do método indicativo de estabilidade para análise de teor e substâncias relacionadas em comprimidos de LF por CLAE

1.6.1 Definições

Diversas definições podem ser encontradas na literatura e nas respectivas legislações das agências regulatórias da área farmacêutica para o termo “validação de métodos”. Nesse contexto, podemos definir a validação do método analítico como um processo pelo qual podemos, através de estudos laboratoriais, determinar a aceitabilidade do método de forma que o mesmo possa cumprir os requisitos para o uso pretendido (HONG; SHAH, 2000).

Outra definição útil é dada pelo guia do ICH para validação de procedimentos analíticos, o qual define que o objetivo da validação do método é demonstrar que ele é adequado para o uso pretendido (ICH, 1996). Também nesse sentido, o guia de validação de métodos do EURACHEM define a validação como sendo um processo pelo qual se confirma através de requisitos analíticos que o método possui características de desempenho consistentes com a aplicação requerida (EURACHEM, 1998).

O guia para validação de métodos analíticos do INMETRO, através do vocabulário internacional de metrologia de 2009, define validação de métodos como uma verificação na qual os requisitos especificados para o método são adequados para o uso pretendido (INMETRO, 2010). Já a resolução 899 da ANVISA afirma que a validação deve demonstrar que o método é apropriado para a finalidade pretendida que, nesse caso, compreende a determinação qualitativa, semi-quantitativa e/ou quantitativa de fármacos e outras substâncias em produtos farmacêuticos (BRASIL, 2003).

1.6.2 Validação intralaboratorial de métodos analíticos

O processo de validação intralaboratorial pode ser dividido em quatro fases: identificação dos parâmetros de desempenho apropriados; delineamento dos experimentos para avaliação de cada parâmetro; determinação dos critérios de aceitabilidade para a

performance de cada parâmetro; e tradução dos resultados no procedimento do método (INMAN et al., 1987).

Antes que qualquer processo de validação seja iniciado, o seu escopo deve ser definido, ou seja, devem ser estabelecidos o sistema analítico (protocolo do método, analitos, faixas de concentração e tipo de matriz) e os requisitos analíticos a serem avaliados (parâmetros de desempenho) (TAVERNIERS; LOOSE; VAN BOCKSTAELE, 2004).

Os estudos de validação intralaboratorial também devem ser representativos, fornecendo um levantamento realístico do número e faixa de efeitos operacionais, além dos analitos, faixas de concentração e matrizes possíveis de ocorrerem nas condições de uso do método (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002). Nesse sentido, é importante mencionar que os experimentos envolvendo replicatas devem considerar a utilização de replicatas verdadeiras e não somente replicatas de leitura, visto que num processo de validação intralaboratorial deve-se conhecer a variabilidade real e não a variabilidade mínima dos resultados (INMAN et al., 1987).

Além do fornecimento dos parâmetros de desempenho, que indicam a adequação para uso e têm dominado a realidade prática de processos de validação intralaboratorial, estes estudos também devem incluir uma verificação de premissas nas quais os métodos de ensaio estão baseados. Como os estudos de validação são baseados em hipóteses estatísticas, uma verificação básica das premissas relacionadas aos testes estatísticos é fundamental para garantia de que os princípios destes testes não sejam afetados e para que os resultados obtidos sejam sustentados (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002).

1.6.3 Parâmetros de desempenho a serem avaliados

Para validação do método indicativo de estabilidade para ensaio de teor e substâncias relacionadas por CLAE da formulação de LF comprimidos, devem ser atendidas as exigências constantes na resolução 899 da ANVISA, que trata da validação de métodos analíticos e bioanalíticos (BRASIL, 2003). De maneira complementar, podem ser adotadas outras recomendações constantes em guias, como é o caso do documento DOQ-CGRE-008 do INMETRO que fornece orientação sobre validação de métodos analíticos (INMETRO, 2010).

A resolução 899 da ANVISA propõe a classificação dos testes analíticos em 4 categorias. O método indicativo de estabilidade para ensaio de teor e substâncias relacionadas

por CLAE se enquadra na categoria I (testes quantitativos para determinação do princípio ativo em produtos farmacêuticos ou matérias-primas) e categoria II (testes quantitativos ou ensaio limite para determinação de impurezas e produtos de degradação em produtos farmacêuticos e matérias-primas). Como o método se enquadra nas categorias I e II, a resolução 899 da ANVISA estabelece como necessária a avaliação dos seguintes parâmetros durante a validação: especificidade/seletividade, linearidade, intervalo, precisão (repetibilidade e precisão intermediária), limite de quantificação, exatidão e robustez (BRASIL, 2003).

Além dos parâmetros exigidos pela resolução 899 da ANVISA; o guia DOQ-CGRE-008 do INMETRO preconiza, para o ensaio de elementos menores correspondentes aos produtos de degradação (concentrações de 0,01% a 1%), a avaliação do parâmetro do limite de detecção. Além disso, preconiza também como um teste complementar à seletividade a avaliação do efeito matriz (INMETRO, 2010).

A seguir serão discutidos mais detalhadamente cada um desses parâmetros utilizados na validação do método indicativo de estabilidade para ensaio de teor e substâncias relacionadas por CLAE para a formulação de comprimidos de LF.

1.6.3.1 Especificidade/seletividade

A especificidade/seletividade pode ser definida como a capacidade de se medir com exatidão a concentração de um determinado analito na presença dos outros componentes presentes na amostra (SNYDER; KIRKLAND; GLAJCH, 1997).

De acordo com a resolução 899 da ANVISA, para análises quantitativas (teor) e análise de impurezas, a especificidade pode ser determinada pela comparação dos resultados obtidos de amostras (fármaco ou medicamento) contaminadas com quantidades apropriadas de impurezas ou excipientes e amostras não contaminadas, para demonstrar que o resultado do teste não é afetado por esses materiais. Entretanto, quando a impureza ou padrão do produto de degradação não estiverem disponíveis, pode-se efetuar essas comparações através da utilização de amostras armazenadas sob condições de estresse como, por exemplo, luz, calor, umidade, hidrólise ácida/básica, oxidação (BRASIL, 2003).

Ainda de acordo com a resolução 899 da ANVISA, deve-se tomar as devidas precauções nos métodos cromatográficos para se garantir a pureza dos picos. Logo, devem ser

utilizados testes de pureza de pico (através de detectores de arranjo de diodos), para demonstrar que ele é atribuído a um só componente (BRASIL, 2003).

1.6.3.2 Teste de efeito matriz

A matriz da amostra pode conter componentes que interferem no desempenho da medição. Dessa maneira, esses interferentes podem aumentar ou reduzir o sinal, e a magnitude do efeito também pode depender da concentração do analito. Com o objetivo de avaliar o efeito matriz deve-se analisar uma curva contendo apenas o padrão do analito em comparação com outra curva contendo padrão do analito adicionado à matriz. A partir da comparação dos resultados pode-se avaliar se os interferentes acentuam ou inibem a detecção ou quantificação do analito de interesse (INMETRO, 2010).

1.6.3.3 Linearidade

A linearidade de um método é uma avaliação sobre o quanto uma curva de calibração que relaciona a concentração do analito versus sua resposta, se aproxima de uma relação linear (SNYDER; KIRKLAND; GLAJCH, 1997).

A resolução 899 da ANVISA recomenda que a linearidade seja determinada pela análise de, no mínimo, cinco concentrações diferentes, compreendidas dentro de um intervalo adequado. Como se trata de uma metodologia para quantificação de teor e uniformidade de conteúdo, é preconizado um intervalo que compreende, no mínimo, a faixa de 70% a 130% da concentração teórica do teste (BRASIL, 2003).

Ainda de acordo com a resolução 899 da ANVISA, caso haja relação linear aparente após a inspeção visual da curva, deve-se tratar os resultados através de métodos estatísticos apropriados para se determinar o coeficiente de correlação, intersecção com eixo Y, coeficiente angular, soma residual dos quadrados mínimos da regressão linear e o desvio padrão relativo. O critério mínimo aceitável para se validar a linearidade da metodologia deve ser um coeficiente de correlação (r) maior ou igual a 0,99 (BRASIL, 2003).

O guia do INMETRO para validação de métodos também recomenda que seja feita a regressão linear dos dados de concentração do analito versus resposta pelo método dos mínimos quadrados; no entanto, a regressão linear só pode ser feita após serem checadas algumas premissas básicas como: teste de *outliers* pelo método *Jacknife*; avaliação da normalidade pelo método de *Ryan Joiner*; teste de homocedasticidade pelo método de *Brown-Forsythe* e avaliação da independência dos resíduos pelo teste de *Durbin-Watson* (INMETRO, 2010).

O teste de outliers pelo método *Jacknife* permite a identificação e exclusão dos valores dispersos, exceto quando a porcentagem dos dados tratados for superior a 22,2% do número original de dados ou quando o ponto for a terceira e última replicata de um nível de concentração estudado (BELSLEY; KUH; WELSCH, 1980).

A avaliação da normalidade dos resíduos pelo teste de *Ryan Joiner* testa a hipótese nula de que os resíduos seguem uma distribuição normal contra a hipótese alternativa de que os resíduos seguem uma outra distribuição de probabilidade. Quando o teste indicar que os dados apresentam desvio da normalidade, variáveis transformadas, como raiz quadrada, logaritmo e inverso da variável dependente são novamente avaliadas. Se o desvio de normalidade persistir após aplicação do teste de *Ryan Joiner* às variáveis transformadas, métodos robustos são recomendados (RYAN; JOINER, 1976).

A homocedasticidade é uma condição que atesta que cada nível da faixa da linearidade avaliada possui uma variação absoluta constante. O teste estatístico escolhido para avaliá-la é o de *Brown-Forsythe* ou *Levene* modificado, o qual confronta a hipótese nula de que as variâncias dos resíduos da regressão não diferem entre si (há homoscedasticidade) contra a hipótese alternativa de que as variâncias dos resíduos são diferentes (há heteroscedasticidade) (BROWN; FORSYTHE, 1974).

A independência dos resíduos é uma premissa que garante a não correlação seriada dos resíduos da regressão. A autocorrelação dos resíduos é verificada pelo teste de *Durbin-Watson*, que confronta a hipótese nula de que não há autocorrelação dos resíduos (resíduos independentes) com a hipótese alternativa de que há autocorrelação dos resíduos (resíduos não são independentes) (DURBIN; WATSON, 1951).

Ainda de acordo com o guia do INMETRO, a avaliação da regressão linear, dos resíduos e do coeficiente de correlação linear não são parâmetros suficientes para comprovar a linearidade do método, pois apenas indicam o ajuste dos resíduos ao modelo matemático proposto. Dessa forma deve-se considerar também na avaliação da linearidade, a realização de

algum teste estatístico que permita avaliar a variância dos resíduos da regressão linear (INMETRO, 2010). Nesse contexto decidiu-se pela utilização da ANOVA.

1.6.3.4 Precisão e exatidão

A exatidão e precisão são considerados os parâmetros de validação mais importantes (TAVERNIERS; LOOSE; VAN BOCKSTAELE, 2004). Esses parâmetros definem a acurácia de um método e são associados à estimativa da incerteza de medição, que inclui os erros aleatórios e sistemáticos intrínsecos ao método (NATA, 1997).

A exatidão pode ser definida como o grau de concordância entre o valor medido e o valor aceito como referência. A exatidão é medida quantitativamente em termos de recuperação, sendo que uma menor recuperação indica maior inexatidão. A recuperação pode ser avaliada comparando-se a resposta do método para um determinado material de referência com o valor conhecido atribuído ao material (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002).

De acordo com a resolução 899 da ANVISA, para formas farmacêuticas (produtos elaborados) pode-se empregar duas metodologias para avaliação da exatidão: análise de amostras, na qual uma quantidade do fármaco é adicionada a uma mistura dos componentes do medicamento (placebo contaminado) ou método de adição de padrão, no qual se adiciona quantidades conhecidas do analito (padrão de referência) ao medicamento (BRASIL, 2003).

Já a precisão pode ser definida como o grau de proximidade entre os resultados obtidos em uma série de medidas individuais de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra (SNYDER; KIRKLAND; GLAJCH, 1997).

A precisão pode ser considerada em três níveis: repetibilidade ou precisão intra-corrída; precisão intermediária ou precisão inter-corrídas; e reprodutibilidade ou precisão inter-laboratorial. No âmbito da validação intralaboratorial, estuda-se a repetibilidade, que trata da concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo com o mesmo analista e mesma instrumentação e avalia-se também a precisão intermediária que pode ser definida como a concordância entre os resultados de um mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes, com analistas diferentes e/ou equipamentos diferentes (EURACHEM, 1998).

A precisão e exatidão do método devem ser determinadas após o estabelecimento da linearidade, do intervalo linear e da especificidade do mesmo, sendo verificadas a partir de, no mínimo, nove determinações contemplando o intervalo linear do procedimento, ou seja, três

concentrações (baixa, média e alta) com três réplicas cada (BRASIL, 2003). O cálculo da exatidão é expresso pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica, de acordo com a equação 1.

$$\text{exatidão} = \frac{\text{concentração média experimental}}{\text{concentração teórica}} \times 100\% \quad \text{Equação 1}$$

Já a precisão é expressa como desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV%), segundo a equação 2.

$$\text{DPR} = \frac{\text{DP}}{\text{CMD}} \times 100\% \quad \text{Equação 2}$$

sendo

DP = desvio padrão absoluto,

CMD = concentração média determinada.

O valor máximo aceitável para o desvio padrão relativo deve ser definido de acordo com a metodologia empregada, a concentração do analito na amostra, tipo de matriz e finalidade do método, não se admitindo valores superiores a 5% (BRASIL, 2003).

1.6.3.5 Limites de detecção e quantificação

O limite de detecção pode ser definido como a menor concentração do analito que produz uma resposta mensurável. Já o limite de quantificação é definido como a menor concentração do analito que produz uma resposta que pode ser adequadamente medida com precisão e exatidão (SNYDER; KIRKLAND; GLAJCH, 1997).

Os limites de detecção e quantificação teóricos podem ser estabelecidos, no caso de métodos instrumentais, através de uma estimativa da concentração baseada na relação de 3 vezes o ruído da linha de base e 10 vezes o ruído da linha de base, respectivamente. Já os limites de detecção e quantificação do método podem ser determinados através da análise de soluções de concentrações conhecidas e decrescentes do analito (BRASIL, 2003).

1.6.3.6 Robustez

A robustez de um método analítico é uma medida da sua capacidade de permanecer inalterado diante de pequenas e deliberadas variações dos parâmetros do método e fornece uma indicação de sua confiabilidade durante o uso normal (ICH, 1996).

A robustez deve ser considerada durante o desenvolvimento da metodologia, e constatando-se qualquer susceptibilidade do método às variações nas condições analíticas, essas deverão ser controladas e as devidas precauções deverão ser incluídas no procedimento. Dentre os principais parâmetros que podem resultar em variação na resposta do método podemos citar as variáveis relacionadas ao preparo das amostras e as variáveis relacionadas ao emprego da cromatografia líquida. Quanto ao preparo das amostras deve-se ter atenção com a estabilidade das soluções analíticas e tempo de extração por exemplo e, em relação à cromatografia a líquido, pode-se listar algumas variáveis importantes como variação na composição da fase móvel, uso de diferentes lotes ou fabricantes de colunas e variação na temperatura da coluna ou no fluxo da fase móvel (BRASIL, 2003).

2 RELEVÂNCIA DO TRABALHO

De acordo com a literatura foram encontrados métodos analíticos para quantificação do metabólito da LF (A77 1726) no plasma por cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE) (SOBHANI et al., 2010) e por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (CLAE-EM) (PAREKH et al., 2010); método para quantificação da LF matéria-prima por CLAE (USP 34); método para quantificação de LF comprimidos por CLAE (YENICELI; DOGRUKOL; TUNCEL, 2006) e método para quantificação de LF e produtos relacionados por espectrofotometria (ABBAS et al., 2006).

Foram encontrados também alguns registros na literatura de métodos analíticos por CLAE para quantificação da LF e produtos de degradação, as quais foram denominadas pelos seus respectivos autores como sendo indicativas de estabilidade. No entanto, essa denominação pode ser questionada visto que foram observados nesses artigos EDFs incompletos (apenas degradação básica) e não controlados (degradação completa do fármaco) (SHOKRY; KAWY; WESHAHY, 2012); EDFs incompletos (apenas fotodegradação) (MIRON; SOLDATTELLI; SCHAPOVAL, 2006) e EDFs com degradações insuficientes em determinadas condições (degradação do fármaco inferior a 10%) (JOSHI et al., 2011; KHER et al., 2011).

Portanto, a relevância técnico-científica do presente trabalho consiste na realização de EDFs completos (empregando várias condições de degradação); EDFs com intensidades suficientes (degradação do fármaco superior a 10%); e EDFs bem controlados (intensidade inferior àquela que produza degradação total do fármaco), propiciando então o desenvolvimento e validação de um método de teor indicativo de estabilidade, empregando CLAE para quantificação da LF e seus produtos de degradação.

Além disso, este trabalho irá agregar conhecimentos teóricos e práticos para a equipe de desenvolvimento e validação analítica da FUNED (Fundação Ezequiel Dias), visto que servirá de base para o planejamento e execução de EDFs e desenvolvimento de métodos analíticos indicativos de estabilidade para outros fármacos e produtos a serem desenvolvidos.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Realizar estudos de degradação forçada, desenvolver e validar um método analítico de teor e substâncias relacionadas por CLAE para avaliar a estabilidade do protótipo de comprimidos de LF da FUNED.

3.2 Objetivos específicos

- Realizar estudos de cinética de degradação forçada em diferentes condições de estresse (hidrólise ácida, hidrólise básica, oxidação, degradação termolítica e degradação fotolítica) para a matéria-prima de LF.
- Estabelecer a cinética de degradação do fármaco LF nas diferentes condições de estresse.
- Desenvolver metodologia analítica indicativa de estabilidade para ensaio de teor da matéria-prima de LF.
- Realizar estudos de degradação forçada em diferentes condições de estresse (hidrólise ácida, hidrólise básica, oxidação, degradação térmica e fotólise) para comprimidos de LF.
- Desenvolver e validar metodologia analítica indicativa de estabilidade para ensaio de teor e substâncias relacionadas para comprimidos de LF por cromatografia a líquido de alta eficiência.
- Apresentar os resultados do estudo de estabilidade de comprimidos de LF.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

4.1.1 Formulações, matérias-primas e padrões

- Formulação de comprimidos de LF 20 mg (leflunomida, lactose monohidratada, celulose microcristalina 101, polivinilpirrolidona, croscarmelose sódica, estearato de magnésio) – Piloto 237/11 – 94,47% (Funed, Brasil).
- Matéria-prima de LF – Lote IF-LE-091219 – 97,78% (Iffect Chemphar, China).
- Padrão de referência de LF – Lote FOG328 – 99,90% (USP, EUA).
- Padrão de trabalho de LF – Lote MP2012030056 – 98,29% (Funed, Brasil).
- Placebo puro da formulação de comprimidos de LF – Piloto 003/12 (Funed, Brasil).

4.1.2 Solventes e reagentes

- Acetato de amônio P.A. (Vetec, Brasil).
- Acetonitrila Lichrosolv – 99,9% (Merck, Alemanha).
- Ácido clorídrico P.A. 37,5% (Vetec, Brasil).
- Água ultrapurificada (Sistema Milli-Q, EUA).
- Hidróxido de sódio micropérolas P.A. (Merck, Alemanha).
- Peróxido de hidrogênio P.A. 30% (Merck, Alemanha).

4.1.3 Equipamentos

- Agitador magnético (Quimis, Brasil).

- Agitador orbital modelo KS125 (IKA Labortechnik, Alemanha).
- Balança analítica modelo AX205 (Mettler Toledo, Suíça).
- Banho ultrassônico modelo Transsonic Digital S (Elma, Alemanha).
- Bomba de vácuo modelo DOA-P104-AA (Gast, EUA).
- Câmara de fotoestabilidade modelo Pharma 500 L (Weiss, Alemanha).
- Câmaras de estabilidade modelo KBF-720 (Binder, Alemanha).
- Cromatógrafo a líquido de alta eficiência modelo LaChrom Elite (Merck Hitachi, Japão), composto por: bomba com desgaseificador modelo L-2130; auto-injetor modelo L-2200; forno de coluna modelo L-2300; e detector de arranjo de diodos modelo L-2450.
- Cromatógrafo a líquido de alta eficiência modelo LaChrom Elite (Merck Hitachi, Japão) composto por: bomba com desgaseificador modelo L-2130; auto-injetor modelo L-2200; forno de coluna modelo L-2300; e detector de ultravioleta modelo L-2400.
- Estufa microprocessada de secagem modelo Q317M42 (Quimis, Brasil).
- Manta aquecedora modelo Classe 300 - 22E (Fisatom, Brasil).
- Potenciômetro medidor de pH microprocessado modelo Q400MT (Quimis, Brasil).
- Pipetador automático modelo Accu-Jet (Brand, Alemanha).

4.1.4 Vidrarias

- Balão de fundo redondo com rolha esmerilhada de 250 mL.
- Balões volumétricos com tampa de 25, 50, 100, 250 e 1000 mL.
- Béqueres de 50, 100 e 1000 mL.
- Condensador de refluxo de bolas em vidro borossilicato.
- Kitassato de 4 litros.
- Pipetas volumétricas de 5, 10, 15, 20 e 25 mL.
- Provetas de 100 e 1000 mL.
- Sistema de filtração a vácuo para fase móvel composto de funil de vidro e copo graduado de vidro de 300 mL.

4.1.5 Material diverso

- Barra magnética lisa em politetrafluoretileno (PTFE) dimensões 7 mm x 20 mm.
- Coluna de fase reversa para CLAE de octadecilsilano (C18), dimensões 125 mm x 4,0 mm, tamanho de partícula 5 μm modelo Lichrospher RP-18 endcapped (Merck, Alemanha).
- Coluna de fase reversa para CLAE de octilsilano (C8), dimensões 125 mm x 4,0 mm, tamanho de partícula 5 μm modelo Lichrospher RP-8 endcapped (Merck, Alemanha).
- Conjunto de *vial* de vidro, septo e tampa para CLAE modelo 8-425 (VWR, EUA).
- Cronômetro digital modelo CR8020 (Timer, Brasil).
- Espátula de aço inox.
- Filme flexível Parafilm (Bemis, EUA).
- Fragmentos de porcelana.
- Gral de porcelana com pistilo.
- Mangueira de silicone.
- Membrana de celulose regenerada de 47 mm de diâmetro e porosidade de 0,45 μm (Millipore, EUA).
- Papel de filtro quantitativo, faixa branca, diâmetro 12,5 cm modelo JP 40 (J. Prolab, Brasil).
- Papel vegetal.
- Pipeta tipo Pasteur.
- Seringa descartável de 25 mL sem agulha (BD, EUA).
- Unidade filtrante para seringa de celulose regenerada de 33 mm e porosidade de 0,45 μm (Whatman, EUA).
- Unidade filtrante para seringa de poli(fluoreto de vinilideno) (PVDF) de 33 mm e porosidade de 0,45 μm (Millipore, EUA).

4.2 Métodos

4.2.1 Estudo de cinética de degradação forçada da matéria-prima de LF e desenvolvimento de método analítico indicativo de estabilidade por CLAE

4.2.1.1 Preparo e degradação das amostras de matéria-prima de LF

O estudo de cinética de degradação forçada da matéria prima de LF foi realizado submetendo-a às seguintes condições de degradação: hidrólise ácida, hidrólise básica, oxidação, degradação térmica e degradação fotolítica.

O preparo da solução padrão de LF, da amostra controle de matéria-prima de LF, da solução tampão utilizada na fase móvel, da solução diluente utilizada na solubilização das amostras, das soluções branco dos agentes estressantes e das amostras de matéria-prima de LF sob as diferentes condições de degradação encontram-se a seguir.

4.2.1.1.1 Preparo da solução de acetato de amônio

A solução de acetato de amônio foi preparada, com adaptações, solubilizando-se 0,77 gramas de acetato de amônio P.A. em 1000 mililitros de água ultrapurificada para se produzir uma solução na concentração de 10 mM (JOSHI et. al, 2011).

4.2.1.1.2 Preparo da solução diluente

A solução diluente foi preparada misturando-se a acetonitrila com a solução de acetato de amônio 10 mM na proporção de 1:1 (JOSHI et. al, 2011).

4.2.1.1.3 Preparo da amostra padrão de LF

A solução padrão estoque foi preparada solubilizando-se 20,02 miligramas de padrão de trabalho de LF em 100 mililitros de solução diluente para se atingir uma concentração próxima a 200 µg/mL. Posteriormente, 10 mililitros da solução padrão estoque foram diluídos em 50 mililitros de solução diluente para se obter uma solução padrão em concentração próxima a 40 µg/mL.

4.2.1.1.4 Preparo da amostra controle da matéria-prima de LF

Foram preparadas três soluções em concentração próxima a 200 µg/mL de LF através da solubilização de 20,01; 20,03 e 20,04 miligramas de matéria-prima em 100 mililitros de solução diluente. Posteriormente, 10 mililitros de cada uma das réplicas foram diluídos em 50 mililitros de solução diluente para se obter uma concentração próxima a 40 µg/mL.

4.2.1.1.5 Teste de hidrólise ácida da matéria-prima de LF

Foram preparadas três soluções em concentração próxima a 200 µg/mL de LF através da solubilização de 20,01; 19,95 e 19,96 miligramas de matéria-prima em 30 mililitros de acetonitrila P.A. e volume de ácido clorídrico 1 M em quantidade suficiente para 100 mililitros. Os valores de pH das soluções resultantes foram próximos a 1,0. As soluções foram transferidas para balão de fundo redondo com rolha esmerilhada de 250 mililitros contendo fragmentos de porcelana, o qual foi acoplado a um condensador de refluxo de bolas e apoiado sobre uma manta aquecedora. As soluções foram submetidas sob refluxo por 30 minutos e 1, 2, 3 e 5 horas. Após cada tempo de refluxo as soluções foram resfriadas até temperatura ambiente. Em seguida, alíquotas de 10 mililitros de cada uma das réplicas foram coletadas para béqueres de 50 mililitros, neutralizadas para pH 7,00 com auxílio de hidróxido de sódio 1 M e posteriormente diluídas em volume de solução diluente em quantidade suficiente para 50 mililitros para se obter uma concentração próxima a 40 µg/mL de LF inicial.

4.2.1.1.6 Teste de hidrólise básica da matéria-prima de LF

Foram preparadas três soluções em concentração próxima a 200 µg/mL de LF através da solubilização de 20,02; 20,04 e 20,02 miligramas de matéria-prima em 30 mililitros de acetonitrila P.A. e volume de hidróxido de sódio 0,005 M em quantidade suficiente para 100 mililitros. Os valores de pH das soluções resultantes foram próximos a 11,0. As soluções foram colocadas para reagir à temperatura ambiente por 0, 1, 5, 10, 15 e 30 minutos. Após cada tempo de reação, alíquotas de 10 mililitros de cada uma das réplicas foram coletadas para béqueres de 50 mililitros, neutralizadas para pH 7,00 com auxílio de ácido clorídrico 0,1 M e posteriormente diluídas em volume de solução diluente em quantidade suficiente para 50 mililitros para se obter uma concentração próxima a 40 µg/mL de LF inicial.

4.2.1.1.7 Teste de oxidação da matéria-prima de LF

Foram preparadas três soluções em concentração próxima a 200 µg/mL de LF através da solubilização de 20,03; 19,96 e 20,05 miligramas de matéria-prima em 30 mililitros de acetonitrila P.A. e volume de peróxido de hidrogênio 30% em quantidade suficiente para 100 mililitros. As soluções foram transferidas para balão de fundo redondo com rolha esmerilhada de 250 mL contendo fragmentos de porcelana, o qual foi acoplado a um condensador de refluxo de bolas e apoiado sobre uma manta aquecedora. As soluções foram submetidas sob refluxo por 5, 15, 30, 60, 120 e 180 minutos. Após cada tempo de refluxo as soluções foram resfriadas até temperatura ambiente. Em seguida, alíquotas de 10 mililitros de cada uma das réplicas foram coletadas e posteriormente diluídas em volume de solução diluente em quantidade suficiente para 50 mililitros para se obter uma concentração próxima a 40 µg/mL de LF inicial.

4.2.1.1.8 Teste de degradação termolítica da matéria-prima de LF

As amostras de matéria-prima de LF foram acondicionadas em fina camada em placas de petri de vidro, identificadas e submetidas ao calor seco a 80°C em estufa por 24, 48, 72, 96 e 120 horas.

Após cada tempo de exposição, foram preparadas soluções em concentração próxima a 200 µg/mL de LF através da solubilização de 20,01; 20,02 e 20,04 miligramas (24 horas); de 19,96; 20,04 e 19,96 miligramas (48 horas); de 19,98; 19,99 e 19,99 miligramas (72 horas); de 20,04; 19,98 e 20,04 miligramas (96 horas); de 20,05; 20,03 e 20,03 (120 horas) de matéria-prima em 100 mililitros de solução diluente. Em seguida, alíquotas de 10 mililitros de cada uma das réplicas foram diluídas em volume de solução diluente em quantidade suficiente para 50 mililitros para se obter uma concentração próxima a 40 µg/mL de LF inicial.

4.2.1.1.9 Teste de degradação fotolítica da matéria-prima de LF

As amostras de matéria-prima de LF foram identificadas e acondicionadas em fina camada em placas de petri de vidro em câmara de fotoestabilidade empregando radiação na região do visível (exposição de 1200, 2400, 3600, 4800 e 6000 klux.h) e radiação na região do ultravioleta (exposição de 200, 400, 600, 800 e 1000 W.h/m²).

Após cada valor de exposição, foram preparadas soluções em concentração próxima a 200 µg/mL de LF através da solubilização de 19,95; 20,03 e 19,95 miligramas (1200 klux.h); de 19,96; 20,05 e 19,99 miligramas (2400 klux.h); de 20,03; 20,02 e 20,03 miligramas (3600 klux.h); de 19,96; 20,05; e 20,00 miligramas (4800 klux.h); de 19,95; 19,97 e 20,02 miligramas (6000 klux.h); de 20,01; 20,00 e 19,97 miligramas (200 W.h/m²); de 20,03; 19,99 e 20,05 miligramas (400 W.h/m²); de 20,05; 19,99 e 19,98 miligramas (600 W.h/m²); de 20,00; 20,01 e 19,99 miligramas (800 W.h/m²); de 19,96; 20,00 e 20,00 (1000 W.h/m²) de matéria-prima em 100 mililitros de solução diluente. Em seguida, alíquotas de 10 mililitros de cada uma das réplicas foram diluídas em volume de solução diluente em quantidade suficiente para 50 mililitros para se obter uma concentração próxima a 40 µg/mL de LF inicial.

4.2.1.1.10 Preparo das soluções branco dos agentes estressantes

Foram preparadas as soluções branco estoque dos testes de hidrólise ácida, hidrólise básica e oxidação através da mistura de 30 mililitros de acetonitrila P.A. com volumes de cada um dos agentes estressantes ácido clorídrico 1 M, hidróxido de sódio 0,005 M e peróxido de hidrogênio 30% em quantidade suficiente para 100 mililitros, respectivamente, na mesma proporção em que foram preparadas as amostras. Em seguida, alíquotas de 10 mililitros foram coletadas de cada uma das soluções branco estoque para béqueres de 50 mililitros, neutralizadas para pH 7,00 com auxílio de hidróxido de sódio 1 M ou ácido clorídrico 0,1 M no caso das soluções do teste de hidrólise ácida e hidrólise básica, respectivamente, e posteriormente diluídas em volume de solução diluente em quantidade suficiente para 50 mililitros para se produzir as soluções branco diluídas. No caso do teste de oxidação, alíquotas de 10 mililitros foram coletadas da respectiva solução branco estoque e posteriormente diluídas em volume de solução diluente em quantidade suficiente para 50 mililitros para se produzir a solução branco diluída.

4.2.1.1.11 Preparo da solução diluente e fases móveis para análise

A solução diluente e fases móveis utilizadas no desenvolvimento da metodologia analítica foram filtradas para *vials* com auxílio de unidade filtrante.

4.2.1.2 Métodos de análise por CLAE

As amostras preparadas no estudo de cinética de degradação forçada da matéria-prima de LF, que se encontram no item 4.2.1.1 (página 72), foram filtradas para *vials* com auxílio de unidade filtrante e analisadas em triplicata de acordo com os respectivos métodos em eluição isocrática e gradiente descritos respectivamente nos itens 4.2.1.2.1 e 4.2.1.2.2.

4.2.1.2.1 Métodos por CLAE em eluição isocrática

As condições cromatográficas dos métodos em eluição isocrática da USP 34, método em eluição isocrática A com algumas adaptações (JOSHI et. al, 2011) e método em eluição isocrática B (modificação do método A) estão apresentadas na tabela 1.

Tabela 1 – Métodos por CLAE em eluição isocrática da USP 34, A e B

Condições cromatográficas	Método da USP 34	Método em eluição isocrática A	Método em eluição isocrática B
Deteção	Região do UV-VIS em 210 nm	Região do UV-VIS em 261 nm	Região do UV-VIS em 261 nm
Fase móvel	Água:ACN:trietilamina ajustada para pH 4,0 com ácido fosfórico (65:35:0,5)	Acetato de amônio 10 mM:ACN (40:60)	Acetato de amônio 10 mM:ACN (50:50)
Fluxo	1,0 mL/min	1,0 mL/min	1,0 mL/min
Coluna	C18 125 mm x 4,0 mm	C18 125 mm x 4,0 mm	C18 125 mm x 4,0 mm
Temperatura do forno	25°C	25°C	25°C
Volume de injeção	10 µL	20 µL	20 µL
Tempo de corrida	30 minutos	8 minutos	8 minutos

4.2.1.2.2 Métodos por CLAE em eluição gradiente

Cromatógrafo a líquido de alta eficiência com detector na região do UV-VIS ajustado para deteção em 261 nm; coluna cromatográfica C18; temperatura do forno ajustada para 25°C; injeção de 20 µL; tempo de corrida de aproximadamente 20 minutos, fluxo de 1,0 mL/min e fase móvel composta de acetato de amônio 10 mM:ACN em eluição gradiente filtrada a vácuo utilizando membrana de acordo com os métodos A e B apresentados na tabela 2.

Tabela 2 – Métodos por CLAE em eluição gradiente A e B

Tempo	Método em eluição gradiente A	Método em eluição gradiente B
	Acetonitrila	Acetonitrila
0 min	35%	30%
15 min	80%	80%
16 min	35%	30%
20 min	35%	30%

4.2.2 Estudo de degradação forçada de comprimidos de LF utilizando método analítico indicativo de estabilidade por CLAE

4.2.2.1 Determinação do peso médio e pulverização dos comprimidos de LF

Foram pesados 20 comprimidos com auxílio de balança analítica e foi determinado um peso médio correspondente a 280,04 miligramas. Em seguida, os comprimidos foram pulverizados em gral com pistilo. O pó resultante foi utilizado nas condições de degradação dos comprimidos de LF com exceção para a degradação térmolítica e fotolítica em que foram empregadas amostras de comprimidos nos testes.

4.2.2.2 Preparo e degradação das amostras de comprimidos de LF

O estudo de degradação forçada dos comprimidos de LF foi realizado submetendo-os às seguintes condições de degradação: hidrólise ácida, hidrólise básica, oxidação, degradação térmica e degradação fotolítica.

O preparo da solução padrão de LF, da amostra controle de comprimidos de LF, das soluções dos agentes estressantes, das amostras de comprimidos de LF e das soluções dos placebos puros da formulação sob as diferentes condições de degradação encontram-se a seguir.

4.2.2.2.1 Preparo da amostra padrão de LF

A solução padrão estoque foi preparada solubilizando-se 20,03 miligramas de padrão de trabalho de LF em 100 mililitros de solução diluente para se atingir uma concentração próxima a 200 µg/mL. Posteriormente, 10 mililitros da solução padrão estoque foram diluídos em 50 mililitros de solução diluente para se obter uma solução padrão em concentração próxima a 40 µg/mL.

4.2.2.2.2 Preparo da amostra controle de comprimidos de LF

Foram preparadas amostras em concentração próxima a 200 µg/mL de LF através da dispersão de uma quantidade de pó dos comprimidos equivalente a 280,09; 280,06 e 280,00 miligramas em 100 mililitros de solução diluente. Essas amostras foram posteriormente filtradas em papel de filtro quantitativo e foram diluídos 10 mililitros de cada uma das soluções resultantes em 50 mililitros de solução diluente para se obter uma concentração próxima a 40 µg/mL.

4.2.2.2.3 Teste de hidrólise ácida de comprimidos de LF

4.2.2.2.3.1 Hidrólise ácida da formulação de comprimidos de LF

Foram preparadas amostras em concentração próxima a 200 µg/mL de LF através da dispersão de uma quantidade de pó dos comprimidos equivalente a 280,03; 280,01 e 280,04 miligramas em 30 mililitros de acetonitrila P.A. e volume de ácido clorídrico 1 M em quantidade suficiente para 100 mililitros. As amostras foram transferidas para balão de fundo redondo com rolha esmerilhada de 250 mL contendo fragmentos de porcelana, o qual foi acoplado a um condensador de refluxo de bolas e apoiado sobre uma manta aquecedora. As amostras foram submetidas sob refluxo por 5 horas. Após o tempo de refluxo as amostras foram resfriadas até temperatura ambiente e filtradas com auxílio de papel de filtro quantitativo. Em seguida, alíquotas de 10 mililitros de cada uma das réplicas foram coletadas para béqueres de 50 mililitros, neutralizadas para pH 7,00 com auxílio de hidróxido de sódio 1 M e posteriormente diluídas em volume de solução diluente em quantidade suficiente para 50 mililitros para se obter uma concentração próxima a 40 µg/mL de LF inicial.

4.2.2.2.3.2 Hidrólise ácida do placebo puro da formulação

Foi preparada uma amostra através da dispersão de uma quantidade de pó da formulação do placebo puro equivalente a 260,03 miligramas em 30 mililitros de acetonitrila P.A. e volume de ácido clorídrico 1 M em quantidade suficiente para 100 mililitros. A amostra foi transferida para balão de fundo redondo com rolha esmerilhada de 250 mL contendo fragmentos de porcelana, o qual foi acoplado a um condensador de refluxo de bolas e apoiado sobre uma manta aquecedora. A amostra foi submetida sob refluxo por 5 horas. Após o tempo de refluxo a amostra foi resfriada até temperatura ambiente e filtrada com auxílio de papel de filtro quantitativo. Em seguida, uma alíquota de 10 mililitros foi coletada para béquer de 50 mililitros, neutralizada para pH 7,00 com auxílio de hidróxido de sódio 1 M e posteriormente diluída em volume de solução diluente em quantidade suficiente para 50 mililitros.

4.2.2.2.4 Teste de hidrólise básica de comprimidos de LF

4.2.2.2.4.1 Hidrólise básica da formulação de comprimidos de LF

Foram preparadas amostras em concentração próxima a 200 $\mu\text{g/mL}$ de LF através da dispersão de uma quantidade de pó dos comprimidos equivalente a 280,04; 280,03 e 280,04 miligramas em 30 mililitros de acetonitrila P.A. e volume de hidróxido de sódio 0,005 M em quantidade suficiente para 100 mililitros. As amostras foram colocadas para reagir à temperatura ambiente por 25 segundos e foram imediatamente filtradas com auxílio de papel de filtro quantitativo. Após o tempo de reação, alíquotas de 10 mililitros de cada uma das réplicas foram coletadas para béqueres de 50 mililitros, neutralizadas para pH 7,00 com auxílio de ácido clorídrico 0,1 M e posteriormente diluídas em volume de solução diluente em quantidade suficiente para 50 mililitros para se obter uma concentração próxima a 40 $\mu\text{g/mL}$ de LF inicial.

4.2.2.2.4.2 Hidrólise básica do placebo puro da formulação

Foi preparada uma amostra através da dispersão de uma quantidade de pó da formulação do placebo puro, equivalente a 260,13 miligramas em 30 mililitros de acetonitrila P.A. e volume de hidróxido de sódio 0,005 M em quantidade suficiente para 100 mililitros. A amostra foi colocada para reagir à temperatura ambiente por 25 segundos e foi imediatamente filtrada com auxílio de papel de filtro quantitativo. Após o tempo de reação, uma alíquota de 10 mililitros foi coletada para béquer de 50 mililitros, neutralizada para pH 7,00 com auxílio de ácido clorídrico 0,1 M e posteriormente diluída em volume de solução diluente em quantidade suficiente para 50 mililitros.

4.2.2.2.5 Teste de oxidação de comprimidos de LF

4.2.2.2.5.1 Oxidação da formulação de comprimidos de LF

Foram preparadas amostras em concentração próxima a 200 µg/mL de LF através da dispersão de uma quantidade de pó dos comprimidos equivalente a 280,01; 280,04 e 280,07 miligramas em 30 mililitros de acetonitrila P.A. e volume de solução de peróxido de hidrogênio 30% em quantidade suficiente para 100 mililitros. As amostras foram transferidas para balão de fundo redondo com rolha esmerilhada de 250 mL contendo fragmentos de porcelana, o qual foi acoplado a um condensador de refluxo de bolas e apoiado sobre uma manta aquecedora. As amostras foram submetidas sob refluxo por 8 minutos. Após o tempo de refluxo as amostras foram resfriadas até temperatura ambiente e filtradas com auxílio de papel de filtro quantitativo. Em seguida, alíquotas de 10 mililitros de cada uma das réplicas foram coletadas e diluídas em volume de solução diluente em quantidade suficiente para 50 mililitros para se obter uma concentração próxima a 40 µg/mL de LF inicial.

4.2.2.2.5.2 Oxidação do placebo puro da formulação

Foi preparada uma amostra através da dispersão de uma quantidade de pó da formulação do placebo puro, equivalente a 260,08 miligramas em 30 mililitros de acetonitrila P.A. e volume de peróxido de hidrogênio 30% em quantidade suficiente para 100 mililitros. A amostra foi transferida para balão de fundo redondo com rolha esmerilhada de 250 mL contendo fragmentos de porcelana, o qual foi acoplado a um condensador de refluxo de bolas e apoiado sobre uma manta aquecedora. A amostra foi submetida sob refluxo por 8 minutos. Após o tempo de refluxo a amostra foi resfriada até temperatura ambiente e filtrada com auxílio de papel de filtro quantitativo. Em seguida, uma alíquota de 10 mililitros foi coletada e diluída em volume de solução diluente em quantidade suficiente para 50 mililitros.

4.2.2.2.6 Teste de degradação termolítica de comprimidos de LF

4.2.2.2.6.1 Degradação termolítica da formulação de comprimidos de LF

A amostra de comprimidos de LF foi identificada, acondicionada em placa de petri de vidro e submetida ao calor seco a 80°C em estufa por 120 horas.

Em seguida os comprimidos foram pulverizados em gral com pistilo. Foram preparadas amostras em concentração próxima a 200 µg/mL de LF através da dispersão de uma quantidade do pó equivalente a 280,00; 280,04 e 280,05 miligramas em 100 mililitros de solução diluente. Essas amostras foram então filtradas em papel de filtro quantitativo. Em seguida, alíquotas de 10 mililitros de cada uma das réplicas foram diluídas em 50 mililitros de solução diluente para se obter uma concentração próxima a 40 µg/mL de LF inicial.

4.2.2.2.6.2 Degradação termolítica do placebo puro da formulação

A amostra de placebo puro da formulação de comprimidos de LF foi acondicionada em fina camada em placa de petri de vidro, identificada e submetida ao calor seco a 80°C por 120 horas.

Foi preparada uma amostra através da dispersão de uma quantidade de pó da formulação do placebo puro equivalente a 260,12 miligramas em 100 mililitros de solução diluente. A amostra foi posteriormente filtrada em papel de filtro quantitativo e foram diluídos 10 mililitros da solução resultante em 50 mililitros de solução diluente.

4.2.2.2.7 Teste de degradação fotolítica de comprimidos de LF

4.2.2.2.7.1 Degradação fotolítica da formulação de comprimidos de LF

As amostras de comprimidos de LF foram identificadas e acondicionadas na forma de granel em placas de petri de vidro e nas embalagens primárias (blísteres e frascos) em câmara de fotoestabilidade empregando radiação na região do visível (exposição de 1200 klux.h) e radiação na região do ultravioleta (exposição de 200 W.h/m²).

Após cada valor de exposição empregando radiação na região do visível e do ultravioleta, os comprimidos foram pulverizados em gral com pistilo. Foram preparadas amostras em concentração próxima a 200 µg/mL de LF através da dispersão de 280,07; 280,06 e 280,07 miligramas (granel/visível); a 280,02; 279,99 e 280,03 miligramas (granel/ultravioleta); a 280,00; 280,08 e 280,05 miligramas (frasco/visível); a 280,03; 280,08 e 280,03 miligramas (frasco/ultravioleta); a 279,99; 280,08 e 280,01 miligramas (blíster/visível); a 280,00; 280,01 e 280,07 miligramas (blíster/ultravioleta) de pó dos comprimidos em 100 mililitros de solução diluente. Essas amostras foram então filtradas em papel de filtro quantitativo. Em seguida, alíquotas de 10 mililitros de cada uma das réplicas foram diluídas em 50 mililitros de solução diluente para se obter uma concentração próxima a 40 µg/mL de LF inicial.

