

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

Júlia Dias Cruz

**ESTRATÉGIAS ANALÍTICAS EMPREGADAS NO ESTUDO DE DEGRADAÇÃO
FORÇADA DO ENTECAVIR MONOIDRATADO 0,5 mg EM MEIO OXIDANTE DE
PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO**

Belo Horizonte (MG)

2025

Júlia Dias Cruz

**ESTRATÉGIAS ANALÍTICAS EMPREGADAS NO ESTUDO DE DEGRADAÇÃO
FORÇADA DO ENTECAVIR MONOIDRATADO 0,5 mg EM MEIO OXIDANTE DE
PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO**

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

**Orientador: Prof. Dr. Patterson Patrício de
Souza.**

Coorientador: MSc. Tiago Aparecido Silva.

CEFET-MG

Belo Horizonte (MG)

2025

Júlia Dias Cruz

**ESTRATÉGIAS ANALÍTICAS EMPREGADAS NO ESTUDO DE DEGRADAÇÃO
FORÇADA DO ENTECAVIR MONOIDRATADO 0,5 mg EM MEIO OXIDANTE DE
PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO**

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

Belo Horizonte, 07 de fevereiro de 2025

**Prof. Dr. Patterson Patrício de Souza
(orientador – CEFET-MG)**

**MSc. Tiago Aparecido Silva
(coorientador – FUNED)**

**Prof^a. Dr^a. Adriana Akemi Okuma
(avaliador(a) – CEFET-MG)**

**Prof. Dr. Cleverson Fernando Garcia
(avaliador(a) – CEFET-MG)**

EPIGRAFE

Cada vida que existiu antes de nós, cada escolha feita por nossos ancestrais, abriu o caminho
para que estivéssemos aqui agora.

A soma de todas as possibilidades, do que escolhemos, e das infinitas que deixaram de ser,
nos trouxeram até este exato momento.

“Somos poeira de estrelas.”

— Carl Sagan

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus pela minha vida, pela minha família e amigos, por todas as oportunidades que Ele me deu.

Agradeço aos meus pais (Cláudio e Sandra) e à minha irmã (Ana Luisa) por toda dedicação, esforço e zelo em todos os momentos da minha vida.

Agradeço ao meu orientador Patterson, pelo auxílio na execução deste trabalho e pela disponibilização do equipamento GCXGC-MS no INTECHLAB. Também sou grata ao Jhonathan Bispo, que me acompanhou durante a análise nesse equipamento, sempre de forma gentil, atenciosa e disponível.

Agradeço também ao meu coorientador Tiago Silva, que além de me oferecer orientação, foi meu ex-supervisor de estágio, tornando-se um amigo. Sua orientação paciente e encorajadora é fonte de inspiração e motivação para eu ser uma profissional melhor, e uma pessoa melhor.

À toda equipe SCFQ da FUNED, agradeço por todo apoio que me deram desde quando ainda era estagiária do setor, e até mesmo depois com a execução deste trabalho. Em destaque, agradeço ao Guilherme, que sempre esteve presente de forma paciente, alegre e respeitosa.

Aos meus amigos, minha gratidão por estarem sempre ao meu lado, acompanhando e vibrando por cada passo da minha trajetória: Kethlen e Virgínia (amigas de infância), Matheus e Manu (amigos do ensino médio), Vitória, Maria Luiza, Isabela e Mariana (ex-estagiárias da Funed), além de Samuel, Ana Carolina, Danilo e Beatriz, que tornaram a jornada da graduação mais leve. De forma especial, agradeço ao meu namorado, Lucas, que tem sido meu companheiro, me alegrando e me acalmando nos momentos de incerteza.

Agradeço também a todos os professores e à equipe técnica de laboratório pelos conhecimentos compartilhados ao longo dessa jornada. E ainda aos profissionais do CEFET, à Janice Cardoso e Márcio Basílio que com trabalho constante, mantêm uma instituição ativa e qualificada. Agradeço ainda ao Cleverson García e a Adriana Akemi por aceitarem compor a banca deste trabalho.

Por fim, agradeço a mim mesma, por todo esforço contínuo em ser uma pessoa dedicada, responsável e comprometida em sempre dar o meu melhor. A tão sonhada formatura se dará em uma instituição pública, bem como todas as escolas em que já estive matriculada.

Daqui em diante, espero trilhar um caminho iluminado, levando em meu coração todos que estiveram presentes até aqui. Muito obrigada!

RESUMO

CRUZ, J. D.; SOUZA, P. P.; SILVA T. A. Estratégias analíticas empregadas no estudo de degradação forçada do entecavir monoidratado 0,5 mg em meio oxidante de peróxido de hidrogênio

O entecavir é um importante medicamento ministrado para o tratamento da hepatite B. O Sistema Único de Saúde (SUS) disponibiliza o entecavir monoidratado 0,5 mg de forma gratuita, que é produzido em uma parceria FUNED - Farmanguinhos (FIOCRUZ). O estudo de degradação forçada (EDF) deve ser realizado nas etapas iniciais de um medicamento, bem como na alteração de formulação de medicamentos já existentes e na proposta de novas dosagens. O EDF é uma análise investigativa, com o intuito de submeter o medicamento a condições de estresse extremas para conhecer possíveis produtos de degradação e para propor métodos capazes de detectar as impurezas geradas de forma seletiva, propiciando o seu rastreio no decorrer do estudo de estabilidade. Sendo assim, para o entecavir, o EDF e estudo de estabilidade já foram realizados, sem a necessidade de identificar os produtos de degradação, apenas notificá-los à ANVISA. No entanto, conhecer essas impurezas é sempre considerado positivo, pois agrega conhecimento acerca do medicamento e possibilita o estudo das rotas de degradação. Além disso, as legislações vigentes acerca do EDF demonstram certas lacunas sobre a execução e análise de resultados. Por isso, elaborou-se o EDF do entecavir pela via oxidativa (peróxido de hidrogênio) para comparar os resultados obtidos com os testes realizados anteriormente pela FUNED por meio da utilização de cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (HPLC-DAD). Ainda, propôs-se a investigar os possíveis produtos de degradação volatilizáveis a partir da análise em cromatografia gasosa bidimensional abrangente acoplada à espectrometria de massas (GCxGC-MS), com preparo prévio da amostra por microextração líquido-líquido dispersiva. Os resultados demonstraram que distintas estratégias analíticas podem propiciar a observação de diferentes produtos de degradação, bem como a aplicação de um conjunto de métodos e técnicas podem ser mais eficientes para se analisar as impurezas geradas. Foram observados em HPLC-DAD três produtos de degradação, diferentemente ao estudo anterior, que detectou duas impurezas. A análise em GCxGC-MS, associada a análise do índice de retenção linear, propiciou a identificação putativa de 15 possíveis produtos de degradação, entretanto, é necessária a utilização de outras técnicas analíticas para melhor elucidação estrutural.

Palavras-chave: Estudo de Degradação Forçada. Entecavir. Peróxido de Hidrogênio.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Semelhança do substrato desoxiguanosina com o entecavir.....	3
Figura 2 - Estruturas moleculares de excipientes orgânicos da formulação de Funed Entecavir 0,5 mg comprimido revestido. Estruturas feitas no <i>software</i> ChemSketch®.....	4
Figura 3 - Molécula de entecavir e seus grupos funcionais. Estruturas feitas no <i>software</i> ChemSketch®.....	5
Quadro 1 - Propriedades físico-químicas do entecavir.....	5
Quadro 2 - Informações base para avaliação da necessidade de notificação, identificação e quantificação dos produtos de degradação no decorrer do estudo de estabilidade do medicamento.....	8
Figura 4 - Relação entre perfil de degradação "potencial", obtido no estudo de estresse (EDF), e o perfil de degradação "real", obtido no estudo de estabilidade de longa duração.....	9
Esquema 1 - Ciclo catalítico desempenhado pelo Fe(III)/(II) interagindo com uma impureza de hidroperóxido conhecida ($R_{imp}OOH$) proveniente de excipientes.....	11
Esquema 2 - Auto-oxidação mediada pelo radical peroxi do fármaco.....	12
Esquema 3 - Formação de radicais da droga para início do processo auto-oxidativo.....	12
Esquema 4 - Ação oxidativa do peróxido de hidrogênio em aminas terciárias.....	13
Esquema 5 - Ação oxidativa do peróxido de hidrogênio em aminas secundárias.....	13
Esquema 6 - Ação oxidativa do peróxido de hidrogênio em olefinas.....	13
Esquema 7 - Oxidação de álcoois primários à aldeído e ácido carboxílico.....	13
Esquema 8 - Oxidação de álcool secundário à cetona.....	14
Figura 5 - Instrumentação básica da HPLC.....	16
Figura 6 - Demonstração simplificada do interior de uma coluna.....	17
Quadro 3 - Transições eletrônicas observadas em detectores UV-Vis.....	18
Figura 7 - Esquema geral de um cromatógrafo gasoso.....	20
Figura 8 - Estrutura geral para colunas capilares.....	20
Figura 9 - Exemplos de fases líquidas de dimetilpolisiloxano e variações de polaridade.....	21
Figura 10 - Construção de diagramas tridimensionais sinal x 1tR x 2tR	22
Figura 11 - Procedimento para microextração líquido-líquido dispersiva.....	23
Figura 12 - Constituintes básicos de um espectrômetro de massas (com exemplos).....	24
Figura 13 - Funcionamento da ionização por elétrons.....	27
Figura 14 - Determinação do LRI de compostos sob condições de temperatura programada.....	28
Figura 15 - Analisador de massas do tipo quadrupolo.....	29

Quadro 4 - Reagentes e solventes utilizados durante o preparo de amostras.....	30
Quadro 5 - Condições experimentais cromatográficas do método de doseamento de ETV....	35
Quadro 6 - Gradiente de eluição do método de doseamento de entecavir.....	35
Quadro 7 - Condições experimentais cromatográficas do método de impurezas relacionadas.....	37
Quadro 8 - Gradiente de eluição do método de substâncias relacionadas do entecavir.....	38
Quadro 9 - Condições experimentais da análise em GCxGC-MS.....	38
Figura 16 - Cromatograma do padrão de trabalho (amostra controle).....	40
Gráfico 1 - Evolução da degradação com a adição de 3 mL de H ₂ O ₂ 30% v v ⁻¹ . Gráfico plotado no <i>software</i> SciDAVis®.....	41
Gráfico 2 - Evolução da degradação com a adição de 350 µL de H ₂ O ₂ 30% v v ⁻¹ . Gráfico plotado no <i>software</i> SciDAVis®.....	42
Figura 17 - Sobreposição de subcromatogramas referentes às amostras controles e degradadas em $\lambda = 254$ nm (método cromatográfico descrito no item 3.4.2) - Tempo de análise: 0,0 a 4,0 minutos.....	45
Figura 18 - Sobreposição de subcromatogramas referentes às amostras controles e degradadas em $\lambda = 254$ nm (método cromatográfico descrito no item 3.4.2) - Tempo de análise: 4,0 a 8,0 minutos.....	46
Figura 19 - Sobreposição de subcromatogramas referentes às amostras controles e degradadas em $\lambda = 254$ nm (método cromatográfico descrito no item 3.4.2) - Tempo de análise: 8,0 a 12,0 minutos.....	47
Figura 20 - Cromatograma 3D da substância medicamentosa degradada (método cromatográfico descrito no item 3.4.2) - Vista 01/02.....	49
Figura 21 - Cromatograma 3D da substância medicamentosa degradada (método cromatográfico descrito no item 3.4.2) - Vista 02/02.....	50
Figura 22 - Sobreposição de subcromatogramas referentes às amostras controles e degradadas em $\lambda = 200$ nm (método cromatográfico descrito no item 3.4.2) - Tempo de análise: 0,00 a 6,00 minutos.....	51
Figura 23 - Sobreposição de subcromatogramas referentes às amostras controles e degradadas em $\lambda = 200$ nm (método cromatográfico descrito no item 3.4.2) - Tempo de análise: 5,75 a 12,00 minutos.....	51
Figura 24 - Sobreposição de subcromatogramas referentes às amostras controles e degradadas em $\lambda = 380$ nm (método cromatográfico descrito no item 3.4.2) - Tempo de análise: 0,00 a 6,00 minutos.....	52

Figura 25 - Sobreposição de subcromatogramas referentes às amostras controles e degradadas em $\lambda = 380$ nm (método cromatográfico descrito no item 3.4.2) - Tempo de análise: 5,75 a 12,00 minutos.....	52
Figura 26 - Sobreposição de subcromatogramas referentes às amostras controles e degradadas em $\lambda = 252$ nm (método cromatográfico descrito no item 3.4.3) - Tempo de análise: 0 a 10 minutos.....	57
Figura 27 - Sobreposição de subcromatogramas referentes às amostras controles e degradadas em $\lambda = 252$ nm (método cromatográfico descrito no item 3.4.3) - Tempo de análise: 10 a 20 minutos.....	58
Figura 28 - Sobreposição de subcromatogramas referentes às amostras controles e degradadas em $\lambda = 252$ nm (método cromatográfico descrito no item 3.4.3) - Tempo de análise: 20 a 30 minutos.....	59
Figura 29 - Cromatograma 3D da substância medicamentosa degradada (método cromatográfico descrito no item 3.4.3) - Vista 01/02.....	60
Figura 30 - Cromatograma 3D da substância medicamentosa degradada (método cromatográfico descrito no item 3.4.3) - Vista 02/02.....	61
Figura 31 - Sobreposição de subcromatogramas referentes às amostras controles e degradadas em $\lambda = 200$ nm (método cromatográfico descrito no item 3.4.3) - Tempo de análise: 0,00 a 6,00 minuto.....	61
Figura 32 - Sobreposição de subcromatogramas referentes às amostras controles e degradadas em $\lambda = 200$ nm (método cromatográfico descrito no item 3.4.3) - Tempo de análise: 6,00 a 12,00 minutos.....	62
Figura 33 - Sobreposição de subcromatogramas referentes às amostras controles e degradadas em $\lambda = 380$ nm (método cromatográfico descrito no item 3.4.3) - Tempo de análise: 6,00 a 12,00 minutos.....	62
Figura 34 - Sobreposição de subcromatogramas referentes às amostras controles e degradadas em $\lambda = 380$ nm (método cromatográfico descrito no item 3.4.3) - Tempo de análise: 6,00 a 12,00 minutos.....	63
Figura 35 - Sobreposição de subcromatogramas: padrão combinado de guanina e entecavir e comprimido degradado.....	63
Figura 36 - Espectro de absorção da radiação UV da guanina, obtido experimentalmente.....	64
Figura 37 - Espectros de absorção da radiação UV das impurezas A, B e C, respectivamente.....	64

Figura 38 - Diagrama tridimensional da amostra comprimido degradado - Vista 01/02.....	65
Figura 39 - Diagrama tridimensional da amostra comprimido degradado - Vista 02/02.....	65
Figura 40 - Diagrama obtido pela técnica GCxGC-MS da amostra comprimido degradado, com produtos de degradação em destaque.....	66
Gráfico 3 - Relação tempo de retenção x índice de retenção. Gráfico plotado no <i>software</i> SciDAVis®.....	68
Quadro 10 - Estruturas anotadas pela técnica GCxGC-MS.....	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Dados e resultados de percentagem degradada para amostras degradadas em 1, 7 e 14 dias.....	42
Tabela 2 - Dados de massa para análise de doseamento e notificação/quantificação de impurezas.....	43
Tabela 3 - Dados e resultados de doseamento e percentagem degradada para amostra degradada em 7 dias (método cromatográfico descrito no item 3.4.2).....	44
Tabela 4 - Relação dos produtos de degradação observados pelo método 3.4.2 a 254 nm.....	49
Tabela 5 - Dados e resultados de doseamento e percentagem degradada para amostra degradada em 8 dias (método cromatográfico descrito no item 3.4.3).....	55
Tabela 6 - Relação dos produtos de degradação observados pelo método 3.4.3 à 252 nm.....	56
Tabela 7 - Dados da análise dos padrões de alcanos para cálculo do LRI.....	67
Tabela 8 - Substâncias anotadas dos produtos de degradação volatilizáveis do entecavir.....	69

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIBN - Azobisisobutironitrila

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ATD - Administração Total Diária

CC - Corrente Contínua

CI - Ionização Química (traduzido do inglês: *Chemical Ionization*)

DAD - Detector de matriz de diodos (traduzido do inglês: *Diode Array Detector*)

DESI - Ionização de Dessorção por Eletrospray (traduzido do inglês: *Desorption electrospray ionization*)

DLLME - Microextração Líquido-Líquido Dispersiva (traduzido do inglês: *Dispersive Liquid-Liquid Microextraction*)

DMD - Dose Máxima Diária

EDF - Estudo de Degradação Forçada

EI - Ionização por Elétrons (traduzido do inglês: *Electron Ionization*)

ESI - Ionização por Eletrospray (traduzido do inglês *Electrospray ionization*)

ETV - Entecavir

FDA - *Food and Drug Administration* (do inglês) (agência federal do Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos Estados Unidos)

FE - Fase Estacionária

FM - Fase Móvel

FUNED - Fundação Ezequiel Dias

GC - Cromatografia Gasosa (traduzido do inglês: *gas chromatography*)

GC x GC - Cromatografia Gasosa Bidimensional Abrangente (traduzido do inglês: *comprehensive two-dimensional gas chromatography*)

HPLC - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (traduzido do inglês: *High-Performance Liquid Chromatography*)

IFA - Insumo Farmacêutico Ativo

LRI - índice de retenção linear (traduzido do inglês: *linear retention index*)

MS - Espectrometria de massas (traduzido do inglês: *Mass Spectrometry*)

NP - Fase Normal (traduzido do inglês: *Normal Phase*)

PA - Afinidade Protônica (traduzido do inglês: *proton affinity*)

pH - Potencial Hidrogeniônico

RF - Radiofrequência

RI - índice de retenção (traduzido do inglês: *retention index*)

RP - Fase Normal (traduzido do inglês: *Reverse Phase*)

RRT - Tempo de Retenção Relativo (traduzido do inglês: *relative retention time*)

SUS - Sistema Único de Saúde

TOF - Tempo de voo (traduzido do inglês *time of flight*)

UV - Radiação ultravioleta

UV-Vis - Radiação ultravioleta e visível

VHB - Vírus da Hepatite B

LISTA DE SÍMBOLOS

μ - micro

1D - primeira dimensão

1D - uma dimensão

1t_R - tempo de retenção na 1ª coluna

2D - segunda dimensão

2t_R - tempo de retenção na 2ª coluna

3D Plot - diagramas tridimensionais

A - absorbância

c - velocidade da luz

E - energia

eV - elétron-volt

h - constante de Planck

Hz - Hertz

I - luz transmitida

I_0 - luz incidente

m/z - razão massa carga

n - pares de elétrons não ligantes

S/N - relação sinal/ruído

T - transmitância

t_R - tempo de retenção

ϵ - coeficiente de absortividade molar

λ - comprimento de onda

π - orbital pi ligante

π^* - orbital pi antiligante

σ - orbital sigma ligante

σ^* - orbital sigma antiligante

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1 Entecavir.....	3
2.1.1 Propriedades físico-químicas.....	5
2.2 Estudo de estabilidade e degradação forçada na indústria farmacêutica.....	6
2.2.1 Degradação oxidativa de medicamentos.....	10
2.2.1.1 Degradação forçada por oxidação realizada nas indústrias.....	14
2.3 Cromatografia líquida de alta eficiência.....	15
2.4 Cromatografia gasosa.....	19
2.4.1 Microextração líquido-líquido dispersiva.....	22
2.5 Espectrometria de massas (MS).....	24
2.5.1 Métodos de inserção e ionização da amostra.....	25
2.5.1.1 GC-MS.....	25
2.5.2 Analisadores de massas.....	29
3 METODOLOGIA.....	30
3.1 Amostras.....	30
3.2 Reagentes.....	30
3.3 Equipamentos e instrumentos.....	31
3.4 Procedimento de análise.....	32
3.4.1 Preparo de soluções para degradação forçada do medicamento Funed Entecavir 0,5 mg comprimido revestido.....	32
3.4.2 Preparo da solução padrão combinada de entecavir e guanina.....	33
3.4.3 Percentagem degradada e notificação/quantificação de impurezas.....	34
3.4.4 Verificação de impurezas relacionadas.....	36
3.4.5 Análise no GCxGC-MS.....	38
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	40
4.1 Avaliação da evolução da degradação.....	40
4.2 Avaliação da degradação e impurezas geradas.....	43
4.2.1 Doseamento final à oxidação e notificação/quantificação de impurezas.....	43
4.2.3 Comparação de resultados.....	53
4.2.4 Verificação da influência dos excipientes na oxidação.....	54
4.3 Verificação de impurezas relacionadas.....	54

4.4 Análise de produtos de degradação volatilizáveis.....	65
5 CONCLUSÃO.....	75
REFERÊNCIAS.....	77

1 INTRODUÇÃO

O produto farmacêutico deve ser avaliado seguindo critérios rigorosos para que sua comercialização seja autorizada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). O estudo de estabilidade é considerado essencial para a garantia da segurança, manutenção da qualidade e eficácia do medicamento. Neste é avaliada a capacidade do produto reter suas propriedades iniciais por uma série de testes destinados à definição de sua vida útil e período de utilização sob condições especificadas de embalagem e armazenamento. São considerados aspectos químicos, físicos, microbiológicos e biofarmacêuticos (1).

O Estudo de Degradação Forçada (EDF) permite a obtenção de métodos indicativos para estabilidade, bem como a elucidação dos produtos e possíveis rotas de degradação. Nesse ensaio é realizada a exposição do fármaco a condições estressantes, que aceleram a formação de produtos de degradação primários, podendo estes serem tóxicos e/ou inativos que comprometem a segurança e eficácia do produto farmacêutico. O EDF é solicitado para registros de novos medicamentos, inclusão de nova forma ou nova concentração, e também em alterações diversas, como: alterações na formulação farmacêutica, alterações na rota de síntese ou no local de fabricação do fármaco, alterações da composição da embalagem primária, e outros. O método indicativo de estabilidade proposto durante o EDF é aplicado durante o estudo de estabilidade para quantificação das impurezas. A depender do teor da impureza, é necessária a notificação, identificação e qualificação à ANVISA (2).

Um dos medicamentos de interesse para o Ministério da Saúde é o Entecavir (ETV). O comprimido foi listado na Relação Nacional de Medicamentos Essenciais em 2020 (3). Esse fármaco é utilizado para garantir o bem-estar do paciente, evitando a progressão da Hepatite B e suas complicações (cirrose, câncer de fígado e outros), que representam uma carga considerada ao Sistema Único de Saúde (SUS). A doença é considerada um importante problema mundial de saúde pública, com aproximadamente 300 milhões de indivíduos infectados pelo vírus da doença no ano de 2020 (4).

A Fundação Ezequiel Dias (FUNED) em parceria com o Instituto de Tecnologia em Fármacos (Farmanguinhos/Fiocruz) realiza a produção e distribuição do Entecavir monoidratado 0,5 mg comprimido revestido. A Fiocruz dispõe da tecnologia para a produção do medicamento, enquanto a Funed fica responsável pelo controle de qualidade de insumos e produtos, processo de envase, embalagem e distribuição para o SUS (5).

A produção e distribuição do Entecavir para o SUS só foi possível devido aos esforços em prol das boas práticas de fabricação e da obtenção de um produto de qualidade e segurança, com vida útil adequada para a distribuição e consumo. Para isso, conforme

descrito em Fundação Ezequiel Dias (2014b), em 2014 foram realizados testes de estabilidade e degradação forçada pela Funed, para obtenção da certificação e liberação para produção pela ANVISA (6). O estudo de degradação forçada foi conduzido com a exposição do fármaco, Insumo Farmacêutico Ativo (IFA) e excipientes a condições de aquecimento, umidade, solução ácida, solução básica, solução oxidante, exposição fotolítica (UV e visível) e íons metálicos, conforme preconizado pela RDC 821/2023 (7).

Conforme Fundação Ezequiel Dias (2014b), foram detectados em comprimento de onda de 254 nm, 10 produtos de degradação, sendo a maioria deles (três produtos) obtidos a partir da exposição a íons metálicos. Além disso, foram obtidos um produto de degradação pela exposição ao calor, e dois produtos para cada uma das condições a seguir: solução oxidante, luz visível e luz ultravioleta (6). A identificação dos produtos de degradação gerados não foi necessária, pois durante o estudo de estabilidade não atingiram o limite determinado pela ANVISA de 0,5% da dose máxima administrada diariamente (de 1 mg dia⁻¹) (8,2). Entretanto, conforme ICH (2006), mesmo não atingindo os limites para identificação, os produtos de degradação gerados por medicamentos em geral, podem ser potenciais responsáveis de produzirem efeitos tóxicos e farmacológicos. Portanto, é desejável conhecer os produtos gerados (9).

Durante o estudo de estabilidade, os analistas deverão se atentar ao limite de identificação, que quando extrapolado poderá acarretar em custo financeiro, tempo adicional de análise, sujeitando-se ainda à disponibilidade de equipamentos, solventes, reagentes e gases, para realização dos ensaios necessários, que podem depender de duas ou mais técnicas para uma conclusão adequada.

Para o presente trabalho, tem-se como objetivo primário a aplicação estratégica de técnicas analíticas no estudo de degradação forçada do Entecavir monoidratado 0,5 mg comprimido revestido a partir de sua exposição ao agente oxidante peróxido de hidrogênio (H₂O₂). Como objetivo secundário, tem-se a identificação putativa dos produtos de degradação volatilizáveis gerados, propiciando a futura elaboração de possíveis rotas de síntese dos produtos de degradação para possível aplicação na produção de padrões de impurezas em escala industrial.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Entecavir

A hepatite B é uma doença acarretada pelo vírus B da hepatite (VHB), que afeta preferencialmente os hepatócitos, as células do fígado (10). A contaminação pode ocorrer de mãe para filho no nascimento (transmissão perinatal) ou por contato com fluidos humanos e materiais contaminados (transmissão horizontal) (11).

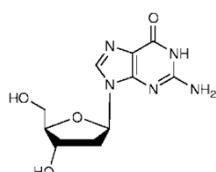
A doença pode variar de uma infecção aguda, que geralmente é curável, a uma infecção crônica, que pode levar a complicações graves, como cirrose e câncer de fígado (10). A forma incurável da doença é normalmente adquirida ainda na infância e, por isso, há uma grande comoção por parte do Ministério da Saúde acerca da vacinação infantil. Na fase adulta, a hepatite B crônica também poderá ocorrer, sendo a transmissão sexual a forma mais comumente observada nesses casos (11).

A doença é considerada um importante problema mundial de saúde pública, com aproximadamente 300 milhões de indivíduos infectados pelo VHB no ano de 2020 (4). Como forma de prevenção a essa doença, o Sistema Único de Saúde disponibiliza a vacina pentavalente, capaz de proteger contra as doenças: difteria, tétano, coqueluche, meningite e hepatite B. Já para o seu tratamento, busca-se evitar a progressão da doença e suas complicações, que representam uma carga considerada ao SUS (12). Os medicamentos disponíveis gratuitamente para uso clínico são: alfapecinterferona, tenofovir e entecavir (13).

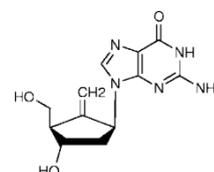
O entecavir (ETV) é um análogo de nucleosídeo que tem se mostrado promissor no tratamento da hepatite B (14). Quando presente no organismo, o ETV sofre rapidamente a fosforilação se transformando em sua forma ativa contra o VHB. Essa estrutura é capaz de interferir no ciclo de reprodução celular por se assemelhar ao trifosfato de desoxiguanosina, que é usado nas células para síntese do DNA (semelhança observada na figura 1). Dessa forma, atua na inibição da transcrição reversa, da replicação do DNA e da transcrição no processo de replicação viral (15).

Figura 1 - Semelhança do substrato desoxiguanosina com o entecavir

(1a) desoxiguanosina



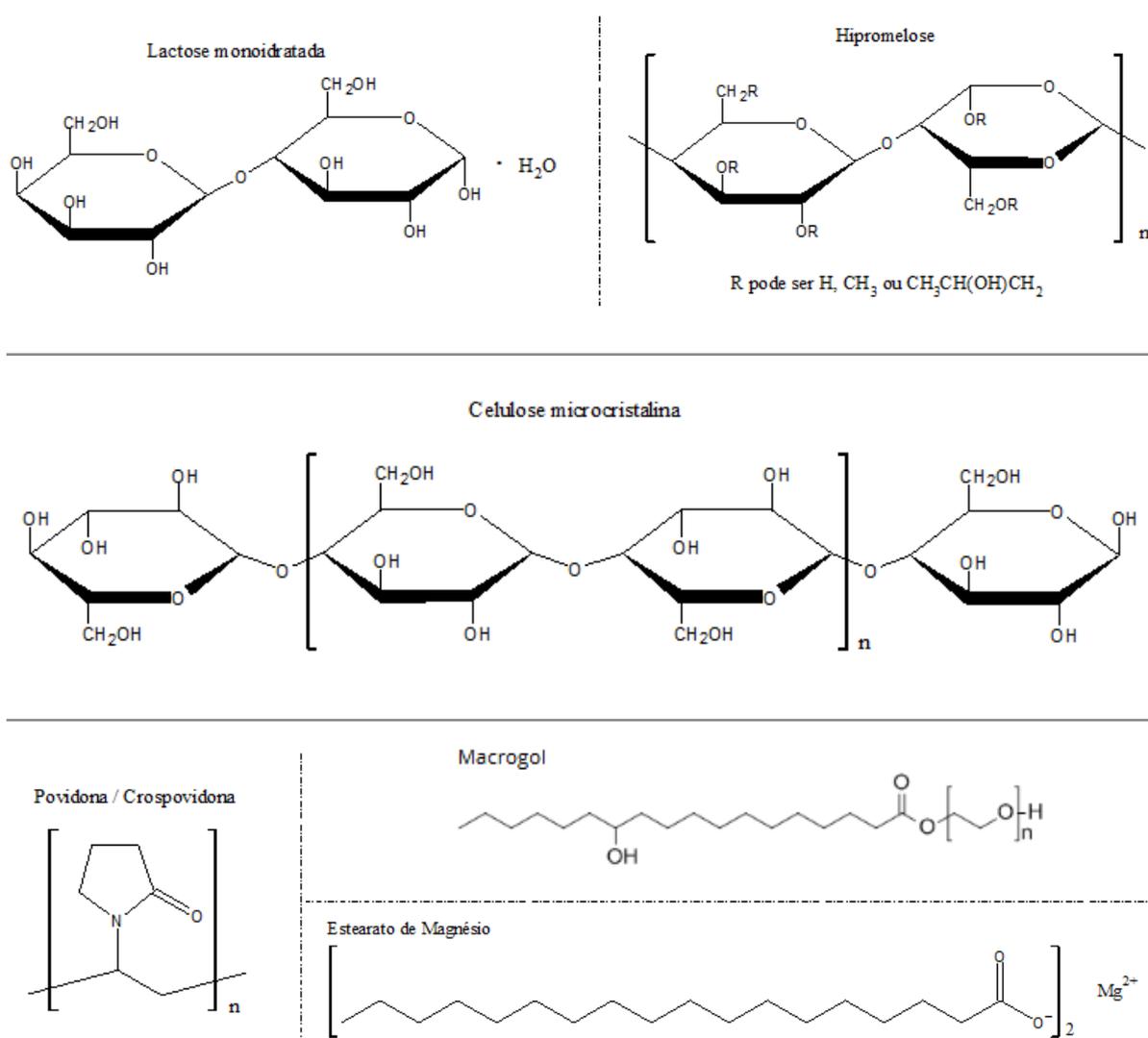
(1b) entecavir



Fonte: LANGLEY (2007)

O SUS disponibiliza gratuitamente o Entecavir na formulação Funed Entecavir 0,5 mg comprimido revestido. O fármaco contém 0,5325 mg de entecavir monoidratado, que equivale a 0,5 mg de entecavir anidro. Em sua formulação estão inseridos como excipientes: lactose monoidratada, celulose microcristalina, crospovidona, povidona, estearato de magnésio, dióxido de titânio, hipromelose e macrogol (estruturas orgânicas demonstradas na figura 2) (16).

