

# ESTUDO DE DEGRADAÇÃO FORÇADA, DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO INDICADOR DE ESTABILIDADE PARA CÁPSULAS DE FOSFATO DE OSELTAMIVIR DE ACORDO COM AS REGRAS DA ANVISA

Bianca da C. Barbosa<sup>1</sup>, Margareth B. C. Gallo<sup>2</sup>, Fabiana M. dos S. U. Moncorvo<sup>1</sup>, Rosemberg B. Moure<sup>1</sup>, Diogo D. do Nascimento<sup>1</sup>, Nelson M. Nunes<sup>1</sup>, Lúcia M. dos S. Pires<sup>1</sup>, Alexandre C. de Souza<sup>1</sup>, José L. N. de Aguiar<sup>3</sup>, Graça M. S. Guerra<sup>1</sup>, Juliana J. S. Medeiros<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Tecnologia em Fármacos - Farmanguinhos/Fiocruz-RJ

<sup>2</sup> Fiocruz Ceará

<sup>3</sup> Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde - INCQS/Fiocruz-RJ



## Resumo

Uma epidemia de gripe causada pelo vírus influenza A subtipo H3N2 surpreendeu os brasileiros em 2021, aumentando a demanda por fosfato de osetamivir, medicamento de escolha para o tratamento e profilaxia da doença. Desde 2020, Farmanguinhos já planejava produzir cápsulas de 30 mg de fosfato de osetamivir (produto - DP) para tratamento pediátrico. Para obter o registro e liberação para comercialização do DP, foi necessário cumprir diversas exigências da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Um deles foi o estudo da degradação forçada do insumo farmacêutico ativo (IFA) e seu DP para

desenvolver um método indicativo de estabilidade (MIE). IFA e DP foram mais susceptíveis à hidrólise básica, apresentando 23% de degradação; IFA e DP foram inertes à reação com cobre, mas produziram o maior número de produtos de degradação (PDegs - um total de 18) na oxidação com água oxigenada. A análise por LC-MS/MS e comparação com padrões de referência revelaram as substâncias relacionadas A, B, C, D e G, de acordo com a classificação da Farmacopeia Europeia, como os principais PDegs. O MIE validado foi capaz de detectar e quantificar cerca de vinte PDegs, sete dos quais coincidiram em amostras do estudo de estabilidade do DP.

**Palavras-chave:** Testes de estresse de medicamentos, Controle de qualidade de medicamentos, inibidores da neuraminidase.

## Abstract

*In the spring of 2021, a flu epidemic caused by the influenza A virus subtype H3N2 took Brazilians by surprise, increasing the demand for oseltamivir phosphate, the drug of choice for the treatment and prophylaxis of the disease. However, since 2020, the Brazilian pharmaceutical Farmanguinhos has decided to produce oseltamivir phosphate 30 mg capsule (drug product - DP) for the treatment of children. To obtain regis-*

*tration and release for sale of DP, it was necessary to comply with several requirements of the Brazilian Health Surveillance Agency (ANVISA). One was the study of forced degradation of the drug substance (DS) and its DP to develop a stability-indicating method (SIM). Both DS and DP were more susceptible to basic hydrolysis, resulting in 23% degradation; they did not react with transition metal ions; and they produced the highest number of degradation products (PDegs) in the oxidation reaction with hydrogen peroxide (a total of 18). LC-MS/MS analysis and comparison with reference standards revealed the related substances A, B, C, D and G, according to the European Pharmacopoeia classification, as the main PDegs. The validated SIM was able to detect and quantify about twenty PDegs, seven of which coincided in samples from the DP stability study.*

**Keywords:** *Drug stress testing, Pharmaceutical quality control, Neuraminidase inhibitor*

## **Introdução**

Em meados da primavera de 2021, um surto de gripe causado pelo vírus influenza A subtipo H3N2 surpreendeu os brasileiros, congestionando o sistema público de saúde já sobrecarregado pela COVID-19 (LISBOA, 2021). O fosfato de oseltamivir é a droga de escolha no tratamento e profilaxia desse tipo de gripe, atuando como um pró-fármaco no fígado e trato gastrointestinal humano, onde é convertido no metabólito ativo carboxilato de oseltamivir - também conhecido como substância relacionada C, conforme nomenclatura da Farmacopeia Europeia - que inibe as neuraminidases do vírus, enzimas essenciais para a proliferação desse microrganismo (LABORDA et al. 2016; KUMAR et al., 2020).

Para facilitar a dispensação para crianças acima de 15 kg, Farmanguinhos decidiu produzir cápsulas contendo 30 mg de

fosfato de oseltamivir conforme as exigências da ANVISA. Uma delas foi o estudo de degradação forçada (EDF) do IFA fosfato de oseltamivir e de seu respectivo DP - incluindo hidrólise ácida e básica, degradação térmica (calor seco e úmido), fotodegradação, oxidação pelo peróxido de hidrogênio e reação com íons metálicos de transição - para prospectar os PDegs com maior probabilidade de serem formados durante o processo de fabricação, período de armazenamento e prazo de validade (Guia 4/2015; RDC 53/2015). E, posteriormente, o desenvolvimento e validação de um método indicativo de estabilidade (MIE) capaz de detectar e quantificar, simultaneamente, o IFA e seus respectivos PDegs, para garantir que o teor do IFA corresponda à dose determinada no rótulo e a concentração de PDegs esteja dentro dos limites de segurança exigidos pelo órgão regulador (RDC 166/2017).

Após realizar uma revisão da literatura focando nos EDFs mais relevantes do IFA e DP e dos MIEs existentes, observamos que nenhum dos estudos havia realizado todas as reações de degradação recomendadas pela ANVISA (Tabela 1). Além disso, alguns estudos carecem de detalhes importantes da metodologia, como a concentração do tampão, o tamanho dos poros e a carga de carbono das partículas da fase estacionária e a estabilidade das soluções, o que poderia dificultar sua reprodução como um todo (Tabela 2).

As curvas de calibração nem sempre foram construídas utilizando a faixa de linearidade recomendada para uma impureza, que vai do limite de quantificação até 120% do limite máximo especificado (LME). Os resultados da curva vieram de amostras diluídas a partir de uma única solução padrão, ao invés de três soluções padrão preparadas independentemente, além de não terem sido submetidos aos tratamentos estatísticos adequados (Tabela 2).

