



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS (PPGCF)

JOSÉ WELLITHOM VITURINO DA SILVA

**AVALIAÇÃO DO PERFIL DE ESTABILIDADE DO TERCONAZOL E
CARACTERIZAÇÃO DE SEUS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO**

Recife

2019

JOSÉ WELLITHOM VITURINO DA SILVA

**AVALIAÇÃO DO PERFIL DE ESTABILIDADE DO TERCONAZOL E
CARACTERIZAÇÃO DE SEUS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO**

Exame de defesa de Mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para a obtenção do título de mestre.

Área de Concentração: Produção e controle de medicamentos.

Orientador: Prof. Dr. Danilo César Galindo Bedor

Recife

2019

Catálogo na fonte:
bibliotecária: Elaine Freitas, CRB4:1790

S586a Silva, José Wellithom Vitorino da.
Avaliação do perfil de estabilidade do terconazol e caracterização de seus produtos de degradação/ José Wellithom Vitorino da Silva. – Recife, 2019.
104 f.; il.

Orientador: Danilo César Galindo Bedor.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências da Saúde. Programa de pós-graduação em Ciências Farmacêuticas.
Inclui referências.

1. Antifúngico. 2. HPLC-DAD. 3. Espectrometria de massas. 4. Produtos de degradação. I. Bedor, Danilo César Galindo (orientador). II. Título.

615.1 CDD (23.ed.)

UFPE (CCS 2019 - 192)

JOSÉ WELLITHOM VITURINO DA SILVA

**AVALIAÇÃO DO PERFIL DE ESTABILIDADE DO TERCONAZOL E
CARACTERIZAÇÃO DE SEUS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO**

Exame de defesa de Mestrado apresentado ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para a obtenção do título de mestre.

Aprovada em: 27 de fevereiro de 2019.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. José Lamartine Soares Sobrinho (Examinador Interno)

Universidade Federal de Pernambuco

Prof.^a Dr.^a Kátia Aparecida da Silva Aquino (Examinadora Externa)

Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Danilo César Galindo Bedor (Orientador)

Universidade Federal de Pernambuco

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, razão de tudo em minha vida.

Aos meus pais, Antônio e Virgínia, por todo amor, dedicação, cuidado, apoio e por serem os exemplos da minha vida.

À minha noiva por seu amor, companheirismo, compreensão e por cada palavra de incentivo.

Aos meus irmãos, Marcos, Carlos e Andreia, pela companhia, amizade e carinho em todos os momentos.

À minha tia Judite e a minha prima Edna por terem desempenhado com tanta dedicação o papel de família quando tive que morar em Recife.

Aos meus sobrinhos, Livia e Eduardo, por me fazerem enxergar a beleza que existe em ser criança.

Ao professor Dr^o Danilo César Galindo Bedor, meu orientador, pelo acolhimento, confiança, amizade e pela oportunidade que me deu de aprender um pouco mais do universo tão vasto que é a química analítica e a bioanálise.

Ao professor Davi Pereira de Santana, coordenador do NUDFAC, por todo seu trabalho prestado para estabelecimento e manutenção da minha segunda casa.

À Prof^a. Dr^a. Leila Bastos Leal, pelo apoio e cuidado.

À indústria farmacêutica HEBRON pela doação da matéria-prima.

À todos os alunos do NUDAFAC: Ana Rosa, Juliana, Maira, Thalita, Carol Costa, Carol Chagas, Karol, Gustavo (que foi “pra vida”), Isabele, Irla, Alélia, Arnon, Henrique, Valéria, Larissa, Camila, Júlia, Beatriz, Auryllane, Rhayane, Amélia e Asley e de um modo especial a:

- Maira, pela amizade e parceria master de laboratório;
- Ana Rosa e Juliana, por virem caminhando junto comigo, entre choros e alegrias, desde a graduação;
- Thalita por todo apoio e amizade desde a iniciação científica.

Aos egressos do NUDFAC Diego, Ellison, Nayara e Anelise.

À Izak por toda ajuda, paciência e discussões sobre nossos trabalhos.