4.2.2.2.7.2 Degradação fotolítica do placebo puro da formulação

As amostras de placebo puro da formulação de comprimidos de LF foram identificadas e acondicionadas em fina camada em placas de petri de vidro em câmara de fotoestabilidade empregando radiação na região do visível (exposição de 1200 klux.h) e radiação na região do ultravioleta (exposição de 200 W.h/m²).

Após exposição empregando radiação na região do visível e do ultravioleta foram preparadas amostras através da dispersão de 259,93 (visível) e 260,01 (ultravioleta) miligramas do placebo puro em 100 mililitros de solução diluente. Essas amostras foram posteriormente filtradas em papel de filtro quantitativo e foram diluídos 10 mililitros de cada uma das réplicas em 50 mililitros de solução diluente.

4.2.2.2.8 Preparo das soluções branco dos agentes estressantes

O preparo das soluções branco dos testes de hidrólise ácida, hidrólise básica e oxidação consistiu no mesmo já descrito no item 4.2.1.1.10 (página 76).

4.2.2.2.9 Preparo da solução diluente e fase móvel para análise

A solução diluente e fase móvel utilizada na análise do estudo de degradação forçada de comprimidos de LF foram filtradas para *vials* com auxílio de unidade filtrante.

4.2.2.3 Método de análise por CLAE

As amostras preparadas no estudo de degradação forçada para comprimidos de LF, que se encontram no item 4.2.2.2 (página 78), foram filtradas para *vials* com auxílio de

unidade filtrante e analisadas em triplicata empregando o método por CLAE em eluição gradiente B considerado indicativo de estabilidade que se encontra no item 4.2.1.2.2 (página 77).

4.2.3 Validação do método analítico indicativo de estabilidade para quantificação do teor e substâncias relacionadas em comprimidos de LF por CLAE

4.2.3.1 Preparo das amostras

A validação da metodologia analítica indicativa de estabilidade para quantificação do teor e substâncias relacionadas em comprimidos de LF por CLAE foi realizada através da avaliação dos seguintes parâmetros de desempenho: seletividade/especificidade, linearidade, teste de efeito matriz, exatidão e precisão, limites de detecção e quantificação, robustez e estabilidade das soluções.

4.2.3.1.1 Amostras para avaliação da seletividade/especificidade do método

A avaliação da seletividade/especificidade do método foi realizada através do preparo das seguintes amostras: solução padrão de referência, solução padrão de trabalho, solução do placebo puro da formulação de comprimidos de LF, solução placebo fortificada a 100% com LF, amostra de hidrólise ácida de comprimidos de LF, amostra de hidrólise básica de comprimidos de LF, amostra de oxidação de comprimidos de LF, amostra de degradação termolítica de comprimidos de LF, amostra de degradação fotolítica de comprimidos de LF, solução diluente e fase móvel. O preparo dessas amostras está descrito a seguir.

4.2.3.1.1.1 Preparo das soluções padrão de referência e de trabalho de LF

As soluções padrão estoque foram preparadas solubilizando-se 20,02 miligramas do padrão de referência e 19,98 miligramas do padrão de trabalho, separadamente, em 100 mililitros de solução diluente para se atingir uma concentração próxima a 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de LF. Posteriormente, 10 mililitros de cada uma das soluções padrão estoque foram diluídos, separadamente, em 50 mililitros de solução diluente para se obter soluções padrão em concentrações próximas a 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de LF.

4.2.3.1.1.2 Preparo da solução do placebo puro da formulação de comprimidos de LF

A solução placebo estoque foi preparada através da dispersão de uma quantidade de pó da formulação do placebo puro equivalente a 259,97 miligramas em 100 mililitros de solução diluente. A amostra foi então filtrada em papel de filtro quantitativo. Em seguida, uma alíquota de 10 mililitros da solução placebo estoque foi coletada e diluída em 50 mililitros de solução diluente.

4.2.3.1.1.3 Preparo da solução placebo fortificada a 100% com LF

A solução placebo fortificada a 100% com LF estoque foi preparada através da dispersão de 20,04 miligramas do padrão de trabalho de LF e 260,04 miligramas do placebo puro em 100 mililitros de solução diluente para se atingir uma concentração próxima a 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de LF. Posteriormente, uma alíquota de 10 mililitros da solução placebo fortificada a 100% com LF estoque foi coletada e diluída em 50 mililitros de solução diluente para se obter uma concentração próxima a 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de LF.

4.2.3.1.1.4 Preparo das amostras de hidrólise ácida, hidrólise básica, oxidação, degradação termolítica e degradação fotolítica de comprimidos de LF

Os preparos das amostras do teste de hidrólise ácida sob refluxo com HCl 1 M por 5 horas; hidrólise básica a temperatura ambiente com NaOH 0,005 M por 25 segundos; oxidação sob refluxo com solução de peróxido de hidrogênio 30% por 8 minutos; degradação termolítica empregando calor seco a 80°C em estufa por 120 horas; degradação fotolítica empregando radiação na região do visível (1200 klux.h) e radiação na região do ultravioleta (200 W.h/m²) de comprimidos de LF consistiram nos mesmos já descritos nos itens 4.2.2.2.3.1 (página 80); 4.2.2.2.4.1 (página 81); 4.2.2.2.5.1 (página 82); 4.2.2.2.6.1 (página 83) e 4.2.2.2.7.1 (página 84) respectivamente.

4.2.3.1.1.5 Preparo da solução diluente e fase móvel para análise

O preparo da solução diluente e fase móvel consistiu no mesmo já descrito no item 4.2.2.2.9 (página 85).

4.2.3.1.2 Amostras para avaliação da linearidade do método

4.2.3.1.2.1 Preparo das soluções-mãe padrão

As três soluções-mãe padrão foram preparadas solubilizando-se 24,95; 24,96 e 25,03 miligramas de padrão de referência de LF, separadamente, em 250 mililitros de solução diluente para se obter uma concentração próxima a 100 µg/mL.

4.2.3.1.2.2 Esquema de diluições realizadas a partir das soluções-mãe padrão

Cada uma das três soluções-mãe padrão foi diluída com auxílio de solução diluente para se produzir as seis soluções igualmente espaçadas na faixa de 10 a 60 µg/mL de acordo com o esquema proposto na tabela 3.

Tabela 3 - Esquema de diluições realizadas a partir das soluções-mãe padrão

Soluções	Alíquota da solução-mãe padrão (mL)	Volume final (mL)	Concentração final (µg/mL)
Solução a 25%	5	50	10
Solução a 50%	10	50	20
Solução a 75%	15	50	30
Solução a 100%	20	50	40
Solução a 125%	25	50	50
Solução a 150%	15	25	60

4.2.3.1.3 Amostras para avaliação do efeito matriz

4.2.3.1.3.1 Preparo das soluções-mãe padrão

O preparo das três soluções-mãe padrão consistiu no mesmo já descrito no item 4.2.3.1.2.1 (página 87).

4.2.3.1.3.2 Preparo da solução-mãe placebo

A solução-mãe placebo foi preparada dispersando-se 650,21 mg do placebo puro da formulação de comprimidos de LF em 250 mililitros de solução diluente. A solução foi em seguida filtrada com papel de filtro quantitativo.

4.2.3.1.3.3 Esquema de diluições realizadas a partir da solução-mãe padrão e solução mãe-placebo

Cada uma das três soluções-mãe padrão e a solução placebo foram diluídas com auxílio de solução diluente para se produzir as seis soluções contaminadas com placebo na faixa de 25 a 150 % da concentração teórica de acordo com o esquema proposto na tabela 4.

Tabela 4 - Esquema de diluições realizadas a partir da solução-mãe padrão e solução-mãe placebo

Soluções contaminadas com placebo	Alíquota da solução-mãe padrão (mL)	Alíquota da solução-mãe placebo (mL)	Volume final (mL)	Concentração final ($\mu\text{g/mL}$)
Solução a 25%	5	10	50	10
Solução a 50%	10	10	50	20
Solução a 75%	15	10	50	30
Solução a 100%	20	10	50	40
Solução a 125%	25	10	50	50
Solução a 150%	15	5	25	60

4.2.3.1.4 Amostras para avaliação da exatidão, precisão, limites de detecção e quantificação

A avaliação da exatidão e precisão do método foi realizada através do preparo de amostras fortificadas compreendendo a faixa de 50 a 150 % da concentração teórica do teste, enquanto a avaliação dos limites de detecção e quantificação foi realizada através do preparo de amostras brancas (placebo puro da formulação de comprimidos de LF).

4.2.3.1.4.1 Preparo das amostras brancas

As amostras brancas foram preparadas através da dispersão de 259,96; 259,99; 260,01 miligramas (Dia 1/Analista 1); de 260,04; 260,02; 259,98 miligramas (Dia 1/Analista 2); de 259,97; 260,04; 259,96 miligramas (Dia 2/Analista 1); e de 260,03; 259,95; 260,05 miligramas (Dia 2/Analista 2) de pó da formulação do placebo puro em 100 mililitros de solução diluente. As amostras foram então filtradas em papel de filtro quantitativo. Em seguida, alíquotas de 10 mililitros de cada uma das réplicas foram diluídas em 50 mililitros de solução diluente.

4.2.3.1.4.2 Preparo das amostras fortificadas a 50, 100 e 150% com LF

As amostras fortificadas a 50, 100 e 150% estoque foram preparadas através da solubilização de quantidade adequada do padrão de trabalho de LF e do placebo puro em volume suficiente de solução diluente para se atingir concentrações próximas a 100, 200 e 300 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. As massas pesadas do padrão de trabalho e do placebo, assim como as diluições realizadas para o preparo dessas amostras estoque estão apresentadas na tabela 5 a seguir.

Tabela 5 - Esquema de preparo das amostras fortificadas a 50, 100 e 150% com LF estoque

Nível de concentração	Dia/Analista	Padrão de trabalho (mg)	Placebo puro (mg)	Volume da solução estoque (mL)	Concentração aproximada (µg/mL)
Amostra fortificada a 50% estoque	Dia 1 Analista 1	9,93	260,01	100	100
		9,92	260,04	100	100
		10,08	259,98	100	100
	Dia 1 Analista 2	9,98	260,03	100	100
		9,92	260,02	100	100
		10,03	259,96	100	100
	Dia 2 Analista 1	10,08	260,05	100	100
		9,96	260,01	100	100
		10,05	259,95	100	100
	Dia 2 Analista 2	9,92	259,98	100	100
		9,99	260,03	100	100
		10,02	260,04	100	100
Amostra fortificada a 100% estoque	Dia 1 Analista 1	19,96	260,02	100	200
		19,98	260,05	100	200
		20,04	259,92	100	200
	Dia 1 Analista 2	19,99	260,00	100	200
		19,97	260,01	100	200
		20,01	259,99	100	200
	Dia 2 Analista 1	20,03	260,01	100	200
		19,98	260,05	100	200
		20,01	259,96	100	200
	Dia 2 Analista 2	20,05	259,99	100	200
		20,04	260,05	100	200
		19,99	260,02	100	200
Amostra fortificada a 150% estoque	Dia 1 Analista 1	30,03	260,03	100	300
		30,01	260,04	100	300
		29,96	259,99	100	300
	Dia 1 Analista 2	29,98	259,96	100	300
		30,04	259,98	100	300
		30,02	260,01	100	300
	Dia 2 Analista 1	30,03	260,03	100	300
		29,96	260,04	100	300
		29,99	259,96	100	300
	Dia 2 Analista 2	29,98	260,04	100	300
		30,02	259,98	100	300
		30,05	259,95	100	300

Em seguida alíquotas de 10 mililitros de cada uma das réplicas das amostras fortificadas a 50, 100 e 150% com LF foram diluídas em 100 mililitros de solução diluente para se atingir concentrações próximas a 20, 40 e 60 µg/mL, respectivamente.

4.2.3.1.4.3 Condução dos ensaios para avaliação da exatidão, precisão, limites de detecção e quantificação

As amostras descritas em 4.2.3.1.4.1 (página 90) e 4.2.3.1.4.2 (página 90) foram preparadas no mesmo laboratório analítico, por dois analistas diferentes, em dois dias consecutivos e analisadas em dois equipamentos diferentes gerando no total quatro experimentos de acordo com o esquema da tabela 6.

Tabela 6 - Esquema para execução dos testes de precisão e exatidão

	Dia 1		Dia 2	
	Manhã	Tarde	Manhã	Tarde
Analista 1	Experimento 1	---	---	Experimento 4
Analista 2	---	Experimento 2	Experimento 3	---
	Balança	Balança	Balança	Balança
	Analítica Mettler	Analítica Mettler	Analítica Mettler	Analítica Mettler
Equipamentos	Toledo AX205	Toledo AX205	Toledo AX205	Toledo AX205
	CLAE DAD	CLAE DAD	CLAE UV	CLAE UV

4.2.3.1.5 Amostras para avaliação da robustez

Este parâmetro foi avaliado através do teste de *Youden Steiner*, o qual se constitui em um método confiável para avaliação da robustez, por meio de um delineamento que envolve sete parâmetros analíticos combinados em oito experimentos. A ideia básica desse teste é não se estudar apenas uma alteração por vez e sim, introduzir várias alterações simultaneamente de tal forma que o efeito de cada uma delas possa ser determinado adequadamente (YOU DEN; STEINER, 1975).

Neste teste foram avaliadas sete variáveis do método através de oito análises de uma solução padrão de trabalho e uma amostra fortificada a 100% com LF de acordo com a tabela 7.

Tabela 7 - Combinação de variáveis para realização do teste de *Youden Steiner*

VARIÁVEIS	ANÁLISES							
	1	2	3	4	5	6	7	8
A, a	A	A	A	A	a	a	a	a
B, b	B	B	b	b	B	B	b	b
C, c	C	c	C	c	C	c	C	c
D, d	D	D	d	d	d	d	D	D
E, e	E	e	E	e	e	E	e	E
F, f	F	f	f	F	F	f	f	F
G, g	G	g	g	G	g	G	G	g
Resultado	S	t	u	v	w	x	y	z

As sete variáveis escolhidas para avaliação da robustez do método e os limites superiores e inferiores adotados para cada uma delas se encontram resumidos na tabela 8 a seguir.

Tabela 8 - Variáveis e limites superiores e inferiores para avaliação da robustez

VARIÁVEL		LIMITE SUPERIOR E INFERIOR
A	Coluna cromatográfica	a: C18 125 mm x 4,0 mm, 5µm A: C8 125 mm x 4,0 mm, 5µm
B	Comprimento de onda de detecção	b: 259 nm B: 263 nm
C	Fluxo de corrida	c: 0,90 mL/minuto C: 1,10 mL/minuto
D	Proporção do gradiente de fase móvel Variação do final do gradiente (Tempo 15 min)	d: Tempo 15 min - 22:78 D: Tempo 15 min - 18:82 Solução acetato de amônio 10 mM : acetonitrila
E	Volume de injeção	e: 18 µL E: 22 µL
F	Temperatura do forno	f: 24°C F: 26°C
G	Unidade filtrante	g: Unidade filtrante de PVDF porosidade de 0,45 µm G: Unidade filtrante de celulose regenerada porosidade de 0,45 µm

4.2.3.1.5.1 Preparo da solução padrão de trabalho e da solução placebo fortificada a 100 % com LF para avaliação da robustez

A solução padrão estoque foi preparada solubilizando-se 19,98 miligramas de padrão de trabalho de LF em 100 mililitros de solução diluente para se atingir uma concentração próxima a 200 µg/mL. Posteriormente, 10 mililitros da solução padrão estoque foram diluídos em 50 mililitros de solução diluente para se obter uma solução padrão em concentração próxima a 40 µg/mL.

A solução placebo fortificada a 100% com LF estoque foi preparada através da dispersão de 20,01 miligramas do padrão de trabalho de LF e 260,02 miligramas do placebo puro em 100 mililitros de solução diluente para se atingir uma concentração próxima a 200 µg/mL. Posteriormente, uma alíquota de 10 mililitros da solução placebo fortificada a 100% com LF estoque foi coletada e diluída em 50 mililitros de solução diluente para se obter uma concentração próxima a 40 µg/mL.

4.2.3.1.6 Amostras para avaliação da estabilidade das soluções

As amostras da solução padrão de referência, solução padrão de trabalho e solução placebo fortificada a 100% com LF utilizadas para avaliação da seletividade foram armazenadas à temperatura ambiente por 24 horas e, em seguida, foram utilizadas para avaliação da estabilidade das soluções.

4.2.3.2 Método de análise por CLAE

As amostras preparadas para validação da metodologia analítica, que se encontram no item 4.2.3.1 (página 85), foram filtradas para *vials* com auxílio de unidade filtrante e analisadas em triplicata empregando o método por CLAE gradiente B considerado indicativo de estabilidade que se encontra no item 4.2.1.2.2 (página 77).

4.2.4 Avaliação do estudo de estabilidade de comprimidos de LF

Uma determinada formulação em escala de bancada de comprimidos de LF na dosagem de 20 mg foi desenvolvida e acondicionada nas embalagens blíster de cloreto de polivinilideno (PVDC) e frasco plástico opaco. Os comprimidos de LF nas duas embalagens foram colocados em duas câmaras de estabilidade: câmara para estudo de estabilidade acelerada [(40±2)°C e (75±5)%UR] e câmara para estudo de estabilidade de longa duração [(30±2)°C e (75±5)%UR].

A duração do estudo de estabilidade acelerada foi de 6 meses, sendo que foram retiradas amostras nos tempos correspondentes a 0, 3 e 6 meses. Já a duração do estudo de estabilidade de longa duração proposto foi de 24 meses, sendo que foram retiradas amostras nos tempos correspondentes a 0, 3, 6, 9 e 12 meses.

Foram realizadas as análises de teor e substâncias relacionadas para todas as amostras retiradas das câmaras empregando o método indicativo de estabilidade validado.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Desenvolvimento do método analítico para quantificação do teor e substâncias relacionadas por CLAE a partir da análise das amostras do estudo de cinética de degradação forçada da matéria-prima de LF

As árvores de decisão citadas na descrição dos testes de degradação forçada (item 1.4.2) possuem a finalidade de facilitar a escolha das condições ideais para obtenção dos produtos da hidrólise ácida, básica, oxidação, degradação termolítica e fotolítica. Entretanto com o objetivo de agilizar a obtenção dessas amostras para desenvolvimento do método, as condições iniciais de degradação tais como concentração do agente estressante, temperatura, pH e concentrações iniciais e finais do fármaco LF foram retiradas de referência científica obtida na literatura.

Foram adotadas as seguintes condições experimentais de degradação para a matéria-prima de LF: hidrólise ácida empregando HCl 1 M sob refluxo; hidrólise básica empregando NaOH 0,005 M; oxidação empregando H₂O₂ 30% sob refluxo; degradação termolítica a 80°C e degradação fotolítica empregando exposição às radiações visível e ultravioleta (KHER et al., 2011; MIRON; SOLDATTELLI; SCHAPOVAL, 2006).

Os tempos de reação necessários para obtenção de uma extensão de degradação adequada (faixa de 10 a 30%), para cada uma das condições de degradação citadas anteriormente, foram obtidos a partir do estudo de cinética de degradação forçada (item 5.2).

5.1.1 Método por CLAE da USP 34

Foram realizadas as análises empregando as condições cromatográficas da USP 34 descritas no item 4.2.1.2.1 das amostras de matéria prima de LF degradadas após hidrólise ácida com HCl 1 M sob refluxo por 5 horas, após hidrólise básica com NaOH 0,005 M à temperatura ambiente no tempo zero e após oxidação com solução de H₂O₂ 30% sob refluxo por 15 minutos. As figuras 9, 10 e 11 representam cada uma dessas corridas cromatográficas respectivamente.

Figura 9 – Cromatograma da matéria-prima de LF após hidrólise ácida com HCl 1 M sob refluxo por 5 horas após análise pelo método por CLAE da USP 34 [Fase móvel composta de água:ACN:triethylamina (65:35:0,5) ajustada para pH 4,0 com ácido fosfórico; fluxo de 1,0 mL/min; coluna C18 (125x4,0) mm, 5 µm a 25°C; volume de injeção de 10 µL; detecção no UV/VIS em 210 nm].

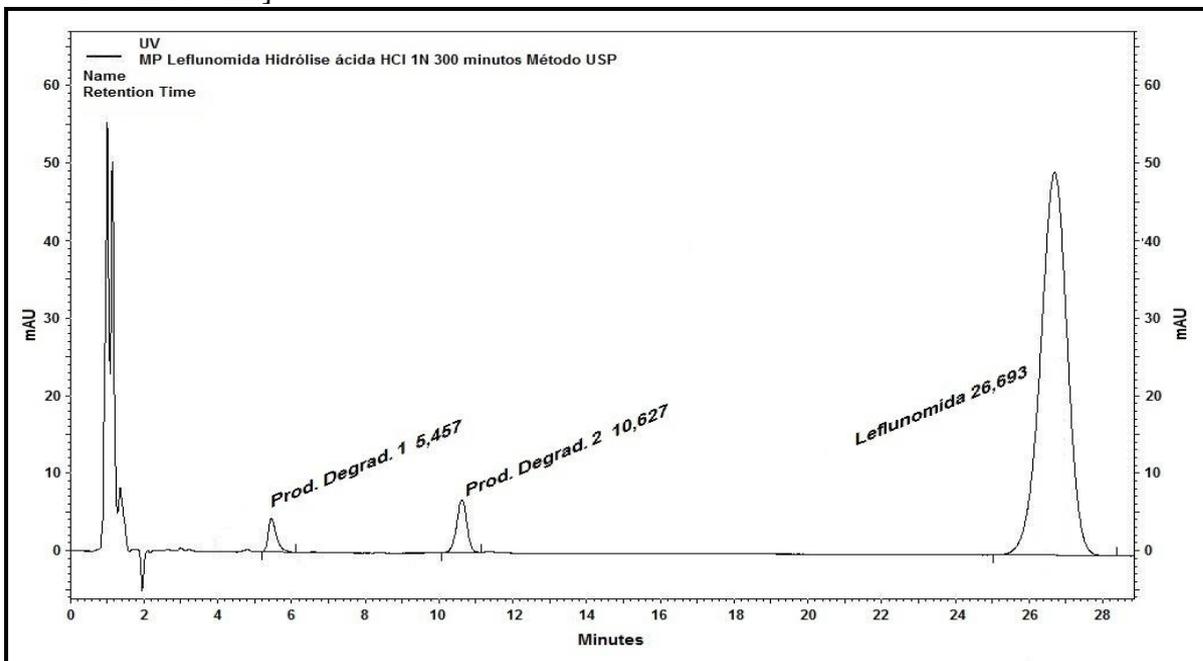


Figura 10 – Cromatograma da matéria-prima de LF após hidrólise básica com NaOH 0,005 M à temperatura ambiente por 25 segundos após análise pelo método por CLAE da USP 34 [Fase móvel composta de água:ACN:triethylamina (65:35:0,5) ajustada para pH 4,0 com ácido fosfórico; fluxo de 1,0 mL/min; coluna C18 (125x4,0) mm, 5 µm a 25°C; volume de injeção de 10 µL; detecção no UV/VIS em 210 nm].

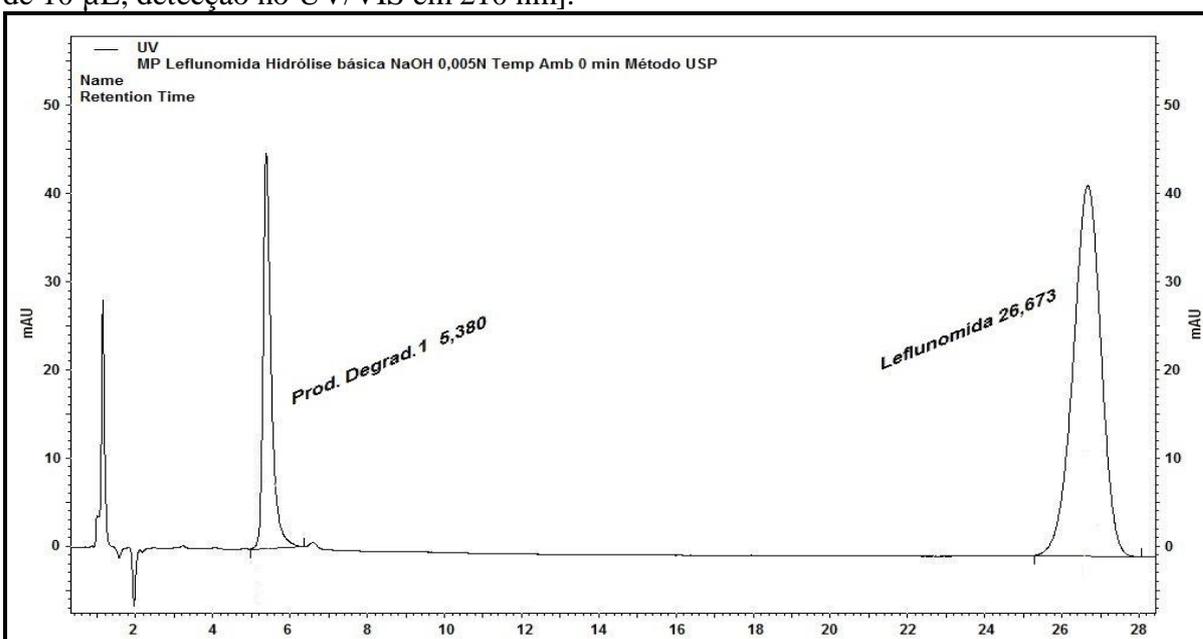
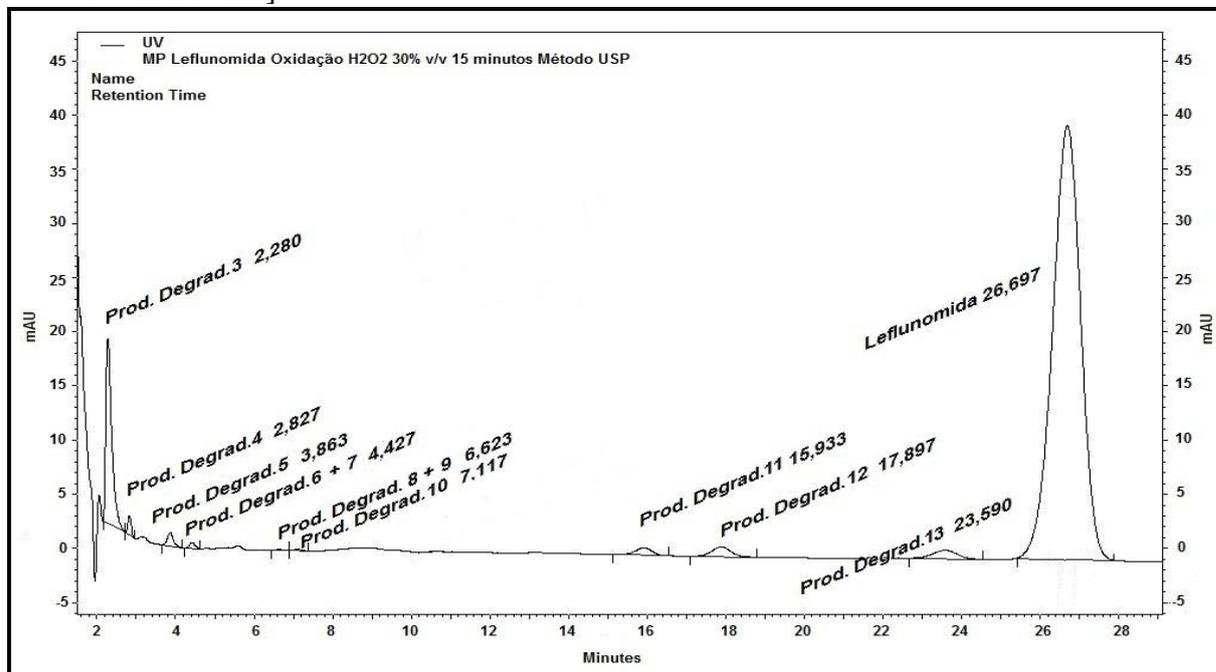


Figura 11 – Cromatograma da matéria-prima de LF após oxidação com H₂O₂ 30% sob refluxo por 15 minutos após análise pelo método por CLAE da USP 34 [Fase móvel composta de água:ACN:triethylamina (65:35:0,5) ajustada para pH 4,0 com ácido fosfórico; fluxo de 1,0 mL/min; coluna C18 (125x4,0) mm, 5 µm a 25°C; volume de injeção de 10 µL; detecção no UV/VIS em 210 nm].



Pode-se afirmar, após observar os cromatogramas das figuras 9 e 10, que a metodologia por CLAE, empregando as condições cromatográficas da USP 34, possibilitou a separação da LF e dos produtos de degradação gerados com uma resolução adequada nas condições de degradação da matéria-prima após hidrólise ácida e básica, respectivamente. No entanto, após visualizar o cromatograma da figura 11, o qual representa a condição de degradação da matéria-prima após oxidação, pode-se concluir que os produtos de degradação 3 e 4, os quais foram eluídos entre os tempos de 2 e 3 minutos no início do cromatograma, não foram separados com resolução adequada, visto que a linha de base neste intervalo do cromatograma encontrou-se com uma inclinação (*threshold*) não adequada para integração dos picos. Além disso, houve coeluição dos produtos de degradação 6 e 7 e dos produtos de degradação 8 e 9.

Uma outra questão importante diz respeito à fase móvel que foi empregada na metodologia da USP 34, a qual utilizou o ácido fosfórico como modificador de pH. Este ácido, classificado como inorgânico, é incompatível com as técnicas de CLAE-EM, visto que pode causar corrosão nas peças metálicas da interface de ionização do espectrômetro de massas. Dessa forma, optou-se pela não utilização desta metodologia farmacopeica, pois

pretendia-se utilizar uma metodologia por CLAE que fosse compatível com a técnica de CLAE-EM.

De acordo com informações sobre soluções adequadas para utilização nas técnicas de CLAE-EM bem como dados sobre as condições ótimas de ionização da molécula da LF em modo negativo, optou-se pela substituição da fase móvel da USP 34 pelo acetato de amônio na concentração de 10 mM (JOSHI et. al, 2011). Esta foi empregada no desenvolvimento dos métodos por CLAE isocrático e gradiente que se encontram nos itens 4.2.1.2.1 e 4.2.1.2.2 (página 77).

5.1.2 Método por CLAE isocrático A

Foram realizadas algumas modificações no método por CLAE da USP 34 para que fosse estabelecido o método por CLAE isocrático A. Dentre essas modificações podemos citar: alteração do comprimento de onda de detecção para 261 nm; alteração do volume de injeção para 20 μ L; e alteração da fase móvel para solução de acetato de amônio 10 mM : acetonitrila (40:60).

A fase móvel foi alterada para solução de acetato de amônio 10 mM : acetonitrila (40:60) com o objetivo de facilitar um posterior acoplamento à técnica de CLAE-EM. A proporção de acetonitrila foi aumentada em 25 % em relação ao método por CLAE isocrático da USP na tentativa de se diminuir o tempo de corrida cromatográfica desde que fosse obtida resolução adequada na separação de todos os produtos de degradação.

O comprimento de onda foi alterado de 210 para 261 nm com o objetivo de diminuir a interferência cromatográfica de componentes provenientes da fase móvel e da solução diluente que porventura poderiam dificultar a quantificação da LF e dos produtos de degradação. Outra razão para essa alteração é que, por estar situado próximo ao máximo de absorção no espectro da LF, a análise das amostras no comprimento de onda de 261 nm provocou um aumento de sensibilidade para a LF e produtos de degradação que mantiveram o grupamento cromóforo da LF, facilitando a visualização e integração destes picos. A alteração do volume de injeção de 10 para 20 μ L também foi realizada com o mesmo propósito.

Foram realizadas as análises, empregando as condições cromatográficas do método em eluição isocrática A, das amostras de matéria prima de LF degradadas após hidrólise ácida com HCl 1 M sob refluxo por 5 horas, após hidrólise básica com NaOH 0,005 M à

temperatura ambiente no tempo zero e após oxidação com solução de H_2O_2 30% sob refluxo por 15 minutos. As figuras 12, 13 e 14 a seguir representam cada uma dessas corridas cromatográficas respectivamente.

Figura 12 – Cromatograma da matéria-prima de LF após hidrólise ácida com HCl 1 M sob refluxo por 5 horas após análise pelo método por CLAE isocrático A [Fase móvel composta de acetato de amônio 10 mM:ACN (40:60); fluxo de 1,0 mL/min; coluna C18 (125x4,0) mm, 5 μm a 25°C; volume de injeção de 20 μL ; detecção no UV/VIS em 261 nm].

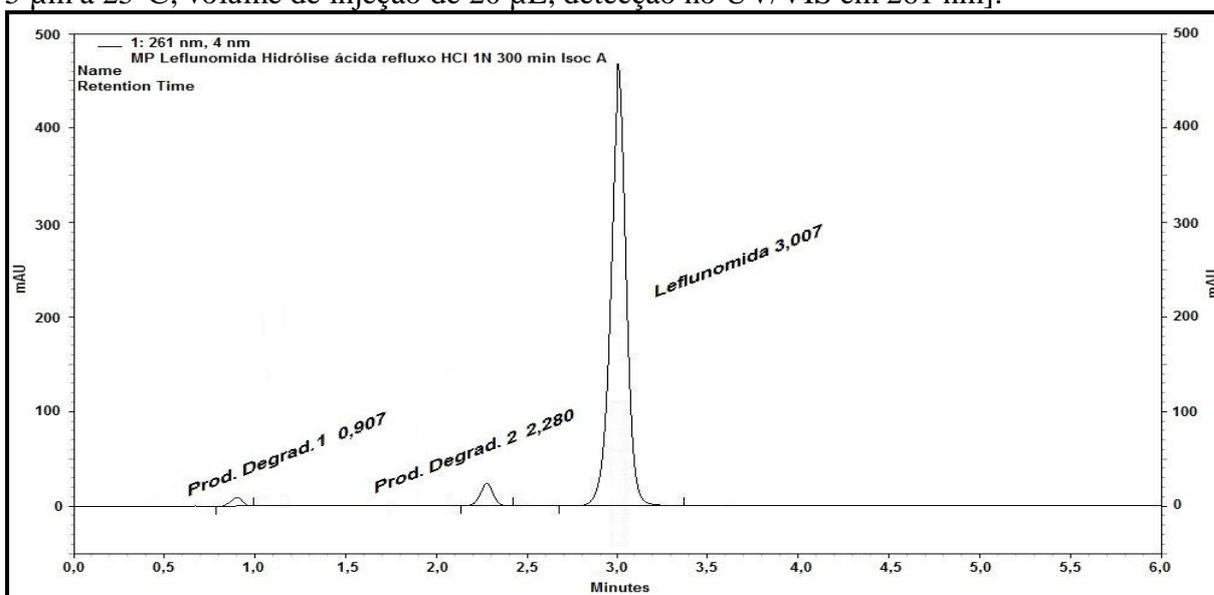


Figura 13 – Cromatograma da matéria-prima de LF após hidrólise básica com NaOH 0,005 M à temperatura ambiente por 25 segundos após análise pelo método por CLAE isocrático A [Fase móvel composta de acetato de amônio 10 mM:ACN (40:60); fluxo de 1,0 mL/min; coluna C18 (125x4,0) mm, 5 μm a 25°C; volume de injeção de 20 μL ; detecção no UV/VIS em 261 nm].

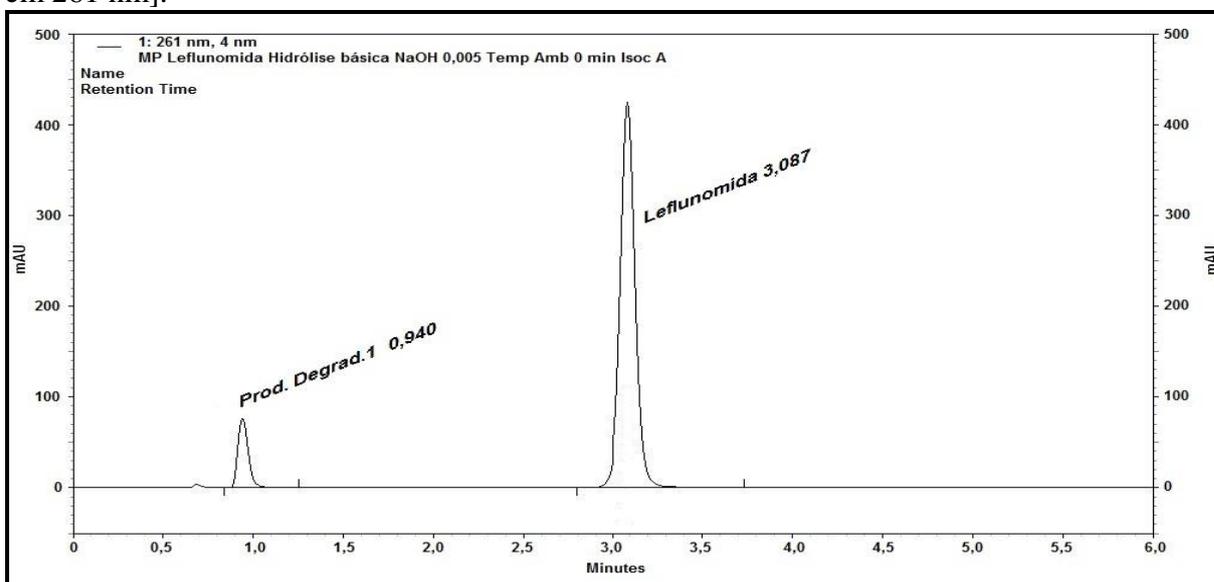
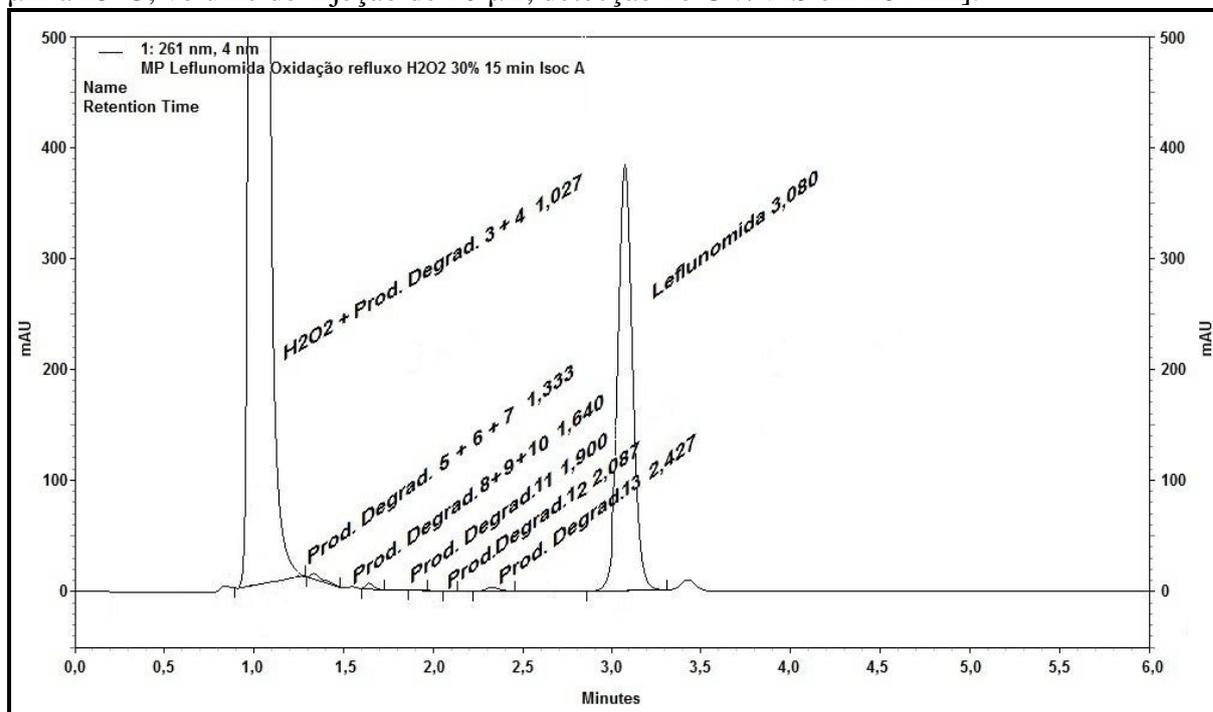


Figura 14 – Cromatograma da matéria-prima de LF após oxidação com H₂O₂ 30% sob refluxo por 15 minutos após análise pelo método por CLAE isocrático A [Fase móvel composta de acetato de amônio 10 mM:ACN (40:60); fluxo de 1,0 mL/min; coluna C18 (125x4,0) mm, 5 µm a 25°C; volume de injeção de 20 µL; detecção no UV/VIS em 261 nm].



Pode-se afirmar, após observar os cromatogramas das figuras 12 e 13, que o método por CLAE isocrático A possibilitou a separação da LF e dos produtos de degradação gerados com resolução aceitável nas condições de degradação da hidrólise ácida e básica.

Após visualizar o cromatograma da figura 14, pode-se concluir que não houve uma separação com resolução adequada para a LF e os produtos de degradação gerados após a condição de oxidação. Está nítido no cromatograma da figura 14 que houve a coeluição do H₂O₂ com os produtos de degradação 3 e 4; coeluição dos produtos de degradação 5, 6 e 7; e dos produtos de degradação 8, 9 e 10.

A partir do que foi exposto acima, pode-se afirmar que o método por CLAE isocrático A foi considerado não adequado como método analítico indicativo de estabilidade. Desta forma, o método por CLAE isocrático A foi alterado para que fosse estabelecido o método por CLAE isocrático B.

5.1.3 Método por CLAE isocrático B

A modificação realizada consistiu na alteração da proporção da fase móvel para solução de acetato de amônio 10 mM : acetonitrila (1:1). O resultado desta alteração foi a diminuição da quantidade de acetonitrila na fase móvel, implicando em uma menor força de eluição, com o objetivo de se otimizar a separação da LF e de seus produtos de degradação com resolução adequada.

Foram realizadas as análises, empregando as condições cromatográficas descritas no método em eluição isocrática B, das amostras de matéria prima de LF degradadas após hidrólise ácida com HCl 1 M sob refluxo por 5 horas, após hidrólise básica com NaOH 0,005 M à temperatura ambiente no tempo zero e após oxidação com solução de H₂O₂ 30% sob refluxo por 15 minutos. As figuras 15, 16 e 17 representam cada uma dessas corridas cromatográficas respectivamente.

Figura 15 – Cromatograma da matéria-prima de LF após hidrólise ácida com HCl 1 M sob refluxo por 5 horas após análise pelo método por CLAE isocrático B [Fase móvel composta de acetato de amônio 10 mM:ACN (50:50); fluxo de 1,0 mL/min; coluna C18 (125x4,0) mm, 5 µm a 25°C; volume de injeção de 20 µL; detecção no UV/VIS em 261 nm].

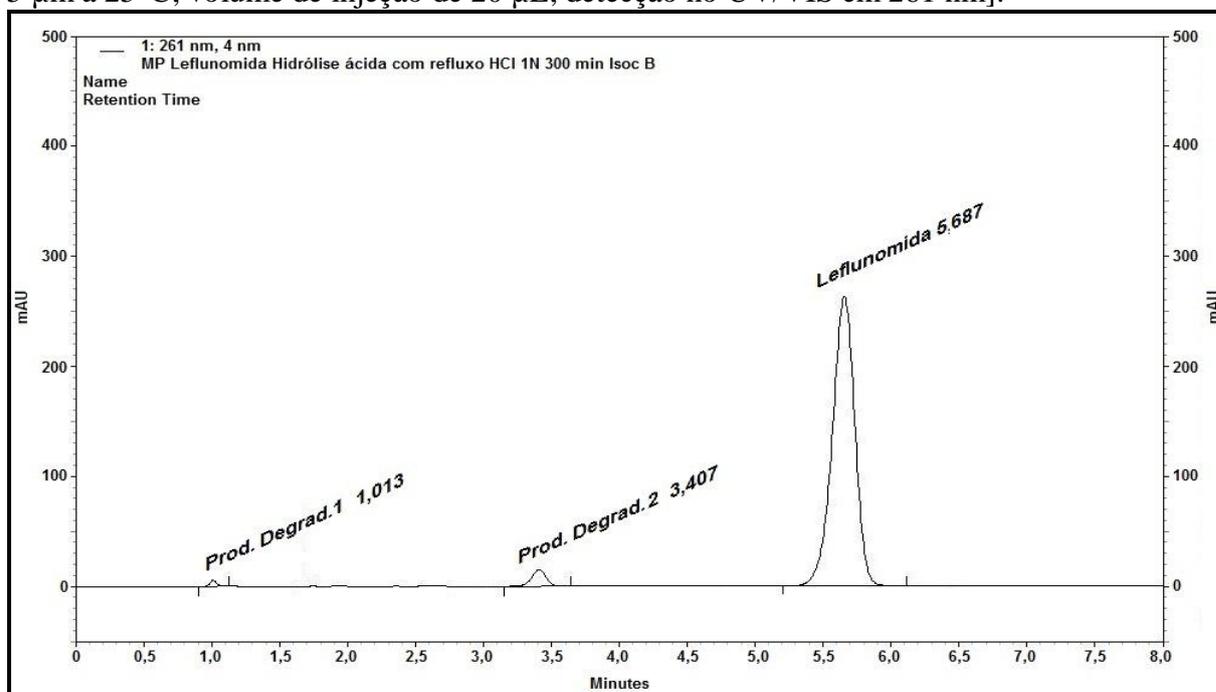


Figura 16 – Cromatograma da matéria-prima de LF após hidrólise básica com NaOH 0,005 M à temperatura ambiente por 25 segundos após análise pelo método por CLAE isocrático B [Fase móvel composta de acetato de amônio 10 mM:ACN (50:50); fluxo de 1,0 mL/min; coluna C18 (125x4,0) mm, 5 μ m a 25°C; volume de injeção de 20 μ L; detecção no UV/VIS em 261 nm].