Tabela 1. Estado da arte do estudo de degradação forçada do fosfato de oseltamivir insumo farmacêutico ativo (IFA) e cápsulas (DP)

Teste de Estresse	OLUWAI et al. (1998)	NAJAS-SIMHAN et al. (2008)	AMEHI et al. (2012)	JUNWAL et al. (2012)	AL-BAGIARY et al. (2014)	KUMAR et al. (2015)	Nossos dados		
	IFA	IFA	DP	IFA	DP	IFA	IFA	DP (75 mg cps)	
HA	Condição	2,5 mg/mL em NaOAc 0,13 M pH 6, 70°C, 24 h	50 mg em 1 mL HCl 1 M, 85°C, 25 min	25 mg em 0,5 mL HCl 1 M, 90°C, 30 min	1 mg/mL em diluente (H <sub>2</sub> O/ACN 1:1), HCl 1 M, 80°C, tempo NI	0,1 mg/mL em MeOH, NaOH 0,01 M HCl, ta, 4 h	0,15 mg/mL em diluente (MeOH/ACN/H <sub>2</sub> O 20:20:60), HCl 0,1 M, 70°C, 40 min	1 mg/mL (equivalente ao oseltamivir base livre) em diluente (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,01 M pH 6), HCl 1,0 M, sob refluxo a 70°C, 20 min	
	Degradação (%) SR detectada	NI A, C, G	10 5 UN	59,6 2 UN	NI A, C, G, J, K	NI none	17,2 A, C, 2 UN	13,1 A, C, 3 UN	15,8 A, C, 1 UN
HB	Condição		50 mg em 1 mL NaOH 0,05 M, ta, 1,5 h, 2,5 h, e 5 h	25 mg em 0,5 mL de NaOH 0,05 M, ta, 5 h	1 mg/mL em diluente, NaOH 0,1 M, 80°C, tempo NI	0,1 mg/mL em MeOH, NaOH 0,01 M, ta, 3 h	0,15 mg/mL em diluente, NaOH 0,1 M, 25°C, 11 min	1 mg/mL em diluente, NaOH 0,01 M, ta, 10 min	
	Degradação (%) SR detectada		NR 1 UN	10, 15, 25, respectivamente 2 UN	5,2 A, C, G	NI NI	NI A, C	23,0 C	23,7 C
OxAO	Condição		50 mg em 1 mL H <sub>2</sub> O, 30%, 90°C, 10 min	25 mg em 0,5 mL H <sub>2</sub> O, 30%, 90°C, 10 min	1 mg/mL em diluente; H <sub>2</sub> O, 2,5%, 30%, ta, 4 h	1 mg/mL em MeOH, H <sub>2</sub> O, 30%, ta, 4 h	0,15 mg/mL em diluente, H <sub>2</sub> O, 5%, 50°C, 40 min	1 mg/mL em diluente, H <sub>2</sub> O, 5% sob refluxo a 100°C, 40 min	
	Degradação (%) SR detectada		NR 39	4,1 3 UN	NI NI	NI 1 UN	14,6 A, C, 5 UN	10,8 A, C, D, G, 14 UN	9,9 A, C, D, G, 14 UN
TS	Condição		50 mg em estufa de ar quente a 100°C e 120°C, 1 h	25 mg em estufa de ar quente a 120°C, 1 h	IFA em pó dentro de ampola de vidro, banho seco a 60°C, 21 dias		105°C, 5 h	Camada fina do IFA em pó dentro de frasco de vidro de fundo chato com tampa de vidro, para evitar perda de PDegs voláteis. Estufa de ar quente a 140°C, 12 h.	
	Degradação (%) SR detectada		NR 11 and 22, respectivamente 2 UN	3,0 4 UN	NI NI	NR 3 UN	0,7 3 UN	9,3 A, B, C, D, G, 9 UN	8,9 A, B, C, D, G, 9 UN
TU	Condição						25 °C, 120 h, 90% RH	Camada fina do IFA em pó dentro de placa de Petri sem tampa. Estufa de ar quente a 140°C, 12 h.	
	Degradação (%) SR detectada		NR NR	NR NR	NR NR	NR NR	NI 1 UN	27,9 A, C, D, G, 13 UN	12,5 A, C, D, G, 10 UN
FotoD	Condição				Camada fina do IFA dentro da câmara de fotostabilidade.	1 mg/mL em MeOH, UV, 24 h	Luz fluorescente branca, 1,2 milibates lx h, 200 W h por m <sup>2</sup> , 120 h, temperatura NI		
	Degradação (%) SR detectada		NR NR	NR NR	NI NI	NI none	1,5 1 UN	IFA: 5,9 GAL: 4,4 C, D, 10 UN	DP: 11,4 CAL: 5,0 C, D, 12 UN
RMT	Condição							1 mg/mL em diluente, CaSO <sub>4</sub> 0,01 M em água pH 3,0, 24 h, ta	
	Degradação (%) SR detectada		NR NR	NR NR	NR NR	NR NR	NR NR		As amostras não reagiram.

A, K: substâncias relacionadas do fosfato de oseltamivir, conforme Farmacopeia Europeia; ACN: acetonitrila; cps: cápsula; FotoD: fotodegradação; HA: hidrólise ácida; HB: hidrólise básica; KCl: Conselho Internacional de Harmonização de Requisitos Técnicos para Produtos Farmacêuticos para Uso Humano; MeOH: metanol; NaOAc: acetato de sódio; NI: não informado; NR: não realizado; OxAO: oxidação com água oxigenada; RMT: reação com metal de transição; PDegs: produtos de degradação; SR: substância relacionada; ta: temperatura ambiente; TS: degradação térmica a seco; TU: degradação térmica úmida; UR: unidade relativa; UN: PDegs não identificados; UV: luz ultravioleta.

A nomenclatura não oficial das substâncias relacionadas (SR) ao fosfato de oseltamivir difere entre as diversas farmacopeias, causando grande confusão na sua identificação e no estabelecimento de seu LME para IFA e DP. Devido a isso, todas as SRs relacionadas neste estudo foram nomeadas de acordo com a Farmacopeia Europeia (2018), enquanto os LMEs seguiram as recomendações da Farmacopeia Americana (2020).

O IFA pode ter diferentes impurezas de fabricação cuja formação dependerá da rota utilizada para sua

síntese, e existem várias. Neste estudo, utilizamos o IFA produzido pela via do ácido chiquímico, que pode apresentar subprodutos (impurezas) resultantes da etapa de redução com a tributílfosfina, como as SRs B e H, e da etapa hidrolítica, como as SRs A, J e K, formadas pela migração N, N-acil da SR C ou por hidrólise da SR G (LABORDA et al., 2016).

Quanto ao mecanismo de degradação do IFA, é sabido que a hidrólise catalisada por ácido ou base promove polarização dos grupos amida e éster, tornando-os mais

susceptíveis ao ataque nucleofílico pela água, formando a SR C como PDeg majoritário à temperatura ambiente. Íons metálicos de transição, como o  $\text{Cu}^{2+}$ , podem desempenhar um papel catalítico semelhante ao ácido e base. O grupo éter é estável à hidrólise (LI, 2012).

Este trabalho mostra o EDF do IFA fosfato de oseltamivir e seu DP, e o desenvolvimento e validação do MIE de acordo com as exigências da ANVISA. Além disso, identifica, por cromatografia líquida/espectrometria de massas (LC/MS-MS), as SRs D e G, que foram formadas acima do limite de identificação especificado pela ANVISA durante o estudo de estabilidade prolongada do DP.