Aos amigos Eduarda, Marisa e Filipe pelo apoio e por todas as dúvidas esclarecidas.

À Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em especial a Nerilin e Rilvan por todo o suporte na secretaria do PPGCF.

À CAPES pela bolsa concedida.

À universidade Federal de Pernambuco e ao contribuinte brasileiro.

RESUMO

O terconazol (TCZ) é um antifúngico do grupo dos triazóis e é utilizado no tratamento da vulvovaginite fúngica de forma bastante eficaz. Por outro lado, a produção de medicamentos exige a realização de estudos que garantam o uso seguro e eficaz, dentre estes, os estudos de degradação forçada têm grande destaque. Este trabalho teve como objetivo realizar um estudo de degradação forçada do TCZ, com a finalidade de desenvolver um MIE por CLAE-DAD e caracterizar seus produtos de degradação. Foram seguidas as diretrizes trazidas pela ICH para as condições de estresse ácido, básico, oxidativo, fotolítico, alta temperatura e umidade. Além disso, foram realizados estudos de cinética de decaimento para as condições em que o TCZ mostrou-se susceptível a degradação. A elucidação estrutural foi realizada com o auxílio do sistema LC-MS/TOF. O método cromatográfico desenvolvido foi composto por coluna Gemini NX (150 x 4,6 mm), temperatura ambiente, fase móvel acetato de amônio (pH= 8 ± 0,5):Metanol (25:75 v/v), fluxo de 1 mL.min⁻¹ no modo isocrático e volume de injeção de 20 µL. As amostras de mostraram-se estáveis nas condições de estresse ácido, básico, fotolítico, alta temperatura e alta umidade. Para o estresse oxidativo com H₂O₂ 3% e 1,5%, foi observado um decaimento de 42,29% e 39,43%, respectivamente, e formação de dois produtos de degradação (PDs 1 e 2). O estresse fotolítico em solução levou a uma degradação de 37,17% do teor do TCZ em apenas 10 min e a formação de 4 produtos de degradação (PDs 3, 4, 5 e 6). O acoplamento do sistema LC-MS foi realizado através da ionização por *electrospray* em modo positivo, onde foi possível observar o sinal 532,1872 *m/z* [M+ H]⁺ como pico base do TCZ. Para o PD1 e PD2 foi observada a presença de íons moleculares 564.1788 *m/z* [M+ H]⁺ e 548.1845 *m/z* [M+ H]⁺, o que nos sugere a adição de dois e um átomos de oxigênio, respectivamente, na estrutura do TCZ, com uma provável formação de N-óxidos. Para os PD3 e 4, foi possível observar um perfil de massas semelhante de 498.2265 *m/z* [M+ H]⁺, o que nos leva a deduzir que estes produtos de degradação são formados pela perda de um átomo de cloro da molécula do TCZ nas posições orto e para. O PD5 evidenciou perfil de massas de 464.2648 *m/z* [M+ H]⁺, sem apresentar padrão isotópico para átomos de cloro, o que nos leva a concluir que este produto de degradação é formado pela perda dos dois átomos de cloro da porção fenílica do TCZ. Já o PD6 apresentou perfil de massas de 496.2108 *m/z* [M+ H]⁺ e seu mecanismo de formação parece estar ligado ao ataque do grupo triazol ao radical arila. A partir deste estudo de degradação forçada foi

possível conhecer melhor os aspectos envolvidos na estabilidade do TCZ e obtiveram-se informações estruturais de seus produtos de degradação o que nos dá suporte para prever e avaliar instabilidades em medicamentos a base deste fármaco.

Palavras-chaves: Antifúngico. HPLC-DAD. Espectrometria de massas. Produtos de degradação.

