

**CENTRO FEDERAL DE EDUCAÇÃO TECNOLÓGICA DE MINAS GERAIS
(CEFET-MG)**

Sthéfanie Aline Silva Santos

**PROPOSTA DE ESTUDO DE DEGRADAÇÃO FORÇADA A PARTIR DA
AVALIAÇÃO DO PERFIL DE DEGRADAÇÃO E PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO
PARA EPINEFRINA**

Belo Horizonte (MG)

2021

Sthéfanie Aline Silva Santos

**PROPOSTA DE ESTUDO DE DEGRADAÇÃO FORÇADA A PARTIR DA
AVALIAÇÃO DO PERFIL DE DEGRADAÇÃO E PRODUTOS DE
DEGRADAÇÃO PARA EPINEFRINA**

**Trabalho de conclusão de curso
apresentado como requisito parcial
para a obtenção do título de Bacharel
em Química Tecnológica.**

Orientador: Prof. Dr. Ildefonso Binatti.

Co-orientadora: Isabela Borges Freitas.

CEFET-MG

Belo Horizonte (MG)

2021

Sthéfanie Aline Silva Santos

**PROPOSTA DE CONDIÇÕES DE DEGRADAÇÃO FORÇADA A PARTIR DA
AVALIAÇÃO DO PERFIL DE DEGRADAÇÃO E PRODUTOS DE
DEGRADAÇÃO PARA EPINEFRINA**

**Trabalho de conclusão de curso do Bacharelado
em Química Tecnológica
CEFET-MG**

Belo Horizonte, 09 de agosto de 2021

Prof. Dr. Ildefonso Binatti.
(orientador – CEFET-MG)

Isabela Borges Freitas.
(co-orientadora – HYPOFARMA)

Prof^a. Dr. Esther Maria Ferreira Lucas
(avaliadora – CEFET-MG)

Dr. Bruno Leonardo Silva
(avaliador – HYPOFARMA)

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Patrícia e Eli.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo dom da vida. Por me inspirar e me capacitar para seguir a Química como minha área profissional e me dar forças todos os dias para conseguir chegar à conclusão da graduação.

Agradeço aos meus pais, Patrícia e Eli, por todo o incentivo e investimento em mim e no meu sonho. Obrigada pelo apoio, confiança e amor.

À minha irmã pela ajuda e motivação.

Aos meus professores, por toda a dedicação e aprendizado. Por me permitirem absorver um pouco de todo o conhecimento que levaram uma vida para reunir. Obrigada pela oportunidade de me tornar uma profissional naquilo que escolhi para o resto da minha vida.

Ao meu orientador, Ildefonso Binatti, por ter acreditado no meu trabalho desde o início e pela atenção e disponibilidade durante a produção dele.

A Isabela Freitas pela participação neste trabalho e por todos os momentos no convívio profissional.

Aos amigos da Hypofarma, pela oportunidade de trabalho, por me acolherem e me permitirem tamanho aprendizado. Obrigada por me ensinarem com tanta dedicação, carinho e paciência tudo aquilo que eu precisava para me desenvolver como profissional dentro da indústria farmacêutica e por se tornarem amigos tão queridos, fazendo os meus dias mais leves e a convivência fácil, divertida e respeitosa.

Aos amigos do CEFET-MG por tudo que compartilhamos durante a graduação, pela amizade sincera e recheada de amor, admiração, apoio e respeito.

RESUMO

SANTOS, S. A. S.; BINATTI, I.; FREITAS, I. B. Proposta de estudo de degradação forçada a partir do estudo do perfil de degradação e produtos de degradação para Epinefrina.

Nas últimas décadas a administração de medicamentos é uma das medidas utilizadas para prevenir, tratar e controlar os sintomas de diversas doenças. Para que os medicamentos possam ser registrados e comercializados no Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) exige que seja feita a avaliação da qualidade medicamentosa por meio de estudos que comprovem sua estabilidade química, física e microbiológica até o fim do seu prazo de validade. Os estudos visam testar e avaliar a variação da qualidade em função do tempo diante da influência de diversos fatores ambientais, além de monitorar a formação e toxicidade de impurezas e produtos de degradação. O estudo de degradação forçada é o principal método que analisa a influência dos fatores ambientais ao expor o insumo farmacêutico ativo e o medicamento a condições mais extremas com o intuito de desenvolver o perfil de degradação, identificar possíveis produtos de degradação que seriam obtidos ao término da vida útil e desenvolver um método indicativo de estabilidade. A primeira etapa do estudo de degradação consiste no estudo do perfil de degradação, sendo este avaliado por meio de pesquisa teórica sobre o medicamento. Sendo assim, no presente trabalho realizou-se um levantamento bibliográfico para a avaliação do perfil degradativo e proposta de condições de degradação forçada da solução injetável de Epinefrina e insumo farmacêutico ativo. Os dados reunidos neste trabalho mostram que o insumo farmacêutico ativo Epinefrina é mais estável do que a solução injetável e que a molécula pode sofrer oxidação, racemização e reação com componentes auxiliares das formulações. Além disso, as reações de degradação da Epinefrina podem ser catalisadas por alterações de pH da solução, exposição a oxigênio, contato com íons metálicos, exposição à luz e temperaturas elevadas. Em conclusão, por meio do levantamento bibliográfico foi possível apresentar uma proposta para condução da parte experimental do estudo de degradação forçada.

Palavras-chave: Epinefrina. Estudo de degradação forçada. Perfil de degradação.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Sequência sintética da adrenalina a partir do catecol	6
Figura 2 - Fórmula estrutural da epinefrina e suas respectivas funções orgânicas.....	9
Quadro 1 - Características físico-químicas da Epinefrina.....	9
Figura 3 – Ionização da Epinefrina.....	11
Figura 4 - Disponibilidade da epinefrina em diferentes pH	12
Quadro 2 - Fatores que afetam a estabilidade de uma formulação.....	13
Figura 5 - Relação entre perfil de degradação "potencial", obtido no estudo de estresse, e o perfil de degradação "real", obtido no estudo de estabilidade de longa duração.....	17
Figura 6 - Estudo do perfil de degradação	18
Esquema 1 - Reação de eliminação em álcoois.....	23
Esquema 2 - Reação de eliminação em haloalcanos.....	23
Esquema 3 - Reação de substituição nucleofílica em haloalcanos	24
Esquema 4 - Reação de descarboxilação em ácido carboxílico	24
Esquema 5 - Reação de hidrólise de ésteres em meio alcalino.	25
Esquema 6 - Reação de hidrólise de lactonas catalisado por ácido e base.....	25
Esquema 7 - Reação de hidrólise de amidas e lactamas.	26
Esquema 8 - Diferentes espécies reativas de oxigênio	26
Esquema 9 - Formação de radicais mediada por metais	27
Esquema 10 - Primeira fase da auto oxidação – iniciação.	27
Esquema 11 - Segunda fase da auto oxidação – propagação.	28
Esquema 12 - Terceira fase da auto oxidação - decomposição em alcóxila e hidroxila. 28	
Esquema 13 - Quarta fase da auto oxidação - terminação	28
Esquema 14 - Reação de oxidação de grupos benzílicos.....	28
Esquema 15 – Estabilização do radical benzílico por ressonância.....	29
Esquema 16 - Reação de oxidação de fenóis.....	29
Esquema 17 - Reação de desalquilação oxidativa de aminas.....	29
Esquema 18 - Reação de oxidação por ataque nucleofílico de aminas terciárias e secundárias.	30
Quadro 3 - Lista de impurezas conhecidas da epinefrina	35
Esquema 19 - Racemização da epinefrina.....	38
Esquema 20 - Reação de substituição e adição da epinefrina por bissulfito.....	39

Esquema 21 - Reação de oxidação da epinefrina por oxigênio molecular.....	39
Esquema 22 - Mecanismo proposto para fotodegradação da epinefrina na presença de bissulfito de sódio	40
Esquema 23 - Reações de degradação da Epinefrina.....	41
Figura 7 – Produtos de degradação identificados por RMN	43
Figura 8 - Cromatogramas de HPLC para (a) padrão de epinefrina, (b) placebo não estressado, (c) epinefrina tratada com ácido, (d) epinefrina tratada com base, (e) epinefrina tratada com peróxido e (f) epinefrina tratada com íons metálicos	43
Figura 9 – Cromatograma de HPLC do perfil de degradação da epinefrina sob oxidação e refluxo por 10 h.....	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Relação entre dose máxima diária do fármaco e limites dos produtos de degradação para notificação, identificação e qualificação na ANVISA	21
Tabela 2 - Quantidade aproximada dos principais produtos de degradação observados em solução injetável contendo Epinefrina	42
Tabela 3 - Proposta de condições experimentais para EDF da epinefrina.....	45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIBN	AzobIsisoButiroNitrila
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATD	Administração Total Diária
DP	<i>Degradation Products</i> (Produtos de Degradação)
EDF	Estudo de Degradação Forçada
EP	<i>European Pharmacopoeia</i> (Farmacopeia Europeia)
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência)
ICH	<i>International Conference on Harmonisation</i> (Conferência Internacional sobre Harmonização)
ICP-MS	<i>Inductively coupled plasma mass spectrometry</i> (Espectrometria de massa por plasma acoplado indutivamente)
IFA	Insumo Farmacêutico Ativo
ND	<i>Not detected</i> (Não detectado)
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RE	Resoluções
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
USP	<i>United States Pharmacopoeia</i> (Farmacopeia Americana)
UTI	Unidades de Terapia Intensiva
UV	Ultravioleta

LISTA DE SÍMBOLOS

λ Comprimento de onda

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	1
2	DESENVOLVIMENTO	4
2.1	Epinefrina.....	4
2.1.1	Características farmacológicas	6
2.1.2	Características físico-químicas	8
2.2	Estudos de estabilidade.....	12
2.2.1	Estudo de Estabilidade: um breve histórico	13
2.2.2	Aspectos gerais do estudo de degradação forçada.....	15
2.2.3	Legislação vigente sobre estudo do perfil de degradação e estudo de degradação forçada	18
2.2.4	Classificação das impurezas	22
2.2.5	Rotas mais comuns de degradação	23
2.2.6	Condições de estresse.....	30
2.2.6.1.	<i>Hidrólise</i>	30
2.2.6.2.	<i>Oxidação</i>	31
2.2.6.3.	<i>Termólise</i>	32
2.2.6.4.	<i>Fotólise</i>	33
2.3	Estudo de degradação forçada para Epinefrina IFA e solução injetável	34
2.3.1	Impurezas conhecidas para o ativo Epinefrina	34
2.3.2	Possíveis rotas de degradação da Epinefrina.....	37
2.3.3	Testes de estresse para Epinefrina na literatura.....	42
2.3.4	Proposta das condições de degradação para a Epinefrina IFA e solução injetável	45
3	CONCLUSÃO.....	48
4	REFERÊNCIAS.....	49

1 INTRODUÇÃO

A saúde coletiva de uma sociedade é um dos fatores de grande importância e, por isso, precisa ser tratada com cuidado especial (ANS, 2021).

A administração de medicamentos é uma dentre diversas medidas utilizadas na promoção da saúde coletiva com foco na prevenção, tratamento e, também, no controle de sintomas das doenças. Nas últimas décadas, o uso dos medicamentos tem contribuído para a eficiência dos sistemas de saúde por se mostrar eficaz na diminuição do volume de doenças e mortalidade, promovendo melhoria na qualidade de vida individual e coletiva (ANS, 2021; SILVA, 2019).

Contudo, a ampla utilização de medicamentos gera preocupação em relação à segurança, eficácia e qualidade medicamentosa. Esses fatores estão relacionados, principalmente, com a dosagem terapêutica, a formação de subprodutos e, às características físico-químicas dos princípios ativos. Dessa forma, o crescente interesse em manter suas propriedades fortalece a necessidade da criação de regras aplicadas ao controle do mercado da indústria farmacêutica e dos medicamentos (CARARINE, 2016; BARATA-SILVA et al, 2017).

No Brasil, o registro e a comercialização de produtos farmacêuticos dependem da aprovação da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) por meio de avaliações técnicas que atestem que os produtos fornecidos ao consumidor final são seguros. Tais avaliações são realizadas pelo fabricante, enviadas para a ANVISA para aprovação e incluem múltiplas análises, como, por exemplo, a análise minuciosa do sistema de qualidade implantado pela empresa como um todo, bem como, a análise dos estudos de estabilidade farmacêutica (SOUZA, 2014; SIMERS, 2016).

Segundo a Resolução da Diretoria Colegiada da ANVISA, a RDC nº 318, de 6 de novembro de 2019, os estudos de estabilidade são delineados para testar e evidenciar a variação de qualidade do Insumo Farmacêutico Ativo (IFA) e/ou produto acabado denominado de forma farmacêutica, fármaco ou medicamento em função do tempo diante da influência de diversos fatores ambientais, tais como temperatura, umidade e luz, além de outros fatores relacionados a potencial interação entre fármaco e excipientes e/ou materiais de embalagem, para assim, determinar o prazo de reteste ou validade do IFA e do medicamento (BRASIL, 2019; LACHMAN et al, 2001).

Todos os fatores citados devem ser considerados no planejamento do estudo de estabilidade pois podem interferir nas propriedades do fármaco e levar à perda parcial

ou total de sua atividade e a formação das impurezas que podem ser inativas ou tóxicas. Essas alterações podem ocorrer em velocidade variada e a determinação da estabilidade é baseada na cinética de reação, ou seja, no estudo da velocidade de degradação e do modo como essa velocidade é influenciada pela concentração dos reagentes, excipientes e outras substâncias, e pela ação dos agentes externos (LACHMAN et al, 2001; CARARINE, 2016).

Um dos principais estudos de estabilidade, que analisa a influência das alterações citadas anteriormente é o estudo de degradação forçada (EDF), que causa degradação em maior escala, expondo o IFA e o medicamento a condições mais extremas (BRASIL, 2015b).

A realização do estudo de degradação forçada, bem como sua análise crítica, é de extrema importância para o registro, renovações e alterações pós-registro e, o não cumprimento pode gerar exigência técnica ou até mesmo o indeferimento do registro do produto (SILVA et al., 2009).

A primeira etapa do EDF consiste em uma pesquisa bibliográfica detalhada sobre os princípios ativos e excipientes utilizados com a finalidade de obter informações sobre os grupos funcionais da(s) molécula(s) do(s) princípio(s) ativo(s) mais susceptíveis a degradação ou interação com excipientes, os produtos de degradação teoricamente possíveis, probabilidade que o grupo funcional responsável pela detecção do IFA seja degradado, previsibilidade de toxicidade dos produtos de degradação e identificação das impurezas de síntese do IFA. Essa pesquisa é de grande relevância para o delineamento do estudo e definição das propostas de condições de estresse a serem adotadas, bem como, para o desenvolvimento do método indicativo de estabilidade. Além disso, pode também ser usada como comparação posterior com os resultados experimentais, podendo auxiliar na discussão do relatório final que será apresentado para a ANVISA (BRASIL, 2015b).

O desenvolvimento do estudo de degradação forçada, para diversos tipos de medicamentos e IFAs, é uma exigência recente e, por isso, não há muitas metodologias de análises pré-definidas e levantamentos bibliográficos completos para princípios ativos e medicamentos na literatura que discutam o assunto sob o ponto de vista teórico e contextual, compilando as informações mais importantes (BRASIL, 2015b; MACHADO, 2011).

Dado o contexto, o presente trabalho visa, por meio de um levantamento bibliográfico, elaborar uma proposta de estudo de degradação forçada para solução injetável e insumo farmacêutico ativo Epinefrina a partir do estudo das características físico-químicas e farmacológicas, impurezas conhecidas e análise das partes mais susceptíveis da molécula a reações químicas, possíveis rotas e produtos de degradação do ativo.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Epinefrina

A epinefrina ou adrenalina é um hormônio neurotransmissor do corpo humano secretado pelas glândulas suprarrenais ou adrenais. Sua presença no organismo se dá por meio de um sinal liberado em resposta a algum estresse físico ou mental ao qual o corpo é submetido. Nesses momentos, as suprarrenais secretam quantidades abundantes deste hormônio com o objetivo de preparar o organismo para luta-fuga, estimulando o coração e elevando a pressão arterial (ALVES, 2021; MAGALHÃES, 2020).

Contudo, o funcionamento das glândulas suprarrenais e das substâncias produzidas por elas permaneceu incerto por séculos e era um grande mistério para os anatomistas. Os primeiros registros do seu descobrimento datam de 1886 (BALL; FEATHERSTONE, 2017).

Em 1855, Thomas Addison definiu a insuficiência adrenal como uma doença após observar sinais como anemia e fraqueza no coração em pacientes que apresentavam as glândulas adrenais deficientes. A partir daí, ele estabeleceu que as suprarrenais eram essenciais para a vida. No mesmo ano, as duas partes que constituem as glândulas, o córtex e a medula, foram observadas microscopicamente, mas, ainda sem mais pistas sobre a sua função. Foi somente em maio de 1886 que William Horatio Bates anunciou o descobrimento da substância produzida pela adrenal no *New York Medical Journal* (ADDISON, 1855; VARELLA, 21-?).

Na segunda metade do século XIX, o clínico geral George Oliver desenvolveu um “instrumento de medição de pulso”, experimentando várias substâncias orais para determinar seus efeitos sobre a pressão arterial. Sua dissertação contém registros do uso de muitas substâncias, incluindo extratos das suprarrenais de animais, preparados por um químico local (OLIVER, 1895).

Sua descoberta, de que o extrato adrenal levou a um aumento da pressão arterial, o fez se aproximar do Professor Edward Schäfer, um fisiologista. Juntos, eles conduziram experimentos animais com extrato suprarrenal intravenoso, comprovando conclusivamente a elevação da pressão arterial, constrição de vasos sanguíneos e contração ventricular aumentada. Eles também estabeleceram que o componente ativo usado no teste surgiu da medula e não do córtex (OLIVER, 1895).