## Materiais e Métodos Reagentes

O fosfato de oseltamivir lote BS09113010 (teor: 100,9%, correspondente à base livre de oseltamivir; 0,01% SR A; 0,02% SR C; 0,01% SR D; 0,02% SR E; 0,02% SR F; 0,07% SR G; 0,009% SR H; 0,03% SR L), marca Roche (RJ, Brasil), foi o IFA usado na fabricação

**Tabela 2.** Estado da arte dos métodos indicativos de estabilidade para o fosfato de oseltamivir insumo farmacêutico ativo (IFA) e cápsula (DP)

Referência/ Parâmetro	OLIVAI et al. (1998)	NARASIMHAN et al. (2008)	AMETI et al. (2012)	JUNWAL et al. (2012)	AL-BAGARY et al. (2014)	KUMAR et al. (2015)	REDDY et al. (2021)	EP, InfP, USP	Nosso método
Plataforma	LC-UV para IFA	LC-UV/DAD para IFA	LC-UV/DAD para DP	LC-UV/DAD para IFA	LC-UV/DAD para DP	LC-UV/DAD para DP	UPLC-UV/DAD para DP	LC-UV para IFA e DP	LC-UV/DAD para IFA e DP
Coluna cromatográfica	Prodigy ODS-2 C18 150 x 4,6 mm, 5 µm	Kromasil C18 250 x 4,6 mm, 5 µm, 100 Å	Parospher STAR C18 150 x 4,6 mm, 5 µm; coluna guardada LC/Chrompher C18 4 x 4 mm, 5 µm	Puruiat C8 250 x 4,6 mm, 5 µm	Nucleosil C18 250 x 4,6 mm, 5 µm	YMC Pro C8 150 x 4,6 mm, 5 µm	BEH C18 100 x 2,1 mm, 1,7 µm	Symmetry C8 250 x 4,6 mm, 5 µm, 100 Å, 12% C	ACE C8 150 x 4,6 mm, 5 µm, 100 Å, 9% C
Fase móvel	A: NaOAc 0,05 M em H <sub>2</sub> O/ACN 92:5:7:5 B: NaOAc 0,05 M em H <sub>2</sub> O/ACN 40:60	A: trietilamina 0,2% pH 3 B: ACN	Trietilamina 0,02 M em tampão fosfato 0,02 M pH 5/MeOH 1:1 v/v	A: KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,01 M pH 4 B: ACN	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 7/ACN/MeOH 50:25:25 v/v/v Concentração do tampão NI	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,02 M pH 3,2/MeOH/ACN 60:20:20 v/v/v	A: o-H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,1% B: ACN	MeOH/ACN/ KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,05 M pH 6/ 245:135:620 v/v/v	A: KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,01 M pH 6 B: MeOH C: ACN
Modo de eluição (Tempo em min, A:B% ou A:B:C% v/v/v)	0, 100 A 15, 100 B 20, 100 A	0-5, 80:20 8, 60:40 12, 30:70 18, 80:20 22, 80:20	Isoacrítico: 10 min	0-5, 97:3 19-20, 78:22 21-22, 75:25 36, 68:32 39-47, 97:3	Isoacrítico: 6 min	Isoacrítico: 15 min	0, 100 A 6, 100 B 8, 100 A 10, 100 A	Isoacrítico: cerca de 34 min	0-4, 90:5-5 4-5, 60:20-20 15, 60:20-20 15-5, 90:5-5 20, 90:5-5
Fluxo (mL/min)	1,5	1,0	1,5	1,0	1,0	1,5	0,3	1,2	1,5
Temperatura da coluna (°C)	ta	ta	25	NI	ta	45	30	50	Coluna: 45 Amostra: ta
Comprimento de onda (nm)	220	215	215	215	210	207	210	207	207
Volume de injeção (µL)	100	20	20	4	20	20	1	15	Teor: 10 MIE: 30
Estabilidade das soluções	NI	IFA: 24 h, 25°C	NI	NI	NI	IFA: 48 h, 25°C	SRs C e D: 72 h, ta	NI	DP em diluente: 90 h IFA em diluente: 72 h SR C na matriz em diluente: 72 h ta na matriz em diluente: 72 h
Diluentes	NI	H <sub>2</sub> O/ACN 7:3 v/v	H <sub>2</sub> O/MeOH 1:1 v/v	H <sub>2</sub> O/ACN 1:1 v/v	MeOH	MeOH/ACN/ H <sub>2</sub> O 20:20:60 v/v/v	H <sub>2</sub> O/MeOH 1:1 v/v	MeOH/ACN/ H <sub>2</sub> O/MeOH 1:1 v/v/v	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,01 M pH 6 Solução de lavagem do injetor: 1,5 mL 80% MeOH em água
Seletividade pelo EDF	Não	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	NI	Sim
LDLQ (µg/mL)	NI	0,05 / 0,3	0,02 / 0,05	NI	0,05 / 0,2	NI	SR C: 0,10,3 SR D: 0,04,0,1	Limite de descondensação: 0,05% para todas as impurezas	Teor: 11,433,9 SR C: 0,20,6 Quilques SR: 0,05,0,14 Limite de descondensação: 0,04% para todas as impurezas
Concentração de trabalho do IFA/DP (mg/mL), Modo de preparação amostra	2,5	1	0,3 Banho de ultrassom por 15 min; filtrada em filtro de seringa de nylon 0,45 µm	1	1 Banho de ultrassom por 5 min	0,15 Banho de ultrassom por 40 min	1 Banho de ultrassom por 20 min; centrífuga 0,45 min (material da membrana NI)	1 Banho de ultrassom por 20 min; centrífuga antes da injeção	0,5 Banho de ultrassom até completa dissolução (10-20 min); filtrada em filtro de seringa PTFE 0,2 µm
Linearidade/faixa de trabalho (% da concentração de trabalho)	NI	7-13 Curva a partir de 1 solução estoque	7,5-75 Curva a partir de 1 solução estoque	NI	0,1-25 Curva a partir de 1 solução estoque	50-150 Curva a partir de 1 solução estoque	0,01-0,3 Curva a partir de 1 solução estoque	NI	Teor: 80,120 SR C: 0,1-2,4 Quilques SR: 0,1-0,24 Curva a partir de 3 soluções estoque
Robustez	NI	Fluxo ± 0,1 Comprimento de onda ± 5 pH do tampão ± 0,2 Fase móvel orgânica ± 2% Temp. coluna ± 3	Fluxo ± 0,1 Comprimento de onda ± 5 pH do tampão ± 0,2 Fase móvel orgânica ± 2% Temp. coluna ± 3	NI	pH do tampão ± 0,5 Outra marca de coluna C18 Lichrosorb 250 x 4,6 mm, 10 µm IFA/ SR: 2,6	Fluxo ± 0,1 Comprimento de onda ± 5 pH do tampão ± 0,2 Fase móvel orgânica ± 2% Temp. coluna ± 5	Fluxo ± 0,05 Temp. coluna ± 5	NI	Fluxo ± 0,1 Temp. coluna ± 2 Tempo de extração (10-20 min) Influência da filtração
Adequabilidade do sistema	NI	NI	NI	NI	Prato teórico NMQ 1986; 4000; assimetria do IFA: 1,7; Resolução entre IFA/ SR: 2,6	Prato teórico NMQ 4000; assimetria do IFA: 1,3-1,6; Resolução entre SR C/IFA: 5,3	Assimetria do IFA: 1,2-1,6; Resolução entre SR C/IFA: 5,3	Assimetria ≤ 2 Resolução entre SR AC ≥ 1,5	Resolução entre SR AC: 11,5; Prato teórico NMQ 5200; assimetria do IFA ≤ 1,5; Pureza de pico do IFA NMQ 0,99