Figura 2 - Estruturas moleculares de excipientes orgânicos da formulação de Funed Entecavir 0,5 mg comprimido revestido. Estruturas feitas no *software* ChemSketch®



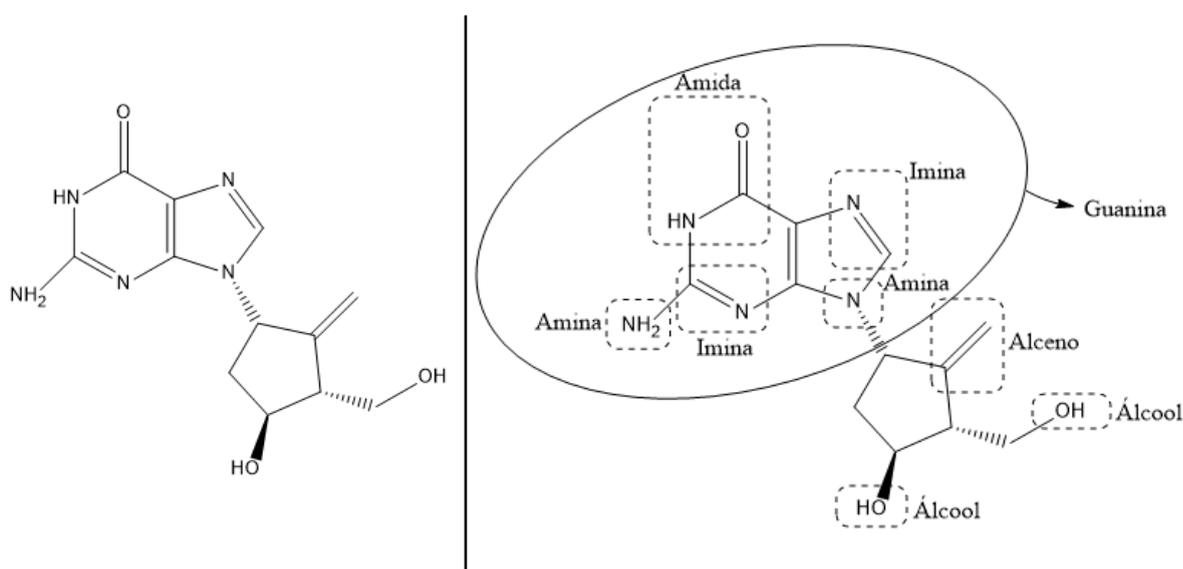
Fonte: ROWE; SHESKEY; OWEN (2006)

2.1.1 Propriedades físico-químicas

O Entecavir em sua forma anidra possui fórmula molecular $C_{12}H_{15}N_5O_3$, de massa molar igual a $277,28 \text{ g mol}^{-1}$ (18). A molécula é composta por uma guanina substituída na posição 9 pelo grupo 4-hidroxi-3-(hidroximetil)-2-metilidenociclopentila (19), conforme mostrado na figura 3. A estrutura apresenta funções nitrogenadas (amina, $-CNR'R$; e imina, $-C=NR$), nitrogenadas e oxigenadas (amidas, $-CONH_2$), oxigenadas (álcool, $-OH$) e grupo alceno ($-C=C-$).

Figura 3 - Molécula de entecavir e seus grupos funcionais.

Estruturas feitas no *software* ChemSketch®



Fonte: Adaptado de NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY (2024)

Esse composto apresenta-se na forma de um pó branco a esbranquiçado, sendo pouco solúvel em água. Quando em solução aquosa saturada, apresenta pH ligeiramente alcalino, devido à presença de nitrogênios e oxigênios em sua estrutura, capazes de sofrerem a protonação. No quadro 1 estão disponíveis esses e demais dados acerca das propriedades físicas e químicas do Entecavir.

Quadro 1 - Propriedades físico-químicas do entecavir

Nome químico	2-Amino-1,9-di-hidro-9-[(1S,3R,4S)-4-hidroxi-3-(hidroximetil)-2-metilenociclopentil]-6H-purin-6-ona ⁽ⁱ⁾
Nome sinônimo	Entecavir
Número CAS	142217-69-4

Quadro 1 - Propriedades físico-químicas do Entecavir - Continuação

Fórmula Química	$C_{12}H_{15}N_5O_3$
Peso molecular	Anidro: 277,28 g mol ⁻¹ ⁽ⁱ⁾ Monoidratado: 295,3 g mol ⁻¹ ⁽ⁱⁱ⁾
Características físicas	Sólido na forma de pó branco a esbranquiçado ⁽ⁱⁱⁱ⁾
Riscos à saúde	Toxicidade aguda, Oral (Categoria 4) ⁽ⁱ⁾ Carcinogenicidade (Categoria 2) ⁽ⁱ⁾
EPI's necessários	Luvas de borracha nitrílica (espessura mínima de 0,11 mm), vestuário de proteção, óculos de segurança e proteção respiratória contra pós. ⁽ⁱ⁾
Ponto de fusão	246 - 248 °C ⁽ⁱ⁾
Solubilidade	Em água 2,4 mg mL ⁻¹ à 25°C ⁽ⁱⁱⁱ⁾
pH	7,9 em solução aquosa saturada, a 25 °C ⁽ⁱⁱⁱ⁾
Rotação óptica específica	Entre + 24,0° e + 28,0°, a 25 °C ^(iv)

Fonte: (i) SIGMA-ALDRICH (2022);

(ii) ENTECAVIR MONOIDRATADO (2018);

(iii) NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY (2024);

(iv) THE UNITED STATES PHARMACOPEIA (2019)

2.2 Estudo de estabilidade e degradação forçada na indústria farmacêutica

Conforme descrito na Farmacopeia Brasileira 7ª edição, o medicamento “é o produto farmacêutico, tecnicamente obtido ou elaborado, que contém um ou mais fármacos e outras substâncias, com finalidade profilática, curativa, paliativa ou para fins de diagnóstico” (21). Para que o medicamento seja liberado para comercialização e consumo, o mesmo deve ser submetido a diversos ensaios físico-químicos e microbiológicos, bem como a estudos relacionados a estabilidade.

O estudo de estabilidade consiste em manter o medicamento sob condições de estresse conhecidas e próximas à realidade de armazenamento por determinado período. Durante o estudo, são realizados ensaios em laboratório para verificar a degradação resultante, permitindo o estabelecimento do prazo de validade, das condições adequadas de

armazenamento e de transporte. Nesse estudo é avaliada a perda da atividade do princípio ativo e a formação de impurezas que conforme a *Food and Drug Administration* (FDA), uma agência federal do Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos Estados Unidos, são componentes do medicamento que não sejam o IFA ou os excipientes da formulação (9).

As impurezas presentes em um medicamento, podem ser classificadas em: orgânicas, inorgânicas e solventes residuais. A primeira se caracteriza por impurezas orgânicas volatilizáveis, conhecidas ou desconhecidas, provenientes do processo de fabricação e/ou armazenamento da substância medicamentosa, podendo ser advindos de materiais de partida, subprodutos, intermediários, produtos de degradação, reagentes, ligantes e catalisadores. Já as impurezas inorgânicas e solventes residuais são consideradas impurezas identificadas e de toxicidades conhecidas, por serem utilizadas na síntese do medicamento e eliminadas em um controle devidamente adequado (9).

Os produtos de degradação são decorrentes das impurezas formadas no armazenamento (22). As substâncias geradas podem apresentar elevada toxicidade, comprometendo ainda mais a saúde do consumidor. A RDC 821/2023 especifica quando os produtos de degradação primários devem ser apenas reportados no estudo de estabilidade (limite de notificação), quando devem ter sua estrutura química identificada (limite de identificação) e quando deverão passar por uma avaliação de segurança biológica ou de um dado perfil de degradação em um nível especificado (limite de qualificação) (7). O quadro 2 (p. 8) retrata as informações base que estabelecem estes limites.

A identificação de impurezas em nível inferior ao descrito no quadro 2 (p. 8), geralmente, não é considerada necessária, mas pode-se destacar que ainda podem ser gerados produtos potenciais responsáveis de produzirem efeitos tóxicos e farmacológicos. Os níveis de impurezas podem ser medidos por uma variedade de técnicas, comparando a resposta analítica da impureza com a de um padrão de referência. Conforme ICH (2006), a própria substância medicamentosa pode ser usada como padrão para estimar os níveis de impurezas (9).

Já quando se atinge o nível de qualificação, é necessário realizar os ensaios de qualificação e testes de genotoxicidade baseados no guia internacional ICH M7(R1). Nesses estudos são avaliados o controle de impurezas mutagênicas, e quando não é possível a obtenção dos dados acerca dos riscos dessas substâncias, é estimado um limite de risco toxicológico, quantidade ao qual a propensão à doença se minimiza. Esse limite é estimado em $1,5 \mu\text{g dia}^{-1}$, que corresponde a um risco menor que 1 em 100.000 da substância causar câncer, mesmo em medicamentos utilizados em tratamentos de longo prazo (23).

Quadro 2 - Informações base para avaliação da necessidade de notificação, identificação e quantificação dos produtos de degradação no decorrer do estudo de estabilidade do medicamento

Limites	Limite de dose máxima diária do princípio ativo¹	Limites dos produtos de degradação²
Limites de Notificação	DMD \leq 1 g	0,1 %
	DMD $>$ 1 g	0,05 %
Limites de Identificação	DMD $<$ 1 mg	1,0 % ou 5 μ g ATD, o que for menor
	1 mg \leq DMD \leq 10 mg	0,5 % ou 20 μ g ATD, o que for menor
	10 mg $<$ DMD \leq 2 g	0,2 % ou 2 mg ATD, o que for menor
	DMD $>$ 2 g	0,10 %
Limites de Qualificação	DMD $<$ 10 mg	1,0 % ou 50 μ g ATD, o que for menor
	10 mg \leq DMD \leq 100 mg	0,5 % ou 200 μ g ATD, o que for menor
	100 mg $<$ DMD \leq 2 g	0,2 % ou 3 μ g ATD, o que for menor
	DMD $>$ 2 g	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 RDC N° 821/2023

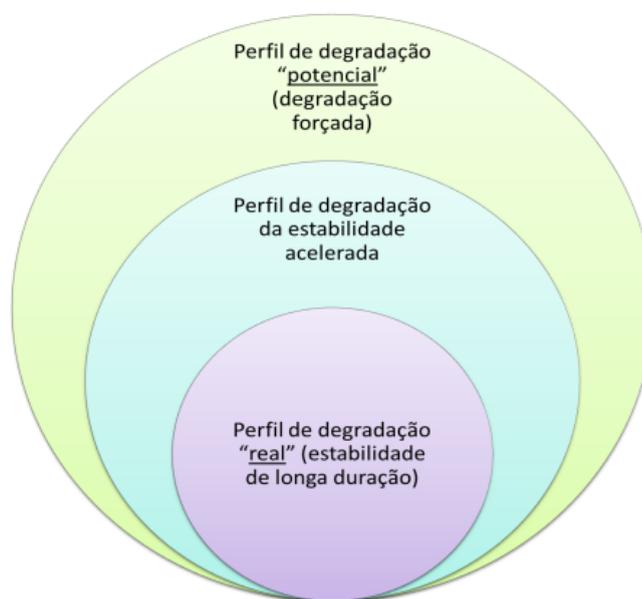
O estudo de estabilidade é subdividido em cinco categorias, conforme descrito abaixo e estabelecido pela RDC 318/2019 (24).

- Estudo de estabilidade acelerado: o medicamento é submetido a condições de armazenamento preestabelecidas, entretanto são realizadas curtas excursões fora das condições iniciais.
- Estudo de estabilidade de acompanhamento: submete-se o medicamento a condições de armazenamento preestabelecidas com o objetivo de acompanhar e confirmar o prazo de validade.
- Estudo de estabilidade de longa duração: verificar se o prazo de validade e condições de armazenamento propostos estão adequados para o medicamento.

- Estudo de estabilidade em uso: comprovar a estabilidade do produto em condições de armazenamento preestabelecidas após a abertura e subsequentes reaberturas da embalagem primária.
- Estudo de estabilidade reduzido: realizado quando parte das amostras não foram testadas em todas as combinações de fatores de estabilidade do produto.

O estudo de degradação forçada assemelha-se aos estudos de estabilidade quanto aos objetivos gerais e condições de controle. Entretanto, de forma experimental, se diferenciam pela intensidade em que os testes são realizados e pela rapidez da análise. O EDF possibilita o conhecimento prévio da estabilidade do produto em condições mais intensas de degradação, podendo antecipar o perfil de degradação que será obtido ao fim de sua vida útil (25). Conforme mostrado na figura 4, do ponto de vista qualitativo, o perfil real de degradação está contido no perfil potencial, obtido pelo EDF (26).

Figura 4 - Relação entre perfil de degradação "potencial", obtido no estudo de estresse (EDF), e o perfil de degradação "real", obtido no estudo de estabilidade de longa duração.



Fonte: BRASIL (2015b)

Na indústria farmacêutica o EDF é essencial para o desenvolvimento de medicamentos, assegurando que o método analítico proposto é capaz de identificar e quantificar as impurezas orgânicas do medicamento, que serão geradas nos estudos de maiores durações. Durante o estudo, o medicamento é submetido a condições estressantes,

acelerando a velocidade de reações que podem acontecer durante o período de armazenamento (26,24).

As condições que devem ser avaliadas são: aquecimento, umidade, hidrólise ácida/básica, meio oxidante e exposição fotolítica (UV e visível) (24). Em cada um dos agentes estressantes, devem ser aplicadas condições suficientes para promover degradação de no mínimo 10% da amostra, porém, inferior à degradação completa da mesma. Segundo Baertschi, Alsante e Reed (2011), historicamente é observado grande variação das condições aplicadas em relação a tempo, temperatura e concentração, mostrando grande dificuldade da definição do ponto final (*endpoints* - do inglês) apropriado para o EDF (27).

Conforme o Guia 04/2015 da ANVISA, apesar de não haver especificado um limite máximo padronizado para os *endpoints*, dados da literatura podem ser utilizados para justificar o ponto final da degradação forçada. Ainda nesse documento, “não se espera que determinado *endpoint* seja considerado “melhor”, visto que diferentes conjuntos de parâmetros selecionados podem gerar resultados adequados” (26). Para Costa *et al.* (2018) e Caldeira (2014), é recomendado que o IFA atinja no máximo 30% de degradação. Dessa forma, evita-se que as impurezas relacionadas sejam degradadas, gerando produtos de degradação secundários, terciários e assim por diante (25,28).

2.2.1 Degradação oxidativa de medicamentos

A degradação oxidativa de um medicamento é uma das degradações mais comumente observadas (29,30), mas também apresenta rotas de maior complexidade de elucidação (31). Devido à complexidade dos processos oxidativos e à dificuldade de reprodução dos experimentos, muitos trabalhos nesse sentido são qualitativos em vez de quantitativos (32).

A oxidação envolve um mecanismo de transferência de elétrons de modo a criar moléculas carregadas, ânions e cátions (33). Os fármacos apresentam três vias principais de oxidação. São elas: transferência de elétrons/metálica, auto-oxidação e oxidação por peróxidos (34,27). Outras condições oxidantes, como exposição a radicais hidroxila e oxigênio singlete ou ozônio são possíveis, porém menos comuns (27).

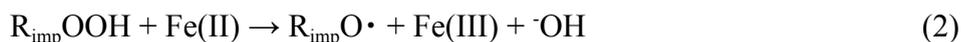
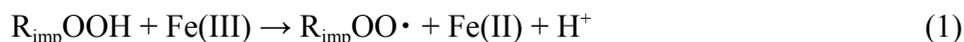
A auto-oxidação é um processo oxidativo espontâneo que envolve a ação do oxigênio molecular (22). O fármaco puro é bastante estável em relação à auto-oxidação, mas no produto medicamentoso formulado a substância medicamentosa se degrada por essa via (27), sendo ainda considerada o mecanismo mais comum de oxidação (35).

Alguns excipientes contêm hidroperóxidos como impurezas conhecidas e estas podem ser responsáveis pelo início do processo. Essas impurezas são geralmente encontradas em

excipientes como Polisorbato 80, Polietilenoglicol 400, Hidroximetilpropilcelulose e Polivinilpirrolidona (27).

Essas impurezas atuam como “iniciadores” da oxidação, pois podem dar origem a radicais peroxi ($R_{imp}OO\cdot$) e alcoxi ($R_{imp}O\cdot$), que são reativos com a molécula do fármaco. A geração dessas espécies pode ser catalisada com a presença de traços de metais (como ferro, cobre, níquel e cromo), conforme demonstrado pelo esquema 1. Essas espécies, ao reagirem com o fármaco, formam $R_{farm}\cdot$ que se encontra em estado tripleto, em virtude do elétron desemparelhado. O radical formado é uma espécie reativa com oxigênio atmosférico (27).

Esquema 1 - Ciclo catalítico desempenhado pelo Fe(III)/(II) interagindo com uma impureza de hidroperóxido conhecida ($R_{imp}OOH$) proveniente de excipientes

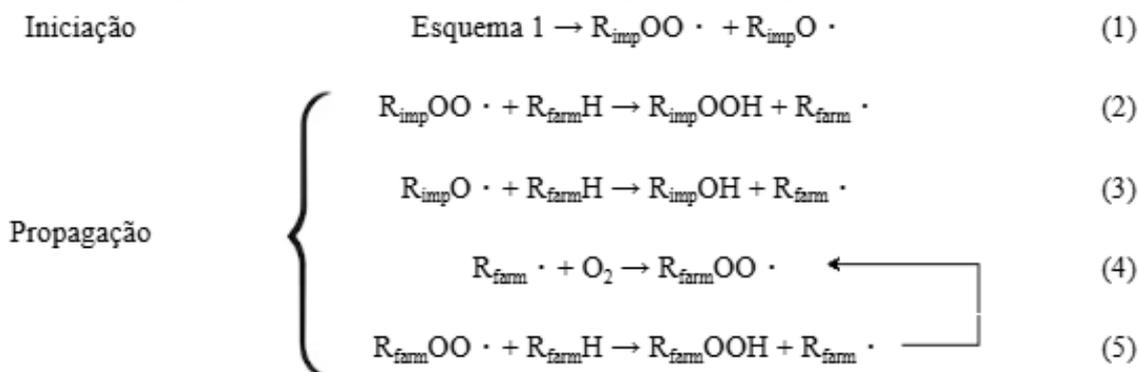


Fonte: Baertschi, Alsante e Reed (2011)

A auto-oxidação ocorre em três etapas: iniciação, propagação e terminação, conforme demonstrado no esquema 2 (p. 12). Segundo Baertschi, Alsante e Reed (2011), na primeira etapa ocorre a formação dos radicais peroxi e alcoxi, que pode ser catalisada conforme esquema 1 (27).

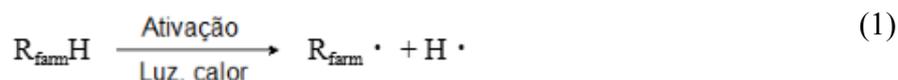
Na etapa de propagação, ocorre a oxidação e propagação da reação, com formação de peróxidos e hidroperóxidos. Os radicais peroxi e alcoxi formados pelas impurezas interagem com o fármaco, gerando os radicais $R_{farm}\cdot$. A partir dessa etapa ocorre a reação com oxigênio molecular. A concentração de oxigênio dissolvido na segunda etapa é fator crucial para o desenvolvimento da auto-oxidação, mas, uma pequena quantidade de O_2 já é suficiente para dar início à reação (32,36).

E, por fim, na terceira etapa ocorre a terminação com geração de produtos inativos. Isso pode ocorrer pela combinação dos radicais presentes no meio, mas os produtos podem ainda conter energia suficiente para voltar a dissociar a molécula (32).

Esquema 2 - Auto-oxidação mediada pelo radical peroxi do fármaco

Fonte: Adaptado de Baertschi, Alsante e Reed (2011)

Segundo Lachman, Lieberman e Kaning (2001), a auto-oxidação também pode ser iniciada sem a presença dos hidroperóxidos. Nesse caso, ocorreria uma quebra homolítica da molécula do fármaco com a formação dos radicais livres $\text{R}_{\text{farm}} \cdot$ e $\cdot\text{H}$ (esquema 3). Essas estruturas seriam geradas a partir de uma decomposição térmica, possivelmente com a ação da luz (32). Entretanto, a reação na presença das impurezas ocorre mais rapidamente, pois atuam como catalisadores da reação (27). Segundo Miller et. al. (1990) apud Li (2012) a auto-oxidação verdadeira, sem ação de catalisadores, é desprezível e a constante de velocidade da reação é estimado em aproximadamente $10^{-5} \text{ mol}^{-1} \text{ L}^1 \text{ s}^{-1}$ (22).

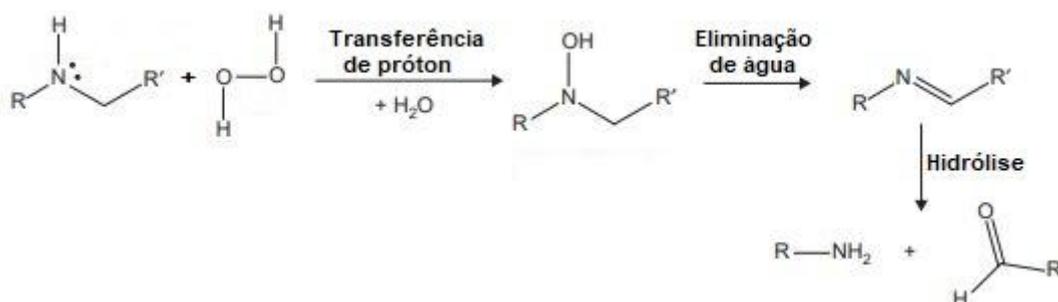
Esquema 3 - Formação de radicais da droga para início do processo auto-oxidativo

Fonte: Lachman, Lieberman e Kaning (2001)

O peróxido de hidrogênio pode ser produzido a partir dos hidroperóxidos formados nas equações 2 e 5 do esquema 2 em uma decomposição ácida. Assim, o peróxido de hidrogênio poderá atuar como um agente oxidativo (27). Segundo Blessy et. al. (2014), a oxidação ocorre preferencialmente em aminas, sulfetos e fenóis, transformando-os em n-óxidos, hidroxilamina, sulfonas e sulfóxido. O ataque à olefinas também é provável, com a formação de epóxido, mas a reação só ocorre se houver algum efeito estrutural estabilizador na molécula para suportar o oxigênio (33). As reações relativas às aminas e olefinas são retratadas abaixo nos esquemas 4, 5 e 6 (p. 13).

Esquema 4 - Ação oxidativa do peróxido de hidrogênio em aminas terciárias

Fonte: Adaptado de Baertschi, Alsante e Reed (2011) e Li (2012)

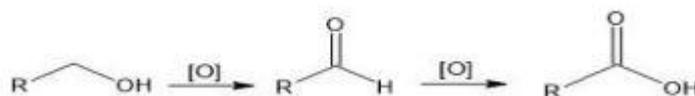
Esquema 5 - Ação oxidativa do peróxido de hidrogênio em aminas secundárias

Fonte: Adaptado de Baertschi, Alsante e Reed (2011)

Esquema 6 - Ação oxidativa do peróxido de hidrogênio em olefinas

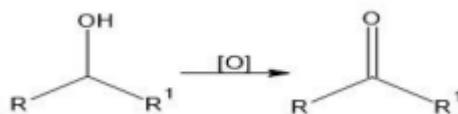
Fonte: Adaptado de Baertschi, Alsante e Reed (2011)

Funções que contenham hidrogênio lábil como carbono benzílico e carbono terciário ou em posições α em relação ao heteroátomo também são susceptíveis à oxidação para formação de hidroperóxidos, hidróxido ou cetona (33). A formação de aldeídos e ácidos carboxílicos pode ser observada pela oxidação de álcoois primários (esquema 7), enquanto que, para álcoois secundários, pode ser observada a formação de cetonas (esquema 8, p. 14) (37).

Esquema 7 - Oxidação de álcoois primários à aldeído e ácido carboxílico

Fonte: Adaptado de SOLOMONS; FRYHLE (2005)

Esquema 8 - Oxidação de álcool secundário à cetona



Fonte: Adaptado de SOLOMONS; FRYHLE (2005)

2.2.1.1 Degradação forçada por oxidação realizada nas indústrias

A degradação forçada é realizada para fins de mimetizar as vias oxidativas possíveis para o medicamento de estudo. É esperado que o estudo seja conduzido de forma a simular diferentes mecanismos de oxidação, determinando um perfil de degradação potencial adequado (26).

A utilização de metais como ferro e cobre (27) ou manganês (22) podem ser utilizadas para o estudo relacionado à transferência de elétrons/metálica. As indústrias farmacêuticas internacionais costumam utilizar peróxido de hidrogênio e o composto Azobisisobutironitrila (AIBN) para propiciar a degradação oxidativa, entretanto, o uso deste último reagente em indústrias nacionais não é frequente, devido a dificuldades de aquisição e importação, como também, problemas relacionados à armazenagem e transporte, por ser uma substância explosiva. Indústrias nacionais costumam realizar degradação oxidativa apenas com o uso de íons metálicos e peróxido de hidrogênio (34).

As diretrizes regulatórias não especificam sobre as condições de pH, temperatura, concentração do fármaco, agentes oxidantes específicos e sua concentração. Entretanto, para a degradação forçada oxidativa, as condições que normalmente são utilizadas pelas indústrias farmacêuticas são: 3% H₂O₂, à 25 °C ou 60 °C, podendo variar o período de um a sete dias (33). Segundo Blessy et. al. (2014) a concentração ideal de fármaco para o início dos testes é de 1 mg mL⁻¹. O fármaco pode não ser totalmente solúvel em água, sendo necessário o uso de um co-solvente que, de preferência, interaja pouco com o agente oxidante e com o IFA. Normalmente, são utilizados a acetonitrila ou o metanol (38).

Conforme RDC 821/2023 a degradação forçada deve ser conduzida em um lote do medicamento (7). É recomendado aplicar as mesmas condições degradantes ao medicamento, ao IFA e ao placebo. Os estudos realizados no placebo seriam importantes a fim de se desconsiderar produtos de degradação provenientes da matriz (26). O uso de padrões de referência (Substância Química de Referência Farmacopéica ou Substância Química de Referência Caracterizada) é dispensável quando o objetivo do estudo de degradação forçada

não for relacionado à comprovação da seletividade do método e na validação de metodologia analítica (38).

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de Arranjo de Fotodiodo é a técnica recomendada para verificação da formação dos produtos de degradação, podendo ser utilizado comprimento de onda fixo ou variável (26). Nessa técnica, é necessário avaliar a pureza do pico do sinal do IFA na solução medicamentosa degradada, para verificar a coeluição de impurezas (2). Os produtos de degradação podem ser medidos pela comparação da resposta analítica da impureza com a de um padrão de referência, ou até mesmo a própria substância medicamentosa (9).

2.3 Cromatografia líquida de alta eficiência

A cromatografia é uma técnica de ampla utilização em diversas áreas de pesquisa, responsável por separar os constituintes de uma mistura ou amostra complexa, que contenha compostos orgânicos, inorgânicos ou biológicos. As primeiras publicações sobre o tema são datadas há mais de um século pelo botânico Michael Tswett (39).

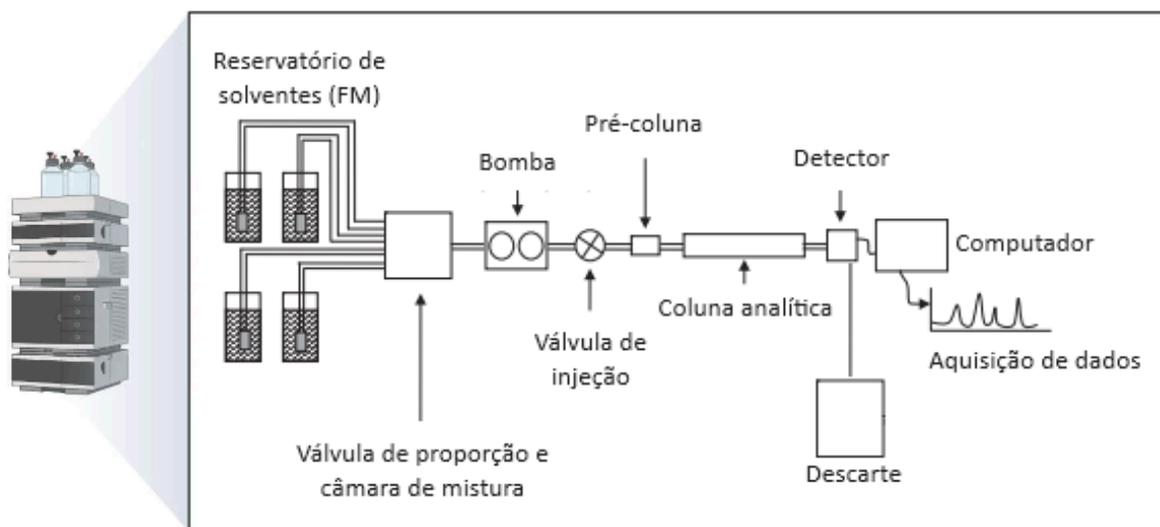
Na cromatografia líquida clássica, a amostra líquida percorre a fase móvel (FM) por ação da gravidade. A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC - do inglês: *High-Performance Liquid Chromatography*) se diferencia da primeira principalmente pela aplicação de pressão para bombeamento da FM e eluição dos analitos, apresentando maior velocidade, sensibilidade e resolução. Isso é necessário, pois o tamanho dos poros presentes na fase estacionária (FE) são menores, impedindo a passagem regular e facilitada do solvente pela gravidade (40).

A HPLC é uma técnica de alta resolução, eficiência e detectabilidade, que permite a separação e análise quantitativa de diversos tipos de amostras. Entretanto, possui como limitações o alto custo de instrumentação e operação, necessidade de experiência no manuseio e a falta de um bom detector universal (41).

O sistema da HPLC é composto principalmente por: 1) Reservatórios de solventes, que pode conter um sistema de degaseificação e filtros especiais; 2) Sistema de bombeamento, responsáveis por fornecer o fluxo constante de fase móvel, permitindo ainda a mistura controlada de solventes; 3) Sistema de injeção, onde é succionado certa alíquota da amostra, que entra em contato com a fase móvel do experimento anteriormente à eluição na coluna; 4) Pré-coluna (opcional), responsável por proteger a coluna de possíveis sólidos em suspensão; 5) Coluna, que é o local onde acontece a separação dos analitos; 6) Detector, que é responsável pelo registo de informações físicas ou químicas do eluato; e 7) Sistema de

aquisição e controle de dados, que permite selecionar os parâmetros de análise desejados, avaliar desempenho do sistema e avaliação de resultados (42). O sistema pode ser observado pela figura 5.

Figura 5 - Instrumentação básica da HPLC



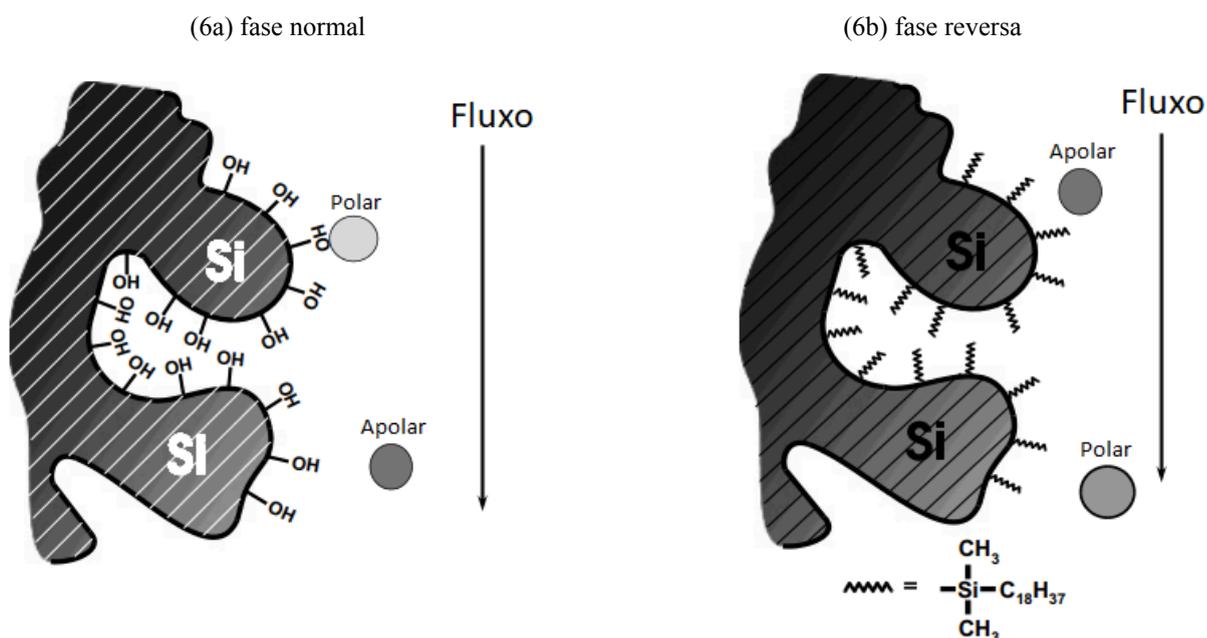
Fonte: adaptado de ARYAL (2023) e VITHA (2017)

A coluna analítica (FE) é composta por um material granular poroso, disperso sob aço inoxidável. Esse material consiste geralmente em sílica com uma superfície rica em silanol, que pode ser modificada quimicamente para atingir o tipo de seleção desejada. Além disso, fatores como comprimento da coluna, porosidade (área superficial), tamanho de poros e tamanho das partículas, possuem influência nas análises em relação ao número de pratos teóricos, retenção, largura do pico, sensibilidade e resolução, respectivamente (41).