Esses extratos logo começaram a ser usados na medicina, principalmente em cirurgias oculares e nasais com o objetivo de diminuir o sangramento. Mas os extratos

animais se deterioravam fácil e rapidamente, causando reações adversas (YAMASHIMA, 2003).

A partir desse momento, os esforços para identificar e purificar a substância ativa responsável pelos efeitos vasoativos se intensificaram. Otto von Fürth, isolou uma substância que chamou de suprarenina, e, em 1897, John Jacobs Abel, isolou uma substância um pouco diferente, conhecida como epinefrina (BALL; FEATHERSTONE, 2017; GILMAN et al, 2012).

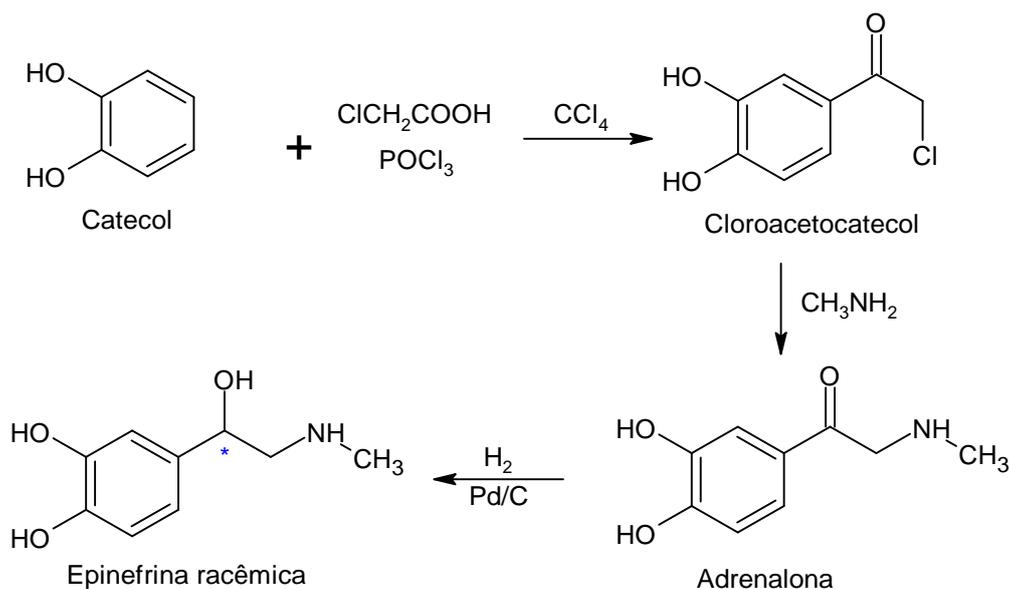
Em 1900, o químico Jokichi Takamine, trabalhando em cooperação com Parke, Davis & Co Laboratories, isolou uma substância cristalina pura da medula adrenal, 2.000 vezes mais forte do que suprarenina. Ele chamou essa substância de adrenalina, onde *ad-* é um prefixo que indica proximidade, *renalis* significa relativo aos rins e o sufixo *-ina*, se aplica a algumas substâncias químicas, as aminas. Em novembro de 1900, Takamine solicitou uma patente intitulada “Produto Extrativo Glandular”, em 1901 obteve o direito de usar a palavra adrenalina como marca registrada e mais tarde o produto começou a ser comercializado com o nome comercial *Adrenalin* (BALL; FEATHERSTONE, 2017; BENNET, 2001).

Sem autoridades regulatórias para controlar o uso da adrenalina na época, ela encontrou rapidamente muitas e variadas aplicações. Tópicamente foi aplicada para estancar sangramentos, foi usada para promover o prolongamento do efeito da anestesia local com o uso da mistura de cocaína com adrenalina, foi usada também para condições alérgicas e a para a asma, e até no tratamento de gonorreia (HOFFMAN, 2013).

Entretanto, o papel mais importante da adrenalina foi descoberto por um cirurgião, George Crile. Crile descobriu que a adrenalina injetada podia reviver um paciente de uma parada cardíaca. Dentro de alguns anos após a sua descoberta, a adrenalina tornou-se uma droga indispensável para a medicina de emergência (CRILE, 1903; CRILE, 1947).

Em 1904, a adrenalina foi sintetizada em laboratório por Friedrich Stolz. Partindo do catecol, ele preparou a adrenalona, que foi reduzida a uma mistura racêmica de adrenalina, como pode ser observado na figura 1 (CESAR, 2011; GILMAN et al, 2012).

Figura 1 - Sequência sintética da adrenalina a partir do catecol



Fonte: Autoria própria.

Atualmente, a epinefrina é um princípio ativo utilizado para o desenvolvimento de formulações. Como fármaco é empregado como constritor em hemorragias ou congestão nasal e também é usado para relaxar os músculos brônquicos na asma e nas reações anafiláticas (ROBINSON et al, 2000; RANG; DALE, 2016).

Entretanto sua principal utilização é em associação com anestésicos locais. A principal vantagem desta associação é absorção lenta do sal anestésico, reduzindo sua toxicidade, aumentando a duração da anestesia, possibilitando o uso de quantidades menores da solução, além de aumentar o efeito anestésico (ROBINSON et al, 2000).

Devido ao seu uso comum em medicina de emergência e Unidades de Terapia Intensiva (UTI), as formas farmacêuticas típicas são ampolas de uso único e soluções injetáveis estéreis acondicionadas em frascos de vidro. Na Farmacopeia Americana (USP, do inglês *United States Pharmacopeia*) a epinefrina injetável é especificada como: “Uma solução estéril de epinefrina em água para injeção preparada com a ajuda de ácido clorídrico ou outros tampões adequados” (HOELLEIN; HOLZGRABE, 2012; UNITED, 2020).

2.1.1 Características farmacológicas

Naturalmente, quando lançada na corrente sanguínea, a adrenalina desencadeia uma série de reações em diferentes partes do corpo, preparando-o para uma resposta abrupta a algum tipo de perigo ou estresse. Isso porque a adrenalina é uma

catecolamina, substância essencial à resposta adrenérgica no organismo (FERNANDES, 2020).

Sua presença leva a um aumento da frequência dos batimentos cardíacos e do volume de sangue por batimento, eleva o nível de açúcar no sangue, minimiza o fluxo sanguíneo nos vasos periféricos e no sistema intestinal enquanto maximiza o fluxo para os músculos voluntários nas pernas e nos braços e causa queima de gordura contida nas células adiposas (TEIXEIRA, 2013).

Como fármaco, a epinefrina é uma droga simpaticomimética, ou seja, imita a ação do hormônio, e seu uso é indicado em ocasiões onde é necessário suporte hemodinâmico em situações de parada cardiorrespiratória ou estados de choque, em reações de anafilaxia ou choque anafilático, em crises asmáticas graves e pouco responsivas as medidas terapêuticas usuais, no controle de pequenas hemorragias cutâneas e em associação aos anestésicos locais, de forma a promover incremento na duração do efeito analgésico (HYFREN, 2021; EFRINALIN, 200-?).

Para atuar no organismo as catecolaminas precisam se ligar à receptores específicos e a ação das mesmas está relacionada principalmente com qual receptor a substância irá interagir. Após essa interação, há uma alteração da permeabilidade da membrana celular, desencadeando uma série de reações intracelulares, na dependência do tipo de receptor e tecido envolvido com o local onde se deu a ligação (HYFREN, 2021; FERNANDES, 2020).

Os receptores nos quais as catecolaminas se ligam para exercer seus efeitos são os alfas ($\alpha 1$ e $\alpha 2$) e beta ($\beta 1$, $\beta 2$ e $\beta 3$) adrenérgicos. Esses receptores localizam-se nas terminações nervosas pré-sinápticas e em algumas pós-sinápticas. Essas terminações podem ser observadas periféricamente, no tecido vascular e adiposo, assim como no coração, pulmões, plaquetas, leucócitos, rins, entre outros (GILMAN et al, 2012).

Os receptores $\alpha 1$ estão presentes no globo ocular, vasos sanguíneos, trato gastrointestinal, sistema urinário, sistema respiratório e em algumas glândulas como as sudoríparas e as salivares. Os receptores $\alpha 2$ são encontrados nos neurônios, vasos sanguíneos, estômago, intestino e no sistema nervoso central, no cérebro. (FERNANDES, 2020; BRAGA, 2012).

Os receptores $\beta 1$ são encontrados no coração, nos rins e no sistema gastrointestinal, os $\beta 2$ nas musculaturas lisas e os receptores $\beta 3$ nos tecidos adiposos (FERNANDES, 2020).

A epinefrina ligada aos receptores α_1 do globo ocular causa estimulação do aumento de cálcio, levando a contração do músculo radial da íris e assim promovendo midríase, ou seja, promove dilatação da pupila. Nos α_1 dos vasos sanguíneos causa a vasoconstrição, aumentando a resistência vascular periférica, e conseqüentemente a pressão arterial. Além disso, realiza também a contração dos vasos venosos, provocando aumento do retorno venoso (HYFREN, 2021; FERNANDES, 2020).

No trato gastrointestinal, a ligação com os receptores α_1 causa relaxamento da musculatura enquanto no sistema urinário acontece a contração do ureter reduzindo a micção, e no sistema respiratório há a redução da secreção brônquica, aumentando a passagem de ar. Ligada aos receptores α_1 das glândulas sudoríparas e glândulas salivares são produzidos suor adrenérgico e secreção salivar, respectivamente (HYFREN, 2021; FERNANDES, 2020).

Já os efeitos da ligação da epinefrina com os receptores α_2 podem ocorrer no terminal pré sináptico e no terminal pós sináptico. No terminal pré sináptico, ela promove inibição da liberação de determinados transmissores, promovendo autorregulação da liberação. Em contrapartida, no terminal pós sináptico há inibição da liberação de insulina e contração da musculatura lisa vascular (HYFREN, 2021; FERNANDES, 2020).

A atuação mais importante da epinefrina nos receptores β_1 ocorre no coração e incluem aumento da força de contração do órgão, aumento da frequência cardíaca e conseqüentemente aumento da pressão arterial. Nos rins também contribui para aumento da pressão arterial e no trato gastrointestinal promove redução da peristalse (GILMAN et al, 2012; RANG; DALE, 2016).

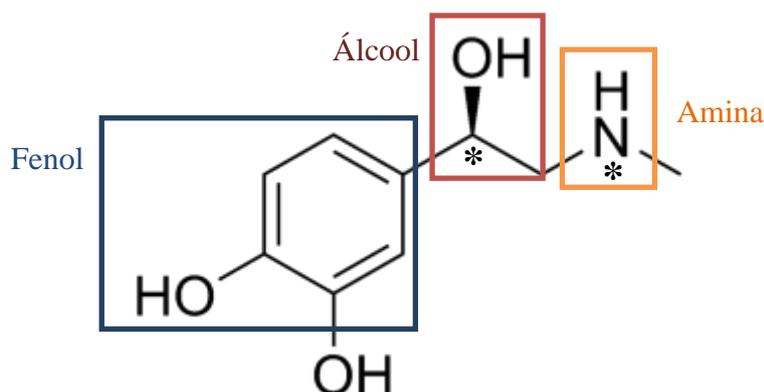
Nos receptores β_2 , ocorre um relaxamento das musculaturas lisas promovendo vasodilatação, broncodilatação, glicogenólise hepática e tremor. E nos receptores β_3 a ação desencadeada pela epinefrina é a mobilização de lipídeos no tecido adiposo (HYFREN, 2021; GILMAN et al, 2012).

2.1.2 Características físico-químicas

A epinefrina é uma molécula de função mista pois possui três grupos funcionais, sendo eles os grupos fenol, álcool e amina (figura 2) e apresenta um carbono assimétrico ligado à hidroxila alcoólica (SZULCZEWSKI; HONG, 1978; PAIVA, 2006).

Um dos enantiômeros da epinefrina desvia o plano da luz polarizada para a direita, sendo chamado de epinefrina dextrogira, e o outro desvia o plano da luz polarizada para a esquerda, sendo denominado de epinefrina levogira e a que realiza a atividade hormonal (FOGAÇA, 21--).

Figura 2 - Fórmula estrutural da epinefrina e suas respectivas funções orgânicas



Fonte: Autoria própria

O conhecimento das propriedades físico-químicas e dados da molécula são imprescindíveis para o início de qualquer trabalho com a substância. Tais informações contribuem para a tomada de decisão das melhores condições em que a molécula possa ser manipulada. A revisão bibliográfica das propriedades da epinefrina encontra-se no Quadro 1.

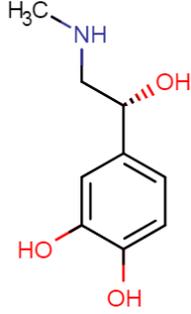
Quadro 1 - Características físico-químicas da Epinefrina

Características físico-químicas	Descrição
Nome químico	1,2-Benzenediol, 4-[1-hydroxy-2-(methylamino)ethyl]-,(R)-(-)-3,4-Dihydroxy- α -[(methylamino)methyl]benzylalcohol
Nomenclatura (INN)	Epinefrina base
Outros nomes	Adrenalina L-Epinefrina R-Epinefrina
CAS nº	51-43-4
Aplicação e uso	Agonista adrenérgico
Fórmula molecular	C ₉ H ₁₃ NO ₃
Composição elementar	C (59%), H (7.15%), N (7.65%), O (26.2%)

Continua

Quadro 1 - Características físico-químicas da Epinefrina

Continuação

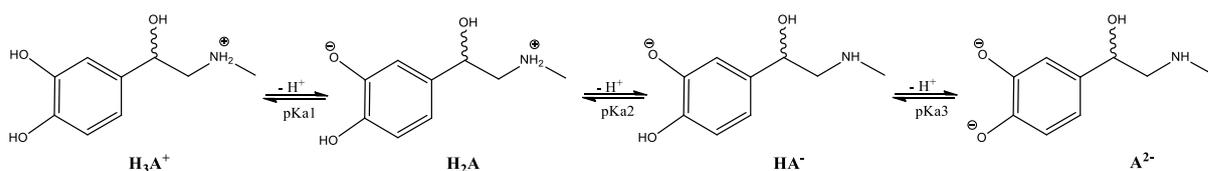
Massa molecular	183,20 g/mol (Base livre) 333,30 g/mol (Bitartarato de epinefrina)
Isomerismo	D-Epinefrina
Características físicas	Pó cristalino ou grânulos, branco a quase branco, inodoro, escurece gradualmente com a exposição à luz e ao ar.
Ponto de fusão	211-212°C
Polimorfismo	Não exhibe
Solubilidade	A solubilidade em água depende do pH, onde a solubilidade aumenta com a diminuição do pH. Pouco solúvel em etanol. Insolúvel em éter, em clorofórmio e em óleos fixos voláteis.
pKa	 <p>pKa 8,91</p>

Quadro 1 - Características físico-químicas da Epinefrina

Conclusão	
Ionização	<p>A primeira reação de desprotonação da epinefrina completamente protonada envolve a perda de prótons do grupo fenólico, gerando um zwitterion (pKa 9,49)</p> <p>A segunda desprotonação envolve a perda de prótons da forma zwitterion no grupo amina, que resulta em uma espécie de carga líquida negativa (pKa 11,28). A terceira desprotonação ocorre no grupo fenólico, resultando em carga líquida negativa (pKa 13,07), conforme a sequência indicada na figura 3.</p> <p>A epinefrina completamente protonada se torna menos disponível à medida que há aumento de pH (figura 4).</p>
Toxicidade	<p>Genotoxicidade e carcinogenicidade: Negativo</p> <p>Irritante ou corrosivo para pele.</p>

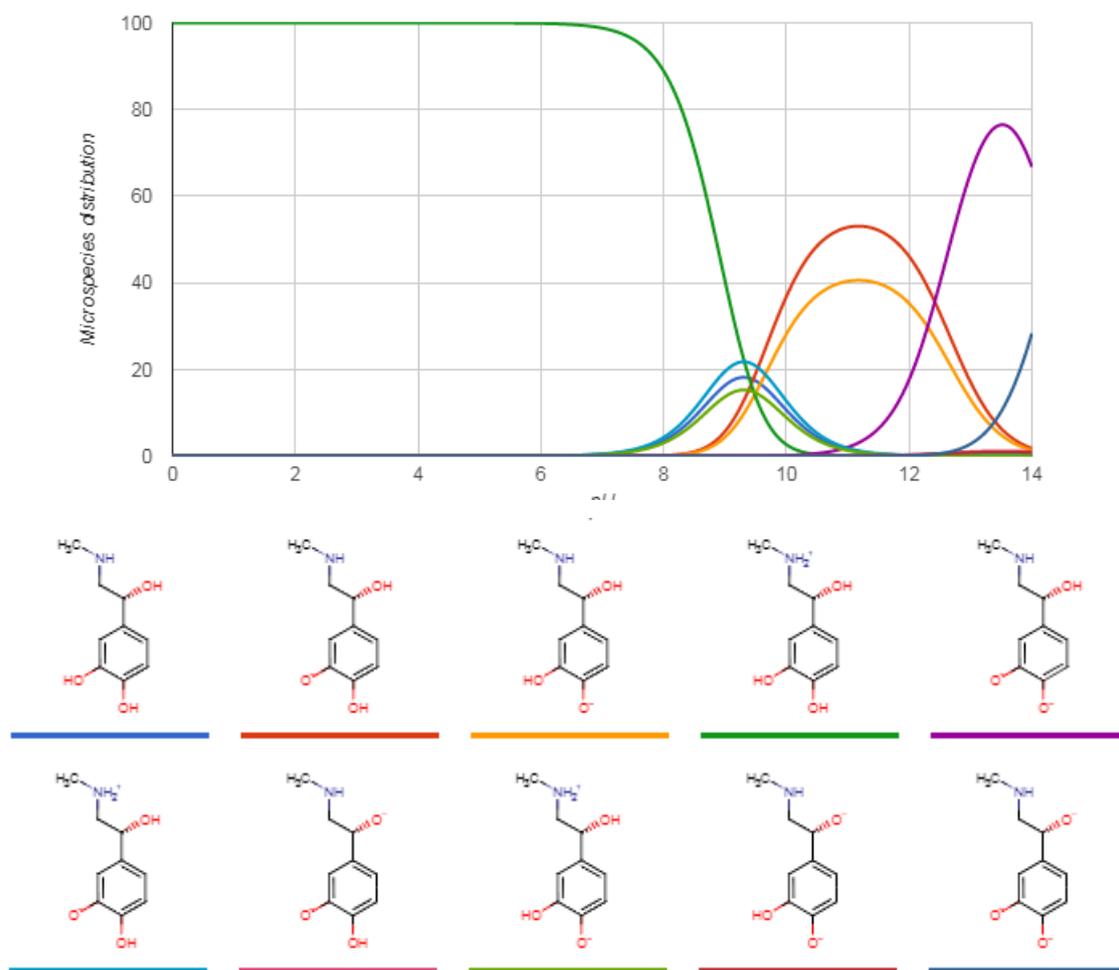
Fonte: Chemicalize, 2021; SZULCZEWSKI; HONG, 1978; Toxtree, 2021.