ABSTRACT

Terconazole (TCZ) is an antifungal of the triazoles group and has been used in the treatment of fungal vulvovaginitis quite effectively. However, for its manufacturing, it is necessary to carry out studies that ensure its safe and effective use. Among these, forced degradation studies had been great significance. The aim of this work was to study the TCZe forced degradation, to develop a stability indicating method by HPLC-DAD and characterizing its degradation products. Forced degradation tests were performed according to ICH guidelines, forced conditions under acid, basic, oxidative, photolytic, thermal and humidity. In addition, TCZ forced degradation kinetics studies have been performed for situations that it is shown your degradation. Structural elucidation was performed using LC-MS/TOF. The chromatographic method developed was performed using Gemine NX (150 x 4.6 mm) at room temperature, mobile phase was ammonium acetate ($\text{pH} = 8 \pm 0,5$) and methanol (25:75 v / v) at a flow of $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ in a isocratic elution and injection volume of $20 \mu\text{L}$. The samples were stable under acid, basic, photolytic, thermal and humidity conditions. However, under oxidative stress with 3% and 1.5% H_2O_2 , a decrease of 42.29% and 39.43%, respectively, and a generation of two degradation products (DPs 1 and 2) were observed. As well, the photolytic stress in solution led to a TCZ degradation of 37.17% in 10 minutes and the generation of 4 degradation products (DPs 3, 4, 5 and 6). HPLC-MS coupling was performed by electrospray ionization on a positive mode, where it was possible to obtain the signal of m/z 532.1872 $[\text{M} + \text{H}]^+$ as the base peak of TCZe. For DP 1 and DP2, the presence of m/z 564.1788 $[\text{M} + \text{H}]^+$ and m/z 548.1845 $[\text{M} + \text{H}]^+$ was observed, these find suggest the addition of two and one oxygen atoms, respectively, on TCZe structure, with a probable generation of N-oxides. For DPs 3 and 4, a similar mass profile of m/z 498.2265 $[\text{M} + \text{H}]^+$ was found, which leads us to deduce that these degradation products are formed by the loss of one chlorine atom of the TCZe molecule in the ortho and para positions. The DP 5 showed the mass profile of m/z 464.2648 $[\text{M} + \text{H}]^+$, without the presence of standard isotope for chlorine atoms, which leads us to conclude that the degradation product is formed by losses of two chlorine atoms of phenyl portion of the TCZe. The DP6 mass profile of m/z 496.2108 $[\text{M} + \text{H}]^+$ and its formation mechanism seems to be associated with the attack of triazole group on aryl radical. From this, the forced degradation study allowed to know the TCZe

stability issues and to know the structures of its degradation products. The knowledge generated here can help to predict instability in medicines based on this drug.

Key-words: Antifungal. HPLC-DAD. Mass spectrometry. Degradation products.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Estruturas químicas dos fármacos itraconazol e terconazol-----	40
Figura 2-	Cromatogramas de branco HCl (a), padrão TCZ (b), amostras de TCZ submetida a HCl 0,4 M (c) e amostras de TCZ submetida a HCl 2 M (d)-----	53
Figura 3-	Cromatogramas de branco NaOH (a), padrão TCZ (b), amostras de TCZ submetida a NaOH 0,4 M (c) e amostras de TCZ submetida a NaOH 2 M (d)-----	54
Figura 4-	Cromatogramas de branco peróxido (a), padrão TCZ (b), amostras de TCZ submetida a H ₂ O ₂ 1,5% (v/v) (c) e amostras de TCZ submetida a H ₂ O ₂ 3% (v/v) (d)-----	56
Figura 5-	Cromatogramas de branco fase móvel (a), padrão TCZ (b), amostras de TCZ submetida a fotodegradação (10 minutos) (c) amostras de TCZ submetida a fotodegradação (90 minutos) (d)-----	57
Figura 6-	Cromatogramas de branco fase móvel (a), padrão TCZ (b), amostras de TCZ submetida a aquecimento (c)-----	59
Figura 7-	Cromatogramas de branco fase móvel (a), padrão TCZ (b), amostras de TCZ submetida a alta umidade (c)-----	60
Figura 8-	Avaliação dos teores do TCZ, produto de degradação e balanço de massas obtido após a oxidação em solução de H ₂ O ₂ a 3 % nos tempos de 0; 1; 2; 3; 4; 7; 59; 24; 32, 48, 52, 56 e 72 horas-----	61
Figura 9-	Avaliação dos teores do TCZ, produto de degradação e balanço de massas obtido após a oxidação em solução de H ₂ O ₂ a 1,5 % nos tempos de 0; 1; 2; 3; 4; 7; 59; 24; 32, 48, 52, 56 e 72 horas-----	62
Figura 10-	Avaliação dos teores do TCZ, produto de degradação e balanço de massas obtido após fotólise nos tempos de 0; 1; 2; 3; 4; 59; 24; 32, 48, 52, 56 e 72 horas-----	63
Figura 11-	Representação gráfica das cinéticas de ordem zero (a), primeira ordem (b) e segunda ordem (c) para a degradação de TCZ submetido a estresse oxidativo (H ₂ O ₂ 3%, 25°C)-----	65
Figura 12-	Representação gráfica das cinéticas de ordem zero (a), primeira ordem (b) e segunda ordem (c) para a degradação de TCZ submetido a estresse oxidativo (H ₂ O ₂ 1,5%, 25°C)-----	67