Quanto à modificação da superfície, as colunas podem ser classificadas entre fase normal e fase reversa, sendo essa última a mais utilizada no mundo (45) e pertinente nas indústrias farmacêuticas (46). A coluna analítica de fase normal (NP - do inglês: *Normal Phase*) consiste em uma FE constituída por compostos polares, assim, a FM utilizada no método deve ser apolar, os compostos apolares são eluídos com maior rapidez, apresentando menor tempo de retenção (t_R). O oposto é observado para a fase reversa (RP - do inglês: *Reverse Phase*), conforme observado pela figura 6 (p. 17). Um exemplo de coluna de RP é a coluna C18, a mais comumente utilizada pela indústria farmacêutica, a qual apresenta grupos octadecil ligados à sílica garantindo hidrofobicidade à estrutura (47).

Ao percorrer a coluna cromatográfica, os solutos presentes na amostra se separam por meio dos mecanismos de partição e adsorção, que consistem na partição dos analitos entre a FM e a FE hidrofóbica, e pela adsorção do analito pela fase porosa (48). Portanto, interações com o analito ocorrem tanto pela fase estacionária, quanto pela fase móvel, que pode ser composta por mais de um solvente em método isocrático (concentrações fixas) ou gradiente (proporção entre solventes se alteram) (42).

Figura 6 - Demonstração simplificada do interior de uma coluna



Fonte: adaptado de DONG (2006)

A escolha do método de eluição implica diretamente na resolução e na capacidade de pico. O uso de métodos gradientes possibilita que misturas complexas tenham seus constituintes separados com maior eficiência, pois garante a análise em uma ampla faixa de hidrofobicidade em um tempo razoável. Assim, componentes de polaridades similares conseguem ser separados. É recomendado que um analista experiente avalie o comportamento dos analitos na coluna e FM utilizada, para alcançar meios de otimização apropriados (48).

Os analitos podem ser detectados ao final da passagem pela coluna analítica por diversas técnicas em um registro contínuo dos dados. Alguns deles são o acoplamento à espectrometria de massas e a absorção da radiação ultravioleta/visível. O primeiro será abordado no tópico 2.5, sendo muito utilizada a ionização por *eletrospray* (ESI) como fonte de ionização ao final da coluna (21). Já o segundo, é o tipo de detector mais utilizado em análises farmacêuticas (42), em que a amostra percorre uma célula de fluxo onde é incidido

um feixe luminoso sobre ela (de uma lâmpada de deutério) de comprimento de onda (λ) fixo, variável ou múltiplo (21).

Os detectores de λ múltiplo são denominados detectores de arranjo de diodos (DAD), ao qual a radiação UV-Vis incidente é “absorvida pela amostra e então separada em seus diferentes comprimentos de onda, que são detectados, individualmente, pelo detector de fotodiodos, registrando dados de absorvância em toda a faixa do espectro” (21).

O sistema capta a intensidade da luz transmitida e calcula o valor da razão entre luz transmitida (I) e luz incidente (I_0), a transmitância (T). Assim, a partir da equação 1 e de outras transformações matemáticas, o *software* transforma os dados de transmitância em absorvância (A), gerando ao final um cromatograma de eixos tempo de retenção por absorvância. A concentração do analito pode ser verificada a partir da Lei de Lambert-Beer (equação 2), em que ϵ é coeficiente de absorvidade molar ($L \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), (b) é o caminho óptico da célula (cm) e (c) é a concentração do analito (mol L^{-1}) (49).

$$A = -\log(I_0 / I) \Rightarrow A = -\log T \quad (1)$$

$$A = \epsilon bc \quad (2)$$

É importante ressaltar que detectores que utilizam a radiação UV-Vis são utilizados apenas para analitos que apresentem regiões cromóforas. Essas regiões são caracterizadas pela possibilidade de excitação eletrônica de elétrons de orbitais moleculares ocupados (σ e π ligantes e não ligantes) para orbitais de energia superiores (antiligantes π^* e σ^*) (21), conforme demonstrado no quadro 3.

Quadro 3 - Transições eletrônicas observadas em detectores UV-Vis

Transição de elétrons	Fenômeno
$\pi \rightarrow \pi^*$	Para essa excitação ocorrer é necessária a presença de grupo funcional insaturado para prover orbital π . A transição de elétrons do orbital π para o orbital π^* ocorre tipicamente em moléculas com ligações duplas conjugadas.
$n \rightarrow \pi^*$	Para essa excitação ocorrer é necessária a presença de grupo funcional insaturado para prover orbital π . Excitação típica em compostos com oxigênio e nitrogênio, com transição de elétrons não ligantes para o orbital π^* .

Quadro 3 - Transições eletrônicas observadas em detectores UV-Vis - Continuação

Transição de elétrons	Fenômeno
n → σ*	Essa transição ocorre em compostos saturados contendo átomos com pares de elétrons não ligantes. Esse tipo de transição ocorre em comprimentos de ondas mais curtos, excitando elétrons não ligantes para o orbital σ*.
σ → σ*	Essa transição é referente à excitação de elétrons do orbital ligante σ de uma molécula para o orbital anti-ligante correspondente pela absorção de radiação. Esse tipo de excitação ocorre em comprimentos de ondas mais curtos. Essa transição ocorre em alcanos.

Fonte: adaptado de PAVIA (2016)

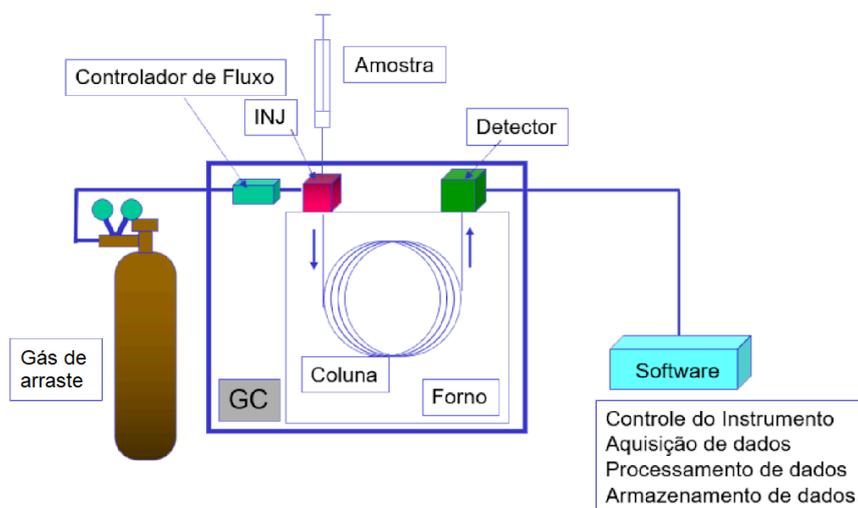
2.4 Cromatografia gasosa

A cromatografia gasosa (GC - traduzido do inglês: *gas chromatography*) é a principal técnica utilizada para análise de compostos voláteis ou volatilizáveis e termostáveis, com alta resolução, sensibilidade, detectabilidade e capacidade de análise de matrizes complexas (50). A separação dos componentes na GC se dá pela diferença de temperatura de ebulição dos analitos e pelas diferentes interações ocorridas durante a passagem da amostra pela coluna cromatográfica. A fase móvel é um gás de arraste inerte e puro, como o hélio, nitrogênio e hidrogênio (51).

A GC, de forma geral, tem como principais componentes: cilindro de gás, injetor, forno, coluna, detector, sistema de controle do instrumento e aquisição de dados (figura 7, p. 20). A inserção da amostra no sistema pode ser dada pela introdução no injetor aquecido, ocorrendo a vaporização dos analitos. Esses são então encaminhados para a coluna cromatográfica, que também é aquecida em um forno. Assim ocorre a separação dos constituintes, que serão encaminhados para o detector conectado à saída do equipamento (50).

O aquecimento ao qual a coluna é submetida é fundamental para a separação dos analitos, podendo ser aplicadas isotermas, em misturas com constituintes de volatilidades muito diferentes, ou rampas de aquecimento, quando necessárias. Quanto maior a temperatura do sistema, mais rapidamente os componentes serão eluídos, diminuindo o tempo de retenção e a resolução cromatográfica entre picos (51).

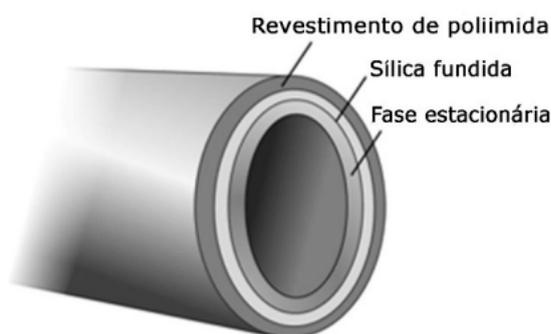
Figura 7 - Esquema geral de um cromatógrafo gasoso



Fonte: adaptado de TECNAL (2024)

As colunas cromatográficas normalmente empregadas são do tipo capilar, que podem ser fabricadas com vidro, aço inoxidável ou sílica fundida, recobertas por um material, que geralmente é a poliimida, conforme figura 8. A fase estacionária para cromatografia gás-líquido é um polímero líquido não volátil, que possui o mecanismo de partição (absorção) para separação dos constituintes da mistura (53).

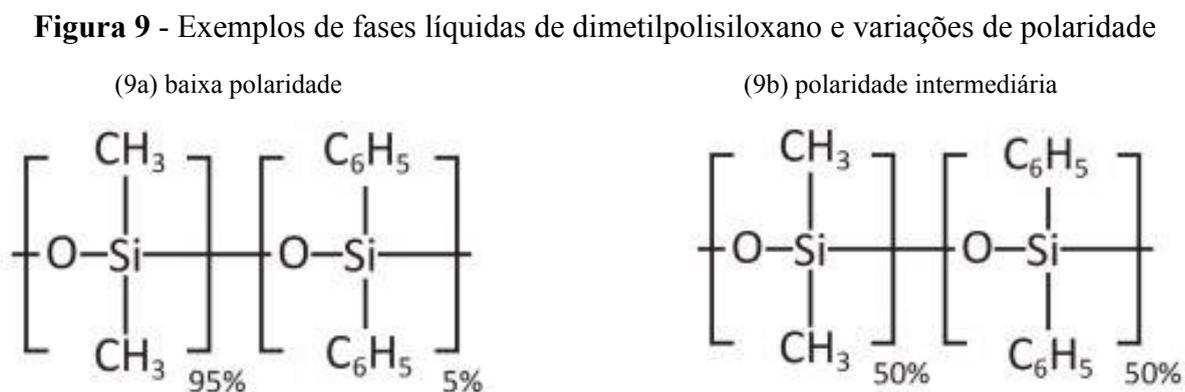
Figura 8 - Estrutura geral para colunas capilares



Fonte: Nascimento *et al.* (2018)

Um exemplo de fase líquida é o dimetilpolisiloxano, que interage com os compostos orgânicos principalmente por forças de dispersão, momento dipolo e por ligações de hidrogênio. Comercialmente, existem colunas de fases líquidas de dimetilpolisiloxano em diferentes proporções para alteração da polaridade da estrutura, como em proporções

5%fenil-metilpolisiloxano (de baixa polaridade) e 50%fenil-metilpolisiloxano (polaridade intermediária), conforme representado na figura 9.



Fonte: Nascimento *et al.* (2018)

As técnicas de separação podem ser aperfeiçoadas por meio de modificações dos módulos presentes no equipamento. Por exemplo, o módulo para forno de coluna pode ser alterado para a criação de um sistema multidimensional, o qual consiste em submeter a amostra a diferentes processos de eluição, sendo uma boa alternativa para que compostos que coeluíram em uma primeira etapa possam ser separados em uma segunda eluição (54).

Nesse sentido, em uma cromatografia gasosa bidimensional abrangente (GC x GC, traduzido do inglês: *comprehensive two-dimensional gas chromatography*), frações do eluato são transferidas da primeira coluna (primeira dimensão - ¹D) para a segunda coluna (segunda dimensão - ²D) ligadas em série com o uso de um modulador, que deve transferir o conteúdo de forma rápida e eficiente. O modulador deve ser capaz de coletar, reconcentrar em uma banda estreita e transferir o material para a segunda coluna (54).

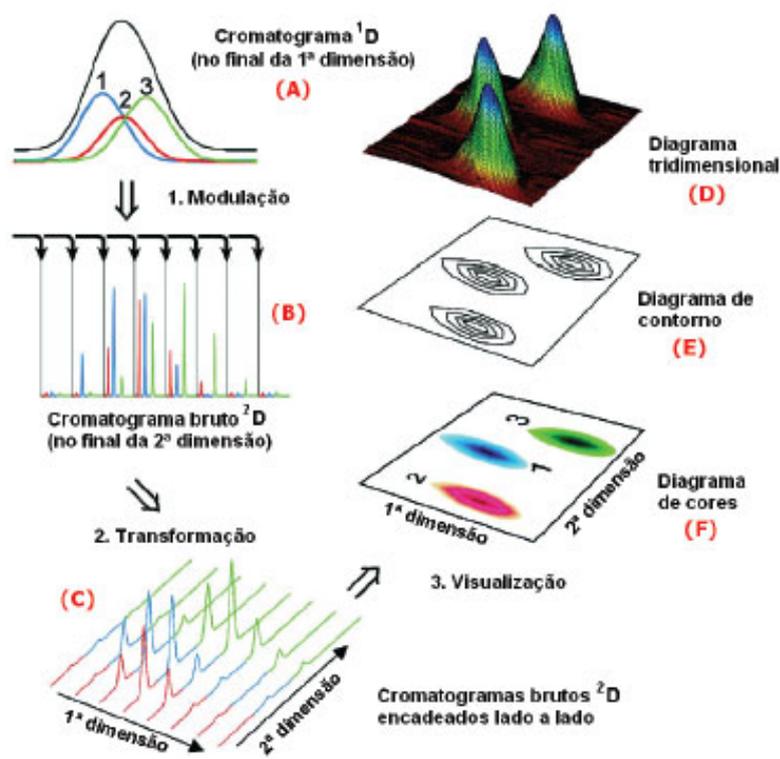
A primeira coluna possui comprimento maior, enquanto a segunda coluna deve ser curta o suficiente para que a eluição ocorra rapidamente, antes que a próxima fração seja nela introduzida, pelo sistema de modulação. As colunas utilizadas são capilares convencionais, sendo que os mecanismos de separação ocorridos devem ser preferencialmente diferentes entre si, denominados mecanismos de separação ortogonais. Assim, ao final da ¹D, o modulador recolherá analitos de temperatura de ebulição semelhantes que serão separados pela ²D, caso a coluna empregada seja seletiva o suficiente (54).

Ao final da corrida cromatográfica, os analitos são detectados e os dados são enviados para um sistema de dados. É possível utilizar na GC uma variedade de tipos de detectores,

entre eles, o detector de massas. No t3pico 2.5, a espectrometria de massas ser3a abordada mais profundamente.

Assim, em uma t3cnica convencional 1D GC (representado pela figura 7, p. 20) s3o gerados como resposta da an3lise um cromatograma em que a grandeza do sinal 3 representado em fun33o do tempo. J3 para a GCxGC, a resposta 3 mais elaborada, pois, o detector envia os dados para o sistema de dados de acordo com o que 3 elu3do pela segunda coluna. Entretanto, o tempo de modula33o 3 conhecido, sendo poss3vel a gera33o de gr3ficos tridimensionais sinal do detector x tempo de reten33o na 1ª coluna (1tR) x tempo de reten33o na 2ª coluna (2tR) e de diagramas tridimensionais (chamados 3D Plot), conforme figura 10 (54).

Figura 10 - Constru33o de diagramas tridimensionais sinal x 1tR x 2tR



Fonte: Pedroso *et al.* (2009)

2.4.1 Microextra33o l3quido-l3quido dispersiva

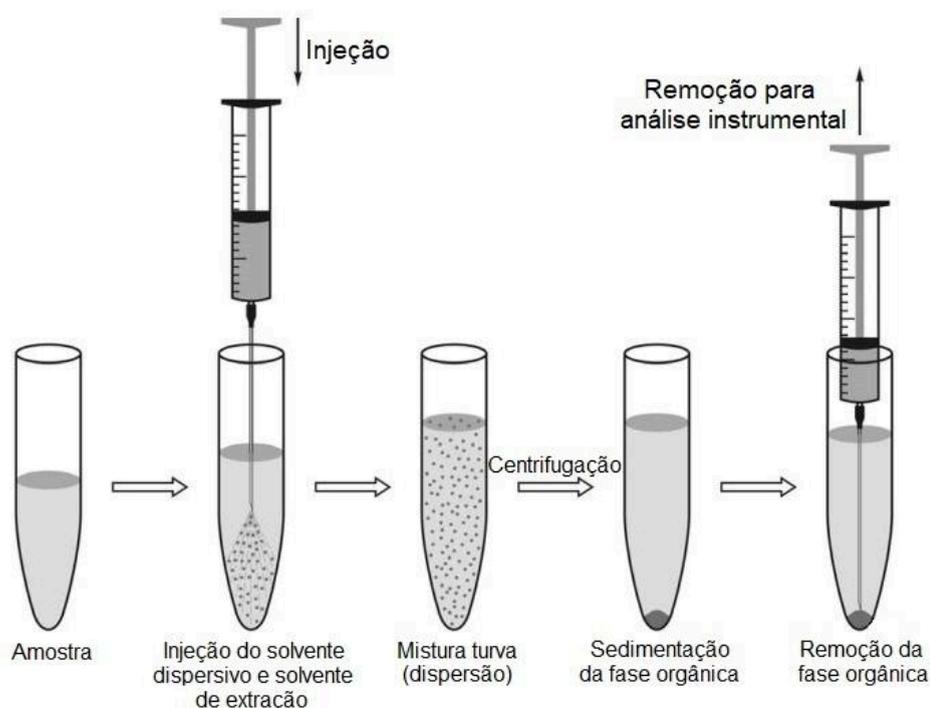
A microextra33o l3quido-l3quido dispersiva (DLLME, traduzido do ingl3s: *Dispersive Liquid-Liquid Microextraction*) tem sido uma t3cnica bastante utilizada para a extra33o e concentra33o de analitos, al3m de tornar a matriz do analito compat3vel com o sistema anal3tico que ser3 empregado, como a cromatografia gasosa (55).

A DLLME ocorre similarmente à extração líquido-líquido convencional, entretanto, são adicionados pequenos volumes de solvente extrator, sendo uma técnica rápida e de mais baixo custo (56). A razão entre o volume de amostra e solvente é de mililitros para microlitros (57). Além do solvente extrator, utiliza-se também um solvente disperso, formando assim um sistema ternário (55).

O solvente dispersor deve ser solúvel tanto na fase orgânica, quanto na fase aquosa, permitindo uma dispersão eficiente do líquido extrator em partículas finas, aumentando sua área superficial de contato com os analitos. Os solventes dispersores mais comumente utilizados são metanol e acetonitrila. Por sua vez, o solvente extrator utilizado deve apresentar densidade preferencialmente maior que a amostra e possuir boa afinidade com o analito de interesse. Normalmente são utilizados hidrocarbonetos halogenados, como clorofórmio e diclorometano (58).

Para realizar a DLLME, primeiro são injetados na amostra o solvente extrator e o solvente dispersor com uma seringa, formando uma mistura turva. Esse sistema ternário é então levado para centrifugação, fazendo com que as gotículas de solvente extrator se depositem no fundo do tubo cônico. Assim, o solvente extrator pode ser retirado para análise instrumental com auxílio de uma microseringa, conforme figura 11.

Figura 11 - Procedimento para microextração líquido-líquido dispersiva



Fonte: Adaptado de ZGOŁA-GRZEŚKOWIAK; GRZEŚKOWIAK (2011)

2.5 Espectrometria de massas (MS)

A espectrometria de massas (MS – do inglês *Mass Spectrometry*) consiste no estudo da matéria por meio da formação de íons em fase gasosa que são caracterizados a partir da razão massa/carga (m/z) desses. É uma técnica interdisciplinar utilizada para identificar e elucidar compostos desconhecidos e quantificar compostos conhecidos, possuindo amplo uso no estudo de pesticidas, na química forense, área clínica e na indústria farmacêutica (62).

Existem vários tipos de espectrômetros de massa, sendo diferenciados pelos mecanismos de ionização e pelo analisador de massa utilizado. De forma simplificada, a figura 12 retrata os constituintes básicos desse equipamento.

Figura 12- Constituintes básicos de um espectrômetro de massas (com exemplos)



Fonte: Autoria própria

O sistema de inserção compreende a entrada dos analitos ao sistema de análise. As técnicas cromatográficas podem ser utilizadas para inserção da amostra. A combinação da MS à cromatografia, seja líquida ou gasosa, permite que os analitos sejam separados e purificados anteriormente à análise estrutural. Dessa forma, as técnicas hífenadas garantem maior abrangência de aplicabilidade do método, sendo úteis na análise de misturas complexas (63).

Para a MS, é fundamental que os analitos estejam ionizados no momento da análise para que sejam analisados e detectados de acordo com a sua razão m/z . A ionização pode ser realizada no momento do preparo de amostra (como no ESI-MS) ou ser feita pelo próprio equipamento, podendo variar a instrumentação de acordo com a aplicação de vácuo, energia aplicada, estado físico inicial da amostra e taxa de fragmentação desejada pelo analista. A ionização ideal é selecionada de acordo com os objetivos da análise e da estrutura do analito de interesse, como o tamanho da molécula, termosensibilidade e polaridade.

Técnicas diferentes de ionização podem ser utilizadas em conjunto para elucidação e identificação de estruturas, já que a escolha do método pode implicar em alteração dos dados analíticos de forma qualitativa e quantitativa (64). Geralmente, são utilizados métodos de ionização brandos em conjunto com métodos mais agressivos, que juntos são capazes de fornecer informações acerca da massa molecular do analito e do padrão de fragmentação, que é único para cada composto.

Após a ionização, os íons gerados são separados em um analisador de massas de acordo com a razão m/z , usando campos elétricos e/ou magnéticos em um sistema a vácuo (65). O sistema de quadrupolos, *orbitrap*, armadilha de íons (no inglês: *ion trap*) e de tempo de voo (TOF - do inglês *time of flight*) são exemplos de analisadores.

Cada analisador utiliza determinado princípio para realizar a separação dos íons. São alguns deles: velocidade, estabilidade nos campos elétrico e/ou magnético e frequência orbital, que são específicos para cada íon gerado já que dependem da razão m/z (65). A escolha do analisador pode influenciar em termos de resolução e intensidades dos picos, que devem ser levados em consideração de acordo com o objetivo da análise. Além disso, alguns analisadores podem ser versáteis pela também capacidade de fragmentação de íons.

Ao final desse processo, os íons são detectados e os dados são processados em um computador. Como resultado da análise é gerado um espectro no qual no eixo y é apresentada a abundância relativa do íon (intensidade do sinal) e no eixo x a razão m/z (65). Quando o equipamento é capaz de gerar dados de alta resolução (m/z com quatro ou mais casas decimais) é considerado que a massa molecular do analito pode ser afirmada de forma inequívoca. Dessa forma, a MS é considerada como uma balança molecular.

2.5.1 Métodos de inserção e ionização da amostra

Dos métodos de inserção/ionização existentes, podem ser citados: ESI, DESI, GC e HPLC. Neste trabalho foram utilizadas somente a técnica de inserção por GC, que consiste em uma técnica propriamente cromatográfica, já retratadas no tópico 2.5. Entretanto, a ionização realizada nessa técnica será aprofundada neste item.

2.5.1.1 GC-MS

Dois técnicas de ionização são amplamente utilizadas em conjunto com a cromatografia gasosa: a ionização por elétrons (EI - do inglês: *Electron ionization*) e a ionização química (CI - do inglês: *chemical ionization*).

A EI foi o primeiro método de ionização utilizado para criação de íons em fase gasosa que possibilitou a análise de diversos compostos orgânicos. Entretanto, esse método pode não ser suficiente na elucidação estrutural de algumas moléculas devido à alta taxa de fragmentação (fragmentação agressiva), que impede a visualização do íon molecular no espectro, que fornece a informação da massa molar do analito.

Para solucionar essa questão, a CI foi desenvolvida como uma alternativa de baixa taxa de fragmentação (fragmentação branda), que permite a observação da massa molar. Dessa forma, a utilização dos dois métodos tornou-se um grande aliado, pois fornecem informações complementares.

Apesar de amplo uso na pesquisa, esses métodos se limitam a compostos pequenos, volatilizáveis e de baixa polaridade. Abaixo está descrita a funcionalidade da técnica EI, utilizada neste trabalho. Também será abordado sobre o uso de índices de retenção para auxílio em identificação de moléculas.

a) Ionização por elétrons (EI)

A ionização por elétrons é a forma de ionização mais simples. Nesta um filamento super aquecido emite elétrons de alta energia, que se ‘colidem’ com o fluxo de moléculas da amostra. Assim, são retirados elétrons da molécula, propiciando a fragmentação da mesma e a geração de cátions de forma altamente reprodutível, conforme demonstrado pela equação 4 (66,67).



O elétron emitido pelo filamento apresenta associado a ele um comprimento de onda que é determinado pela equação 5, sendo ‘ λ ’ o comprimento de onda (m), ‘ h ’ a constante de Planck (J s), ‘ c ’ a velocidade da luz ($m\ s^{-1}$) e ‘ E ’ igual a energia (J). Quando o comprimento de onda aplicado é próximo ao comprimento da ligação na molécula, a onda é perturbada e torna-se complexa. Então, a onda passa a não corresponder a uma função senoidal, podendo ser considerada como a sobreposição de ondas harmônicas. Se uma das frequências tiver energia suficiente, poderão ocorrer excitações eletrônicas ou a expulsão de elétrons (62).

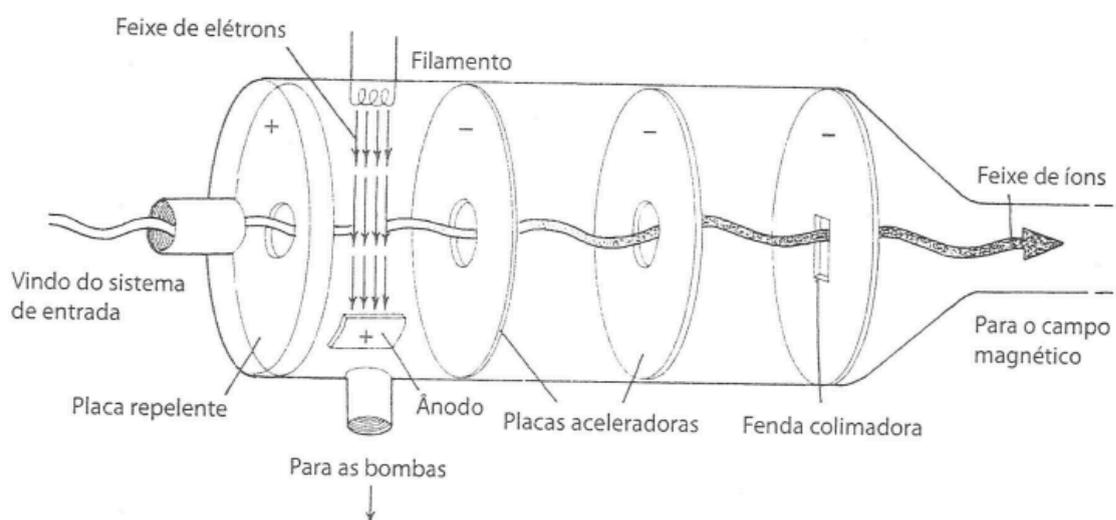
$$\lambda = hc / E \quad (5)$$

A remoção de um elétron ocorre apenas se a energia incidida for equivalente à energia de ionização da molécula. Para a maioria dos compostos orgânicos essa energia varia entre 8 e 15 eV (66). Entretanto, usualmente é aplicado na EI um feixe de elétrons padrão de 70 eV, pois, segundo Hoffman e Stroobant (2007) essa é a energia em que se atinge o número máximo de íons produzidos, apresentando maior eficiência (62). Parte dessa energia é utilizada para formação do produto primário (íon molecular) e o restante é utilizado para fragmentar o íon molecular em porções menores, de modo sequencial ou não (66,68).

O perfil de fragmentação gerado, juntamente com a relação m/z do íon molecular, representam grande importância para o reconhecimento de estruturas desconhecidas, uma vez que cada molécula apresenta um perfil de fragmentação próprio (podendo estar contidos em bibliotecas de espectros, que podem ser consultadas) e a razão m/z do produto primário corresponde ao peso molecular do analito. Entretanto, muitas vezes o íon molecular pode não ser observado, sendo um inconveniente desta técnica. A fragmentação rápida do íon molecular pode ocasionar a não detecção dessa estrutura no espectro. Dessa forma, perde-se uma importante informação analítica, o peso molecular do composto (68).

Após colisão entre elétron-molécula com a formação dos cátions e fragmentos, uma placa de potencial positivo atua como repelente para os íons formados, direcionando-os para uma série de placas aceleradoras. As placas aceleradoras realizam esse efeito por serem carregadas com uma diferença de potencial elevada. Ao fim do percurso, o fluxo de cátions passam por fendas colimadoras que uniformizam um feixe de cátions, conforme mostrado na figura 13 (66).

Figura 13 - Funcionamento da ionização por elétrons



Fonte: PAVIA (2016)

b) O uso de índices de retenção na GC-MS

Os bancos de dados disponíveis para a identificação de compostos muitas vezes podem não ser o suficiente para essa tarefa, devido à complexidade do analito. Contudo, os índices de retenção podem ser utilizados para evitar uma identificação equivocada (53).

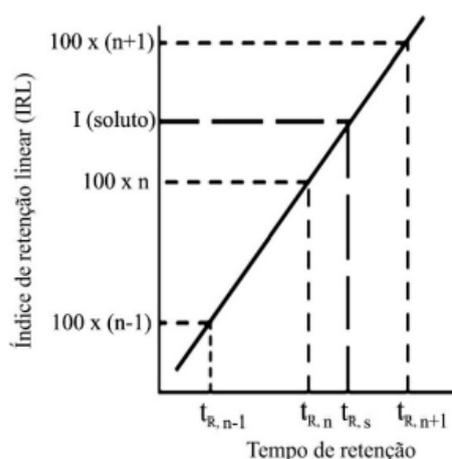
O índice de retenção de Kóvats é sempre calculado em análises isotérmicas (60), com a injeção em um GC de uma mistura padrão de alcanos saturados, operando em condições bem estabelecidas. Os tempos de retenção obtidos, são utilizados como um padrão externo de referência, para o cálculo do índice do analito de interesse (53).

No caso de análises com gradiente linear da temperatura, é utilizado o índice de retenção linear (LRI - traduzido do inglês: *linear retention index*). Entretanto, obter os valores de LRI disponíveis em literatura pode ser um desafio, pois dependem do tipo de fase estacionária, da espessura do filme, das condições de temperatura e outros (60). O LRI pode ser calculado conforme a equação 3, sendo n igual ao número de carbonos do alcano de sinal anterior ao analito, $t_{R(i)}$ igual ao t_R do analito, $t_{R(n)}$ igual ao t_R do alcano de sinal anterior ao analito e $t_{R(n+1)}$ igual ao tempo de retenção do alcano de sinal posterior ao analito.

$$LRI = 100n + 100 \left[\frac{t_{R(i)} - t_{R(n)}}{t_{R(n+1)} - t_{R(n)}} \right] \quad (3)$$

O valor do índice de retenção também pode ser determinado a partir de uma relação tempo de retenção x índice de Kóvats, conforme figura 14. Com o valor de LRI, juntamente com a comparação de espectros com a literatura, pode-se verificar a correlação entre os dados e avaliar se a identificação foi realizada de forma razoável (53).