Figura 3 – Ionização da Epinefrina



Fonte: Autoria própria.

Figura 4 – Formas ionizadas da epinefrina em diferentes pH



Fonte: Chemicalize, 2021.

2.2 Estudos de estabilidade

Todo medicamento sofre degradação, e por isso sempre é estipulado um prazo de validade para os fármacos pelas indústrias farmacêuticas. Ao longo do período de vida útil de um medicamento, os fármacos formam produtos de degradação que podem comprometer a sua qualidade e alguns podem formar produtos de degradação que podem ser inativos e/ou tóxicos e que comprometem, dessa forma, a eficácia e segurança. As condições para a degradação de fármacos não necessitam ser ideais, já que uma pequena quantidade de produto de degradação pode ser crítica para a qualidade do fármaco (BERNARDES, 2012; MOREIRA, 2020).

Por meio de diversas técnicas e estudos pode-se avaliar a estabilidade de um medicamento, sendo possível prever rotas de degradação, identificar e quantificar produtos de degradação. Com base nestas informações pode-se modificar a composição,

embalagem e acondicionamento dos medicamentos para minimizar o aparecimento de substâncias nocivas à saúde (BERNARDES, 2012). No quadro 2, são listados os fatores que podem afetar a estabilidade de formulações farmacêuticas.

Quadro 2 - Fatores que afetam a estabilidade de uma formulação

Fatores	Condições que alteram a estabilidade dos fatores
Relação IFA/Excipiente	Estrutura química do IFA e do excipiente, impurezas, forma física, hidratação, tamanho de partículas, polimorfismo.
Formulação	Razão IFA-Excipiente, processo produtivo, forma farmacêutica, embalagem.
Ambiente	Temperatura, luz, umidade, oxigênio.

Fonte: Adaptado de MOREIRA (2020).

2.2.1 Estudo de Estabilidade: um breve histórico

Os estudos de estabilidade são um conjunto de testes sistematizados que tem como objetivo determinar a capacidade de um fármaco de manter suas características e, a partir dos resultados de tais testes, estabelecer o prazo de validade, as condições adequadas de armazenamento e transporte, além de prever a data de reteste dos IFAs. Quando a data de reteste é atingida, deve-se realizar a retestagem do IFA para assegurar que o mesmo se mantém adequado para utilização (FACCI et al, 2020; ALCÂNTARA et al, 2013).

Diante disso, os estudos de estabilidade são fundamentais para a garantia da qualidade dos medicamentos e para proteger a população de danos causados pela presença de impurezas em medicamentos (FACCI et al, 2020; ALCÂNTARA et al, 2013).

Até a década de 1980 não havia interferência de autoridades sanitárias mundiais nos métodos de avaliação da estabilidade, e estes, por sua vez, seguiam princípios científicos e técnicos. Diante da grande relevância dos estudos de estabilidade, ficou clara a necessidade da regulamentação dos parâmetros e métodos de avaliação da estabilidade (CARVALHO, et al 2004).

Dessa forma, em 1990, foi criado o comitê denominado *The International Council for Harmonization of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human*

Use (ICH). O ICH reúne autoridades regulatórias e a indústria farmacêutica para discutir aspectos científicos e técnicos dos produtos farmacêuticos e desenvolve diretrizes próprias. O objetivo desse comitê é alcançar uma maior harmonização em todo mundo para garantir o desenvolvimento de medicamentos seguros e eficazes e que os mesmos sejam mantidos no mercado de maneira mais eficiente (MISSION, 2021).

Logo após sua criação, o ICH publicou a primeira versão do documento de nome *Stability testing of new drug substances and products*, que passou por revisões, sendo a de 2003 a mais recente e em vigência. A partir desse momento, com a necessidade de mais informações sobre o tema, o ICH publicou outros guias, sendo eles: *Impurities in New Drug Substances* em 1994, *Photostability Testing of New Drug Substances and Products* em 1995, *Impurities in New Drug Products* em 1995, *Maintenance of the Guideline for Residual Solvents* em 1996, *Bracketing and Matrixing Designs for Stability Testing of New Drug Substances and Products* em 2000 e *Guideline for Elemental Impurities* em 2013. Todos estes guias foram revisados e atualizados posteriormente (QUALITY, 2021).

A evolução nas exigências e nas revisões dos guias advém, dentre outros fatores, do progresso dos métodos analíticos que, ao longo dos anos, se tornaram cada vez mais eficientes, seletivos, exatos e sensíveis; do emprego de técnicas de caracterização que fornecem informações sobre a estabilidade em estados sólidos e a constante preocupação com a identificação e quantificação de impurezas nas formulações farmacêuticas (FACCI et al, 2020).

No Brasil, a regulamentação do setor farmacêutico é realizada pela ANVISA, criada em 1999, sendo uma autarquia sob regime especial, que tem como atribuição a normatização, controle e fiscalização de produtos e substâncias de interesse para a saúde (BRASIL, 1999). Portanto, o órgão publica constantemente normas, em forma de Resolução da Diretoria Colegiada (RDC), Resoluções (RE) e instruções, por meio de notas técnicas, guias e informes, de modo a orientar os setores regulados a melhor forma de assegurar a qualidade dos produtos (SOUZA, 2014).

A primeira legislação brasileira sobre estabilidade publicada pela ANVISA foi a RE nº485/2002, onde havia a apresentação de um guia para a realização de estudos de estabilidade condizente com os guias internacionais. A legislação preconizava a realização de apenas dois tipos de estudos de estabilidade (acelerado e de longa duração). Nos anos seguintes, com o avanço dos estudos e buscando se alinhar a

legislação internacional, a ANVISA publicou novas regulamentações, tomando como base as normas internacionais, e guias para melhor entendimento e cumprimento da legislação (FACCI et al, 2020).

Recentemente publicada, a norma em vigor que estabelece os critérios para a realização de estudos de estabilidade de IFAs e de medicamentos, exceto biológicos (produzidos a partir de organismos vivos), é a RDC nº 318/2019. Nesta legislação estão reunidas as informações e os requerimentos legais dos estudos de estabilidade e esclarecidas as peculiaridades relacionadas a cada categoria de medicamento. A partir de sua publicação foram revogadas as principais normas anteriores sobre estudos de estabilidade RE nº 1/2005, IN nº 4/2007 e RDC nº 45/2012 (BRASIL, 2019).

De acordo com a RDC nº 318/2019, os estudos de estabilidade são classificados em acelerado, longa duração, acompanhamento, degradação forçada e, mais recentemente, estabilidade pós-reconstituição ou diluição e estabilidade em uso (BRASIL, 2019).

2.2.2 Aspectos gerais do estudo de degradação forçada

Os estudos de estabilidade determinam o perfil de degradação, ou seja, o conjunto de produtos de degradação observado em um medicamento ou IFA. Dentre os estudos que fornecem o perfil estão o estudo de estabilidade de longa duração e o estudo de estabilidade acelerado (BRASIL, 2015b).

No estudo de estabilidade de longa duração, que expõe o IFA ou medicamento à temperatura e umidade pelo tempo equivalente à sua vida útil, é obtido o perfil de degradação de interesse sanitário, chamado de perfil de degradação “real”. Já o estudo de estabilidade acelerado, que expõe o IFA ou medicamento a condições forçadas de armazenamento, é um estudo primariamente preditivo e seu perfil de degradação é útil em situações especiais como em casos de concessão de prazo de validade provisório. (BRASIL, 2015b; BRASIL, 2019).

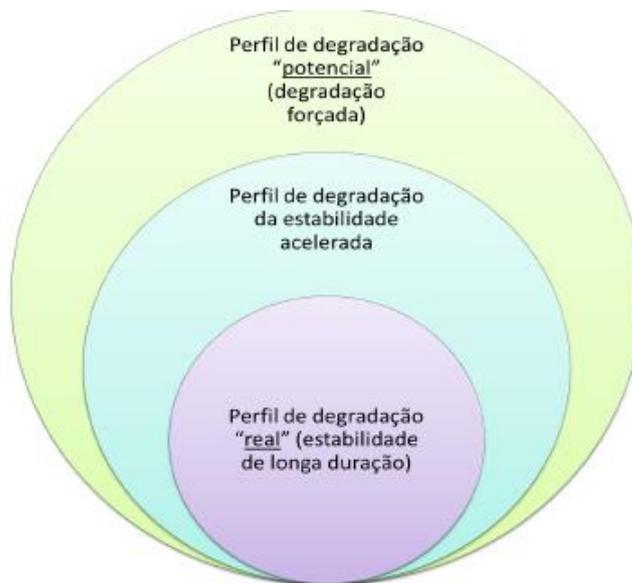
A temperatura e umidade utilizadas no estudo de estabilidade acelerado e de longa duração do princípio ativo e do produto são determinadas pela zona climática na qual o país de origem enquadra-se. O Brasil situa-se na Zona Climática IVb (quente/muito úmida) e, portanto, a temperatura é de $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e umidade de $75\% \pm 5\%$.

Os ensaios dos estudos de estabilidade são realizados utilizando-se um método indicativo de estabilidade, isto é, um método capaz de identificar e quantificar todos os produtos de degradação provenientes do perfil de degradação obtido. Entretanto, não é possível desenvolver tal método utilizando-se apenas as amostras no final do estudo de estabilidade de longa duração ou do estudo de estabilidade acelerado, porque em geral a degradação é pequena, podendo trazer problemas de detecção e quantificação (BRASIL, 2015b).

Sendo assim, se faz necessário a realização de um estudo que cause deliberadamente a degradação em maior escala, expondo o IFA e o medicamento a condições mais extremas. Tal estudo é uma ferramenta que permite o desenvolvimento de métodos indicativos de estabilidade e é definido pela RDC nº 318, de 6 de novembro de 2019, como Estudo de Degradação Forçada (EDF) (BRASIL, 2015b). Também chamado de estudo de estresse, tal estudo permite avaliar a degradação do ativo, não com a finalidade de determinar seu prazo de validade, mas para antecipar o perfil de degradação e identificar os possíveis produtos de degradação que seriam obtidos ao término da vida útil por meio de condições forçadas de degradação (COSTA et al, 2018; ALCÂNTARA et al, 2013).

O perfil de degradação obtido com o EDF é um perfil de degradação “potencial”, uma vez que, por ser realizado em diversas condições, há o aparecimento de mais produtos de degradação do que os obtidos nos estudos de estabilidade de longa duração e o estudo de estabilidade acelerado. O perfil de degradação “potencial” pode ser diferente tanto qualitativamente quanto quantitativamente do “real”, porém qualitativamente um está contido no outro, como ilustrado na figura 5 (BRASIL, 2015b).

Figura 5 - Relação entre perfil de degradação "potencial", obtido no estudo de estresse, e o perfil de degradação "real", obtido no estudo de estabilidade de longa duração

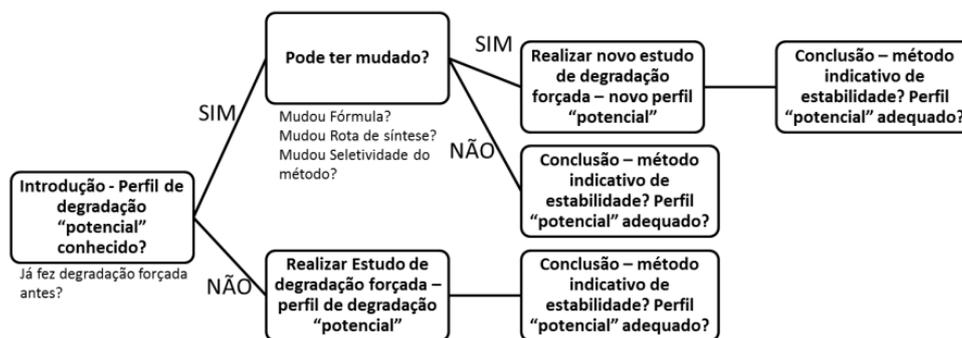


Fonte: BRASIL, 2015b.

Para a obtenção do perfil de degradação forçada, é necessário provocar a degradação significativa do fármaco em condições tais como: a hidrólise ácida, hidrólise básica, oxidação, termólise, fotólise e exposição à íons metálicos. As amostras expostas no estudo não devem ser submetidas a condições muito severas, a fim de evitar degradação extrema. A porcentagem ideal de degradação do ativo em cada condição deve ser em torno de 10%, próximo ao que pode acontecer durante a estabilidade ou ao longo da vida útil do produto (ALCÂNTARA et al, 2013). Quando a degradação se encontra muito acima da faixa de 10%, os produtos de interesse podem ser degradados novamente, se transformando em subprodutos secundários, que possivelmente não se formariam nos estudos de estabilidade e muito abaixo dessa faixa, os produtos formados podem ser menosprezados (FERRAZ, 2016).

Para atender a resolução também deve ser feito o estudo do perfil de degradação. Nesse estudo é avaliado, por meio de pesquisa teórica do medicamento e análise do seu perfil de degradação "potencial" obtido com o estudo de degradação forçada, se todos os produtos de degradação relevantes foram detectados. Na figura 6 são ilustrados os conceitos para o estudo do perfil de degradação, estudo de degradação forçada e perfil de degradação (BRASIL, 2015b).

Figura 6 - Estudo do perfil de degradação



Fonte: BRASIL, 2015b.

A melhor forma de realizar os testes e os requisitos para os mesmos depende das necessidades do projeto, do estágio de desenvolvimento do fármaco ou do medicamento e dos recursos disponíveis na empresa. O mais adequado é que o monitoramento dos produtos de degradação seja feito por meio de um único método analítico indicativo de estabilidade, porém, caso não seja possível a análise conjunta, métodos diferentes podem ser desenvolvidos (ALCÂNTARA et al, 2013).

Em suma, EDF é realizado para alcançar os seguintes objetivos: estabelecer rotas de degradação de fármacos e medicamentos; diferenciar os produtos de degradação relacionados ao fármaco daqueles que são gerados a partir de excipientes e/ou adjuvantes em uma formulação; determinar a estabilidade intrínseca de um fármaco na formulação; elucidar os mecanismos de degradação do fármaco e do medicamento; desenvolver um método analítico adequado para indicar a estabilidade; compreender as propriedades físico-químicas das moléculas do fármaco; gerar formulações mais estáveis; e produzir um perfil de degradação semelhante ao que seria observado em um estudo formal de estabilidade, sob as condições preconizadas pelos guias do ICH (ALCÂNTARA et al, 2013).

2.2.3 Legislação vigente sobre estudo do perfil de degradação e estudo de degradação forçada

Estudos de degradação forçada estão descritos em várias diretrizes internacionais, como o ICH, e na nacional, pela ANVISA (ALCÂNTARA et al, 2013).

Na maioria dos casos, as diretrizes do ICH só se aplicam aos pedidos de comercialização de novos produtos. Porém, como as condições utilizadas para a degradação forçada são definidas em termos gerais, é possível aplicá-las para o

desenvolvimento de métodos analíticos indicativos de estabilidade durante a fase clínica, desenvolvimento e comercialização (FACCI et al, 2020).

No Brasil, a resolução que estabelece parâmetros para a notificação, identificação e qualificação de produtos de degradação em medicamentos é a RDC 53/2015. Esta resolução estabelece parâmetros para a verificação de produtos de degradação em medicamentos, para a elaboração do perfil de degradação correspondente e para a notificação, identificação e qualificação dos produtos de degradação formados ao longo do prazo de validade do medicamento (BRASIL, 2015a).

A resolução se aplica aos medicamentos com substâncias ativas sintéticas e semissintéticas, classificados como novos, que são medicamentos com IFA novo no país, genéricos, medicamento similar a um produto de referência ou inovador, que se pretende ser com este intercambiável, geralmente produzido após a expiração ou renúncia da proteção patentária ou de outros direitos de exclusividade, comprovada a sua eficácia, segurança e qualidade e similares, medicamento que contém o mesmo ou os mesmos princípios ativos, apresenta a mesma concentração, forma farmacêutica, via de administração, posologia e indicação terapêutica, e que é equivalente ao medicamento registrado no órgão federal responsável pela vigilância sanitária, podendo diferir somente em características relativas ao tamanho e forma do produto, prazo de validade, embalagem, rotulagem, excipientes e veículos, devendo sempre ser identificado por nome comercial ou marca.

Além disso, a RDC 53/15, define que o estudo do perfil de degradação deve seguir os seguintes requisitos: deve ser conduzido em um lote, em escala laboratorial, piloto ou industrial do medicamento; que para fins de comparação deve ser feita também com a formulação, com o placebo e no insumo farmacêutico ativo isolado e associado no caso de associações em dose fixa; em caso de mais de um fabricante do insumo farmacêutico ativo, o estudo deve ser realizado para cada fabricante; deve ser realizado em todas as concentrações do medicamento; e no caso das associações em dose fixa, deverão ser executadas também com os insumos farmacêuticos ativos isolados, associados e na formulação (BRASIL, 2015a).