Figura 13- Representação gráfica das cinéticas de ordem zero (a), primeira ordem (b) e segunda a ordem (c) para a degradação de TCZ submetido a estresse fotolítico-----	71
Figura 14- Espectro de massas de alta resolução ampliado do TCZ obtido pelo sistema LC-MS-TOF no modo ESI +-----	73
Figura 15- Espectro de massas de alta resolução do PD 1 obtido pelo sistema LC-MS-TOF no modo ESI +-----	75
Figura 16- Espectro de massas de alta resolução do PD 2 obtido pelo sistema LC-MS-TOF no modo ESI +-----	76
Figura 17- Mecanismo de formação de N-óxidos do TCZ-----	77
Figura 18- Estruturas propostas para os produtos de degradação 1 e 2-----	78
Figura 19- Espectro de massas de alta resolução ampliado dos PDs 3 e 4 obtidos pelo sistema LC-MS-TOF no modo ESI +-----	79
Figura 20- Espectro de massas de alta resolução ampliado do PD 5 obtido pelo sistema LC-MS-TOF no modo ESI +-----	81
Figura 21- Espectro de massas de alta resolução ampliado do PD obtido pelo sistema LC-MS-TOF no modo ESI +-----	82
Figura 22- Esquema representativo de fotodegradação para formação do PD5 através da via radicalar-----	83
Figura 23- Estruturas propostas para os produtos de degradação 3, 4,5 e 6-----	83
Figura 24- Espectro MS/MS de alta resolução do PD1 obtido pelo sistema LC-MS-TOF no modo ESI +-----	84
Figura 25- Caminho de fragmentação ESI/MS/MS proposto para PD 1-----	85
Figura 26- MS2 de alta resolução do PD2 obtido pelo sistema LC-MS-TOF no modo ESI +-----	86
Figura 27- Caminho de fragmentação ESI/MS/MS proposto para PD 2-----	87
Figura 28- MS2 de alta resolução do PD 3 e 4 obtido pelo sistema LC-MS-TOF no modo ESI +-----	88
Figura 29- Caminho de fragmentação ESI/MS/MS proposto para PD 3-----	89
Figura 30- Caminho de fragmentação ESI/MS/MS proposto para PD 4-----	90
Figura 31- MS2 de alta resolução do PD5 obtido pelo sistema LC-MS-TOF no modo ESI +-----	91
Figura 32- Caminho de fragmentação ESI/MS/MS proposto para PD 5-----	92

Figura 33- MS2 de alta resolução do PD 6 obtido pelo sistema LC-MS-TOF no
modo ESI +-----93