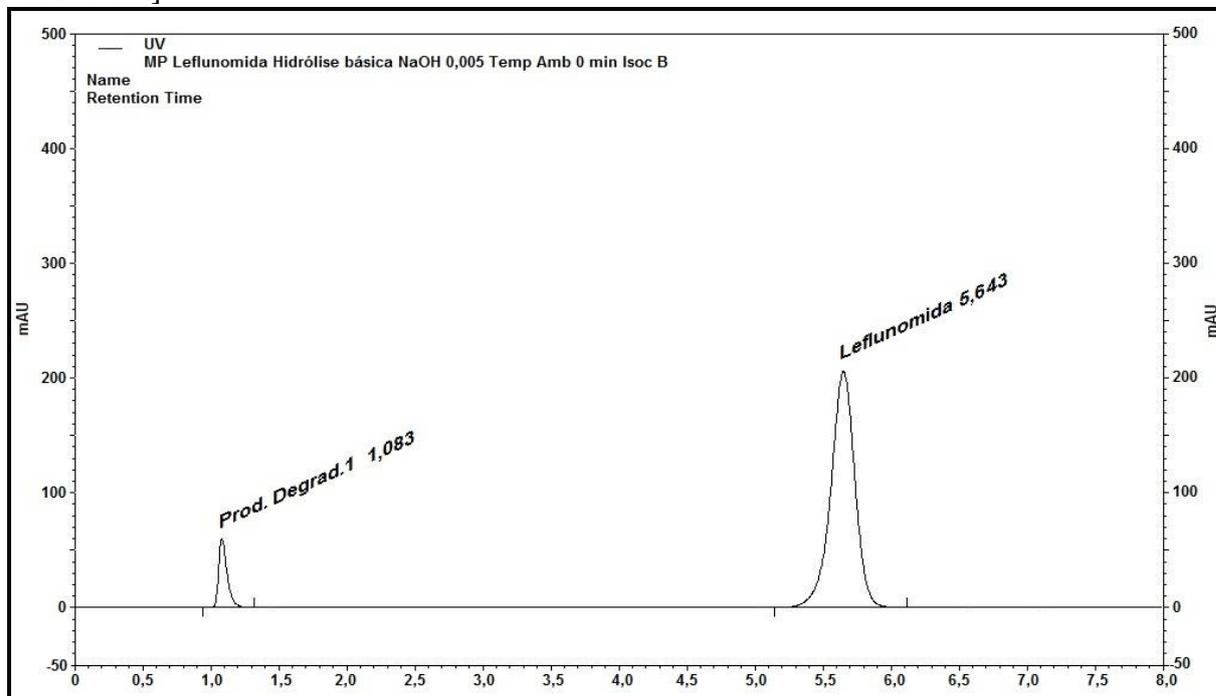
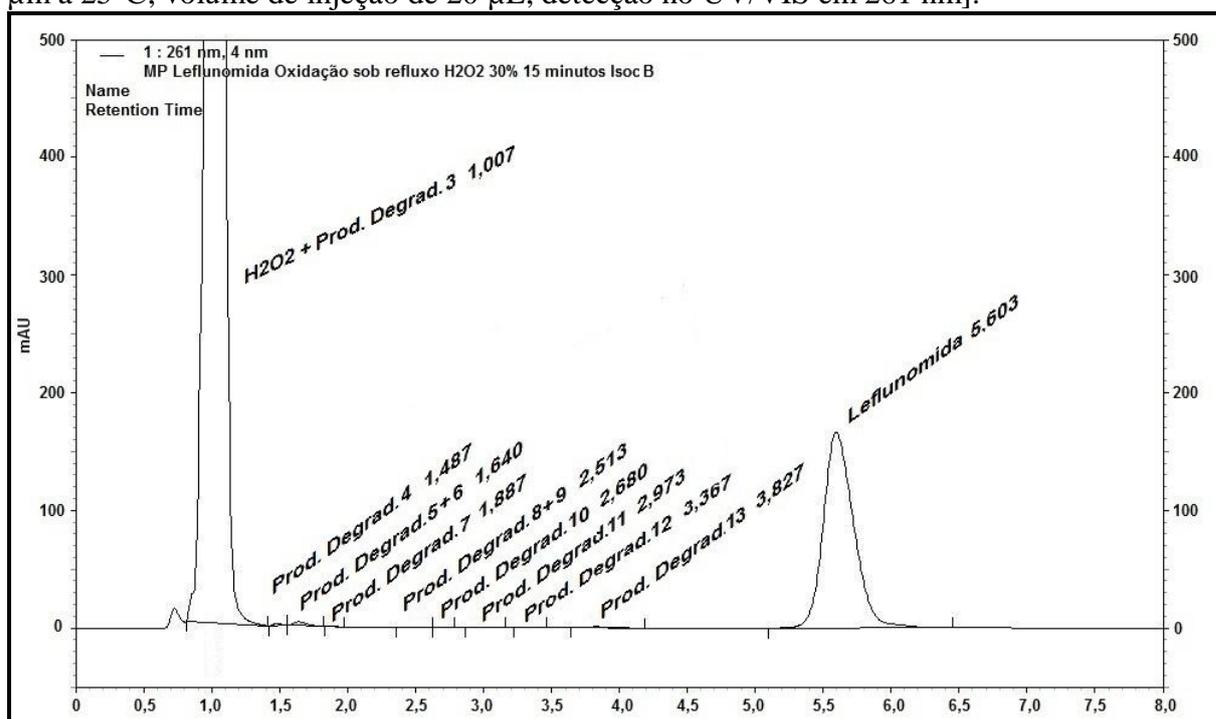


Figura 17 – Cromatograma da matéria-prima de LF após oxidação com H₂O₂ 30% sob refluxo por 15 minutos após análise pelo método por CLAE isocrático B [Fase móvel composta de acetato de amônio 10 mM:ACN (50:50); fluxo de 1,0 mL/min; coluna C18 (125x4,0) mm, 5 μ m a 25°C; volume de injeção de 20 μ L; detecção no UV/VIS em 261 nm].



Pode-se afirmar, após observar os cromatogramas das figuras 15 e 16, que o método por CLAE isocrático B possibilitou a separação da LF e dos produtos de degradação gerados com resolução aceitável nas condições de degradação da hidrólise ácida e básica.

Após visualizar o cromatograma da figura 17, pode-se concluir que não houve uma separação com resolução adequada para a LF e os produtos de degradação gerados após a condição de oxidação. Está nítido no cromatograma da figura 17 que houve a coeluição do produto de degradação 3 com o H_2O_2 e coeluição dos produtos de degradação 5 e 6 e dos produtos de degradação 8 e 9.

A partir do que foi exposto acima, pode-se afirmar que o método por CLAE isocrático B foi considerado não adequado como método analítico indicativo de estabilidade. Desta forma, o método por CLAE isocrático B foi adaptado para que fosse estabelecido o método por CLAE gradiente A.

5.1.4 Método por CLAE gradiente A

A modificação realizada foi a alteração da fase móvel de eluição isocrática para gradiente conforme a tabela 2 que se encontra no item 4.2.1.2.2 (página 77).

A alteração da fase móvel de eluição isocrática para gradiente foi necessária para otimizar a separação cromatográfica dos picos dos produtos de degradação nos cromatogramas das amostras degradadas, salientando o cromatograma da amostra de LF após oxidação, a qual possui produtos de degradação com ampla faixa de polaridade. Desta forma a eluição gradiente foi mais adequada para otimizar a resolução dos picos nesse tipo de amostra, a qual possui produtos de degradação de maior e menor polaridade.

Foram realizadas as análises, empregando as condições cromatográficas descritas no método em eluição gradiente A, das amostras de matéria prima de LF degradadas após hidrólise ácida com HCl 1 M sob refluxo por 5 horas, após hidrólise básica com NaOH 0,005 M à temperatura ambiente no tempo zero e após oxidação com solução de H_2O_2 30% sob refluxo por 15 minutos. As figuras 18, 19 e 20 a seguir representam cada uma dessas corridas cromatográficas respectivamente.

Figura 18 – Cromatograma da matéria-prima de LF após hidrólise ácida com HCl 1 M sob refluxo por 5 horas após análise pelo método por CLAE gradiente A [Fase móvel composta de acetato de amônio 10 mM:ACN (0 min-65:35; 15 min-20:80; 16 min-65:35 e 20 min-65:35); fluxo de 1,0 mL/min; coluna C18 (125x4,0) mm, 5 µm a 25°C; volume de injeção de 20 µL; detecção no UV/VIS em 261 nm].

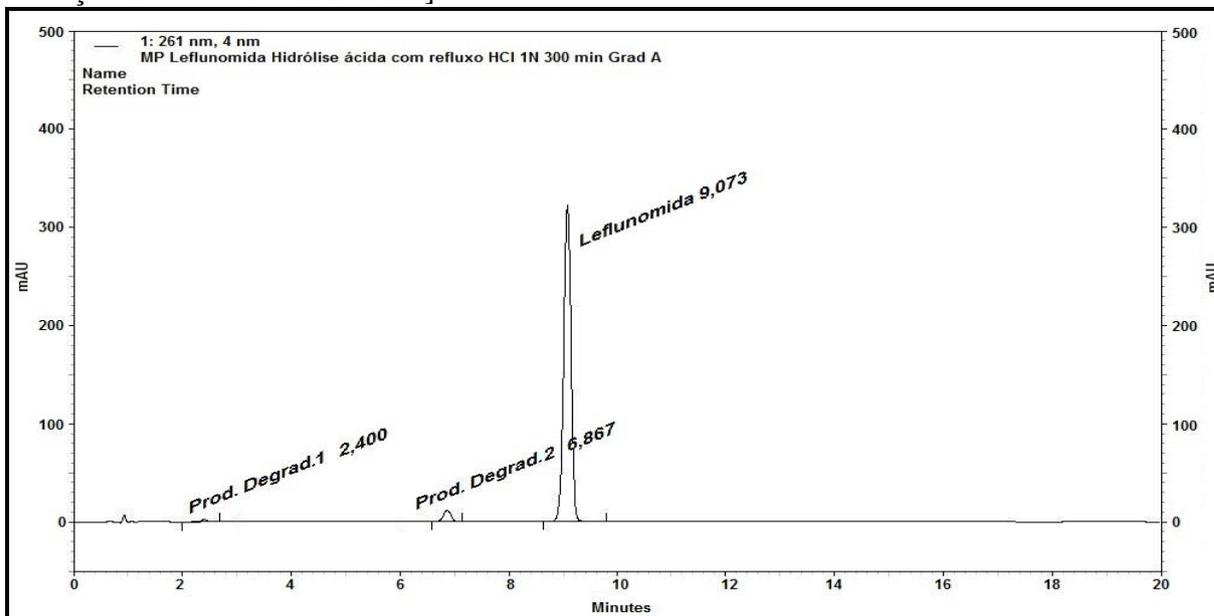


Figura 19 – Cromatograma da matéria-prima de LF após hidrólise básica com NaOH 0,005 M à temperatura ambiente por 25 segundos após análise pelo método por CLAE gradiente A [Fase móvel composta de acetato de amônio 10 mM:ACN (0 min-65:35; 15 min-20:80; 16 min-65:35 e 20 min-65:35); fluxo de 1,0 mL/min; coluna C18 (125x4,0) mm, 5 µm a 25°C; volume de injeção de 20 µL; detecção no UV/VIS em 261 nm].

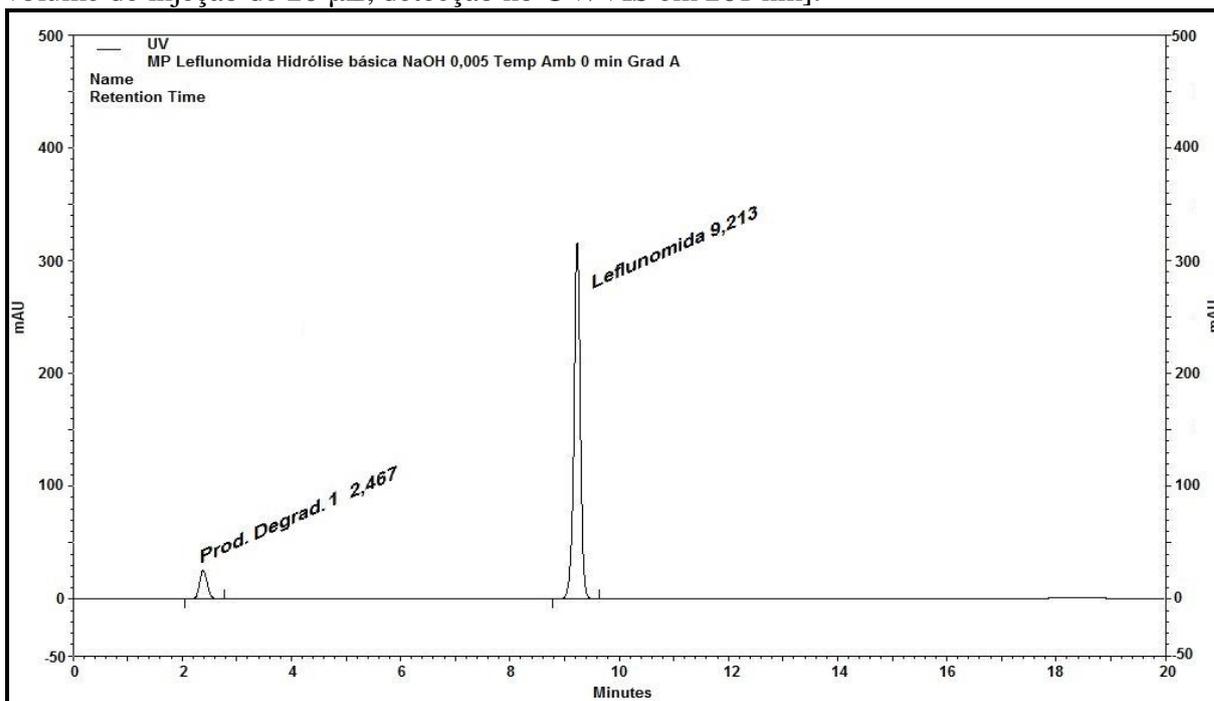
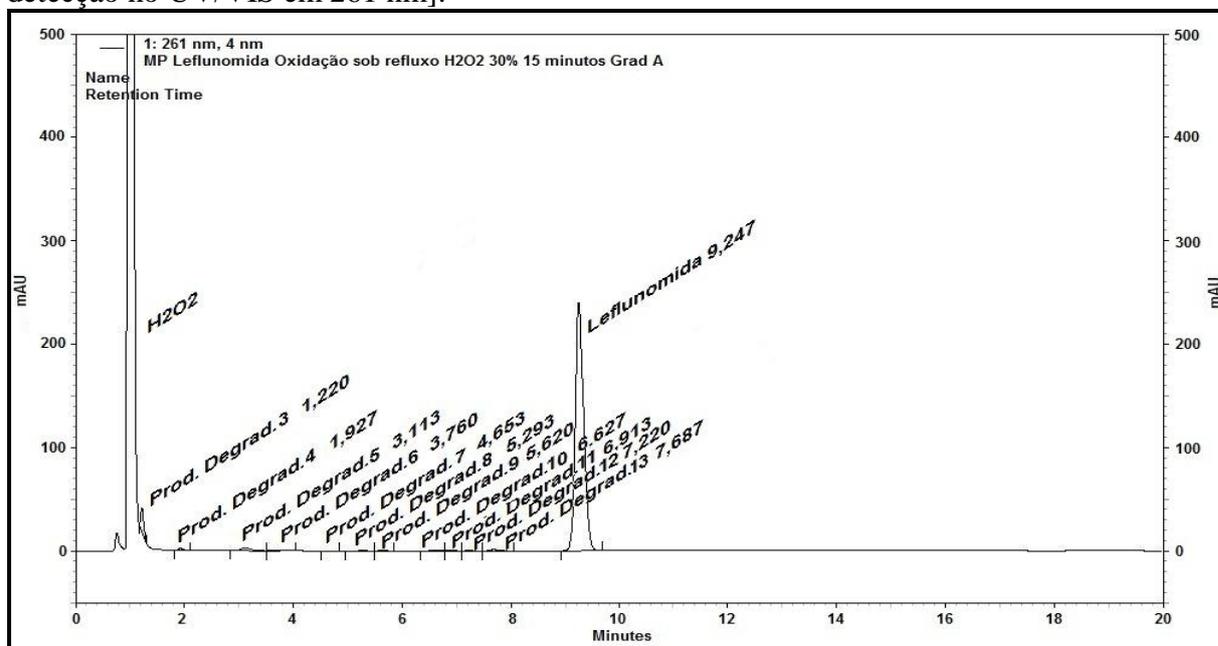


Figura 20 – Cromatograma da matéria-prima de LF após oxidação com H₂O₂ 30% sob refluxo por 15 minutos após análise pelo método por CLAE gradiente A [Fase móvel composta de acetato de amônio 10 mM:ACN (0 min-65:35; 15 min-20:80; 16 min-65:35 e 20 min-65:35); fluxo de 1,0 mL/min; coluna C18 (125x4,0) mm, 5 µm a 25°C; volume de injeção de 20 µL; detecção no UV/VIS em 261 nm].



Pode-se afirmar, após observar os cromatogramas das figuras 18 e 19, que o método por CLAE gradiente A possibilitou a separação da LF e dos produtos de degradação gerados com resolução aceitável nas condições de degradação da hidrólise ácida e básica.

Após visualizar o cromatograma da figura 20, pode-se concluir que houve separação com resolução aceitável para a LF e os produtos de degradação oriundos da oxidação, com exceção para o produto de degradação 3, o qual eluiu com a água oxigenada (H₂O₂).

Portanto, o método por CLAE gradiente A foi considerado não adequado como método analítico indicativo de estabilidade. Então, o método por CLAE gradiente A foi adaptado para que fosse estabelecido o método por CLAE gradiente B.

5.1.5 Método por CLAE gradiente B

Foi realizada uma alteração na proporção da fase móvel no início do gradiente (tempo zero minutos) para solução de acetato de amônio 10 mM : acetonitrila (7:3), a qual se encontra no esquema da tabela 2 do item 4.2.1.2.2 (página 77).

A alteração em questão se tornou necessária para atenuar a força de eluição do gradiente de fase móvel no início da corrida cromatográfica, com o objetivo de separar com resolução adequada o produto de degradação 3 da água oxigenada (H₂O₂).

Foram realizadas as análises, empregando as condições cromatográficas descritas no método por eluição em gradiente B, das amostras de matéria prima de LF degradadas após hidrólise ácida com HCl 1 M sob refluxo por 5 horas, após hidrólise básica com NaOH 0,005 M à temperatura ambiente no tempo zero e após oxidação com solução de H₂O₂ 30 % sob refluxo por 15 minutos. Essas corridas cromatográficas estão representadas nas figuras 21 a 26.

Figura 21 – Cromatograma da matéria-prima de LF após hidrólise ácida com HCl 1 M sob refluxo por 5 horas após análise pelo método por CLAE gradiente B [Fase móvel composta de acetato de amônio 10 mM:ACN (0 min-70:30; 15 min-20:80; 16 min-70:30 e 20 min-70:30); fluxo de 1,0 mL/min; coluna C18 (125x4,0) mm, 5 µm a 25°C; volume de injeção de 20 µL; detecção no UV/VIS em 261 nm].

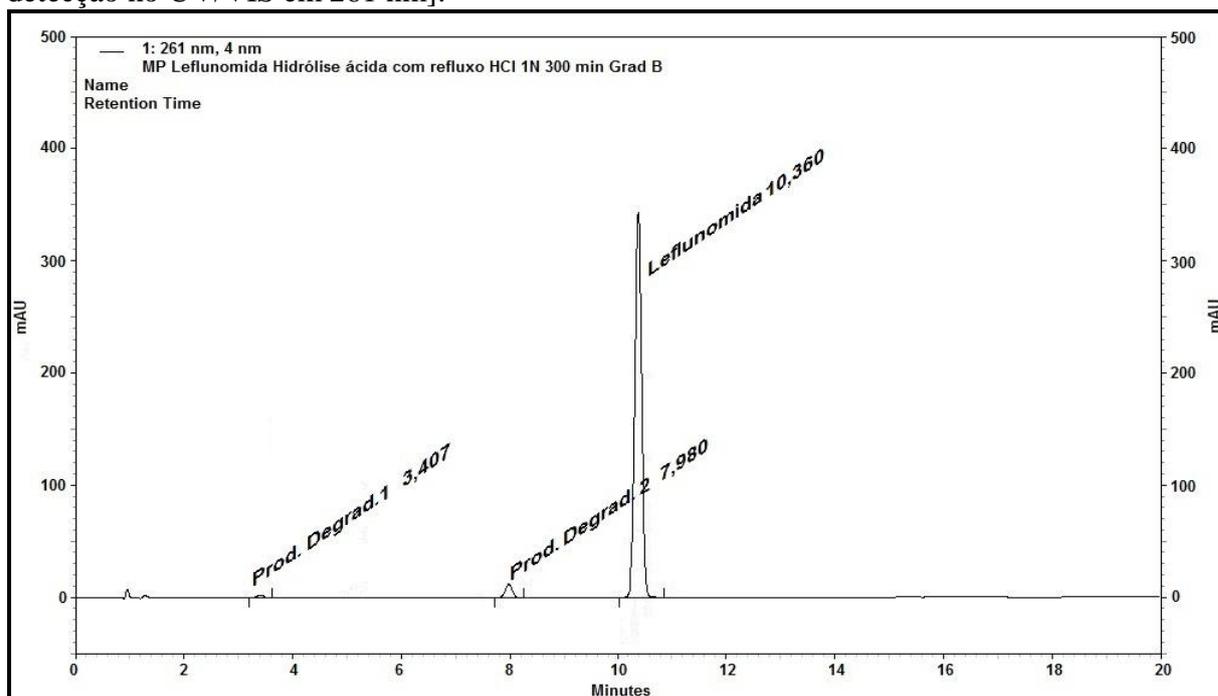


Figura 22 – Sobreposição com aproximação dos cromatogramas da matéria-prima de LF após hidrólise ácida com HCl 1 M sob refluxo por 5 horas; da solução branco da hidrólise ácida e da solução diluente após análise pelo método por CLAE gradiente B [Fase móvel composta de acetato de amônio 10 mM:ACN (0 min-70:30; 15 min-20:80; 16 min-70:30 e 20 min-70:30); fluxo de 1,0 mL/min; coluna C18 (125x4,0) mm, 5 µm a 25°C; volume de injeção de 20 µL; detecção no UV/VIS em 261 nm].

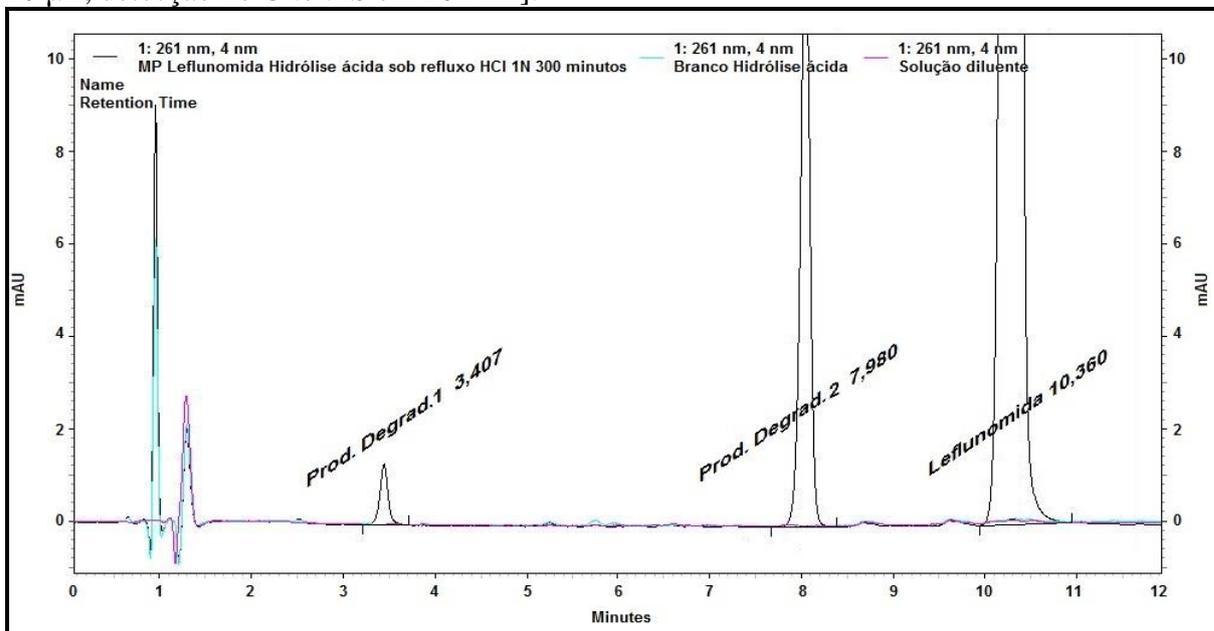


Figura 23 – Cromatograma da matéria-prima de LF após hidrólise básica com NaOH 0,005 M à temperatura ambiente por 25 segundos após análise pelo método por CLAE gradiente B [Fase móvel composta de acetato de amônio 10 mM:ACN (0 min-70:30; 15 min-20:80; 16 min-70:30 e 20 min-70:30); fluxo de 1,0 mL/min; coluna C18 (125x4,0) mm, 5 µm a 25°C; volume de injeção de 20 µL; detecção no UV/VIS em 261 nm].

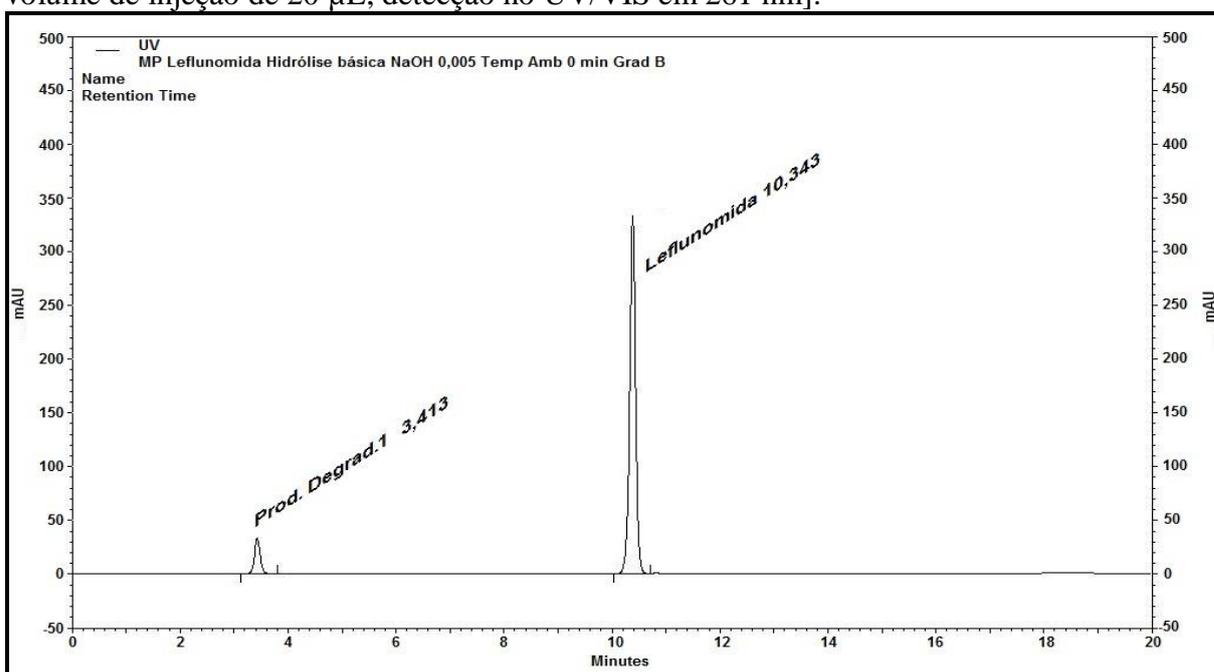


Figura 24 – Sobreposição com aproximação dos cromatogramas da matéria-prima de LF após hidrólise básica com NaOH 0,005 M à temperatura ambiente por 25 segundos; da solução branco da hidrólise básica e da solução diluente após análise pelo método por CLAE gradiente B [Fase móvel composta de acetato de amônio 10 mM:ACN (0 min-70:30; 15 min-20:80; 16 min-70:30 e 20 min-70:30); fluxo de 1,0 mL/min; coluna C18 (125x4,0) mm, 5 μ m a 25°C; volume de injeção de 20 μ L; detecção no UV/VIS em 261 nm].

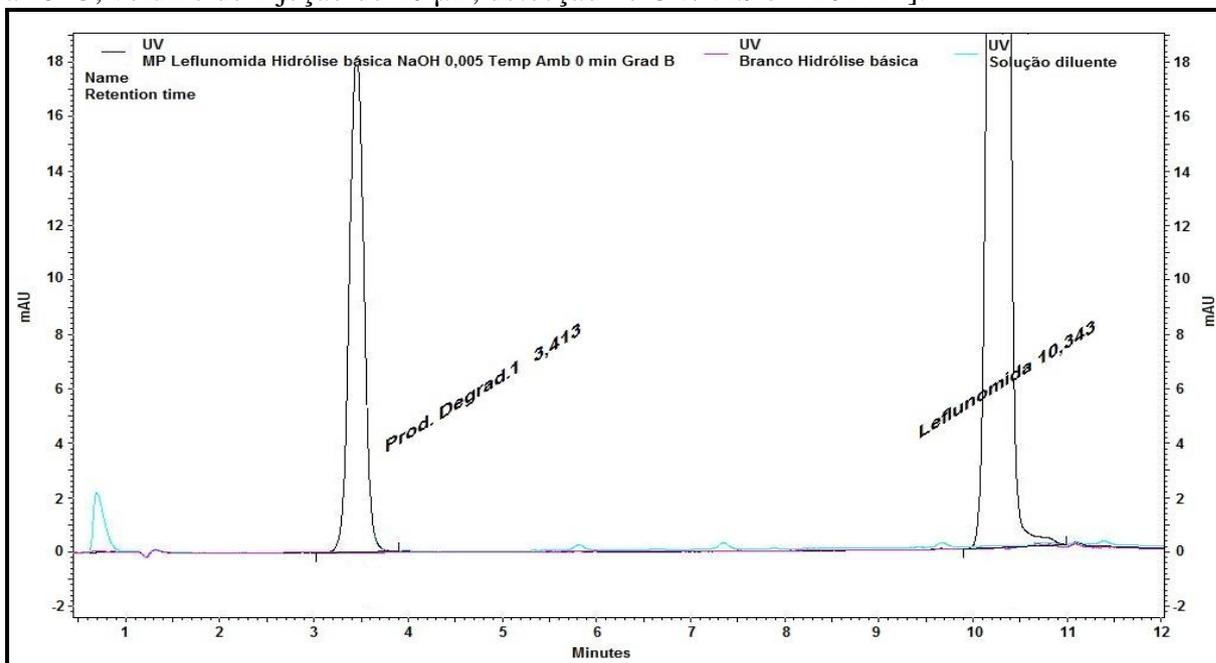


Figura 25 – Cromatograma da matéria-prima de LF após oxidação com H₂O₂ 30% sob refluxo por 15 minutos após análise pelo método por CLAE gradiente B [Fase móvel composta de acetato de amônio 10 mM:ACN (0 min-70:30; 15 min-20:80; 16 min-70:30 e 20 min-70:30); fluxo de 1,0 mL/min; coluna C18 (125x4,0) mm, 5 μ m a 25°C; volume de injeção de 20 μ L; detecção no UV/VIS em 261 nm].

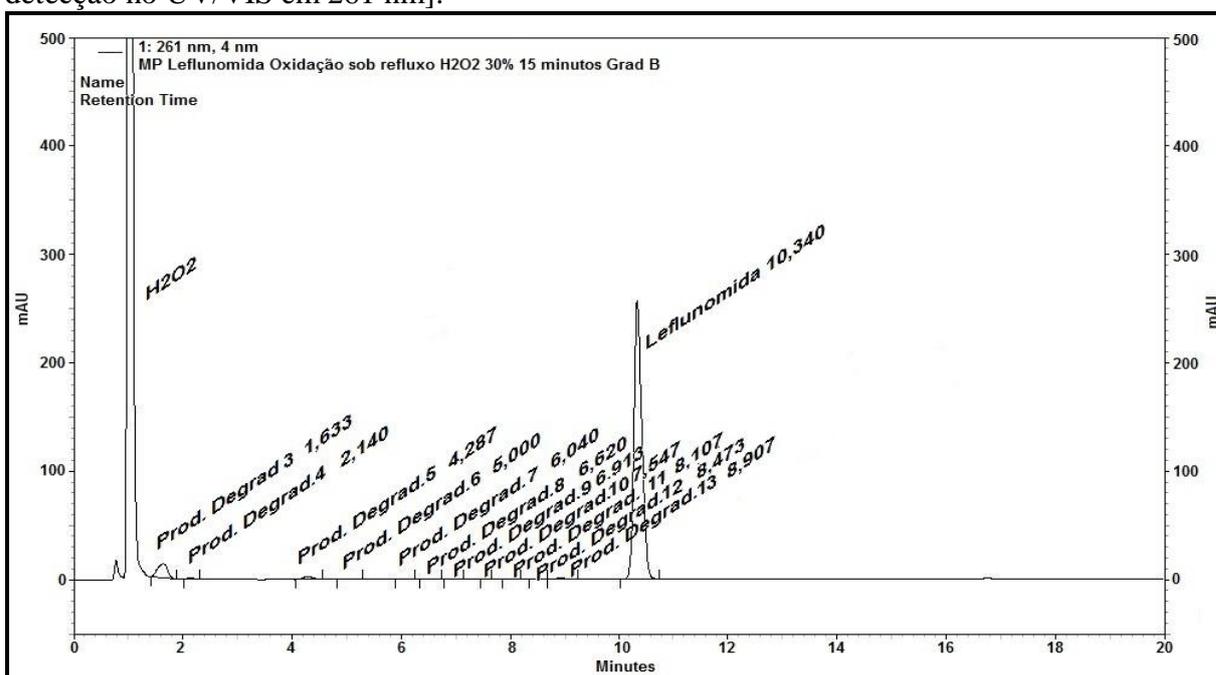
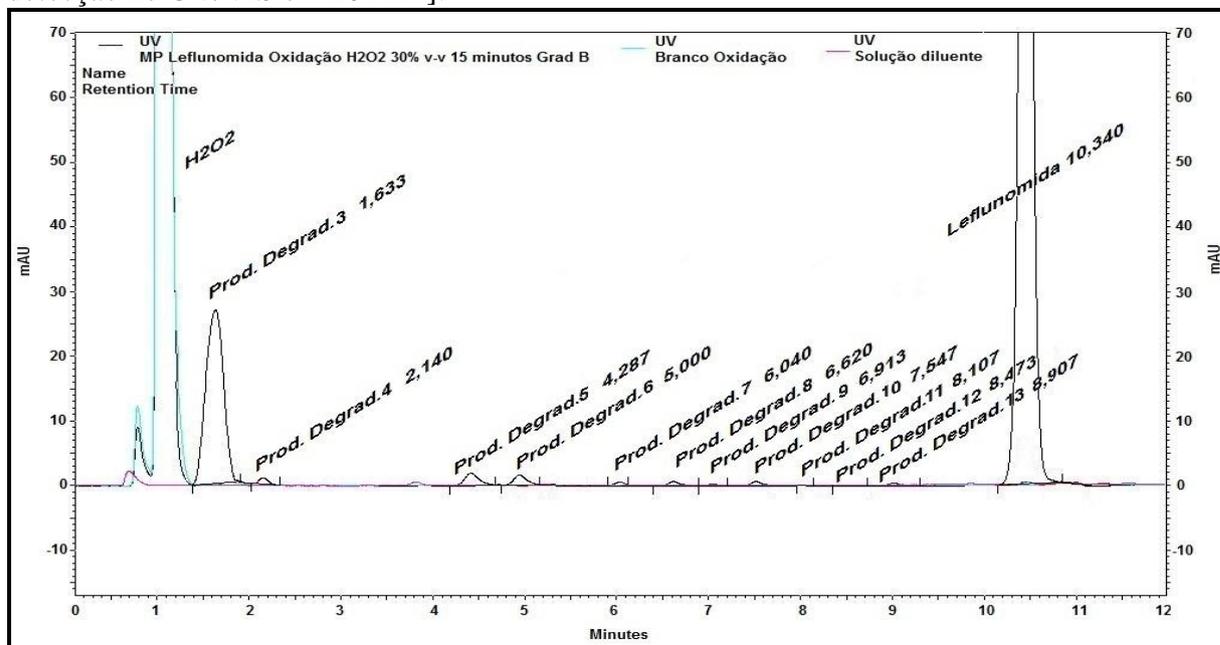


Figura 26 – Sobreposição com aproximação dos cromatogramas da matéria-prima de LF após oxidação com H₂O₂ 30% sob refluxo por 15 minutos; da solução branco da oxidação e da solução diluente após análise pelo método por CLAE gradiente B [Fase móvel composta de acetato de amônio 10 mM:ACN (0 min-70:30; 15 min-20:80; 16 min-70:30 e 20 min-70:30); fluxo de 1,0 mL/min; coluna C18 (125x4,0) mm, 5 µm a 25°C; volume de injeção de 20 µL; detecção no UV/VIS em 261 nm].



Após observar os cromatogramas das figuras 21 a 26, pode-se afirmar que o método por CLAE gradiente B possibilitou a separação da LF e dos produtos de degradação gerados com resolução aceitável nas três condições de degradação avaliadas: hidrólise ácida, hidrólise básica e oxidação. Após visualizar os cromatogramas das figuras 25 e 26, pode-se concluir que o produto de degradação 3 foi separado, com boa resolução, da água oxigenada (H₂O₂).

Portanto, o método por CLAE gradiente B foi considerado adequado como método analítico indicativo de estabilidade e foi utilizado na quantificação dos produtos de degradação gerados em todas as condições de degradação.

5.2 Estudo de cinética de degradação forçada da matéria-prima de LF

Foram realizadas as análises, empregando as condições cromatográficas do método por CLAE em eluição gradiente B descritas em 4.2.1.2.2 (página 77), das amostras controle e das amostras do estudo de cinética de degradação forçada da matéria prima de LF preparadas

conforme descrito em 4.2.1.1 (página 72). A seguir encontram-se os resultados e discussões dos testes com os controles e com os produtos de cada condição de degradação.

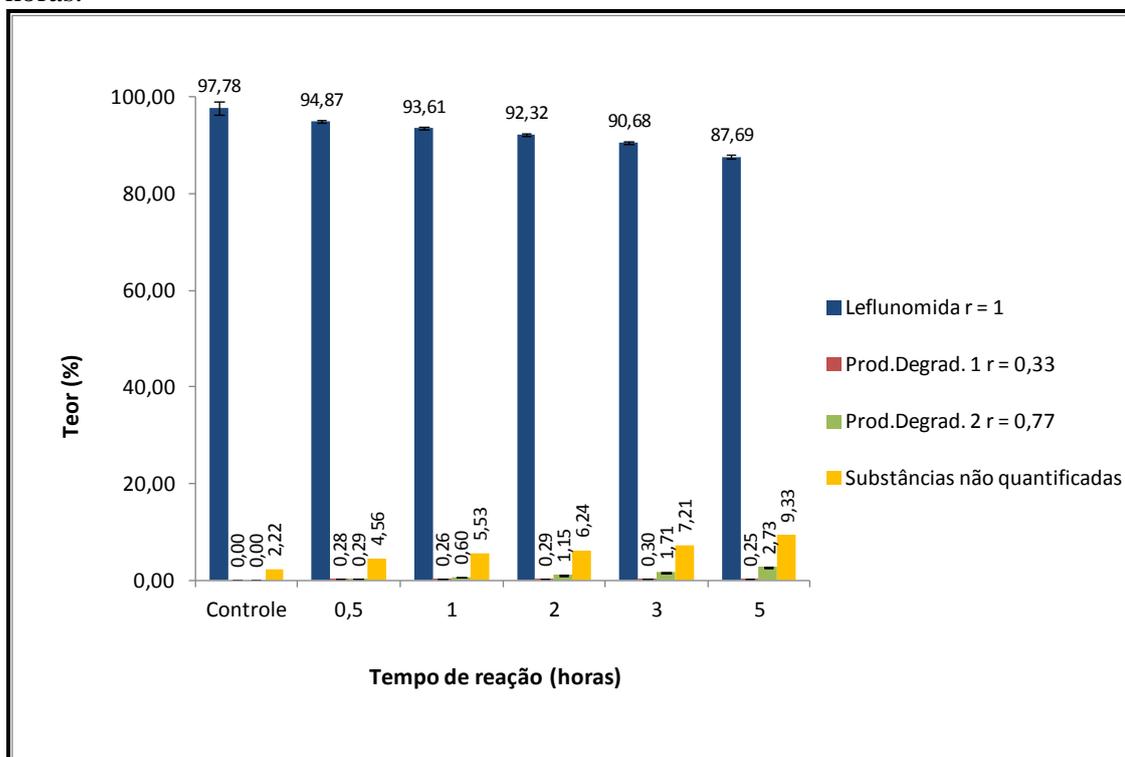
5.2.1 Hidrólise ácida da matéria-prima de LF

A matéria-prima de LF é muito estável em meio ácido, reagindo lentamente nessas condições (YENICELI, DOGRUKOL, TUNCEL, 2006). Portanto, foi necessária a utilização de uma concentração mais elevada de solução de ácido clorídrico e a degradação foi conduzida sob refluxo empregando tempos maiores de reação.

Os produtos da hidrólise ácida da matéria-prima de LF foram injetados no cromatógrafo a líquido de alta eficiência assim como a solução branco da hidrólise ácida, solução diluente e fase móvel. Os cromatogramas foram então sobrepostos com o objetivo de se excluir os sinais dos interferentes, permitindo a identificação e quantificação apenas dos produtos de degradação provenientes do fármaco LF.

A quantificação dos produtos de degradação foi realizada relacionando as suas respectivas áreas com a área do padrão de LF devido à ausência dos padrões dos produtos de degradação. Os produtos de degradação foram identificados utilizando como nomenclatura os números cardinais e os seus respectivos tempos de retenção relativos para facilitar a interpretação dos dados obtidos. Os resultados do teor da amostra controle, bem como dos teores do fármaco LF e produtos de degradação obtidos para cada tempo de degradação após a hidrólise ácida com solução de ácido clorídrico 1 M sob refluxo encontram-se na figura 27.

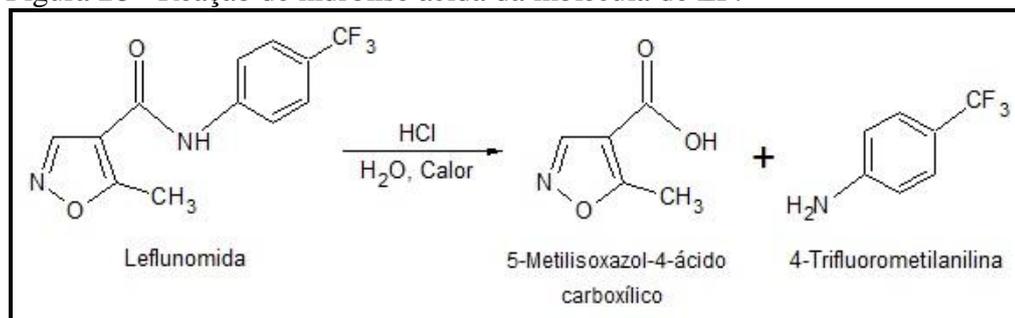
Figura 27 - Quantificação da LF e produtos de degradação obtidos após a hidrólise ácida com solução de HCl 1 M sob refluxo nos tempos de reação de 0,5; 1; 2; 3 e 5 horas.