O lote escolhido deve ser representativo do ponto visto de vista estatístico e deve ser discutido a possibilidade de formação de novos produtos de degradação, além de conter a comparação entre os perfis de degradação forçada do IFA, do placebo e do produto (BRASIL, 2015a).

A resolução estabelece também que os estudos devem submeter à amostra as condições de aquecimento, umidade, solução ácida, solução básica, solução oxidante, exposição fotolítica e íons metálicos. Para nenhuma das condições há indicações dos limites de exposição (*endpoints*), isso porque, existe uma falta de harmonização de tais informações, até mesmo na literatura científica. Portanto, a ANVISA preconiza que a determinação os limites de exposição e da concentração dos degradantes a serem utilizados nos estudos deve ser feita baseada em referências e justificada na petição (BRASIL, 2015a).

Além disso, segundo a RDC 53/2015, os estudos de degradação forçada devem promover degradação em extensão suficiente, de forma que, permita a avaliação da formação de produtos de degradação. Para tal, a degradação deve ser superior a 10% (dez por cento) e inferior àquela que levaria à degradação completa da amostra, comprometendo o teste. Nos testes em que a degradação não atingiu 10% (dez por cento), a empresa deve apresentar justificativa técnica (BRASIL, 2015a).

Os resultados dos ensaios experimentais servem de base para o desenvolvimento e validação da metodologia indicativa de estabilidade e para a análise crítica do perfil de degradação do medicamento (BRASIL, 2015a).

A resolução também inclui que os testes e os resultados precisam ser refeitos e reapresentados caso haja alterações ou inclusões na rota de síntese do IFA ou mudanças na composição do produto acabado. No caso de mudanças no excipiente, que não comprometa o estudo de degradação forçada já realizado e nem possua possibilidade de formação de novos produtos de degradação, o estudo não precisa ser realizado novamente, porém é necessário justificativa técnica (BRASIL, 2015a).

Ainda segundo a RDC 53/2015, durante o estudo de degradação deve ser avaliada a necessidade de notificação, identificação e qualificação dos produtos de degradação, que correspondem as classificações para os limites de impurezas, em que, as mesmas deverão ser reportadas para a agência em caso de notificação, ter sua estrutura química identificada por métodos apropriados em caso de identificação e estabelecido seu perfil de segurança através da avaliação de segurança biológica em caso de qualificação, com base nas informações da tabela 1 (BRASIL, 2015a).

Tabela 1 - Relação entre dose máxima diária do fármaco e limites dos produtos de degradação para notificação, identificação e qualificação na ANVISA

Tipo de limites	Dose máxima diária ¹	Limites ²
Limites de Notificação	≤ 1g	0,1%
	> 1g	0,05%
Limites de Identificação	< 1mg	1,0% ou 5µg ATD, o que for menor
	1mg – 10mg	0,5% ou 20µg ATD, o que for menor
	> 10mg – 2g	0,2% ou 2mg ATD, o que for menor
	> 2g	0,10%
Limite de Qualificação	< 10mg	1,0% ou 50µg ATD, o que for menor
	10mg – 100mg	0,5% ou 200µg ATD, o que for menor
	>100mg – 2g	0,2% ou 3mg ATD, o que for menor
	> 2g	0,15%

Onde:

¹ Quantidade máxima do insumo farmacêutico ativo administrado por dia.

² Limites dos produtos de degradação são expressos como a percentagem do insumo farmacêutico ativo ou como a Administração Total Diária (ATD) de um produto de degradação.

Fonte: Adaptado de BRASIL (2015a).

Os limites de aceitação para os produtos de degradação e o limite para cada produto individual, bem como, o limite total de produtos de degradação, devem estar incluídos nas especificações de liberação do medicamento e do estudo de estabilidade (BRASIL, 2015a).

Além da resolução 53/2015, existem documentos complementares publicados com o objetivo de melhorar o entendimento sobre a legislação, sendo eles o Guia 04/2015 e o Perguntas e respostas sobre a RDC 53/2015. Os documentos complementares não conferem ou criam novas obrigações, devendo ser utilizados como referência para cumprimento legislativo. O Guia 04/2015 expressa o entendimento da ANVISA sobre as melhores práticas com relação a procedimentos, rotinas e métodos considerados adequados para cumprimento dos requisitos exigidos na legislação, contendo recomendações que podem ser abordadas de forma alternativa, desde que atenda as exigências da legislação e o Perguntas e respostas sobre a RDC 53/2015 esclarece as perguntas mais frequentes recebidas pela ANVISA e aborda os assuntos

divididos em sessões que esclarecem as questões conceituais, práticas, de requisitos quanto às especificações e métodos de análise, além das questões sobre registro e pós-registro dos produtos farmacêuticos (FACCI et al, 2020; ANVISA, 2015b).

2.2.4 Classificação das impurezas

Impureza, segundo a RDC nº 53, de 4 de dezembro de 2015, é qualquer componente presente no IFA ou no produto acabado que não seja o insumo farmacêutico ativo nem os excipientes (BRASIL, 2015a).

O ICH define em seus guias que as impurezas relacionadas a fármacos e medicamentos podem ser classificadas em impurezas orgânicas, inorgânicas e solventes residuais (ICH Q3A, 2006; ICH Q3B, 2006; ICH Q3C, 2019).

As impurezas orgânicas estão relacionadas ao processo de produção e/ou a degradação do IFA e/ou do produto. Podem ser impurezas conhecidas ou desconhecidas, voláteis e não-voláteis e incluem materiais de partida utilizados para a síntese do IFA, subprodutos formados durante o processo de síntese, intermediários sintéticos e produtos de degradação (ICH Q3A, 2006; ICH Q3B, 2006).

As impurezas inorgânicas são impurezas conhecidas e identificadas, geralmente oriundas do processo de produção. Incluem reagentes, ligantes, catalisadores, metais pesados ou outros metais residuais e sais inorgânicos (ICH Q3A, 2006; ICH Q3B, 2006).

São consideradas impurezas conhecidas aquelas que podem ser encontradas por meio de informações bibliográficas, publicações dos fabricantes, ou ainda, em artigos acadêmicos. Do ponto de vista analítico, são impurezas de baixa complexidade, pois por estarem presentes na literatura, provavelmente possuem métodos analíticos para sua identificação e quantificação (LEITE, 2009).

Já as impurezas de degradação ou produtos de degradação são substâncias formadas pela exposição do IFA ou da formulação a condições que favoreçam a interação das moléculas e a ocorrência de reações de degradação. São consideradas complexas analiticamente e necessitam de estudos de estabilidade para seu acompanhamento (LEITE, 2009).

Por fim, os solventes residuais são substâncias orgânicas voláteis usados ou produzidos no processo de fabricação do IFA, excipientes e produtos farmacêuticos. São utilizados com o objetivo de aumentar o rendimento, determinar as características

do cristal, da pureza e da solubilidade. Entretanto, o uso dos solventes deve sempre ser avaliado e justificado pois estes compostos apresentam toxicidade (ICH Q3C, 2016).

Baseado no risco, para o ser humano e para o meio ambiente, que cada solvente pode causar, eles são classificados em três classes: Classe 1, toxicidade inaceitável; Classe 2, toxicidade aceitável; e Classe 3, não tóxicos ou pouco tóxicos (ICH Q3C, 2016).

Sobre os procedimentos analíticos adotados para determinação de cada tipo de impureza, os guias estabelecem que devem ser utilizados métodos adequados e validados para detecção e quantificação das impurezas potenciais para o ativo e o produto (ICH Q3A, 2006; ICH Q3B, 2006).

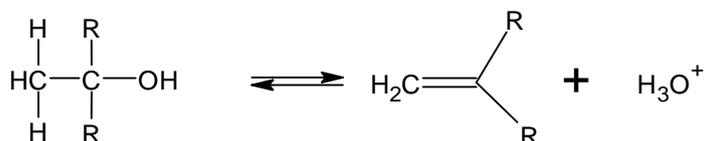
Usualmente as análises de impurezas orgânicas são realizadas por meio de cromatografia líquida, enquanto as impurezas inorgânicas por ICP-MS e os solventes residuais por cromatografia gasosa (LEITE, 2009).

2.2.5 Rotas mais comuns de degradação

As formulações farmacêuticas são multicomponentes e várias reações de degradação podem ocorrer simultaneamente. Dentre as rotas mais comuns de degradação de fármacos estão: eliminação/desidratação, substituição nucleofílica, racemização/epimerização, descarboxilação, hidrólise e oxidação (MOREIRA, 2020).

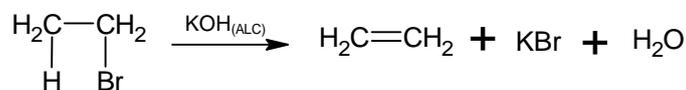
Na eliminação/desidratação ocorre uma reação em que um grupo é eliminado da molécula, resultando na formação de uma dupla ligação, produzindo alcenos. Os grupos mais susceptíveis a essa forma de degradação são os álcoois e haloalcanos, conforme pode ser observado nos esquemas 1 e 2 (MOREIRA, 2020).

Esquema 1 - Reação de eliminação em álcoois



Fonte: Autoria própria.

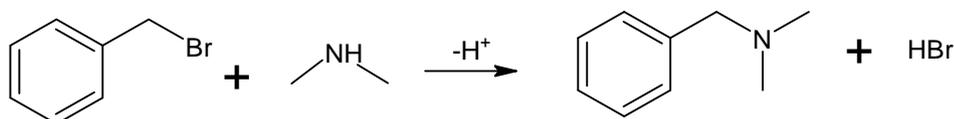
Esquema 2 - Reação de eliminação em haloalcanos



Fonte: Autoria própria.

Na substituição nucleofílica um grupo ou átomo é substituído por um nucleófilo, sendo os halogênios o grupo mais susceptível a tal reação, conforme ilustrado no esquema 3 (MOREIRA, 2020).

Esquema 3 - Reação de substituição nucleofílica em haloalcanos



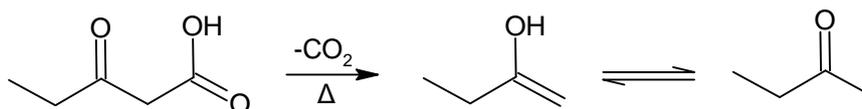
Fonte: Autoria própria.

Já a racemização/epimerização envolve a transformação de uma substância opticamente ativo em intermediários quirais (SOLOMONS, 2001). Essa é uma importante reação de degradação, uma vez que, pode causar diminuição da atividade biológica, ou mesmo trazer efeitos adversos (MOREIRA, 2010).

Na racemização, moléculas contendo um único centro quiral resultam na formação de um par de enantiômeros, enquanto na epimerização ocorre a racemização de um centro quiral em moléculas contendo mais de um carbono assimétrico resultando na formação de um diastereoisômero. Os grupos funcionais susceptíveis a reações de racemização/epimerização envolvem os compostos com centros quirais com hidrogênios ácido, compostos com centros quirais próximos a duplas ligações e anéis aromáticos e, centros quirais passíveis de formação de carbocátion (MOREIRA, 2020).

A descarboxilação, ocorre quando uma reação leva a perda de uma molécula de gás carbônico. Normalmente acontece na clivagem de um ácido carboxílico, conforme esquema 4, e é uma importante reação na degradação de análogos do ácido salicílico. Essa reação tem os compostos β -cetoácidos e seus similares como grupos funcionais susceptíveis (SOLOMONS, 2001; MOREIRA, 2020).

Esquema 4 - Reação de descarboxilação em ácido carboxílico



Fonte: Autoria própria.

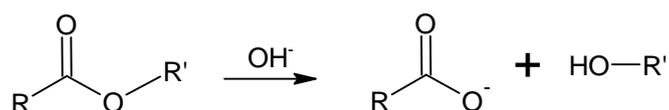
A hidrólise consiste em uma reação em que uma ligação simples é clivada pela adição de uma molécula de água. Apesar de só requerer o IFA e a água, ela pode ser

significativamente catalisada por ácidos e bases. É a degradação mais previsível em fármacos e são mais favoráveis em ésteres e lactonas (ésteres cíclicos) e amidas e lactamas (amidas cíclicas). Também pode ocorrer em nitrilas, carbamatos, imidas, iminas, éteres e tioéteres (MOREIRA, 2020).

Os compostos contendo ésteres e lactonas são hidrolisados, primariamente pelo ataque nucleofílico do íon hidroxila ou da água à carbonila do éster, em ácido carboxílico e álcool, como pode ser observado nos esquemas 5 e 6. A velocidade de degradação nesta reação depende dos substituintes R e R', em que os grupos retiradores de elétrons favorecem a hidrólise enquanto os doadores a inibem (BAERTSCHI et al, 2005).

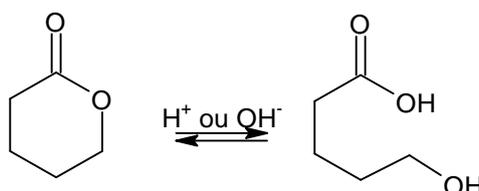
A estabilidade de ésteres e lactonas depende fortemente do pH, já que ácidos fortes ou bases fortes aumentam a hidrólise (BAERTSCHI et al, 2005).

Esquema 5 - Reação de hidrólise de ésteres em meio alcalino.



Fonte: Autoria própria.

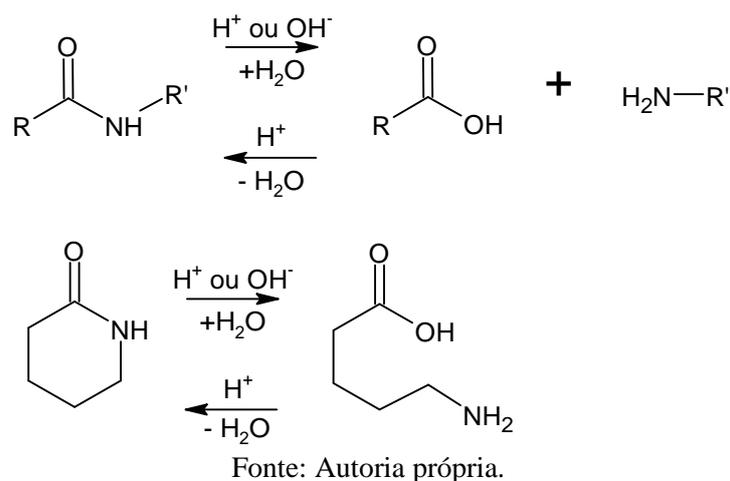
Esquema 6 - Reação de hidrólise de lactonas catalisado por ácido e base.



Fonte: Autoria própria.

Já o grupamento amida é menos eletrofílico e mais estável, quando comparado aos ésteres, e, por consequência, menos susceptível à hidrólise. Em contato com a água as amidas são decompostas em aminas e ácidos, enquanto as lactamas são decompostas em ácidos, conforme ilustrado no esquema 7 (BAERTSCHI et al, 2005).

Esquema 7 - Reação de hidrólise de amidas e lactamas.

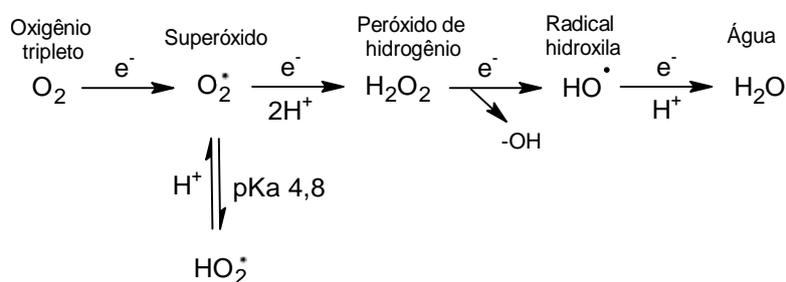


A oxidação é uma das mais complexas rotas de degradação de fármacos e envolve a remoção de um átomo eletrorrepelente, radical ou elétron, ou a adição de um átomo eletronegativo ou radical. Os grupos comuns mais susceptíveis são os grupos benzílicos e alílicos, aminas e álcoois (FERRAZ, 2016).

Na grande maioria dos casos a reação de oxidação ocorre espontaneamente, lentamente no início e mais rapidamente no decorrer, como uma reação em cadeia, devido à presença de oxigênio molecular (O_2) no ar. Tal processo é conhecido como auto oxidação (MATTOS, 2017).

Para que a reação se inicie, a condição fundamental necessária é a formação de espécies reativas de oxigênio como o ânion radical superóxido, peróxido de hidrogênio e o radical livre hidroxila (esquema 8) (LEITE, 2009).

Esquema 8 - Diferentes espécies reativas de oxigênio



A formação das espécies reativas de oxigênio, em especial o radical livre hidroxila, pode ser catalisada por íons metálicos de transição, como o cobre II e o ferro

III, e passa a ser conhecida como auto oxidação mediada por radical livre (esquema 9) (MATTOS, 2017).

Esquema 9 - Formação de radicais mediada por metais



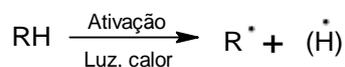
Fonte: Autoria própria.

Na reação de formação dos radicais por metais, o íon metálico atua como doador de elétrons para ativar o oxigênio molecular e a formação das espécies reativas. A reação de oxidação também pode ocorrer por meio da presença peróxido de hidrogênio, mas sem a formação de radicais, nomeada como reação de oxidação não mediada por radicais ou não radicalar (MATTOS, 2017).

Os mecanismos de oxidação dependem da estrutura química de cada fármaco, mas, por via de regra, envolvem transferência de elétrons para formar ânions reativos e cátions. O mecanismo mais comum para a degradação oxidativa é o da auto oxidação, que pode ser dividida em quatro fases (LEITE, 2005; NETO, 2018).

A primeira fase é caracterizada pela decomposição das substâncias presentes, possivelmente por ação da luz, altas temperaturas ou íons metálicos formando radicais livres (esquema 10) (SANTOS, 2012).