ACN: acetonitrila; DPR: desvio padrão relativo; EDF: seletividade do método provada com o Estado de Degradação Forçada; EP: Farmacopeia Europeia; InfP: Farmacopeia Internacional; LC-UV/DAD: cromatografia líquida acoplada a detector ultravioleta com dispositivo diodo; LD: limite de detecção; Limite de descondensação: LQ experimental (%); LQ: limite de quantificação; MeOH: metanol; MIE: método indicativo de estabilidade; NI: não informado; NMQ: não menos que; RC: membrana de celulose regenerada; SR: substância relacionada de acordo com a EP; ta: temperatura ambiente; UPLC: cromatografia líquida de ultra desempenho; USP: Farmacopeia Americana.

do DP e no EDF. Farman-guinhos-FIOCRUZ (RJ, Brasil) fabricou cápsulas de 30 mg, lote 17090364, e o respectivo placebo, lote 1709PL133, para a validação do método e o estudo de estabilidade acelerada (40°C, 75% umidade relativa (UR), 6 meses); e cápsulas de 75 mg, lote 16040090, e respectivo placebo, lote 1605PLO58, para o EDF e estudo de estabilidade prolongado (30°C, 75% UR, 18 meses). O fosfato de oseltamivir padrão (OP, 99,7%) usado para preparar a solução de

adequabilidade durante o EDF, e as SRs A e B (pureza não informada), C (93,1%, como o sal hemi tratrato  $\text{C}_{14}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_4 \cdot 0,5 \text{ C}_4\text{H}_6\text{O}_6$ , 359,4 g/mol), D (99%) e G (98%) foram fabricadas pela Farmacopeia Europeia. OP (99,6%, lote R00490, USP) foi usado para as curvas de calibração no solvente. ACN e MeOH grau HPLC,  $\text{CuSO}_4$  (≥ 98%),  $\text{H}_2\text{O}_2$  (30%), e  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (≥ 99%) foram fabricados pela Merck (Darmstadt, Alemanha); NaOH (97%) e EDTA (EDTA; 99,4-100,6%) foram fabricados pela Vetec (RJ, Brasil).



### Testes de estresse

IFA, DP (cápsulas de 75 mg) e respectivo placebo – composto por amido pregelatinizado, (Ingredion; EUA), talco (Magnesita; MG, Brasil), povidona K30 (Huangshan; China), croscarmellose de sódio (Blanver; SP, Brasil) e estearil fumarato de sódio (JRS Pharma; SP, Brasil) – foram submetidos ao EDF (condições das reações na Tabela 1) de acordo com as recomendações da ANVISA (Guia 4/2015; RDC 53/2015). Durante a fotodegradação, o sistema químico actinométrico validado com o mono hidrocloreto de quinino diidratado a 2% garantiu a exposição luminosa, visto que a diferença de absorção foi  $\geq 0,5$  AU. As amostras da hidrólise ácida e básica foram neutralizadas com soluções de NaOH 0,01 M e HCl 0,1 M, respectivamente. EDTA 0,1 M foi usado para parar a reação com  $\text{CuSO}_4$ . Após o término das reações, as amostras foram diluídas em  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,01 M pH 6 para cerca de 0,5 mg/mL (equivalente a base livre de oseltamivir) e injetadas em duplicata, com exceção do branco (diluyente), do controle (meio reacional) e das amostras provenientes da degradação com peróxido

de hidrogênio, que foram injetadas somente uma vez e imediatamente após o término do tempo estipulado, pois a reação não foi neutralizada. O cromatograma de cada amostra degradada (IFA, DP e placebo) foi comparado com os cromatogramas do branco, das amostras não degradadas e do controle. Somente os picos que apareceram nas amostras degradadas, e/ou apareceram em maior proporção do que nas amostras não degradadas, foram considerados PDegs. As amostras foram analisadas pelo MIE descrito na Tabela 2 (coluna “nosso método”), determinando-se a pureza de pico do IFA e dos PDegs com o dispositivo diodo. A solução para checar a adequabilidade do sistema e identificar os PDegs formados durante o EDF foi preparada na concentração final de 500  $\mu\text{g/mL}$  de OP e 1  $\mu\text{g/mL}$  de cada SR (A, B, C (equivalente a base livre da SR C), D e G) em diluyente, correspondendo a 100 e 0,2% da concentração de trabalho.

### Equipamento

O sistema HPLC 20AT (Shimadzu) acoplado ao detector UV com dispositivo diodo (SPD-M20A) e

ao controlador CBM-20A (Lite) foi usado durante o EDF, o desenvolvimento e validação do MIE.

Todos os equipamentos, instrumentos e micropipetas foram qualificados e/ou calibrados.

### Validação do MIE

As soluções usadas nas curvas de calibração com solvente e com adição de padrão à matriz (placebo) foram obtidas a partir da diluição de três soluções estoque preparadas independentemente e injetadas em triplicata. Maiores detalhes são descritos na Tabela 2, na coluna “nosso método”.

O fator resposta relativo da SR C foi calculado como a razão entre os coeficientes angulares (inclinação) obtidos nas curvas de calibração com a SR C e OP usando soluções na faixa de 0,1 a 2,4% (7 pontos) da concentração de trabalho.

As análises estatísticas foram realizadas conforme as exigências da ANVISA (Guia 10/2017; RDC 166/2017) usando a tabela construída por BAZÍLIO et al. (2012). O LME para

SR C (2%), impureza individual desconhecida (0,2%), impurezas totais desconhecidas (0,5%) e impurezas totais (3%) no DP foram determinados baseando-se na Farmacopeia Americana (2020).