Após analisar os dados da figura 27 e comparar os resultados das amostras degradadas com a amostra controle, pode-se afirmar que houve a degradação gradual e lenta do fármaco LF levando à formação dos produtos de degradação 1 e 2 ao longo dos tempos de reação avaliados. A LF foi parcialmente degradada após 5 horas de reação, sendo que houve a formação dos produtos de degradação 1 ($r = 0,33$) e 2 ($r = 0,77$), cujo somatório correspondeu a 2,98%. O percentual restante, equivalente a 9,33%, deve-se a produtos de degradação não cromofóricos e/ou que não puderam ser detectados com o método em questão.

A seguir encontra-se representado na figura 28 o esquema da reação de hidrólise ácida da molécula da LF (SOLOMONS et al., 2012).

Figura 28 - Reação de hidrólise ácida da molécula de LF.



Como pode ser observado na figura 28, o grupamento amida da molécula da LF hidrolisa-se em meio ácido na presença de calor, levando à formação dos compostos 5-metil-isoxazol-4-ácido carboxílico e 4-trifluorometilanilina. Dentre estas duas substâncias, a 4-trifluorometilanilina manteve em sua estrutura um grupamento cromóforo derivado da analina cuja absorvidade é próxima a 230 nm (GU, 1997). Enquanto o 5-metil-isoxazol-4-ácido carboxílico possui grupamento cromóforo, derivado da conjugação entre o grupamento isoxazol e a função ácido carboxílico, cuja absorvidade é próxima a 208 nm. Portanto, é de se presumir que o produto de degradação 2, cujo teor aumentou consideravelmente em função do tempo de reação, possa ser uma das duas substâncias.

Em relação ao produto de degradação 1, existe uma grande probabilidade de que seja oriundo da clivagem do grupamento isoxazol da molécula da LF, visto que este composto foi eluído no cromatograma com tempo de retenção relativo de 0,33. Este tempo de retenção relativo é similar ao encontrado para o produto de degradação A77 1726 (teriflunomida), que foi gerado durante a hidrólise básica da LF, cujos resultados serão discutidos adiante. Provavelmente esta reação de clivagem do anel isoxazol ocorreu devido ao emprego do calor durante a hidrólise ácida, favorecendo assim a formação residual da teriflunomida.

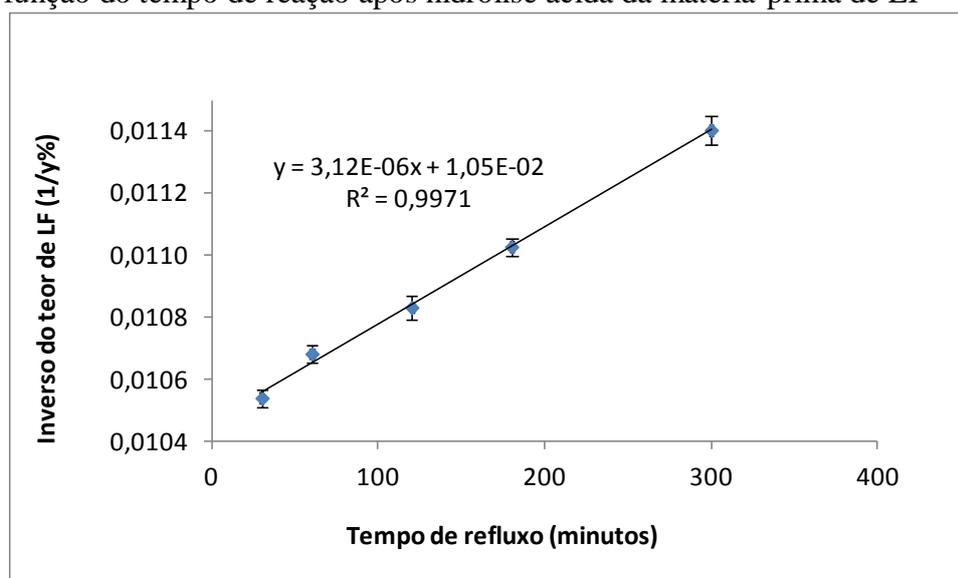
A partir dos resultados da figura 27 foram construídos gráficos de dispersão em que foram testados dois modelos matemáticos. O primeiro modelo matemático relacionou o inverso do teor de LF com os tempos de reação avaliados enquanto o segundo modelo relacionou o logaritmo neperiano do teor de LF com os tempos de reação avaliados. Os resultados dos coeficientes de correlação encontrados a partir das equações de cada um dos modelos matemáticos avaliados encontram-se na tabela 9.

Tabela 9 – Resultados dos coeficientes de correlação encontrados a partir das equações de cada um dos modelos matemáticos avaliados para a curva de degradação ácida

Modelo matemático avaliado	Equações obtidas	Coefficiente de determinação	Coefficiente de correlação
Inverso do teor de LF	$y = 3,12E-06x + 1,05E-02$	$R^2 = 0,9971$	$r = 0,9985$
Logaritmo neperiano do teor de LF	$y = -2,85E-04x + 4,56$	$R^2 = 0,9876$	$r = 0,9938$

Avaliando os resultados da tabela 9 pode-se afirmar que foi encontrado um maior valor do coeficiente de correlação para o modelo matemático empregando o inverso do teor de LF. Desta forma este modelo foi empregado na obtenção da curva e equação linear as quais estão representadas na figura 29.

Figura 29 - Curva de degradação relacionando o inverso do teor de LF em função do tempo de reação após hidrólise ácida da matéria-prima de LF



Empregando a equação obtida a partir da curva de degradação linear da figura 29, foram estimados os tempos de reação necessários para se degradar intencionalmente 10% e 30% do fármaco LF, respectivamente. Pode-se concluir que a matéria-prima de LF deve ser submetida à hidrólise ácida, na presença de solução de ácido clorídrico 1 M sob refluxo, por um período de tempo compreendido entre 3,26 e 20,22 horas para que seja obtido um perfil de degradação satisfatório para o desenvolvimento da metodologia analítica indicativa de estabilidade.

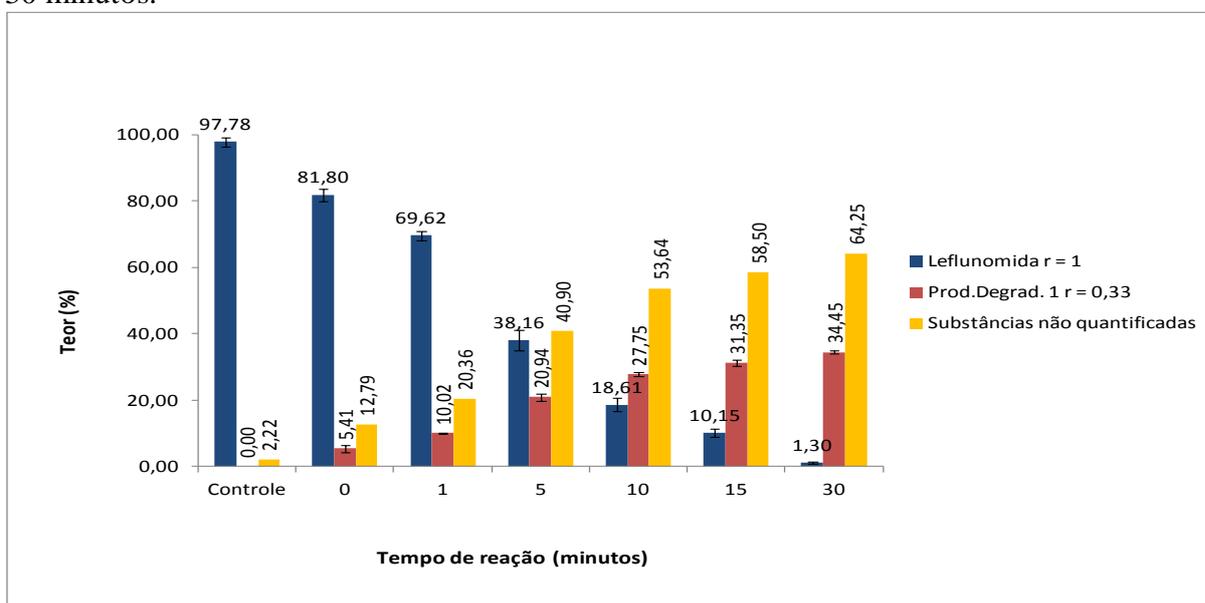
5.2.2 Hidrólise básica da matéria-prima de LF

A LF é muito instável em meio básico, reagindo rapidamente na presença de soluções alcalinas (KALGUTKAR et al., 2003). Portanto, foi necessária a utilização de uma concentração mais baixa de solução de hidróxido de sódio e a degradação foi conduzida à temperatura ambiente.

Os produtos da hidrólise básica da matéria-prima de LF foram injetados no cromatógrafo a líquido de alta eficiência assim como a solução branco da hidrólise básica, solução diluente e fase móvel. Os cromatogramas foram então sobrepostos com o objetivo de se excluir os sinais dos interferentes, permitindo a identificação e quantificação apenas dos produtos de degradação provenientes do fármaco LF.

A quantificação dos produtos de degradação foi realizada relacionando as suas respectivas áreas com a área do padrão de LF devido à ausência dos padrões dos produtos de degradação. Estes foram identificados utilizando como nomenclatura os números cardinais e os seus respectivos tempos de retenção relativos para facilitar a interpretação dos dados obtidos. Os resultados do teor da amostra controle, bem como dos teores do fármaco LF e produto de degradação obtido para cada tempo de degradação após a hidrólise básica com solução de hidróxido de sódio 0,005 M à temperatura ambiente encontram-se na figura 30.

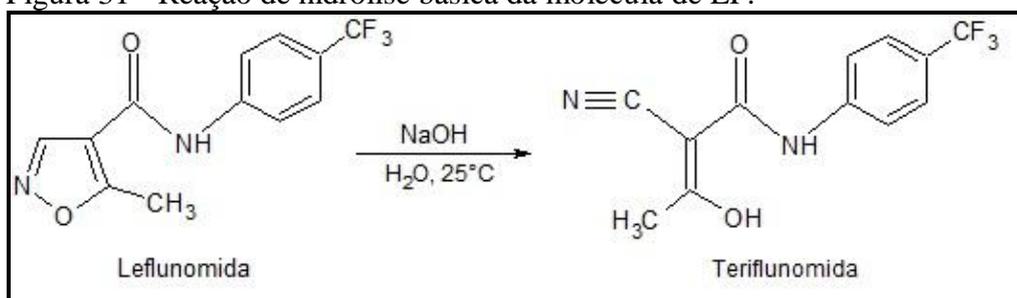
Figura 30 - Quantificação da LF e produtos de degradação obtidos após a hidrólise básica com solução de NaOH 0,005 M à temperatura ambiente nos tempos de reação de 0; 1; 5; 10; 15 e 30 minutos.



Após analisar os dados da figura 30 e comparar os resultados das amostras degradadas com a amostra controle, pode-se afirmar que houve a degradação gradual e rápida do fármaco LF e a formação concomitante do produto de degradação 1 ao longo dos tempos de reação avaliados. A LF foi quase totalmente degradada após 30 minutos de reação, sendo que houve uma formação de 34,45% do produto de degradação 1. O percentual restante, equivalente a 64,25%, deve-se a produtos de degradação não cromofóricos e/ou que não puderam ser detectados com o método em questão.

A seguir encontra-se, representado na figura 31, o esquema da reação de hidrólise básica da molécula da LF (KALGUTKAR et al., 2003).

Figura 31 - Reação de hidrólise básica da molécula de LF.



Como pode ser observado na figura 31, a molécula da LF hidrolisa-se em meio básico à temperatura ambiente, levando ao rompimento e abertura do anel isoxazol com consequente formação do composto A77 1726 (teriflunomida). Esta substância manteve em sua estrutura um grupamento cromóforo derivado da anilina cuja absorvidade é próxima a 230 nm (GU, 1997). Portanto, é de se presumir que o produto de degradação 1, cujo teor aumentou rapidamente em função do tempo de reação, seja o A77 1726. A hidrólise do grupamento amida da molécula de LF não foi observada, provavelmente, por se tratar de uma reação lenta nas condições empregadas durante a hidrólise básica à temperatura ambiente.

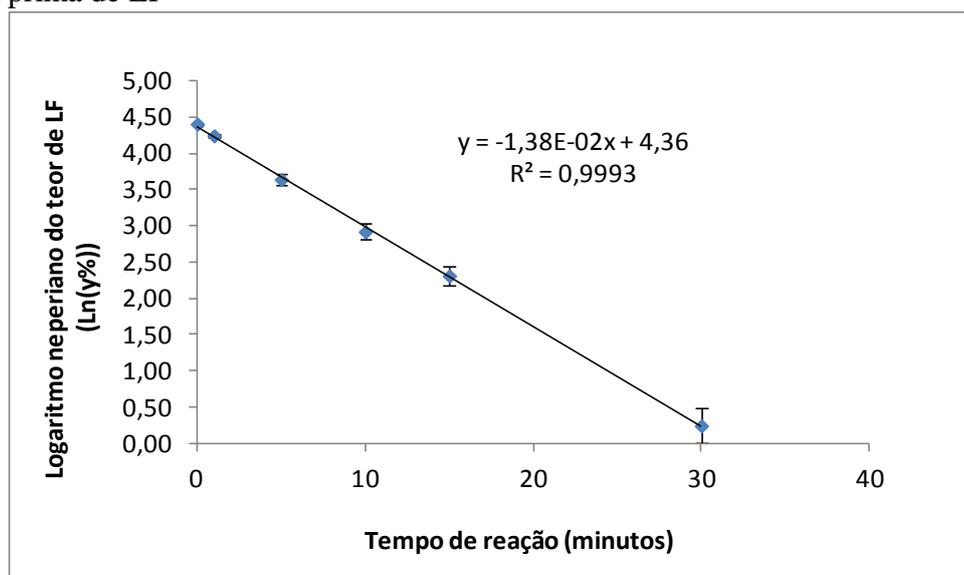
A partir dos resultados da figura 30 foram construídos gráficos de dispersão em que foram testados dois modelos matemáticos. O primeiro modelo matemático relacionou o inverso do teor de LF com os tempos de reação avaliados enquanto o segundo modelo relacionou o logaritmo neperiano do teor de LF com os tempos de reação avaliados. Os resultados dos coeficientes de correlação encontrados a partir das equações de cada um dos modelos matemáticos avaliados encontram-se na tabela 10.

Tabela 10 – Resultados dos coeficientes de correlação encontrados a partir das equações de cada um dos modelos matemáticos avaliados para a curva de degradação básica

Modelo matemático avaliado	Equações obtidas	Coefficiente de determinação	Coefficiente de correlação
Inverso do teor de LF	$y = 2,53E-02x - 8,91E-02$	$R^2 = 0,8314$	$r = 0,9118$
Logaritmo neperiano do teor de LF	$y = -1,38E-02x + 4,36$	$R^2 = 0,9993$	$r = 0,9996$

Avaliando os resultados da tabela 10 pode-se afirmar que foi encontrado um maior valor do coeficiente de correlação para o modelo matemático empregando o logaritmo neperiano do teor de LF. Desta forma este modelo foi empregado na obtenção da curva e equação linear as quais estão representadas na figura 32.

Figura 32 - Curva de degradação relacionando o logaritmo neperiano do teor de LF em função do tempo de reação após hidrólise básica da matéria-prima de LF



Empregando a equação obtida a partir da curva de degradação linear da figura 32, foram estimados os tempos de reação necessários para se degradar intencionalmente 10% e 30% do fármaco LF, respectivamente. Pode-se concluir que a matéria-prima de LF deve ser submetida à hidrólise básica, na presença de solução de hidróxido de sódio 0,005 M à temperatura ambiente, por um período de tempo compreendido entre 0 e 49 segundos para que seja obtido um perfil de degradação satisfatório para o desenvolvimento da metodologia analítica indicativa de estabilidade.

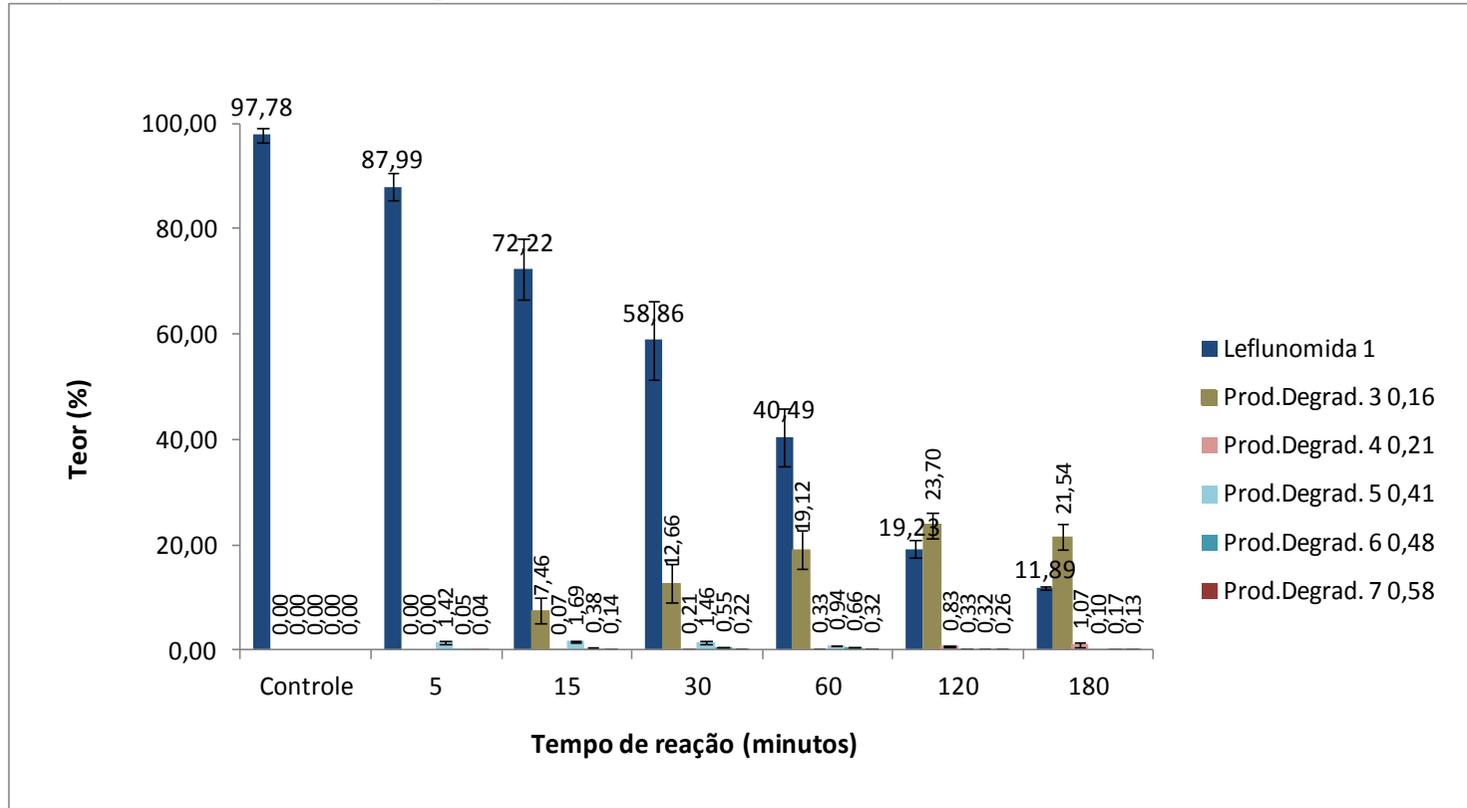
5.2.3 Oxidação da matéria-prima de LF

A matéria-prima de LF possui uma estabilidade média em meio oxidante, reagindo de maneira moderada nessas condições (KHER, 2011). Portanto, foi necessária a utilização de uma concentração mais elevada de solução de peróxido de hidrogênio e a degradação foi conduzida sob refluxo empregando tempos consideráveis de reação.

Os produtos da oxidação da matéria-prima de LF foram injetados no cromatógrafo a líquido de alta eficiência assim como a solução branco da oxidação, solução diluente e fase móvel. Os cromatogramas foram então sobrepostos com o objetivo de se excluir os sinais dos interferentes, permitindo a identificação e quantificação apenas dos produtos de degradação provenientes do fármaco LF.

A quantificação dos produtos de degradação foi realizada relacionando as suas respectivas áreas com a área do padrão de LF devido à ausência dos padrões dos produtos de degradação. Estes foram identificados utilizando como nomenclatura os números cardinais e os seus respectivos tempos de retenção relativos para facilitar a interpretação dos dados obtidos. Os resultados do teor da amostra controle, bem como dos teores do fármaco LF e produtos de degradação obtidos para cada tempo de degradação após a oxidação com solução de peróxido de hidrogênio 30% sob refluxo encontram-se nas figuras 33 e 34.

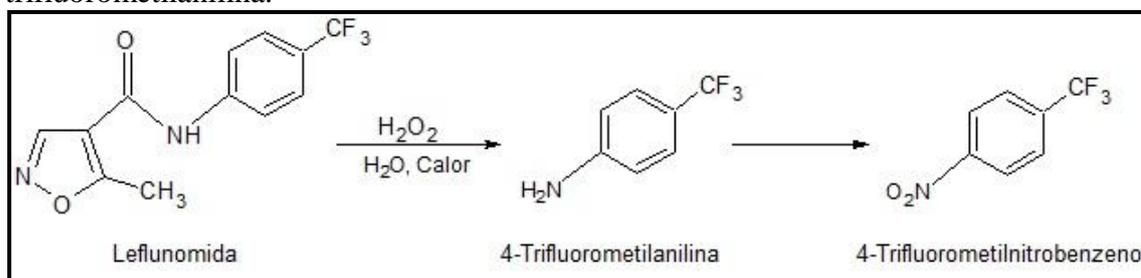
Figura 33 - Quantificação da LF e produtos de degradação 3 a 7 obtidos após a oxidação com solução de peróxido de hidrogênio 30% sob refluxo nos tempos de reação de 5; 15; 30; 60; 120 e 180 minutos.



Após analisar os dados das figuras 33 e 34 e comparar os resultados das amostras degradadas com a amostra controle, pode-se afirmar que houve a degradação gradual do fármaco LF levando à formação dos produtos de degradação 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 e 13, sendo que o teor encontrado para o produto de degradação 3 foi bem superior ao dos demais ao longo dos tempos de reação avaliados. A LF foi quase totalmente degradada após 3 horas de reação, sendo que houve a formação dos produtos de degradação 3 a 13, cujo somatório correspondeu a 23,16%. O percentual restante, equivalente a 64,95%, deve-se a produtos de degradação não cromofóricos e/ou que não puderam ser detectados com o método em questão.

A seguir encontra-se, representado na figura 35, o esquema da reação de hidrólise da molécula da LF seguida da oxidação do produto intermediário 4-trifluorometilanilina (SOLOMONS et al., 2012).

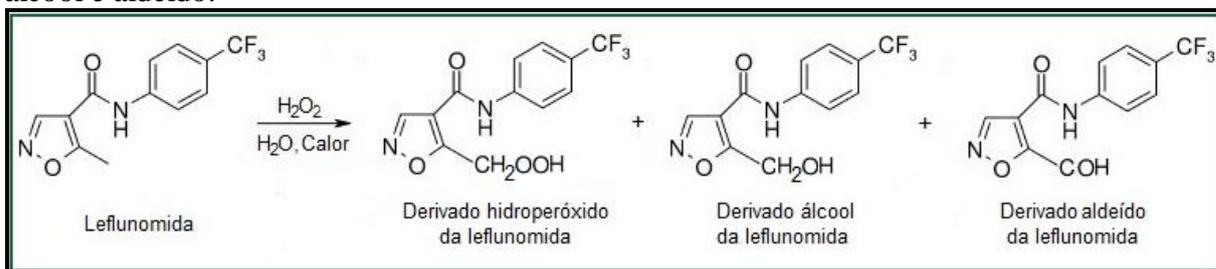
Figura 35 - Reação de hidrólise da LF seguida da oxidação do produto intermediário 4-trifluorometilanilina.



Como pode ser observado na figura 35, a molécula da LF se hidrolisa na presença de água e calor, levando ao rompimento do grupamento amida e formação da 4-trifluorometilanilina. Em seguida o grupamento amino deste produto intermediário é oxidado na presença de água oxigenada levando à formação do composto 4-trifluorometilnitrobenzeno. Dentre as inúmeras possibilidades de reações oxidativas, esta é a que ocorre com maior probabilidade. Portanto existe a possibilidade de que o produto de degradação 3, cujo teor aumentou rapidamente em função do tempo de reação, seja o 4-trifluorometilnitrobenzeno.

Outras reações oxidativas que poderiam ocorrer com a molécula da LF estão representadas no esquema da figura 36 (SOLOMONS et al., 2012).

Figura 36 - Outras reações oxidativas da LF levando à formação dos derivados hidroperóxido, álcool e aldeído.



Como pode ser observado na figura 36, os grupamentos metila da molécula da LF podem oxidar-se na presença de água oxigenada, água e calor, levando à formação dos derivados hidroperóxido, álcool e aldeído. Dentre as inúmeras possibilidades de reações oxidativas, estas ocorrem com menor probabilidade. Portanto, é de se presumir que os variados produtos de degradação, cujos teores encontrados foram bem baixos, possam ser variações destes compostos derivados.

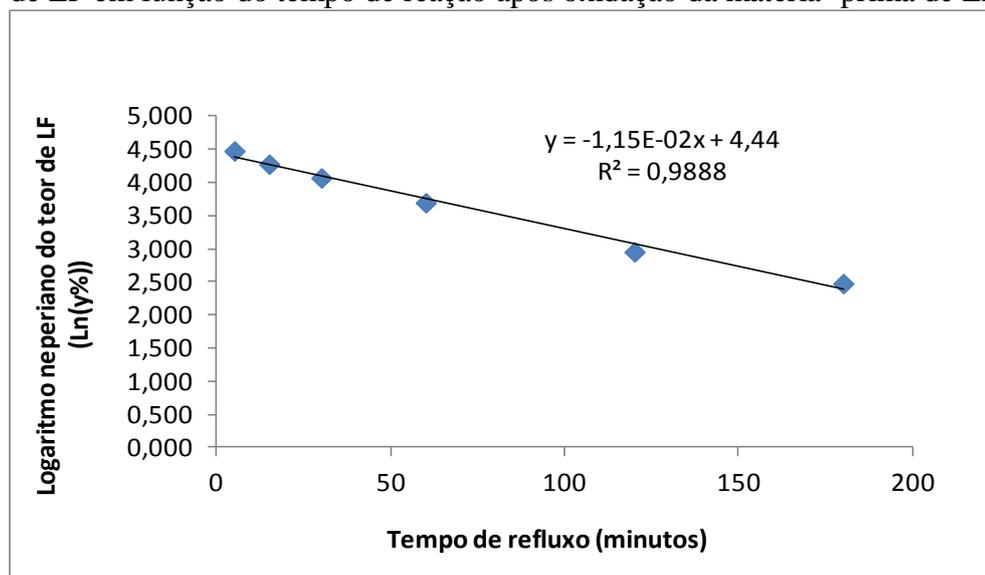
A partir dos resultados das figuras 33 e 34 foram construídos gráficos de dispersão em que foram testados dois modelos matemáticos. O primeiro modelo matemático relacionou o inverso do teor de LF com os tempos de reação avaliados enquanto o segundo modelo relacionou o logaritmo neperiano do teor de LF com os tempos de reação avaliados. Os resultados dos coeficientes de correlação encontrados a partir das equações de cada um dos modelos matemáticos avaliados encontram-se na tabela 11.

Tabela 11 – Resultados dos coeficientes de correlação encontrados a partir das equações de cada um dos modelos matemáticos avaliados para a curva de degradação oxidativa

Modelo matemático avaliado	Equações obtidas	Coefficiente de determinação	Coefficiente de correlação
Inverso do teor de LF	$y = 4,15E-04x + 5,60E-03$	$R^2 = 0,9821$	$r = 0,9910$
Logaritmo neperiano do teor de LF	$y = -1,15E-02x + 4,44$	$R^2 = 0,9888$	$r = 0,9944$

Avaliando os resultados da tabela 11 pode-se afirmar que foi encontrado um maior valor do coeficiente de correlação para o modelo matemático empregando o logaritmo neperiano do teor de LF. Desta forma este modelo foi empregado na obtenção da curva e equação linear as quais estão representadas na figura 37.

Figura 37 - Curva de degradação relacionando o logaritmo neperiano do teor de LF em função do tempo de reação após oxidação da matéria- prima de LF



Empregando a equação obtida a partir da curva de degradação linear da figura 37, foram estimados os tempos de reação necessários para se degradar intencionalmente 10% e 30% do fármaco LF, respectivamente. Pode-se concluir que a matéria-prima de LF deve ser submetida à oxidação, na presença de solução de peróxido de hidrogênio 30% v/v sob refluxo, por um período de tempo compreendido entre 0 e 16,78 minutos para que seja obtido um perfil de degradação satisfatório para o desenvolvimento da metodologia analítica indicativa de estabilidade.

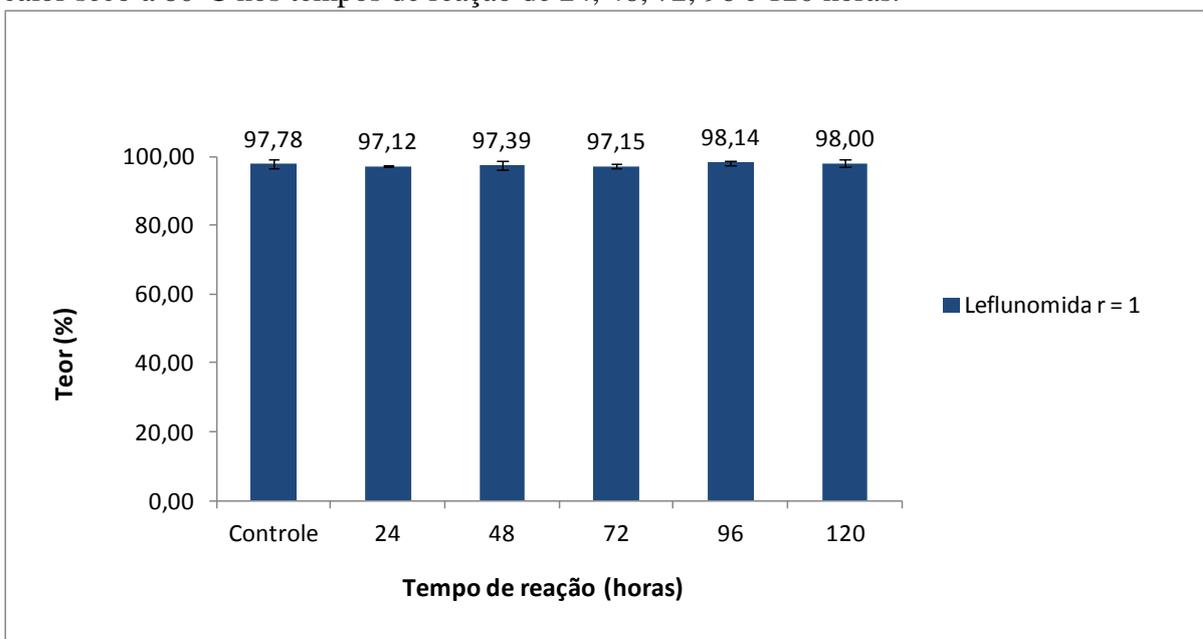
5.2.4 Degradação termolítica da matéria-prima de LF

A LF é muito estável quando submetida ao calor seco a 80°C, praticamente não reagindo nessas condições (EL-RIES et al., 2011).

Os produtos da degradação termolítica da matéria-prima de LF foram injetados no cromatógrafo a líquido de alta eficiência em conjunto com a solução diluente e fase móvel. Os cromatogramas foram então sobrepostos com o objetivo de se excluir os sinais desses interferentes, permitindo a identificação e quantificação apenas dos produtos de degradação provenientes do fármaco LF.

Os resultados do teor da amostra controle, bem como dos teores do fármaco LF e produtos de degradação obtidos para cada tempo de degradação após a degradação termolítica empregando o calor seco encontram-se na figura 38.

Figura 38 - Quantificação da LF e produtos de degradação após a degradação termolítica sob calor seco a 80°C nos tempos de reação de 24, 48, 72, 96 e 120 horas.



Após analisar os dados da figura 38 e comparar os resultados das amostras degradadas com a amostra controle, pode-se afirmar que o teor do fármaco LF manteve-se inalterado. Pode-se observar que não houve a degradação do fármaco e também não houve a formação de produtos de degradação até 120 horas de reação sob calor seco a 80°C. Conclui-se, portanto, que a matéria-prima de LF é termoestável quando exposta ao calor seco a 80°C por um período de 120 horas.

5.2.5 Degradação fotolítica da matéria-prima de LF

Os produtos da degradação fotolítica na região do visível e ultravioleta da LF foram injetados no cromatógrafo a líquido de alta eficiência assim como a solução diluente e fase móvel. Os cromatogramas foram então sobrepostos com o objetivo de se excluir os sinais dos interferentes, permitindo a identificação e quantificação apenas dos produtos de degradação provenientes do fármaco LF.

Os resultados do teor da amostra controle, bem como dos teores do fármaco LF e produtos de degradação obtidos para cada período de exposição após degradação fotolítica empregando a radiação visível e ultravioleta encontram-se nas figuras 39 e 40.

Figura 39 - Quantificação da LF e produtos de degradação após a degradação fotolítica nas exposições ao visível de 1200, 2400, 3600, 4800 e 6000 Klux.h.

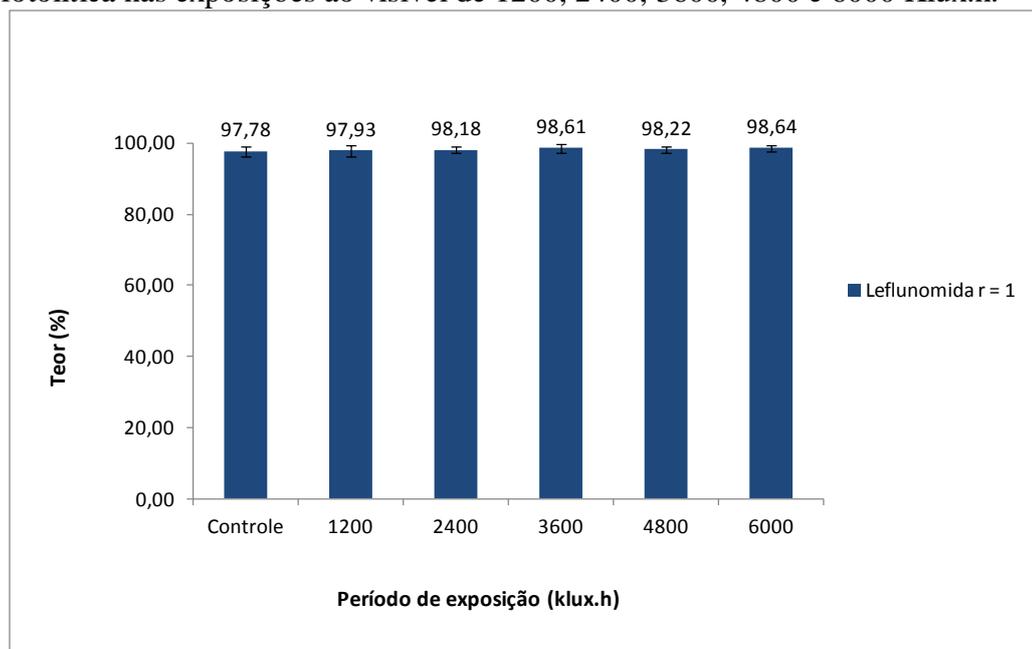
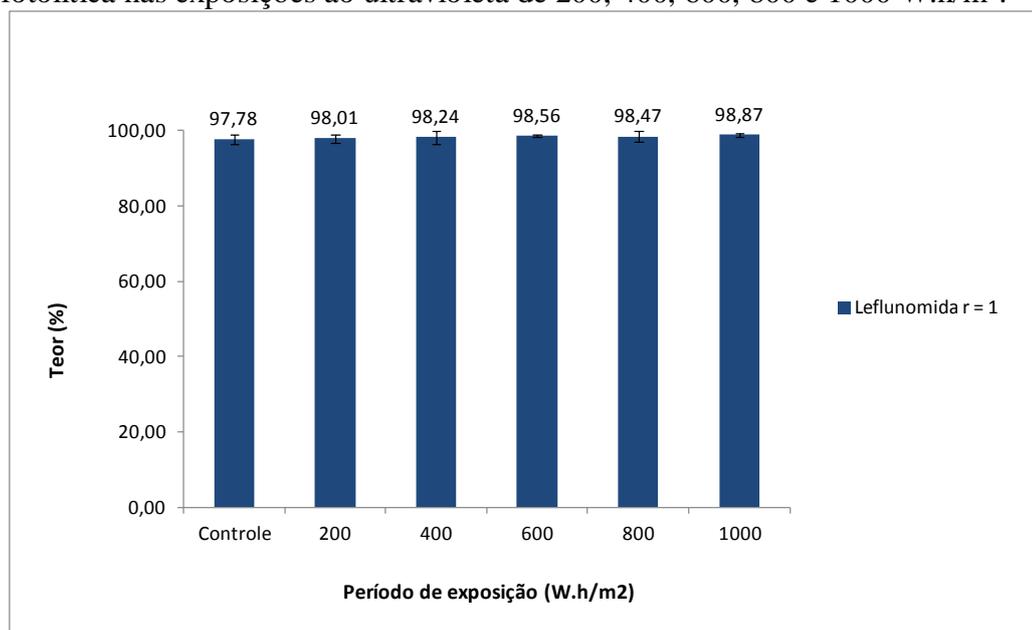


Figura 40 - Quantificação da LF e produtos de degradação após a degradação fotolítica nas exposições ao ultravioleta de 200, 400, 600, 800 e 1000 W.h/m².



Após analisar os dados da figura 39 e comparar os resultados das amostras degradadas após exposição à radiação visível com a amostra controle, pode-se afirmar que o teor do fármaco LF manteve-se inalterado. Pode-se observar que não houve a degradação do fármaco LF e também não houve a formação de produtos de degradação até o período de exposição de 6000 klux.h. Conclui-se portanto que a matéria-prima de LF foi fotoestável à radiação visível nas condições avaliadas cuja dose de radiação foi cinco vezes superior à preconizada nos estudos confirmatórios (1200 Klux.h).

Após analisar os dados da figura 40 e comparar os resultados das amostras degradadas após exposição à radiação ultravioleta com a amostra controle, pode-se afirmar que o teor do fármaco LF manteve-se inalterado. Pode-se observar que não houve a degradação do fármaco LF e também não houve a formação de produtos de degradação até o período de exposição de 1000 W.h/m². Conclui-se portanto que a matéria-prima de LF foi fotoestável à radiação ultravioleta nas condições avaliadas, cuja dose de radiação foi cinco vezes superior à preconizada nos estudos confirmatórios (200 W.h/m²).

5.3 Estudo de degradação forçada de comprimidos de LF

Foram realizadas as análises, empregando as condições cromatográficas do método por CLAE gradiente B descritas em 4.2.1.2.2 (página 77), das amostras controle e das amostras do estudo de degradação forçada de comprimidos de LF preparadas conforme descrito em 4.2.2.2 (página 78). A seguir encontram-se os resultados e discussões dos testes com as amostras controle e com as amostras submetidas a cada condição de degradação.

5.3.1 Hidrólise ácida de comprimidos de LF

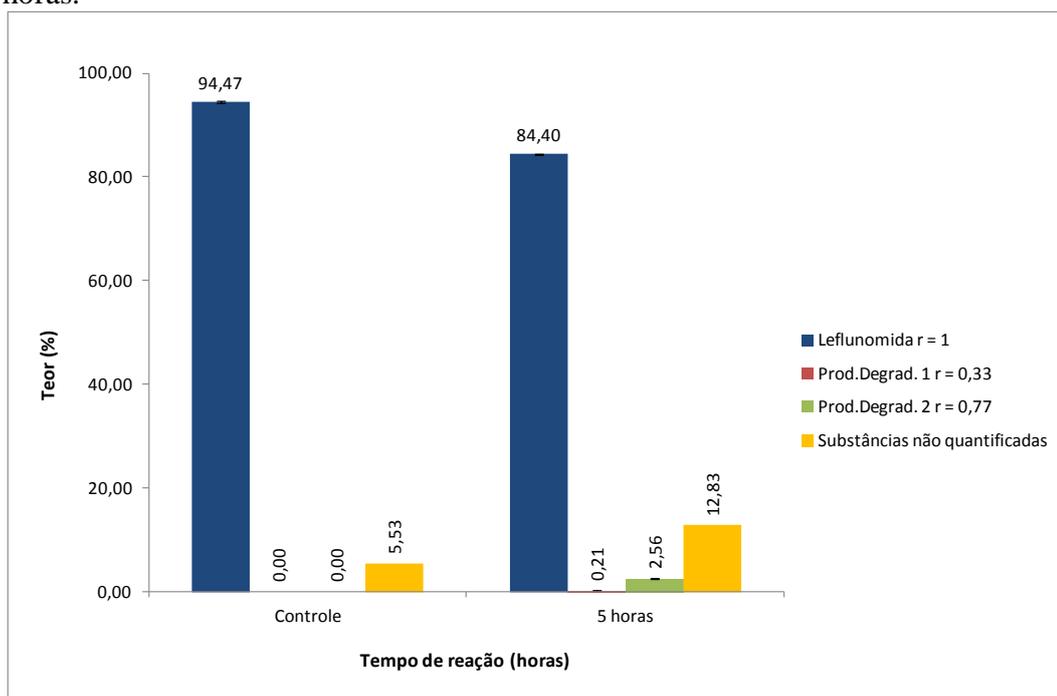
De acordo com os resultados obtidos da hidrólise ácida da matéria prima de LF, foi determinado que o intervalo de tempo reacional necessário para se degradar intencionalmente de 10 a 30% do fármaco deveria estar compreendido entre 3,45 e 18,15 horas. A partir desses resultados foi calculado o tempo médio de reação equivalente a 11 horas. No entanto, por se tratar de um tempo reacional elevado e incompatível com a rotina de trabalho, foi adotado um

tempo reacional correspondente a 5 horas, mas que ainda se encontra dentro do intervalo de tempo aceitável. As amostras de comprimidos de LF foram então submetidas à hidrólise ácida com HCl 1 M sob refluxo por um período de 5 horas.

As amostras de comprimidos de LF e das soluções dos placebos puros da formulação submetidas à hidrólise ácida foram injetadas no cromatógrafo a líquido de alta eficiência assim como a solução branco da hidrólise ácida, solução diluente e fase móvel. Os cromatogramas foram então sobrepostos com o objetivo de se excluir os sinais provenientes dos excipientes do placebo puro da formulação e dos demais interferentes, permitindo a identificação e quantificação apenas dos produtos de degradação do fármaco LF.

A quantificação dos produtos de degradação foi realizada relacionando as suas respectivas áreas com a área do padrão de LF devido à ausência dos padrões dos produtos de degradação. Estes foram identificados utilizando como nomenclatura os números cardinais e os seus respectivos tempos de retenção relativos para facilitar a interpretação dos dados obtidos. Os resultados do teor da amostra controle, bem como dos teores do fármaco LF e produtos de degradação obtidos após a hidrólise ácida com solução de ácido clorídrico 1 M sob refluxo por 5 horas encontram-se na figura 41.

Figura 41 - Quantificação da LF e produtos de degradação após a hidrólise ácida de comprimidos de LF com solução de ácido clorídrico 1 M sob refluxo por 5 horas.



Após analisar os dados da figura 41 e comparar os resultados da amostra degradada com a amostra controle, pode-se afirmar que houve a degradação do fármaco LF em cerca de 10,07% e a formação dos produtos de degradação 1 a 2, cujo somatório correspondeu a 2,77%. O percentual restante, equivalente a 12,83%, deve-se a produtos de degradação não cromofóricos e/ou que não puderam ser detectados com o método em questão.

Pode-se afirmar que o perfil de degradação obtido após a hidrólise ácida nas condições descritas foi considerado satisfatório para ser utilizado na validação do parâmetro da seletividade/especificidade da metodologia analítica de teor indicativa de estabilidade para comprimidos de LF. O cromatograma representativo desta condição de degradação e respectivos resultados da resolução entre os sinais obtidos encontram-se na avaliação da seletividade do método validado no item 5.4.1.6.