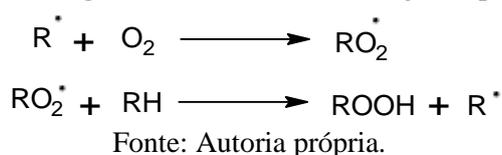
Esquema 10 - Primeira fase da auto oxidação – iniciação.



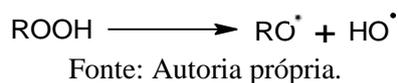
Fonte: Autoria própria.

Na segunda e terceira etapas, os radicais livres formam os compostos primários da oxidação (peróxidos e hidroperóxidos) que, pela mesma reação, são formados exponencialmente conforme ilustrado nos esquemas 11 e 12 (SANTOS, 2012).

Esquema 11 - Segunda fase da auto oxidação – propagação.

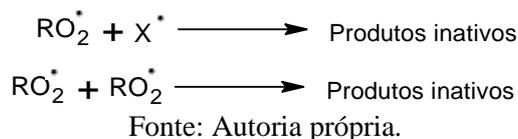


Esquema 12 - Terceira fase da auto oxidação - decomposição em alcoxila e hidroxila.



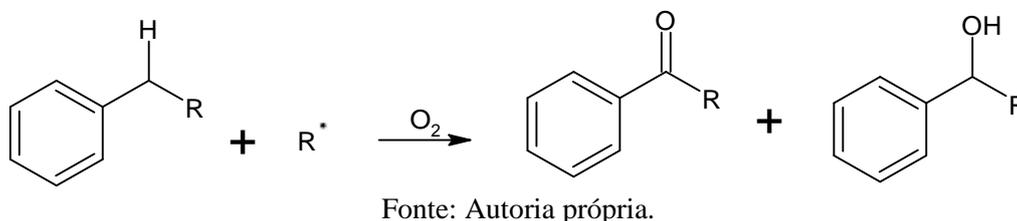
Já na quarta fase, devido à instabilidade compostos primários gerados, ocorre a degradação dos mesmos em aldeídos, cetonas, álcool, sulfonas e outros compostos. O processo termina quando ocorre a reação entre dois radicais derivados das substâncias iniciais, que forma produtos inativos e incapazes de gerar novos radicais livres, conforme mostrado no esquema 13 (KEMIN, 2018; SANTOS, 2012).

Esquema 13 - Quarta fase da auto oxidação - terminação



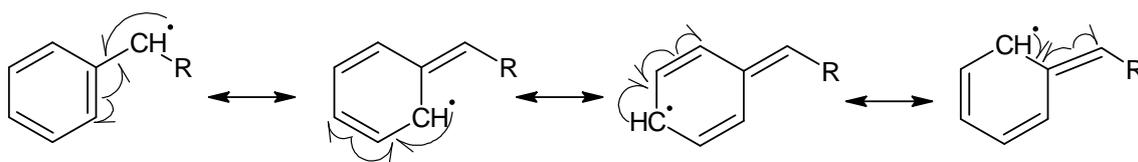
O grupo benzílico costuma ser estável na maioria das condições, mas pode sofrer degradação oxidativa via radicalar, conforme mostrado no esquema 14 (BAERTSCHI et al, 2005).

Esquema 14 - Reação de oxidação de grupos benzílicos



A susceptibilidade do grupo benzílico à oxidação é devido a ligação C-H de carbonos benzílicos ser mais fraca do que de carbonos sp^3 , pois a formação de radical é estabilizada por ressonância com o anel aromático, como pode ser observado no esquema 15 (BAERTSCHI et al, 2005).

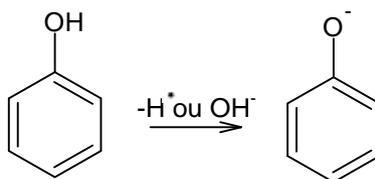
Esquema 15 – Estabilização do radical benzílico por ressonância



Fonte: Autoria própria.

Os fenóis são conhecidos por sofrerem oxidação facilmente, pois a hidroxila é fortemente doadora de elétrons para o anel fenil e é a chave para a oxidação do anel. A abstração do átomo de hidrogênio fornece um radical particularmente estável que pode levar à reação com o oxigênio molecular, conforme mostrado no esquema 16. A desprotonação do fenol em pH alto em ânion fenolato catalisa muito o processo de auto oxidação, permitindo a reação direta com o oxigênio molecular (auto oxidação catalisada por base) (BAERTSCHI et al, 2005).

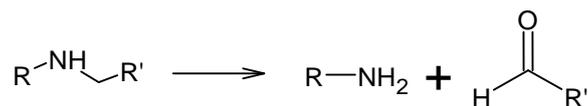
Esquema 16 - Reação de oxidação de fenóis



Fonte: Autoria própria.

Já as aminas são susceptíveis a formação de radical na ligação C-N. Quando as aminas estão desprotonadas (ou seja, na forma neutra de "base livre"), elas são nucleofílicas, mais facilmente oxidadas e mais voláteis. O processo de oxidação desse grupo via radicalar leva à formação de intermediário imina que pode sofrer hidrólise, conforme mostrado no esquema 17 (BAERTSCHI et al, 2005).

Esquema 17 - Reação de desalquilação oxidativa de aminas

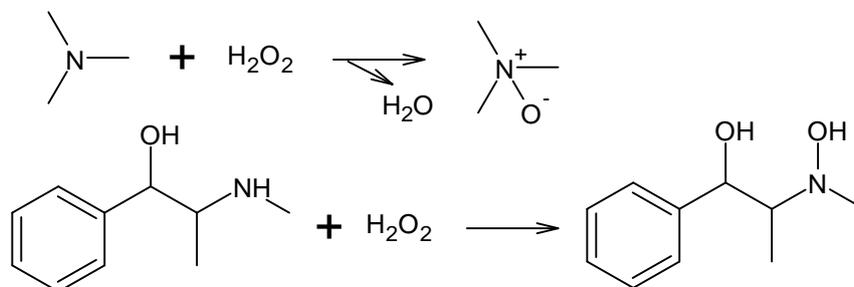


Fonte: Autoria própria.

As aminas também podem sofrer oxidação por ataque nucleofílico, onde os seus pares de elétrons livres podem reagir com peróxidos ou hidroperóxidos. Nesse tipo de

mecanismo, as aminas terciárias reagem formando N-óxidos enquanto as secundárias hidroxilaminas, conforme esquema 18 (MOREIRA, 2020; BAERTSCHI et al, 2005).

Esquema 18 - Reação de oxidação por ataque nucleofílico de aminas terciárias e secundárias.



Fonte: Autoria própria.

2.2.6 Condições de estresse

2.2.6.1. Hidrólise

A água é considerada um dos reagentes mais predominantes em reações de degradação. Diversos fármacos são considerados instáveis em meio aquoso, tornando indispensável intervenções durante a formulação e armazenamento. Para que a eficácia e a estabilidade do produto final sejam mantidas, a água pode ser substituída por outros excipientes, como o propilenoglicol, desde que haja compatibilidade do fármaco com o novo excipiente (FERRAZ, 2016; GONÇALVES, 2014).

A água necessária para essa reação pode estar presente em níveis significativos na formulação, nos próprios IFAs na forma de hidratos, nos excipientes e também no ambiente em que se encontra a amostra. Ela pode participar da reação de duas formas, como reagente ou como solvente. Nos medicamentos sólidos pode aderir à superfície do produto, formando uma camada de água que pode dissolver a substância e degradá-la (ARANTES, 2018).

As reações de hidrólise são afetadas pela temperatura, sais, tampão, força iônica, solventes e outros aditivos tais como agentes complexantes, agentes tensoativos e excipientes, que podem aumentar ou diminuir a velocidade das reações. Entretanto, a hidrólise é tipicamente catalisada por ácidos ou bases, conseqüentemente, essas são as condições utilizadas para induzir as reações hidrolíticas nos estudos de degradação forçada. Tais condições são especialmente importantes quando a molécula a ser testada

tiver grupos funcionais que possam existir em diferentes estados ionizados em meio aquoso (FERRAZ, 2016; CALDEIRA, 2014).

Nos estudos de degradação forçada, a abordagem prática consiste em expor a amostra, em solução, a uma ampla faixa de pH. De acordo com o Guia nº4, versão 1, de 04 de dezembro de 2015, recomenda-se que a hidrólise ácida seja conduzida utilizando-se uma solução tampão em pH abaixo de 7,0 ou um ácido mineral, como ácido clorídrico (HCl) e a hidrólise alcalina seja conduzida utilizando-se uma solução tampão em pH acima de 7,0 ou um hidróxido de metal alcalino, como hidróxido de sódio (NaOH). O uso de temperaturas elevadas até o limite de aproximadamente 70°C pode ser usado para acelerar as reações hidrolíticas (BRASIL, 2015b).

A escolha da faixa de pH a ser utilizada, de forma que cause uma degradação aceitável, depende da reatividade química de cada molécula do fármaco a ser avaliado. Alguns fármacos podem não ser solúveis em determinada faixa de pH escolhida para a análise, e nesses casos, a amostra é avaliada em suspensão, através da adição de um co-solvente ou ajuste do pH para facilitar a dissolução. A seleção do co-solvente é baseada na estrutura química do fármaco e deve-se evitar o uso daqueles que possam interagir com a solução estressante e/ou com o IFA, sendo os mais utilizados o metanol e a acetonitrila (FERRAZ, 2016; ARANTES, 2018).

2.2.6.2. Oxidação

A degradação por oxidação também é considerada um dos mecanismos mais comuns em fármacos, uma vez que o oxigênio que participa da maioria das reações e é abundante no ambiente. Além disso, é uma das principais causas de instabilidade, principalmente nos fármacos das classes dos esteroides, antibióticos, vitaminas, óleos e gorduras. A oxidação precisa ser bem controlada devido à natureza das reações químicas, já que seus intermediários são, com frequência, termicamente instáveis e podem se decompor por meio de vias alternativas em temperaturas elevadas. Essa decomposição acontece porque a ligação O-O é fraca e pode ser clivada e levar à formação de radicais hidroxila, que são agentes oxidantes mais reativos (MATTOS, 2017; CALDEIRA, 2014; VALLE, 2019).

Para que a estabilidade de fármacos seja mantida em relação as condições oxidativas, são necessárias diversas precauções durante a manufatura e estocagem. Em recipientes farmacêuticos, o oxigênio deve ser substituído por nitrogênio ou dióxido de

carbono e deve-se evitar o contato com íons de metais pesados, que catalisam a oxidação. Além disso, a estocagem deve acontecer em temperaturas reduzidas (FERRAZ, 2016).

De acordo com o Guia nº4, versão 1, de 04 de dezembro de 2015, para mimetizar as vias oxidativas em estudos de estresse, são utilizados peróxido de hidrogênio, outros agentes oxidantes como íons metálicos de Cu II ou Fe III ou compostos orgânicos capazes de gerar radicais, como o AIBN (Azobisisobutironitrila). De modo análogo ao citado para as hidrólises é permitido uso de co-solventes caso o IFA não seja solúvel na solução de agente estressante, entretanto, tomando-se sempre a precaução de não se utilizar substâncias que possam interagir com o agente de estresse (BRASIL, 2015b; ARANTES, 2018).

2.2.6.3. Termólise

Dentre os fatores ambientais envolvidos na degradação de produtos farmacêuticos, a temperatura é o mais importante, uma vez que, o aumento da temperatura pode oferecer energia suficiente para acelerar a degradação de fármacos. Essa influência pode ser reduzida pela correta seleção da forma de armazenamento, que pode ser feita em temperatura ambiente, em resfriamento ou congelamento (LEITE, 2005).

As reações de degradação termolítica ocorrem devido à exposição ao calor ou a temperaturas elevadas e são caracterizadas pela ruptura de ligações químicas, conhecido como pirólise. No contexto da degradação de fármacos, o termo é usado para descrever qualquer reação que ocorra em temperaturas elevadas, como hidrólise/desidratação, isomerização/epimerização, descarboxilação, rearranjos e alguns tipos de reações de polimerização (GONÇALVES, 2014; MATTOS, 2017).

Na termólise, o aumento da velocidade das reações ocorre em função do aumento da temperatura porque a distribuição de energias cinéticas moleculares em temperaturas mais elevadas se desloca no sentido de se ter um número maior de moléculas rápidas, ou seja, com energia igual ou superior à energia de ativação da substância. Dessa forma, a energia mínima para que a reação possa ocorrer é atingida, favorecendo a degradação por diversas vias termolíticas (LEITE, 2005).

A expressão mais utilizada para a avaliação da relação entre a velocidade das reações químicas e a temperatura para uma dada ordem de reação é a equação de

Arrhenius (equação 1). A partir dela é possível estimar o efeito da temperatura sobre a velocidade de degradação de uma substância, desde que, se conheça sua energia de ativação (GONÇALVES, 2014).

$$K = A \cdot e^{\frac{-E_a}{R.T}}$$

Onde:

K é a constante de velocidade;

A é o fator de frequência;

R é a constante universal dos gases;

T é a temperatura em Kelvin, e;

E_a é a energia de ativação.

De acordo com o Guia nº4, versão 1, de 04 de dezembro de 2015, para o estudo de degradação forçada os medicamentos devem ser submetidos ao aquecimento sem aumento de umidade no ambiente e sem dissolver o produto (térmica seca) e ao aquecimento com umidade relativa controlada e acima da umidade ambiente (térmica úmida). Recomenda-se utilizar uma temperatura maior do que aquela utilizada no estudo de estabilidade acelerada (> 40 °C) ou temperatura igual a de esterilização do medicamento (BRASIL, 2015b; ARANTES, 2018).

2.2.6.4. Fotólise

A luz é outro fator ambiental envolvido na degradação de fármacos, visto que, em determinados comprimentos de onda podem fornecer energia necessária para desencadear inúmeras reações. A proteção à influência da luz pode ser alcançada por meio de embalagens especiais que sejam capazes de bloquear a passagem de luz, adição de complexantes ou aditivos que absorvem a radiação através da competição com o princípio ativo, manipulação a baixa luz, estocagem no escuro e revestimento protetor nas formulações de comprimidos. Essas estratégias podem ser adotadas em qualquer fase da produção de um medicamento, inclusive no produto acabado (LEITE, 2005; ARANTES, 2018).

A primeira lei da fotoquímica afirma que “apenas a radiação que é absorvida por uma molécula pode efetivamente produzir mudanças químicas na molécula”. Isso significa que a taxa de fotodegradação é diretamente dependente da quantidade de

radiação incidente e da quantidade de radiação absorvida pelas moléculas (CALDEIRA, 2014).

Portanto, a reação de fotólise é resultado da absorção de radiação eletromagnética, principalmente na região do ultravioleta e visível, pela maioria dos IFAs ou por algum agente na formulação. A fotodegradação de fármacos depende das propriedades espectrais da substância, como também, da distribuição espectral da fonte de luz (VALLE, 2019).

De acordo com a equação 2, quanto menor o comprimento de onda (λ) da radiação mais energia é absorvida por mol de reagente. Dessa forma, as radiações absorvidas na gama do UV e violeta (300 a 800 nm) contribuem mais facilmente para o início de reações químicas do que aquelas com comprimento de onda maiores (LACHMAN et al, 2001).

Eq. 1

$$E = 2,859 \times \frac{10^5}{\lambda_{kcal.mol^{-1}}}$$

A energia absorvida pelos fármacos, quando maior que a energia de ativação, promove a quebra de ligações resultando nas reações de degradação, tais como, oxidação, redução, rearranjo de anéis, polimerização e isomerização. A cinética e os mecanismos de tais reações são mais complexas do que a das reações térmicas, pois dependem de um número mais alto de variantes (LACHMAN et al, 2001).

Os principais grupos funcionais que apresentam sensibilidade à luz são os grupos carbonila, nitroaromáticos, fenóis, alcenos, sulfetos, polienos e as funções N-óxido e cloretos de arila (NETO, 2018).

De acordo com o Guia nº4, versão 1, de 04 de dezembro de 2015, para o estudo de degradação forçada os medicamentos devem ser submetidos a fotólise variando a quantidade de lux hora e/ou watt hora por metro quadrado. O guia de fotoestabilidade do ICH recomenda realizar a exposição das amostras a no mínimo 1,2 milhões de lux hora e 200 watt hora por metro quadrado. O estudo deve ser conduzido em câmeras com emissão de luz ultravioleta e fluorescente e o tempo de exposição depende da intensidade da luz que será emitida (BRASIL, 2015b; ARANTES, 2018).

2.3 Estudo de degradação forçada para Epinefrina IFA e solução injetável

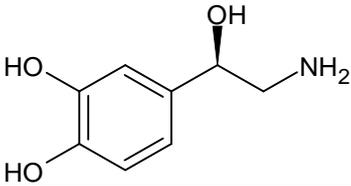
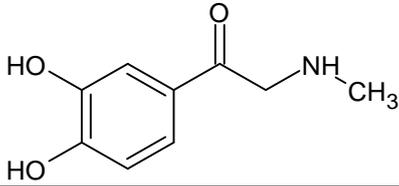
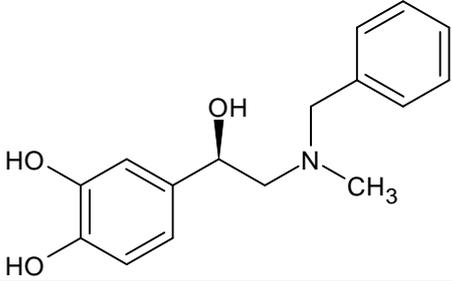
2.3.1 Impurezas conhecidas para o ativo Epinefrina

Algumas impurezas dos insumos farmacêuticos ativos e soluções injetáveis possuem suas estruturas elucidadas, identificadas e quantificadas por meio de métodos

adequados. Tais impurezas são chamadas de impurezas conhecidas e são indicadas nas monografias compendiais de cada ativo (BERNARDES, 2012).

As monografias compendiais da Epinefrina, tais como a Farmacopeia Americana e a Farmacopeia Europeia, listam as impurezas conhecidas para o ativo em questão, conforme demonstrado no quadro 3.