### **Método LC/MS-MS**

Para identificar as SRs detectadas acima do limite de identificação especificado pela ANVISA em amostras do estudo de estabilidade, o MIE foi adaptado para LC/MS. Usamos o sistema Ultra-Fast LC (Shimadzu) acoplado ao espectrômetro de massas de alta resolução QTOF Compact (Bruker), contendo uma coluna BEH C8 100 x 2,1 mm, 1,7 µm, 130 Å, 13% de carbono (Waters, USA). Os solventes acetato de amônia 10 mM pH 6, metanol e acetonitrila foram usados como fases móvel A, B e C, respectivamente, em uma eluição no modo gradiente (tempo em min, % de A:B:C v/v/v): 0 a 1, 86:7:7; 1,1 a 5, 70:15:15; 5,1 a 9, 66:17:17; 9,1 a 12, 62:19:19; 12,1 a 16, 86:7:7, com fluxo de 0,3 mL/min, temperatura da coluna 50°C e volume de injeção de 10 µL. Os espectros de massa foram adquiridos no modo *electrospray* positivo. As soluções estoque de DP, SRs D e G foram preparadas na

concentração de 100 µg/mL em metanol, e diluídas para 1 µg/mL em H<sub>2</sub>O/metanol 7:3 v/v. As amostras foram passadas em filtros de seringa de PTFE 0,22 µm antes de serem injetadas.

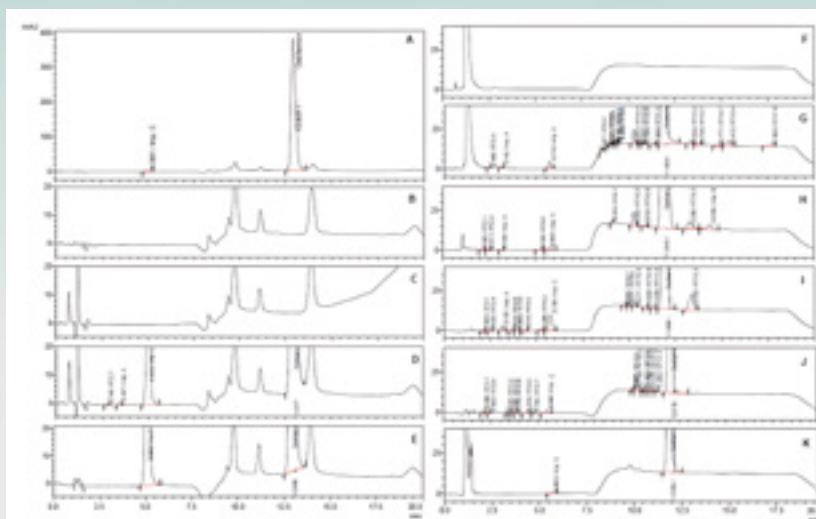
### **Resultados e Discussão** **Desenvolvimento do MIE**

Primeiramente, analisamos a solução de adequabilidade usando o método de Kumar et al. (2015), porém a resolução entre as SRs A e C (0,73) ficou abaixo da faixa recomendada pelas farmacopeias ( $\geq 1,5$ ), e o tempo de retenção do OP ocorreu dentro dos 3 primeiros minutos da análise, o que poderia causar sobreposição dos picos de qualquer PDeg que viesse a ser formado. Para resolver este problema, mudamos o pH e a concentração do tampão, e criamos uma eluição em gradiente, o que elevou o tempo de retenção do OP para cerca de 12 minutos, deixando mais espaço para a ocorrência de outros PDegs. Para melhorar a detecção dos PDegs, o volume de injeção para o MIE foi de 30 µL, enquanto no método de teor foi de 10 µL. A solução aquosa de metanol a 80% foi empregada

na lavagem do injetor para evitar carreamento do IFA entre as análises. Depois de várias injeções da amostra de DP, os picos do IFA e SRs apareceram duplicados no cromatograma. Uma das hipóteses cogitadas para explicar o ocorrido foi que o estearil fumarato de sódio – um componente graxo do placebo – estava obstruindo os poros da fase estacionária, alterando, portanto, sua interação com as substâncias analisadas, o que produziu deformação nos picos detectados. A opção dada pelas farmacopeias era centrifugar a amostra, mas a filtração através de filtro de seringa PTFE com tamanho de poro 0,22 µm se mostrou mais prática. O comprimento de onda (207 nm) usado para monitorar as análises foi definido com base nas absorções máximas dos solventes da fase móvel (240/205 nm para metanol; 200/190 nm para acetonitrila), OP (195 nm), SRs A (194 nm), B (195 nm) e C (200 nm). Finalmente, o tempo de retenção relativo das SRs foi determinado e as amostras degradadas foram analisadas pelo MIE otimizado (Tabela 2).

## Perfil da degradação forçada

Após submetemos o IFA, DP (cápsula de 75 mg) e respectivo placebo aos testes de estresse, observamos que o IFA e DP foram mais susceptíveis à hidrólise alcalina, apresentando cerca de 23% de degradação e somente a SR C como PDeg (Tabela 1, coluna “nossos dados”; Figura 1). Porém, o maior número de PDegs (18 no total) foi obtido na reação com peróxido de hidrogênio. A SR C, além de ser o principal metabólito em humanos, também foi detectada em todas as reações de degradação, seguida da SR A. Ao contrário do que se esperava, IFA e DP não sofreram degradação na presença de íons cúpricos nas condições testadas. Na fotodegradação, quando os percentuais de degradação do IFA (5,9%) e do controle de ausência de luz (4,4%) foram comparados, notamos que o principal agente de degradação foi a temperatura e não a luz. O placebo não sofreu degradação em nenhuma das condições testadas.



**Figura 1:** Cromatogramas do estudo de degradação forçada do IFA (a-e) e do produto (f-k): (a) IFA não degradado; (b): diluente ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,01 M pH 6); (c): meio reacional da hidrólise ácida; (d): hidrólise ácida; (e): hidrólise alcalina; (f): meio reacional com peróxido de hidrogênio; (g): reação com peróxido de hidrogênio; (h): degradação térmica a seco; (i): degradação térmica úmida; (j): fotodegradação; (k): reação com sulfato cúprico.

Nem todas as reações apresentaram balanço de massas, talvez devido à formação de PDegs voláteis ou que carecem de grupos cromóforos. Exemplo disso foi a degradação térmica úmida, que apresentou o menor índice de recuperação do IFA (81,2%) durante o EDF, pois foi realizada em placas de Petri sem tampa no interior de uma estufa saturada com vapor de água.

A SR D observada em algumas das reações (Tabela 1) pode ter sido formada por meio da oxidação do grupo éter, passando por um intermediário enona e aromatização do ciclo hexeno (GILISSEN et al., 2017).

## Validação do MIE (SR C e impurezas desconhecidas) e do método de teor do IFA

Para a validação dos métodos, consideramos os parâmetros exigidos pela ANVISA: linearidade, faixa de trabalho, seletividade/especificidade, precisão, exatidão, limite de quantificação (LQ), limite de detecção e robustez.