5.3.2 Hidrólise básica de comprimidos de LF

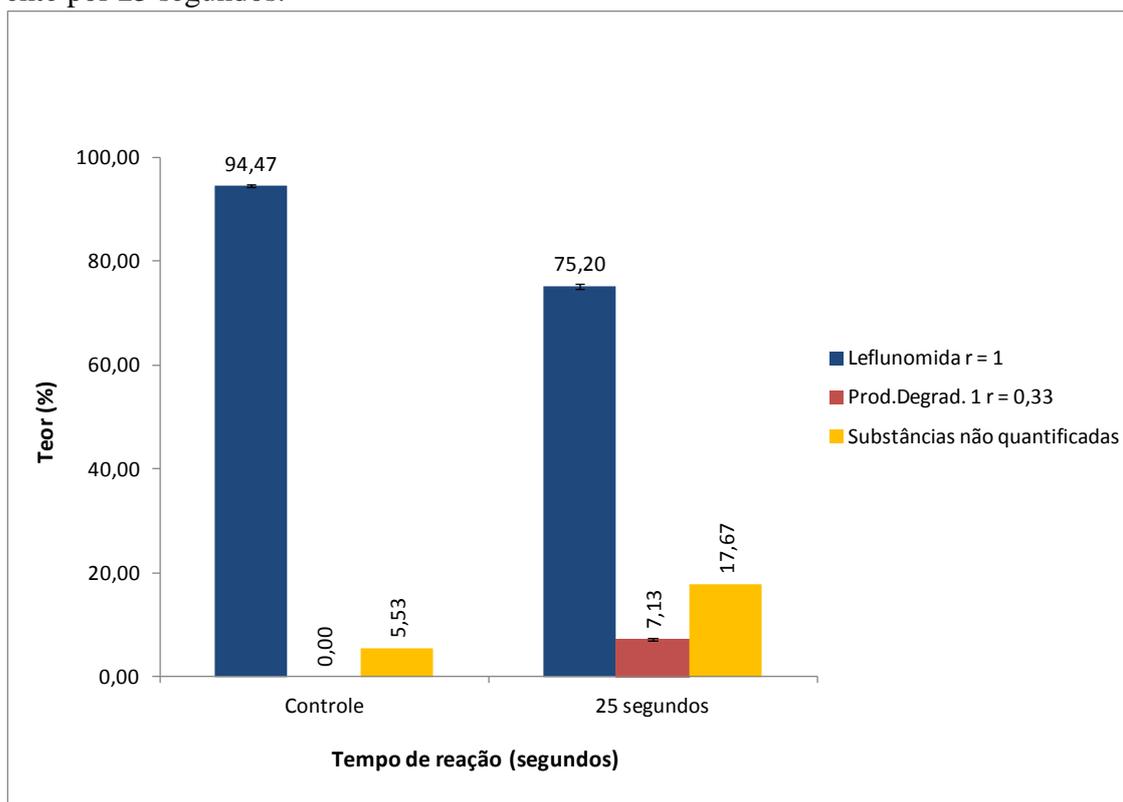
De acordo com os resultados obtidos da hidrólise básica da matéria prima de LF, foi determinado que o intervalo de tempo reacional necessário para se degradar intencionalmente de 10 a 30 % do fármaco deveria estar compreendido entre 0 e 49 segundos. A partir desses resultados foi calculado o tempo médio de reação equivalente a 25 segundos. As amostras de comprimidos de LF foram então submetidas à hidrólise básica com NaOH 0,005 M à temperatura ambiente por 25 segundos.

As amostras de comprimidos de LF e das soluções dos placebos puros da formulação submetidas à hidrólise básica foram injetadas no cromatógrafo a líquido de alta eficiência assim como a solução branco da hidrólise básica, solução diluente e fase móvel. Os cromatogramas foram então sobrepostos com o objetivo de se excluir os sinais provenientes dos excipientes do placebo puro da formulação e dos demais interferentes, permitindo a identificação e quantificação apenas dos produtos de degradação do fármaco LF.

A quantificação dos produtos de degradação foi realizada relacionando as suas respectivas áreas com a área do padrão de LF devido à ausência dos padrões dos produtos de degradação. Estes foram identificados utilizando como nomenclatura os números cardinais e os seus respectivos tempos de retenção relativos para facilitar a interpretação dos dados obtidos. Os resultados do teor da amostra controle, bem como dos teores do fármaco LF e

produtos de degradação obtidos após a hidrólise básica com solução de hidróxido de sódio 0,005 M à temperatura ambiente por 25 segundos encontram-se na figura 42.

Figura 42 - Quantificação da LF e produtos de degradação após a hidrólise básica de comprimidos de LF com solução de hidróxido de sódio 0,005 M à temperatura ambiente por 25 segundos.



Após analisar os dados da figura 42 e comparar os resultados da amostra degradada com a amostra controle, pode-se afirmar que houve a degradação do fármaco LF em cerca de 19,27% e a formação de 7,13% do produto de degradação 1. O percentual restante, equivalente a 17,67%, deve-se a produtos de degradação não cromofóricos e/ou que não puderam ser detectados com o método em questão.

Pode-se afirmar que o perfil de degradação obtido após a hidrólise básica nas condições descritas foi considerado satisfatório para ser utilizado na validação do parâmetro da seletividade/especificidade da metodologia analítica de teor indicativa de estabilidade para comprimidos de LF. O cromatograma representativo desta condição de degradação e respectivos resultados da resolução entre os sinais obtidos encontram-se na avaliação da seletividade do método validado no item 5.4.1.7.

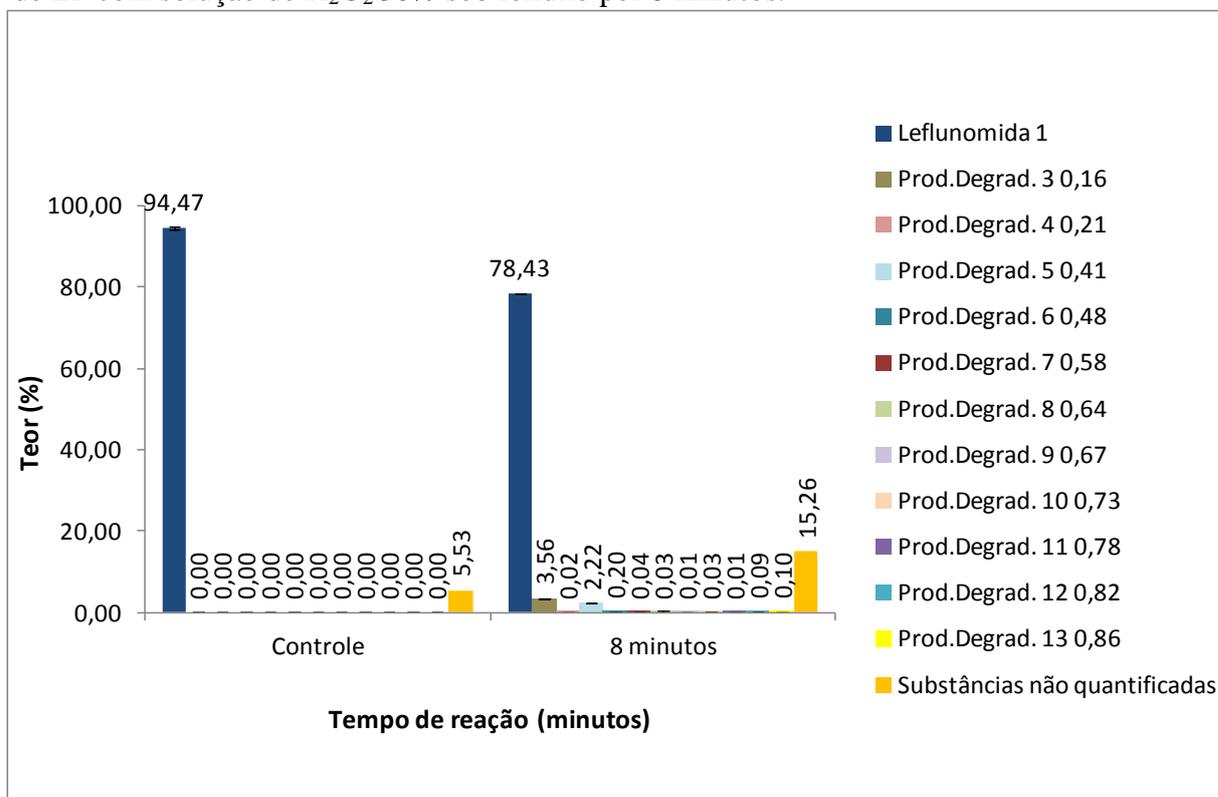
5.3.3 Oxidação de comprimidos de LF

De acordo com os resultados obtidos da oxidação da matéria prima de LF, foi determinado que o intervalo de tempo reacional necessário para se degradar intencionalmente de 10 a 30% do fármaco deveria estar compreendido entre zero e 16,78 minutos. A partir desses resultados foi calculado o tempo médio de reação equivalente a 8 minutos. As amostras de comprimidos de LF foram então submetidas à oxidação com solução de H₂O₂ 30% sob refluxo por 8 minutos.

As amostras de comprimidos de LF e das soluções dos placebos puros da formulação submetidas à oxidação foram injetadas no cromatógrafo a líquido de alta eficiência assim como a solução branco da oxidação, solução diluente e fase móvel. Os cromatogramas foram então sobrepostos com o objetivo de se excluir os sinais provenientes dos excipientes do placebo puro da formulação e dos demais interferentes, permitindo a identificação e quantificação apenas dos produtos de degradação do fármaco LF.

A quantificação dos produtos de degradação foi realizada relacionando as suas respectivas áreas com a área do padrão de LF devido à ausência dos padrões dos produtos de degradação. Estes foram identificados utilizando como nomenclatura os números cardinais e os seus respectivos tempos de retenção relativos para facilitar a interpretação dos dados obtidos. Os resultados do teor da amostra controle, bem como dos teores do fármaco LF e produtos de degradação obtidos após a oxidação com solução de peróxido de hidrogênio 30% sob refluxo por 8 minutos encontram-se na figura 43.

Figura 43 - Quantificação da LF e produtos de degradação após oxidação de comprimidos de LF com solução de H₂O₂ 30% sob refluxo por 8 minutos.



Após analisar os dados da figura 43 e comparar os resultados da amostra degradada com a amostra controle, pode-se afirmar que houve a degradação do fármaco LF em cerca de 16,04% e a formação dos produtos de degradação 3 a 13, cujo somatório correspondeu a 6,31%. O percentual restante, equivalente a 15,26%, deve-se a produtos de degradação não cromofóricos e/ou que não puderam ser detectados com o método em questão.

Pode-se afirmar que o perfil de degradação obtido após a oxidação nas condições descritas foi considerado satisfatório para ser utilizado na validação do parâmetro da seletividade/especificidade da metodologia analítica de teor indicativa de estabilidade para comprimidos de LF. O cromatograma representativo desta condição de degradação e respectivos resultados da resolução entre os sinais obtidos encontram-se na avaliação da seletividade do método validado no item 5.4.1.8.

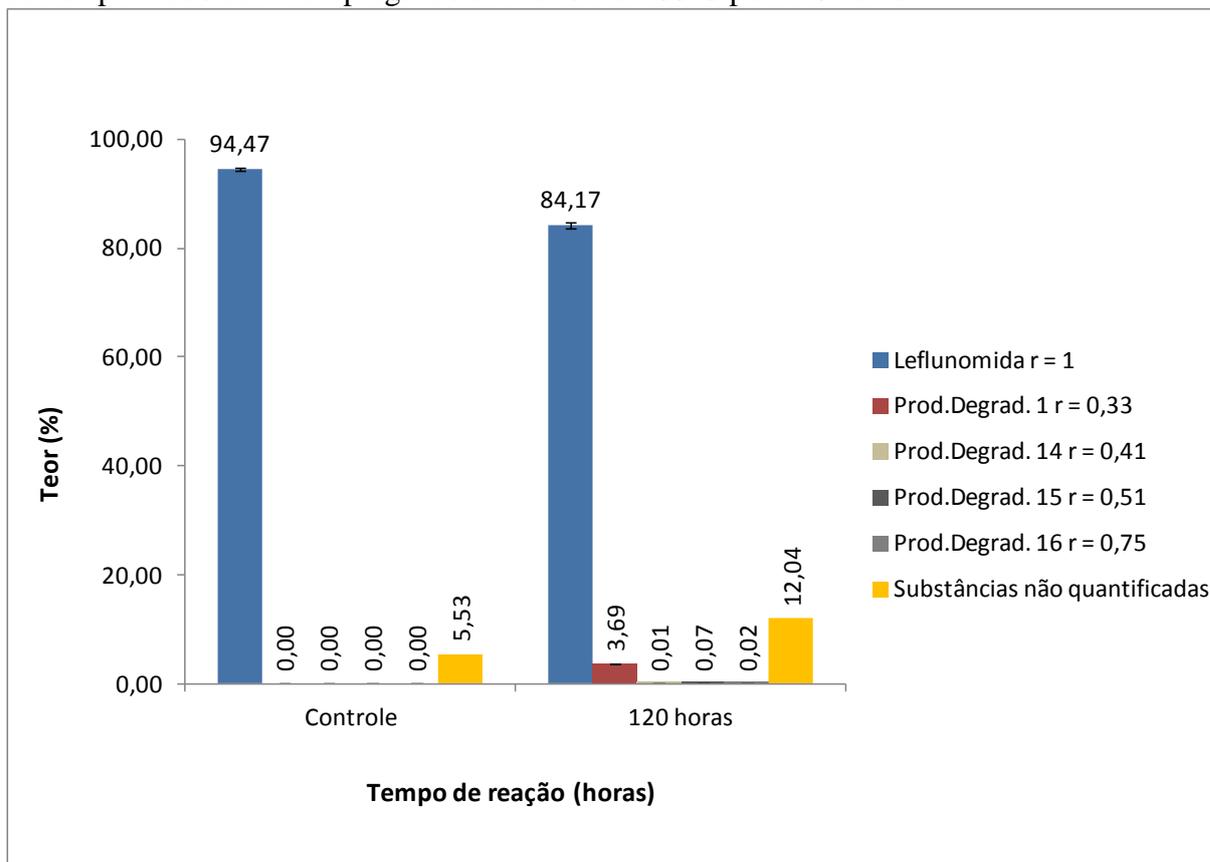
5.3.4 Degradação térmica de comprimidos de LF

De acordo com os resultados obtidos da degradação térmica da matéria prima de LF, foi constatado que o fármaco LF foi termoestável após exposição ao calor seco a 80 °C por 120 horas. As amostras de comprimidos de LF foram expostas às mesmas condições da matéria prima, ou seja, submetidas ao calor seco a 80 °C por 120 horas.

As amostras de comprimidos de LF e dos pós dos placebos puros da formulação submetidas ao calor seco foram injetadas no cromatógrafo a líquido de alta eficiência assim como a solução diluente e fase móvel. Os cromatogramas foram então sobrepostos com o objetivo de se excluir os sinais provenientes dos excipientes do placebo puro da formulação e dos demais interferentes, permitindo a identificação e quantificação apenas dos produtos de degradação do fármaco LF.

A quantificação dos produtos de degradação foi realizada relacionando as suas respectivas áreas com a área do padrão de LF devido à ausência dos padrões dos produtos de degradação. Os produtos de degradação foram identificados utilizando como nomenclatura os números cardinais e os seus respectivos tempos de retenção relativos para facilitar a interpretação dos dados obtidos. Os resultados do teor da amostra controle, bem como dos teores do fármaco LF e produtos de degradação obtidos após a degradação térmica empregando o calor seco a 80°C por 120 horas encontram-se na figura 44.

Figura 44 - Quantificação da LF e produtos de degradação obtidos após a degradação térmica de comprimidos de LF empregando o calor seco a 80°C por 120 horas.



Após analisar os dados da figura 44 e comparar os resultados da amostra degradada com a amostra controle, pode-se afirmar que houve a degradação do fármaco LF em cerca de 10,30% e a formação dos produtos de degradação 1; 14; 15 e 16, cujo somatório correspondeu a 3,79%. O percentual restante, equivalente a 12,04%, deve-se a produtos de degradação não cromofóricos e/ou que não puderam ser detectados com o método em questão.

A formulação de comprimidos de LF demonstrou ser instável à degradação térmica empregando o calor seco a 80°C por 120 horas. Provavelmente, esta diferença de reatividade química dos comprimidos de LF, quando comparados com a matéria prima de LF, se deve ao fato de que os excipientes da formulação em combinação com o fármaco podem favorecer a sua degradação.

Pode-se afirmar que o perfil de degradação obtido após a degradação térmica nas condições descritas foi considerado satisfatório para ser utilizado na validação do parâmetro da seletividade/especificidade da metodologia analítica de teor indicativa de estabilidade para comprimidos de LF. O cromatograma representativo desta condição de degradação e

respectivos resultados da resolução entre os sinais obtidos encontram-se na avaliação da seletividade do método validado no item 5.4.1.9.

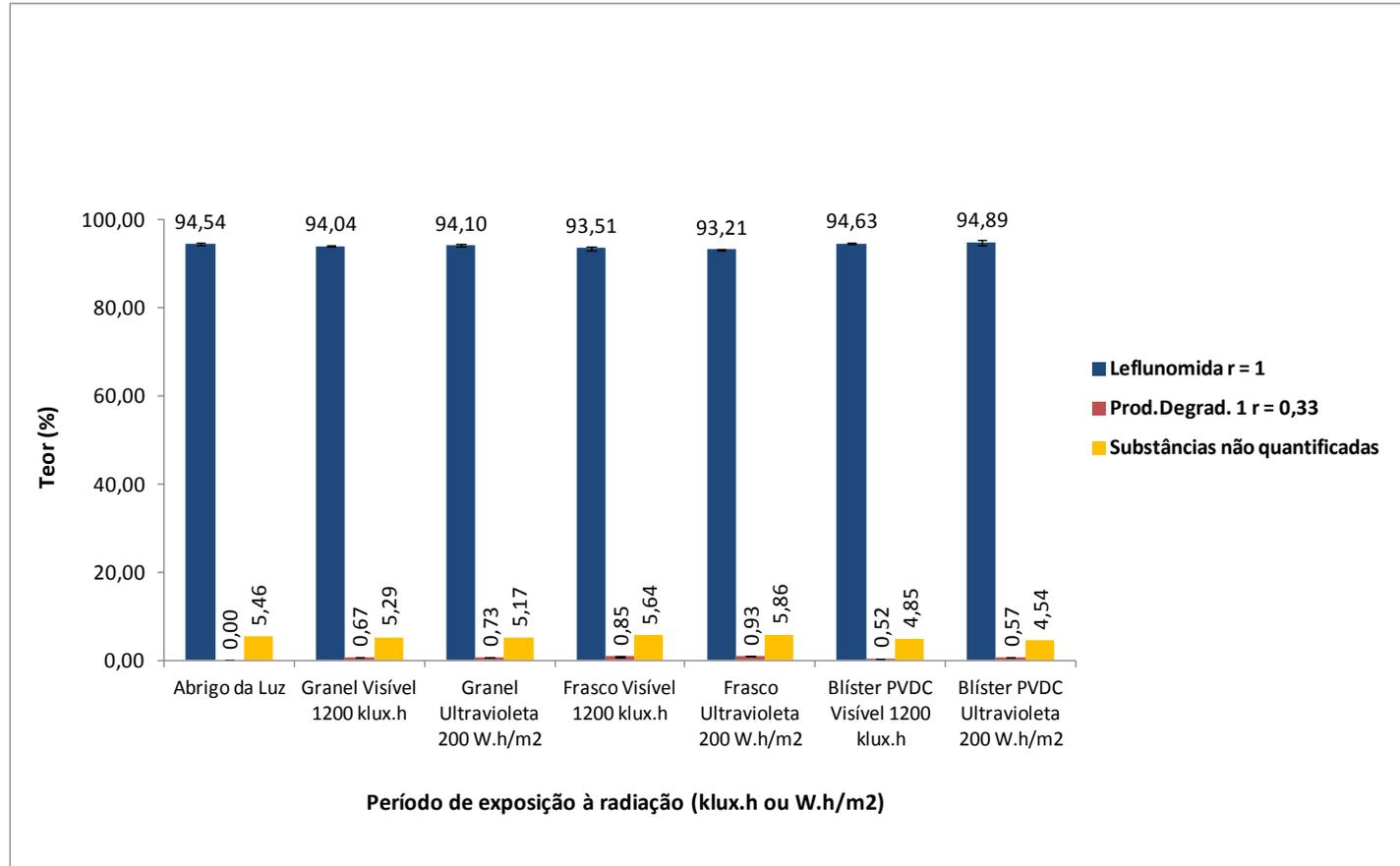
5.3.5 Degradação fotolítica de comprimidos de LF

De acordo com os resultados obtidos da degradação fotolítica da matéria prima de LF, foi constatado que o fármaco LF foi fotoestável à radiação visível e à radiação ultravioleta empregando doses de radiação correspondentes a 1200 klux.h e 200 W.h/m² respectivamente. As amostras de comprimidos de LF na forma de granel e embalagens primárias (frasco e blíster) foram expostas às doses de radiação empregadas nos estudos confirmatórios, as quais correspondem a 1200 klux.h de radiação visível e 200 W.h/m² de radiação ultravioleta (ICH, 1996).

As amostras de comprimidos de LF e dos pós dos placebos puros da formulação submetidas à radiação visível e ultravioleta foram injetadas no cromatógrafo a líquido de alta eficiência assim como a solução diluente e fase móvel. Os cromatogramas foram então sobrepostos com o objetivo de se excluir os sinais provenientes dos excipientes do placebo puro da formulação e dos demais interferentes, permitindo a identificação e quantificação apenas dos produtos de degradação do fármaco LF.

A quantificação dos produtos de degradação foi realizada relacionando as suas respectivas áreas com a área do padrão de LF devido à ausência dos padrões dos produtos de degradação. Estes foram identificados utilizando como nomenclatura os números cardinais e os seus respectivos tempos de retenção relativos para facilitar a interpretação dos dados obtidos. Os resultados do teor da amostra ao abrigo da luz, bem como dos teores do fármaco LF e produtos de degradação obtidos após degradação fotolítica empregando as doses de 1200 klux.h de radiação visível e as doses de 200 W.h/m² de radiação ultravioleta encontram-se na figura 45.

Figura 45 - Quantificação da LF e produtos de degradação obtidos após a degradação fotolítica de comprimidos de LF na forma de granel, frasco de polietileno e blíster de PVDC empregando as doses de 1200 Klux.h de radiação visível e as doses de 200 W.h/m² de radiação ultravioleta.



Após analisar os dados da figura 45 e comparar os resultados das amostras fotodegradadas de comprimidos de LF acondicionadas na forma de granel com a amostra ao abrigo da luz, pode-se afirmar que houve uma degradação do fármaco LF em torno de 0,50% para a amostra exposta à radiação visível e em torno de 0,44% para a amostra exposta à radiação ultravioleta. Em relação à formação do produto de degradação 1, foram quantificados 0,67% e 0,73% para as amostras expostas à radiação visível e ultravioleta respectivamente. Os percentuais restantes equivalentes a 5,29% e 5,17% para as amostras expostas à radiação visível e ultravioleta, respectivamente, devem-se a produtos de degradação não cromofóricos e/ou que não puderam ser detectados com o método em questão.

Após analisar os dados da figura 45 e comparar os resultados das amostras fotodegradadas de comprimidos de LF acondicionadas na forma de frasco de polietileno com a amostra ao abrigo da luz, pode-se afirmar que houve uma degradação do fármaco LF em torno de 1,03% para a amostra exposta à radiação visível e em torno de 1,33% para a amostra exposta à radiação ultravioleta. Em relação à formação do produto de degradação 1, foram quantificados 0,85% e 0,93% para as amostras expostas à radiação visível e ultravioleta respectivamente. Os percentuais restantes equivalentes a 5,64% e 5,86% para as amostras expostas à radiação visível e ultravioleta, respectivamente, devem-se a produtos de degradação não cromofóricos e/ou que não puderam ser detectados com o método em questão.

Após analisar os dados da figura 45 e comparar os resultados das amostras fotodegradadas de comprimidos de LF acondicionadas na forma de blíster PVDC com a amostra ao abrigo da luz, pode-se afirmar que houve uma discreta degradação do fármaco LF, respeitados os respectivos desvios-padrão. Em relação à formação do produto de degradação 1, foram quantificados 0,52% e 0,57% para as amostras expostas à radiação visível e ultravioleta respectivamente. Os percentuais restantes equivalentes a 4,85% e 4,54% para as amostras expostas à radiação visível e ultravioleta, respectivamente, devem-se a produtos de degradação não cromofóricos e/ou que não puderam ser detectados com o método em questão.

As amostras da formulação de comprimidos de LF acondicionadas na forma de granel, na forma de frasco de polietileno e na forma de blíster PVC apresentaram-se instáveis à degradação fotolítica empregando as doses de radiação de 1200 Klux.h de radiação visível e 200 W.h/m² de radiação ultravioleta. Provavelmente, esta diferença de reatividade fotoquímica dos comprimidos de LF quando comparados com a matéria prima de LF se deve

ao fato de que os excipientes da formulação em combinação com o fármaco podem favorecer a sua fotodegradação.

Pode-se afirmar que o perfil de degradação obtido após a degradação fotolítica nas condições descritas foi considerado satisfatório para ser utilizado na validação do parâmetro da seletividade/especificidade da metodologia analítica de teor indicativa de estabilidade para comprimidos de LF. Os cromatogramas representativos destas condições de degradação e respectivos resultados da resolução entre os sinais obtidos encontram-se na avaliação da seletividade do método validado no item 5.4.1.10.

5.4 Validação do método analítico indicativo de estabilidade para quantificação do teor e substâncias relacionadas em comprimidos de LF por CLAE

Para a validação da metodologia analítica indicativa de estabilidade para ensaio de teor e uniformidade de conteúdo de comprimidos de LF por CLAE serão avaliados e discutidos os seguintes parâmetros: seletividade/especificidade; linearidade; teste de efeito matriz; exatidão; precisão; limites de detecção e quantificação; robustez; e estabilidade das soluções.

A seguir encontram-se os resultados e respectivas discussões das análises das amostras preparadas em 4.2.3.1 (página 85), as quais foram analisadas empregando as condições cromatográficas da metodologia analítica considerada indicativa de estabilidade descrita em 4.2.1.2.2 (página 77).

5.4.1 Avaliação da seletividade do método

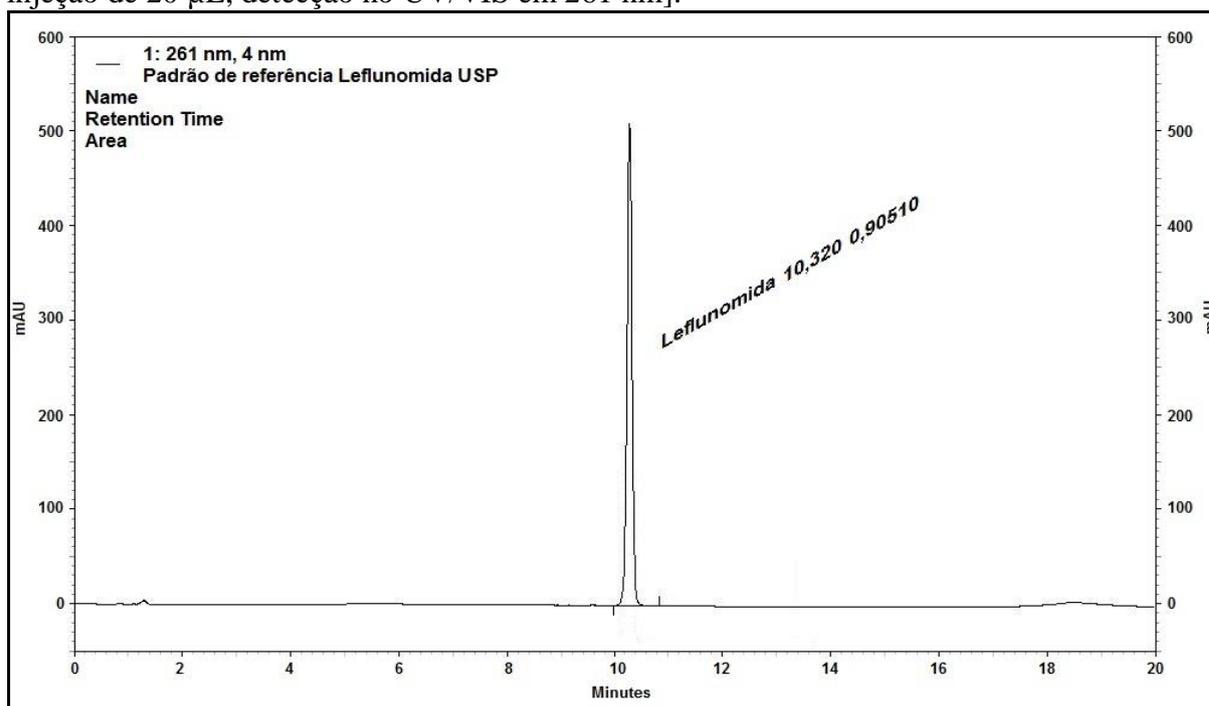
A seletividade foi avaliada através da análise e interpretação dos cromatogramas de várias amostras: solução padrão de referência, solução padrão de trabalho, solução do placebo puro da formulação de comprimidos de LF, solução placebo fortificado a 100% com LF, produto da hidrólise ácida de comprimidos de LF, produto da hidrólise básica de comprimidos de LF, produto da oxidação de comprimidos de LF, produto da degradação térmica de comprimidos de LF, produto da degradação fotolítica de comprimidos de LF, solução diluente

e fase móvel. Os resultados e discussões para cada uma das amostras estudadas encontram-se a seguir.

5.4.1.1 Avaliação da solução padrão de referência

O cromatograma da solução padrão de referência da USP, evidenciando o tempo de retenção e assimetria do pico de LF, encontra-se representado pela figura 46.

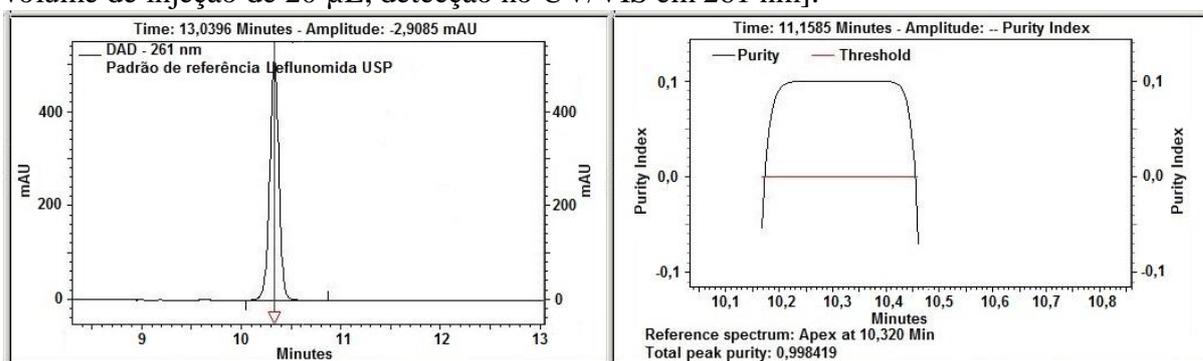
Figura 46 - Cromatograma da solução padrão de referência de LF da USP [Fase móvel composta de acetato de amônio 10 mM:ACN (0 min-70:30; 15 min-20:80; 16 min-70:30 e 20 min-70:30); fluxo de 1,0 mL/min; coluna C18 (125x4,0) mm, 5 μ m a 25°C; volume de injeção de 20 μ L; detecção no UV/VIS em 261 nm].



A partir da análise do cromatograma da solução padrão de referência de LF da USP, o qual está representado pela figura 46, observa-se um pico bem definido com tempo de retenção de aproximadamente 10,32 minutos e assimetria de 0,9 correspondente ao fármaco LF. A assimetria obtida para o pico de LF encontra-se dentro do critério de aceitação de adequação do sistema que varia de 0,9 a 1,5 (SNYDER; KIRKLAND; GLAJCH, 1997).

A pureza total do pico de LF foi avaliada empregando a análise espectral com detector na região do UV realizando varredura na faixa de 200 a 400 nm e adotando uma resolução de 1 nm. O teste de pureza de pico está representado pela figura 47.

Figura 47 - Teste de pureza de pico da solução padrão de referência de LF da USP [Fase móvel composta de acetato de amônio 10 mM:ACN (0 min-70:30; 15 min-20:80; 16 min-70:30 e 20 min-70:30); fluxo de 1,0 mL/min; coluna C18 (125x4,0) mm, 5 μ m a 25°C; volume de injeção de 20 μ L; detecção no UV/VIS em 261 nm].

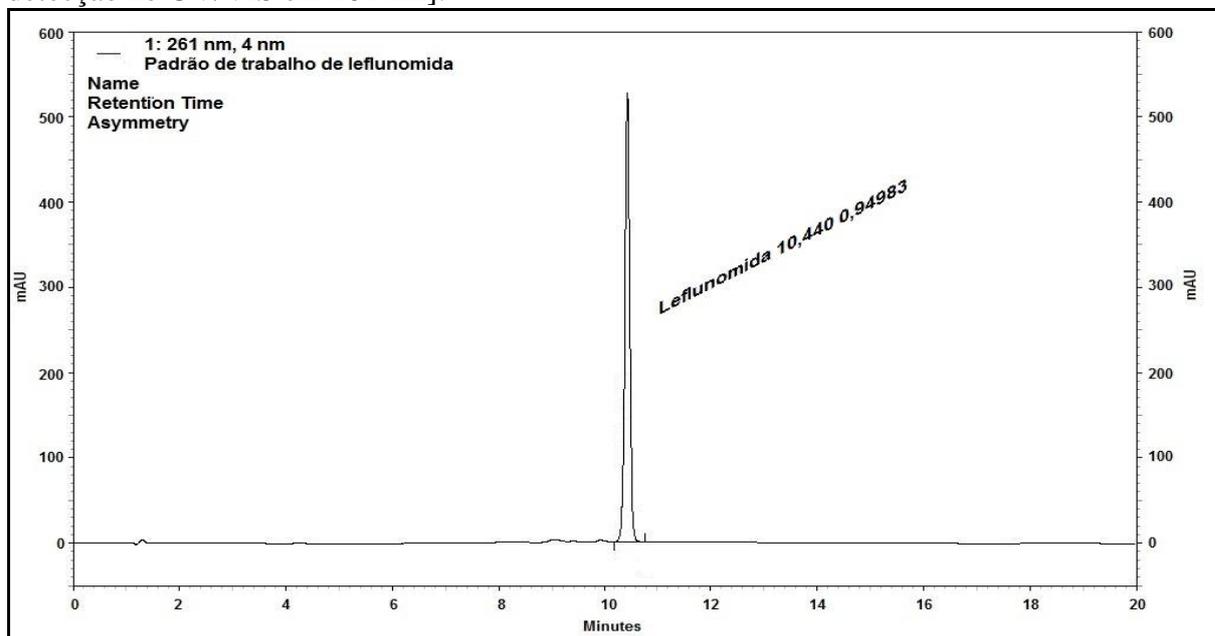


A partir da análise da figura 47, observa-se que o valor do índice de pureza obtido para o pico de LF foi de 0,998, o qual foi superior ao índice de pureza mínimo especificado de 0,980 (SIEVERT, H. J. P.; DROUEN, A. C. J. H., 1993). O resultado sugere se tratar de um composto puro, ou seja, não está havendo coeluição de nenhuma outra substância no mesmo tempo de retenção avaliado.

5.4.1.2 Avaliação da solução padrão de trabalho

O cromatograma da solução padrão de trabalho, evidenciando o tempo de retenção e assimetria do pico de LF, encontra-se representado pela figura 48.

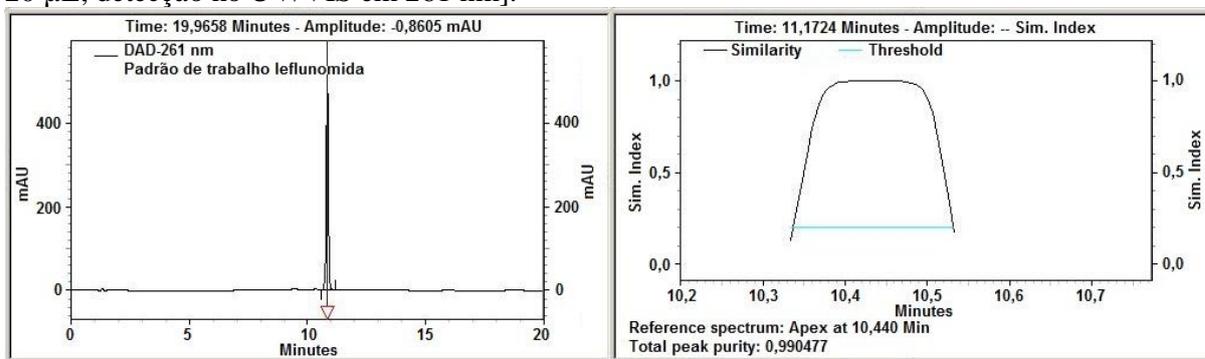
Figura 48 - Cromatograma da solução padrão de trabalho de LF [Fase móvel composta de acetato de amônio 10 mM:ACN (0 min-70:30; 15 min-20:80; 16 min-70:30 e 20 min-70:30); fluxo de 1,0 mL/min; coluna C18 (125x4,0) mm, 5 µm a 25°C; volume de injeção de 20 µL; detecção no UV/VIS em 261 nm].



A partir da análise do cromatograma da solução padrão de trabalho, o qual está representado pela figura 48, observa-se um pico bem definido com tempo de retenção de aproximadamente 10,44 minutos e assimetria de 0,95 correspondente ao fármaco LF. A assimetria obtida para o pico de LF encontra-se dentro do critério de aceitação de adequação do sistema que varia de 0,9 a 1,5 (SNYDER; KIRKLAND; GLAJCH, 1997). Os valores encontrados para o tempo de retenção e assimetria foram similares aos obtidos para o pico do padrão de referência de LF da USP, o que sugere se tratar da mesma substância.

A pureza total do pico de LF foi avaliada empregando a análise espectral com detector na região do UV realizando varredura na faixa de 200 a 400 nm e adotando uma resolução de 1 nm. O teste de pureza de pico está representado pela figura 49.

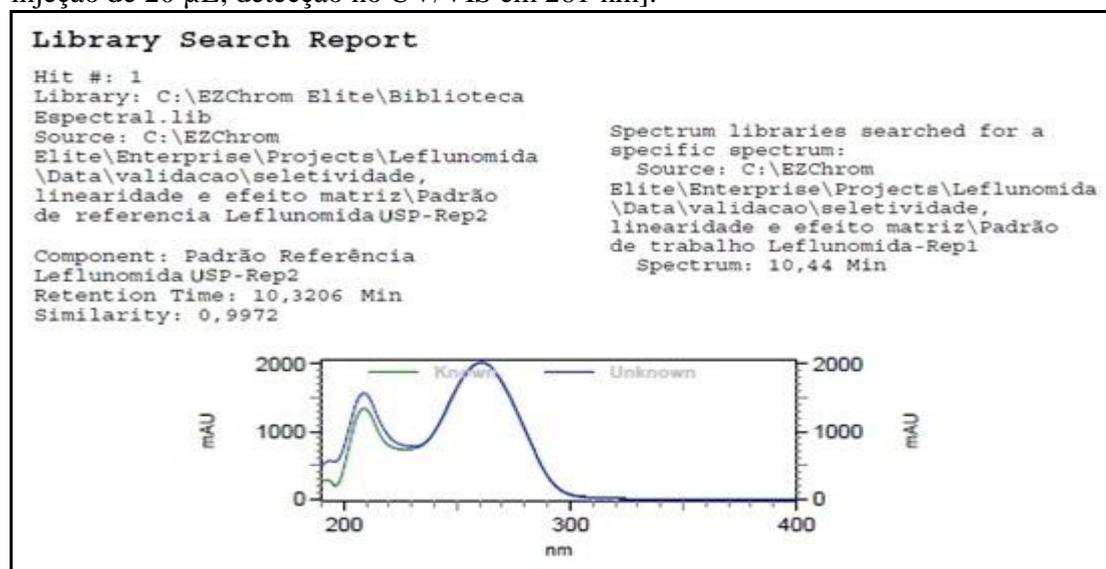
Figura 49 - Teste de pureza de pico da solução padrão de trabalho de LF [Fase móvel composta de acetato de amônio 10 mM:ACN (0 min-70:30; 15 min-20:80; 16 min-70:30 e 20 min-70:30); fluxo de 1,0 mL/min; coluna C18 (125x4,0) mm, 5 μ m a 25°C; volume de injeção de 20 μ L; detecção no UV/VIS em 261 nm].



A partir da análise da figura 49, observa-se que o valor do índice de pureza obtido para o pico de LF foi de 0,990, o qual foi superior ao índice de pureza mínimo especificado de 0,980 (SIEVERT, H. J. P.; DROUEN, A. C. J. H., 1993). O resultado sugere se tratar de um composto puro, ou seja, não está havendo coeluição de nenhuma outra substância no mesmo tempo de retenção avaliado.

O teste de análise espectral para o padrão de trabalho de LF, o qual foi realizado considerando a faixa de 200 a 400 nm na região do ultravioleta com resolução de 1 nm, encontra-se representado pela figura 50.

Figura 50 - Teste de análise espectral do padrão de trabalho de LF [Fase móvel composta de acetato de amônio 10 mM:ACN (0 min-70:30;15 min-20:80; 16 min-70:30 e 20 min-70:30); fluxo de 1,0 mL/min; coluna C18 (125x4,0) mm, 5 μ m a 25°C; volume de injeção de 20 μ L; detecção no UV/VIS em 261 nm].

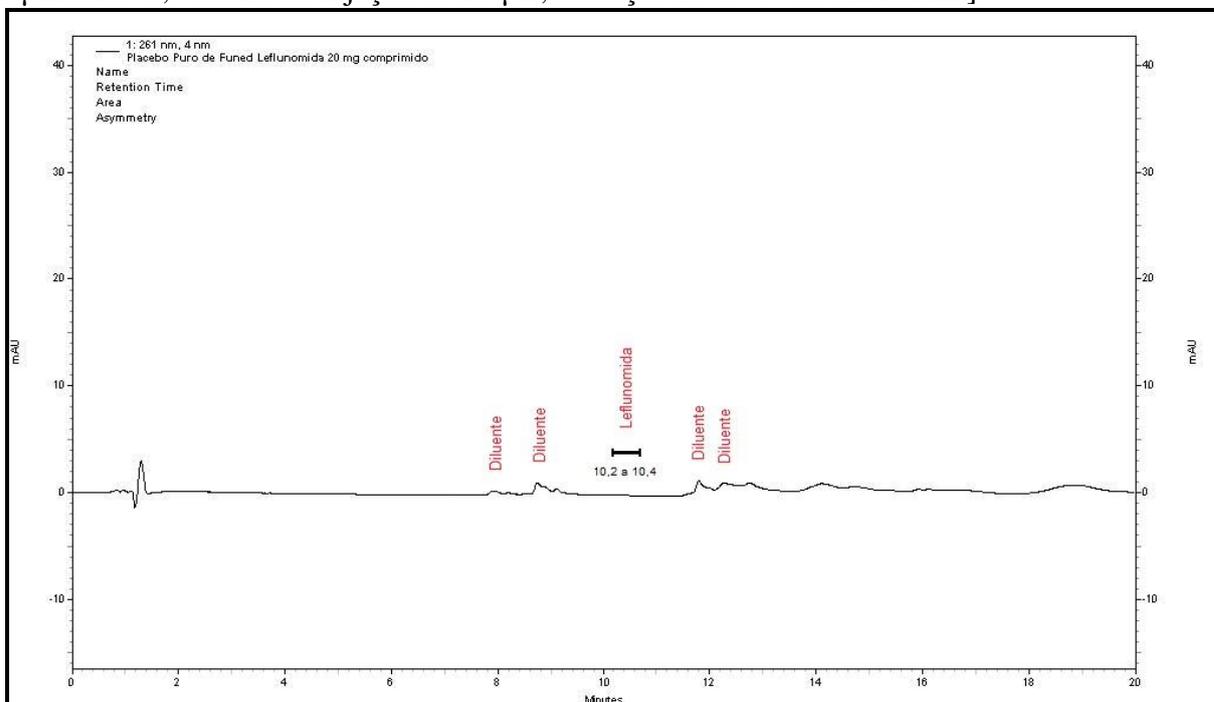


A partir da análise da figura 50 pode-se observar que, após realizada a comparação do espectro do padrão de trabalho de LF com o espectro do padrão de referência de LF da USP, foi encontrada uma similaridade de 0,9972, a qual foi superior a similaridade mínima especificada de 0,990 (SIEVERT, H. J. P.; DROUEN, A. C. J. H., 1993) confirmando a identidade da substância em análise.

5.4.1.3 Avaliação da solução do placebo da formulação de comprimidos de LF

O cromatograma da solução do placebo da formulação de comprimidos de LF encontra-se representado pela figura 51.

Figura 51 – Cromatograma com aproximação da solução do placebo da formulação de comprimidos de LF [Fase móvel composta de acetato de amônio 10mM:ACN (0min-70:30; 15min-20:80; 16min-70:30 e 20min-70:30); fluxo de 1,0 mL/min; coluna C18 (125x4,0)mm, 5µm a 25°C; volume de injeção de 20 µL; detecção no UV/VIS em 261nm].