Figura 14 - Determinação do LRI de compostos sob condições de temperatura programada



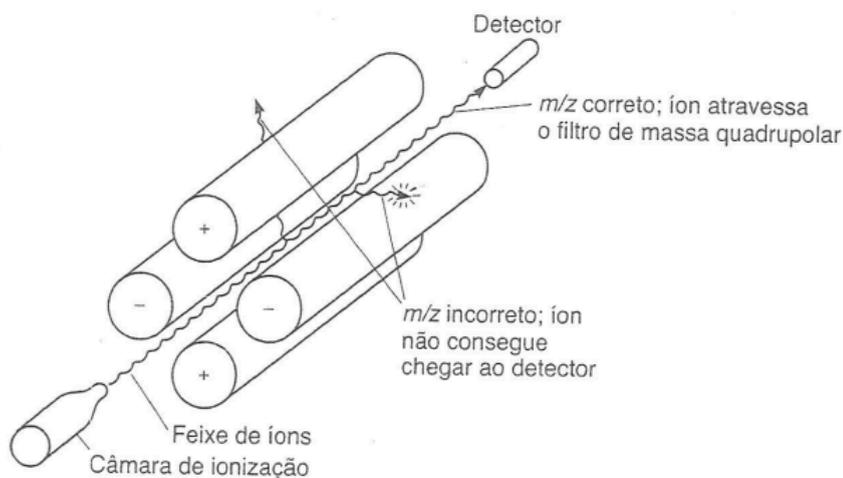
Fonte: Adaptado de Shimadzu Corporation (2007)

2.5.2 Analisadores de massas

Uma vez formados os íons, estes são encaminhados para o analisador de massas que irá separá-los de acordo com uma propriedade física dos mesmos, a razão m/z . Todos os analisadores de massas utilizam de campos elétricos e magnéticos estáticos ou dinâmicos que podem ser isolados ou combinados, diferenciando-os pela forma com que são aplicados (62). Na MS, o analisador de massas utilizado que irá definir se a técnica empregada será de alta ou baixa resolução. Ou seja, indicará a “precisão de massa”, a capacidade de separação de íons de m/z muito semelhantes. Os analisadores de massas TOF e *orbitrap* são exemplos de analisadores de alta resolução, enquanto que o quadrupolo e *ion trap* são denominados analisadores de baixa resolução (69).

O analisador de massas do tipo quadrupolo foi utilizado neste trabalho. Esse analisador é composto por quatro hastes perfeitamente paralelas na direção do feixe de íons, com uma seção transversal hiperbólica (figura 15) (62,66). São aplicadas nessas barras uma tensão de corrente contínua (CC) e uma radiofrequência (RF), gerando um campo eletroestático oscilante na região entre as barras. Para uma dada configuração de RF e CC, apenas os íons de m/z específicos terão trajetórias estáveis, completando o percurso até o final do analisador. Íons de m/z menores ou maiores tem suas trajetórias instáveis e acabam colidindo com as barras, sendo eliminados. As combinações de RF e CC são alteradas durante a análise para que seja possível a verificação de diferentes íons em um único experimento (66).

Figura 15 - Analisador de massas do tipo quadrupolo



Fonte: PAVIA (2016)

3 METODOLOGIA

3.1 Amostras

A degradação por exposição a meio oxidante foi realizada em comprimidos de Funed Entecavir 0,5 mg comprimido revestido (lote: 23030007, validade: 12/2025), de peso médio igual a 290 mg, e em comprimidos de placebo (lote: 15100103) do medicamento.

A formulação das amostras é constituída de entecavir monoidratado, polivinilpirrolidona K-30 (PVPK-30), celulose microcristalina 101, lactose monoidratada (malha 200 mesh), crospovidona e estearato de magnésio. A formulação para o placebo exclui a adição do princípio ativo (IFA Entecavir Monoidratado) (8).

Todos os comprimidos utilizados foram provenientes de único lote produzido pela Divisão de Produção Farmacêutica (DPF) da FUNED, em frascos coletados durante o envasamento no período do início, meio e fim do processo.

Além disso, foram utilizadas amostras de Padrão de Trabalho de Entecavir monoidratado (validade de padronização: 05/2026, Teor: 93,37% de entecavir, lote: MP2021060014) e Insumo Farmacêutico Ativo (IFA) - Entecavir monoidratado (validade: 31/05/2026, lote: MP2022090033).

3.2 Reagentes

Os reagentes e solventes utilizados durante o trabalho estão descritos no quadro 4. A água ultrapurificada utilizada foi obtida através do sistema de purificação de água Millipore Integral A-10 existente no Laboratório do Serviço de Controle Físico-Químico da FUNED.

Quadro 4 - Reagentes e solventes utilizados durante o preparo de amostras

Substância	Pureza / Teor	Marca	Lote
Acetonitrila	Grau HPLC, > 99,9%	Honeywell Riedel-de Haën™	EE594-US
Ácido clorídrico	37%	Química Moderna	14316
Álcool metílico	ACS, ISO, Reag, Ph Eur	Supelco	I1155009
Cloreto de sódio	ACS, ISO, Reag, Ph Eur	Supelco	K53698504
Clorofórmio	ACS, ISO, Reag, Ph Eur	Supelco	K54622045
Metanol	ACS, ISO, Reag, Ph Eur	Supelco	I1155009
Padrão de Guanina	Padrão de referência	USP	R111M0

Quadro 4 - Reagentes e solventes utilizados durante o preparo de amostras - Continuação

Padrão de alcanos (C ₅ - C ₁₈)	Padrão de referência	Agilent	6601049
Padrão de alcanos (C ₂₀ - C ₄₀)	Padrão de referência	Sigma-Aldrich	BCCD3361
Peróxido de hidrogênio	mín 29,0%	Synth	252512

3.3 Equipamentos e instrumentos

Os equipamentos utilizados foram:

- HPLC Merck Hitachi, com módulo para forno de coluna L-2300, auto-amostrador L-2200, sistema de bombas L-2130 e detector UV-Vis com arranjo de diodo L-2450. *Software* de análise: EZChrom Elite Chromatography Data System - Agilent Technologies (2007)
- Balança analítica: Mettler Toledo - X 205 DU;
- Banho ultrassom: Elma[®] - Transsonic Digitals;
- Agitador orbital: Labnet - Shaker 40;
- Estufa: Blinder - VD23;
- Pipetador automático 100 - 1000 µL: Discovery comfort;
- Pipetador automático 500 - 5000 µL: Biohit - m5000;
- Moinho analítico: IKA[®] - A11 basic;
- Coluna cromatográfica: Agilent - Eclipse Plus C18 150 mm x 4,6 mm x 3,5 µm;
- Coluna cromatográfica: Dr. Maisch - ReproSil Star RP18-e 150 mm x 2,0 mm x 5,0 µm;
- Filtro PVDF 0,22 µm.
- Cromatógrafo gasoso Agilent, com módulo para forno da coluna 8890 GC System, auto-amostrador 7693A(G4513A), espectrômetro de massas 5977C GC/MSD. Modulador: GC Option 886. *Software* de análise: GC Image 2021 (Zoex).
- Coluna cromatográfica: Agilent - DB5MS 20 m x 0,18 mm x 0,18 µm;
- Coluna cromatográfica: Agilent - DB7HT 5 m x 0,25 mm x 0,25 µm;
- Pipeta volumétrica de 1,00, 5,00 e 10,00 mL;
- Proveta de 10,0, 25,0, 100 e 500 mL;
- Agitador de tubos vortex: Biomixer - VTX-2500;
- Centrífuga: Thermo Scientific - Heraeus Megafurge 16R
- *Vials* de HPLC e de GC
- Insert para *vial*

3.4 Procedimento de análise

Todo o preparo de amostra foi realizado no laboratório do Serviço de Controle Físico-Químico da FUNED, como também a condução da degradação forçada e análises de doseamento e verificação de impurezas. As soluções foram únicas, sem preparo de replicatas. A análise em GCxGC-MS foi executada no laboratório de tecnologias integradas (INTECHLAB), localizado no campus VI do CEFET-MG.

3.4.1 Preparo de soluções para degradação forçada do medicamento Funed Entecavir 0,5 mg comprimido revestido

A degradação forçada do medicamento Funed Entecavir 0,5 mg comprimido revestido foi realizada seguindo as exigências da RDC 821/2023, adaptando o método descrito no documento “Relatório do Estudo de Degradação Forçada de Entecavir 0,5 mg/comprimido” de 2014, escrito por colaboradores da FUNED.

a) Preparo de soluções a serem degradadas

- Comprimido Funed Entecavir 0,5 mg comprimido revestido

Triturou-se 20 comprimidos de Funed Entecavir 0,5 mg comprimido revestido, com o auxílio de moinho, realizando um *pool* de amostras do início, meio e fim do envase. Mediram-se a massa de 725 mg do triturado e transferiu-se para balão volumétrico de 25,00 mL com auxílio de 10 mL de metanol, medidos em proveta. Em seguida, o balão foi levado em banho ultrassom por 20 minutos e em agitador orbital pelo mesmo período. Após o processo, adicionaram-se 350 µL de peróxido de hidrogênio e aferiu-se o menisco do balão com água ultrapurificada. A mistura foi transferida para tubo tipo Falcon de 50 mL e levado à estufa a 25 °C.

- Placebo de formulação do Funed Entecavir 0,5 mg comprimido revestido

Realizou-se o mesmo procedimento adotado para o Funed Entecavir 0,5 mg comprimido revestido, medindo a massa de 725 mg do placebo.

- IFA do Funed Entecavir 0,5 mg comprimido revestido

Mediu-se a massa e transferiu-se 10,65 mg do IFA do Funed Entecavir 0,5 mg comprimido revestido para balão volumétrico de 200,0 mL com auxílio de 80 mL de metanol, medidos em proveta. Em seguida, o balão foi levado em banho ultrassom por 20 minutos e em agitador orbital pelo mesmo período. Depois, foram adicionados 2,8 mL de peróxido de

hidrogênio e aferiu-se o menisco do balão com água ultrapurificada. Uma alíquota de 25 mL dessa mistura foi transferida para tubo tipo Falcon de 50 mL e levado à estufa a 25 °C.

- **Branco**

O branco foi preparado adicionando 10 mL de metanol, medidos em proveta, a um balão volumétrico de 25,00 mL. Em seguida, adicionaram-se 350 µL de peróxido de hidrogênio e aferiu-se o menisco do balão com água ultrapurificada. A mistura foi transferida para tubo tipo Falcon de 50 mL e levado à estufa a 25 °C.

b) Preparo de soluções controle

O preparo de soluções controle foi realizado idem item 'a' da seção 3.4.1, excluindo a adição do peróxido de hidrogênio. Também foi preparada uma solução controle do padrão de trabalho de Entecavir monoidratado, conforme descrito abaixo.

- **Padrão de Trabalho de Entecavir monoidratado**

Realizou-se o mesmo procedimento adotado para a solução de degradação do IFA do Funed Entecavir 0,5 mg comprimido revestido, medindo a massa de 10,65 mg do Padrão de Trabalho de Entecavir monoidratado, sem a adição de peróxido de hidrogênio.

3.4.2 Preparo da solução padrão combinada de entecavir e guanina

a) Preparo da solução diluente

Em um béquer de 500 mL adicionaram-se 15,0 mL de acetonitrila e 285,0 mL de água ultrapurificada, com auxílio de proveta.

b) Preparo da solução de ácido clorídrico 1 mol L⁻¹

Adicionou-se 5 mL de água ultrapurificada em um balão volumétrico de 10,00 mL com o auxílio de uma proveta. Em seguida, pipetou-se 0,85 mL de ácido clorídrico 37% e transferiu-se para o balão. Esperou-se o resfriamento e aferiu-se o menisco com água ultrapura.

c) Preparo da solução padrão de entecavir

Pesou-se 7,5 mg de padrão de trabalho de entecavir monoidratado e transferiu-se para balão volumétrico de 25,00 mL com auxílio de 20 mL de solução diluente, medidos em

proveta. Em seguida, o balão foi levado em banho ultrassom por 20 minutos. Após o processo, aferiu-se o menisco do balão com solução diluente.

d) Preparo da solução padrão de guanina

Pesou-se 5,12 mg de padrão de padrão de guanina e transferiu-se para balão volumétrico de 50,00 mL com auxílio de 5 mL de solução diluente, medidos em proveta. Adicionou-se 1,00 mL de ácido clorídrico 1 mol L⁻¹, com o auxílio de uma pipeta volumétrica. Em seguida, o balão foi levado em banho ultrassom por 20 minutos. Após o processo, aferiu-se o menisco do balão com solução diluente.

e) Preparo da solução padrão combinada

Transferiu-se para um balão volumétrico de 100,0 mL, 5,00 mL da solução padrão de entecavir e 5,00 mL da solução padrão de guanina, com auxílio de pipeta volumétrica. Depois, aferiu-se o menisco do balão com solução diluente. Em seguida, pipetou-se 5,00 mL dessa solução com uma pipeta volumétrica e transferiu-se para um balão volumétrico de 50,00 mL. Aferiu-se o menisco do balão com solução diluente.

3.4.3 Percentagem degradada e notificação/quantificação de impurezas

O doseamento final à oxidação e notificação/quantificação de impurezas foram realizados após 7 dias de degradação. A metodologia de doseamento utilizada foi desenvolvida e validada pela Fundação Ezequiel Dias (6). O mesmo procedimento também foi aplicado para se conhecer a evolução da degradação, analisando-se em 1, 7 e 14 dias de degradação para as amostras controle padrão de trabalho e comprimido degradado.

As soluções de análise foram preparadas conforme item 3.4.1 e foram filtradas em membrana de PVDF com porosidade de 0,22 µm e transferidas para *vials* de HPLC. A análise em HPLC com detector DAD foi conduzida realizando injeção das amostras em triplicata e análise da fase móvel, seguindo as condições instrumentais cromatográficas e gradiente de eluição, descritos nos quadros 5 e 6, respectivamente (p. 35). Para análise da evolução da degradação, as injeções foram realizadas em duplicata.

Quadro 5 - Condições experimentais cromatográficas do método de doseamento de ETV

Condição	Descrição
Volume de injeção	6 µL
Fase móvel	Gradiente de eluição (quadro 6)
Fase estacionária	C18 150 mm x 2,0 mm x 5,0 µm
Fluxo da fase móvel	0,8 mL min ⁻¹
Temperatura do forno	50 °C
Temperatura do auto-injetor	10 °C
Tempo de corrida	12 minutos
Comprimento de onda	Varredura espectral 190 a 400 nm
Solução de limpeza do auto injetor	Acetonitrila:Água ultrapura (3:97)

Fonte: adaptado de FUNDAÇÃO EZEQUIEL DIAS (2014a)

Quadro 6 - Gradiente de eluição do método de doseamento de entecavir

Tempo (minutos)	% Acetonitrila	% Água ultrapura	Eluição
0	3	97	Equilíbrio
0 → 3,3	3 → 10	97 → 90	Gradiente linear
3,3 → 4,0	10 → 40	90 → 60	Gradiente linear
4,0 → 6,0	40 → 100	60 → 0	Gradiente linear
6,0 → 7,0	100	0	Isocrático
7,0 → 8,0	100 → 50	0 → 50	Gradiente linear
8,0 → 9,0	50 → 3	50 → 97	Gradiente linear
9,0 → 12,0	3	97	Equilíbrio

Fonte: adaptado de FUNDAÇÃO EZEQUIEL DIAS (2014a)

Após a análise, fez-se comparação entre cromatogramas e notificação dos picos de entecavir e impurezas (sinais provenientes apenas da amostra de Funed Entecavir 0,5 mg comprimido revestido). O teor de entecavir foi determinado a partir da comparação entre

áreas do sinal de entecavir pelo comprimido degradado e solução controle respectiva, corrigidas pela massa, conforme Brasil (2015b). A porcentagem de degradação atingida deverá estar inclusa no intervalo de 10 a 30% (25,28,24).

Os cálculos realizados estão descritos nas equações 12 e 13, sendo: ÁreaDEG = área do sinal de entecavir obtida pelo cromatograma do comprimido degradado; mCONT = massa medida para o preparo da solução controle de comprimido (mg); ÁreaCONT = área do sinal de entecavir obtida pelo cromatograma da solução controle; e mDEG = massa medida para o preparo da solução degradada (mg).

$$\text{Teor de entecavir após degradação (\%)} = \frac{\text{ÁreaDEG} * \text{mCONT} * 100}{\text{ÁreaCONT} * \text{mDEG}} \quad (12)$$

$$\text{Percentual de degradação (\%)} = 100 - \frac{\text{ÁreaDEG} * \text{mCONT} * 100}{\text{ÁreaCONT} * \text{mDEG}} \quad (13)$$

O teor individual de cada impureza foi calculado tomando como referência a área respectiva ao entecavir na amostra, pois, conforme ICH (2006) (9), a própria substância medicamentosa pode ser usada como padrão para estimar os níveis de impurezas. A equação utilizada está descrita na equação 14 abaixo, sendo ÁreaIMP = área gerada pelo sinal da impureza e ÁreaCONT = área gerada pelo sinal de ETV na solução controle medicamentosa.

$$\text{Teor da impureza (\%)} = \frac{\text{ÁreaIMP} * 100}{\text{ÁreaCONT}} \quad (14)$$

Já o teor total de impurezas (que apresentam cromóforo), foi determinado a partir da somatória de todos os sinais respectivos às impurezas, relacionando-os ao sinal de entecavir da solução controle, conforme equação 15.

$$\text{Teor total de impureza (\%)} = \frac{\sum \text{ÁreaIMP} * 100}{\text{ÁreaCONT}} \quad (15)$$

3.4.4 Verificação de impurezas relacionadas

O método de impurezas relacionadas consistiu na verificação de impurezas já conhecidas para o entecavir: guanina, 3'-monobenzil entecavir, 5'-monobenzil entecavir e di-benzil entecavir (70).

Devido a indisponibilidade dos padrões analíticos 3'-monobenzil entecavir, 5'-monobenzil entecavir e di-benzil entecavir, não foi possível realizar a análise cromatográfica dessas. Entretanto, a guanina estava disponível, contribuindo para a verificação da formação desta impureza. Para isso, preparou-se uma amostra padrão combinada de entecavir e guanina conforme método validado por colaboradores da FUNED. O preparo foi descrito no item 3.4.2.

A análise foi conduzida em HPLC com detector DAD, com as condições experimentais e gradiente de eluição descritas nos quadros 7 e 8 (p. 38), respectivamente. As amostras foram analisadas após 8 dias de degradação, seguindo o preparo descrito no item 3.4.1. Foi também analisada uma amostra padrão combinada de entecavir e guanina, preparada conforme item 3.4.2.

Estas foram filtradas em membrana de PVDF com porosidade de 0,22 μm e transferidas para *vials* de HPLC. Realizaram-se injeções em duplicata, também com análise da fase móvel.

Quadro 7 - Condições experimentais cromatográficas do método de impurezas relacionadas

Condição	Descrição
Volume de injeção	20 μL
Fase móvel	Gradiente de eluição (quadro 8, p. 38)
Fase estacionária	C18 150 mm x 4,6 mm x 3,5 μm
Fluxo da fase móvel	1,0 mL min^{-1}
Temperatura do forno	35 °C
Temperatura do auto-injetor	10 °C
Tempo de corrida	30 minutos
Comprimento de onda	Varredura espectral 190 a 400 nm
Solução de limpeza do auto injetor	Acetonitrila:Água ultrapura (3:97)

Fonte: adaptado de FUNDAÇÃO EZEQUIEL DIAS (2014a)

Quadro 8 - Gradiente de eluição do método de substâncias relacionadas do entecavir

Tempo (minutos)	% Acetonitrila	% Água ultrapura	Eluição
0	5	95	Isocrático
0 → 3,3	5 → 80	95 → 20	Gradiente linear
3,3 → 4,0	80	20	Isocrático
4,0 → 6,0	80 → 5	20 → 95	Gradiente linear
6,0 → 7,0	5	95	Equilíbrio

Fonte: adaptado de FUNDAÇÃO EZEQUIEL DIAS (2014a)

3.4.5 Análise no GCxGC-MS

A análise em GCxGC-MS foi conduzida pelo preparo das amostras descrita no item 3.4.1 e exposição à agente estressante por 6 dias. As amostras foram preparadas por DLLME como forma de eliminar o peróxido de hidrogênio e a água presentes na amostra, além de concentrar os produtos de degradação em uma matriz orgânica.

A DLLME foi realizada para todas as amostras preparadas no item 3.4.1. Pipetaram-se 10,00 mL de cada amostra (previamente centrifugada por 15 min e filtrada em filtros PDVF 0,45 e 0,22 μm) em um tubo Falcon de 15 mL. Adicionaram-se 365 μL de clorofórmio (solvente extrator) e 0,7 g de cloreto de sódio (para proporcionar um efeito *salting out*). Não foi adicionado solvente dispersor, uma vez que o metanol presente na amostra já atuaria como tal, conforme Huo *et al.* (2011) (58). Levou-se a mistura em vortex por 2 minutos e depois centrifugou-se por 15 minutos. A retirada da fase orgânica decantada foi realizada com o auxílio de uma seringa, transferindo-a para um *insert*. O *insert* foi então inserido em um *vial* para GC (injeção direta), procedendo à análise em GCxGC-MS. As condições cromatográficas e espectrométricas foram descritas no quadro 9.

Quadro 9 - Condições experimentais da análise em GCxGC-MS

Condição	Descrição
Volume de injeção	1 μL
Fase estacionária (1D)	5%fenil-metilpolissiloxano (20 m x 0,18 mm x 0,18 μm)

Quadro 9 - Condições experimentais do GCxGC-MS - Continuação

Condição	Descrição
Fase estacionária (2D)	50%-Fenil-metilpolissiloxano (5 m x 0,25 mm x 0,25 µm)
Pressão do gás de arraste (H ₂)	28,5 psi
Fluxo do gás de arraste	0,5 mL min ⁻¹
Tempo de modulação	4 segundos
Modo	<i>Splitless</i>
Temperatura do injetor	270 °C
Temperatura do forno (rampa de aquecimento)	50 °C por 1,00 min Taxa de aquecimento = 8 °C min ⁻¹ até 300 °C 300 °C por 1,75 min
Temperatura do detector	320 °C
Tempo de corrida	34 minutos
Análise	<i>Full Scan: m/z = 50 - 300</i> (modo positivo)
Taxa de aquisição espectral	20 Hz

A identificação putativa das impurezas volatilizáveis foi baseada na comparação do perfil de fragmentação dos compostos com os espectros de referência de substâncias padrão provenientes do banco de dados da NIST (2022), obtendo-se os valores de *Match* e *Reverse Match*. Para uma identificação mais efetiva, as soluções padrão de alcanos C₅ - C₁₈ e C₂₀ - C₄₀ foram transferidas para *vial* e submetidas à análise em GCxGC-MS nas mesmas condições descritas pelo quadro 9, com o objetivo de verificação do índice de retenção linear dos produtos de degradação. O LRI foi calculado com os dados obtidos para a primeira dimensão, pela equação linear $LRI = 60,516 * T_R + 437,75$ ($R^2 = 0,997$).

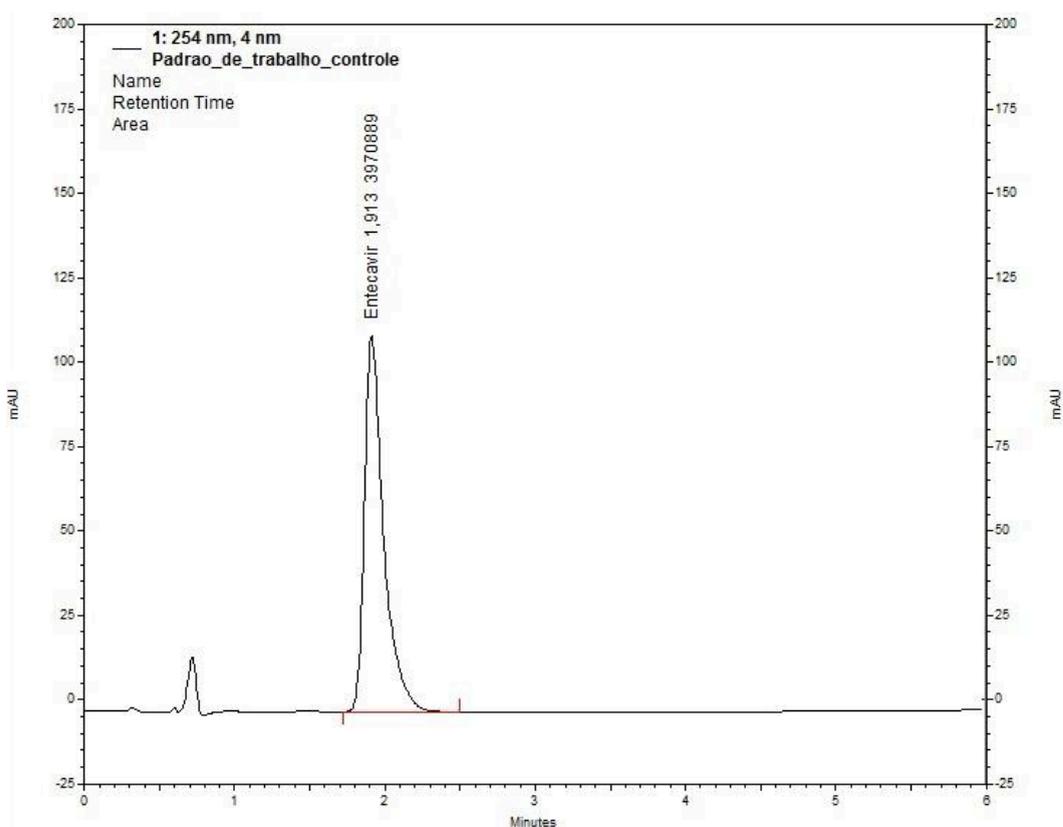
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As estratégias utilizadas no estudo de degradação forçada oxidativa do entecavir monoidratado 0,5 mg são apresentadas abaixo. Tais estratégias foram utilizadas para determinação do preparo ideal da amostra, considerando o tempo de degradação. E também, para notificação e determinação do teor de impurezas, com identificação putativa, a partir de comparação direta com padrões e por bibliotecas disponíveis.

4.1 Avaliação da evolução da degradação

A partir do método validado na FUNED, descrito no tópico 3.4.2, sabe-se que o padrão de entecavir detém tempo de retenção (t_R) igual a 1,9 min nas condições de análises descritas. Esse t_R foi reconfirmado a partir da análise do padrão de trabalho (subcromatograma mostrado na figura 16) e foi utilizado como parâmetro para reconhecer o sinal referente ao entecavir nas amostras problemas.

Figura 16 - Subcromatograma do padrão de trabalho (amostra controle)



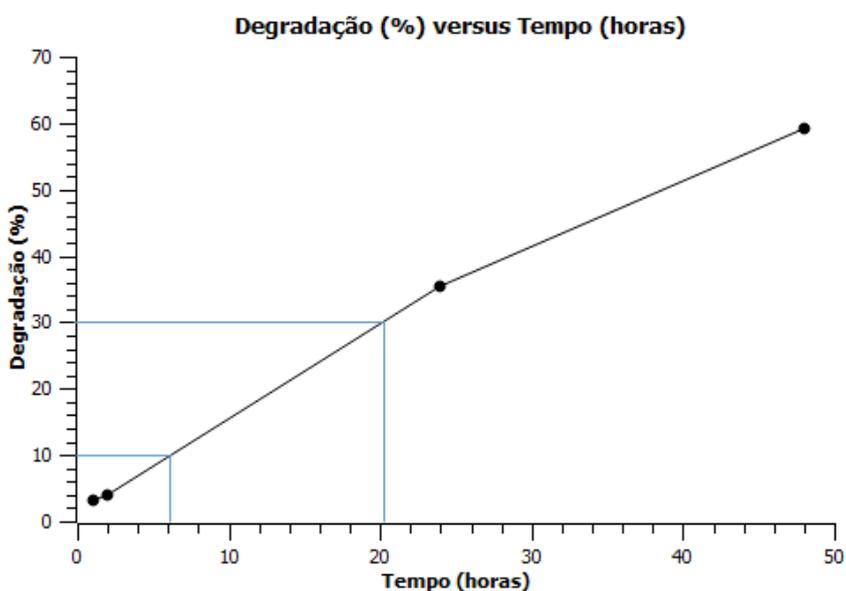
Com relação ao método de degradação, foi necessária a elaboração de um método diferente para degradar as amostras ao já proposto preliminarmente por colaboradores da Funed (com relação à volume de peróxido de hidrogênio e tempo de degradação), pois, na

tentativa de replicar o experimento original, os resultados não foram similares. Isso demonstra certa instabilidade e dificuldade de se alcançar uma análise reprodutível, conforme também observado por Lachman, Lieberman e Kaning (2001) (32).

Ao replicar o experimento, era esperado uma percentagem de degradação dentro da faixa de 10 - 30% em cinco dias de exposição ao meio oxidante. Entretanto, atingiu-se (aproximadamente) 30% em apenas um dia de exposição, conforme observado pela análise visual do gráfico 1. Esse curto período não é interessante, pois dificulta o preparo da amostra e realização de análises em um percentual de degradação ainda dentro da faixa recomendada.

Gráfico 1 - Evolução da degradação com a adição de 3 mL de H_2O_2 30% v v⁻¹.

Gráfico plotado no *software* SciDAVis[®]



Sendo assim, realizou-se a diminuição do volume de peróxido de hidrogênio gradativamente até o volume de 350 μ L, que garantiu uma faixa de tempo adequada para realização dos ensaios posteriores. Então, a partir da realização do método de oxidação proposto e análise cromatográfica, realizou-se a integração do sinal referente ao entecavir obtidos pela solução controle e degradada em 1, 7 e 14 dias (dados mostrados na tabela 1, p. 42). A partir da equação 13, calculou-se o percentual de degradação e montou-se o gráfico de degradação em função do tempo (gráfico 2, p. 42).

Tabela 1 - Dados e resultados de percentagem degradada para amostras degradadas em 1, 7 e 14 dias

Amostra		Massa comprimido (mg) - Amostra DEG -	Massa comprimido (mg) - Amostra CONT -
A1		725,04	725,19
A2		725,23	

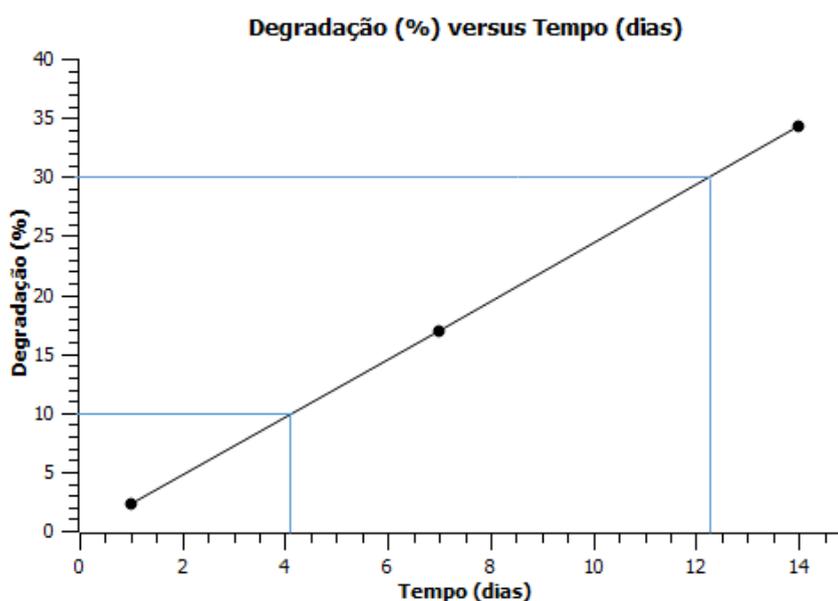
Tempo (dias)	Amostra	Área Entecavir* - Amostra DEG -	Área Entecavir* - Amostra CONT -	Degradação (%)	Degradação média (%)
1	A1	472147,5	482694,5	2,16	2,29
	A2	471050,0		2,42	
7	A1	414436,5	502593,0	17,52	16,97
	A2	420080,5		16,42	
14	A1	328031,5	504964,0	35,03	34,19
	A2	336584,5		33,35	

Legenda: DEG = degradada; CONT = controle

*Áreas referentes à média de injeções em duplicata

Gráfico 2 - Evolução da degradação com a adição de 350 µL de H₂O₂ 30% v v⁻¹.

Gráfico plotado no *software* SciDAVis®



A partir do gráfico 2 é possível avaliar visualmente o tempo em que o meio atinge a degradação em torno de 10 - 30%, que seria entre 4 a 12 dias de degradação,

aproximadamente. A elaboração desse gráfico foi importante para uma análise preliminar de determinação do tempo entre preparo da amostra e demais análises instrumentais. O volume de peróxido de hidrogênio proposto garante um período maior para realização de análises em nível de degradação dentro da faixa recomendada.