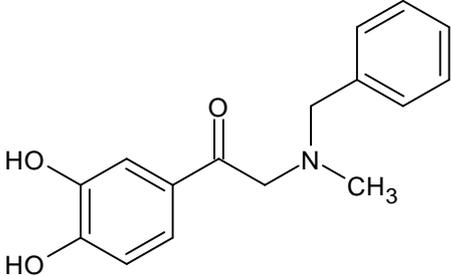
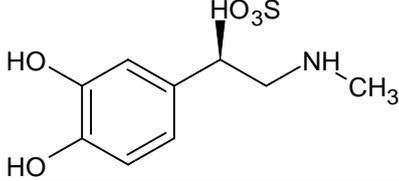
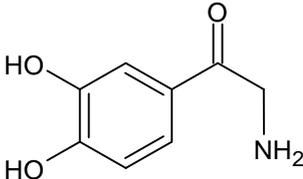
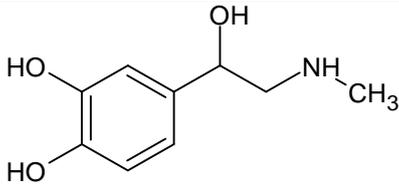
Quadro 3 - Lista de impurezas conhecidas da epinefrina

Impureza	Características físico-químicas	
EP Impureza B	Nome químico	(1R)-2-amino-1-(3,4- dihydroxyphenyl)ethanol
	Fórmula estrutural	
	Outros nomes	Noradrenalina, Norepinefrina
	Definição	Impureza de reação secundária, impureza de síntese/degradação.
EP Impureza C	Nome químico	1-(3,4-dihydroxyphenyl)-2-(methylamino)ethanone
	Fórmula estrutural	
	Outros nomes	Adrenalona
	Definição	Intermediário de reação, impureza de síntese/degradação.
EP Impureza D	Nome químico	4-[(1R)-2-(benzylmethylamino)-1-hydroxyethyl]benzene-1,2-diol
	Fórmula estrutural	
	Outros nomes	N-Benzil Epinefrina, Rac-adrenalina
	Definição	Impureza de reação secundária, impureza de síntese.

Continua

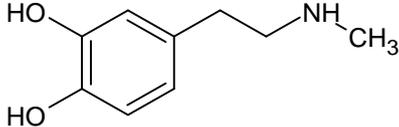
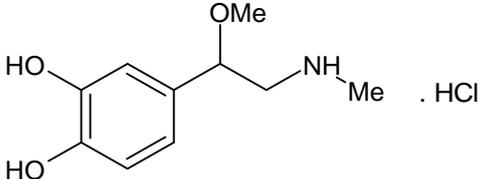
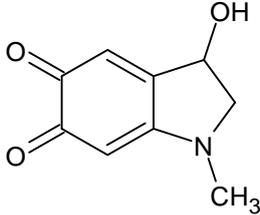
Quadro 3 - Lista de impurezas conhecidas da Epinefrina

Continuação

Impureza	Características físico-químicas	
EP Impureza E	Nome químico	2-(benzylmethylamino)-1-(3,4-dihydroxyphenyl)ethan-1-one
	Fórmula estrutural	
	Outros nomes	N-Benzil Adrenalona
	Definição	Impureza de reação secundária, impureza de síntese.
EP Impureza F	Nome químico	(1 <i>R</i>)-1-(3,4-dihydroxyphenyl)-2-(methylamino)ethanesulfonic acid.
	Fórmula estrutural	
	Outros nomes	Epinefrina ácido sulfônico
	Definição	Impureza de reação secundária, impureza de síntese/degradação.
Arterenona	Nome químico	2-Amino-1-(3,4-dihydroxyphenyl)-ethanone
	Fórmula estrutural	
	Outros nomes	Noradrenalona
	Definição	Impureza de reação secundária, impureza de síntese/degradação.
Oxedrina (USP)	Nome químico	1-(4-Hydroxyphenyl)-2-(methylamino)etanol
	Fórmula estrutural	
	Outros nomes	Sinefrina
	Definição	-

Quadro 3 - Lista de impurezas conhecidas da Epinefrina

Conclusão

Impureza	Características físico-químicas	
Epinina (USP)	Nome químico	4-[2-(Methylamino)ethyl]benzene-1,2-diol
	Fórmula estrutural	
	Outros nomes	Desoxiadrenalina, desoxiepinefrina, N-Metildopamina
	Definição	Impureza de reação secundária, impureza de síntese/degradação.
Análogo de metoxi epinefrina (USP)	Nome químico	4-(1-methoxy-2-(methylamino)ethyl) benzene-1, 2-diol hydrochloride
	Fórmula estrutural	
	Outros nomes	Não se aplica
	Definição	-
Adrenocromo	Nome químico	3-hydroxy-1-methyl-2,3-dihydro-1H-indole-5,6-dione
	Fórmula estrutural	
	Outros nomes	Não se aplica
	Definição	Impureza de degradação

Fonte: UNITED; 2020; EUROPEAN, 2013; SZULCZEWSKI; HONG, 1978

2.3.2 Possíveis rotas de degradação da Epinefrina

A epinefrina pertence a classe das catecolaminas. Esta classe de substância contém um grupo catecol (um anel benzeno com dois grupos hidroxila) ligado a um grupo álcool e um grupo amina (FAROOQUI, 2016).

No estado sólido, a epinefrina é um composto relativamente estável, entretanto é susceptível a decomposição. Portanto, algumas precauções especiais durante a síntese da base livre, forma de base conjugada (desprotonada) de uma amina, devem ser tomadas e o material obtido deve ser armazenado sob condições reguladas como

atmosfera de nitrogênio, frascos âmbar e umidade controlada (SZULCZEWSKI; HONG, 1978).

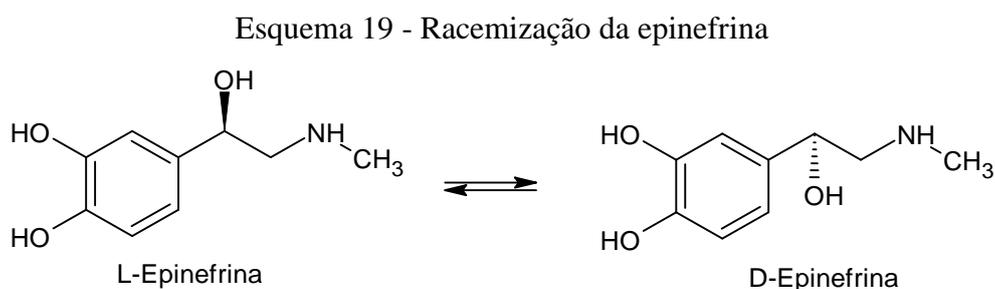
No entanto, as soluções injetáveis da epinefrina são muito instáveis e sua degradação acontece pela oxidação do grupo catecol e grupo alcoólico, por racemização e reações com os componentes auxiliares das formulações (STEPENSKY et al, 2003; ABREU et al, 2020).

As reações de degradação da epinefrina podem ser catalisadas por alterações de pH da solução, exposição a oxigênio, contato com íons metálicos, exposição a luz e temperaturas elevadas. Além disso, sua estabilidade também pode ser afetada pela presença de aditivos, concentração do ativo na solução e tempo de armazenamento (HOELLEIN; HOLZGRABE, 2012; CHURCH et al, 1994).

A epinefrina racemiza a uma taxa considerável, mesmo em temperatura ambiente. A racemização da molécula, mostrada no esquema 19, é catalisada em condições ácidas, o que se torna uma consideração importante no desenvolvimento da formulação, uma vez que, a acidez da solução injetável é utilizada para ajudar a prevenir a oxidação e aumentar a solubilidade da molécula (SZULCZEWSKI; HONG, 1978; YOSHIOKA; STELLA, 2002).

Em pH igual ou menor a 3,5, a racemização ocorre por uma reação de substituição nucleofílica do tipo S_N1 , uma vez que, o carbocátion formado pode ser estabilizado por ressonância com o anel aromático o que é favorecido pela presença de OH na posição para (YOSHIOKA; STELLA, 2002).

Acredita-se que essa reação (esquema 19) ao ser catalisada por ácido, ocorra pela rápida protonação do átomo de oxigênio alcoólico secundário, seguido pela eliminação da hidroxila em forma de água. O ataque de uma segunda molécula de água ao carbocátion secundário resulta na produção de uma mistura racêmica (YOSHIOKA; STELLA, 2002).

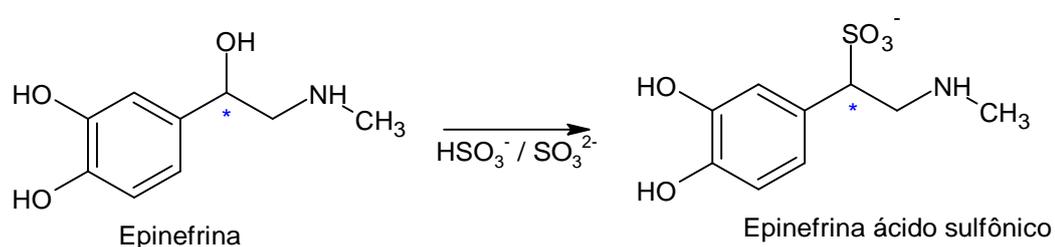


Fonte: Autoria própria.

Os íons sulfito, como bissulfito ou metabissulfito de sódio, são muito utilizados como antioxidantes em formulações aquosas para atrasar a oxidação e diminuir a formação da cor (HOELLEIN; HOLZGRABE, 2012; SZULCZEWSKI; HONG, 1978).

No entanto, os íons sulfito podem atacar a molécula de epinefrina via mecanismo S_N2 em valores de pH maiores que 5, formando epinefrina ácido sulfônico (sulfonato de L- ou D-adrenalina), que não possui efeito farmacológico, mas é inofensivo (HOELLEIN; HOLZGRABE, 2012; SZULCZEWSKI; HONG, 1978).

Esquema 20 - Reação de substituição e adição da epinefrina por bissulfito.

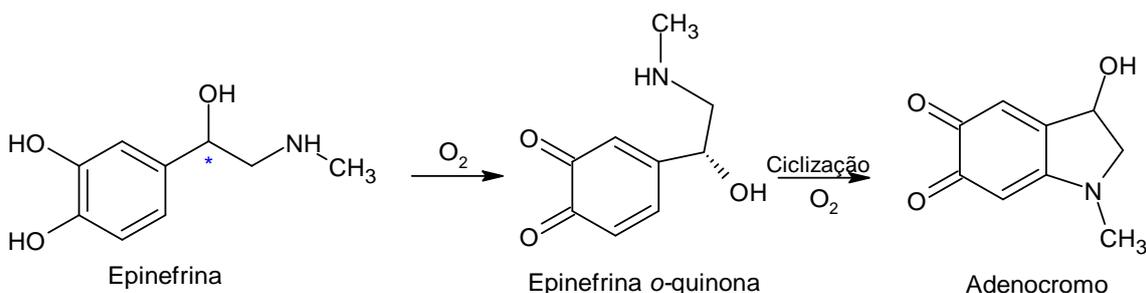


Fonte: Autoria própria.

Como a epinefrina é um o-difenol contendo os grupos hidroxilas vicinais, é um ótimo agente redutor. Por isso, é facilmente oxidado por agentes oxidantes como o oxigênio molecular e íons metálicos, além de ser uma reação de degradação favorecida por condições básicas, fotolíticas e por compostos auxiliares presentes nas formulações (HOELLEIN; HOLZGRABE, 2012; SZULCZEWSKI; HONG, 1978).

A oxidação da epinefrina pelo oxigênio molecular ocorre através da formação transitória da epinefrina quinona com formação do composto adrenocromo, que é fortemente colorido, conforme ilustrado no esquema 21 (BAERTSCHI et al, 2005; YOSHIOKA; STELLA, 2002).

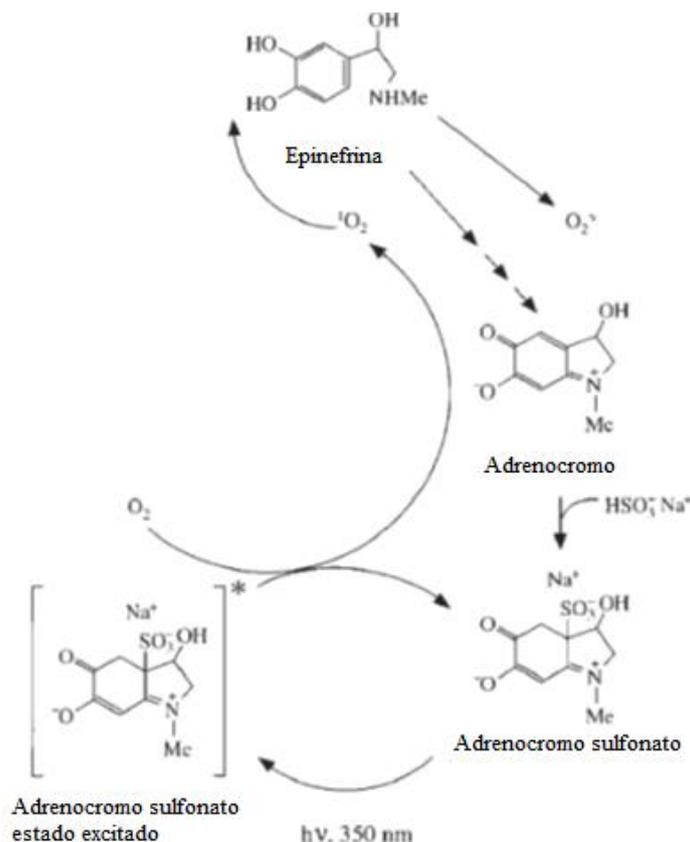
Esquema 21 - Reação de oxidação da epinefrina por oxigênio molecular



Fonte: Autoria própria.

A oxidação da epinefrina pode ser favorecida pela exposição a luz e presença de íons sulfito, simultaneamente. Brustugun et al (2003) propuseram um mecanismo de fotodegradação da epinefrina na presença de bissulfito de sódio, mostrado no esquema 22. Em seus estudos, observaram que o efeito catalítico do bissulfito na fotodecomposição da epinefrina parece ser devido à formação de sulfonato de adrenocromo que atua como um sensibilizador no processo de fotodegradação. A degradação induzida pelo sulfonato de adrenocromo pode ser parcialmente atribuída à geração de oxigênio singleto, estado excitado eletrônico de menor energia do oxigênio molecular no seu estado fundamental tripleto. Isso indica que o sulfonato de adrenocromo é uma fonte de moléculas reativas de oxigênio singleto levando à oxidação da epinefrina (BRUSTUGUN et al, 2003).

Esquema 22 - Mecanismo proposto para fotodegradação da epinefrina na presença de bissulfito de sódio



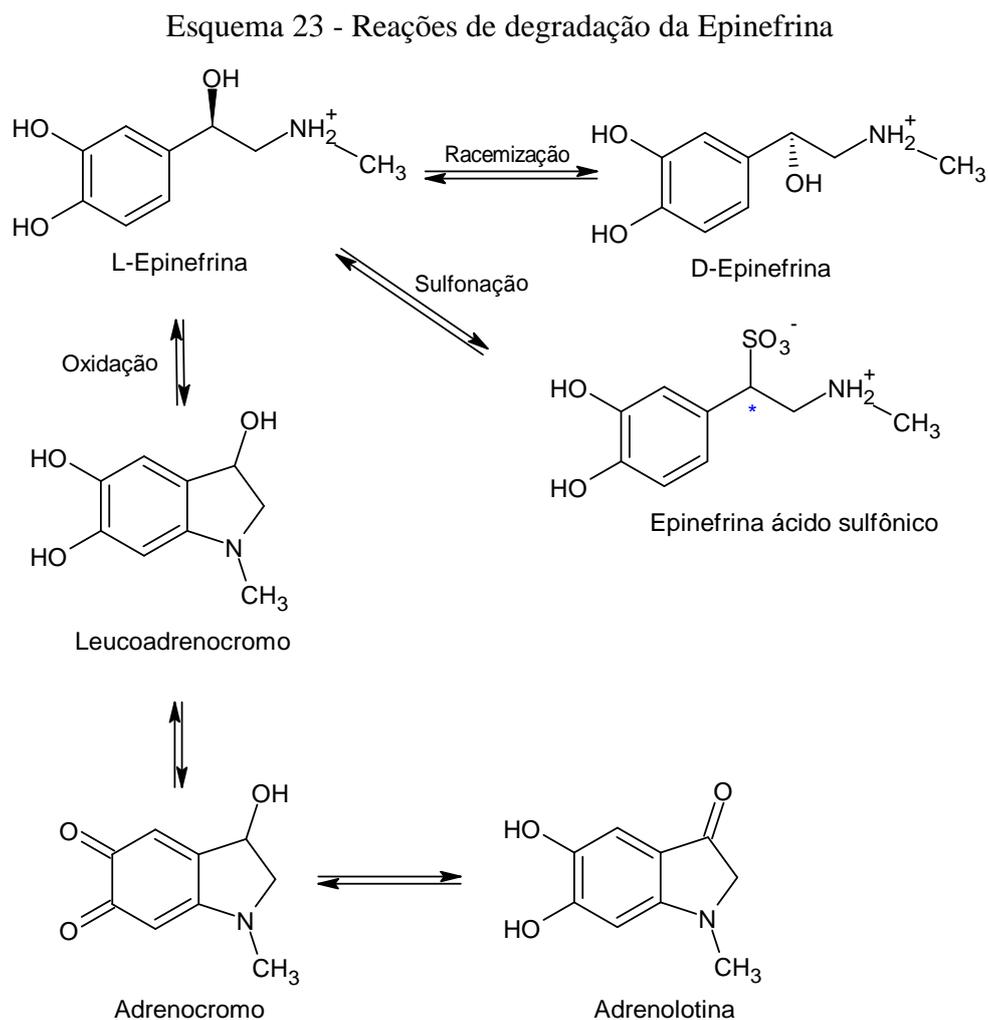
Fonte: Adaptado de BRUSTUGUN et al, 2003.