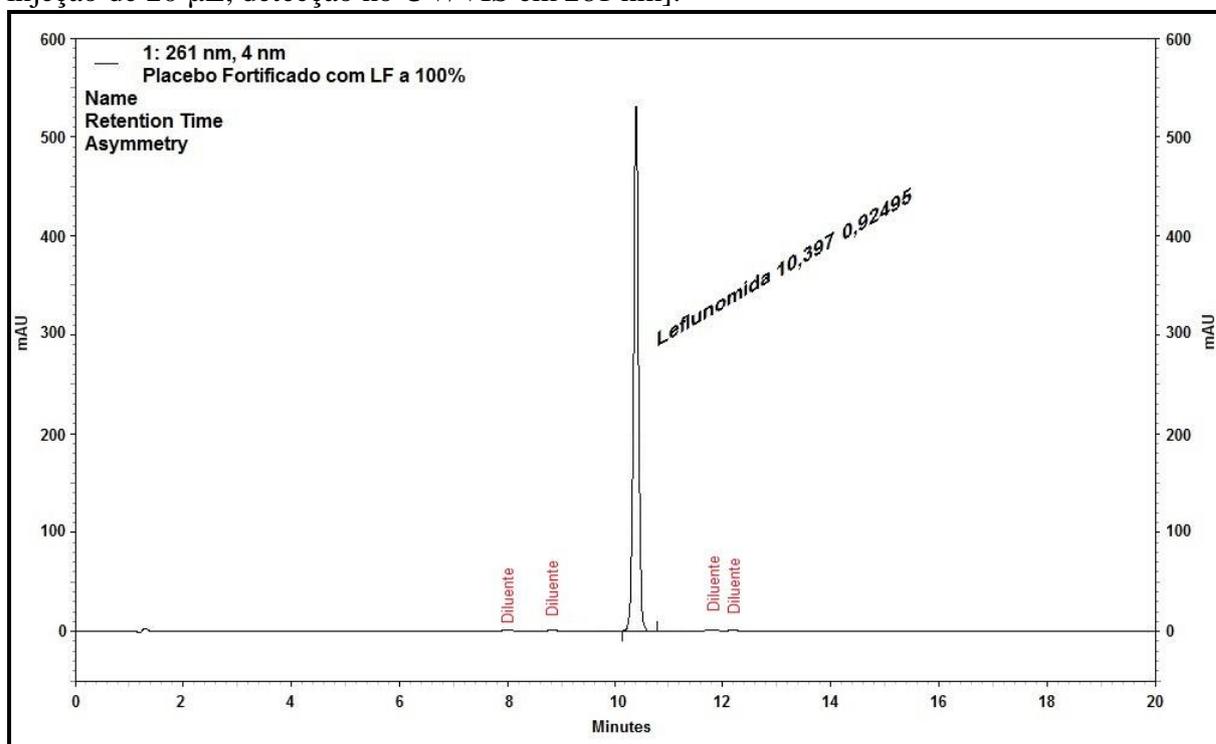
O placebo é constituído pelos excipientes da formulação de comprimidos de LF e não deve interferir na análise. Como pode ser observado no cromatograma da figura 51 não

existem picos interferentes eluindo no mesmo tempo de retenção do fármaco LF que seria eluído na faixa de 10,2 a 10,4 minutos. Isso significa que os excipientes da formulação não interferem na quantificação do fármaco LF. Os sinais encontrados próximos à LF estão relacionados a impurezas presentes na solução diluente que também não interferem na quantificação do fármaco.

5.4.1.4 Avaliação da solução placebo fortificada a 100 % com LF

O cromatograma da solução placebo fortificada com LF a 100%, evidenciando o tempo de retenção e assimetria do pico de LF, encontra-se representado pela figura 52.

Figura 52 - Cromatograma da solução placebo fortificada com LF a 100 % [Fase móvel composta de acetato de amônio 10 mM:ACN (0 min-70:30; 15 min-20:80; 16 min-70:30 e 20 min-70:30); fluxo de 1,0 mL/min; coluna C18 (125x4,0) mm, 5 μ m a 25°C; volume de injeção de 20 μ L; detecção no UV/VIS em 261 nm].

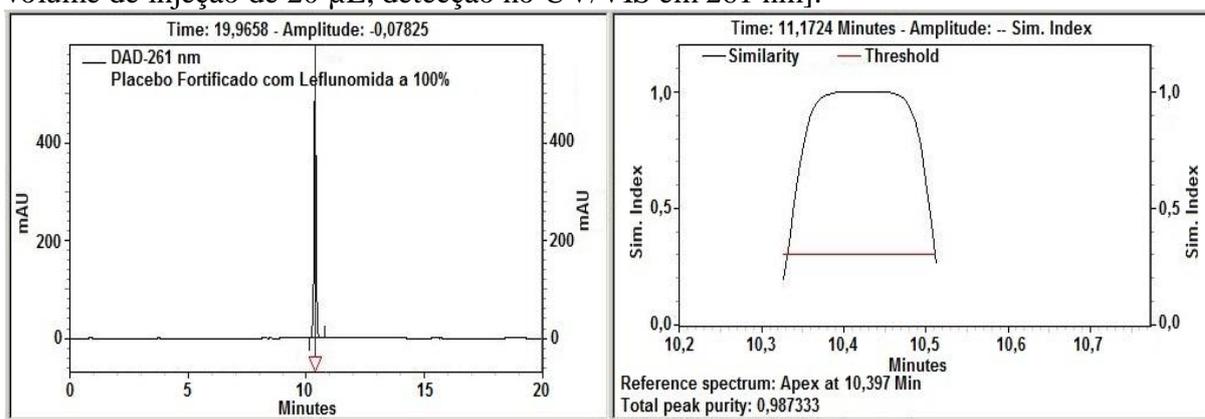


O placebo fortificado é constituído pela mistura dos excipientes da formulação com quantidade conhecida do princípio ativo. Através dessa amostra pode-se avaliar se existe alguma interferência dos excipientes da formulação de comprimidos de LF quando estão associados ao fármaco LF.

A partir da análise do cromatograma da solução placebo fortificada com LF a 100%, o qual está representado pela figura 52, observa-se um pico bem definido com tempo de retenção de aproximadamente 10,4 minutos e assimetria de 0,92 correspondente ao fármaco LF. A assimetria obtida para o pico de LF encontra-se dentro do critério de aceitação de adequação do sistema que varia de 0,9 a 1,5 (SNYDER; KIRKLAND; GLAJCH, 1997). Os valores encontrados para o tempo de retenção e assimetria foram similares aos obtidos para o pico do padrão de trabalho de LF e para o padrão de referência de LF da USP, o que sugere se tratar da mesma substância.

A pureza total do pico de LF foi avaliada empregando a análise espectral com detector na região do UV realizando varredura na faixa de 200 a 400 nm e adotando uma resolução de 1 nm. O teste de pureza de pico está representado pela figura 53.

Figura 53 - Teste de pureza de pico da solução placebo fortificada com LF a 100% [Fase móvel composta de acetato de amônio 10 mM:ACN (0 min-70:30; 15 min-20:80; 16 min-70:30 e 20 min-70:30); fluxo de 1,0 mL/min; coluna C18 (125x4,0) mm, 5 µm a 25°C; volume de injeção de 20 µL; detecção no UV/VIS em 261 nm].



A partir da análise da figura 53, observa-se que o valor do índice de pureza obtido para o pico de LF foi de 0,987, o qual foi superior ao índice de pureza mínimo especificado de 0,980 (SIEVERT, H. J. P.; DROUEN, A. C. J. H., 1993). O resultado sugere se tratar de um composto puro, ou seja, não está havendo coeluição de nenhuma outra substância no mesmo

tempo de retenção avaliado. Pode-se afirmar, portanto, que os excipientes da formulação não interferem na quantificação do fármaco LF.

5.4.1.5 Avaliação da solução diluente e fase móvel

Os cromatogramas da solução diluente e fase móvel encontram-se representados pelas figuras 54 e 55.

Figura 54 - Cromatograma com aproximação da solução diluente [Fase móvel composta de acetato de amônio 10 mM:ACN (0 min-70:30; 15 min-20:80; 16 min-70:30 e 20 min-70:30); fluxo de 1,0 mL/min; coluna C18 (125x4,0) mm, 5 µm a 25°C; volume de injeção de 20 µL; detecção no UV/VIS em 261 nm].

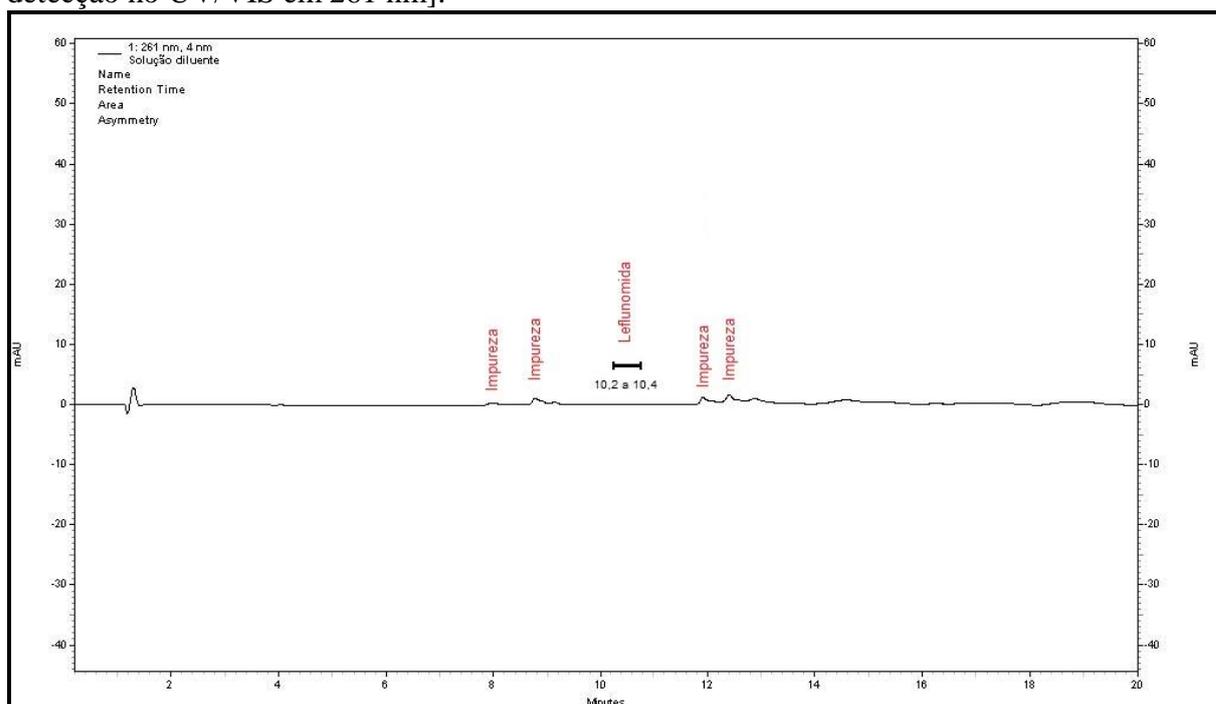
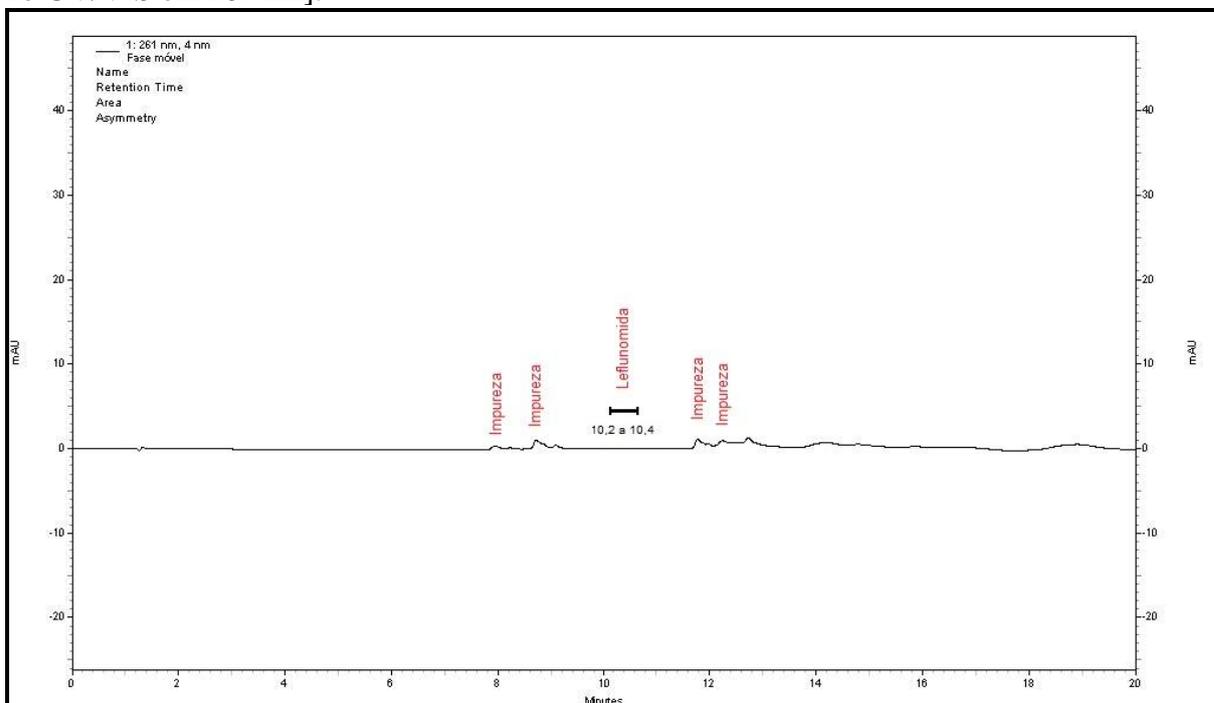


Figura 55 – Cromatograma com aproximação da fase móvel [Fase móvel composta de acetato de amônio 10 mM:ACN (0 min-70:30; 15 min-20:80; 16 min-70:30 e 20 min-70:30); fluxo de 1,0 mL/min; coluna C18 (125x4,0) mm, 5 µm a 25°C; volume de injeção de 20 µL; detecção no UV/VIS em 261 nm].

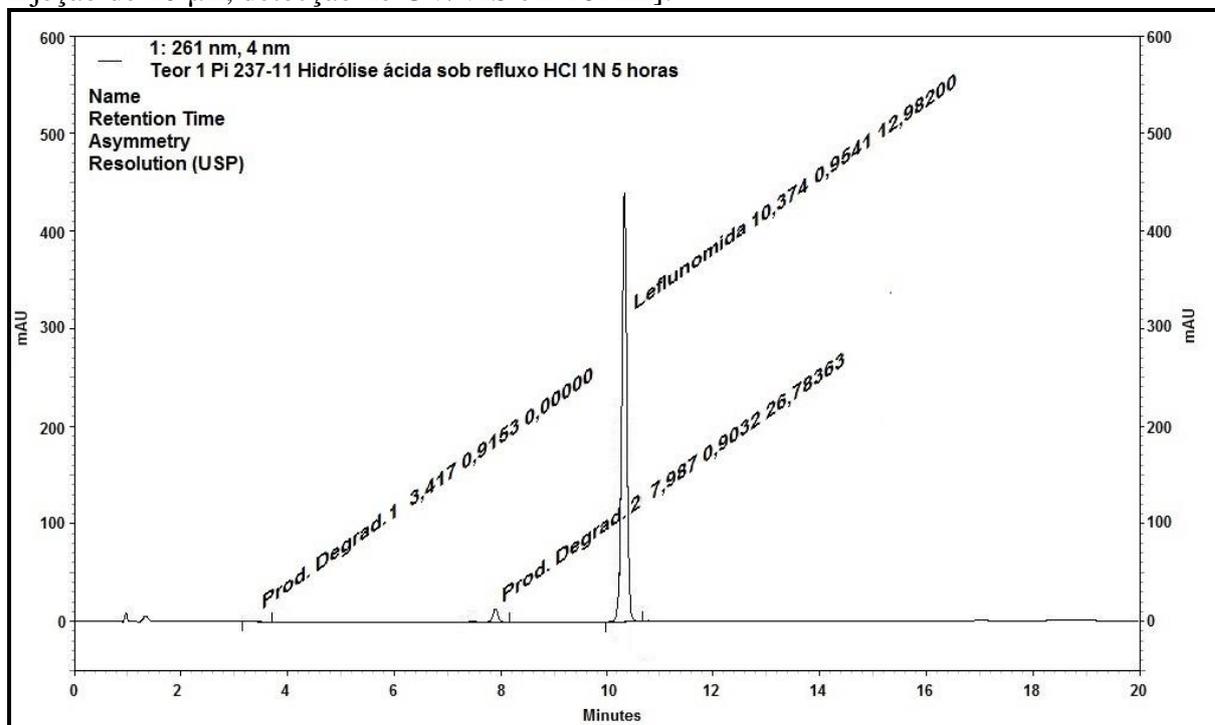


A solução diluente é utilizada no preparo das amostras enquanto a fase móvel é empregada na corrida cromatográfica. Ambas as amostras não devem interferir nas análises. Como pode ser observado nos cromatogramas das figuras 54 e 55, não existem sinais de impurezas eluindo no mesmo tempo de retenção do fármaco LF que seria eluído na faixa de 10,2 a 10,4 minutos. Isso significa que a solução diluente e fase móvel não interferem na quantificação do fármaco LF.

5.4.1.6 Avaliação do produto de hidrólise ácida de comprimidos de LF

O cromatograma do produto da hidrólise ácida de comprimidos de LF, evidenciando o tempo de retenção, assimetria do pico e resolução cromatográfica, encontra-se representado pela figura 56.

Figura 56 - Cromatograma do produto da hidrólise ácida de comprimidos de LF [Fase móvel composta de acetato de amônio 10mM:ACN (0min-70:30; 15min-20:80; 16min-70:30 e 20min-70:30); fluxo de 1,0 mL/min; coluna C18 (125x4,0)mm, 5µm a 25°C; volume de injeção de 20 µL; detecção no UV/VIS em 261nm].



O produto da hidrólise ácida de comprimidos de LF é constituído pelo fármaco LF degradado na faixa de 10 a 30% e pelos produtos de degradação 1 e 2. Através do cromatograma pode-se avaliar se existe alguma interferência dos produtos de degradação gerados na quantificação do fármaco LF.

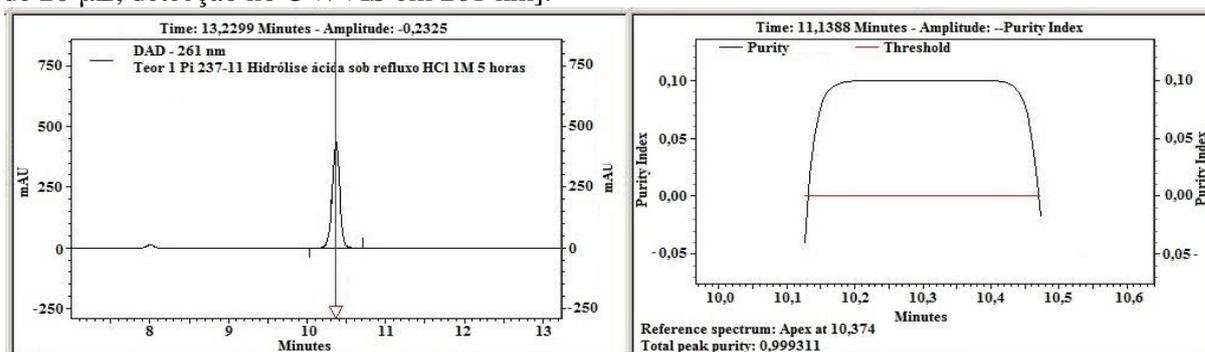
A partir da análise do cromatograma do produto da hidrólise ácida de comprimidos de LF, o qual está representado pela figura 56, observa-se um pico bem definido com tempo de retenção de aproximadamente 10,4 minutos e assimetria de 0,95 correspondente ao fármaco LF. Houve a formação dos produtos de degradação 1 e 2, os quais apresentaram tempos de retenção de 3,4 e 8,0 minutos respectivamente. Os valores de assimetria de pico encontrados para os produtos de degradação 1 e 2 foram correspondentes a 0,92 e 0,90 respectivamente. As assimetrias obtidas para os sinais de LF e dos produtos de degradação encontram-se dentro do critério de aceitação de adequação do sistema que varia de 0,9 a 1,5 (SNYDER; KIRKLAND; GLAJCH, 1997).

Os produtos de degradação 1, 2 e o fármaco LF apresentaram resoluções cromatográficas iguais a 26,78 e 12,98. Os valores de resolução cromatográfica obtidos foram

superiores ao limite mínimo especificado de 2,00 (SNYDER; KIRKLAND; GLAJCH, 1997). Isto significa que todos os picos do cromatograma possuem resolução satisfatória entre eles. Desta forma, conclui-se que os produtos de degradação gerados após hidrólise ácida não interferem na quantificação deles mesmos e também não interferem na quantificação do fármaco LF em comprimidos.

A pureza total do pico de LF foi avaliada empregando a análise espectral com detector na região do UV realizando varredura na faixa de 200 a 400 nm e adotando uma resolução de 1 nm. O teste de pureza de pico está representado pela figura 57.

Figura 57 - Teste de pureza de pico do produto de hidrólise ácida de comprimidos de LF [Fase móvel composta de acetato de amônio 10 mM:ACN (0 min-70:30; 15 min-20:80; 16 min-70:30 e 20 min-70:30); fluxo de 1,0 mL/min; coluna C18 (125x4,0) mm, 5 µm a 25°C; volume de injeção de 20 µL; detecção no UV/VIS em 261 nm].



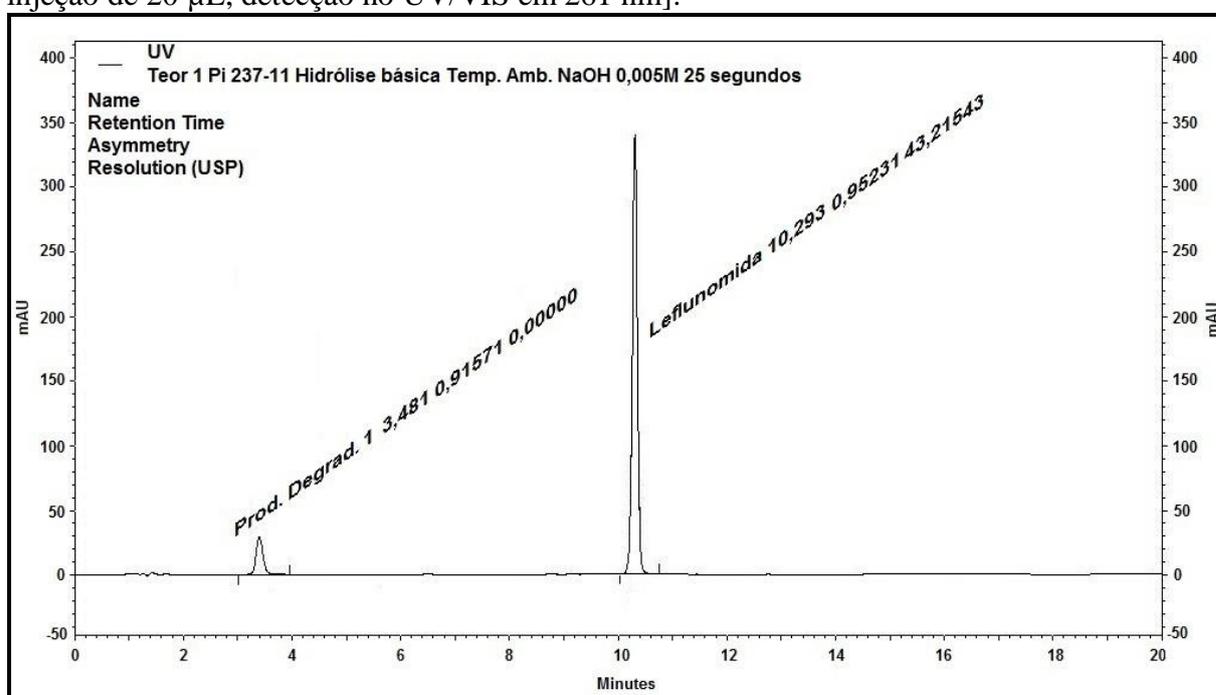
A partir da análise da figura 57, observa-se que o valor do índice de pureza obtido para o pico de LF foi de 0,999, o qual foi superior ao índice de pureza mínimo especificado de 0,980 (SIEVERT, H. J. P.; DROUEN, A. C. J. H., 1993). O resultado sugere se tratar de um composto puro, ou seja, não está havendo coeluição de nenhuma outra substância no mesmo tempo de retenção avaliado. Pode-se afirmar portanto que os produtos de degradação gerados após hidrólise ácida não interferem na quantificação do fármaco LF.

Não foram realizados os testes de pureza de pico para os produtos de degradação porque não foram obtidos espectros com intensidade adequada para se realizar os cálculos. Além disso a RDC n° 58 de 20 de dezembro de 2013 da ANVISA, em seu artigo 7°, exige a verificação da pureza cromatográfica apenas do pico do insumo farmacêutico ativo nos cromatogramas das amostras degradadas (BRASIL, 2013).

5.4.1.7 Avaliação do produto de hidrólise básica de comprimidos de LF

O cromatograma do produto da hidrólise básica de comprimidos de LF, evidenciando o tempo de retenção, assimetria do pico e resolução cromatográfica, encontra-se representado pela figura 58.

Figura 58 - Cromatograma do produto da hidrólise básica de comprimidos de LF [Fase móvel composta de acetato de amônio 10 mM:ACN (0 min-70:30; 15 min-20:80; 16 min-70:30 e 20 min-70:30); fluxo de 1,0 mL/min; coluna C18 (125x4,0) mm, 5 µm a 25°C; volume de injeção de 20 µL; detecção no UV/VIS em 261 nm].



O produto da hidrólise básica de comprimidos de LF é constituído pelo fármaco LF degradado na faixa de 10 a 30% e pelo produto de degradação 1. Através do cromatograma pode-se avaliar se existe alguma interferência do produto de degradação gerado na quantificação do fármaco LF.

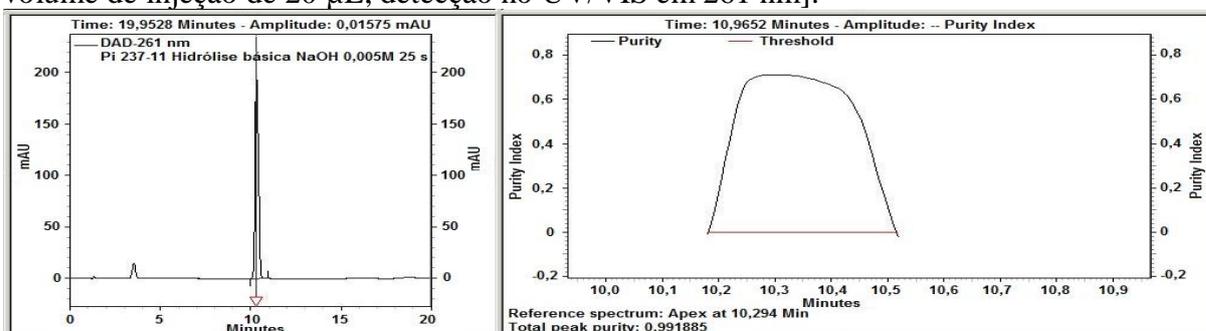
A partir da análise do cromatograma do produto da hidrólise básica de comprimidos de LF, o qual está representado pela figura 58, observa-se um pico bem definido com tempo de retenção de aproximadamente 10,3 minutos e assimetria de 0,95 correspondente ao fármaco LF. Houve a formação do produto de degradação 1, o qual apresentou tempo de

retenção de 3,5 minutos. O valor de assimetria de pico encontrado para o produto de degradação 1 foi correspondente a 0,92. As assimetrias obtidas para os sinais de LF e do produto de degradação encontram-se dentro do critério de aceitação de adequação do sistema que varia de 0,9 a 1,5 (SNYDER; KIRKLAND; GLAJCH, 1997).

O produto de degradação 1 e o fármaco LF apresentaram resolução cromatográfica igual a 43,22. O valor de resolução cromatográfica obtido foi superior ao limite mínimo especificado de 2,00 (SNYDER; KIRKLAND; GLAJCH, 1997). Isto significa que todos os picos do cromatograma possuem resolução satisfatória entre eles. Desta forma, conclui-se que o produto de degradação gerado após hidrólise básica não interfere na quantificação do fármaco LF em comprimidos.

A pureza total do pico de LF foi avaliada empregando a análise espectral com detector na região do UV realizando varredura na faixa de 200 a 400 nm e adotando uma resolução de 1 nm. O teste de pureza de pico está representado pela figura 59.

Figura 59 - Teste de pureza de pico do produto de hidrólise básica de comprimidos de LF [Fase móvel composta de acetato de amônio 10 mM:ACN (0 min-70:30; 15 min-20:80; 16 min-70:30 e 20 min-70:30); fluxo de 1,0 mL/min; coluna C18 (125x4,0) mm, 5 μ m a 25°C; volume de injeção de 20 μ L; detecção no UV/VIS em 261 nm].



A partir da análise da figura 59, observa-se que o valor do índice de pureza obtido para o pico de LF foi de 0,992, o qual foi superior ao índice de pureza mínimo especificado de 0,980 (SIEVERT, H. J. P.; DROUEN, A. C. J. H., 1993). O resultado sugere se tratar de um composto puro, ou seja, não está havendo coeluição de nenhuma outra substância no mesmo tempo de retenção avaliado. Pode-se afirmar portanto que o produto de degradação gerado após hidrólise básica não interfere na quantificação do fármaco LF.

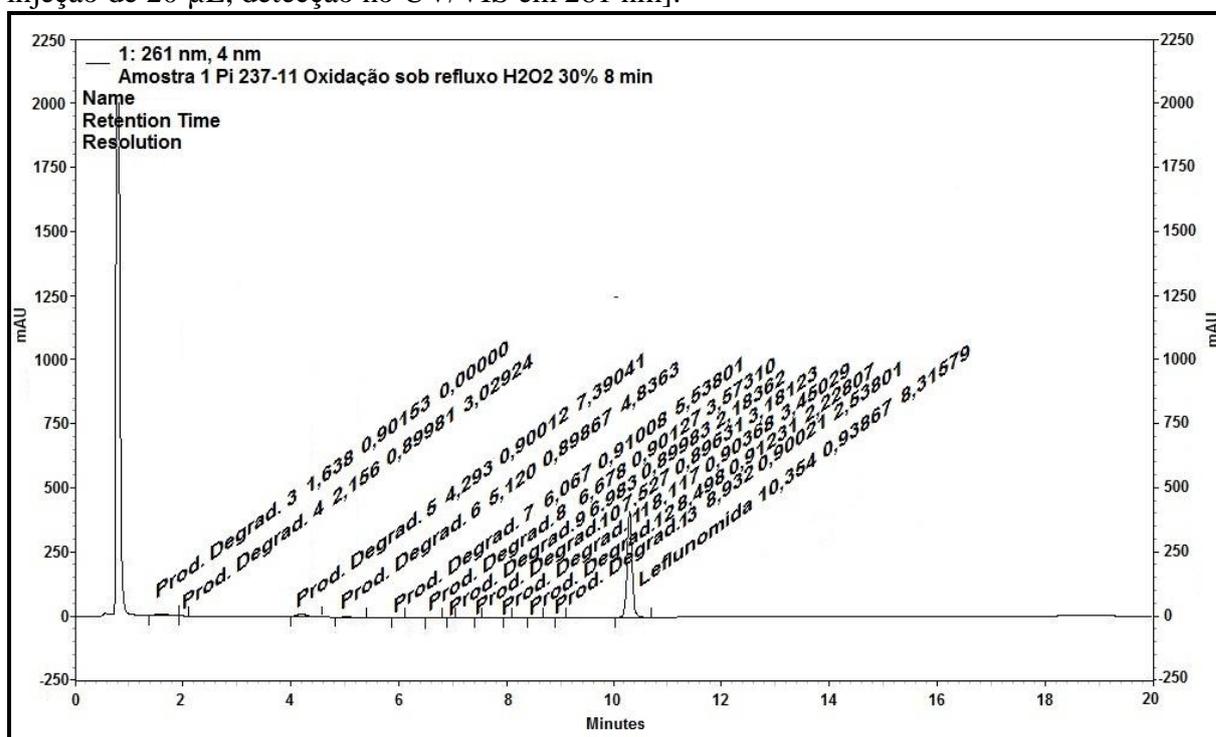
Não foi realizado o teste de pureza de pico para o produto de degradação porque não foi obtido espectro com intensidade adequada para se realizar o cálculo. Além disso a RDC n°

58 de 20 de dezembro de 2013 da ANVISA, em seu artigo 7º, exige a verificação da pureza cromatográfica apenas do pico do insumo farmacêutico ativo nos cromatogramas das amostras degradadas (BRASIL, 2013).

5.4.1.8 Avaliação do produto de oxidação de comprimidos de LF

O cromatograma do produto de oxidação de comprimidos de LF, evidenciando o tempo de retenção, assimetria do pico e resolução cromatográfica, encontra-se representado pela figura 60.

Figura 60 - Cromatograma do produto de oxidação de comprimidos de LF [Fase móvel composta de acetato de amônio 10 mM:ACN (0 min-70:30; 15 min-20:80; 16 min-70:30 e 20 min-70:30); fluxo de 1,0 mL/min; coluna C18 (125x4,0) mm, 5 µm a 25°C; volume de injeção de 20 µL; detecção no UV/VIS em 261 nm].



O produto da oxidação de comprimidos de LF é constituído pelo fármaco LF degradado na faixa de 10 a 30% e pelos produtos de degradação 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 e

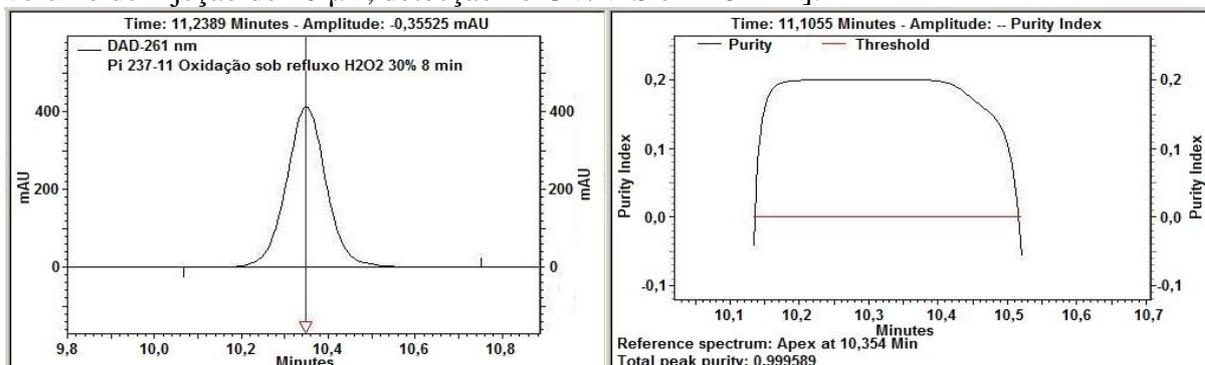
13. Através do cromatograma pode-se avaliar se existe alguma interferência dos produtos de degradação gerados na quantificação do fármaco LF.

A partir da análise do cromatograma do produto de oxidação de comprimidos de LF, o qual está representado pela figura 60, observa-se um pico bem definido com tempo de retenção de aproximadamente 10,4 minutos e assimetria de 0,94 correspondente ao fármaco LF. Houve a formação dos produtos de degradação 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 e 13, os quais apresentaram tempos de retenção de 1,638, 2,156, 4,293, 5,120, 6,067, 6,678, 6,983, 7,527, 8,117, 8,498 e 8,932 minutos respectivamente. Os valores de assimetria de pico encontrados para os produtos de degradação 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 e 13 foram correspondentes a 0,90, 0,90, 0,90, 0,90, 0,91, 0,90, 0,90, 0,90, 0,90, 0,91 e 0,90 respectivamente. As assimetrias obtidas para os sinais de LF e dos produtos de degradação encontram-se dentro do critério de aceitação de adequação do sistema que varia de 0,9 a 1,5 (SNYDER; KIRKLAND; GLAJCH, 1997).

Os produtos de degradação 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 e o fármaco LF apresentaram resoluções cromatográficas iguais a 3,03, 7,39, 4,84, 5,54, 3,57, 2,18, 3,18, 3,45, 2,23, 2,54 e 8,32. Os valores de resolução cromatográfica obtidos foram superiores ao limite mínimo especificado de 2,00 (SNYDER; KIRKLAND; GLAJCH, 1997). Isto significa que todos os picos do cromatograma possuem resolução satisfatória entre eles. Desta forma, conclui-se que os produtos de degradação gerados após oxidação não interferem na quantificação deles mesmos e também não interferem na quantificação do fármaco LF em comprimidos.

A pureza total do pico de LF foi avaliada empregando a análise espectral com detector na região do UV realizando varredura na faixa de 200 a 400 nm e adotando uma resolução de 1 nm. O teste de pureza de pico está representado pela figura 61.

Figura 61 - Teste de pureza de pico do produto de oxidação de comprimidos de LF [Fase móvel composta de acetato de amônio 10 mM:ACN (0 min-70:30; 15 min-20:80; 16 min-70:30 e 20 min-70:30); fluxo de 1,0 mL/min; coluna C18 (125x4,0) mm, 5 μ m a 25°C; volume de injeção de 20 μ L; detecção no UV/VIS em 261 nm].



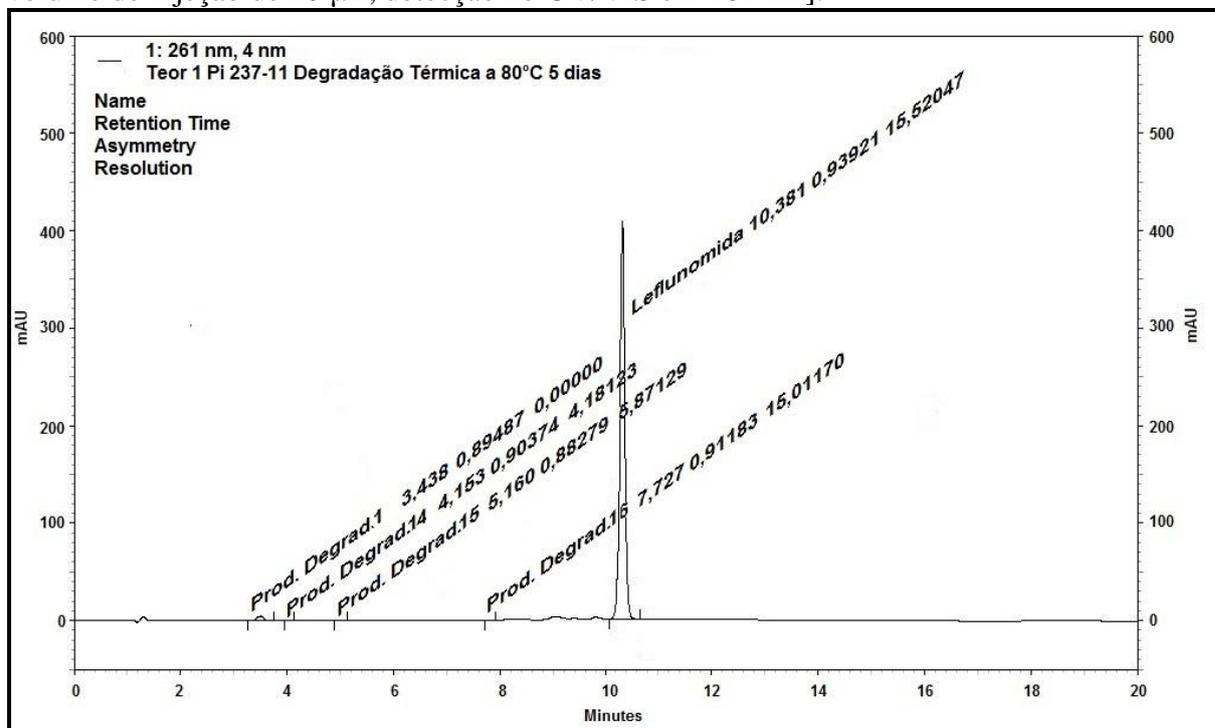
A partir da análise da figura 61, observa-se que o valor do índice de pureza obtido para o pico de LF foi de 1,000, o qual foi superior ao índice de pureza mínimo especificado de 0,980 (SIEVERT, H. J. P.; DROUEN, A. C. J. H., 1993). O resultado sugere se tratar de um composto puro, ou seja, não está havendo coeluição de nenhuma outra substância no mesmo tempo de retenção avaliado. Pode-se afirmar portanto que os produtos de degradação gerados após oxidação não interferem na quantificação do fármaco LF.

Não foram realizados os testes de pureza de pico para os produtos de degradação porque não foram obtidos espectros com intensidade adequada para se realizar os cálculos. Além disso a RDC n° 58 de 20 de dezembro de 2013 da ANVISA, em seu artigo 7°, exige a verificação da pureza cromatográfica apenas do pico do insumo farmacêutico ativo nos cromatogramas das amostras degradadas (BRASIL, 2013).

5.4.1.9 Avaliação do produto de degradação térmica de comprimidos de LF

O cromatograma do produto de degradação térmica de comprimidos de LF, evidenciando o tempo de retenção, assimetria do pico e resolução cromatográfica, encontra-se representado pela figura 62.

Figura 62 - Cromatograma do produto de degradação térmica de comprimidos de LF [Fase móvel composta de acetato de amônio 10 mM:ACN (0 min-70:30; 15 min-20:80; 16 min-70:30 e 20 min-70:30); fluxo de 1,0 mL/min; coluna C18 (125x4,0) mm, 5 µm a 25°C; volume de injeção de 20 µL; detecção no UV/VIS em 261 nm].



O produto de degradação térmica de comprimidos de LF é constituído pelo fármaco LF degradado e pelos produtos de degradação 1, 14, 15 e 16. Através do cromatograma pode-se avaliar se existe alguma interferência dos produtos de degradação gerados na quantificação do fármaco LF.

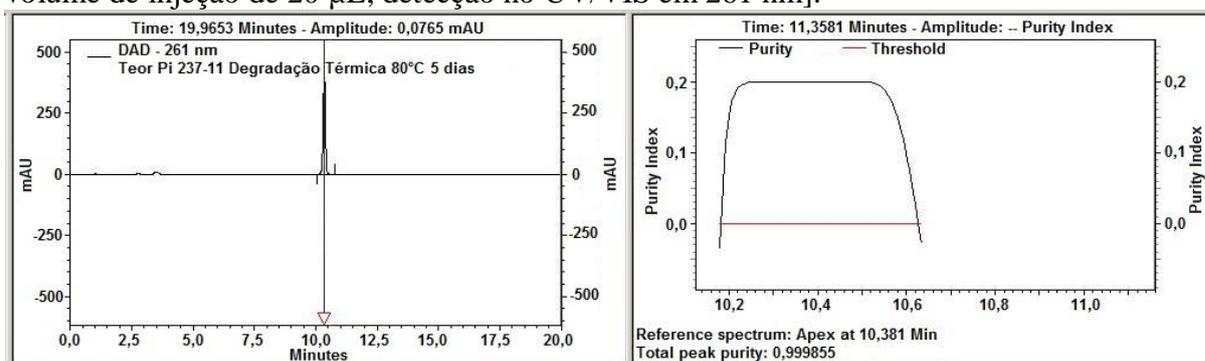
A partir da análise do cromatograma do produto de degradação térmica de comprimidos de LF, o qual está representado pela figura 62, observa-se um pico bem definido com tempo de retenção de aproximadamente 10,4 minutos e assimetria de 0,94 correspondente ao fármaco LF. Houve a formação dos produtos de degradação 1, 14, 15 e 16, os quais apresentaram tempos de retenção de 3,438, 4,153, 5,160 e 7,727 minutos, respectivamente. Os valores de assimetria de pico encontrados para os produtos de degradação 1, 14, 15 e 16 foram correspondentes a 0,89, 0,90, 0,88 e 0,91, respectivamente. As assimetrias obtidas para os sinais de LF e dos produtos de degradação encontram-se dentro do critério de aceitação de adequação do sistema que varia de 0,9 a 1,5 (SNYDER; KIRKLAND; GLAJCH, 1997).

Os produtos de degradação 1, 14, 15, 16 e o fármaco LF apresentaram resoluções cromatográficas iguais a 4,18, 5,87, 15,01 e 15,52. Os valores de resolução cromatográfica

obtidos foram superiores ao limite mínimo especificado de 2,00 (SNYDER; KIRKLAND; GLAJCH, 1997). Isto significa que todos os picos do cromatograma possuem resolução satisfatória entre eles. Desta forma, conclui-se que os produtos de degradação gerados após degradação térmica não interferem na quantificação deles mesmos e também não interferem na quantificação do fármaco LF em comprimidos.

A pureza total do pico de LF foi avaliada empregando a análise espectral com detector na região do UV realizando varredura na faixa de 200 a 400 nm e adotando uma resolução de 1 nm. O teste de pureza de pico está representado pela figura 63.

Figura 63 - Teste de pureza de pico do produto de degradação térmica de comprimidos de LF [Fase móvel composta de acetato de amônio 10 mM:ACN (0 min-70:30; 15 min-20:80; 16 min- 70:30 e 20 min-70:30); fluxo de 1,0 mL/min; coluna C18 (125x4,0) mm, 5 µm a 25°C; volume de injeção de 20 µL; detecção no UV/VIS em 261 nm].