Figura 34- Caminho de fragmentação ESI/MS/MS proposto para PD 6-----94

LISTA DE QUADROS

Quadro 1- Diretrizes do ICH para a condução dos testes de degradação-----	30
Quadro 2- Limites de notificação, identificação e qualificação do (s) produtos (s) de degradação no decorrer do estudo de estabilidade-----	32
Quadro 3- Expressões matemáticas que definem as ordens de reação-----	49
Quadro 4- Expressões matemáticas que definem os parâmetros cinéticos das reações-----	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Parâmetros de condução para realização dos estudos de estabilidade acelerada e de longa duração-----	26
Tabela 2-	Características físico-químicas do terconazol-----	40
Tabela 3-	Lista de reagentes utilizados-----	42
Tabela 4-	Lista de equipamentos utilizados-----	43
Tabela 5-	Modos de eluição utilizados na fase de desenvolvimento do MIE-----	44
Tabela 6-	Dados das áreas médias obtidas no tempo zero e após exposição, concentração, Log C e 1/C adquiridos em análise da solução de matéria-prima do TCZ submetida a estresse oxidativo (H ₂ O ₂ 3%, 25°C)-----	64
Tabela 7-	Dados das áreas médias obtidas no tempo zero e após exposição, concentração, Log C e 1/C adquiridos em análise da solução de matéria-prima do TCZ submetida a estresse oxidativo (H ₂ O ₂ 1,5%, 25°C)-----	66
Tabela 8-	Parâmetros cinéticos calculados para o TCZ na oxidação por peróxido----	69
Tabela 9-	Teor de TCZ após degradações oxidativas-----	69
Tabela 10-	Dados das áreas médias obtidas no tempo zero e após exposição, concentração, Log C e 1/C adquiridos em análise da solução de matéria-prima do TCZ submetida a fotólise-----	70
Tabela 11-	Parâmetros cinéticos calculados para o TCZ na fotodegradação-----	72

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIBN- Radical Azobisisobutironitrila

ANVISA- Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CLAE- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

DAD- Arrando de diodos

DPR- Desvio Padrão Relativo

ESI- Ionização por Electrospray

eV- Eletrovolts

FDA- *Food and Drug Administration*

H₂O₂- Peróxido de hidrogênio

HCl- Ácido clorídrico

ICH- *International Conference on Armonization*

IFA- Insumo Farmacêutico Ativo

IR- Índice de Refração

L- Litros

LC-MS/MS (Q-TOF)- Cromatografia Líquida acoplado a espectrometria de massas em tandem com detecção por tempo de voo

log P- Logaritmo do coeficiente de partição

Lux/h- Luz por hora

m/z- Relação massa/carga

MALDI- Ionização e dessorção a laser assistida por matriz

MIE- Método Indicativo de Estabilidade

NaOH- Hidróxido de sódio

OMS- Organização Mundial de Saúde

PD- Produto de Degradação

PDs- Produtos de Degradação

pKa- Logaritmo da constante de dissociação

ppm- Partes por milhão

RDC- Resolução de Diretoria Colegiada

RE- Resolução

RMN- Ressonância Magnética Nuclear

T_{1/2}- Meia-vida de degradação

T_{90%}- Meia vida-útil

TER- Terconazol

UR- Umidade Relativa

UV- Ultravioleta

W/hm²- Watts por hora por metro quadrado

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
2	OBJETIVOS	22
2.1	OBJETIVO GERAL	22
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
3	REFERENCIAL TEÓRICO	23
3.1	SEGURANÇA E EFICÁCIA DE MEDICAMENTOS	23
3.2	ESTABILIDADE	24
3.3	MÉTODOS INDICATIVOS DE ESTABILIDADE (MIE)	27
3.4	ESTUDOS DE DEGRADAÇÃO FORÇADA	29
3.4.1	Condições de degradação	34
3.4.1.1	Hidrólise ácida e básica	34
3.4.1.2	Oxidação	34
3.4.1.3	Fotodegradação	35
3.4.1.4	Degradação por aquecimento	36
3.5	TÉCNICAS ANALÍTICAS UTILIZADAS NOS ESTUDO DE DEGRADAÇÃO FORÇADA	36
3.5.1	Espectrometria de massas por tempo de voo (EM-TOF)	37
3.6	TERCONAZOL	39
4	MATERIAL E MÉTODOS	42
4.1	INSUMO	42
4.2	REAGENTES	42
4.3	EQUIPAMENTOS	42
4.4	MÉTODO INDICATIVO DE ESTABILIDADE (MIE)	43
4.4.1	Fase móvel	43
4.5	ESTUDO PRELIMINAR DE DEGRADAÇÃO FORÇADA	44
4.5.1	Preparo do padrão	44