### Adequabilidade do sistema

Duas soluções de OP, correspondendo a 100 e 0,2% da concentração de trabalho, foram preparadas independentemente em diluente e usadas para avaliar o desempenho do sistema em geral e da



metodologia. O sistema foi considerado adequado mediante os valores de resolução, assimetria e pratos teóricos citados na Tabela 2, e dos valores de precisão (repetibilidade) e exatidão (recuperação) conforme recomendações da AOAC (2016), em função da concentração do analito.

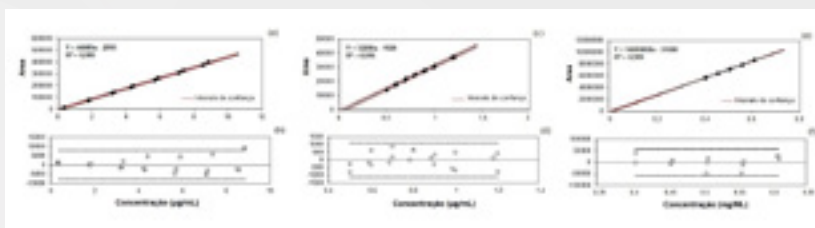
### Linearidade e faixa de trabalho

As curvas de calibração foram construídas plotando-se a área do pico versus a concentração do analito, e os dados foram analisados pela regressão linear dos mínimos quadrados, visto que os dados apresentaram distribuição normal (Teste Ryan-Joiner; Tabela 3). As curvas de calibração da SR C e OP em solvente apresentaram um bom ajuste ao modelo de regressão linear, visto que a regressão foi significativa ( $p < 0.001$ ), os coeficientes de determinação ( $R^2$ ) e correlação ( $r$ ) foram maiores que 0,99 e não houve desvio na linearidade. Além disso, a linearidade

**Tabela 3.** Análises estatísticas do método de teor e MIEs para fosfato de oseltamivir cápsulas

Teste estatístico	Estatística analisada e critérios de aceitação	Teor	MIE para SR C	MIE para qualquer impureza <sup>a</sup>
Normalidade dos resíduos (Teste Ryan-Joiner)	Req > Rcrit ( $\alpha = 0,05$ ), dados apresentam distribuição normal	Req = 0,97 Rcrit = 0,94	Req = 0,97 Rcrit = 0,95	Req = 0,99 Rcrit = 0,95
Autocorrelação dos resíduos (Teste Durbin-Watson)	$d > dU$ ( $\alpha = 0,05$ ), não há correlação	$d = 1,79$ $dU = 1,36$	$d = 2,32$ $dU = 1,42$	$d = 1,85$ $dU = 1,41$
Homoscedasticidade (Teste Brown-Forsythe)	$p > 0,05$ t calc < t tab ( $\alpha = 0,05$ ), existe homoscedasticidade	$p = 0,93$ t calc = 0,09 t tab = 2,16	$p = 0,10$ t calc = -1,73 t tab = 2,09	$p = 0,94$ t calc = 0,07 t tab = 2,10
Desvio da linearidade (ANOVA)	$p < 0,001$ regressão significativa $p > 0,05$ não há desvio da linearidade	$p = 9,98E-21$ $p = 0,07$	$p = 1,39E-30$ $p = 0,06$	$p = 3,92E-22$ $p = 0,06$
Regressão linear	Coefficiente de correlação de Pearson ( $r \geq 0,990$ ); Coefficiente de determinação ( $R^2 \geq 0,980$ )	$r = 0,999$ $R^2 = 0,999$	$r = 0,999$ $R^2 = 0,999$	$r = 0,997$ $R^2 = 0,995$
Equação da reta ( $y = bx + a$ )		$Y = 14200000x - 91000$	$Y = 44400x - 2810$	$Y = 32200x - 1520$

<sup>a</sup>Curva realizada para quantificar qualquer impureza em relação ao fosfato de oseltamivir; equação da reta: a: coeficiente linear (intercepto); b: coeficiente angular (inclinação); y = absorção; x = concentração do analito; d: valor calculado de d; dU: limite superior de d; Rcrit: valor crítico de R; Req: valor calculado de R; t calc: valor calculado de t; t tab: valor tabelado de t.



**Figura 2:** Curvas de calibração e gráficos dos resíduos do método indicativo de estabilidade da SR C (a, b) e impurezas desconhecidas (c, d), e do método de determinação do teor em fosfato de oseltamivir cápsulas (e, f).

foi avaliada de acordo com a homogeneidade da variância dos erros entre os diferentes níveis de concentração por meio da inspeção visual do gráfico de resíduos (Figura 2), o qual mostrou uma distribuição dos resíduos ao longo do zero com pequena dispersão, e usando o teste de Brown-Forsythe, ao nível de significância de 5% ( $\alpha = 0,05$ ), que confirmou a tendência de homoscedasticidade observada.

### Seletividade e especificidade

Durante o EDF, a pureza de pico do IFA e das SRs apresentou valores iguais ou maiores do que o valor mínimo especificado pela ANVISA (0,99; RDC 166/2017), provando a habilidade do método em resolver bem todos os componentes das amostras. Além disso, os cromatogramas do diluente e do placebo não apresentaram picos sobrepostos no tempo de retenção do oseltamivir.



*Limite de quantificação (LQ), limite de detecção (LD) e fator resposta relativo (FRR)*

Os valores teóricos do LD e LQ foram calculados em função dos valores de interseção e inclinação das respectivas curvas de calibração e declarados como 0,04% e 0,12% para SR C, respectivamente; e 0,01% e 0,03% para impurezas desconhecidas, respectivamente. Soluções diluídas de OP foram preparadas e injetadas para a obtenção dos valores empíricos. O LQ foi determinado como 0,2 µg/mL (0,04%), apresentando DPR de 4% e exatidão (recuperação) de 95,4%, os quais se acharam dentro dos limites recomendados pela AOAC (2016), conforme concentração do analito ( $\leq 5,3\%$  e 90-107%, respectivamente).

A razão entre os coeficientes angulares da curva para a SR C ( $b = 44400$ ) e OP ( $b = 30700$ ), resultaram num FRR de 1,45 para a SR C, que foi similar ao da Farmacopeia Americana (USP, 2020). Para

qualquer outra impureza, o FRR foi considerado 1, exceto para a SR D, que deveria ter o mesmo valor indicado pela USP (2,7), visto que ela apresenta uma absorvidade ( $\lambda_{\max}$  305 nm) maior que a do oseltamivir e de todas as outras SRs, o que poderia levar a uma concentração superestimada no comprimento de onda usado para monitorar as análises.

Apesar de obtermos valores diferentes de LQ para a SR C e OP, o que prevalece na prática é o LQ empírico (limite de desconsideração = 0,04%) determinado em função da base livre de oseltamivir, visto que todas as impurezas serão quantificadas em relação ao pico do IFA e serão desconsideradas caso estejam abaixo desse limite.