A partir da análise da figura 63, observa-se que o valor do índice de pureza obtido para o pico de LF foi de 1,000, o qual foi superior ao índice de pureza mínimo especificado de 0,980 (SIEVERT, H. J. P.; DROUEN, A. C. J. H., 1993). O resultado sugere se tratar de um composto puro, ou seja, não está havendo coeluição de nenhuma outra substância no mesmo tempo de retenção avaliado. Pode-se afirmar portanto que os produtos de degradação gerados após degradação térmica não interferem na quantificação do fármaco LF.

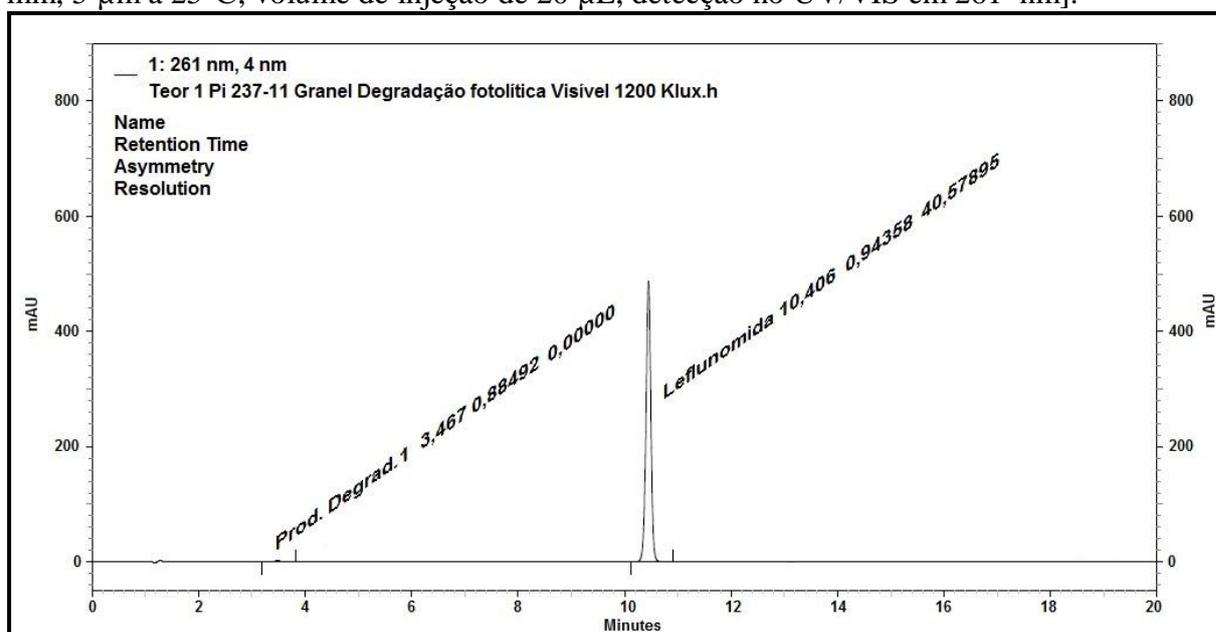
Não foram realizados os testes de pureza de pico para os produtos de degradação porque não foram obtidos espectros com intensidade adequada para se realizar os cálculos. Além disso a RDC n° 58 de 20 de dezembro de 2013 da ANVISA, em seu artigo 7°, exige a verificação da pureza cromatográfica apenas do pico do insumo farmacêutico ativo nos cromatogramas das amostras degradadas (BRASIL, 2013).

5.4.1.10 Avaliação dos produtos de degradação fotolítica de comprimidos de LF

5.4.1.10.1 Avaliação do produto de degradação fotolítica na radiação visível de comprimidos de LF

O cromatograma do produto de degradação fotolítica na radiação visível de comprimidos de LF, evidenciando o tempo de retenção, assimetria do pico e resolução cromatográfica, encontra-se representado pela figura 64.

Figura 64 - Cromatograma do produto de degradação fotolítica na radiação visível de comprimidos de LF [Fase móvel composta de acetato de amônio 10 mM:ACN (0 min-70:30; 15 min-20:80; 16 min-70:30 e 20 min-70:30); fluxo de 1,0 mL/min; coluna C18 (125x4,0) mm, 5 µm a 25°C; volume de injeção de 20 µL; detecção no UV/VIS em 261 nm].



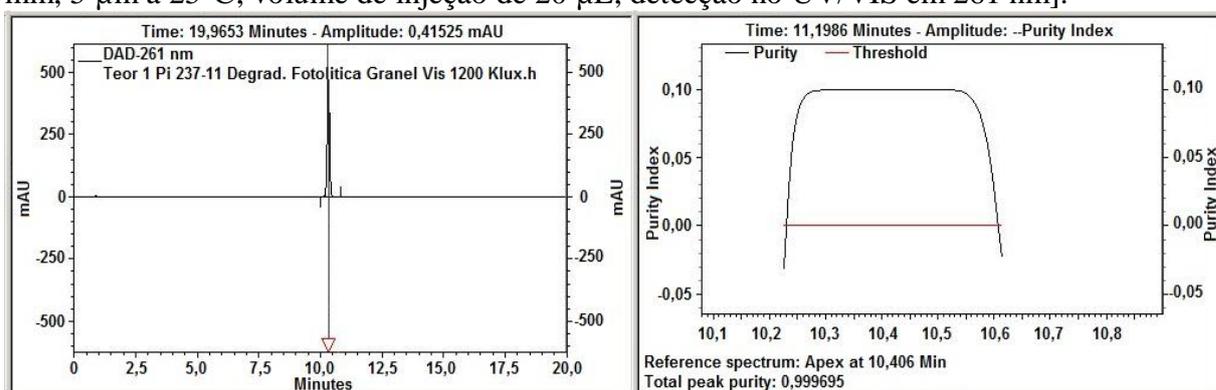
O produto de degradação fotolítica na radiação visível de comprimidos de LF é constituído pelo fármaco LF degradado em uma pequena magnitude e pelo produto de degradação 1. Através do cromatograma pode-se avaliar se existe alguma interferência do produto de degradação gerado na quantificação do fármaco LF.

A partir da análise do cromatograma do produto de degradação fotolítica na radiação visível de comprimidos de LF, o qual está representado pela figura 64, observa-se um pico bem definido com tempo de retenção de aproximadamente 10,4 minutos e assimetria de 0,94 correspondente ao fármaco LF. Houve a formação do produto de degradação 1, o qual apresentou o tempo de retenção de 3,467 minutos. O valor de assimetria de pico encontrado para o produto de degradação 1 foi correspondente a 0,88. As assimetrias obtidas para os sinais de LF e dos produtos de degradação encontram-se dentro do critério de aceitação de adequação do sistema que varia de 0,9 a 1,5 (SNYDER; KIRKLAND; GLAJCH, 1997).

O produto de degradação 1 e o fármaco LF apresentaram resolução cromatográfica igual a 40,58. O valor de resolução cromatográfica obtido foi superior ao limite mínimo especificado de 2,00 (SNYDER; KIRKLAND; GLAJCH, 1997). Isto significa que os picos do cromatograma possuem resolução satisfatória entre eles. Desta forma, conclui-se que o produto de degradação gerado após degradação fotolítica na radiação visível não interfere na quantificação do fármaco LF em comprimidos.

A pureza total do pico de LF foi avaliada empregando a análise espectral com detector na região do UV realizando varredura na faixa de 200 a 400 nm e adotando uma resolução de 1 nm. O teste de pureza de pico está representado pela figura 65.

Figura 65 - Teste de pureza de pico do produto de degradação fotolítica na radiação visível de comprimidos de LF [Fase móvel composta de acetato de amônio 10 mM:ACN (0 min-70:30; 15 min-20:80; 16 min-70:30 e 20 min-70:30); fluxo de 1,0 mL/min; coluna C18 (125x4,0) mm, 5 μ m a 25°C; volume de injeção de 20 μ L; detecção no UV/VIS em 261 nm].



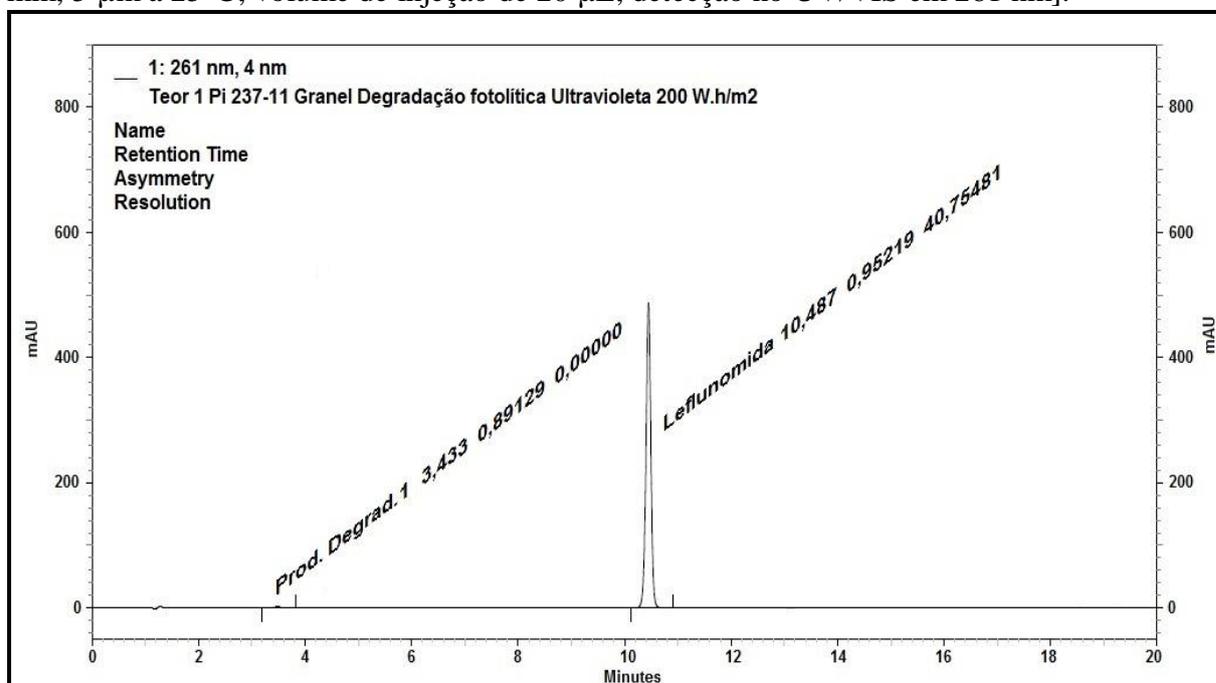
A partir da análise da figura 65, observa-se que o valor do índice de pureza obtido para o pico de LF foi de 1,000, o qual foi superior ao índice de pureza mínimo especificado de 0,980 (SIEVERT, H. J. P.; DROUEN, A. C. J. H., 1993). O resultado sugere se tratar de um

composto puro, ou seja, não está havendo coeluição de nenhuma outra substância no mesmo tempo de retenção avaliado. Pode-se afirmar portanto que o produto de degradação gerado após degradação fotolítica na radiação visível não interfere na quantificação do fármaco LF.

5.4.1.10.2 Avaliação do produto de degradação fotolítica na radiação ultravioleta de comprimidos de LF

O cromatograma do produto de degradação fotolítica na radiação ultravioleta de comprimidos de LF, evidenciando o tempo de retenção, assimetria do pico e resolução cromatográfica, encontra-se representado pela figura 66.

Figura 66 - Cromatograma do produto de degradação fotolítica na radiação ultravioleta de comprimidos de LF [Fase móvel composta de acetato de amônio 10 mM:ACN (0 min-70:30; 15 min-20:80; 16 min-70:30 e 20 min-70:30); fluxo de 1,0 mL/min; coluna C18 (125x4,0) mm, 5 µm a 25°C; volume de injeção de 20 µL; detecção no UV/VIS em 261 nm].



O produto de degradação fotolítica na radiação ultravioleta de comprimidos de LF é constituído pelo fármaco LF degradado em uma pequena magnitude e pelo produto de

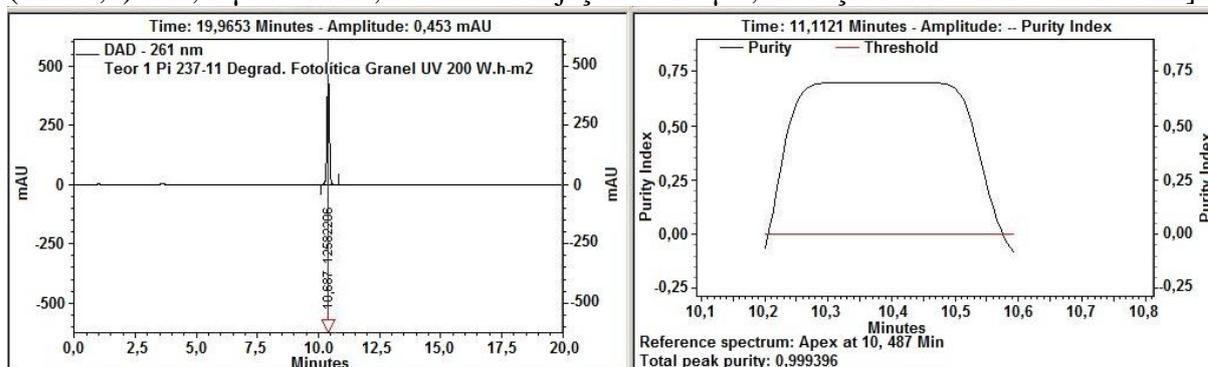
degradação 1. Através do cromatograma pode-se avaliar se existe alguma interferência do produto de degradação gerado na quantificação do fármaco LF.

A partir da análise do cromatograma do produto de degradação fotolítica na radiação ultravioleta de comprimidos de LF, o qual está representado pela figura 66, observa-se um pico bem definido com tempo de retenção de aproximadamente 10,5 minutos e assimetria de 0,95 correspondente ao fármaco LF. Houve a formação do produto de degradação 1, o qual apresentou o tempo de retenção de 3,433 minutos. O valor de assimetria de pico encontrado para o produto de degradação 1 foi correspondente a 0,89. As assimetrias obtidas para os sinais de LF e do produto de degradação encontram-se dentro do critério de aceitação de adequação do sistema que varia de 0,9 a 1,5 (SNYDER; KIRKLAND; GLAJCH, 1997).

O produto de degradação 1 e o fármaco LF apresentaram resolução cromatográfica igual a 40,75. O valor de resolução cromatográfica obtido foi superior ao limite mínimo especificado de 2,00 (SNYDER; KIRKLAND; GLAJCH, 1997). Isto significa que os picos do cromatograma possuem resolução satisfatória entre eles. Desta forma, conclui-se que o produto de degradação gerado após degradação fotolítica na radiação ultravioleta não interfere na quantificação do fármaco LF.

A pureza total do pico de LF foi avaliada empregando a análise espectral com detector na região do UV realizando varredura na faixa de 200 a 400 nm e adotando uma resolução de 1 nm. O teste de pureza de pico está representado pela figura 67.

Figura 67 - Teste de pureza de pico do produto de degradação fotolítica na radiação ultravioleta de comprimidos de LF [Fase móvel composta de acetato de amônio 10 mM:ACN (0 min-70:30; 15 min-20:80; 16 min-70:30 e 20 min-70:30); fluxo de 1,0 mL/min; coluna C18 (125x4,0) mm, 5 μ m a 25°C; volume de injeção de 20 μ L; detecção no UV/VIS em 261 nm].



A partir da análise da figura 67, observa-se que o valor do índice de pureza obtido para o pico de LF foi de 0,999, o qual foi superior ao índice de pureza mínimo especificado de 0,980 (SIEVERT, H. J. P.; DROUEN, A. C. J. H., 1993). O resultado sugere se tratar de um composto puro, ou seja, não está havendo coeluição de nenhuma outra substância no mesmo tempo de retenção avaliado. Pode-se afirmar portanto que o produto de degradação gerado após degradação fotolítica na radiação ultravioleta não interfere na quantificação do fármaco LF.

5.4.1.11 Conclusão da avaliação da seletividade/especificidade do método

Para todas as amostras avaliadas na seletividade/especificidade do método analítico, houve resolução satisfatória entre todos os picos dos cromatogramas, permitindo dessa forma a quantificação do fármaco LF na presença dos seus produtos de degradação, excipientes da formulação, diluente e fase móvel. Todos os produtos de degradação encontrados nos testes de degradação forçada da matéria-prima de LF e dos comprimidos de LF foram quantificados com resolução satisfatória entre eles. Os testes de pureza de pico foram satisfatórios em todas as amostras avaliadas indicando que o fármaco LF foi quantificado sem interferências analíticas. Pode-se concluir a partir do exposto que o parâmetro de seletividade/especificidade do método está validado.

5.4.2 Avaliação da linearidade

A linearidade do método foi avaliada através da análise de três curvas de calibração, sendo que cada uma foi construída a partir de 6 soluções contendo o fármaco na faixa de 10 a 60 µg/mL. O teste estatístico empregado foi a análise de variância dos resíduos da regressão linear por ANOVA. Para que fosse possível aplicá-lo foram cheçadas algumas premissas básicas como: teste de outliers pelo método *Jacknife*; avaliação da normalidade pelo método *Ryan Joner*; teste de homocedasticidade pelo método de *Brown-Forsythe*; e avaliação da independência dos resíduos pelo teste de *Durbin-Watson*. Os resultados e respectivas discussões para cada um dos testes avaliados encontram-se a seguir.

5.4.2.1 Avaliação das premissas básicas

Os resultados do teste de outliers pelo método *Jacknife*, avaliação da normalidade pelo método *Ryan Joner*, teste de homocedasticidade pelo método de *Brown-Forsythe* e avaliação da independência dos resíduos pelo teste de *Durbin-Watson* estão representados na tabela 12.

Tabela 12 - Resultados dos testes para avaliação das premissas básicas

PARÂMETRO	AMOSTRAS AVALIADAS	ESPECIFICAÇÕES	RESULTADOS
Teste de <i>ouliers</i> pelo método <i>Jacknife</i>	18 resíduos das três curvas de calibração construídas com seis níveis de concentração	$J_{ei} > J_{crítico}$ ($\alpha=0,05$)	Resíduos 02, 10, 13 e 18 foram <i>outliers</i>
Avaliação da normalidade pelo teste de <i>Ryan-Joner</i>	14 resíduos (após exclusão de 4 valores <i>outliers</i>)	$R_{eq} \geq R_{crítico}$ ($\alpha =0,05$)	Os resíduos seguem uma distribuição normal
Avaliação da homocedasticidade pelo teste de <i>Brown-Forsythe</i>	14 resíduos	$t_L \leq t_{crítico}$ ($\alpha =0,05$)	Há homocedasticidade
Avaliação da independência dos resíduos pelo teste de <i>Durbin-Watson</i>	14 resíduos	$d_u < d < 4-d_u$ ($\alpha =0,05$)	Os resíduos são independentes (não há correlação)

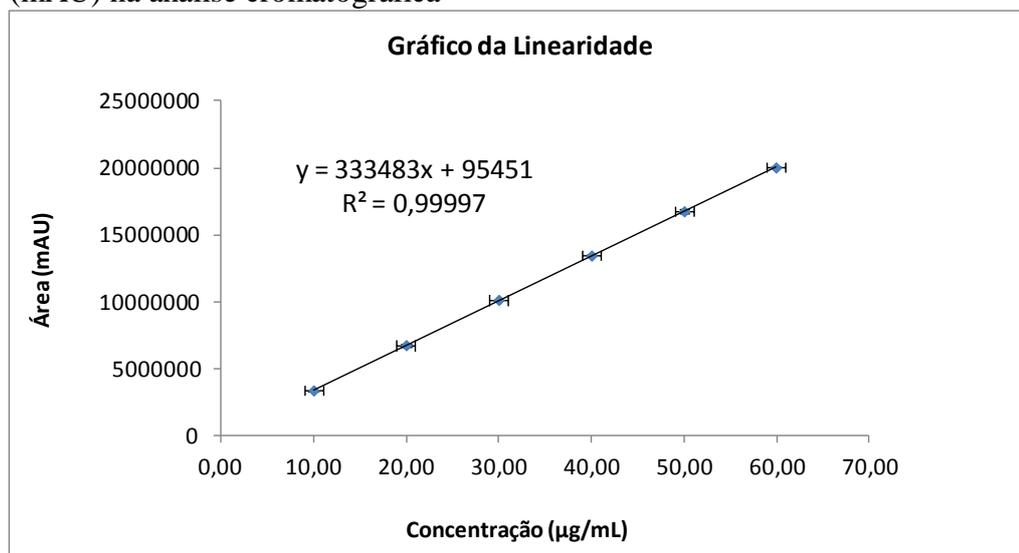
α = nível de significância do teste

Após observar os resultados que se encontram na tabela 12, pode-se concluir que os resíduos provenientes das três curvas de calibração, após exclusão dos valores *outliers*, atendem a todas as especificações dos testes avaliados. Portanto pode-se concluir que os dados atendem às premissas básicas e desta forma o teste de variância dos resíduos da regressão por ANOVA pode ser aplicado.

5.4.2.2 Teste de linearidade e significância da regressão

Foram plotados num gráfico de dispersão os pontos correlacionando a concentração do fármaco versus a resposta analítica. Em seguida foi realizada a regressão linear desses pontos, a qual permitiu a construção da curva de calibração e a obtenção dos dados do coeficiente linear, coeficiente angular e coeficiente de determinação, os quais estão representados na figura 68.

Figura 68 - Curva de calibração relacionando a concentração de soluções de LF na faixa de 10,00 a 60,00 $\mu\text{g/mL}$ versus a resposta obtida em unidades de área (mAU) na análise cromatográfica



Avaliando as estatísticas da regressão linear pode-se afirmar que o coeficiente de correlação (0,99998), calculado a partir da raiz quadrada do coeficiente de determinação, está em conformidade com a especificação da RE n° 899/2003 da ANVISA, a qual preconiza um valor maior ou igual a 0,99. No entanto, restringir-se à utilização do coeficiente de correlação como critério para avaliação da linearidade é um equívoco. Este coeficiente, na verdade, deve ser utilizado para verificar se os pontos estão bem ajustados à função linear que foi aplicada.

Desta forma a análise de variância por ANOVA foi empregada para a determinação da significância de regressão e do desvio de linearidade. Os resultados da aplicação deste teste encontram-se representados na tabela 13.

Tabela 13 - Análise de variância (ANOVA) para determinação da significância da regressão e desvio da linearidade.

FONTE DE VARIACÃO	GRAUS DE LIBERDADE	SOMA DE QUADRADOS	QUADRADO MÉDIO	F	F_{CRÍTICO} ($\alpha = 0,05$)
Regressão	1	4,13E+14	4,13E+14	1,28E+5	4,75
Resíduo	12	3,87E+10	3,22E+09	-	-
Desvio da linearidade	4	8,59E+09	2,15E+09	0,57	3,84
Entre níveis	5	4,13E+14	-	-	-
Erro puro	8	3,01E+10	3,76E+09	-	-
Total	13	4,13E+14	-	-	-

α = nível de significância do teste

Após observar os dados que se encontram na tabela 13, pode-se concluir que para o teste de significância da regressão o valor de F (1,28E+5) foi maior que o $F_{\text{crítico}}$ (4,75) e para o teste de desvio de linearidade o valor de F (0,57) foi menor que o $F_{\text{crítico}}$ (3,84). Estes resultados indicam que a regressão é significativa e que não há desvio de linearidade, respectivamente. Pode-se afirmar a partir do exposto que o parâmetro de linearidade está validado.

5.4.3 Avaliação do efeito matriz

O efeito matriz foi avaliado através do preparo de três curvas de calibração matrizadas, sendo que cada uma foi construída a partir de 6 soluções contendo o fármaco na faixa de 10 a 60 $\mu\text{g/mL}$. A cada uma das soluções anteriores foi adicionado um volume fixo da solução mãe placebo com o objetivo de matrizar-las. A linearidade das curvas matrizadas foi avaliada e posteriormente elas foram comparadas com as curvas do teste de linearidade para verificar se a matriz afetava significativamente sua inclinação ou interseção. Com esse propósito foi adotado o teste de F para avaliar a homocedasticidade dos resíduos das curvas e em seguida o teste de t para comparar as curvas. Os resultados e respectivas discussões para cada um dos testes avaliados encontram-se a seguir.

5.4.3.1 Avaliação das premissas básicas da curva matrizada

Os resultados do teste de outliers pelo método *Jacknife*, avaliação da normalidade pelo método *Ryan Joner*, teste de homocedasticidade pelo método de *Brown-Forsythe* e avaliação da independência dos resíduos pelo teste de *Durbin-Watson* estão representados na tabela 14.

Tabela 14 - Resultados dos testes para avaliação das premissas básicas.

PARÂMETRO	AMOSTRAS AVALIADAS	ESPECIFICAÇÕES	RESULTADOS
Teste de <i>ouliers</i> pelo método <i>Jacknife</i>	18 resíduos das três curvas matrizadas construídas com seis níveis de concentração	$J_{ei} > J_{crítico}$ ($\alpha = 0,05$)	Resíduos 11 e 17 foram <i>outliers</i>
Avaliação da normalidade pelo teste de <i>Ryan-Joner</i>	16 resíduos (após exclusão de 2 valores <i>outliers</i>)	$R_{eq} \geq R_{crítico}$ ($\alpha = 0,05$)	Os resíduos seguem uma distribuição normal
Avaliação da homocedasticidade pelo teste de <i>Brown-Forsythe</i>	16 resíduos	$t_L \leq t_{crítico}$ ($\alpha = 0,05$)	Há homocedasticidade
Avaliação da independência dos resíduos pelo teste de <i>Durbin-Watson</i>	16 resíduos	$d_u < d < 4-d_u$ ($\alpha = 0,05$)	Os resíduos são independentes (não há correlação)

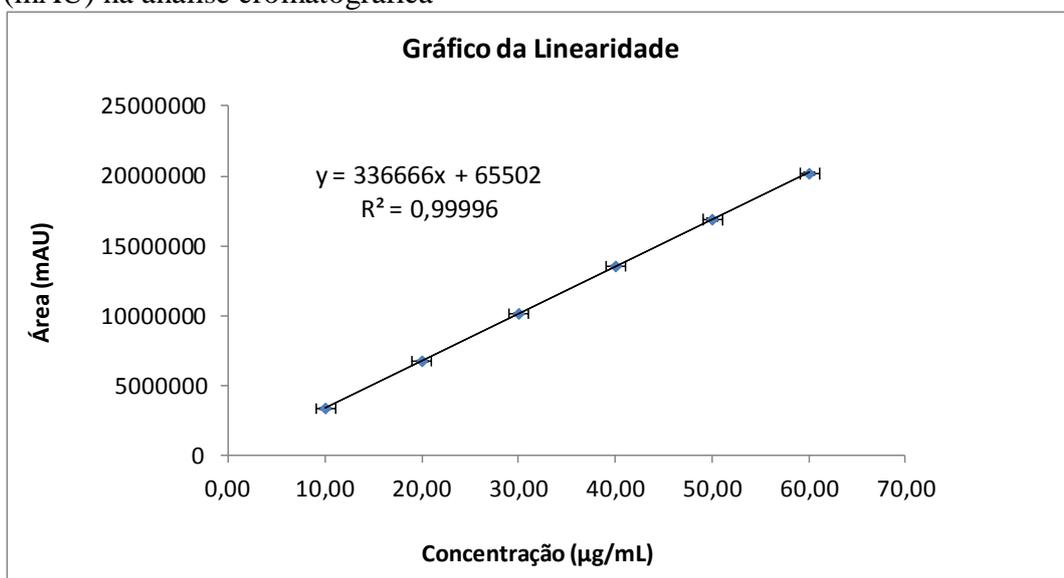
α = nível de significância do teste

Após observar os resultados que se encontram na tabela 14, pode-se concluir que os resíduos provenientes das três curvas matrizadas, após exclusão dos valores *outliers*, atendem a todas as especificações dos testes avaliados. Portanto, pode-se concluir que os dados atendem às premissas básicas e desta forma o teste de variância dos resíduos da regressão por ANOVA pode ser aplicado.

5.4.3.2 Avaliação da linearidade da curva matrizada

Foram plotados num gráfico de dispersão os pontos correlacionando a concentração do fármaco versus a resposta analítica. Em seguida foi realizada a regressão linear desses pontos, a qual permitiu a construção da curva matrizada e a obtenção dos dados do coeficiente linear, coeficiente angular e coeficiente de determinação, os quais estão representados na figura 69.

Figura 69 - Curva matrizada relacionando a concentração de soluções matrizadas de LF na faixa de 10,00 a 60,00 $\mu\text{g/mL}$ versus a resposta obtida em unidades de área (mAU) na análise cromatográfica



Avaliando as estatísticas da regressão linear pode-se afirmar que o coeficiente de correlação encontrado (0,99998), calculado a partir da raiz quadrada do coeficiente de determinação, está em conformidade com a especificação da RE n° 899/2003 da ANVISA, a qual preconiza um valor maior ou igual a 0,99.

A análise de variância por ANOVA foi empregada para a determinação da significância de regressão e do desvio de linearidade. Os resultados da aplicação deste teste encontram-se representados na tabela 15.

Tabela 15 - Análise de variância (ANOVA) para determinação da significância da regressão e desvio da linearidade da curva matrizada.

FONTE DE VARIACÃO	GRAUS DE LIBERDADE	SOMA DE QUADRADOS	QUADRADO MÉDIO	F	F_{CRÍTICO} $\alpha = 0,05$
Regressão	1	5,15E+14	5,15E+14	1,32E+5	4,60
Resíduo	14	5,48E+10	3,91E+09	-	-
Desvio da linearidade	4	6,64E+09	1,66E+09	0,34	3,48
Entre níveis	5	5,15E+14	-	-	-
Erro puro	10	4,82E+10	4,82E+09	-	-
Total	15	5,15E+14	-	-	-

α = nível de significância do teste

Após observar os dados que se encontram na tabela 15, pode-se concluir que para o teste de significância da regressão o valor de F (1,32E+5) foi maior que o $F_{\text{crítico}}$ (4,60) e para o teste de desvio de linearidade o valor de F (0,34) foi menor que o $F_{\text{crítico}}$ (3,48). Estes resultados indicam, respectivamente, que a regressão é significativa e que não há desvio de linearidade. Portanto, pode-se prosseguir para a próxima etapa que consiste na avaliação da homocedasticidade dos resíduos das curvas e comparação da inclinação e interseção entre as curvas da linearidade e curva matrizada.

5.4.3.3 Avaliação da homocedasticidade dos resíduos das curvas

Os resíduos das curvas da linearidade e curva matrizada, os quais serão utilizados para avaliação da homocedasticidade se encontram nas tabelas 16 e 17.

Tabela 16 - Resíduos (e_i) da curva da linearidade.

PONTOS	x_i	y_i	e_i
1	0,009980	3375039	-54291
2	0,009984	3393355	-46644
3	0,010012	6849598	92780
4	0,019960	6693659	-65826
5	0,019968	6752557	-25599
6	0,020024	10145377	61071
7	0,029940	10142606	54299
8	0,029952	10143743	27429
9	0,030036	13430955	13828
10	0,039920	13483004	28534
11	0,040048	16675664	-70284
12	0,049900	16850131	57505
13	0,049920	20012870	-53897
14	0,050060	20055864	-18905
15	0,059880	13483004	-54291
16	0,060072	16675664	-46644

Tabela 17 - Resíduos (e_i) da curva matrizada (continua)

PONTOS	x_i	y_i	e_i
1	0,009980	3394841	-25250
2	0,009984	3404658	-16781
3	0,010012	3410511	-20362
4	0,019960	6846550	63813
5	0,019968	6732322	-53109
6	0,020024	6766326	-37974
7	0,029940	10252805	107423
8	0,029952	10120645	-28780
9	0,030036	10162127	-15600

Tabela 17 - Resíduos (e_i) da curva matrizada (continuação)

PONTOS	x_i	y_i	e_i
10	0,039920	13598902	90875
11	0,040048	13536973	-14181
12	0,049900	16821059	-49613
13	0,049920	16912265	34854
14	0,050060	17018269	93686
15	0,059880	20128296	-105021
16	0,060072	20274034	-23975

Utilizando os 32 resíduos das curvas da linearidade e curva matrizada, foi avaliada a homocedasticidade das variâncias dos resíduos através do teste de F (SNEDECOR; COCHRAN, 1989), cujos resultados se encontram na tabela 18.

Tabela 18 - Resultados da avaliação da homocedasticidade das variâncias dos resíduos através do teste de F

Testes	Resultados
$s^2_{res>}$	3,914E+09
$s^2_{res<}$	3,222E+09
F	1,21
$F_{crítico} (\alpha = 0,05)$	2,64

α = nível de significância do teste

Após observar os dados que se encontram na tabela 18, pode-se concluir que para o teste de homocedasticidade das variâncias dos resíduos o valor de F (1,21) foi menor que o $F_{crítico}$ (2,64). Este resultado indica que há homocedasticidade das variâncias dos resíduos das curvas. Portanto pode-se prosseguir para a próxima etapa que consiste na avaliação do efeito matriz utilizando o teste de t com variâncias combinadas.

5.4.3.4 Teste de efeito matriz

Foi realizado o teste de efeito matriz através da avaliação de dois parâmetros: teste de comparação das inclinações das curvas e teste de comparação das interseções das curvas empregando o teste de t com variâncias combinadas (ARMITAGE; BERRY, 1994). Os resultados dos testes se encontram na tabela 19.

Tabela 19 - Resultados dos testes de efeito matriz de comparação das inclinações e interseções das curvas usual e curva matrizada

Testes	Resultados – Teste de t comparação das inclinações	Resultados – Teste de t comparação das interseções
s_p^2	3594701742	-
t_b	2,66	-
t_a	-	0,90
$t_{\text{crítico}} (\alpha = 0,05)$	2,06	2,06
p	0,013	0,377

α = nível de significância do teste

Após avaliar os dados que se encontram na tabela 19, pode-se afirmar que para o teste de comparação das inclinações o valor de t_b (2,66) foi maior que o $t_{\text{crítico}}$ (2,06) e para o teste de comparação das interseções o valor de t_a (0,90) foi menor que o $t_{\text{crítico}}$ (2,06). Estes resultados indicam, respectivamente, que as inclinações das curvas se diferem e as interseções das curvas não diferem. Portanto pode-se concluir que há efeito matriz sobre as inclinações das curvas, indicando então que na rotina analítica as curvas de calibração para quantificação do teor devem ser matrizadas. Pode-se afirmar a partir do exposto que o parâmetro do efeito matriz está validado.

5.4.4 Avaliação da exatidão e recuperação

A exatidão do método foi avaliada através da análise de soluções placebo adicionadas com fármaco em triplicata em 3 níveis de concentração (20, 40 e 60 $\mu\text{g/mL}$) dentro da faixa em que a linearidade foi demonstrada. O procedimento de preparo das amostras descritas

anteriormente foi executado em um laboratório analítico por 2 analistas diferentes empregando 2 equipamentos diferentes. Foram gerados no total 4 conjuntos de dados analíticos de cada solução final. A estimativa das concentrações das amostras foi determinada por meio de curva de calibração e as recuperações foram calculadas através das concentrações obtidas em relação à concentração teórica adicionada. Os resultados encontram-se na tabela 20.

5.4.4.1 Avaliação das recuperações

Os resultados das recuperações das soluções placebo adicionadas com fármaco nos níveis de concentração de 20, 40 e 60 µg/mL encontram-se na tabela 20.

Tabela 20 - Resultados das recuperações das soluções placebo adicionadas com o fármaco nas concentrações de 20, 40 e 60 µg/mL.

Replicatas	Resultados de recuperação (%)	Resultados de recuperação (%)	Resultados de recuperação (%)
	(20 µg/mL)	(40 µg/mL)	(60 µg/mL)
1	101,07	98,44	99,67
2	99,17	99,55	98,58
3	102,36	102,25	102,69
4	100,50	100,32	99,68
5	98,78	100,71	99,51
6	98,30	102,66	99,90
7	99,53	100,33	99,58
8	101,99	101,84	100,76
9	99,97	99,33	101,81
10	100,71	101,01	100,55
11	99,53	102,79	101,39
12	99,30	102,32	102,68
Especificação recuperação individual (AOAC, 1998)		97,00 a 103,00	
Média	100,1	101,0	100,6
Especificação recuperação média (AOAC, 1998)		98,0 a 102,0	

Após avaliar os resultados de recuperação que se encontram na tabela 20, pode-se afirmar que para os 3 níveis de concentração avaliados, todas as recuperações individuais se

encontram dentro do intervalo de 97,00 a 103,00% (AOAC, 1998). Pode-se observar também que o resultado de recuperação média para cada nível de concentração avaliado se encontra dentro do intervalo de 98,0 a 102,0% (AOAC, 1998). Portanto pode-se concluir que o parâmetro da exatidão está validado.

5.4.5 Avaliação da precisão

Foram calculados os resíduos (*ei*) das recuperações aparentes, os quais foram utilizados para testar as premissas da normalidade (Ryan-Joiner) e homocedasticidade (F de Levene). A última etapa consistiu na avaliação das precisões intra-corrída e inter-corrídas empregando a análise de variância por ANOVA. Os resultados se encontram na tabela 21.

Tabela 21 - Resultados dos testes de Ryan-Joiner, F de Levene e ANOVA

Replicatas	Resultados (20 µg/mL)			Resultados (40 µg/mL)			Resultados (60 µg/mL)		
	pi	qi	ei	pi	qi	ei	pi	qi	ei
1	0,051	-1,635	-1,700	0,051	-1,635	-1,637	0,051	-1,635	-1,734
2	0,133	-1,114	-0,969	0,133	-1,114	-1,167	0,133	-1,114	-1,136
3	0,214	-0,792	-0,894	0,214	-0,792	-1,030	0,214	-0,792	-0,987
4	0,296	-0,536	-0,544	0,296	-0,536	-0,911	0,296	-0,536	-0,641
5	0,378	-0,312	-0,524	0,378	-0,312	-0,533	0,378	-0,312	-0,189
6	0,459	-0,102	-0,411	0,459	-0,102	-0,517	0,459	-0,102	-0,151
7	0,541	0,102	-0,319	0,541	0,102	-0,170	0,541	0,102	-0,013
8	0,622	0,312	0,205	0,622	0,312	0,282	0,622	0,312	0,046
9	0,704	0,536	0,864	0,704	0,536	0,747	0,704	0,536	0,201
10	0,786	0,792	1,305	0,786	0,792	1,337	0,786	0,792	1,090
11	0,867	1,114	1,493	0,867	1,114	1,429	0,867	1,114	1,139
12	0,949	1,635	1,495	0,949	1,635	2,170	0,949	1,635	2,375
Ryan-Joiner	$R_{eq}=0,966$	$R_{critico}=0,942$		$R_{eq}=0,978$	$R_{critico}=0,942$		$R_{eq}=0,976$	$R_{critico}=0,942$	
F de Levene	$F_{critico} = 4,07$	$F = 0,22$		$F_{critico} = 4,07$	$F = 0,25$		$F_{critico} = 4,07$	$F = 0,97$	
ANOVA	Intra-corrída (max=3,3%)	DPR=1,25%		Intra-corrída (max=3,3%)	DPR=1,39%		Intra-corrída (max=3,3%)	DPR=1,31%	
	Inter-corrída (max=5,0%)	DPR=1,26%		Inter-corrída (max=5,0%)	DPR=1,42%		Inter-corrída (max=5,0%)	DPR=1,32%	

Foi adotado um nível de significância (α) correspondente a 0,05 para os testes de Ryan-Joiner, F de Levene e ANOVA.

Observando os resultados que se encontram na tabela 21, pode-se afirmar que para o teste de Ryan-Joiner os valores R_{eq} foram maiores que o $R_{critico}$ e para o teste de F de Levene

os valores de $F_{\text{crítico}}$ foram maiores que o F para os três níveis de concentração avaliados. Portanto os resíduos dos três níveis de concentração atendem às premissas básicas da normalidade e homocedasticidade.

O teste de ANOVA foi então aplicado, sendo que foram obtidos para cada nível de concentração valores de DPR% inferiores a 5,0% no caso da precisão inter-corrída (AOAC, 1998; BRASIL, 2003) e valores de DPR% inferiores a 3,3% no caso da precisão intra-corrída (AOAC, 1998; BRASIL, 2003). Pode-se afirmar, a partir do exposto, que o parâmetro da precisão está validado.

5.4.6 Avaliação dos limites de detecção e quantificação

Os limites de detecção e quantificação foram avaliados através da análise de amostras brancas preparadas em triplicata com o auxílio do placebo puro da formulação. O procedimento de preparo das amostras descritas anteriormente foi executado em um laboratório analítico por 2 analistas diferentes empregando 2 equipamentos diferentes. Foram gerados no total 4 conjuntos de dados analíticos. A estimativa das concentrações das amostras brancas foi determinada por meio de curva de calibração.

O limite de detecção teórico foi determinado a partir da concentração média calculada para as amostras brancas mais três vezes o desvio padrão das concentrações calculadas para o analito nas amostras brancas, enquanto o limite de quantificação teórico foi determinado a partir da concentração média calculada para as amostras brancas mais dez vezes o desvio padrão das concentrações calculadas para o analito nas amostras brancas. Os resultados se encontram na tabela 22.

Tabela 22 - Resultados dos limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) teóricos.

Analista e dia do preparo das amostras	Replicatas	Concentração (µg/mL)	Concentração média (µg/mL)	Desvio padrão
Dia 1 / Analista 1	1	0,0024	0,0028	0,00040
	2	0,0032		
	3	0,0029		
Dia 1 / Analista 2	1	0,0031	0,0025	0,00056
	2	0,0024		
	3	0,0020		
Dia 2 / Analista 1	1	0,0021	0,0026	0,00047
	2	0,0028		
	3	0,0030		
Dia 2 / Analista 2	1	0,0022	0,0030	0,00072
	2	0,0036		
	3	0,0032		
-	-	Média	0,0027	0,00054
-	-	LD Teórico	0,0042	-
-	-	LQ Teórico	0,0078	-

Após avaliar os dados que se encontram na tabela 22, pode-se afirmar que para o cálculo do limite de detecção teórico foi encontrado um resultado correspondente a 0,0042 µg/mL e para o cálculo do limite de quantificação teórico foi encontrado um resultado correspondente a 0,0078 µg/mL. Pode-se afirmar, a partir do exposto, que o parâmetro dos limites de detecção e quantificação está validado.

5.4.7 Avaliação da robustez

Os resultados de recuperação média de LF para cada uma das 8 corridas cromatográficas do teste de robustez em que foram feitas as combinações das sete variáveis escolhidas se encontram na tabela 23.

Tabela 23 - Resultados de recuperação média para as 8 análises do teste de robustez.

Variável	Análises							
	1	2	3	4	5	6	7	8
A, a	A	A	A	A	a	a	a	a
B, b	B	B	b	b	B	B	b	b
C, c	C	c	C	c	C	c	C	c
D, d	D	D	d	d	d	d	D	D
E, e	E	e	E	e	e	E	e	E
F, f	F	f	f	F	F	f	f	F
G, g	G	g	g	G	g	G	G	g
Recuperação (%)	s	t	u	v	w	x	y	z
	100,06	100,82	100,79	98,28	97,80	99,34	99,28	96,36
Desvio padrão	0,05	0,11	0,10	0,09	0,30	0,05	0,20	0,35

Conforme pode ser observado na tabela 23 foram calculados os resultados de recuperação do fármaco LF para cada uma das 8 corridas cromatográficas do teste de robustez. Estes resultados serviram de subsídio para avaliar o impacto de cada variável separadamente, como pode ser observado na tabela 24.

Tabela 24 - Impacto de cada uma das 7 variáveis avaliadas no teste de robustez.

Variáveis	Resultados Recuperação (%)	Influência (X - x)
Coluna cromatográfica	A	99,99
	a	98,19
Comprimento de onda de detecção	B	99,51
	b	98,68
Fluxo de corrida	C	99,48
	c	98,70
Proporção do gradiente de fase móvel (variação do final do gradiente - tempo 15 min)	D	99,13
	d	99,05
Volume de injeção	E	99,14
	e	99,04
Temperatura do forno	F	98,12
	f	100,06
Unidade filtrante	G	99,24
	g	98,94

De acordo com os resultados de influência (X-x) que se encontram na tabela 24, pode-se afirmar que as variáveis que obtiveram maiores valores foram a coluna cromatográfica (1,79) e temperatura do forno (-1,93). Portanto, convém que estas duas variáveis sejam monitoradas com atenção na rotina de aplicação do método analítico. Pode-se concluir, a partir do exposto, que o parâmetro robustez está validado.

5.4.8 Avaliação da estabilidade das soluções

A estabilidade das soluções foi avaliada através da análise da solução padrão de referência USP de LF, solução padrão de trabalho de LF e solução placebo fortificada com LF a 100%. Estas soluções analisadas imediatamente após seu preparo e após 24 horas de estocagem à temperatura ambiente. Na tabela 25 a seguir encontram-se os resultados das diferenças médias das áreas após a análise de cada uma das soluções anteriores.