4.2 Avaliação da degradação e impurezas geradas

4.2.1 Doseamento final à oxidação e notificação/quantificação de impurezas

Com a evolução de degradação estipulada, optou-se por realizar o doseamento e notificação/quantificação de impurezas em 7 dias de degradação. Os dados referentes às medidas de massa estão demonstrados na tabela 2.

Tabela 2 - Dados de massa para análise de doseamento e notificação/quantificação de impurezas

Solução	Material	Massa (mg)	Concentração ETV (mg mL ⁻¹)
Branco CONT	-	-	-
Branco DEG	-	-	-
Placebo CONT	Placebo	724,80	-
Placebo DEG	Placebo	724,13	-
IFA CONT	IFA	10,55	-
IFA DEG	IFA	10,53	-
ETV CONT	Pool de 20 comprimidos	724,65	-
ETV DEG	Pool de 20 comprimidos	725,26	-
PT CONT	Padrão de trabalho	10,62	0,04958

Legenda: PT = padrão de trabalho; DEG = degradada; CONT = controle; ETV = entecavir

Primeiramente, calculou-se o teor de entecavir e percentagem de degradação a partir das equações 11 e 12, obtendo-se teor de 76,59% e degradação de 23,41%. A percentagem de degradação encontrada está de acordo com o valor recomendado de 10-30% por Costa *et al.* (2018), Caldeira (2014) e RDC 821/2023 (25,28,7). Os dados e resultados do doseamento final à oxidação e percentagem degradada estão retratados na tabela 3 (p. 44).

Tabela 3 - Dados e resultados de doseamento e percentagem degradada para amostra degradada em 7 dias (método cromatográfico descrito no item 3.4.2)

Massa comprimido (mg) - Amostra DEG -		Massa comprimido (mg) - Amostra CONT -		
725,26		724,65		
Tempo (dias)	Área Entecavir* - Amostra DEG -	Área Entecavir* - Amostra CONT -	Teor ETV (%)	Degradação (%)
7	2831234,0	3693638,3	76,59	23,41

Legenda: DEG = degradada; CONT = controle; ETV = entecavir

*Áreas referentes à média de injeções em triplicata

A análise de pureza de pico foi realizada obtendo resultado de 0,781171. Esse valor indica que o sinal analítico pode ser atribuído a mais de um componente, com possibilidade de coeluição.

Nas figuras 17, 18 e 19 (a partir da p. 45), foi realizada a sobreposição de todos os cromatogramas obtidos para as amostras controle e de degradação. Analisando-se atentamente, é possível observar dois sinais atribuídos à amostra do comprimido degradado, indicando produtos de degradação forçada oxidativa (nomeadas como impurezas 1 e 2). Os sinais apresentaram tempo de retenção de 0,86 e 1,31 minutos. Através da relação sinal/ruído (S/N - do inglês: *signal to noise ratio*), tem-se que os sinais apresentaram S/N (ASTM) de 23,802530 e 2,141778. Segundo a RDC 166/2017, o limite de detecção deve ser maior ou igual a 2:1. Como os valores obtidos foram maiores que 2, os sinais não podem ser considerados ruídos na linha de base do cromatograma e representam uma resposta à detecção de um analito (71).

Figura 17 - Sobreposição de subcromatogramas referentes às amostras controles e degradadas em $\lambda = 254$ nm (método cromatográfico descrito no item 3.4.2).

Tempo de análise: 0,0 a 4,0 minutos

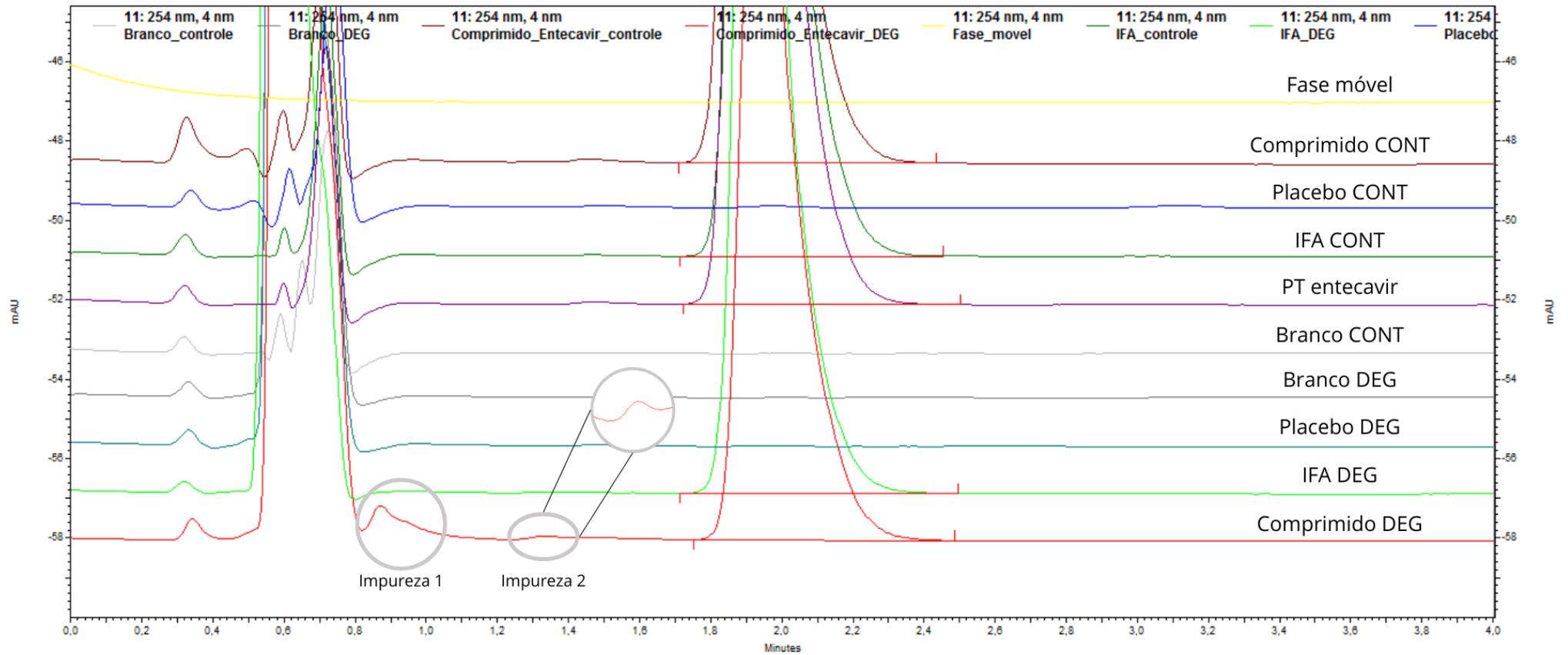


Figura 18 - Sobreposição de subcromatogramas referentes às amostras controles e degradadas em $\lambda = 254$ nm (método cromatográfico descrito no item 3.4.2).

Tempo de análise: 4,0 a 8,0 minutos

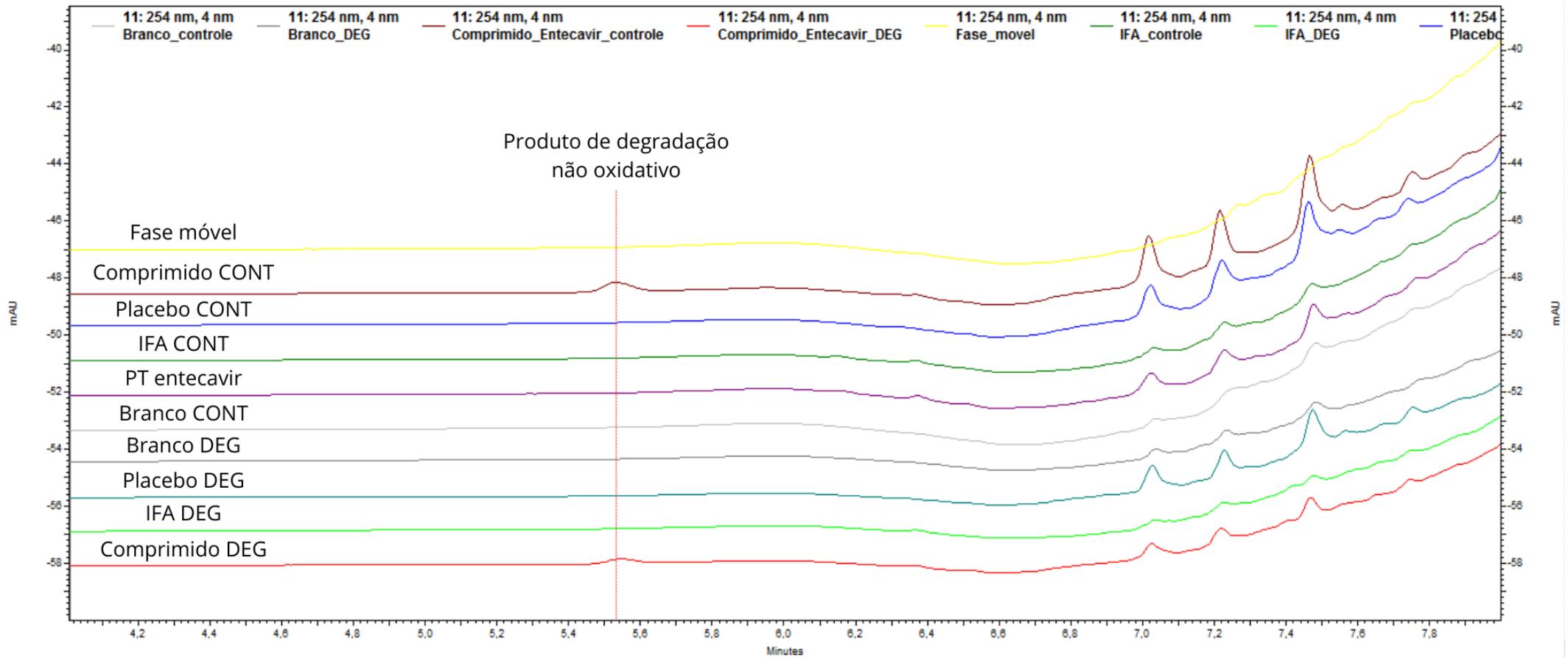
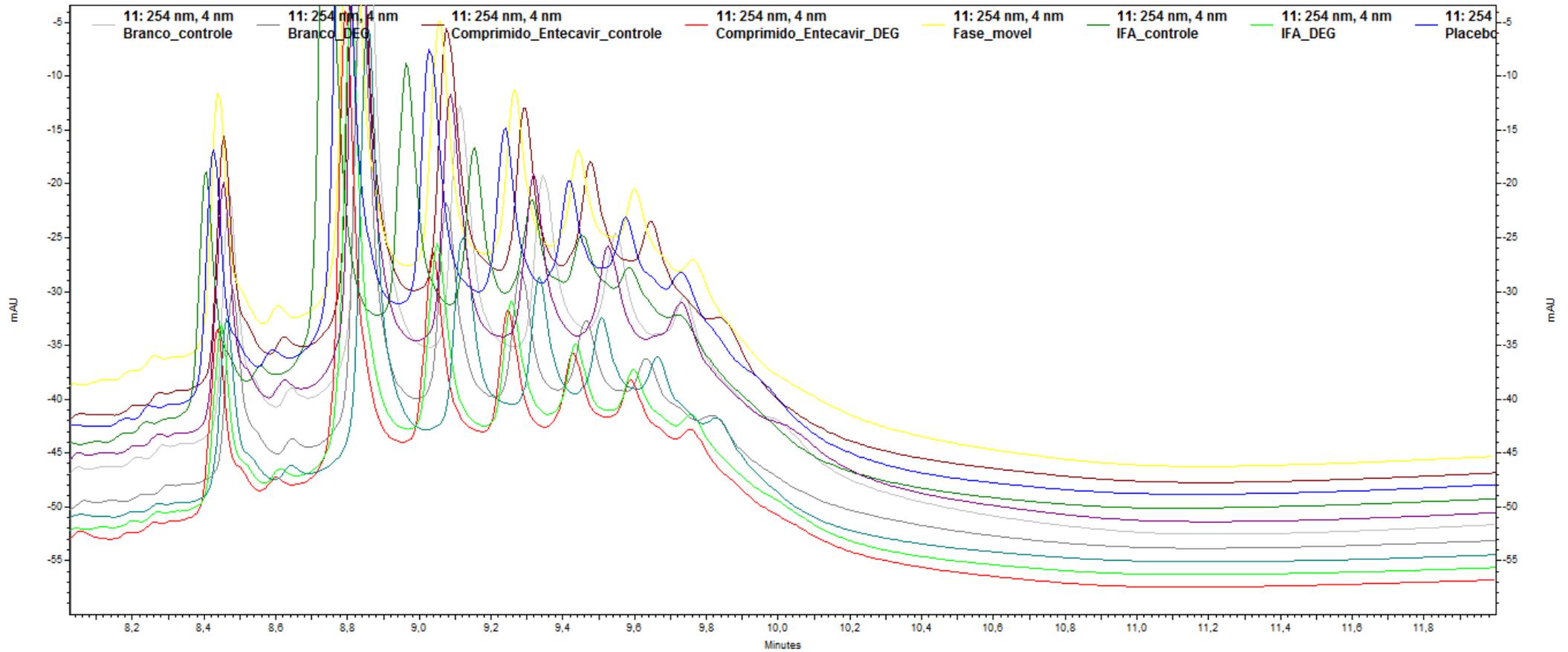


Figura 19 - Sobreposição de subcromatogramas referentes às amostras controles e degradadas em $\lambda = 254$ nm (método cromatográfico descrito no item 3.4.2).

Tempo de análise: 8,0 a 12,0 minutos



Comparando o T_R das impurezas com o sinal respectivo ao entecavir (1,9 minutos), tem-se que as impurezas são mais polares que o IFA, pois interagiram melhor com a fase móvel, concentrada em água, havendo pouca interação hidrofóbica com a fase estacionária.

É importante ressaltar que o sinal referente ao entecavir apresentou um efeito de cauda posterior. A impureza 1 também apresentou o mesmo efeito, porém de forma mais acentuada. Esse efeito pode ter sido causado por uma deterioração da coluna, causada pelo acúmulo de contaminantes, bloqueio por micropartículas, dessorção da fase sólida, e outros (72).

Outra explicação para esse efeito se dá pela possível presença de grupos silanóis residuais na coluna cromatográfica (do processo de fabricação da sílica modificada), fazendo com que interações polares possam ocorrer nesses sítios ativos com compostos que possuem grupo amino ou outro grupo funcional básico (73). Acredita-se que esse fator também possa ter interferido na análise, por ser um efeito observado nas primeiras injeções, ainda em amostras não degradadas.

Outra possibilidade que não poderia ser descartada é uma possível degradação da impureza 1 ocorrida durante a análise cromatográfica, bem como a sobreposição de sinais referentes a duas impurezas, ocasionando o efeito de cauda no sinal. Para confirmar essas possibilidades, realizou-se a análise de pureza de pico, obteve-se o valor de 0,889326, valor considerado insatisfatório. Dessa forma, não pode-se afirmar que o sinal é referente à apenas um analito, podendo haver coeluições.

No T_R 5,53 minutos é possível verificar a presença de um sinal observado apenas para a solução de comprimido controle e para a solução respectiva degradada (figura 18, p. 46). Esse sinal não possui área maior na amostra degradada, sendo ainda um sinal de área 23% menor que o encontrado na amostra controle. Dessa forma, pode-se verificar que o sinal é correspondente a um produto de degradação, mas que a degradação que o originou não foi a via oxidativa por peróxido de hidrogênio. Como o foco deste trabalho se restringe às impurezas oxidativas, o estudo desse produto pode ser abordado em trabalhos futuros, com a realização de outras vias de degradação.

Realizou-se a integração dos sinais referentes às impurezas 1 e 2. As áreas obtidas estão demonstradas na tabela 4 (p. 49), juntamente ao teor respectivo. Comparando a área da impureza à área do sinal de entecavir (equação 14), percebe-se que as impurezas geradas correspondem a um teor total de 1,29% (equação 15). Como foi verificada uma degradação de 23,41% (tabela 3, p.44), pelo balanço de massa, tem-se que 22,12 pontos percentuais não foram verificados pela aplicação desse método, à comprimento de onda de 254 nm.

Tabela 4 - Relação dos produtos de degradação observados pelo método 3.4.2 a 254 nm

Impureza	Tempo de retenção (min)	Tempo de retenção relativo*	Área**	Teor (%)
1	0,85	0,45	44002,67	1,19
2	1,30	0,68	3762,00	0,10
Teor de impureza (%)				1,29

* Calculado com referência ao tempo de retenção do entecavir de 1,90 min

** Áreas referentes à média de injeções em duplicata

Contudo, a análise foi realizada com a varredura do espectro de 190 a 400 nm, com o objetivo de cobrir uma ampla faixa de absorção, para verificação de impurezas que poderiam ter o pico de absorção máxima diferente de 254 nm. Foi plotado o cromatograma 3D (figuras 20 e 21, p. 50) para a solução medicamentosa degradada e verificou-se que em torno de 190 nm são observados sinais que não aparecem no comprimento de onda original de análise (254 nm), bem como a partir de 300 nm é verificado um sinal próximo a um minuto que não foi verificado em 254 nm.

Figura 20 - Cromatograma 3D da substância medicamentosa degradada (método cromatográfico descrito no item 3.4.2) - Vista 01/02

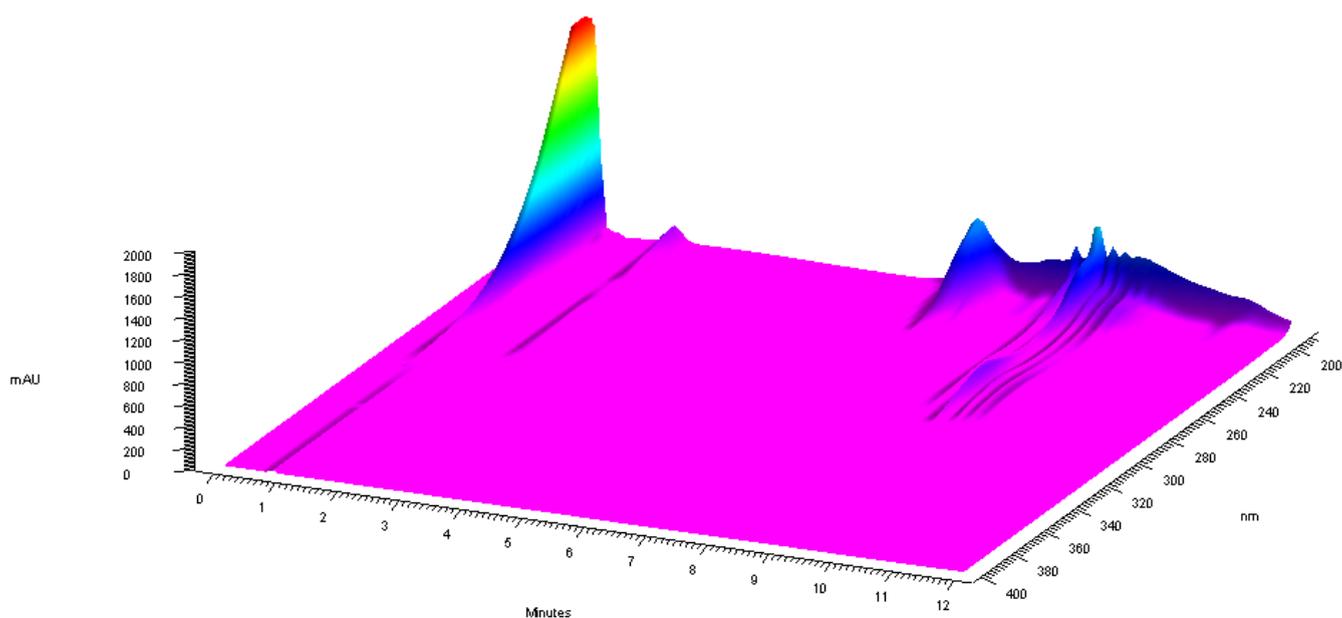
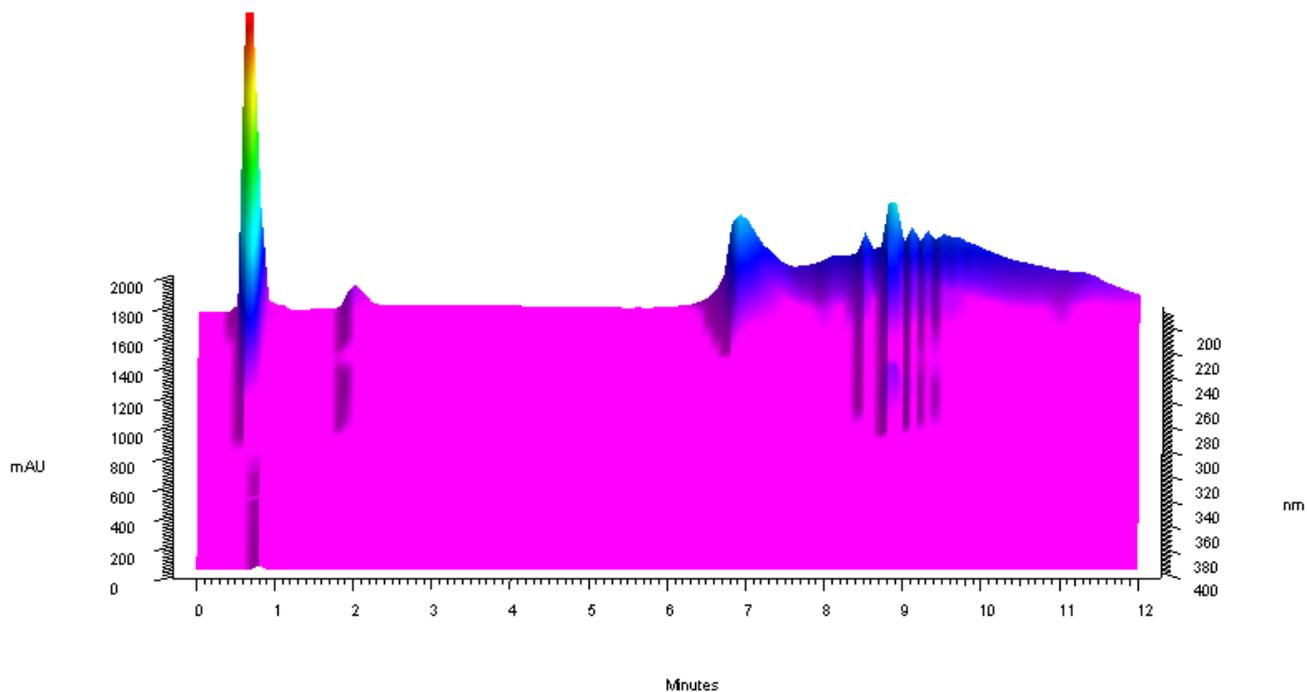


Figura 21 - Cromatograma 3D da substância medicamentosa degradada (método cromatográfico descrito no item 3.4.2) - Vista 02/02



Para verificação dos sinais observados próximos à 190 nm, realizou-se a sobreposição dos cromatogramas obtidos em 200 nm. Essa escolha foi feita com o intuito de se evitar a faixa de absorção dos solventes utilizados na fase móvel, uma vez que tanto a água, quanto a acetonitrila, possuem limite de transparência em 190 nm (66). Como é possível observar pelas figuras 22 e 23 (p. 51), o cromatograma referente ao comprimido degradado não apresentou sinais que não fossem observados nas demais amostras em 200 nm. Portanto, os sinais observados pelo cromatograma 3D são respectivos à absorção de componentes não relacionados a produtos de degradação forçada.

Figura 22 - Sobreposição de subcromatogramas referentes às amostras controles e degradadas em $\lambda = 200$ nm (método cromatográfico descrito no item 3.4.2). Tempo de análise: 0,00 a 6,00 minutos

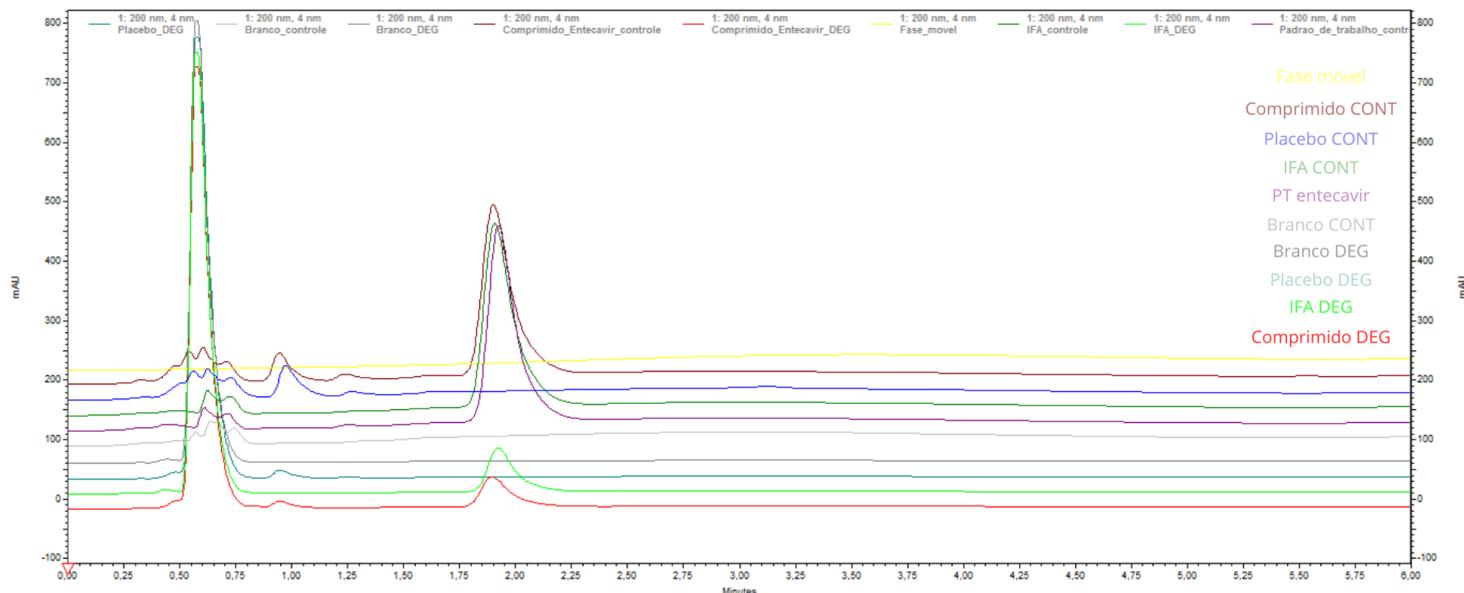
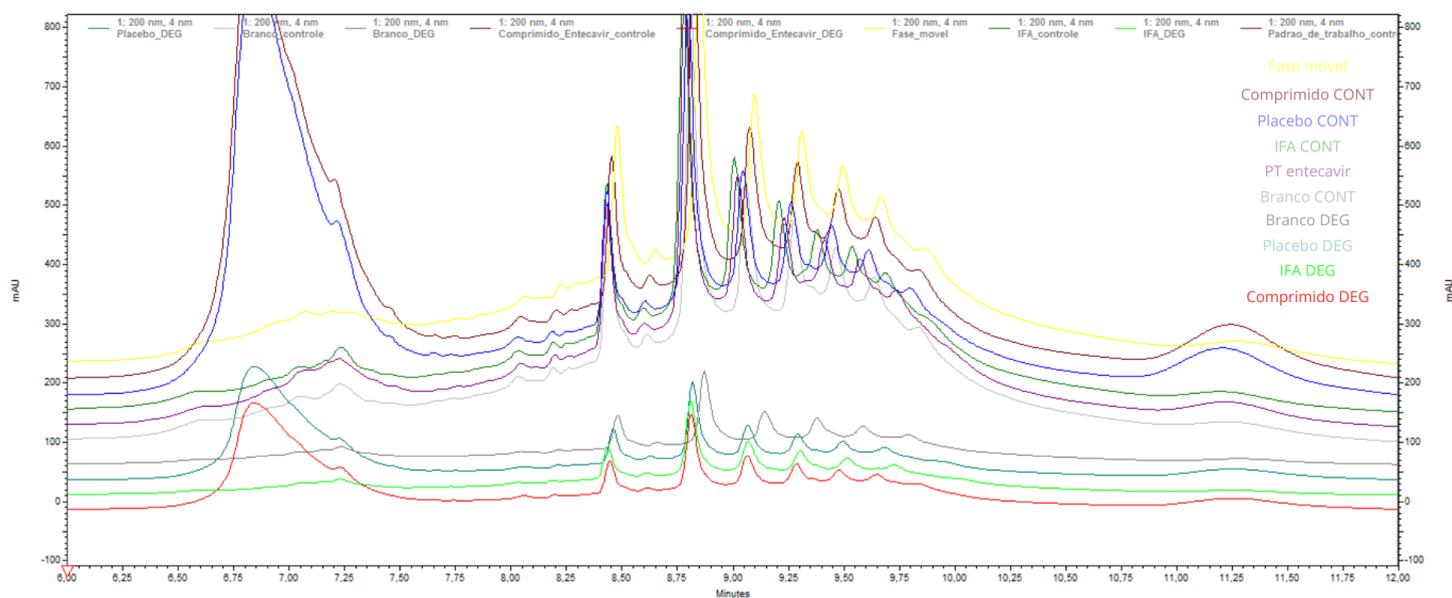


Figura 23 - Sobreposição de subcromatogramas referentes às amostras controles e degradadas em $\lambda = 200$ nm (método cromatográfico descrito no item 3.4.2). Tempo de análise: 6,00 a 12,00 minutos



Realizou-se a sobreposição dos cromatogramas também à 380 nm para verificação do sinal observado próximo a um minuto a partir de 300 nm. A partir das figuras 24 e 25 (p. 52), é possível verificar que semelhante ao $\lambda = 200$ nm, não houve a presença de um sinal referente apenas à substância medicamentosa degradada.