*Precisão (repetibilidade e reprodutibilidade), exatidão e efeito matriz*

A comparação entre as áreas obtidas para a SR C e OP (Tabela 4) nas curvas em solvente e na matriz (placebo)

apresentaram valores t menores do que os valores tabulados (2,8), indicando que a diferença entre os resultados não foi significativa, logo a matriz não influencia a resposta dos analitos. Os métodos apresentaram coeficiente de variação (CV, precisão) e recuperação (exatidão) conforme valores recomendados pela AOAC (2016) em função da concentração do analito.

*Robustez*

A filtração das amostras em filtro de seringa com membrana PTFE (0,22 µm) não alterou a resposta dos analitos em comparação com as amostras não filtradas, porém, o uso de filtros com membrana de celulose regenerada (0,45 µm) reduziu a recuperação.

O IFA foi estável por 72 h em diluente (CV 1,64%; t calculado 1,76 < t tabelado 2,77) e 96 h em solução do placebo a 60% em diluente (CV 1,17%; t calc 1,08 < t tab 4.3), à temperatura ambiente e ao abrigo

da luz. A SR C foi estável por 48 h em diluente (CV 1,24%;  $t_{calc}$  1,92 <  $t_{tab}$  2,77) e 72 h em solução do placebo a 60% em diluente (CV 2,22%;  $t_{calc}$  2,80 <  $t_{tab}$  4,3) sob as mesmas condições do IFA.

O tempo de extração do oseltamivir estipulado pelas farmacopeias é de 20 minutos (Tabela 2), porém, a extração em 10 minutos mostrou a mesma eficiência (CV 1,13%; teor do IFA 99,56%;  $t_{calc}$  0,22 <  $t_{tab}$  2,77).

Pequenas mudanças no fluxo ( $\pm$  0,1 mL/min) e na temperatura da coluna ( $\pm$  2 °C) não afetaram a resposta do oseltamivir, mas reduziram significativamente a recuperação da SR C, exceto pelo fluxo de 1,4 mL/min ( $n=4$ ; CV 2,21%; recuperação 100,6%;  $t_{calc}$  1,69 <  $t_{tab}$  4,3).

#### Desafio do MIE validado

Amostras provenientes do estudo de estabilidade acelerada e de longa duração foram analisadas com o MIE

**Tabela 4.** Resultados de precisão, exatidão e efeito matriz do método indicativo de estabilidade e do método para determinação de teor para o fosfato de oseltamivir cápsulas

Nível de concentração (%) (n = 3)	OP em diluente <sup>a</sup> (Analista A)		OP em matriz <sup>b</sup> (Analista A)		Agrupados (n = 6)		
	CV (%)	Exatidão (%)	CV (%)	Exatidão (%)	CV (%)	Exatidão (%)	$t_{calc}$ ( $\alpha = 0,05$ )
0,16	1,37	101,59 ± 1,58	2,24	96,67 ± 2,33	3,14	99,13 ± 2,49	2,75
0,20	2,00	99,21 ± 2,25	1,15	97,48 ± 1,23	1,75	98,34 ± 1,38	1,26
0,24	1,65	99,82 ± 1,87	0,67	96,98 ± 0,68	1,94	98,40 ± 0,48	2,30
Nível de concentração (%) (n = 3)	SR C em diluente <sup>c</sup> (Analista A)		SR C em matriz <sup>d</sup> (Analista A)		Agrupados (n = 6)		
	CV (%)	Exatidão (%)	CV (%)	Exatidão (%)	CV (%)	Exatidão (%)	$t_{calc}$ ( $\alpha = 0,05$ )
1,6	1,88	99,68 ± 2,13	0,59	98,54 ± 0,66	1,41	99,11 ± 1,11	0,93
2,0	1,82	99,76 ± 2,06	0,24	99,55 ± 0,27	1,17	99,65 ± 0,93	0,19
2,4	1,75	100,43 ± 1,98	0,38	98,62 ± 0,43	1,51	99,53 ± 0,30	1,49
Nível de concentração (%) (n = 3)	OP em diluente <sup>e</sup> (Analista A)		OP em matriz <sup>b</sup> (Analista A)		Agrupados (n = 6)		
	CV (%)	Exatidão (%)	CV (%)	Exatidão (%)	CV (%)	Exatidão (%)	$t_{calc}$ ( $\alpha = 0,05$ )
80	0,92	100,52 ± 1,05	0,34	99,40 ± 0,38	0,87	99,60 ± 0,70	1,71
100	0,47	99,80 ± 0,53	0,80	99,07 ± 0,90	0,71	99,44 ± 0,56	1,32
120	0,08	100,39 ± 0,09	0,22	98,19 ± 0,25	1,22	99,29 ± 0,17	2,23
Nível de concentração (%) (n = 6)	Analista A <sup>f</sup>		Analista B <sup>f</sup>		Agrupados (n = 12)		
	CV (%)	Teor (%)	CV (%)	Teor (%)	CV (%)	Teor (%)	$t_{calc}$ ( $\alpha = 0,05$ )
100	1,14	95,88	0,44	95,30	0,89	95,58	1,23

<sup>a</sup>Precisão intra-dia (coeficiente de variação: CV) e exatidão obtidas usando soluções de fosfato de oseltamivir (OP) ou SR C; <sup>b</sup>Determinação do efeito matriz usando soluções de placebo a 60% adicionadas de OP ou SR C; <sup>c</sup>Precisão intra-dia (CV) e exatidão obtidas pelo método de determinação de teor usando soluções de OP; <sup>d</sup>Precisão inter-dia (CV) e teor do IFA obtidos pelo método de teor usando 6 soluções do produto (cápsulas 30 mg) em diluente, a 100% da concentração de trabalho e preparadas independentemente. Os resultados foram dados como a média das injeções em triplicata  $\pm$  desvio padrão.

validado e revelaram um total de 7 PDeqs. Dois deles, nos tempos de retenção (TR) de 13,3 e 10,3 minutos, ocorreram acima do limite de identificação especificado pela ANVISA (0,2%). Nesses casos, deve-se usar um segundo método que empregue técnica diferente do MIE, para se identificar as impurezas (RDC 166/2017). Os PDeqs foram identificados por LC/MS-MS como as SRs G e D, respectivamente, baseando-se nos TR, na relação massa/carga e nos padrões de

fragmentação exibidos nos espectros de massas dos PDeqs em comparação com os padrões de referência. A SR D apresentou íon pseudomolecular  $[M+H]^+$  em  $m/z$  224 e uma transição de íon produto em  $m/z$  224 $\rightarrow$ 182, sendo esses dados inéditos na literatura. A SR G apresentou o íon pseudomolecular  $[M+H]^+$  em  $m/z$  313 e transições de íon produto em  $m/z$  313 $\rightarrow$ 225, 225 $\rightarrow$ 208 e 208 $\rightarrow$ 166, conforme dados da literatura (JUNWAL et al., 2012).