Tabela 25 - Resultados do teste de estabilidade das soluções padrão de referência da USP, padrão de trabalho e placebo fortificado com LF a 100%

Injeções	Resultados (Áreas)					
	Pd. USP (0h)	Pd. USP (24h)	Pd. Trabalho (0h)	Pd. Trabalho (24h)	Placebo fort. 100% (0h)	Placebo fort. 100% (24h)
1	13669291	13594917	13299222	13371992	13480012	13646989
2	13678488	13608795	13247769	13324897	13469019	13650351
3	13672955	13657903	13241965	13338093	13490056	13699295
Média	13673578	13620538	13262985	13344994	13479695	13665545
DPR %	0,03	0,24	0,24	0,18	0,08	0,21
Diferença (%)		0,39		-0,62		-1,38

Após avaliar os dados que se encontram na tabela 25, pode-se afirmar que para todas as soluções avaliadas as diferenças percentuais entre as áreas médias obtidas entre os tempos 0 e 24h foram inferiores ao limite máximo de $\pm 2\%$. Este limite foi adotado a partir do procedimento de validação de métodos analíticos do laboratório da FUNED pelo fato de não ter especificação definida para este teste na RE n° 899 de 05/2003 da ANVISA e no guia DOQ-CGCRE-008 do INMETRO (BRASIL, 2003; INMETRO, 2010).

Portanto, as soluções analíticas podem ser analisadas em até 24 horas após seu preparo. Pode-se concluir, a partir do exposto, que o parâmetro estabilidade das soluções está validado.

5.4.9 Conclusão da validação do método analítico

Todos os parâmetros de desempenho avaliados durante a validação do método analítico foram satisfatórios. Portanto, pode-se concluir que a metodologia analítica indicativa de estabilidade para quantificação do teor e substâncias relacionadas em comprimidos de LF por CLAE encontra-se validada.

5.5 Avaliação da estabilidade dos comprimidos de LF

Os estudos de estabilidade acelerada e de longa duração das formulações em escala de bancada de comprimidos de LF na dosagem de 20 mg, acondicionadas nas embalagens blíster PVDC e frasco plástico opaco, foram concluídos de acordo com o planejado. Ao longo dos 2 estudos foram realizados os testes de quantificação de teor e substâncias relacionadas nas amostras dos comprimidos de LF em cada tempo de estabilidade programado.

5.5.1 Estabilidade do produto na embalagem blíster PVDC

Os resultados do estudo de estabilidade acelerada e de longa duração de comprimidos de LF acondicionados na embalagem blíster PVDC encontram-se nas figuras 70 e 71.

Figura 70 - Resultados do estudo de estabilidade acelerada de comprimidos de LF acondicionados em blíster PVDC.

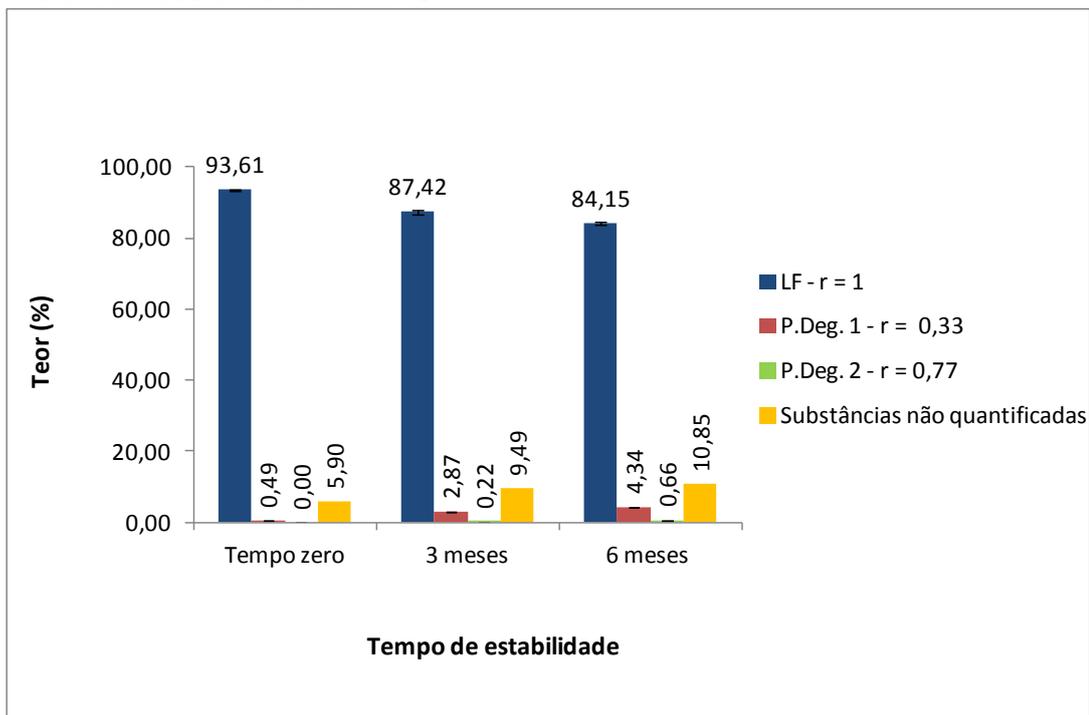
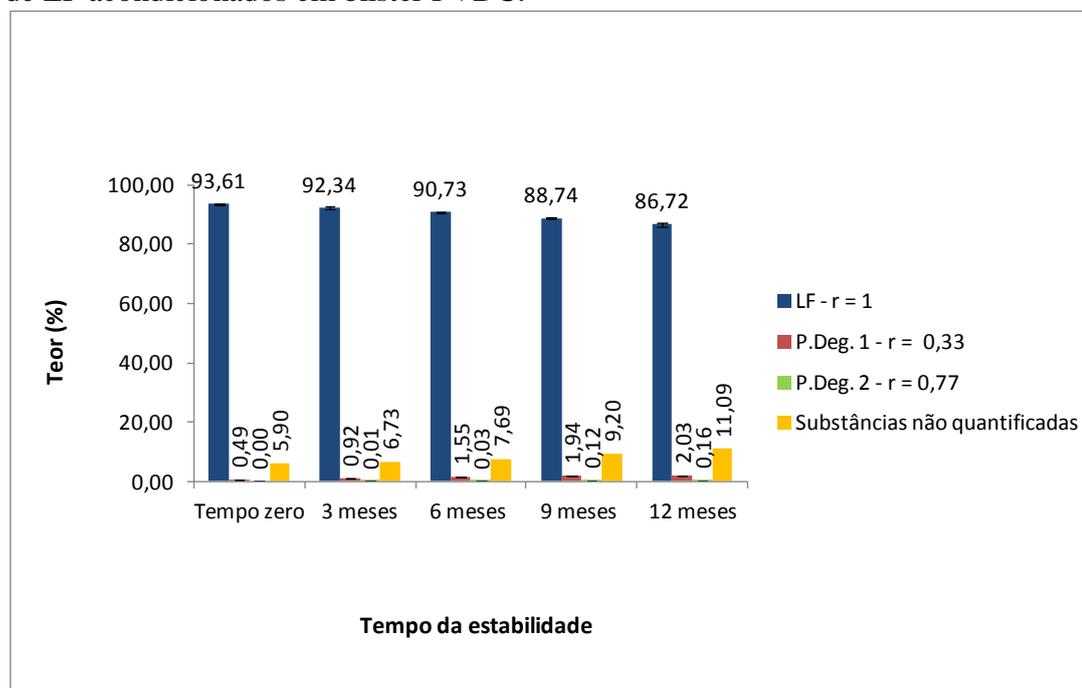


Figura 71 - Resultados do estudo de estabilidade de longa duração de comprimidos de LF acondicionados em blíster PVDC.



De acordo com os resultados do estudo de estabilidade acelerada de comprimidos de LF na embalagem blíster PVDC apresentados na figura 70, podemos concluir que no sexto mês de estabilidade houve a formação de 4,34 e 0,66% dos produtos de degradação da hidrólise alcalina ($r = 0,33$) e da hidrólise ácida ($r = 0,77$), respectivamente. Estes resultados também passaram por uma avaliação de acordo com os critérios de reporte, identificação e qualificação, a qual foi realizada utilizando as regras existentes no guia “Impurities in New Drug Products” [Q3B(R2)] de 06/2006 do ICH. Os dados desta avaliação, considerando uma dose máxima diária de 100 mg de LF, estão representados na tabela 26.

Tabela 26 - Avaliação dos resultados após 6 meses de estabilidade acelerada em blíster PVDC considerando os critérios de reporte, identificação e qualificação.

Substância	Tempo de retenção relativo	Resultado bruto (%)	Resultado	Ação	
			reportado (%) Limite: > 0,1%	Identificação Limite: > 0,2%	Qualificação Limite: > 0,5%
LF	1,00	84,15	N.A	N.A	N.A
P.Deg. 1	0,33	4,34	4,3	Sim	Sim
P.Deg. 2	0,77	0,66	0,7	Sim	Sim

A partir dos resultados da tabela 26 pode-se concluir que os comprimidos de LF foram mais susceptíveis à hidrólise alcalina visto que o teor do produto de degradação da hidrólise alcalina foi superior ao da hidrólise ácida. Além disso, os resultados dos produtos de degradação P.Deg. 1 e P.Deg. 2 encontram-se acima dos limites de reporte, identificação e qualificação. Isto implica que, além da obrigatoriedade de serem reportados no estudo de estabilidade, eles deveriam ter a sua estrutura química elucidada e teriam que passar por testes de avaliação de toxicidade em humanos. No entanto, levando-se em conta que a resolução nº 01/2005 da ANVISA preconiza uma queda de no máximo 5,00% para o fármaco de interesse, os resultados foram insatisfatórios para LF devido à queda no seu teor correspondente a 9,46% (BRASIL, 2005). Desta forma, estes resultados não deverão ser apresentados para a ANVISA, o que inviabiliza os esforços de se identificar e qualificar os produtos de degradação P.Deg. 1 e P.Deg. 2.

A partir do exposto pode-se concluir que o produto na embalagem blíster PVDC foi reprovado no estudo de estabilidade acelerada. No entanto, resolveu-se prosseguir com o

estudo de estabilidade de longa duração conforme orientação da resolução n° 01/2005 da ANVISA (BRASIL, 2005).

Observando os resultados do estudo de estabilidade de longa duração de comprimidos de LF na embalagem blíster PVDC apresentados na figura 71, pode-se concluir que no décimo segundo mês de estabilidade houve a formação de 2,03 e 0,16% dos produtos de degradação da hidrólise alcalina ($r = 0,33$) e da hidrólise ácida ($r = 0,77$), respectivamente. Estes resultados também passaram por uma avaliação de acordo com os critérios de reporte, identificação e qualificação, a qual foi realizada utilizando as regras existentes no guia “Impurities in New Drug Products” [Q3B(R2)] de 06/2006 do ICH. Os dados desta avaliação, considerando uma dose máxima diária de 100 mg de LF, estão representados na tabela 27.

Tabela 27 - Avaliação dos resultados após 12 meses de estabilidade de longa duração em blíster PVDC considerando os critérios de reporte, identificação e qualificação.

Substância	Tempo de retenção relativo	Resultado bruto (%)	Resultado	Ação	
			reportado (%) Limite: > 0,1%	Identificação Limite: > 0,2%	Qualificação Limite: > 0,5%
LF	1,00	86,72	N.A	N.A	N.A
P.Deg. 1	0,33	2,03	2,0	Sim	Sim
P.Deg. 2	0,77	0,16	0,2	Não	Não

A partir dos resultados da tabela 27, pode-se concluir que os comprimidos de LF foram mais susceptíveis à hidrólise alcalina visto que o teor do produto de degradação da hidrólise alcalina foi superior ao da hidrólise ácida. Além disso, o resultado do produto de degradação P.Deg. 1 encontra-se acima dos limites de reporte, identificação e qualificação. Isto implica que além da obrigatoriedade de ser reportado no estudo de estabilidade, ele deveria ter a sua estrutura química elucidada e teria que passar por testes de avaliação de toxicidade em humanos. No entanto, levando-se em conta que a resolução n°01/2005 da ANVISA preconiza uma queda de no máximo 5,00% para o fármaco de interesse, os resultados foram insatisfatórios para LF devido à queda no seu teor correspondente a 6,89% (BRASIL, 2005). Desta forma estes resultados também não deverão ser apresentados para a ANVISA, o que inviabiliza os esforços de se identificar e qualificar o produto de degradação P.Deg. 1.

Portanto, pode-se concluir que o produto na embalagem blíster PVDC também foi reprovado no estudo de estabilidade de longa duração e desta forma não poderá ser registrado empregando esta formulação.

5.5.2 Estabilidade do produto na embalagem frasco plástico opaco

A seguir, nas figuras 72 e 73, encontram-se os resultados do estudo de estabilidade acelerada e de longa duração de comprimidos de LF acondicionados na embalagem frasco plástico opaco.

Figura 72 - Resultados do estudo de estabilidade acelerada de comprimidos de LF acondicionados em frasco plástico opaco.

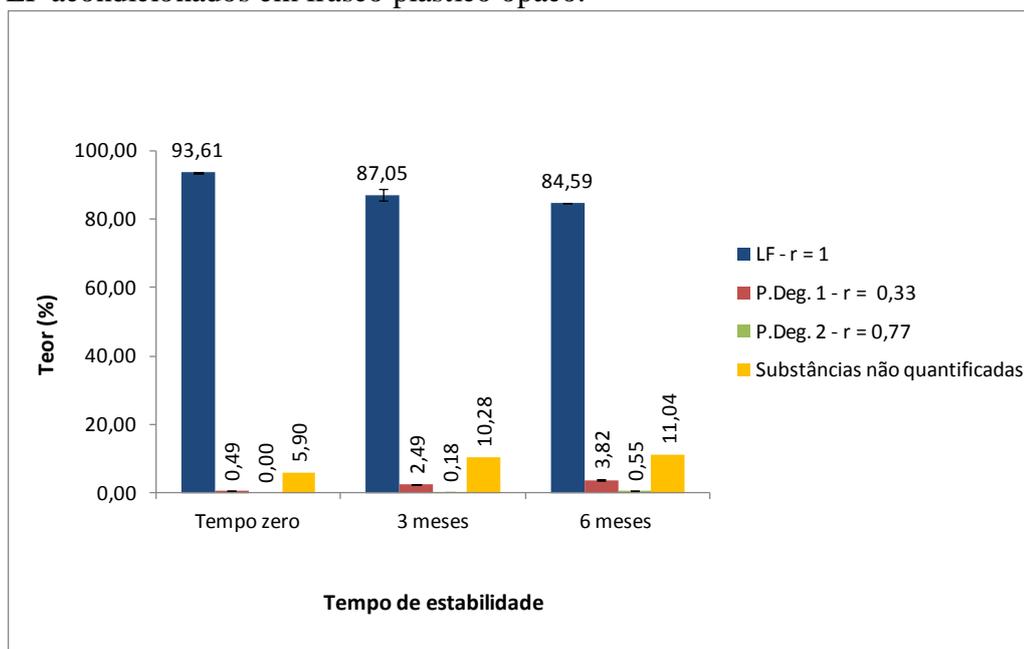
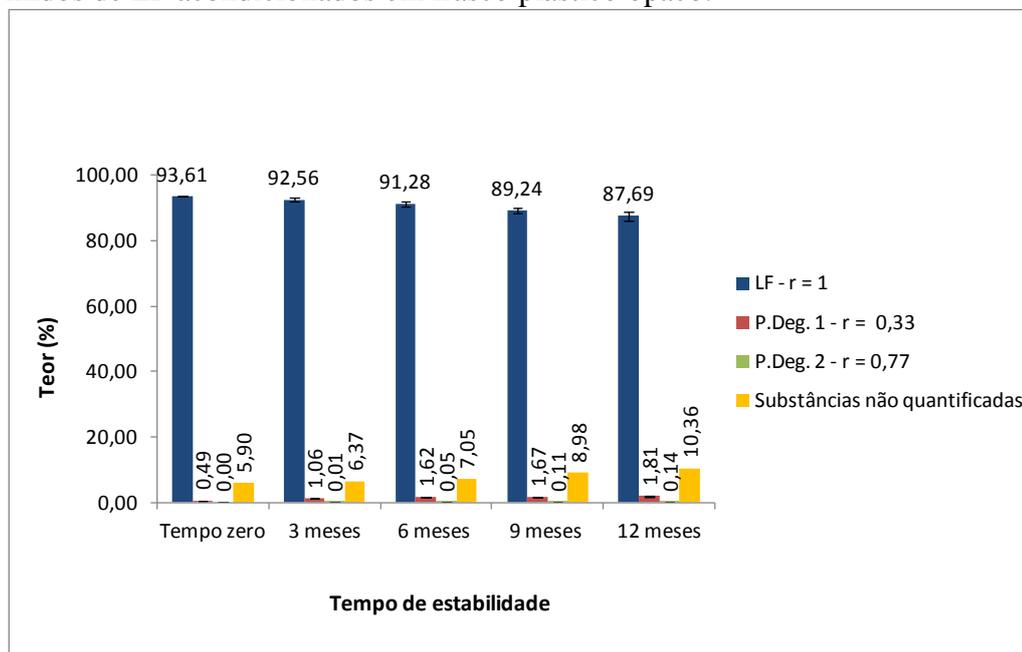


Figura 73 - Resultados do estudo de estabilidade de longa duração de comprimidos de LF acondicionados em frasco plástico opaco.



De acordo com os resultados do estudo de estabilidade acelerada de comprimidos de LF na embalagem frasco plástico opaco apresentados na figura 72, podemos concluir que no sexto mês de estabilidade houve a formação de 3,82 e 0,55% dos produtos de degradação da hidrólise alcalina ($r = 0,33$) e da hidrólise ácida ($r = 0,77$), respectivamente. Estes resultados também passaram por uma avaliação de acordo com os critérios de reporte, identificação e qualificação, a qual foi realizada utilizando as regras existentes no guia “Impurities in New Drug Products” [Q3B(R2)] de 06/2006 do ICH. Os dados desta avaliação, considerando uma dose máxima diária de 100 mg de LF, estão representados na tabela 28.

Tabela 28 - Avaliação dos resultados após 6 meses de estabilidade acelerada em frasco plástico opaco considerando os critérios de reporte, identificação e qualificação.

Substância	Tempo de retenção relativo	Resultado bruto (%)	Resultado	Ação	
			reportado (%) Limite: > 0,1%	Identificação Limite: > 0,2%	Qualificação Limite: > 0,5%
LF	1,00	84,59	N.A	N.A	N.A
P.Deg. 1	0,33	3,82	3,8	Sim	Sim
P.Deg. 2	0,77	0,55	0,6	Sim	Sim

A partir dos resultados da tabela 28 pode-se concluir que os comprimidos de LF também foram mais susceptíveis à hidrólise alcalina visto que o teor do produto de degradação da hidrólise alcalina foi superior ao da hidrólise ácida. Além disso os resultados dos produtos de degradação P.Deg. 1 e P.Deg. 2 encontram-se acima dos limites de reporte, identificação e qualificação. Isto implica que, assim como na embalagem PVDC, eles também deveriam ter a sua estrutura química elucidada e teriam que passar por testes de avaliação de toxicidade em humanos. No entanto, pelos mesmos motivos já explicitados anteriormente para a embalagem PVDC, os resultados foram insatisfatórios para LF devido à queda no seu teor correspondente a 9,02% (BRASIL, 2005). Desta forma estes resultados também não deverão ser apresentados para a ANVISA, o que inviabiliza os esforços de se identificar e qualificar os produtos de degradação P.Deg. 1 e P.Deg. 2.

A partir do exposto, pode-se concluir que o produto na embalagem frasco plástico opaco foi reprovado no estudo de estabilidade acelerada. No entanto, resolveu-se prosseguir com o estudo de estabilidade de longa duração conforme preconizado na resolução nº 01/2005 da ANVISA (BRASIL, 2005).

Observando os resultados do estudo de estabilidade de longa duração de comprimidos de LF na embalagem frasco plástico opaco apresentados na figura 73, pode-se concluir que no décimo segundo mês de estabilidade houve a formação de 1,81 e 0,14% dos produtos de degradação da hidrólise alcalina ($r = 0,33$) e da hidrólise ácida ($r = 0,77$), respectivamente. Estes resultados também passaram por uma avaliação de acordo com os critérios de reporte, identificação e qualificação, a qual foi realizada utilizando as regras existentes no guia “Impurities in New Drug Products” [Q3B(R2)] de 06/2006 do ICH. Os dados desta avaliação, considerando uma dose máxima diária de 100 mg de LF, estão representados na tabela 29.

Tabela 29 - Avaliação dos resultados após 12 meses de estabilidade de longa duração em frasco plástico opaco considerando os critérios de reporte, identificação e qualificação.

Substância	Tempo de retenção relativo	Resultado bruto (%)	Resultado	Ação	
			reportado (%) Limite: > 0,1%	Identificação Limite: > 0,2%	Qualificação Limite: > 0,5%
LF	1,00	87,69	N.A	N.A	N.A
P.Deg. 1	0,33	1,81	1,8	Sim	Sim
P.Deg. 2	0,77	0,14	≤ 0,1	Não	Não

A partir dos resultados da tabela 29 pode-se concluir que os comprimidos de LF foram mais susceptíveis à hidrólise alcalina visto que o teor do produto de degradação da hidrólise alcalina foi superior ao da hidrólise ácida. Além disso o resultado do produto de degradação P.Deg. 1 encontra-se acima dos limites de reporte, identificação e qualificação. Isto implica que assim como na estabilidade acelerada, ele também deveria ter a sua estrutura química elucidada e teria que passar por testes de avaliação de toxicidade em humanos. No entanto, pelos mesmos motivos já explicitados anteriormente para a estabilidade acelerada, os resultados foram insatisfatórios para LF devido à queda no seu teor correspondente a 5,92% (BRASIL, 2005). Desta forma estes resultados também não deverão ser apresentados para a ANVISA, o que inviabiliza os esforços de se identificar e qualificar o produto de degradação P.Deg. 1.

Pode-se concluir que o produto na embalagem frasco plástico opaco também foi reprovado no estudo de estabilidade de longa duração e, portanto, não poderá ser registrado na formulação proposta.

5.5.3 Conclusão da avaliação da estabilidade

A formulação proposta foi reprovada nos estudos de estabilidade acelerada e de longa duração nas embalagens blíster PVDC e frasco plástico opaco. Ambos medicamentos de referência e genéricos são comercializados em embalagem de frasco plástico opaco. Portanto, presume-se que não se trata de um problema relacionado estritamente à embalagem e, desta forma, a formulação será reavaliada com o objetivo de otimizar a estabilidade do fármaco LF no produto em questão, e novo estudo de estabilidade será realizado nas mesmas embalagens testadas.

6 CONCLUSÃO

Foram encontrados registros na literatura de métodos analíticos indicativos de estabilidade por CLAE para quantificação da LF e seus produtos de degradação, os quais foram desenvolvidos à partir de estudos de degradação forçada incompletos.

Logo, foi proposta a realização de um estudo de degradação forçada completo, o qual viabilizou o desenvolvimento e validação com sucesso de um método analítico para a quantificação do teor e substâncias relacionadas em comprimidos de LF da formulação em desenvolvimento pela FUNED. O método atendeu aos parâmetros de seletividade, linearidade, efeito matriz, precisão, exatidão, robustez e estabilidade das soluções analíticas. Em relação à seletividade, ele foi capaz de separar a LF e todos produtos de degradação oriundos de uma variedade de condições de estresse, e por este motivo pode ser denominado como indicativo de estabilidade.

O método validado foi empregado nas análises do estudo de estabilidade acelerada e de longa duração de uma formulação em escala de bancada de comprimidos de LF acondicionada em duas embalagens distintas (blíster PVDC e frasco plástico opaco), sendo que foi capaz de monitorar com confiabilidade a LF e os produtos de degradação encontrados.

Além disso, o método cumpriu o seu objetivo ao comprovar a necessidade de redesenvolvimento farmacotécnico da formulação, em virtude da reprovação nos estudos de estabilidade nas duas embalagens avaliadas. A reprovação na apresentação de frasco plástico opaco, a qual é encontrada nas apresentações dos medicamentos de referência e genéricos, reforça ainda mais este entendimento.

Pelos motivos expostos anteriormente, este método pode ser empregado na indústria farmacêutica tanto para o controle de qualidade, quanto para avaliação dos estudos de estabilidade das formulações de comprimidos de LF.

Este projeto deixa ainda como perspectivas a realização de análises na formulação a ser redesenvolvida pela FUNED das amostras degradadas empregando as técnicas de CLAE-MS e CLAE-RMN, com o objetivo de elucidar a estrutura química daqueles produtos de degradação cujos valores percentuais ultrapassem os limites de identificação. Em relação àqueles produtos de degradação que ultrapassem os limites de qualificação, temos como desafio a realização dos estudos de toxicidade em humanos.

7 REFERÊNCIAS

ABBAS, S. S.; BEBAWY, L. I.; FATTAH, L. A.; REFAAT, H. H. Spectrophotometric stability-indicating methods for the determination of leflunomide in the presence of its degradates. **Journal of AOAC International**, v. 89, n. 6, p. 1524-1531, nov-dec 2006.

ALAMANOS, Y.; DROSOS, A. A. Epidemiology of adult rheumatoid arthritis. **Autoimmunity Reviews**, v. 4, n. 3, p. 130-136, 2005.

ALBERS, J. M. C.; PAIMELA, L.; KURKI, P.; EBERHARDT, K. B.; EMERY, P.; HOF, M. A. V.; SCHREUDER, F. H. J. M.; REPO, M. L.; RIEL, P. L. C. M. V. Treatment strategy, disease activity, and outcome in four cohorts of patients with early rheumatoid arthritis. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 60, n. 5, p. 453-458, May 2001.

ALSANTE, K. M.; MARTIN, L.; BAERTSCHI, S. W. A stress testing benchmarking study. **Pharmaceutical Technology**, v. 27, n. 2, p. 60-73, 2003.

ANDERSON, N.; BYARD, S. J. Photostability Testing: Design and Interpretation of Tests on New Drug Substances and Dosage Forms. **Photostability of drugs and drug formulations**, p. 137, 2004.

ANVISA. **Consulta a banco de dados. Consulta de produto - Medicamentos**. Disponível em: <http://www7.anvisa.gov.br/datavisa/consulta_produto/Medicamentos/frmConsultaMedicamentos.asp>. Acesso em: 07 Jun. 2013.

AOAC. **Peer-Verified Methods Program, Manual on policies and procedures**. Arlington, Va., USA, 1998. Disponível em: <<http://www.aoac.org/vmeth/PVM.pdf>>. Acesso em: 12/09/2013.

ARMITAGE, P.; BERRY, G. **Statistical methods in medical research**. Oxford: Blackwell Science Ltd., 1994.

ARNETT, F. C.; EDWORTHY, S. M.; BLOCH, D. A.; MCSHANE, D. J.; FRIES, J. F.; COOPER, N. S. The american rheumatism association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. **Arthritis and Rheumatism**, v. 31, n. 3, p. 315-324, 1988.

BAERTSCHI, S. W.; ALSANTE, K. M.; REED, R. A. **Pharmaceutical stress testing: predicting drug degradation**. Taylor & Francis, 2005.

BAKSHI, M.; SINGH, B.; SINGH, A.; SINGH, S. The ICH guidance in practice: stress degradation studies on ornidazole and development of a validated stability-indicating assay. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 26, n. 5-6, p. 891-897, Dec 2001.

BAKSHI, M.; SINGH, S. Development of validated stability-indicating assay methods-critical review. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 28, n. 6, p. 1011-1040, 2002.

BEDSE, G.; KUMAR, V.; SINGH, S. Study of forced decomposition behavior of lamivudine using LC, LC-MS/TOF and MSn. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 49, n. 1, p. 55-63, 2009.

BELSLEY, D.A.; KUH, E.; WELSCH, R.E. **Regression diagnostics: identifying influential data and sources of collinearity**. New York: Wiley, 292 p., 1980.

BÉRTOLO, M. B. Consenso brasileiro no diagnóstico e tratamento da artrite reumatoide. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 47, p. 150-150, 2007.

BÉRTOLO, M. B.; BRENOL, C. V.; SCHAINBERG, C. G.; NEUBARTH, F.; LIMA, F. A. C.; LAURINDO, I. M.; SILVEIRA, I. G.; PEREIRA, I. A.; LOURES, M. A. R.; AZEVEDO, M. N.; FREITAS, M. V. C.; NETO, M. S. P.; XAVIER, R. M.; GIORGI, R. D. N.; KOWALSKI, S. C.; ANTI, S. M. A. Atualização do consenso brasileiro no diagnóstico e tratamento da artrite reumatóide. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 47, n. 3, p. 151-159, mai/jun, 2007.

BOCCARDI, G. Autoxidation of drugs: prediction of degradation impurities from results of reaction with radical chain initiators. **Farmaco**, v. 49, n. 6, p. 431-435, Jun 1994.

BRASIL. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resultado da consulta de medicamentos**. Disponível em: http://www7.anvisa.gov.br/datavisa/Consulta_Produto/consulta_medicamento.asp. Acesso em 15/01/2014.

_____. Informe técnico nº 1, de 15 de julho de 2008. Esclarecimento sobre o item 2.9 do anexo da Resolução RE nº 1 de 29/07/2005, que trata do Guia para Realização dos Estudos de Estabilidade. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Poder Executivo**, Brasília, DF, 15 jul. 2008.

_____. Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Poder Executivo**, Brasília, DF, 02 jun. 2003.

_____. Resolução nº 01, de 29 de julho de 2005. Guia para a realização de estudos de estabilidade. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Poder Executivo**, Brasília, DF, 01 ago. 2005.

_____. Resolução de Diretoria Colegiada - RDC nº 17, de 16 de abril de 2010. Dispõe sobre as boas práticas de fabricação de medicamentos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Poder Executivo**, Brasília, DF, 19 abr. 2010.

_____. Resolução de Diretoria Colegiada - RDC nº 58, de 20 de dezembro de 2013. Estabelece parâmetros para a notificação, identificação e qualificação de produtos de degradação em medicamentos com substâncias ativas sintéticas e semissintéticas, classificados como novos, genéricos e similares, e dá outras providências. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Poder Executivo**, Brasília, DF, 20 dez. 2013.

BROWN, M.B.; FORSYTHE, A.B. Robust tests for the equality of variances. **Journal of the American Statistical Association**, v. 69, p. 364-367, 1974.

DING, L.; WANG, X.; YANG, Z.; CHEN, Y. The use of HPLC/MS, GC/MS, NMR, UV and IR to identify a degradation product of eperisone hydrochloride in the tablets. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 46, n. 2, p. 282-287, 22 Jan 2008.

DOLAN, J. W. Stability-indicating assays. **LC GC North America**, v. 20, n. 4, p. 346-349, 2002.

DURBIN, J.; WATSON, G.S. Testing for serial correlation in least squares regression. **Biometrika**, v. 38, p. 159-178, 1951.

EL-RIES, M. A.; ABO-ATTIA, F. M.; EL-BAYOUMI, A.; EMAN, G. S. Thermal Characterization of Leflunomide. **Insight Pharmaceutical Sciences**, v. 1, p. 18-23, 2011.

EURACHEM. **The fitness for purpose of analytical methods: A laboratory guide to method validation and related topics**. Laboratory of the Government Chemist, 1998.

FDA. Guideline for Submitting Documentation for the Stability of Human Drugs and Biologics. **Food and Drug Administration**, Rockville, MD, 1987.

_____. Guidance for Industry: Stability Testing of Drug substances and Drug Products (Draft guidance), **Food and Drug Administration**, Rockville, MD, 1998.

_____. **Unites States Department of Health and Human Services. Drugs - Orange Book Search - active ingredient search.** Disponível em: <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/ob/docs/tempai.cfm>. Acesso em 07/06/2012.

FENG, W.; LIU, H.; CHEN, G.; MALCHOW, R.; BENNETT, F.; LIN, E.; PRAMANIK, B.; CHAN, T. Structural characterization of the oxidative degradation products of an antifungal agent SCH 56592 by LC-NMR and LC-MS. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 25, n. 3-4, p. 545-557, 2001.

FORSYTH, R.; IP, D. Determination of imipenem and cilastatin sodium in Primaxin® by first order derivative ultraviolet spectrophotometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 12, n. 10, p. 1243-1248, 1994.

FOX, R. I.; HERRMANN, M. L.; FRANGOU, C. G.; WAHL, G. M.; MORRIS, R. E.; STRAND, V.; KIRSCHBAUM, B. J. Mechanism of action for leflunomide in rheumatoid arthritis. **Clinical Immunology**, v. 93, n. 3, p. 198-208, Dec 1999.

GABRIEL, S. E. The epidemiology of rheumatoid arthritis. **Rheumatic Disease Clinics of North America**, v. 27, n. 2, p. 269-281, may 2001.

GOLDENBERG, M. M. Leflunomide, a novel immunomodulator for the treatment of active rheumatoid arthritis. **Clinical Therapeutics**, v. 21, n. 11, p. 1837-1852; discussion 1821, Nov 1999.

GOOLSBY, M. J.; NEWSOME, G. Guidelines for the management of rheumatoid arthritis update. **Journal of the American Academy of Nurse Practitioners**, v. 14, n. 10, p. 432-437, 2002.

GORMAN, P. M.; JIANG, H. Isolation methods I: Thin-layer chromatography. **Separation Science and Technology**: Academic Press, v. 5, p. 203-230, 2004.

GOTZSCHE, P. C.; JOHANSEN, H. K. Short-term low-dose corticosteroids vs placebo and nonsteroidal antiinflammatory drugs in rheumatoid arthritis. **The Cochrane Database of Systematic Reviews**, n. 2, p. CD000189, 2002.

GRIMM, W.; KRUMMEN, K. **Stability Testing in the EC, Japan and the USA: Scientific and Regulatory Requirements (including the Draft of the Harmonized Guideline for the EC, Japan and the USA)**, 1993.

GU, X. X.; LI, C. Y.; QI, X.; ZHOU, T. Z. Determination of trace aniline in water by a spectrophotometric method after preconcentration on an organic solvent-soluble membrane filter. **Analytical Letters**, v. 30, n. 2, p. 259-270, 1997.

HAMILTON, L. C.; VOJNOVIC, I.; WARNER, T. D. A771726, the active metabolite of leflunomide, directly inhibits the activity of cyclo-oxygenase-2 in vitro and in vivo in a substrate-sensitive manner. **British Journal of Pharmacology**, v. 127, n. 7, p. 1589-1596, Aug 1999.

HONG, D. D.; SHAH, M. Development and Validation of HPLC stability-indicating assays. **Drug stability: principles and practices**. New York: Marcel Dekker, p. 329-384, 2000.

ICH. The International Conference on Harmonisation. **Stability testing of active pharmaceutical ingredients and finished pharmaceutical products**. Disponível em: < http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q1F/Stability_Guideline_WHO.pdf >. Acesso em 12/10/2012.

ICH-Q1A(R2). The International Conference on Harmonisation. **ICH Q1A(R2) stability testing of new drug substances and products**, 2003.

ICH-Q1B. The International Conference on Harmonisation. **Stability Testing: Photostability Testing of New Drug Substances and Products**, 1996.

ICH-Q1F. The International Conference on Harmonisation. **ICH Q1F guideline stability data package for registration in climatic zones III and IV**, 2003.

ICH-Q2(R1). The International Conference on Harmonisation. **ICH Q2(R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology**, 1996.

ICH-Q3B(R2). The International Conference on Harmonisation. **ICH Q3B(R2) Impurities in New Drug Products**, 2006.

INMAN, E. L.; FRISCHMANN, J. K.; JIMENEZ, P. J.; WINKEL, G. D.; PERSINGER, M. L.; RUTHERFORD, B. S. General method validation guidelines for pharmaceutical samples. **Journal of Chromatographic Science**, v. 25, n. 6, p. 252-256, Jun 1987.

INMETRO. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. DOQ-CGCRE-008. **Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos**. Rio de Janeiro, 2010.

JERUSSI, R. A. Stability testing and generics. **J cGMP Compliance**, v. 4, n. 3, p. 28-32, 1999.

JOSHI, H. S.; KHER, G. J.; RAM, V. R.; PANDYA, G. P. Development and validation of a stability indicating UPLC assay method for determination of Leflunomide in tablet formulation. **Der Chemica Sinica**, v. 2, n. 5, p. 65-74, 2011.

KALGUTKAR, A. S.; NGUYEN, H. T.; VAZ, A. D. N.; DOAN, A.; DALVIE, D. K.; MCLEOD, D. G.; MURRAY, J. C. In vitro metabolism studies on the isoxazole ring scission in the anti-inflammatory agent Leflunomide to its active α -Cyanoenol metabolite A77 1726: Mechanistic similarities with the cytochrome P450-Catalyzed dehydration of aldoximes. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 31, n. 10, p. 1240-1250, 2003.

KHER, G. J.; RAM, V. R.; DUBAL, K. L.; BAPODARA, A. H.; JOSHI, H. S. Validation of a stability-indicating LC method for assay of leflunomide in tablets and for determination of content uniformity. **International Journal of ChemTech Research**, v. 3, n. 2, p. 523-530, 2011.

KLICK, S.; MUIJSELAAR, P. G.; WATERVAL, J.; EICHINGER, T.; KORN, C.; GERDING, T. K.; DEBETS, A. J.; GRIEND, C. S.; BELD, C. V. D.; SOMSEN, G. W.; JONG, G. J. D. Stress testing of drug substances and drug products. **Pharmaceutical Technology**, 2005.

LI, E. K.; TAM, L. S.; TOMLINSON, B. Leflunomide in the treatment of rheumatoid arthritis. **Clinical Therapeutics**, v. 26, n. 4, p. 447-459, Apr 2004.

LOVDAHL, M. J.; PRIEBE, S. R. Characterization of clinafloxacin photodegradation products by LC-MS/MS and NMR. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 23, n. 2-3, p. 521-534, 2000.

MADDISON, P.; KIELY, P.; KIRKHAM, B.; LAWSON, T.; MOOTS, R.; PROUDFOOT, D.; REECE, R.; SCOTT, D.; SWORD, R.; TAGGART, A.; THWAITES, C.; WILLIAMS, E. Leflunomide in rheumatoid arthritis: recommendations through a process of consensus. **Rheumatology**, v. 44, n. 3, p. 280-286, 2005.

MANNA, S. K.; AGGARWAL, B. B. Immunosuppressive leflunomide metabolite (A77 1726) blocks TNF-dependent nuclear factor-kappa B activation and gene expression. **The Journal of Immunology**, v. 162, n. 4, p. 2095-2102, Feb 1999.

MEHTA, V.; KISALAY, S.; BALACHANDRAN, C. Leflunomide. **Indian Journal of Dermatology, Venereology and Leprology**, v. 75, n. 4, p. 422-424, Jul-Aug 2009.

MENDHAM, J. **Vogel's textbook of quantitative chemical analysis**. Pearson Education India, 2006.

MONCUR, C.; WILLIAMS, H. J. Rheumatoid arthritis: status of drug therapies. **Physical Therapy**, v. 75, n. 6, p. 511-525, Jun 1995.

NATA. National Association of Testing Authorities. Technical note 17. **Format and content of test methods and procedures for validation and verification of chemical test methods**, 1997.

PAREKH, J. M.; VAGHELA, R. N.; SUTARIVA, D. K.; SANYAL, M.; YADAV, M.; SHRIVASTAV, P. S. Chromatographic separation and sensitive determination of teriflunomide, an active metabolite of leflunomide in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 878, n. 24, p. 2217-2225, Aug. 2010.

PENG, S. X. Hyphenated HPLC-NMR and its applications in drug discovery. **Biomedical Chromatography**, v. 14, n. 6, p. 430-441, 2000.

RAO, R. N.; RAMACHANDRA, B.; VALI, R. M.; RAJU, S. S. LC-MS/MS studies of ritonavir and its forced degradation products. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 53, n. 4, p. 833-842, 2010.

REDDY, Y. R.; NANDAN, S. R.; BHARATHI, D. V.; NAGARAJU, B.; REDDY, S. S.; RAVINDRANATH, L. K.; RAO, V. S. LC and LC-MS/MS study of forced decomposition behavior of anastrozole and establishment of validated stability-indicating analytical method for impurities estimation in low dose anastrozole tablets. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 50, n. 3, p. 397-404, 2009.

REYNOLDS, D. W.; FACCHINE, K. L.; MULLANEY, J. F.; ALSANTE, K. M.; HATAJIK, T. D.; MOTTO, M. G. Conducting forced degradation studies. **Pharmaceutical Technology**, p. 48-56, 2002.

RUBINO, J.; SWARBRICK, J.; BOYLAN, J. **Autoxidation and antioxidants**. New York: Marcel Dekker, 1988a.

RUBINO, J. T.; SWARBRICK, J.; BOYLAN, J. C. **Photodecomposition of drugs**. New York: Marcel Dekker, 2859-2865, 1988b.

RYAN, T.A.; JOINER, B.L. **Normal probability plots and tests for normality**. The State College: Pennsylvania State University, 15 p.,1976.

SCHATTENKIRCHNER, M. The use of leflunomide in the treatment of rheumatoid arthritis: an experimental and clinical review. **Immunopharmacology**, v. 47, n. 2-3, p. 291-298, May 2000.

SCOTT, D. L.; SMOLEN, J. S.; KALDEN, J. R.; PUTTE, L. B. A.; LARSEN, A.; KVIEN, T. K.; SCHATTENKIRCHNER, M.; NASH, P.; OED, C.; LOEW, I. Treatment of active rheumatoid arthritis with leflunomide: two year follow up of a double blind, placebo controlled trial versus sulfasalazine. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 60, p. 913-923, 2001.

SHOKRY, D. S.; KAWY, M. A.; WESHAHY, S.A. Application of spectrophotometric and chromatographic methods for stability indicating determination of leflunomide. **Journal of Applied Sciences Research**, v. 8, n. 3, p. 1547-1557, 2012.

SILVA, K. E. R.; ALVES, L. D. S.; SOARES, M. F. R.; PASSOS, R. C. S.; FARIA, A. R.; ROLIM NETO, P. J. Modelos de avaliação da estabilidade de fármacos e medicamentos para a indústria farmacêutica. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 30, n. 2, p. 129-135, 2009.

SINGH, S.; BAKSHI, M. Stress test to determine inherent stability of drugs. **Pharmaceutical Technology**, v. 4, p. 1-14, 2000.

SINGH, S.; KUMAR, V. Recent developments on long term stability test conditions. **The Pharma Review**, v. 12, p. 61-68, 2006.

SNEDECOR, G. W.; COCHRAN, W. G. **Statistical methods**. Ames: Iowa State University, 1989.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; GLAJCH, J. L. **Practical HPLC method development**. John Wiley & Sons, 1997.

SOBHANI, K.; GARRET, D. A.; LIU, D. P.; RAINEY, P. M. A rapid and simple high-performance liquid chromatography assay for the leflunomide metabolite, teriflunomide (A77 1726), in renal transplant recipients. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 133, p. 454-457, 2010.

SOLOMONS, T. W. G.; FRYHLE, C. B.; JOHNSON, R. G. **Química orgânica**. v. 2, 10^a ed., Livros Técnicos e Científicos Editora, 2012.

STEWART, P.; TUCKER, I. Prediction of drug stability—part 2: Hydrolysis. **The Australian Journal of Hospital Pharmacy**, v. 15, p. 11-16, 1985.

TAVERNIERS, I.; DE LOOSE, M.; VAN BOCKSTAELE, E. Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 23, n. 8, p. 535-552, 2004.

THOMPSON, M.; ELLISON, S. L. R.; WOOD, R. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis. **Pure and Applied Chemistry**, v. 74, n. 5, p. 835-855, 2002.

United States Pharmacopoeia. 34 ed. NF 29. **United States Pharmacopoeial Convention**, Rockville, MD, 2011.

WILLIAMS, M. **The Merck Index: an Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals**, 14th Edition. Merck Inc., Whitehouse Station/Rahway, New Jersey, October 2006.

WORTMANN, R. L. Pathogenesis of rheumatoid arthritis: basis for future therapies. **Seminars in Arthritis and Rheumatism**, v. 21, n. 2, Suppl 1, p. 35-39, Oct 1991.

XU, X.; BARTLETT, M. G.; STEWART, J. T. Determination of degradation products of sumatriptan succinate using LC-MS and LC-MS-MS. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 26, n. 3, p. 367-77, Oct 2001.

YENICELI, D.; DOGRUKOL, A. K. D.; TUNCEL, M. Determination of leflunomide in tablets by high performance liquid chromatography. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 40, n. 1, p. 197-201, Aug. 2006.

YOSHIOKA, S.; STELLA, V. J. **Stability of drugs and dosage forms**. New York: Kluwer Academic: 268 p., 2002.

YOU DEN, W. J.; STEINER, E. H. **Statistical manual of AOAC – Association of official analytical chemistry**. Washington: AOAC, 88 p., 1975.