Apesar de levarem à formação de sulfonato de adrenalina e sulfonato de adrenocromo, como ilustrado nos esquemas 20 e 22, o uso de bissulfito ou metabissulfito

de sódio continua sendo um método muito comum na estabilização das soluções de epinefrina, pois a quantidade de bissulfito/metabissulfito utilizado é baixa quando comparado com a taxa de oxidação do fármaco (STEPENSKY et al, 2003).

O tempo de armazenamento também é um fator que afeta a estabilidade das soluções de epinefrina. Em períodos prolongados de armazenamento, quando a epinefrina está presente em concentrações significativas, a taxa de isomerização óptica inversa (conversão de D-adrenalina para L-adrenalina) torna-se substancial, resultando em uma distorção do resultado em relação ao resultado inicial (STEPENSKY et al, 2003).

Portanto, a epinefrina pode ser inativada por racemização e oxidação ou por reações com componentes auxiliares da formulação, formando produtos com atividade farmacológica reduzida. O esquema 23 reúne as principais reações de degradação da epinefrina.



Fonte: Autoria própria.

2.3.3 Testes de estresse para Epinefrina na literatura

Realizou-se uma pesquisa bibliográfica acerca de testes experimentais do estudo de degradação forçada para o insumo farmacêutico ativo Epinefrina e solução injetável. Não se encontrou na literatura referências contendo a parte prática do estudo para o IFA. Já os resultados encontrados para os estudos de degradação forçada de Epinefrina solução injetável são discutidos a seguir.

Abreu et al desenvolveram um estudo de degradação forçada para soluções injetáveis contendo o ativo epinefrina e desenvolveram, a partir dos testes de estresse, um método indicativo de estabilidade por HPLC (ABREU et al, 2020).

O estudo expôs amostras de anestésicos dentários a duas abordagens diferentes de degradação forçada, sendo a primeira a utilização refluxo de até 10 horas e a segunda armazenamento em câmara climática a $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e $75 \pm 5\%$ de umidade relativa por 14 dias. Ambas as abordagens foram testadas utilizando-se as amostras sob condição oxidante (peróxido de hidrogênio 30%), hidrolítica (hidróxido de sódio 6,0 M e ácido clorídrico 6,0 M), metálica (sulfato de cobre 25mM) e fotolítica (2,4 milhões lux) de acordo com as diretrizes do ICH (ABREU et al, 2020).

Abreu et al obtiveram três produtos de degradação majoritários na degradação da epinefrina, nas diferentes condições. Na tabela 2 estão resumidos os resultados encontrados para cada condição testada e na figura os produtos de degradação identificados por RMN de ^1H e ^{13}C .

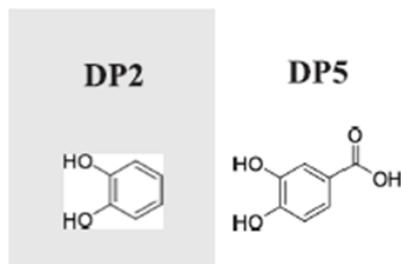
Tabela 2 - Quantidade aproximada dos principais produtos de degradação observados em solução injetável contendo Epinefrina

Condição de degradação	Refluxo	Câmara climática
Hidrólise básica	DP-2 (+++)	DP-2 (++)
	DP-4 (++)	DP-4 (++)
	DP-5 (+)	DP-5 (+)
Hidrólise ácida	DP-2 (++)	DP-2 (+)
Oxidação	DP-2 (+++)	DP-2 (++)
	DP-4 (+)	DP-4 (+)
	DP-5 (+)	DP-5 (+)
Íons metálicos	DP-2 (+)	ND
	DP-5 (+)	

NOTA: Análise semiquantitativa dos resultados: (+) < 0,1%; (++) 0,1 – 5,0%; (+++) > 5,0%
Abreviações: DP, produto de degradação; ND, não detectado.

Fonte: Adaptado de ABREU et al (2020).

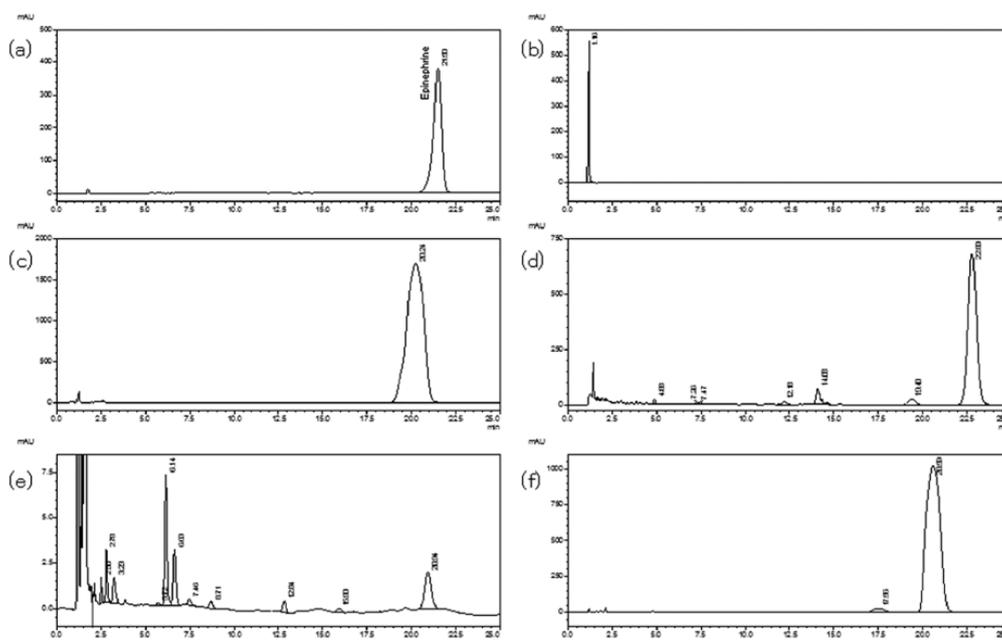
Figura 7 – Produtos de degradação identificados por RMN



Fonte: Adaptado de ABREU et al (2020).

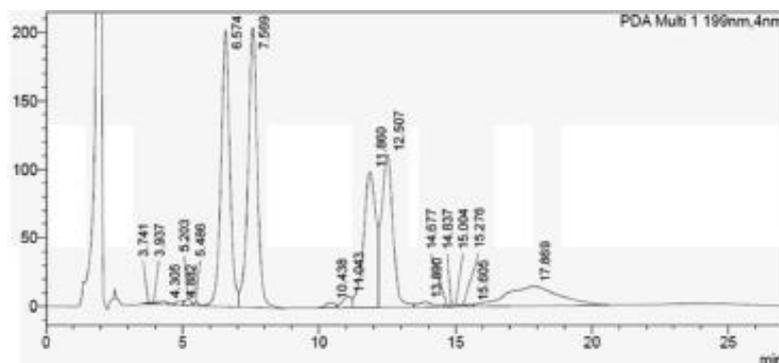
De acordo com o estudo, houve geração de produtos de degradação em quase todas as condições, principalmente em condições oxidativas. Não foram detectados níveis significativos de DPs no estresse por íons metálicos e apenas traços de DP-3 foram encontrados no estresse por fotólise (ABREU et al, 2020). Os sinais cromatográficos obtidos pelas amostras estressadas por meio de método indicativo de estabilidade por HPLC são ilustrados nas figuras 8 e 9.

Figura 8 - Cromatogramas de HPLC para (a) padrão de epinefrina, (b) placebo não estressado, (c) epinefrina tratada com ácido, (d) epinefrina tratada com base, (e) epinefrina tratada com peróxido e (f) epinefrina tratada com íons metálicos



Fonte: Adaptado de ABREU et al (2020).

Figura 9 – Cromatograma de HPLC do perfil de degradação da epinefrina sob oxidação e refluxo por 10 h



Fonte: Adaptado de ABREU et al (2020).

Abreu et al observaram, a partir do resultado dos testes de estresse, que as soluções de epinefrina são instáveis quando expostas a temperaturas acima de 25°C e, portanto, sofrem degradação significativa por via termolítica após longos períodos de exposição. Além disso, a degradação é muito favorecida em condições alcalinas e oxidativas (ABREU et al, 2020).

Outros estudos corroboram com os resultados encontrados por Abreu et al. Nos estudos conduzidos por Muller et al, foi observado uma alta taxa de degradação (t 0,99) nas soluções injetáveis de epinefrina armazenadas em temperaturas maiores e iguais a 30°C (MULLER et al, 1988).

Church et al observaram completa degradação da epinefrina solução injetável após aquecimento constante (65°C) por 7 dias e redução da epinefrina com aumento da epinefrina ácido sulfônico após aquecimento cíclico (65°C por 8 hr/d por 4 a 12 semanas) (CHURCH et al, 1994).

Carr et al comprovaram a estabilidade da epinefrina em soluções de bolsas para infusão abaixo de 25°C ao armazenar soluções do ativo (epinefrina em dextrose 5 % em água) em diferentes concentrações a 25°C e 4°C por 30 dias e não observar mudanças significativas de pH, cor e concentração nas mesmas (CARR et al, 2014).

Robinson et al obtiveram diminuição significativa das concentrações médias de epinefrina, em nove soluções de epinefrina em diferentes combinações com bupivacaína e lidocaína, após alcalinização das soluções injetáveis com bicarbonato de sódio 8,4% por um período de 24 horas (ROBINSON et al, 2000).

Bonhomme et al observaram a concentração da epinefrina solução injetável tratada com solução básica de bicarbonato de sódio 8,4%, até atingir pH $7,55 \pm 0,01$,

diminuir até aproximadamente 30% após 30 minutos e 100% após duas semanas (BONHOMME et al, 1990).

E Stepensky et al obtiveram grande conversão de epinefrina a sulfonato de L- ou D-adrenalina por oxidação após longo período de armazenamento (2 anos) em condições controladas e recomendadas pelos fabricantes das soluções injetáveis (STEPENSKY et al, 2003).

Apesar de os estudos citados utilizarem diferentes combinações da epinefrina, nenhuma interferência dos componentes das combinações nas degradações do ativo foi descrita. Dessa forma, é possível relacionar os estudos para análise do perfil degradativo da Epinefrina solução injetável (MULLER et al, 1988; CHURCH, 1994; CARR et al, 2014; ROBINSON et al, 2000; BONHOMME et al, 1990; STEPENSKY et al, 2003).

2.3.4 Proposta das condições de degradação para a Epinefrina IFA e solução injetável

Os dados observados na pesquisa do perfil degradativo da epinefrina são de grande importância para o delineamento das condições experimentais utilizadas em um estudo de degradação forçada da molécula. A tabela 3 descreve uma proposta das condições experimentais de degradação para a epinefrina IFA e solução injetável.

Tabela 3 - Proposta de condições experimentais para EDF da epinefrina

Condição	Agente	Concentração		Tempo de exposição	
		IFA	Solução injetável	IFA	Solução injetável
Hidrólise ácida	Ácido clorídrico	0,1 M	1 M a 3 M	10 dias	1 a 7 dias
Hidrólise básica	Hidróxido de sódio	0,1 M	0,1 M a 1 M	10 dias	30 min
Oxidação	Peróxido de hidrogênio	3%	35%	10 dias	7 dias
	Calor seco	60 °C	65 °C	10 dias	8 – 24 horas
Termólise	Calor úmido	75% umidade relativa	-	10 dias	-
	Fotólise	Luz UV fluorescente tubular	3,6 milhões lux/h	3,6 milhões lux/h	Tempo necessário para alcançar 3,6 milhões lux/h
Íons Metálicos	Cloreto férrico	0,05 M	0,05 M	24 horas	24 horas

Fonte: Autoria própria.

Para a elaboração da tabela 3 a escolha do tempo de exposição foi baseada na susceptibilidade de degradação da epinefrina e no tempo utilizado pelos estudos experimentais de diversos autores analisados no item 2.3.3.

Abreu et al (2020) cita a formação de produtos de degradação no tratamento com os agentes estressantes de seu estudo, entretanto, a relação entre o tempo de exposição e a extensão da degradação em porcentagem não foi analisada. Além disso, as estruturas identificadas para os produtos de degradação não correspondem as estruturas das impurezas conhecidas, listadas no quadro 3 (p. 34). Tal fator pode ser explicado pelo uso de condições extremamente drásticas, que podem ter levado à formação de produtos de degradação secundários. Portanto, as concentrações indicadas para a condução do estudo de degradação para Epinefrina foram menores do que aquelas utilizadas por Abreu e colaboradores.

Para a hidrólise ácida na solução injetável, recomenda-se a utilização de concentrações mais baixas, entre seis vezes e duas vezes menor que as utilizadas por Abreu et al (2020), e testadas entre um e sete dias de exposição para avaliação da relação do tempo de exposição com a diminuição do teor e formação de produtos de degradação.

Considerando-se a alta taxa de degradação para a epinefrina nas condições básica e termolítica, encontradas nos estudos de Abreu et al (2020), Muller et al (1988), Church et al (1994), Robinson et al (2000) e Bonhomme et al (1990), propõe-se a exposição em tempo reduzido em ambas as condições. Recomenda-se, para a solução injetável, exposição de trinta minutos na condição básica, tempo utilizado por Bonhomme et al (1990), e de oito a vinte e quatro horas para a condição termolítica, tempo sete vezes menor do que o utilizado por Church et al (1994) com o objetivo de evitar que a amostra seja completamente degradada como ocorreu na referência em questão.

Ademais, no estudo da hidrólise básica na solução injetável, propõe-se concentrações de hidróxido de sódio aproximadamente seis vezes menor do que a utilizada por Abreu et al (2020), uma vez que o mesmo cita a formação de produtos de degradação mas não analisa a relação entre o tempo de exposição e a extensão da degradação em porcentagem, enquanto os outros estudos citados utilizam bicarbonato de sódio 8,4% como agente estressante, não havendo resultados completos de estudos experimentais na literatura sobre o uso de hidróxido de sódio como agente estressante.

Para o estudo da via termolítica recomenda-se a utilização da mesma temperatura utilizada nos estudos de Church et al (1994), 65°C.

Para íons metálicos e oxidação recomenda-se a exposição pelo tempo máximo preconizado pelo Guia nº4 da ANVISA, uma vez que a epinefrina é pouco suscetível a degradação metálica e suscetível a oxidação em tempos prolongados e condições drásticas, de acordo com Abreu et al (2020).

Já para a degradação fotolítica recomenda-se a utilização do tempo de exposição necessário para atingir 3,6 milhões lux/h, quantidade mais drástica do que a utilizada por Abreu e colaboradores (2020), uma vez que não foram observados formação de produtos de degradação com a quantidade de luz utilizada no estudo de Abreu et al (2020).

Para o IFA, considerou-se os *endpoints* sugeridos pela Organização Mundial da Saúde (WHO, 2005).

O procedimento instrumental e de preparo das amostras deve ser baseado nas legislações vigentes, concentração do ativo no produto e procedimentos internos do laboratório analítico (MATTOS, 2017).

Os resultados encontrados após a condução do estudo de degradação forçada devem ser discutidos em um relatório, apresentando o impacto das condições testadas no resultado do perfil de degradação e discussão sobre os fatores de armazenamento que podem interferir na estabilidade do produto (BRASIL, 2015b).

De forma geral, considerando-se o estudo preditivo da degradação, a epinefrina solução injetável deve ser armazenada em frascos de vidro âmbar, com vedação hermética, preenchido com nitrogênio, adição de conservantes antioxidantes, armazenamento em baixas temperaturas para prevenir a degradação e coloração do produto farmacêutico (HOELLEIN; HOLZGRABE, 2012).

3 CONCLUSÃO

O estudo de degradação forçada é uma ferramenta importante para o processo de desenvolvimento de produtos farmacêuticos, uma vez que, fornece informações sobre a química de degradação de fármacos e medicamentos e auxilia no desenvolvimento de um método indicativo de estabilidade. Desse modo, a pesquisa bibliográfica inicial permite que o delineamento do estudo e as propostas de condições de estresse sejam feitas.

Para a Epinefrina, insumo farmacêutico ativo e solução injetável, foram encontrados registros na literatura sobre suas propriedades físico-químicas, bem como suas possíveis rotas de degradação e suscetibilidade à degradação.

A epinefrina pode sofrer reações de degradação por aumento e diminuição de pH, exposição a oxigênio, contato com íons metálicos, exposição a luz e temperaturas elevadas. O insumo farmacêutico ativo é mais estável do que sua solução injetável, mas ainda assim, ambos podem sofrer degradação.

A epinefrina pode ser inativada por racemização, oxidação ou por reações com componentes auxiliares da formulação. As condições que mais favorecem a degradação da epinefrina são as condições básica, oxidativa e termolítica.

Logo, foi proposto um estudo de degradação forçada, delineando-se cada condição a partir do estudo do perfil de degradação da molécula e dos resultados encontrados para os testes de estresse na literatura.

Por fim, a solução injetável e o insumo farmacêutico ativo devem ter seus produtos de degradação ou impurezas verificados nos estudos de estresse e notificados, identificados ou qualificados, de acordo com o valor de teor obtido para cada uma.

4 REFERÊNCIAS

ABREU, L. C. L. DE; ABRAHIM-VIEIRA, B. DE A.; SOUZA, A. M. T. DE; PINTO, E. C.; GONÇALVES, M. DA S.; SIMON, A.; VIANA, G. M.; RODRIGUES, C. R.; SOUSA, V. P.; CABRAL, L. M. Forced Degradation Studies of Norepinephrine and Epinephrine from dental anesthetics: Development of Stability-Indicating HPLC Method and In Silico Toxicity evaluation. *Biomedical Chromatography*, Rio de Janeiro, Brasil, v.34, p. 1-8, 2020.

ADDISON T. **Constitutional and local effects of disease of the suprarenal capsules.** London: Samuel Highley; 1855.

ÁLVAREZ-DIDUK, R; GALANO, A. Adrenaline and Noradrenaline: Protectors against Oxidative Stress or Molecular Targets?. *The Journal of Physical Chemistry B*, Cidade do México, México, v.8, n.119, p.3479-3491, 2015.