4.5.2 Preparo das amostras	44
4.5.2.2 Degradação hidrolítica básica	45
4.5.2.3 Degradação oxidativas	45
4.5.2.4 Degradação fotolítica	46
4.5.2.5 Degradação térmica	46
4.5.2.6 Degradação por umidade	47
4.6 ESTUDO DE CINÉTICA DE DEGRADAÇÃO	47
4.7 AVALIAÇÃO DE BALANÇO DE MASSAS	49
4.8 OTIMIZAÇÃO DA ESPECTROMETRIA DE MASSAS	50
4.8.1 Definição do modo de ionização e perfil de fragmentação	50
4.8.2 Otimização dos parâmetros da fonte e acoplamento LC-MS	50
4.9 CARACTERIZAÇÃO DOS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS	50
5 RESULTADOS	51
5.1 DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO	51
5.1.1 Hplc dad	51
5.1.2 Degradação Forçada	51
5.1.2.1 Hidrólise ácida e básica	52
5.1.2.2 Degradação oxidativa com peróxido de hidrogênio	54
5.1.2.3 Degradação fotolítica	56
5.1.2.4 Degradação térmica	57
5.1.2.5 Degradação por umidade	59
5.1.3 Avaliação do balanço de massas	60
5.2 ESTUDOS DE CINÉTICA DE DEGRADAÇÃO	63
5.2.1 Definição das ordens de reação	63
5.2.1.1 Cinética de degradação oxidativas com peróxido de hidrogênio	63
5.2.1.1 Cinética de degradação fotolítica	69

5.3	OTIMIZAÇÃO DA ESPECTROMETRIA DE MASSAS	72
5.4	ELUIDAÇÃO ESTRUTURAL POR ESPETROMETRIA DE MASSAS DE ALTA RESOLUÇÃO	73
5.4.1	Oxidação	74
4.1.2	Fotólise	79
5.5	PERFIL DE FRAGMENTAÇÃO	84
6	CONCLUSÃO	95
7	PERSPECTIVAS	96
	REFERÊNCIAS	97

1 INTRODUÇÃO

A candidíase vulvovaginal, é a segunda causa mais comum de vaginite e representa cerca de 40% dos problemas vaginais das pacientes atendidas na atenção básica, afetando 75% das mulheres pelo menos uma vez na vida. As recomendações das diretrizes terapêuticas da Organização Mundial de Saúde (OMS) trazem o grupo dos triazóis de uso tópico como os medicamentos de primeira escolha para o tratamento da candidíase vulvovaginal (NYIRJESY, SOBEL, 2003). Este grupo teve o terconazol como seu primeiro medicamento comercializado e desde então tem apresentado grande eficácia em regimes de tratamento de curto prazo, além de promover altas taxas de cura nos exames clínicos e micológicos, apresentando baixas taxas de reincidência quando comparado a outras drogas antifúngicas do grupo imidazol, o que evidencia a importância da produção deste medicamento (RIZK et al., 2014).

Por outro lado, a produção de medicamentos traz consigo muitas exigências e entre os aspectos importantes relacionados ao seu desenvolvimento e registro está a estabilidade, que pode ser definida como a capacidade de um produto manter suas especificações frente as condições a que possam estar expostos desde a fabricação até o final de prazo de validade estabelecido. Uma vez que fatores ambientais como temperatura, umidade, luz e outros intrínsecos às propriedades físico-químicas, processo produtivo, bem como materiais de embalagem podem influenciar diretamente na estabilidade de medicamentos e acelerar o processo de degradação (NARAYAN, MANUPRIYA, 2017; SENGUPTA, CHATTERJEE, TEKADE, 2018).