Figura 24 - Sobreposição de subcromatogramas referentes às amostras controles e degradadas em $\lambda = 380$ nm (método cromatográfico descrito no item 3.4.2). Tempo de análise: 0,00 a 6,00 minutos

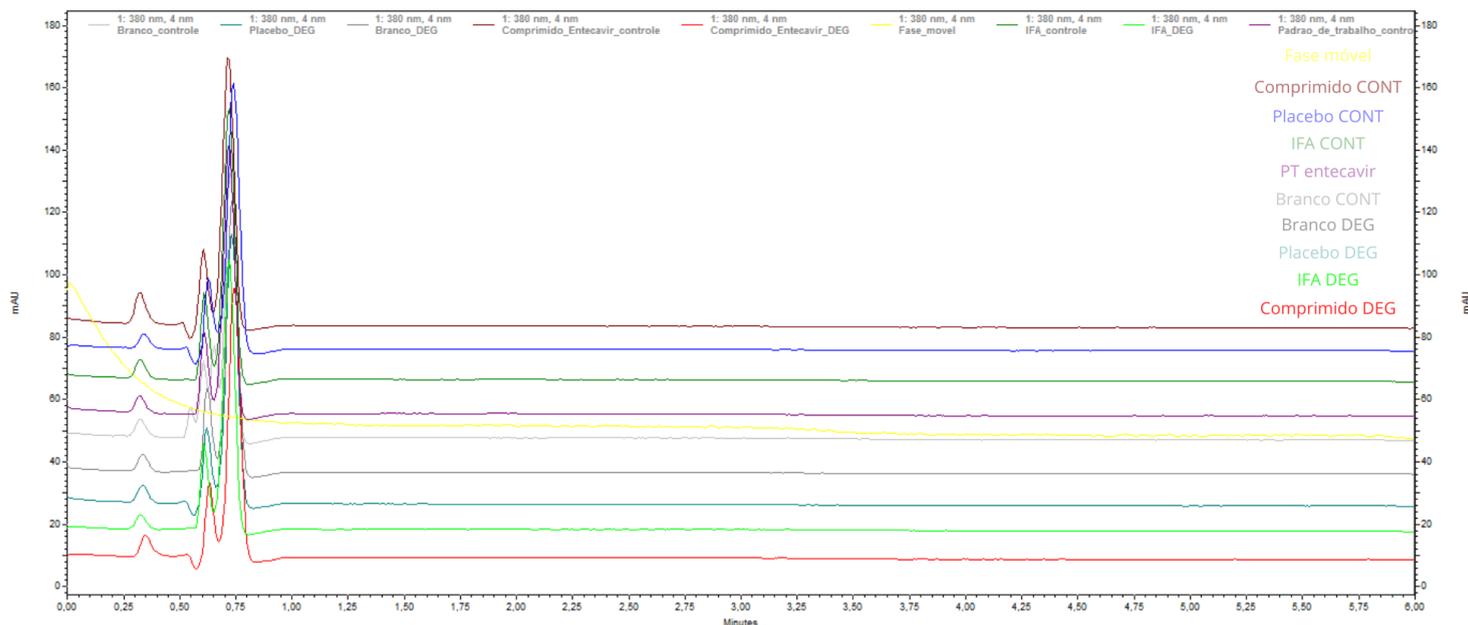
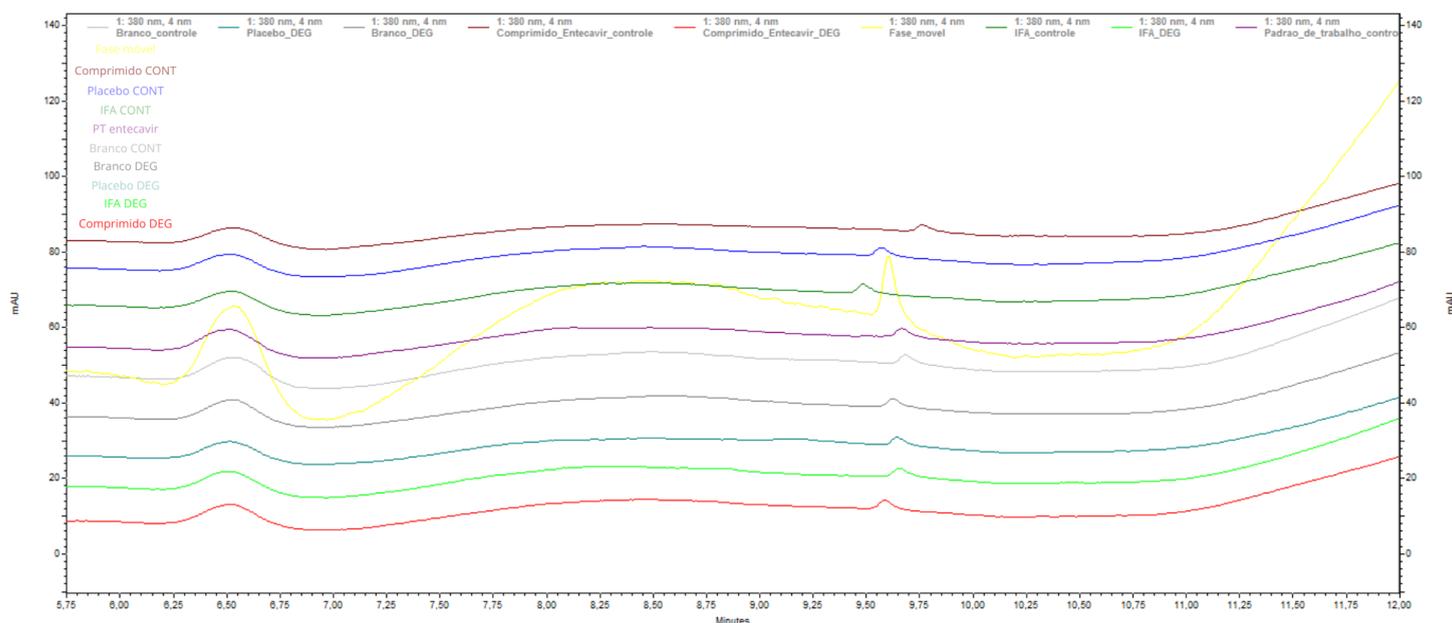


Figura 25 - Sobreposição de subcromatogramas referentes às amostras controles e degradadas em $\lambda = 380$ nm (método cromatográfico descrito no item 3.4.2). Tempo de análise: 5,75 a 12,00 minutos



Portanto, como a sobreposição de subcromatogramas foi realizada de forma estratégica em regiões que apresentavam sinais de absorção diferentes de 254 nm, e que a pureza de pico não foi considerada satisfatória, a aplicação de outro método cromatográfico

pode se mostrar interessante para verificação de substâncias cromóforas que sofreram uma possível coeluição, bem como a utilização da técnica de LC-MS. A deconvolução de picos também poderia ser aplicada para verificação de coeluição, entretanto, essa ferramenta não estava disponível no *software* de análise utilizado.

4.2.3 Comparação de resultados

Comparando os resultados obtidos com os descritos no Relatório do Estudo de Degradação Forçada construído por colaboradores da Funed, tem-se que no estudo preliminar foi observada uma degradação de 17,92% pela adição de 3 mL de peróxido de hidrogênio 30% (v v⁻¹) e tempo de degradação de cinco dias à temperatura ambiente. Foram observados dois produtos de degradação, com tempo de retenção relativo (RRT, do inglês: *relative retention time*) ao entecavir de 0,453 e 0,589, com um teor de 1,86% e 1,50%, respectivamente (6).

É possível observar que possivelmente a primeira impureza obtida no estudo preliminar também foi observada no presente trabalho (impureza 1). Já a segunda impureza, se distanciou do tempo de retenção relativo obtido pela impureza 2 em 13,8%, portanto, não é possível concluir se são correspondentes à mesma impureza.

Diante de resultados diferentes, as normativas que tratam acerca de estudos de degradação forçada, consideram que “diferentes conjuntos de parâmetros selecionados podem gerar resultados adequados” e que “não se espera que determinado *endpoint* seja considerado “melhor”” (26). Como em um EDF são aplicadas condições de estresse muito superiores ao que o medicamento seria submetido em seu uso, não são esperadas a formação das impurezas em grandes proporções no medicamento, entretanto, essas devem ser monitoradas no estudo de estabilidade pela utilização de métodos seletivos, que garantam a sua detecção.

A RDC 821/2023, não especifica como os testes de EDF devem ser executados e, foi observado experimentalmente, que as impurezas obtidas podem não ser correspondentes. Portanto, condições diferentes podem gerar resultados diferentes e *endpoints* diferentes. Isso pode implicar na criação de um método de análise ineficaz para avaliar os produtos de degradação e impossibilitar a avaliação destes durante o estudo de estabilidade.

A não visualização de impurezas nos estudos de degradação forçada, poderá acarretar em atrasos e retrabalhos para as indústrias farmacêuticas uma vez que, caso ocorra o aparecimento de impurezas não verificadas nas fases iniciais do desenvolvimento de um produto em fases posteriores do estudo de estabilidade, os estudos de identificação e/ou

qualificação devem ser iniciados imediatamente e os resultados obtidos devem ser encaminhados à ANVISA, em petição de alteração de especificações (26)

4.2.4 Verificação da influência dos excipientes na oxidação

A degradação do IFA foi realizada sob as mesmas condições do comprimido. Isso possibilita avaliar também o efeito cinético dos excipientes para a reação de degradação oxidativa. O nível de degradação do IFA sobre as mesmas condições do comprimido foi de 0,65%, enquanto que para o comprimido foi de 23,41%. Isso demonstra que os excipientes apresentam papel cinético, uma vez que a presença desses aumentou de forma considerável a oxidação do entecavir.

Esse aumento ocorreu possivelmente porque os excipientes do entecavir apresentam os hidroperóxidos como impurezas conhecidas. Essas impurezas são consideradas iniciadoras da reação, podendo ainda agir como catalisadores, com a regeneração da impureza (27). A presença de metais, oriundos do processo produtivo, também podem interferir na cinética pelo efeito catalítico que possui na fase de iniciação, pela interação com essas impurezas (esquema 2, p. 12).

4.3 Verificação de impurezas relacionadas

As amostras foram submetidas ao método, validado previamente por colaboradores da Funed, de impurezas relacionadas para o entecavir, com a expectativa de observação de sinais que poderiam estar coeluídos no método de doseamento, como uma forma de otimização, bem como (e principalmente), a investigação da formação da guanina, que é uma impureza já conhecida para o entecavir (70).

Esse método se diferencia do método de doseamento descrito no item 3.4.2, com relação a coluna utilizada, tempo de análise, fluxo e temperatura do forno. Considerando-se o uso de mesma coluna cromatográfica, ao aumentar-se o tempo de análise, possibilita-se a visualização de espécies que necessitam de um tempo maior para percorrer a coluna, que fazem mais interações hidrofóbicas. Diminuindo-se a temperatura, a viscosidade da solução é alterada, tornando-se mais viscosa, gerando um aumento da pressão do sistema. O aumento do fluxo de solvente também propicia o aumento da pressão.

Comparando-se as colunas utilizadas, ambas são C18 com 150 mm de comprimento, logo são responsáveis por fazer interações hidrofóbicas com os analitos. Entretanto, possuem diâmetro e tamanho de partículas distintos. O diâmetro maior da coluna está relacionado à possibilidade de um maior volume de injeção da amostra e o uso em análises em que o tempo de corrida pequeno não é uma prioridade. Já o tamanho das partículas menor está associado à

maior eficiência na separação, uma vez que a área superficial para que ocorra interação com os analitos é maior. Além disso, partículas menores estão relacionadas à menor perda de eficiência em altas taxas de fluxo e melhor resolução de pico e sensibilidade (47,42). Portanto, o método de verificação de impurezas relacionadas, demonstra uma maior eficiência para verificação de sinais respectivos às impurezas não visualizadas anteriormente.

Esse método foi aplicado com oito dias de degradação. Fazendo uma relação entre sinais, idem equação 13, tem-se que a amostra apresentou percentual de degradação de 27,67% (tabela 5).

Tabela 5 - Dados e resultados de doseamento e percentagem degradada para amostra degradada em 8 dias (método cromatográfico descrito no item 3.4.3)

Massa comprimido (mg) - Amostra DEG -		Massa comprimido (mg) - Amostra CONT -		
725,26		724,65		
Tempo (dias)	Área Entecavir* - Amostra DEG -	Área Entecavir* - Amostra CONT -	Teor ETV (%)	Degradação (%)
8	7431470,0	10266308,50	72,33	27,67

Legenda: DEG = degradada; CONT = controle; ETV = entecavir

*Áreas referentes à média de injeções em duplicata

Foi possível a verificação de 3 produtos de degradação, conforme figuras 26, 27 e 28 (a partir da p. 57). Essas impurezas foram nomeadas como impureza A ($t_R = 2,12$), impureza B ($t_R = 2,40$) e impureza C ($t_R = 10,47$). A análise da relação S/N foi realizada para cada sinal, obtendo-se os valores de 380,184793; 767,428635 e 2,308017, respectivamente. Dessa forma, os sinais observados não podem ser considerados como ruídos da linha de base, pois foram superiores à proporção 2:1 (71). Pode-se verificar que a aplicação de um novo método cromatográfico foi eficaz para a pesquisa de novas impurezas não observadas anteriormente.

A partir do tempo de retenção observado, pode-se analisar acerca da polaridade das impurezas. As impurezas A e B apresentam polaridade maior, comparadas ao entecavir, pois interagiram menos com a FE, eluindo mais rapidamente. Já a impureza C, apresentou tempo de retenção maior que o entecavir, fazendo maiores interações com a FE, ficando mais retido na coluna. Isso é um indicativo de que essa impureza tem característica menos polar que o entecavir.

A pureza de pico para o sinal respectivo ao entecavir foi de 1,00000, indicando uma separação satisfatória. Além disso, a partir da quantificação das impurezas, foi realizado o somatório da percentagem de degradação explicada, atingindo-se um teor de 1,95% (tabela 6). Sendo assim, a aplicação de outro método cromatográfico, aplicando diferentes condições experimentais, como o uso de uma fase estacionária de maior caráter polar, e/ou a aplicação de diferentes técnicas é interessante para verificação de substâncias cromóforas que coeluíram e para verificação de impurezas que não apresentam grupos cromóforos, com o uso de LC-MS e ESI-MS.

Tabela 6 - Relação dos produtos de degradação observados pelo método 3.4.3 à 252 nm

Impureza	Tempo de retenção (min)	Tempo de retenção relativo*	Área**	Teor (%)
A	2,12	0,38	22768,50	0,22
B	2,40	0,43	173938,00	1,69
C	10,47	1,88	3922,00	0,04
Degradação total (%)				1,95

* Calculado com referência ao tempo de retenção do entecavir de 5,58 min

** Áreas referentes à média de injeções em duplicata

Figura 26 - Sobreposição de subcromatogramas referentes às amostras controles e degradadas em $\lambda = 252$ nm (método cromatográfico descrito no item 3.4.3).

Tempo de análise: 0 a 10 minutos

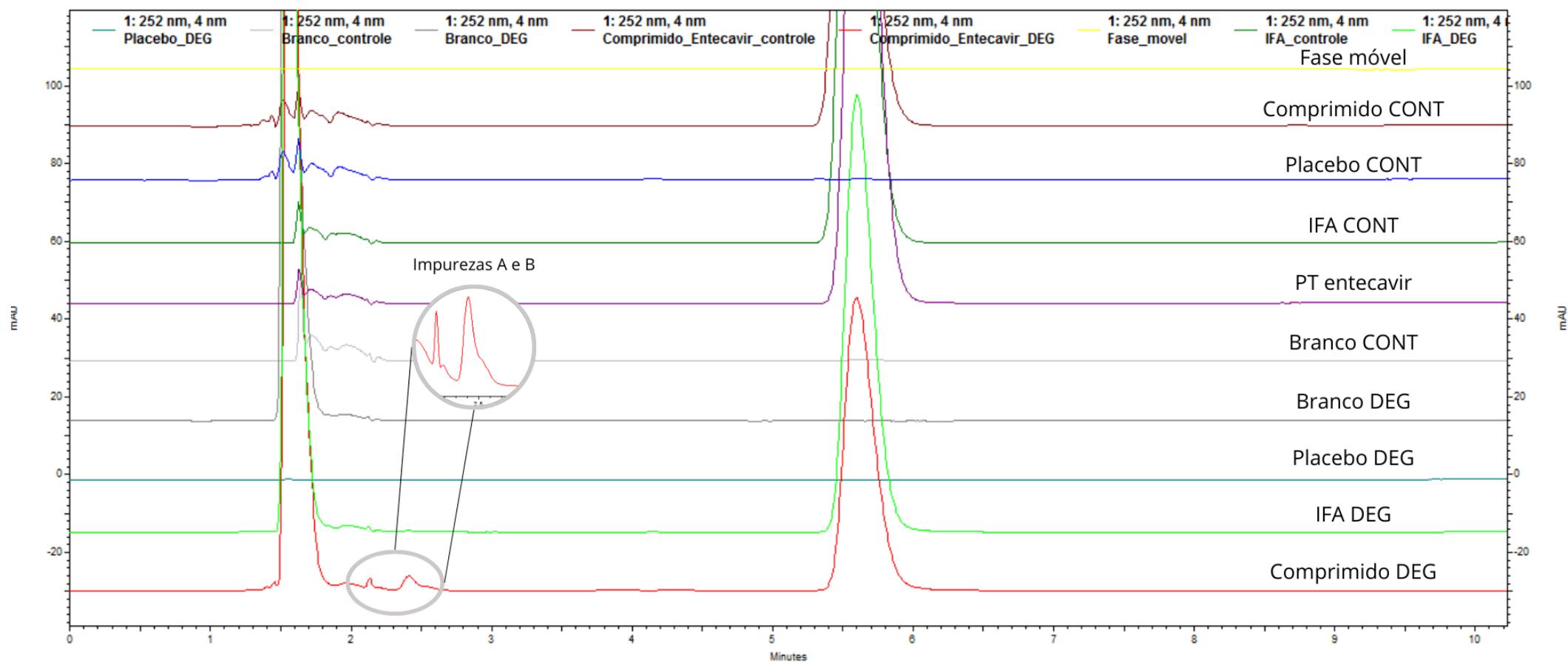


Figura 27 - Sobreposição de subcromatogramas referentes às amostras controles e degradadas em $\lambda = 252$ nm (método cromatográfico descrito no item 3.4.3).

Tempo de análise: 10 a 20 minutos

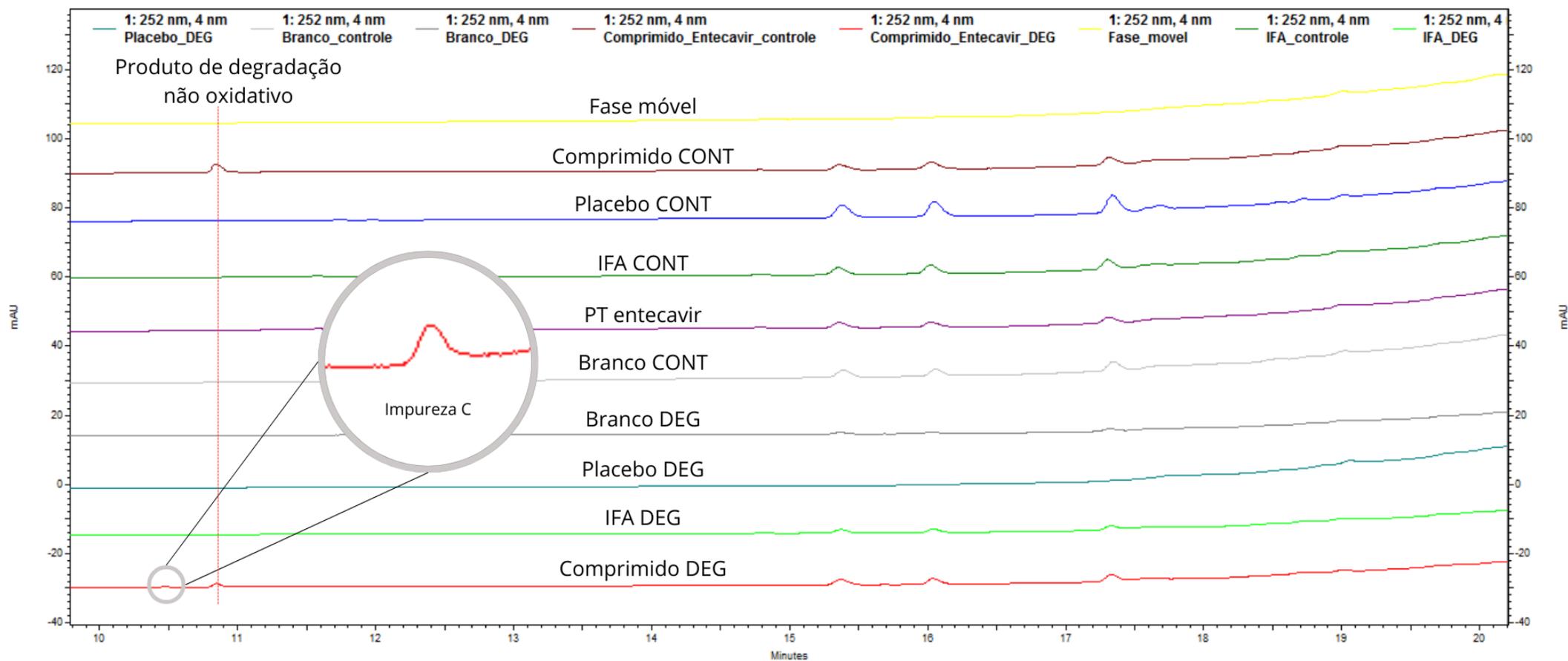
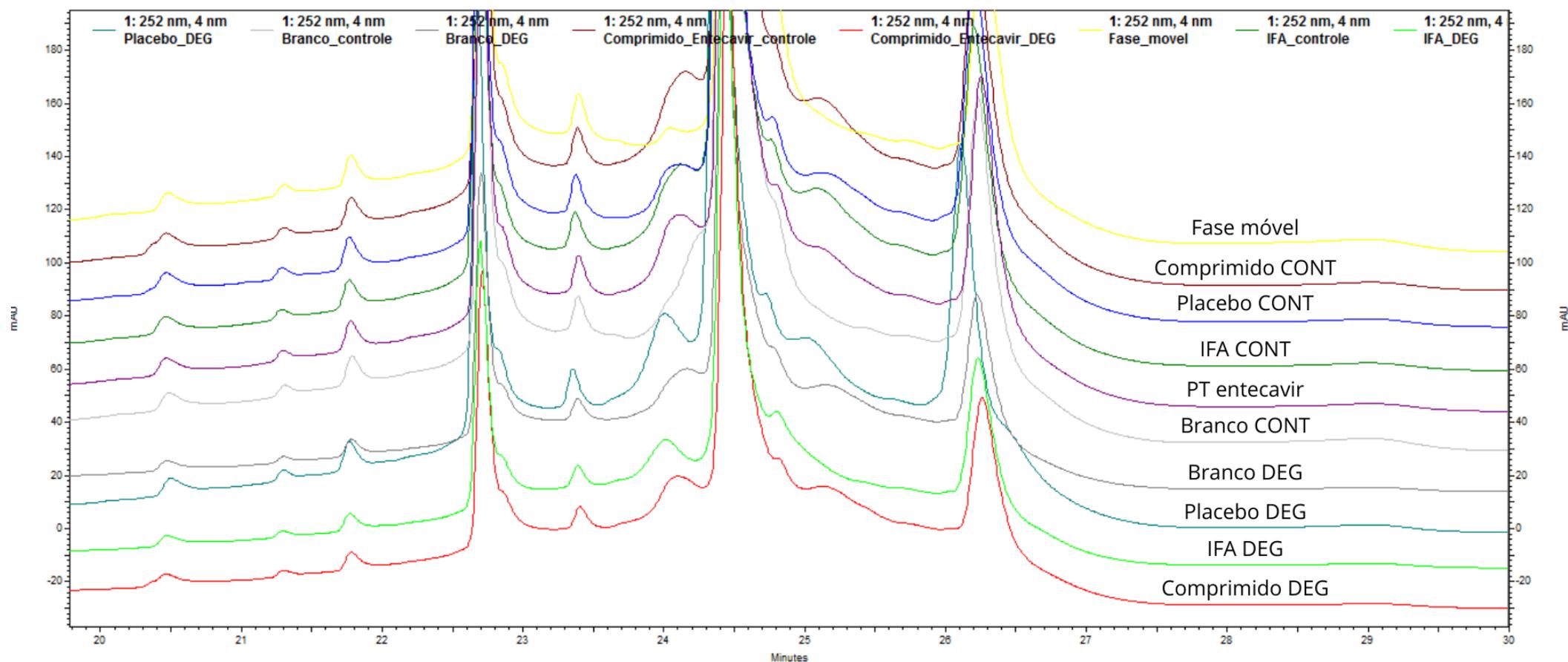


Figura 28 - Sobreposição de subcromatogramas referentes às amostras controles e degradadas em $\lambda = 252$ nm (método cromatográfico descrito no item 3.4.3).

Tempo de análise: 20 a 30 minutos



Novamente, foi observado um sinal apenas na amostra medicamentosa controle e degradada, confirmando-se como um produto de degradação não oxidativo. O estudo dessa impureza não foi realizado, pois não está relacionado ao estudo dos produtos obtidos pela via oxidativa, que são o foco do trabalho.

Além disso, verificou-se novamente o espectro 3D de absorção em comprimentos de onda na faixa do UV (figuras 29 e 30, p. 61), observando a ocorrência de sinais não observados em 252 nm próximo à 190 nm e a partir de 300 nm (em torno de um minuto). Entretanto, fazendo a sobreposição de subcromatogramas das amostras controle e degradadas em comprimentos de onda relacionados (200 nm e 380 nm), não foi possível a verificação de sinais referentes apenas ao medicamento degradado (figuras 31, 32, 33 e 34, a partir da p. 61). É importante ressaltar que produtos de degradação, que tem a presença de grupos cromóforos, podem ter sido gerados em baixas concentrações e não terem sido observados, devida à uma limitação de sensibilidade do detector utilizado.

Figura 29 - Cromatograma 3D da substância medicamentosa degradada (método cromatográfico descrito no item 3.4.3) - Vista 01/02

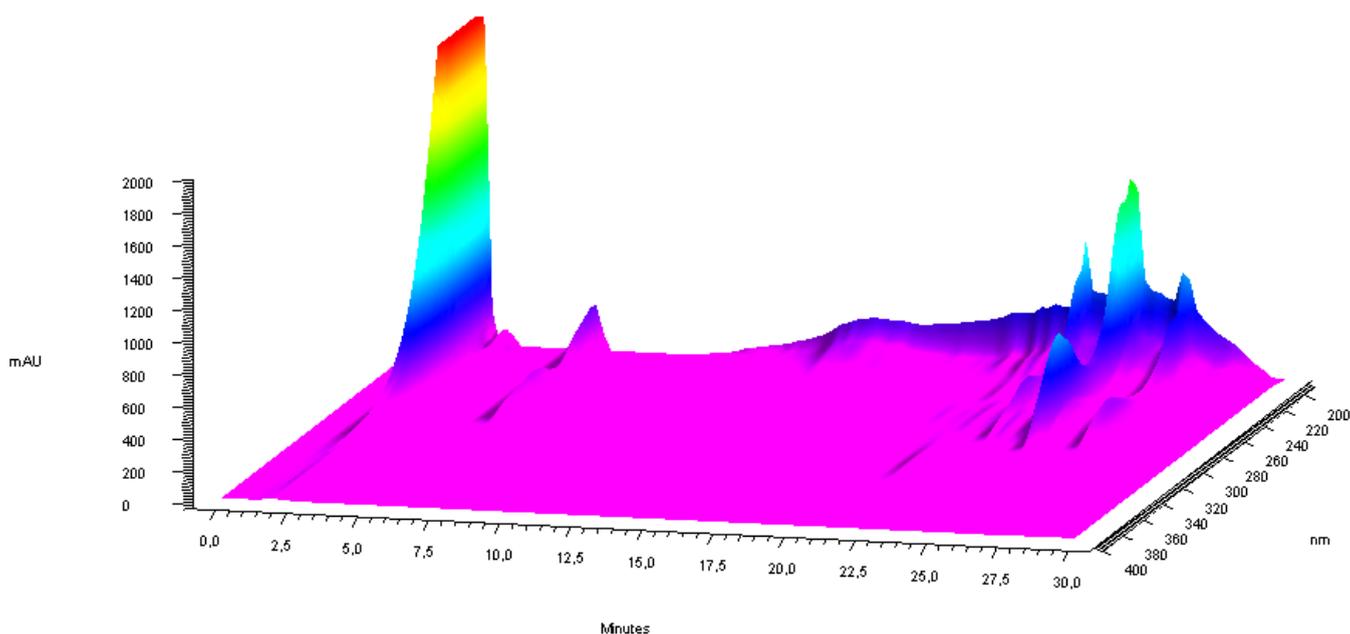


Figura 30 - Cromatograma 3D da substância medicamentosa degradada (método cromatográfico descrito no item 3.4.3) - Vista 02/02

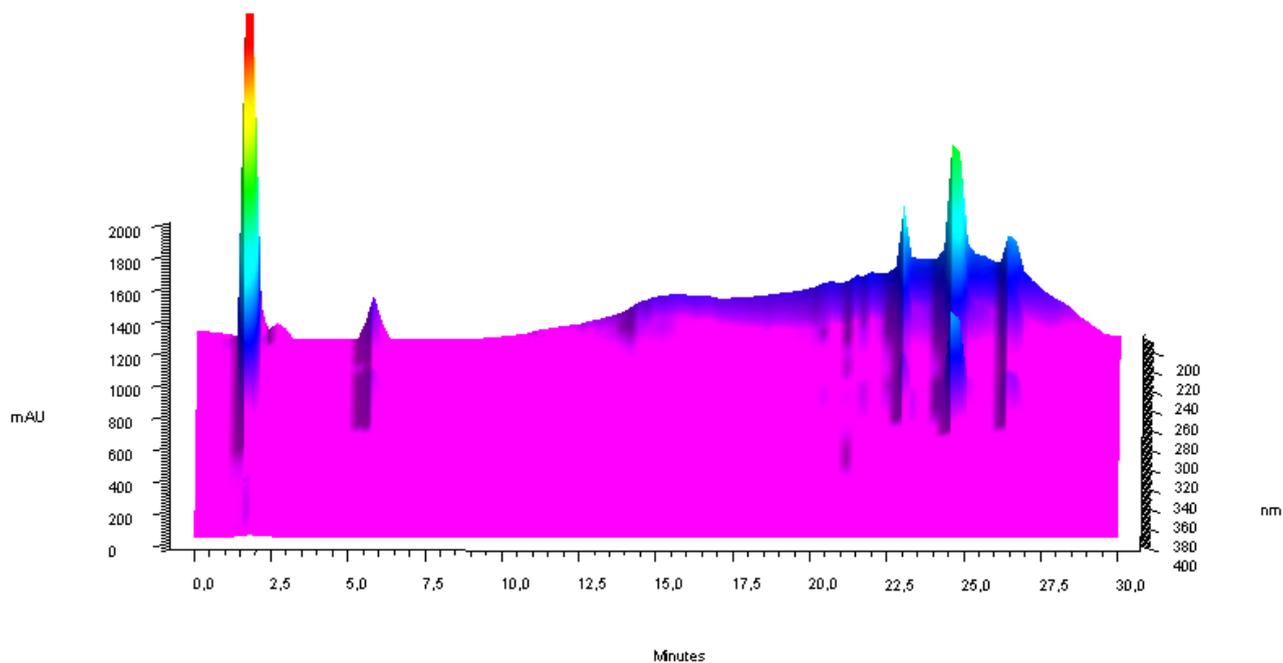


Figura 31 - Sobreposição de subcromatogramas referentes às amostras controles e degradadas em $\lambda = 200$ nm (método cromatográfico descrito no item 3.4.3). Tempo de análise: 0,00 a 6,00 minutos

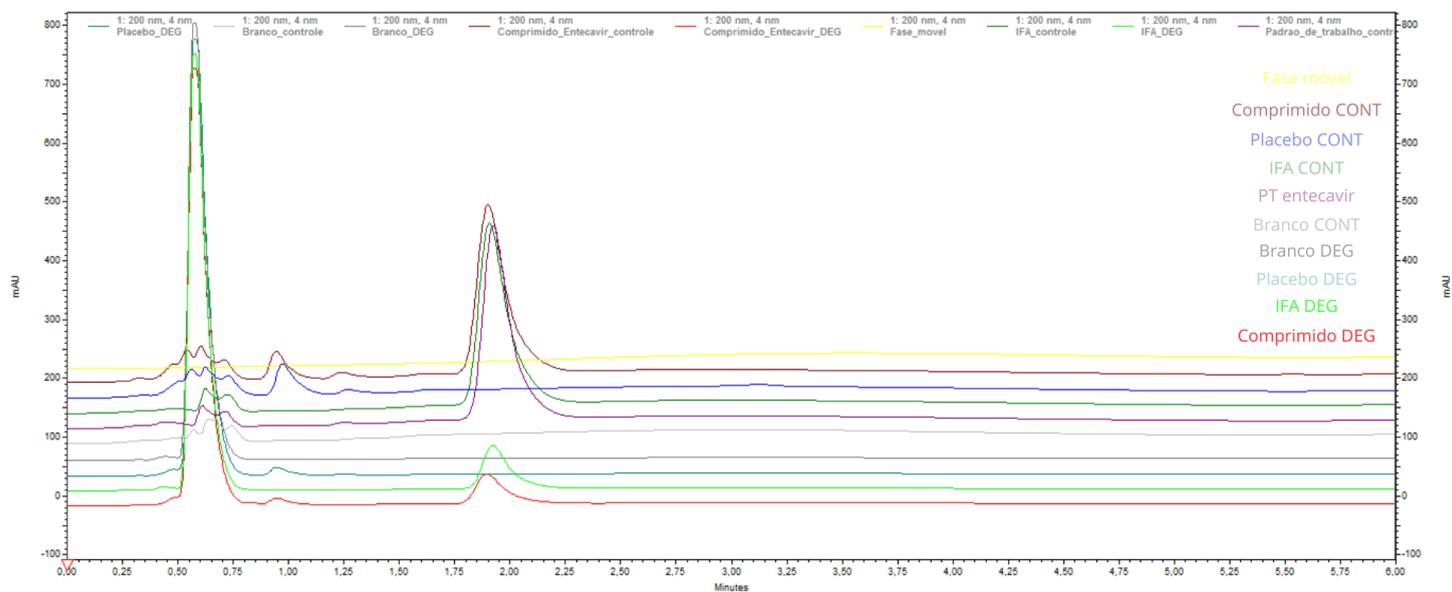


Figura 32 - Sobreposição de subcromatogramas referentes às amostras controles e degradadas em $\lambda = 200$ nm (método cromatográfico descrito no item 3.4.3). Tempo de análise: 6,00 a 12,00 minutos