## Conclusões

Ao realizarmos o EDF do IFA, DP e placebo conforme recomendações da ANVISA, conseguimos preencher algumas lacunas detectadas no levantamento bibliográfico. Constatamos que a formulação não interage quimicamente com o IFA, ao contrário, promove uma certa proteção conjunta contra a umidade e calor, como pode ser observado no percentual de degradação obtido para o IFA e DP. O blíster cristal de PVC/PE/PVDC foi escolhido como embalagem primária, por conferir maior proteção contra a umidade (RODRIGUES e FERRAZ, 2007), a qual pode causar hidrólise e oxidação do IFA. O MIE validado apresentou um tempo de análise menor, com uma concentração menor de tampão, e filtração da amostra em vez de centrifugação, reduzindo o tempo de preparo da amostra e aumentando a vida da coluna cromatográfica, o que reduziu os custos da produção em geral.

Todas as impurezas detectadas no estudo de estabilidade também ocorreram durante a

degradação forçada térmica e com peróxido de hidrogênio, validando o EDF como meio para obter-se um MIE robusto, capaz de detectar e quantificar os PDegs com maior probabilidade de serem formados.

O MIE e o método para teor foram aprovados pela ANVISA, assim como o subsequente registro e comercialização do fosfato de oseltamivir cápsulas de 30 mg, suprimindo a demanda do mercado para formulações pediátricas do medicamento.

## Agradecimentos

Os autores agradecem a Farmanguinhos, pelo apoio na pesquisa e implementação dos métodos; a Diego Coutinho de Freitas pela ajuda na confecção do resumo gráfico; a Wilson Camargo por suas contribuições para o entendimento dos mecanismos de degradação.

## Referências

AL-BAGARY, R. I.; EL-ZAHER, A. A.; MORSY, F. A.; FOUAD, M. M. Kinetic study of the alkaline degradation of oseltamivir phosphate and valacyclovir hydrochloride using validated stability indicating HPLC. *Analytical Chemical Insights*, v. 9, p. 41–48, 2014.

AMETI, A.; SLAVKOVSKA, J.; STARKOSKA, K.; ARSOVA-SARAFINOVSKA, Z. A simple isocratic RP-HPLC method for quality control of oseltamivir capsules. *Macedonian Journal of Chemistry and Chemical Engineering*, v. 31, n. 2, p. 205–215, 2012.

AOAC, 2016. Association of Official Analytical Chemists. *Official Methods of Analysis*. Appendix F: Guidelines for standard method performance requirements. Disponível em: [http://www.eoma.aoc.org/app\\_f.pdf](http://www.eoma.aoc.org/app_f.pdf) [Acesso em abril 2023].

BAZÍLIO, F. S.; BOMFIM, M. V. J.; ALMEIDA, R. J.; ABRANTES, S. M. P. Uso de planilha eletrônica na verificação da adequação de curva analítica ao modelo linear. *Revista Analytica*, v. 59, p. 60–67, 2012.

GILISSEN, P. J.; BLANCO-ANIA, D.; RUTJES, F. P. J. T. Oxidation of secondary methyl ethers to ketones. *The Journal of Organic Chemistry*, v. 82, pp 6671–6679, 2017.

Guia 4/2015. ANVISA. Guia para a obtenção do perfil de degradação, identificação e qualificação dos produtos de degradação em medicamentos.

Guia 10 /2017. ANVISA. Guia para tratamento estatístico da validação analítica.

JUNWAL, M.; SAHU, A.; HANDA, T.; SHAH, R. P.; SINGH, S. ICH guidance in practice: Degradation behaviour of oseltamivir phosphate under stress conditions. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 62, p. 48–60, 2012.

KUMAR, N. M.; ABBULU, K.; NARAYANA, B. V. Development and validation of stability indicating RP-HPLC method for the determination of oseltamivir phosphate in oseltamivir phosphate capsules. *International Journal of Research in Chemistry and Environment*, v. 5, n. 1, p. 44–53, 2015.

KUMAR, S.; GOICOECHEA, S.; KUMAR, S.; PEARCE, C. M.; DURVASULA, R.; KEMPAIAH, P.; RATHI, B.; POONAM. Oseltamivir analogs with potent anti-influenza virus activity. *Drug Discovery Today*, v. 25, n. 8, p. 1389–1402, 2020.

LABORDA, P.; WANG, S-Y.; VOGLMEIR, J. Influenza neuraminidase inhibitors: Synthetic approaches, derivatives and biological activity. *Molecules*, v. 21, n. 11, p. 1513, 2016.

LI, M. *Organic Chemistry of Drug Degradation*. RSC Publishing, Cambridge, 2012.

LISBOA, V. Agência Brasil, 2021. Disponível em: <https://agenciabrasil.ebc.com.br/saude/noticia/2021-12/gripe-se-espalha-durante-primavera-e-surpreende-pesquisadores> [Acesso em abril 2023].

NARASIMHAN, B.; ABIDA, B. K.; SRINIVAS, K. Stability indicating RP-HPLC method development and validation for oseltamivir API. *Chemical Pharmaceutical Bulletin*, v. 56, n. 4, p. 413–417, 2008.

OLIYAI, R.; YUAN, L-C.; DHAL, T. C.; SWAMINATHAN, S.; WANG, K-Y.; LEE, W. A. Biexponential decomposition of a neuraminidase inhibitor prodrug (GS-4104) in aqueous solution. *Pharmaceutical Research*, v. 15, n. 8, p. 1300–1304, 1998.

RDC no 53 de 8 de dezembro de 2015. Estabelece parâmetros para a notificação, identificação e qualificação de produtos de degradação em medicamentos com substâncias ativas sintéticas e semissintéticas, classificados como novos, genéricos e similares, e dá outras providências. *Diário Oficial da União (DOU)*, Brasília, no 234, de 08/12/2015.

RDC no166, de 24 de julho de 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. *Diário Oficial da União (DOU)*, Brasília, no 141, p. 87, de 25/07/2017.

REDDY, G. C.; SHYAMALA, P.; KRISHNA, R. M.; NARAYANARAO, K. M. V.; BABU, D. Characterization of oseltamivir phosphate API and simultaneous quantification and validation of its impurities by UPLC. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, v. 14, n. 4, p. 161–169, 2021.

RODRIGUES, L. N. C.; FERRAZ, H. G. Embalagem farmacêutica tipo blíster: escolha de um filme adequado para fármacos sensíveis à umidade. *Revista Analytica*, v. 28, p. 80–86, 2007.

The European Pharmacopoeia 10th ed. The Council of Europe/European Directorate for the Quality of Medicines and Healthcare (EDQM), United Kingdom, 2018.

The International Pharmacopoeia 10th ed. The World Health Organization Department of Essential Medicines and Health products with the help of Human Info NGO/WIT, New Zealand, 2020.

US Pharmacopoeia National Formulary: USP 43-NF 38. The United States Pharmacopoeial Convention, Rockville, 2020.