Assim, problemas relacionados a instabilidade de medicamentos podem ter entre outras consequências a degradação do fármaco em estruturas sem atividade farmacológica ou redução da mesma, podendo levar a ineficácia terapêutica, além da formação de produtos de degradação (PDs) que apresentem potencial toxicidade, pondo em risco a segurança do usuário. Por sua vez, para que se possa avaliar os produtos de degradação de um medicamento, recorre-se aos testes de degradação forçada, que consistem em submeter o produto a condições forçadas de degradação superiores as estabelecidas para os testes de estabilidade acelerada (ICH, 2003; BRASIL, 2015).

Os estudos de degradação forçada têm sido bastante discutidos e mostram-se um instrumento poderoso para adequada avaliação e aprimoramento da estabilidade em produtos farmacêuticos, uma importante ferramenta na elucidação das rotas de

degradação de fármacos e necessário para o desenvolvimento e validação de métodos indicativos de estabilidade (MIE). Além disso, são formalizados como requerimento regulamentar, dadas as exigências das agências regulatórias. (SRIVASTAVA, KUMAR, 2017).

Apesar de sua importância, os guias oficiais fornecem orientações gerais e muito limitadas, o que tem gerado dúvidas na condução destes testes. Outro ponto importante tem sido a identificação e elucidação estrutural de PDs, uma vez que exigem técnicas sofisticadas de análise, como a espectrometria de massa e a ressonância magnética nuclear que, entre outras características, apresentam alto custo, ainda não são tão difundidas e demandam profissionais habilitados para operar e interpretar seus resultados. Todas essas questões se revelam desafiadoras e, em partes, um entrave para as indústrias farmacêuticas, principalmente para as de pequeno e médio porte já que não dispõem desses recursos (DE VIJLDER, 2018).

Assim, tendo em vista a escassez de relatos na literatura acerca de PDs para o terconazol, faz-se necessário a realização de avaliações que nos permitam ampliar os conhecimentos do perfil de estabilidade deste fármaco de forma a contribuir com os avanços referentes a segurança e eficácia de medicamentos no Brasil.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o perfil de estabilidade do terconazol através de estudo de degradação forçada, como subsídio de garantia de sua qualidade, segurança e eficácia durante todo o prazo de validade.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar estudo de degradação forçada do Insumo Farmacêutico Ativo (IFA) terconazol nas seguintes condições forçadas: aquecimento; umidade; solução ácida, solução básica; solução oxidante e exposição à luz;
- Desenvolver método indicativo de estabilidade capaz de detectar e quantificar com seletividade o terconazol, na presença de seus produtos de degradação por CLAE-DAD;
- Elucidar rota degradativa e identificar os produtos de degradação do terconazol por LC-MS/MS (Q-TOF);
- Determinar a cinética de degradação do fármaco terconazol nas diferentes condições de estresse.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 SEGURANÇA E EFICÁCIA DE MEDICAMENTOS

Os medicamentos são considerados a principal ferramenta terapêutica para recuperação ou manutenção das condições de saúde da população (VIEIRA, 2005) e o sucesso farmacoterapêutico pode ser alcançado através da comprovação de que os medicamentos sejam seguros e eficazes para os fins a que se destinam e que seus efeitos colaterais não suprimam os seus benefícios. Tais aspectos estão ligados diretamente ao perfil de efeito de cada medicamento e podem ser avaliados durante o seu processo de desenvolvimento, produção e uso, através de estudos toxicológicos, pré-clínicos e clínicos e de farmacovigilância (FDA,1999; QUENTAL, FILHO, 2006; GOROG, 2007; BRASIL, 2017).

Aliado a isso, os avanços das boas práticas de fabricação e das técnicas de controle de qualidade trouxeram o entendimento de que os processos envolvidos na produção de medicamentos também oferecem um risco potencial na sua qualidade, segurança e eficácia. Dessa forma, foram feitos inúmeros avanços em relação a avaliação e padronização das condições sanitárias envolvidas nos processos produtivos que passaram a contar com roteiros de inspeção para empresas fabricantes, padrões mínimos de exigência para validação de processos, procedimentos de limpeza, metodologia analítica e qualificação de fornecedores. (ZUCK, 1995; SHABIR, 2004).