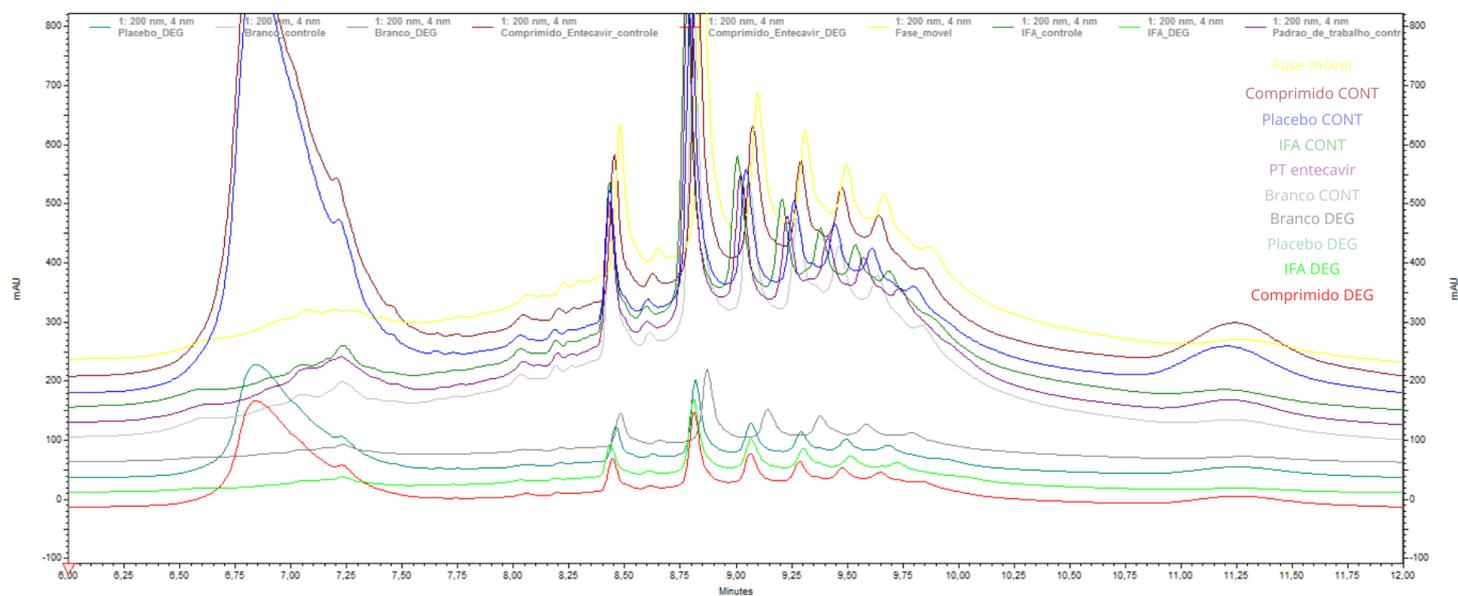


Figura 33 - Sobreposição de subcromatogramas referentes às amostras controles e degradadas em $\lambda = 380$ nm (método cromatográfico descrito no item 3.4.3). Tempo de análise: 0,00 a 6,00 minutos

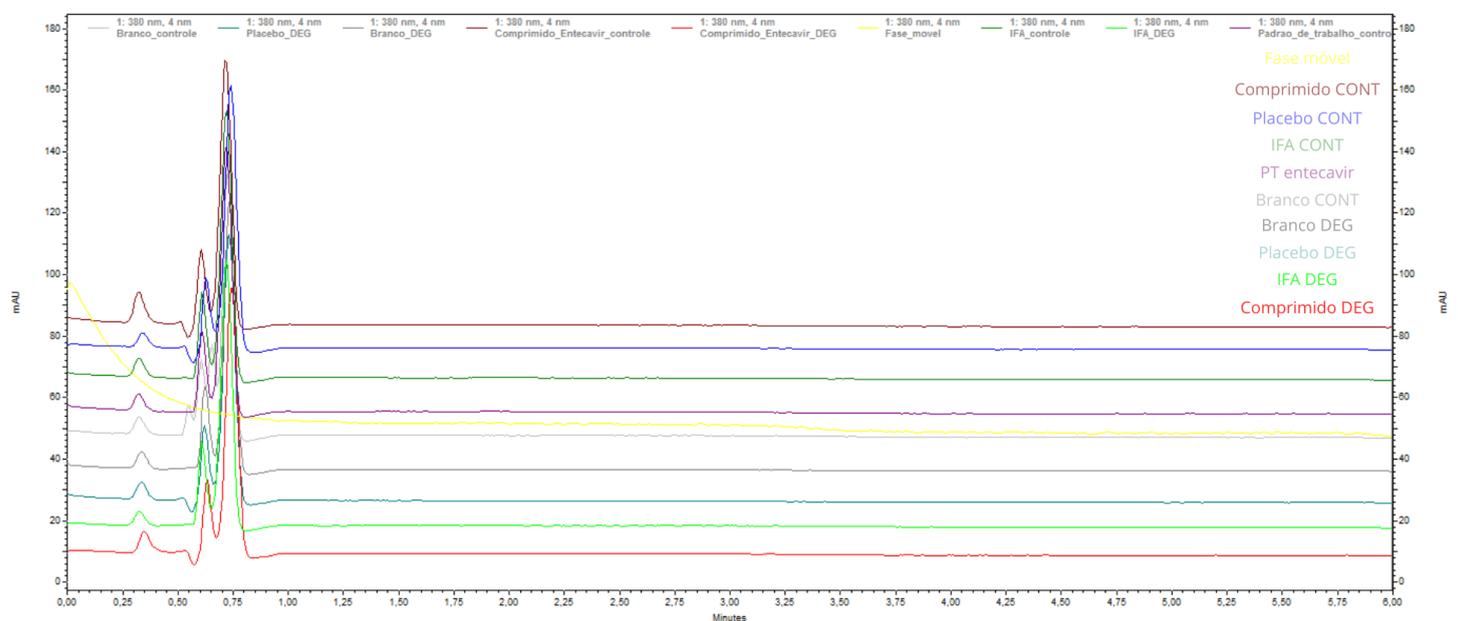
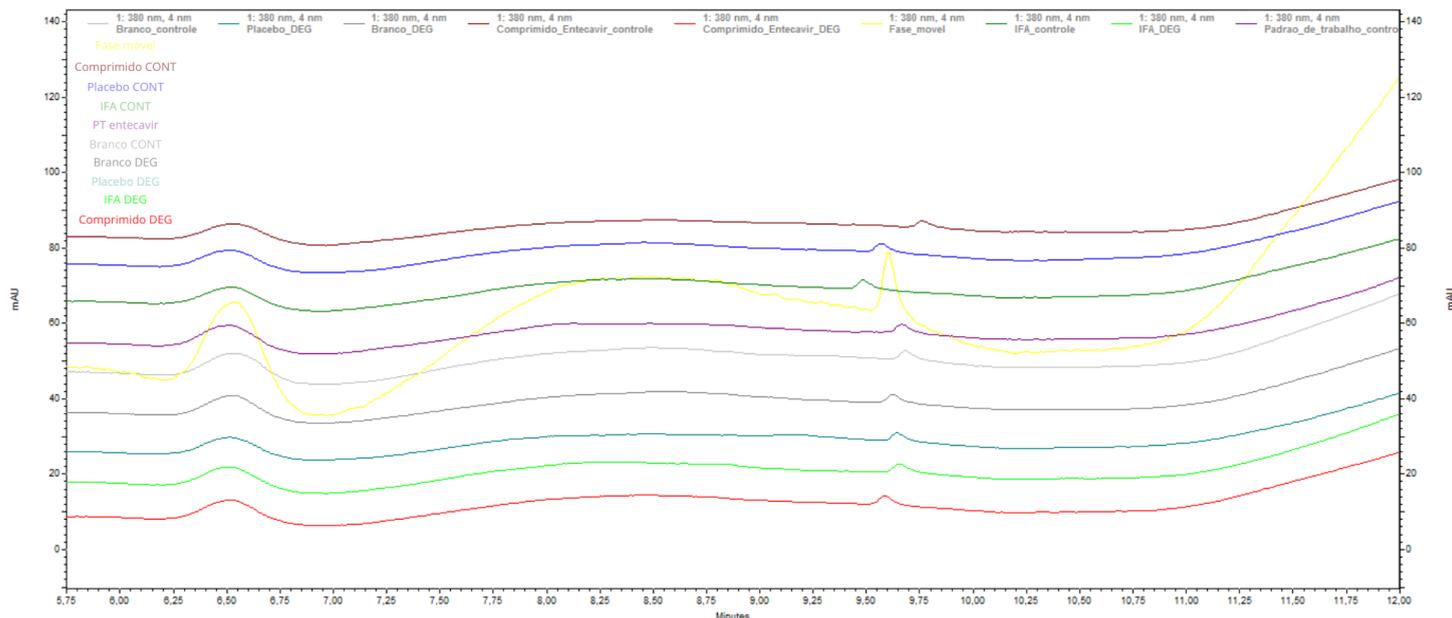


Figura 34 - Sobreposição de subcromatogramas referentes às amostras controles e degradadas em $\lambda = 380$ nm (método cromatográfico descrito no item 3.4.3). Tempo de análise: 6,00 a 12,00 minutos



Para verificação da formação da guanina, realizou-se a injeção de uma solução padrão combinada contendo entecavir e guanina, sob as mesmas condições de análise da amostra medicamentosa degradada. Os cromatogramas foram sobrepostos, conforme figura 35. Realizou-se também a abstração dos espectros de absorção na faixa de radiação UV tanto para o padrão de guanina, quanto para as impurezas observadas (figuras 36 e 37, respectivamente, p. 64).

Figura 35 - Sobreposição de subcromatogramas: padrão combinado de guanina e entecavir e comprimido degradado

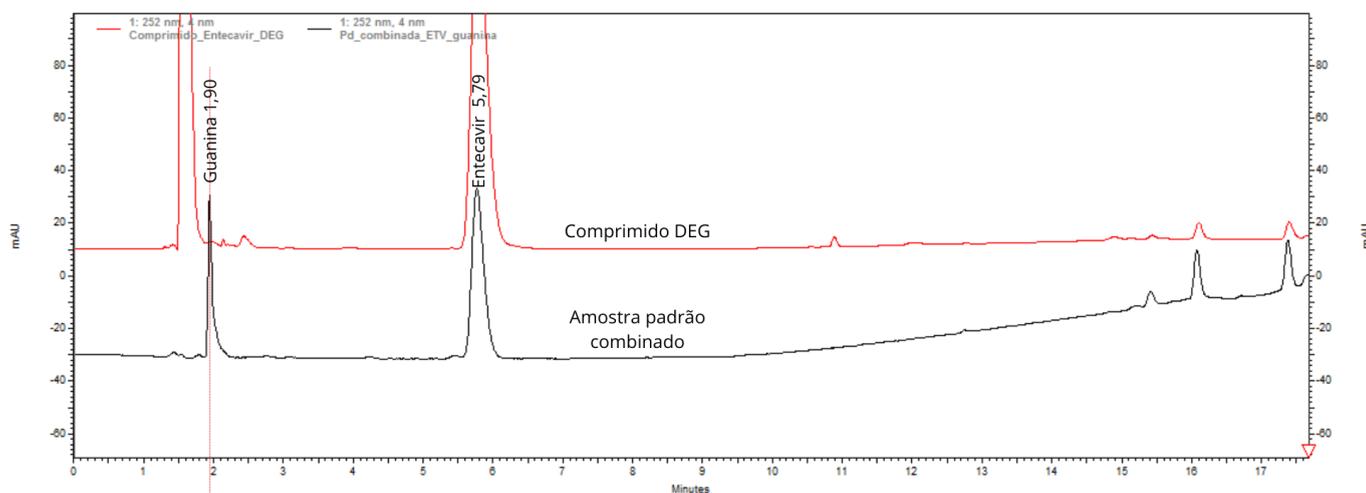


Figura 36 - Espectro de absorção da radiação UV da guanina, obtido experimentalmente

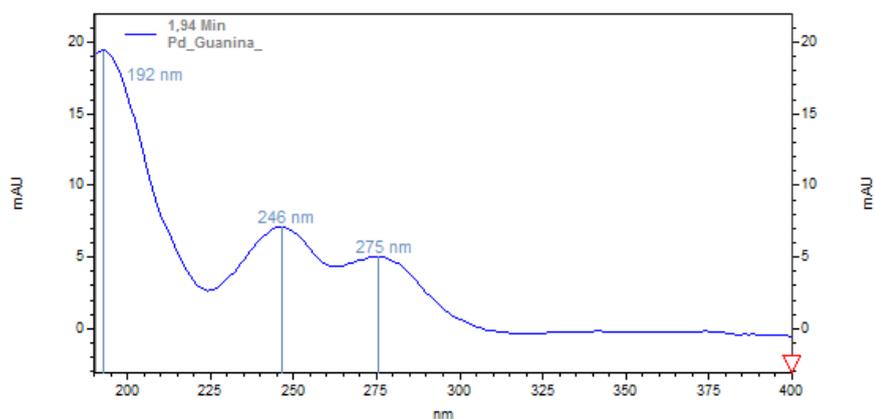
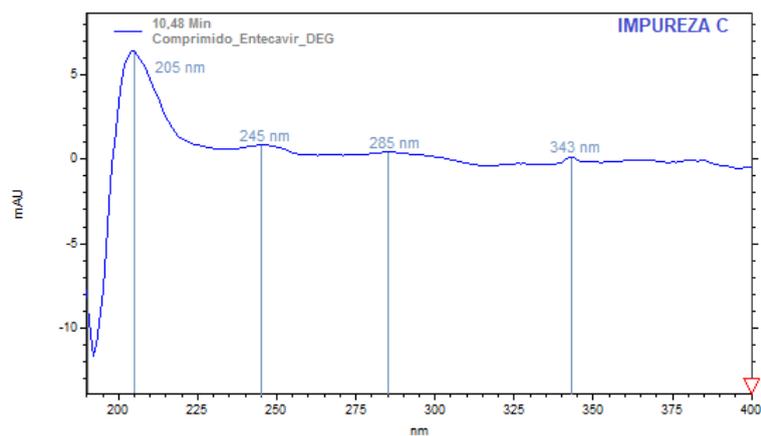
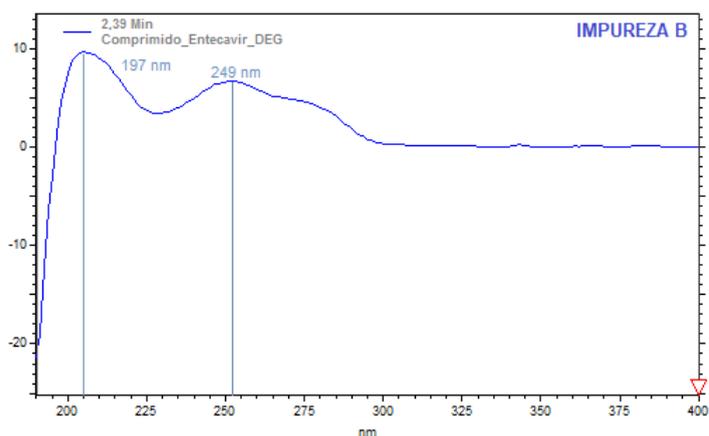
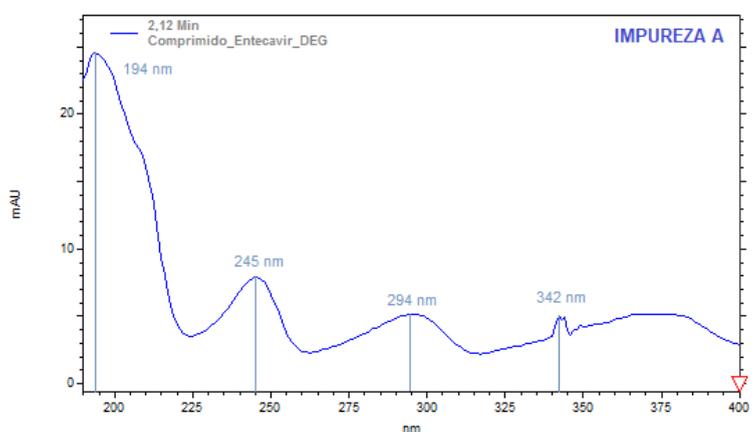


Figura 37 - Espectros de absorção da radiação UV das impurezas A, B e C, respectivamente



Portanto, observou-se que, além de apresentar tempo de retenção relativo ao sinal de entecavir de 0,33, a guanina apresentou máximos de absorção em 192, 246 e 275 nm, diferentemente das impurezas. Portanto, a possibilidade de formação dessa molécula foi descartada. Possivelmente, o método oxidativo empregado não foi agressivo o suficiente para oxidar os nitrogênios presentes nas estruturas cíclicas do entecavir.

4.4 Análise de produtos de degradação volatilizáveis

A análise das impurezas volatilizáveis foi conduzida em 6 dias de degradação, realizando preparo prévio das amostras por DLLME. Nas figuras 38 e 39 estão demonstrados o cromatograma 3D obtido para a amostra de comprimido degradado. A partir da comparação entre cromatogramas das demais amostras controle e degradadas, realizou-se de forma visual, a identificação de sinais correspondentes apenas à amostra comprimido degradado. A figura 40 (p. 66) representa o cromatograma 2D com as impurezas em destaque.

Figura 38 - Diagrama tridimensional da amostra comprimido degradado - Vista 01/02

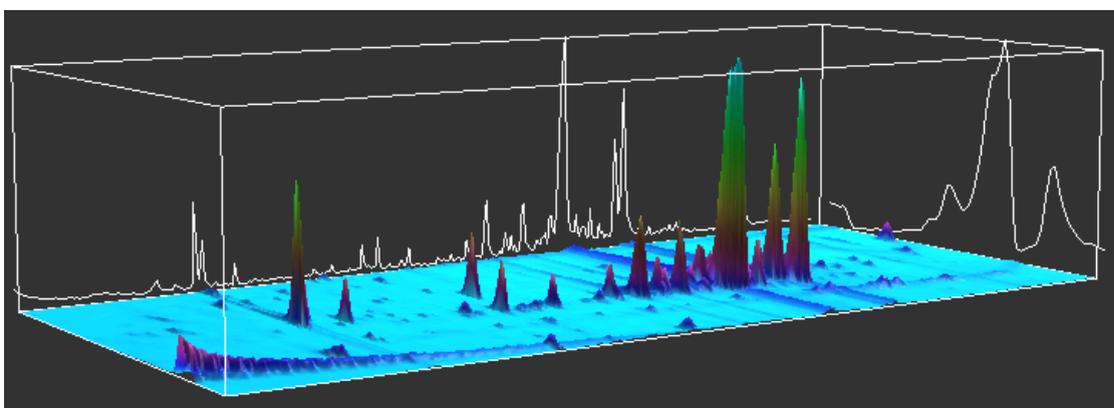


Figura 39 - Diagrama tridimensional da amostra comprimido degradado - Vista 02/02

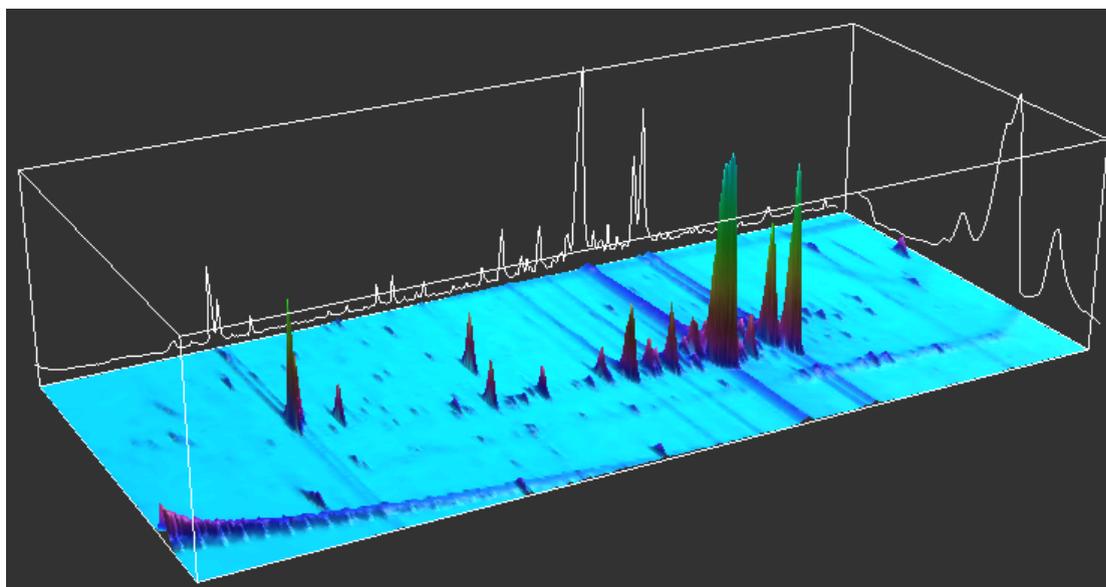
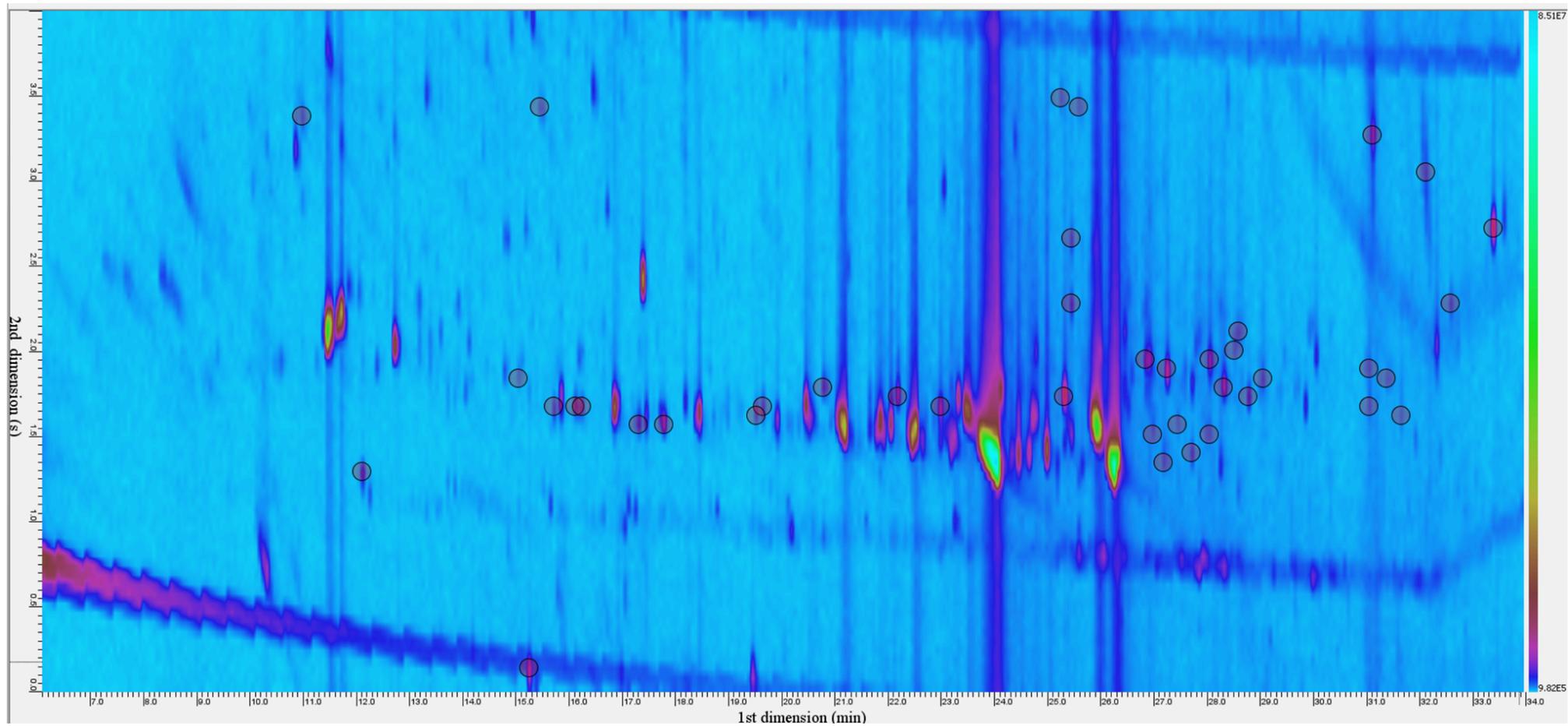


Figura 40 - Diagrama obtido pela técnica GCxGC-MS da amostra comprimido degradado, com produtos de degradação em destaque

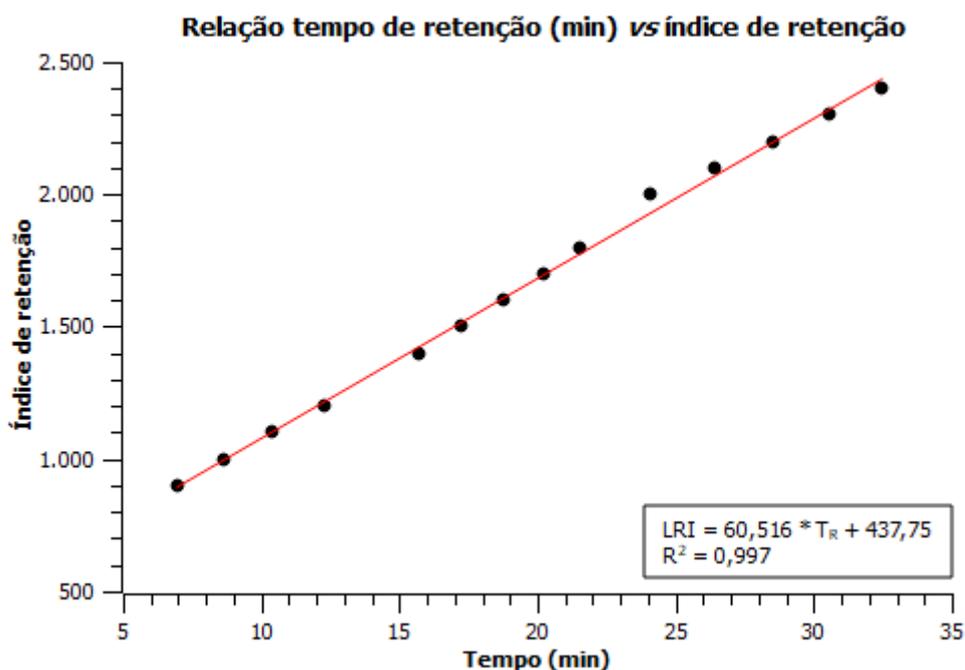


A partir da figura 40 (p. 66), foram observados 41 sinais correspondentes a possíveis produtos de degradação oxidativa, dos quais o perfil de fragmentação foi comparado com a biblioteca NIST (2022) de forma automática pelo *software* GC Image 2021 (Zoex), obtendo-se os valores de *match* e *reverse match*. É importante ressaltar que o número de impurezas volatilizáveis observadas pode ser um valor subestimado, uma vez que a método empregado não foi validado anteriormente e, é eficiente para a extração de compostos de baixa polaridade, devido ao emprego do solvente extrator clorofórmio, que é pouco polar.

Para verificação do índice de retenção linear, realizou-se a análise de dois padrões de alcanos: C₅ - C₁₈ e C₂₀ - C₄₀, obtendo-se os tempos de retenção para a primeira dimensão, descritos na tabela 7. A partir desses dados, construiu-se o gráfico 3 (p. 68), realizando-se o melhor ajuste da curva, para obtenção da relação índice de retenção vs. tempo de retenção, que foi utilizada no cálculo do LRI dos produtos de degradação.

Tabela 7 - Dados da análise dos padrões de alcanos para cálculo do LRI

n	Índice de Retenção	Tempo de retenção (min)
9	900	6,9548
10	1000	8,6215
11	1100	10,4215
12	1200	12,2881
14	1400	15,6881
15	1500	17,2215
16	1600	18,7548
17	1700	20,2215
18	1800	21,5548
20	2000	24,0881
21	2100	26,4215
22	2200	28,5548
23	2300	30,5548
24	2400	32,4215

Gráfico 3 - Relação tempo de retenção vs índice de retenção.Gráfico plotado no *software* SciDAVis®

Os resultados obtidos foram compilados na tabela 8 (p. 69). Nessa tabela foram demonstradas as estruturas com menor desvio em relação ao índice de retenção descrito em literatura para análises em colunas pouco polares, considerando-se como critério de corte, o desvio igual a 3%.

É possível observar que o ácido cis-5,8,11,14,17-eicosapentaenóico se repetiu para as impurezas 34' e 38', devido ao índice de retenção e perfil de fragmentação se assemelharem. Dessa forma, para melhor verificação e elucidação das estruturas, seriam necessárias a aplicação de técnicas analíticas para separação e purificação, e realização de análises complementares, como em espectrometria de alta resolução e em GC-MS triplo quadrupolo. Uma melhor verificação também poderia ser realizada a partir da análise do padrão isotópico, bem como pela verificação aprofundada dos fragmentos gerados pelo impacto de elétrons. Contudo, as estruturas identificadas de forma putativa foram demonstradas na página 72 a partir do quadro 10.