ALVES. L. **Adrenalina.** *Brasil Escola.* Disponível em: <<https://brasilecola.uol.com.br/quimica/adrenalina.htm>>. Acesso em: 21 mar.2021

ANS. Agência Nacional de Saúde Suplementar. **Medicamentos:** Uso seguro e cuidados essenciais. Disponível em: <<http://www.ans.gov.br/temas-de-interesse/medicamentos-uso-seguro-e-cuidados-essenciais>>. Acesso em: 22 fev. 2021

ARANTES, P. C. Relevância da determinação de produtos de degradação em medicamentos no Brasil. *Revista Oswaldo Cruz*, [s. l.], v. 5, ed. 18, 2018. Disponível em: <http://revista.oswaldocruz.br/Edicao_18/Home>. Acesso em: 21 fev. 2021.

BAERTSCHI, S. W.; ALSANTE, K. M.; REED, R. A. Pharmaceutical Stress Testing: Predicting Drug Degradation. Indianapolis: Informa Healthcare, 2005, p. 624.

BALL, C. M.; FEATHERSTONE, P. J. The early history of adrenaline. *Anaesth Intensive Care*. [s. l.], v. 45, n. 3, p. 279-281. Disponível em: <<https://journals.sagepub.com/doi/pdf/10.1177/0310057X1704500301>>. Acesso em: 21 mar. 2021.

BARATA-SILVA, C.; HAUSER-DAVIS, R., A; SILVA, A. L. O.; MOREIRA, J. C. Desafios ao controle da qualidade de medicamentos no Brasil. *Cad. Saúde Colet*, Rio de Janeiro, v.25, n. 3, p. 362-370, 2017. Disponível em: <<https://www.scielo.br/pdf/cadsc/v25n3/1414-462X-cadsc-1414-462X201700030075.pdf>>. Acesso em: 1.mar. 2021

BENNETT, J. W. Adrenalin and cherry trees. *Modern Drug Discovery*. Washington, DC, v. 4, n. 12, p. 47-48, 2001. Disponível em: <http://pubsapp.acs.org/subscribe/archive/mdd/v04/i12/html/12timeline.html?>. Acesso em: 29. jul. 2021.

BERNARDES, J. **Método identifica produto de degradação em medicamento.** Agência USP de notícias. 2012. Disponível em: <<http://www.usp.br/agen/?p=96350>>. Acesso em: 19 jul. 2021.

BONHOMME, L., BENHAMOU, D., COMOY, E., & PREAUX, N. Stability of epinephrine in alkalized solutions. *Annals of Emergency Medicine*, Clamart, França, v.19, n.11, p. 1242–1244, 1990.

BRAGA, S. de M. Uso de fármacos agonistas dos receptores α -2 adrenérgicos em medicina veterinária. Dissertação (Mestrado). Curso de pós graduação em Ciência Animal, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Goiás, 2012.

BRASIL, 1999. Lei n. 9782, de 26 de janeiro de 1999. **Define o Sistema Nacional de Vigilância Sanitária, cria a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, e dá outras providências.** Presidência da República, Casa Civil, Subcrefia para Assuntos Jurídicos, Brasília, DF, 26 de janeiro de 1999.

BRASIL, 2015a. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 53, de 4 de dezembro de 2015. **Estabelece parâmetros para a notificação, identificação e qualificação de produtos de degradação em medicamentos com substâncias ativas sintéticas e semissintéticas, classificados como novos, genéricos e similares, e dá outras providências.** Diário Oficial da União, Poder Executivo, Brasília, DF, 8 de dezembro de 2015.

BRASIL, 2015b. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Guia nº 4/2015, versão 1, de 4 de dezembro de 2015. **Guia para obtenção do perfil de degradação, e identificação e qualificação de produtos de degradação em medicamentos.** Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 04 de dezembro de 2015.

BRASIL, 2019. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 318, de 6 de novembro de 2019. **Estabelece os critérios para a realização de Estudos de Estabilidade de insumos farmacêuticos ativos e medicamentos, exceto biológicos, e dá outras providências.** Diário Oficial da União, Poder Executivo, Brasília, DF, 7 de novembro de 2019.

BRUSTUGUN, J., KRISTENSEN, S. & TØNNESEN, H. H. Photostability of epinephrine - The influence of bisulfite and degradation products. *Die Pharmazie*, Oslo, Noruega, v.59, p. 457-63, 2003.

CALDEIRA, A. S. P. **Estudo de degradação forçada, desenvolvimento e validação de método analítico de teor e substâncias relacionadas para avaliação da estabilidade de comprimidos de leflunomida.** Dissertação (Mestrado). Curso de pós graduação em Gestão, Pesquisa e Desenvolvimento na Indústria Farmacêutica, Instituto de Tecnologia em Fármacos – FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.

CARARINE, A. D. **Estabilidade de medicamentos: fatores interferentes com destaque em material de embalagem.** Monografia. Curso de Pós-graduação em Tecnologias Industriais Farmacêuticas, Instituto de Tecnologia em Fármacos – Farmanguinhos, Rio de Janeiro, 2016.

CARR, R. R., DECARIE, D., & ENSOM, M. H. H. Stability of Epinephrine at Standard Concentrations. *The Canadian Journal of Hospital Pharmacy*, Vancouver, Canadá, v.67, n.3, p. 197-202, 2014.

CARVALHO J. P.; SANTOS, A. S.; SA, A. S.; TEIXEIRA, C. S.; NOGUEIRA, M. S.; *Fármacos & Medicamentos*, v.8, n.22, 2004.

CESAR, P. **Eliminação**. 2010. Disponível em: <https://www.profpc.com.br/Elimina%C3%A7%C3%A3o.htm>. Acesso em: 17 jul. 2021.

CESAR, P. **Adrenalina**: a molécula da ação. 2011. Disponível em: <<https://www.profpc.com.br/Adrenalina.htm>>. Acesso em: 21 mar.2021.

CHEMICALIZE. **Epinephrine**. Disponível em: <<https://chemicalize.com>>. Acesso em: 16 mar. 2021.

CHURCH, W. H., HU, S. S., & HENRY, A. J. Thermal degradation of injectable epinephrine. *The American Journal of Emergency Medicine*, Carolina do Norte, Estados Unidos, v. 12, n.3, p. 306–309, 1994.

COSTA, G. C.; VIANA; G. M.; LIMA FILHO; U. F.; CABRAL, L. M. Diretrizes para elaboração de um protocolo e relatório de estudo de degradação forçada de medicamentos de acordo com a RDC 53/2015. *Infarma: Ciências Farmacêuticas*, Rio de Janeiro, v. 30, n. 3, p. 194-202, 21 set. 2018. Disponível em: <http://www.revistas.cff.org.br/?journal=infarma&page=article&op=view&path%5B%5D=2307&path%5B%5D=pdf_1>. Acesso em: 21 fev. 2021.

CRILE, G H. **Blood-pressure in surgery**: An experimental and clinical research; The Cartwright prize essay for 1903. Philadelphia and London: JB Lippincott Company, 1903.

CRILE, G. W., CRILE, G. **George Crile**: an Autobiography. Philadelphia and New York: Lippincott, 1947.

EFRINALIN: **Hemitartarato de Epinefrina**. Satoro Tabuchi. São Paulo: Blau Farmacêutica S.A, [200-?]. Bula de remédio.

EUROPEAN Pharmacopoeia. 8. ed. v.1. Europa: Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare of the Council of Europe (EDQM), 2013, p. 1490-1491.

FACCI, J.; DINIZ, L. F.; REIS, N. F. A.; FERNANDES, C. Evolução da legislação e das técnicas analíticas aplicadas a estudos de estabilidade de insumos e produtos farmacêuticos. *Química Nova*, Belo Horizonte, v. 43, n. 7, p. 959-973, 10 jun. 2020. Disponível em: <https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-40422020000700959&script=sci_abstract&tlng=pt>. Acesso em: 21 fev. 2021.

FAROOQUI, T. Trace Amines and Their Potential Role in Primary Headaches. In: FAROOQUI, T. (Ed), FAROOQUI, A. A (Ed). *Trace Amines and Neurological Disorders*. Estados Unidos: Academic Press, 2016. p. 349–366.

FERNANDES, J. **Adrenalina e Noradrenalina: as catecolaminas endógenas e sua ação simpática.** [s. l.], 2020. Disponível em: <<https://blog.jaleko.com.br/adrenalina-e-noradrenalina-as-catecolaminas-endogenas-e-sua-acao-simpatica/>>. Acesso em: 21 mar. 2021.

FERRAZ, M. S. S. **Estudo teórico da relação ensaios de degradação forçada e estudo de estabilidade de fármacos e medicamentos.** Monografia. Curso de pós graduação em Tecnologias Industriais Farmacêuticas, Instituto de Tecnologia em Fármacos – FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016.

FOGAÇA, J. R. V. **Adrenalina.** [s. l.]. [21--]. Disponível em: <<https://www.preparaenem.com/quimica/adrenalina.htm>>. Acesso em: 21 mar. 2021.

GILMAN, A. G., LIMBIRD, L. E., HARDMAN, J. **Goodman & Gilman: As Bases Farmacológicas da Terapêutica.** 10. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2012. 1614 p.

GONÇALVES, K. H. E. **Estudos de degradação forçada de fármacos fluoroquinolônicos assistida por irradiação micro-ondas.** Dissertação (Mestrado). Programa de pós graduação *Stricto Sensu* em Ciências Moleculares, Universidade Estadual de Goiás - UEG, Anápolis, Goiás, 2014.

HOELLEIN, L., & HOLZGRABE, U. Ficts and facts of epinephrine and norepinephrine stability in injectable solutions. *International Journal of Pharmaceutics*, Wuerzburg, Alemanha, v.434, n.1-2, p. 468–480, 2012.

HOFFMAN, B. Adrenaline. USA: Harvard College; 2013.

HYFREN: **Epinefrina.** Cristal Mel Guerra e Silva. Minas Gerais: Hypofarma – Instituto de Hypodermia e Farmácia Ltda, 2021. Bula de remédio.

ICH Q3A. *International Conference on Harmonisation.* Impurities in new drug substances Q3A (R2). Current Step 4 version, out 2006. Disponível em: <[p://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q3A_R2/Step4/Q3A_R2_Guideline.pdf](http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q3A_R2/Step4/Q3A_R2_Guideline.pdf)>. Acesso em: 14 abr. 2021.

ICH Q3B. *International Conference on Harmonisation.* Impurities in New Products Q3B(R2). Current Step 4 version, jun 2006. Disponível em: <http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q3B_R2/Step4/Q3B_R2_Guideline.pdf>. Acesso em: 14 abr. 2021.

ICH Q3C. *International Conference on Harmonisation.* Impurities: guideline for residual solvents Q3C (R6) Current Step 4 version, out 2016. Disponível em: <https://database.ich.org/sites/default/files/Q3C-R6_Guideline_ErrorCorrection_2019_0410_0.pdf>. Acesso em: 14 de abr 2021.

KEMIN. **O processo de oxidação e a formação dos compostos relacionados à rancidez.** 2018. Disponível em: <https://www.kemin.com/sa/pt/blog/food/oxidative-process>. Acesso em: 7 jul. 2021.

LACHMAN, L.; LIEBERMEN, H. A. e KANIG, J. L. **Teoria e Prática na Indústria Farmacêutica.** 1. ed. Lisboa: Fundação Galouste Guldenkian, 2001. vol II. 1017 p.

LEITE, E. G. **ESTABILIDADE: importante parâmetro para avaliar a qualidade, segurança e eficácia de fármacos e medicamentos.** Dissertação (Mestrado). Programa de pós graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, 2005.

LEITE, F. Impurezas de degradação. *Scientia chromatographica*, Campinas, São Paulo, v.1, n.2, p. 63-72, 2009.

MACHADO, E. dos S. **Análise Comparativa das metodologias para pesquisa e controle de produtos de degradação em insumos farmacêuticos ativos e produtos sólidos orais de uma indústria estatal farmacêutica de grande porte situada no Rio de Janeiro.** Monografia (Especialização). Curso de pós graduação em Tecnologias Industriais Farmacêuticas, Instituto de Tecnologia em Fármacos – FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011.

MAGALHÃES. L. **Adrenalina.** [s. l.]. Toda matéria. 2020. Disponível em: <<https://www.todamateria.com.br/adrenalina/>>. Acesso em: 21 mar. 2021

MATTOS, A. P. F. de L. **Proposta de estudo de degradação forçada e desenvolvimento de método indicativo de estabilidade para o insumo farmacêutico ativo Praziquantel e produto acabado.** Monografia. Curso de pós graduação em Tecnologias Industriais Farmacêuticas, Instituto de Tecnologia em Fármacos – FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2017.

MISSION: Harmonisation for Better Health. ICH. 2021. Disponível em: <https://www.ich.org/page/mission>. Acesso em: 07. jun. 2021.

MOREIRA, J. A. Degradação de fármacos – Reatividade e predição, 2020. 37 slides.

MULLER, C., BURGHARDT, G., WOLLMANN, H. The stability of norepinephrine hydrogen tartrate, epinephrine hydrogen tartrate and isoprenaline sulfate. 29. The stability of drugs and preparations. *Pharmazie*, Alemanha, v.43, n.5, p. 321–323, 1988.

NETO, J. L. de F. **Avaliação da estabilidade e desenvolvimento de comprimidos orodispersíveis pediátricos à base de efavirenz.** Tese (Doutorado). Programa de pós graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, Recife, Pernambuco, 2018.

OLIVER G, SCHÄFER E. The physiological effects of extracts of the suprarenal capsules. *J Physiol* 1895; 18:230-276.

PAIVA, A. P. O fenômeno da quiralidade – bases de estereoquímica. UNESP. 2006. Disponível em: <https://www.fcav.unesp.br/Home/departamentos/tecnologia/LUCIANAMARIASARAN/o-fenomeno-da-quiralidade-artigo.pdf>. Acesso em: 12. mai. 2021.

QUALITY Guidelines. ICH. 2021. Disponível em: <https://www.ich.org/page/quality-guidelines>. Acesso em: 07. jul. 2021.

RANG, H.P; DALE, M.M. **Farmacologia Clínica.** 8. Ed. São Paulo: Elsevier, 2016. 1939 p.

ROBINSON, J., FERNANDO, R., SUN WAI, W. Y. S., & REYNOLDS, F. Chemical stability of bupivacaine, lidocaine and epinephrine in pH-adjusted solutions. *Anaesthesia*, Londres, Reino Unido, v. 55, n.9, p. 853–858, 2000.

SANTOS, V. L. P. **Estabilidade e tempo de vida útil de fármacos e medicamentos.** Dissertação (Mestrado). Mestrado integrado em Ciências Farmacêuticas, Universidade Fernando Pessoa. Porto, Portugal, 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. *Rev Ciênc Farm Básica Apl.* Recife, Pernambuco, v. 30, n.2, p. 1-8, 2009. Disponível em: <<http://files.bvs.br/upload/S/1808-4532/2009/v30n2/a014.pdf>>. Acesso em: 1 mar.2021.

SILVA, T. A. **Obtenção de SQC e validação de metodologia analítica para doseamento do solvente residual tolueno em soros hiperimunes.** Monografia. Curso de Bacharel em Química Tecnológica, Centro Federal de Educação Tecnológica – CEFET-MG, Belo Horizonte, Minas Gerais, 2019.

SIMERS. **Quais os critérios para a aprovação de um medicamento?.** 2016. Disponível em: <<http://www.simers.org.br/noticia?name=quais-os-criterios-para-aprovacao-de-um-novo-medicamento>>. Acesso em: 22 fev.2021

SOUZA, J. N. **Estudo de estabilidade: fatores que influenciam na estabilidade do medicamento.** Monografia. Curso de Pós-graduação em Tecnologia Industrial Farmacêutica, Instituto de Tecnologia em Fármacos – Farmanguinhos, Rio de Janeiro, 2014.

SOLOMONS, T. W. G., FREUHLE, C. B. **Química Orgânica**, 7. ed, LTC – Livros Técnicos e Científicos Editora S.A., Rio de Janeiro, 2001, p. 679.

STEPENSKY, D., CHORNY, M., DABOUR, Z., & SCHUMACHER, I. Long-term stability study of L-adrenaline injections: Kinetics of sulfonation and racemization pathways of drug degradation. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, Israel, v. 93, n.4, p. 969–980, 2004.

SZULCZEWSKI, D. H., & HONG, W. (1978). Epinephrine. *Analytical Profiles of Drug Substances*, 193–229.

TEIXEIRA. I. A. **Sabia que a adrenalina é considerada estimulante natural?.** ISaúde. 2013. Disponível em: <<https://www.isaude.com.br/noticias/detalhe/noticia/sabia-que-a-adrenalina-e-considerada-um-estimulante-natural>>. Acesso em: 21 mar.2021.

UNITED States Pharmacopeia - National Formulary. 43. ed. v. 38. Rockville, 2020. p. 1645-1648.

VALLE, T. S. do. **Estudo de degradação forçada e desenvolvimento de método indicativo de estabilidade para determinação de Benznidazol.** Dissertação

(Mestrado). Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG, Belo Horizonte, Minas Gerais, 2019.

VARELLA, M. **Adrenais (suprarrenais)**. [S. l.]. 21-?. Disponível em: <<https://drauziovarella.uol.com.br/corpo-humano/adrenais-suprarrenais/>>. Acesso em: 21 mar. 2021.

WHO. World Health Organization. Annex 5: Guidelines for registration of fixed-dose combination medicinal products. WHO Technical Report Series, n. 929, 2005

YAMASHIMA, T. Jokichi Takamine (1854–1922), The Samurai Chemist, and His Work on Adrenalin. *Journal of Medical Biography*, v.11, n.2, p. 95–102, 2003.

YOSHIOKA, S. & STELLA, V. J. **Stability of Drugs and Dosage Forms**. Nova York: Kluwer Academic Publishers, 2002.