Tabela 8 - Substâncias anotadas dos produtos de degradação volatilizáveis do entecavir

Impureza	¹ T _R	² T _R	Nome	Fórmula	Match	Reverse Match	IR Teórico	IRL	Desvio
1'	10,9549	3,3481	Não anotada	-	-	-	-	1101	-
2'	12,0882	1,2624	Não anotada	-	-	-	-	1169	-
3'	15,4216	3,4030	Não anotada	-	-	-	-	1371	-
4'	15,0216	1,8662	Não anotada	-	-	-	-	1347	-
5'	15,2216	1,0980	Não anotada	-	-	-	-	1359	-
6'	15,6882	1,5917	Não anotada	-	-	-	-	1387	-
7'	16,0882	1,6466	Não anotada	-	-	-	-	1411	-
8'	16,2216	1,6466	2-Dodecenal, (E)-	C ₁₂ H ₂₂ O	555	616	1410	1419	1,77
9'	17,2882	1,5368	Não anotada	-	-	-	-	1484	-
10'	17,7549	1,5368	Pentadecane, 8-methylene-	C ₁₆ H ₃₂	664	698	1537	1512	1,61
11'	19,4882	1,5917	1-Dodecanol, 3,7,11-trimethyl-	C ₁₅ H ₃₂ O	624	683	1633	1617	0,98
12'	19,6216	1,6466	Não anotada	-	-	-	-	1625	-
13'	20,7549	1,7564	Não anotada	-	-	-	-	1694	-
14'	22,1549	1,7015	Não anotada	-	-	-	-	1778	-
15'	22,9549	1,6466	Não anotada	-	-	-	-	1827	-

Tabela 8 - Substâncias anotadas dos produtos de degradação volatilizáveis do entecavir - Continuação

Impureza	¹T_R	²T_R	Nome	Fórmula	Match	Reverse Match	IR Teórico	IRL	Desvio
16'	25,2882	1,7015	Diethylene glycol monododecyl ether	C ₁₆ H ₃₄ O ₃	700	718	2006	1968	2,19
17'	25,4216	2,2504	Z-(13,14-Epoxy)tetradec-11-en-1-ol acetate	C ₁₆ H ₂₈ O ₃	674	694	2024	1976	1,53
18'	25,4216	2,6346	Não anotada	-	-	-	-	1976	-
19'	25,5549	3,4579	Não anotada	-	-	-	-	1984	-
20'	25,2216	3,4579	Não anotada	-	-	-	-	1964	-
21'	26,8882	1,9211	{4-[2-(Dimethylamino)ethoxy]-3-methoxyphenyl}methan amine, N-acetyl	C ₁₄ H ₂₂ N ₂ O ₃	608	665	2118	2065	0,14
22'	27,2216	1,8662	Não anotada	-	-	-	-	2085	-
23'	28,0216	1,9211	17-Octadecynoic acid	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	675	707	2165	2134	0,37
24'	28,5549	2,0857	Z,Z-4,16-Octadecadien-1-ol acetate	C ₂₀ H ₃₆ O ₂	621	647	2193	2166	0,27
25'	28,4882	1,9759	Não anotada	-	-	-	-	2162	-
26'	28,2882	1,7564	Não anotada	-	-	-	-	2150	-
27'	28,7549	1,7015	Não anotada	-	-	-	-	2178	-
28'	29,0216	1,8113	Norvenlafaxine	C ₁₆ H ₂₅ NO ₂	587	609	2179	2194	1,97
29'	26,9549	1,5368	Não anotada	-	-	-	-	2069	-
30'	27,4216	1,5368	Não anotada	-	-	-	-	1968	-

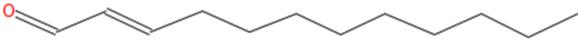
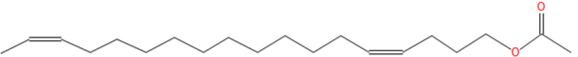
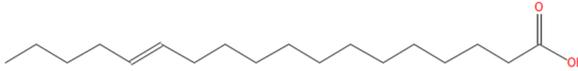
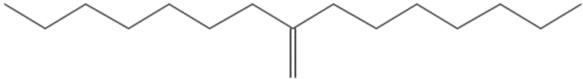
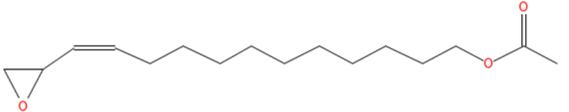
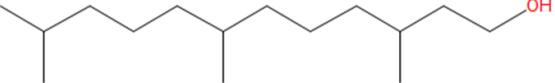
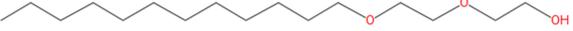
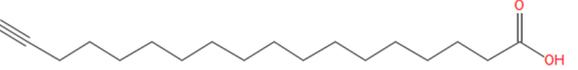
Tabela 8 - Substâncias anotadas dos produtos de degradação volatilizáveis do entecavir - Continuação

Impureza	¹ T _R	² T _R	Nome	Fórmula	Match	Reverse Match	IR Teórico	IRL	Desvio
31'	28,0216	1,4820	Não anotada	-	-	-	-	2134	-
32'	27,1549	1,3173	12-Methyl-E,E-2,13-octadecadien-1-ol	C ₁₉ H ₃₆ O	633	710	2123	2081	0,47
33'	27,6882	1,3722	trans-13-Octadecenoic acid	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	630	665	2159	2113	2,12
34'	31,0216	1,6466	cis-5,8,11,14,17-Eicosapentaenoic acid	C ₂₀ H ₃₀ O ₂	692	750	2333	2315	0,77
35'	31,0216	1,8662	Estra-1,3,5(10)-trien-17β-ol	C ₁₈ H ₂₄ O	565	650	2309	2315	0,61
36'	31,0882	3,2384	Não anotada	-	-	-	-	2319	-
37'	31,3549	1,8113	ω-3 Arachidonic Acid methyl ester	C ₂₁ H ₃₄ O ₂	577	631	2308	2335	1,43
38'	31,6216	1,5917	cis-5,8,11,14,17-Eicosapentaenoic acid	C ₂₀ H ₃₀ O ₂	600	648	2333	2351	0,94
39'	32,0882	2,9090	6'-Hydroxy-3',5a'-dimethyldecahydro-2'H-spiro[oxirane-2,8'-oxireno[2',3':6,7]naphtho[1,2-b]furan]-2'-one, angelate	C ₂₀ H ₂₆ O ₆	630	647	2366	2380	0,59
40'	32,5549	2,2504	Não anotada	-	-	-	-	2408	-
41'	33,3549	2,6895	Não anotada	-	-	-	-	2456	-

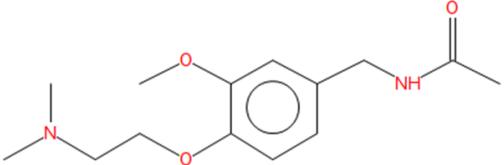
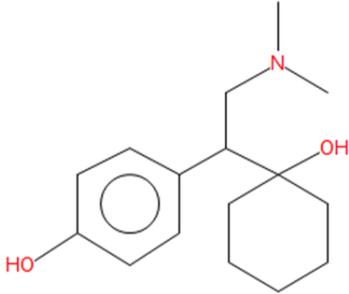
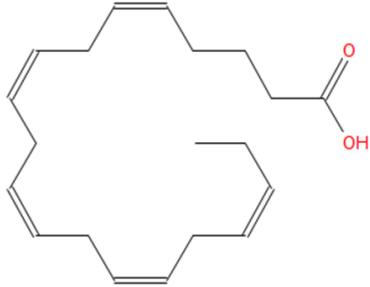
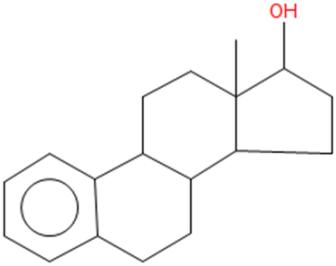
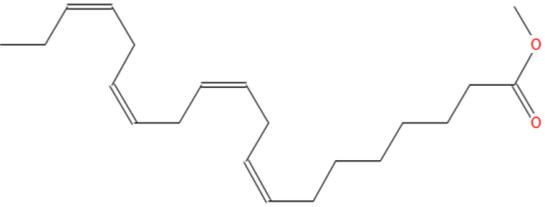
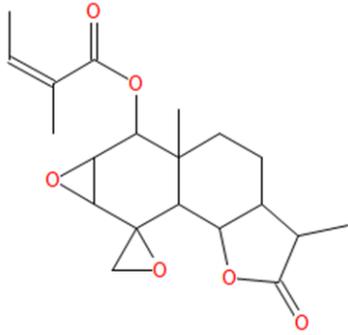
*Legenda: RI = Índice de Retenção (traduzido do inglês: *retention index*)

Fonte: NIST (2024)

Quadro 10 - Estruturas anotadas pela técnica GCxGC-MS

<p>2-Dodecenal, (E)-</p> 	<p>Acetato de Z,Z-4,16-Octadecadieno-1-ol</p> 	<p>ácido trans-13-octadecenóico</p> 
<p>Pentadecano, 8-metileno-</p> 	<p>Acetato de Z-(13,14-Epóxi)tetradec-11-en-1-ol</p> 	<p>12-Metil-E,E-2,13-octadecadien-1-ol</p> 
<p>1-Dodecanol, 3,7,11-trimetil-</p> 	<p>Éter monododecílico de dietilenoglicol</p> 	<p>Ácido 17-octadecínico</p> 

Quadro 10 - Estruturas anotadas pela técnica GCxGC-MS - Continuação

<p>{4-[2-(Dimetilamino)etoxi]-3-metoxifenil}metanamina, N-acetil</p> 	<p>Norvenlafaxina</p> 	<p>ácido cis-5,8,11,14,17-eicosapentaenóico</p> 
<p>Estra-1,3,5(10)-trien-17β-ol</p> 	<p>Éster metílico do ácido araquidônico ω-3</p> 	<p>6'-Hidroxi-3',5a'-dimetildecahidro-2'H-espiro[oxirano-2,8'-oxireno[2',3':6,7]nafto[1,2-b]furan]-2'-ona, angelato</p> 

Três dos 15 compostos apresentados no quadro 10 (p. 72) contém uma cadeia carbônica extensa, ligada a um ácido carboxílico. Essa estrutura se assemelha ao excipiente estearato de magnésio, que possivelmente deve sofrer a oxidação, com certa influência do IFA. Os ácidos carboxílicos também podem ter sido formados a partir da oxidação de álcoois primários, existentes no entecavir, entretanto, devido à semelhança visual à estrutura do estearato, acredita-se que a primeira hipótese seja mais passível de ocorrência.

Quatro dos 15 compostos anotados se assemelham estruturalmente ao excipiente macrogol, devido a uma cadeia carbônica extensa com a presença de éster em suas estruturas. Portanto, acredita-se que esses compostos são provenientes da oxidação do macrogol, influenciada pela presença de ETV no meio reacional.

Dois produtos apresentaram o epóxido em suas estruturas, que podem ser provenientes da oxidação de olefinas. O ETV apresenta grupo alceno em sua estrutura, mas, não é possível assegurar que os produtos formados sejam advindos da oxidação do IFA, pois, visualmente as estruturas não se assemelham e são muito complexas.

Apenas duas estruturas contêm a presença do nitrogênio, indicando que possivelmente a microextração realizada não foi capaz de extrair os compostos nitrogenados, ou que estes não são volatilizáveis. É importante ressaltar que o ETV apresenta grupos nitrogenados que, quando oxidados, podem gerar n-óxidos, hidroxilamina, imina, amina e aldeído. Como essas estruturas não foram observadas, possivelmente a técnica ou método analítico empregado não é adequado para análise desses compostos, sendo necessária a utilização de LC-MS para essa verificação.

As demais estruturas anotadas são complexas e necessitam de um maior entendimento acerca das reações envolvidas no processo, que não são triviais, uma vez que a degradação oxidativa é considerada uma das rotas de maior complexidade de elucidação (31). Portanto, um maior aprofundamento nos processos oxidativos é necessária, juntamente com o emprego de outras estratégias analíticas, capazes de corroborar para a identificação dos produtos de degradação formados, como a GC com ionização química (para verificação do íon molecular), análise isotópica e o uso de espectrômetros de massas de maior resolução.

5 CONCLUSÃO

No presente trabalho realizou-se a degradação forçada no Entecavir monoidratado 0,5 mg comprimido revestido a partir de sua exposição ao agente oxidante peróxido de hidrogênio (H_2O_2). As amostras foram analisadas em HPLC com detector DAD. O resultado encontrado foi comparado com o estudo realizado por colaboradores da Funed, apresentando divergências a respeito dos tempos de retenção relativos (ao entecavir) para as impurezas obtidas, indicando a possível verificação de impurezas diferentes. Nesse mesmo método, observou-se uma pureza de pico inferior ao satisfatório, indicando a possível coeluição de analitos.

Como tentativa de aprimoramento dos resultados, foi realizada a análise em um novo método cromatográfico, com o objetivo também de verificar se a guanina, que é uma impureza relacionada para o entecavir, estaria sendo formada durante a degradação. A partir da análise de tempo de retenção relativo e verificação dos espectros de absorção, concluiu-se que a guanina não é formada pela degradação oxidativa.

Entretanto, nesse novo método a pureza de pico atingiu valor de 1,00000, demonstrando a incoerência de coeluições ao sinal de entecavir. Além disso, foram observados três produtos de degradação, indicando uma otimização do método. A partir da integração das áreas e comparação com a área respectiva ao sinal de entecavir, calculou-se o teor dessas impurezas, que atingiram 1,95%.

Contudo, grande parte das impurezas não foram verificadas, possivelmente, por uma ineficácia do método cromatográfico, ou por uma subestimação dos teores individuais de cada impureza, uma vez que apesar de ser uma convenção realizar a comparação de área com o IFA, o cromóforo presente no composto pode ter absorção da luz UV de forma não equivalente ao entecavir.

Como estratégia de verificar os compostos volatilizáveis, empregou-se a técnica GCxGC-MS, atrelada à análise do índice de retenção linear para aprimoramento dos resultados. A partir dessa análise foram observados 41 produtos de degradação, sendo possível uma identificação putativa de 15 compostos. Entretanto, para afirmação da formação dessas impurezas, é recomendado a aplicação de outras técnicas analíticas, como em MS de alta resolução.

É importante ressaltar que o número de impurezas volatilizáveis pode ser subestimado, uma vez que analitos de polaridade razoável, podem não ter sido extraídos pelo emprego da técnica DLLME pelo uso de um solvente pouco polar.

Contudo, os resultados obtidos contribuirão para uma futura elaboração de possíveis rotas de síntese dos produtos de degradação e sua aplicação na produção de padrões de

impurezas em escala industrial e, ainda, na realização de estudos de degradação forçada pela elaboração de um planejamento técnico eficiente e uso de estratégias analíticas abordadas.

Além disso, pode-se avaliar que as legislações vigentes acerca do estudo de degradação forçada demonstram certas lacunas sobre a execução e análise de resultados. Diferentes metodologias podem propiciar produtos de degradação diferentes, bem como a aplicação de diferentes métodos e técnicas podem ser mais eficientes para se analisar as impurezas geradas.

Portanto, tem-se a necessidade de uma maior harmonização acerca dos métodos e técnicas utilizadas nesse estudo, considerando um maior rigor também para a visualização de um maior número de impurezas possíveis, tendendo a explicar a percentagem degradada em sua totalidade.

REFERÊNCIAS

- [1] WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Guidelines on Stability Testing of Pharmaceutical Products Containing Well-established Drug Substances in Conventional Dosage Forms.** 94.565. rev.1. 1994. Disponível em: https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/62169/WHO_PHARM_94.565_rev.1.pdf?isAllowed=y&sequence=1. Acesso em: 12 mai. 2023.
- [2] BRASIL. 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.** 2015a. Diário Oficial da União, Poder Executivo, Brasília, DF, 7 de dezembro de 2015.
- [3] BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia, Inovação e Insumos Estratégicos em Saúde. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. **Relação Nacional de Medicamentos Essenciais.** 2020. Disponível em: https://bvsmis.saude.gov.br/bvsmis/publicacoes/relacao_medicamentos_rename_2020.pdf. Acesso em: 12 mai. 2023.
- [4] FERRAZ, M. L. *et al.* Brazilian Society of Hepatology and Brazilian Society of Infectious Diseases Guidelines for the Diagnosis and Treatment of Hepatitis B. **The Brazilian Journal Of Infectious Diseases**, [S.L.], v. 24, n. 5, p. 434-451, set. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjid.2020.07.012>.
- [5] FUNDAÇÃO EZEQUIEL DIAS. **Funed produz medicamento utilizado no tratamento da Hepatite B.** 2021. Disponível em: <http://www.funed.mg.gov.br/2021/07/destaque/funed-produz-medicamento-utilizado-no-tratamento-da-hepatite-b/#:~:text=O%20primeiro%20contrato%20entre%20Funed,comprimidos%20at%C3%A9%20mar%C3%A7o%20de%202022>. Acesso em: 12 mai. 2023.
- [6] FUNDAÇÃO EZEQUIEL DIAS. Diretoria Industrial. Divisão de Desenvolvimento de Medicamentos. Serviço de Desenvolvimento Analítico e Estudo de Estabilidade. **Relatório do Estudo de Degradação Forçada de Entecavir 0,5 mg/comprimido.** Edição 00. Belo Horizonte: FUNED, 2014 b.
- [7] BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução da Diretoria Colegiada - BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 821, de 16

- de outubro de 2023. **Altera a Resolução colegiada - RDC nº 53, de 4 de dezembro de 2015, que 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.** 2023. Diário Oficial da União, Poder Executivo, Brasília, DF, 16 de outubro de 2023.
- [8] FUNDAÇÃO EZEQUIEL DIAS. Diretoria Industrial. Divisão de Desenvolvimento de Medicamentos. Serviço de Desenvolvimento Analítico e Estudo de Estabilidade. **Protocolo do Estudo de Degradação Forçada de Entecavir 0,5 mg/comprimido.** Edição 00. Belo Horizonte: FUNED, 2014 a.
- [9] INTERNATIONAL COUNCIL FOR HARMONISATION. **Scientific guideline: Impurities in new drug substances - Q3A (R2).** CPMP/ICH/2737/99. 2006. Disponível em:
<https://www.ema.europa.eu/en/ich-q3a-r2-impurities-new-drug-substances-scientific-guideline>. Acesso em: 9 abr. 2024.
- [10] BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Guia de Vigilância em Saúde.** Coordenação Geral de Desenvolvimento da Epidemiologia em Serviços. Volume 2 – 1. ed. atual. – Brasília: Ministério da Saúde, 2017. Disponível em:
https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_vigilancia_saude_volume_2.pdf. Acesso em 16 dez. 2023.
- [11] WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Hepatitis B.** 2023. Disponível em:
<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-b>. Acesso em: 9 ago. 2023.
- [12] ROCHA, L. **Brasil registra mais de 718 mil casos de hepatites em 21 anos; conheça os riscos.** 2022. CNN Brasil. São Paulo. Disponível em:
<https://www.cnnbrasil.com.br/saude/brasil-registra-mais-de-718-mil-casos-de-hepatites-em-21-anos-conheca-os-riscos/>. Acesso em: 17 out. 2022.
- [13] BRASIL. **Hepatite B.** 2020. Disponível em:
[https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/h/hepatites-virais/hepatite-b-1#:~:text=A%20principal%20forma%20de%20preven%C3%A7%C3%A3o%20da%20infec%C3%A7%C3%A3o%20pelo%20v%C3%ADrus%20da,de%20idade%20\(vacina%20penta%20valente\)](https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/h/hepatites-virais/hepatite-b-1#:~:text=A%20principal%20forma%20de%20preven%C3%A7%C3%A3o%20da%20infec%C3%A7%C3%A3o%20pelo%20v%C3%ADrus%20da,de%20idade%20(vacina%20penta%20valente)). Acesso em: 17 out. 2022.
- [14] LANGLEY, D. R. *et al.* Inhibition of Hepatitis B Virus Polymerase by Entecavir. **Journal Of Virology**, [S.L.], v. 81, n. 8, p. 3992-4001, 15 abr. 2007. American Society

- for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jvi.02395-06>.
- [15] SCOTT, L. J.; KEATING, G. M. Entecavir: A review of its use in chronic hepatitis B. **Drugs**, [S.L.], v. 69, n. 8, p. 1003-1033, jun. 2009. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.2165/00003495-200969080-00005>.
- [16] ENTECAVIR MONOIDRATADO: comprimido. Responsável técnica: Michelle Andreza Chaves de Oliveira. Belo Horizonte: Fundação Ezequiel Dias, 2018. Disponível em:
<http://www.funed.mg.gov.br/wp-content/uploads/2019/10/Bula-entecavir-monoidratado-para-o-profissional-de-sa%C3%BAde.pdf>. Acesso em: 9 mai. 2022.
- [17] Rowe R.C.; Sheskey P.J.; Owen S.C. **Handbook of Pharmaceutical Excipientes**. 5. ed. London: Php, 2006. Pharmaceutical Press. APhA.
- [18] SIGMA-ALDRICH. **Ficha de Informação de Segurança de Produto Químico: ENTECAVIR, >=98%**. Versão 6.2. Revisado em 06.12.2022. Impresso em 05.04.2024. Disponível em:
<https://www.sigmaaldrich.com/BR/pt/sds/sigma/sml1103?userType=anonymous>. Acesso em: 05 abr. 2024.
- [19] NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY. **PubChem Compound Summary for CID 135398508, Entecavir**. 2024. Disponível em:
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Entecavir>. Acesso em: 5 abr. 2024.
- [20] THE UNITED STATES PHARMACOPEIA. **The National Formulary - USP 42**. Rockville: The United States Pharmacopeia Convention, 2019.
- [21] AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. (2024). **Farmacopeia Brasileira: Monografias – Produtos Biológicos**. Vol. 1.
- [22] LI, M. **Organic Chemistry of Drug Degradation**. Cambridge: Rsc Drug Discovery Series, 2012.
- [23] International Council for Harmonisation. Assessment and control of DNA reactive (mutagenic) impurities in pharmaceuticals to limit potential carcinogenic risk M7 (R1). 2017. EMA/CHMP/ICH/83812/2013. Disponível em:
https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-guideline-m7r1-assessment-and-control-dna-reactive-mutagenic-impurities-pharmaceuticals-limit-potential-carcinogenic-risk-step-5_en.pdf. Acesso em: 21 mai. 2024.
- [24] BRASIL. 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.
- [25] COSTA, G. N. *et al.* DIRETRIZES PARA ELABORAÇÃO DE UM PROTOCOLO E RELATÓRIO DE ESTUDO DE DEGRADAÇÃO FORÇADA DE MEDICAMENTOS DE ACORDO COM A RDC 53/2015. **Infarma - Ciências Farmacêuticas**, [S.L.], v. 30, n. 3, p. 194-202, 9 out. 2018. Conselho Federal de Farmacia. <http://dx.doi.org/10.14450/2318-9312.v30.e3.a2018.pp194-202>.
- [26] BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Guia para obtenção do perfil de degradação, e identificação e qualificação de produtos de degradação em medicamentos.** MEDICAMENTOS – GUIA nº 4, versão 1, de 04 de dezembro de 2015 – Brasília: Ministério da Saúde.
- [27] BAERTSCHI, S. W.; ALSANTE, K. M.; REED, R. A. **PHARMACEUTICAL STRESS TESTING: predicting drug degradation.** 2. ed. London: Informa Healthcare, 2011. 612 p.
- [28] 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.** 2014. 194 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-Graduação em Gestão, Pesquisa e Desenvolvimento da Indústria Farmacêutica, Instituto de Tecnologia em Fármacos - Fiocruz, Rio de Janeiro, 2014. Disponível em: <https://www.arca.fiocruz.br/bitstream/handle/icict/14590/13.pdf?sequence=3&isAllowed=y>. Acesso em: 28 ago. 2023.
- [29] PADDOCK LABORATORIES INC. **Compounding, Stability and Beyond-Use Dates.** Secundum Artem: current & practical compounding information for the pharmacist. Minneapolis, v.7, n.3, 2005.
- [30] FREED, A. L. *et al.* pH control of nucleophilic/electrophilic oxidation. **International Journal Of Pharmaceutics**, [S.L.], v. 357, n. 1-2, p. 180-188, 5 jun. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2008.01.061>.
- [31] REYNOLDS, D. W.; ET AL. **Available guidance and best practices for conducting forced degradation studies:** Pharmaceutical Technology. 26. vol 2. 2002
- [32] LACHMAN, L.; LIEBERMAN, H. A.; KANING, J. L. **TEORIA E PRÁTICA NA INDÚSTRIA FARMACÊUTICA.** Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2001. 1527 p. Tradução de: João F. Pinto, Ph. D.; Ana Isabel Fernandes, Ph. D..

- [33] BLESSY, M.; *et al.* Development of forced degradation and stability indicating studies of drugs—A review. **Journal Of Pharmaceutical Analysis**, [S.L.], v. 4, n. 3, p. 159-165, jun. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpha.2013.09.003>.
- [34] BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Gerência-Geral de Medicamentos (Gerência de Avaliação da Qualidade de Medicamentos Sintéticos). **Relatório de análise de impacto regulatório sobre controle de produtos de degradação em medicamentos**. Brasília: Ministério da Saúde, 2022. Disponível em: https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/regulamentacao/air/analises-de-impacto-regulatorio/2023/arquivos-relatorios-de-air-2023-2/relatorio__air__degradacao_forcada__versao_1.pdf. Acesso em: 03 set. 2024.
- [35] LEITE, E. G. **ESTABILIDADE**: importante parâmetro para avaliar a qualidade, segurança e eficácia de fármacos e medicamentos. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005. Disponível em: <https://lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/7869/000559401.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 8 dez. 2024.
- [36] 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.
- [37] SOLOMONS, T.; FRYHLE C. B. Química Orgânica. 8. Ed. Rio de Janeiro: LTC, 2005. SPRECHER, R. A. Model Comparisons and R2. *The American Statistician*, Vol. 48, No. 2 (Maio, 1994), pp. 113-117
- [38] AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Perguntas & Respostas**: Assunto: RDC 53/2015 e guia 4/2015. 2017. Medicamentos. Gerência Geral de Medicamentos e Produtos Biológicos. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/centraisdeconteudo/publicacoes/medicamentos/publicacoes-sobre-medicamentos/perguntas-e-respostas-rdc-53-2015-e-guia-04-2015.pdf>. Acesso em: 20 nov. 2024.
- [39] VON MÜHLEN, C.; LANÇAS, F. M. Cromatografia unificada. **Química Nova**, [S.L.], v. 27, n. 5, p. 747-753, out. 2004. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422004000500014>.
- [40] GUIMARÃES, L. F. L.; COLLINS, C. H. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. In: COLLINS, Carol H; BRAGA, Gilberto L; BONATO, Pierina s (org.). **Cromatografia: química analítica**. 7. ed. Campinas, Sp: Editora da Unicamp, 1997. p. 183-238.

- [41] JARDIM, I. C. S. F.; COLLINS, C. H.; GUIMARÃES, L. F. L. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. In: COLLINS, Carol H.; BRAGA, Gilberto L.; BONATO, Pierina S.. **Fundamentos de cromatografia**. Campinas, Sp: Editora da Unicamp, 2006. p. 273-398.
- [42] KAZAKEVICH, Y.; LOBRUTTO, R. **HPLC FOR PHARMACEUTICAL SCIENTISTS**. 1st. ed. [s.l.] John Wiley & Sons, Inc., 2007.
- [43] ARYAL, Sagar. **HPLC: principle, parts, types, uses, diagram**. Principle, Parts, Types, Uses, Diagram. 2023. Disponível em: <https://microbenotes.com/high-performance-liquid-chromatography-hplc/>. Acesso em: 25 mar. 2024.
- [44] VITHA, Mark F.. **Chromatography: principles and instrumentation**. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 2017.
- [45] TONHI, E. *et al.* Fases estacionárias para cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR) baseadas em superfícies de óxidos inorgânicos funcionalizados. **Química Nova**, [S.L.], v. 25, n. 4, p. 616-623, jul. 2002. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422002000400017>.
- [46] GALEA, C.; MANGELINGS, D.; HEYDEN, Y. V. Characterization and classification of stationary phases in HPLC and SFC – a review. **Analytica Chimica Acta**, [S.L.], v. 886, p. 1-15, jul. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2015.04.009>.
- [47] DONG, M. W. **MODERN HPLC FOR PRACTICING SCIENTISTS**. 1st. ed. [s.l.] John Wiley & Sons, Inc., 2006.
- [48] MOGOLLÓN, N. G. S. *et al.* STATE OF THE ART TWO-DIMENSIONAL LIQUID CHROMATOGRAPHY: fundamental concepts, instrumentation, and applications. **Química Nova**, [S.L.], v. 37, n. 10, p. 1680-1691, jul. 2014.
- [49] SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J. **Introduction to Modern Liquid Chromatography**. 2. ed. Canada: John Wiley & Sons, Inc., 1979. Disponível em: https://faculty.ksu.edu.sa/sites/default/files/introduction_to_modern_liquid_chromatography.pdf. Acesso em: 01 ago. 2024.
- [50] PENTEADO, J.C.P.; MAGALHÃES, D.; MASINI, J.C. Experimento didático sobre cromatografia gasosa: uma abordagem analítica e ambiental. **Química Nova**, [S.L.], v. 31, n. 8, p. 2190-2193, 2008. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422008000800047>.
- [51] PIOVEZAN, M. **Cromatografia Gasosa - CG**. MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO. SECRETARIA DE EDUCAÇÃO PROFISSIONAL E TECNOLÓGICA. INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA. CAMPUS

- FLORIANÓPOLIS – SANTA CATARINA. Disponível em: <https://docente.ifsc.edu.br/marcel.piovezan/MaterialDidatico/AIN%202/Aula%20Cromatografia%20gasosa%20AIN%202.pdf>. Acesso em: 12 jan. 2025.
- [52] TECNAL. **Cromatografia a Gás**: poderosa técnica de quantificação de compostos orgânicos. Poderosa Técnica de Quantificação de Compostos Orgânicos. 2024. Disponível em: https://tecnal.com.br/es/blog/404_cromatografia_a_gas_poderosa_tecnica_de_separacao_e_quantificacao_de_compostos_organicos. Acesso em: 12 jan. 2025.
- [53] NASCIMENTO, R.F. *et al.* **Cromatografia Gasosa**: aspectos teóricos e práticos. Fortaleza: Imprensa Universitária, 2018. Universidade Federal do Ceará.
- [54] PEDROSO, M.P. *et al.* Cromatografia gasosa bidimensional abrangente (GC × GC). **Química Nova**, [S.L.], v. 32, n. 2, p. 422-430, 2009. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422009000200029>.
- [55] REZAEI, M.; YAMINI, Y.; FARAJI, M. Evolution of dispersive liquid–liquid microextraction method. **Journal Of Chromatography A**, [S.L.], v. 1217, n. 16, p. 2342-2357, abr. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2009.11.088>.
- [56] DUARTE, J.S.; DORES, E.F.G.C.; VILLA, R.D. ULTRASOUND VORTEX ASSISTED DISPERSIVE LIQUID-LIQUID MICROEXTRACTION (USVADLLME) APPLIED TO THE DETERMINATION OF THE TRIAZOLE FLUTRIAFOL AND TRIAZINES AND TRIAZINONES PESTICIDES IN WATER. **Química Nova**, [S.L.], v. 39, n. 8, set. 2016. GN1 Sistemas e Publicacoes Ltd.. <http://dx.doi.org/10.5935/0100-4042.20160110>.
- [57] OJEDA, C.B.; ROJAS, F.S. Separation and Preconcentration by Dispersive Liquid–Liquid Microextraction Procedure: a review. **Chromatographia**, [S.L.], v. 69, n. 11-12, p. 1149-1159, 14 abr. 2009. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1365/s10337-009-1104-1>.
- [58] HUO, X.; LI, Q.; LIN, X.; CHEN, X.; BI, K. Application of Dispersive Liquid–Liquid Microextraction for the Analysis of Six Fungicides in Fruit Samples by GC–ECD. **Chromatographia**, [S.L.], v. 73, n. 3-4, p. 313-319, 7 jan. 2011. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10337-010-1875-4>.
- [59] ZGOŁA-GRZEŚKOWIAK, A.; GRZEŚKOWIAK, T. Dispersive liquid-liquid microextraction. **Trac Trends In Analytical Chemistry**, [S.L.], v. 30, n. 9, p. 1382-1399, out. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.trac.2011.04.014>.
- [60] VIEGAS, Marcelo Caldeira; BASSOLI, Denisley Gentil. Utilização do índice de

- retenção linear para caracterização de compostos voláteis em café solúvel utilizando GC-MS e coluna HP-Innowax. **Química Nova**, [S.L.], v. 30, n. 8, p. 2031-2034, 2007. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422007000800040>.
- [61] SHIMADZU CORPORATION. **Retention Index(Isothermal)**. 2007. Disponível em: https://www.shimadzu.com/an/service-support/technical-support/analysis-basics/gcms/fundamentals/retention/retention_index.html. Acesso em: 21 jan. 2025.
- [62] HOFFMANN, E. DE; STROOBANT, V. **Mass Spectrometry: principles and applications**. 3. ed. Chichester: John Wiley & Sons, Inc., 2007.
- [63] PACIFICO, M. *et al.* Metabolite fingerprint of “capim dourado” (*Syngonanthus nitens*), a basis of Brazilian handicrafts. **Industrial Crops And Products**, [S.L.], v. 33, n. 2, p. 488-496, mar. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2010.10.023>.
- [64] AWAD, H.; KHAMIS, M. M.; EL-ANEED, A. Mass Spectrometry, Review of the Basics: ionization. **Applied Spectroscopy Reviews**, [S.L.], v. 50, n. 2, p. 158-175, 25 set. 2014. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/05704928.2014.954046>.
- [65] MAHER, S.; JJUNJU, F. P. M.; TAYLOR, STEPHEN. Colloquium: 100 years of mass spectrometry. **Reviews Of Modern Physics**, [S.L.], v. 87, n. 1, p. 113-135, 28 jan. 2015. American Physical Society (APS). <http://dx.doi.org/10.1103/revmodphys.87.113>.
- [66] PAVIA, D. L. **Introdução à espectroscopia**. 2. ed. São Paulo: Cengage Learning, 2016. xviii, 733 p., il. ISBN 9788522122384 (broch.). Tradução de: Introduction to spectroscopy (5. ed.).
- [67] MORATO, N. M.; COOKS, R. G. Desorption Electrospray Ionization Mass Spectrometry: 20 years. **Accounts Of Chemical Research**, [S.L.], v. 56, n. 18, p. 2526-2536, 6 set. 2023. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/acs.accounts.3c00382>.
- [68] ARDREY, R. E. **LIQUID CHROMATOGRAPHY– MASS SPECTROMETRY: an introduction**. Huddersfield, Uk: John Wiley & Sons, Ltd, 2023. ISBNs: 0-471-49799-1 (HB); 0-471-49801-7 (PB).
- [69] KUČHAŘ, L.; ASFAW, B.; RYBOVÁ, J.; LEDVINOVÁ, J. Tandem Mass Spectrometry of Sphingolipids. **Advances In Clinical Chemistry**, [S.L.], p. 177-219, 2016. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/bs.acc.2016.06.004>.
- [70] FUNDAÇÃO EZEQUIEL DIAS. Diretoria Industrial. Departamento de Controle de Qualidade. **Análise da Matéria-Prima Entecavir Monoidratado**. Revisão 06. Belo Horizonte: FUNED, 2024.
- [71] BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).

Resolução da Diretoria Colegiada - RDC no 166, de 24 de julho de 2017. **Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências.** Diário Oficial da União, Poder Executivo, Brasília, DF, 25 de julho de 2017.

- [72] SHIMADZU CORPORATION. **Abnormal Peak Shapes.** 2024. Disponível em: <https://www.shimadzu.com/an/service-support/technical-support/analysis-basics/tips/abnormalpeakshapes.html>. Acesso em: 11 jan. 2025.
- [73] LABSOLUTIONS. **Peak Tailing in HPLC.** 2024. Disponível em: <https://www.elementlabsolutions.com/uk/chromatography-blog/post/peak-tailing-in-hplc>. Acesso em: 11 jan. 2025.
- [74] NIST. 2024. Disponível em: <https://www.nist.gov/>. Acesso em 21 jan. 2025.