Além disso, a questão da pureza em medicamentos ganhou grande destaque, uma vez que pode contribuir para o perfil de efeitos colaterais observados pelo uso de medicamentos. Para fins regulatórios, as impurezas em medicamentos são classificadas como orgânicas, inorgânicas e solventes residuais e mostram-se umas das questões mais importantes na análise farmacêutica moderna (ICH, 1996; GOROG, 2003; NAGESWARARAO, 2003).

A presença dessas impurezas em medicamentos é tolerada até certos níveis e está ligada diretamente à qualidade dos insumos farmacêuticos utilizados. Como exemplo podemos citar a presença de isômeros, intermediários de síntese e resíduos de solventes; ao processo de fabricação pela contaminação por ligantes, sais inorgânicos, metais pesados, catalisadores, auxiliares de filtração; e à estabilidade do produto

acabado, aspecto primordial na formação de produtos de degradação (RAO, NAGARAJU, 2003).

3.2 ESTABILIDADE

A estabilidade de um produto farmacêutico pode ser definida como a capacidade de uma formulação específica em um sistema de embalagem específico manter suas características físicas, químicas, microbiológicas, toxicológicas e informativas. A estabilidade também pode ser entendida como um indicador da capacidade que um produto formulado ou substância isolada têm em manter suas propriedades mediante o efeito de fatores ambientais (KOMMANABOYINA, 1999).

No ramo farmacêutico, os estudos de estabilidade são um requisito regulamentar necessário para aprovação de registro de qualquer medicamento, dada a extrema importância que desempenham. Os resultados desses estudos são utilizados no desenvolvimento racional de formulações, uma vez que auxiliam na escolha dos adjuvantes farmacotécnicos utilizados, tendo o objetivo de desenvolver sistemas que promovam a integridade do fármaco e do produto como um todo (HUYNH-BA, 2009).

Da mesma forma, fornecem informações necessárias para escolha de material de embalagem, determinação de condições ótimas de armazenamento, além da geração de dados necessários para prever e determinar prazos de validade. Assim, os estudos de estabilidade mostram-se como subsídio de garantia da qualidade, segurança e eficácia de medicamentos durante todo seu tempo de uso (BAJAJ, 2012).

Além dos fatores ambientais tais como temperatura, umidade, luminosidade, outras variáveis como o processo produtivo utilizado, interação fármaco-excipiente ou fármaco-fármaco, bem como materiais de embalagem utilizados podem influenciar diretamente na estabilidade de medicamentos e acelerar o processo de degradação (SILVA et al., 2009). Estas degradações envolvem diferentes mecanismos e estão diretamente ligados aos fatores anteriormente mencionados. Dessa forma, reações de oxidação, hidrólise, racemização, redução, solvólise, entre outras, podem levar a perda ou diminuição da atividade de fármacos, perda de função de excipientes, formação de produtos de degradação, perda da integridade do material de embalagem, além de descaracterização físico-química do medicamento (CARSTENSEN et al., 2000).

Em 2005, a ANVISA publicou a RE 01, que continua vigente até os dias atuais e funciona como um guia para realização dos testes de estabilidade de produtos farmacêuticos. Tem por finalidade prever, determinar ou acompanhar os prazos de validade desses produtos em suas embalagens primárias, através da verificação de manutenção de suas características físicas, químicas, biológicas e microbiológicas, após passarem por procedimentos específicos em câmaras projetadas para este fim. Nesta resolução os estudos de estabilidade são dispostos em três tipos e o resultado de cada um desempenha um papel diferenciado para o estabelecimento do prazo de validade, como disposto a seguir (BRASIL, 2005).

O estudo de estabilidade acelerado gera no produto testado um aumento de velocidade no processo de degradação através de sua exposição a condições forçadas de temperatura e umidade, aos quais não estariam em condições normais de armazenamento. Os resultados de suas avaliações, juntamente com os resultados parciais dos seis primeiros meses do estudo de estabilidade de longa duração, fornecem informações necessárias para prever o prazo de validade provisório de 2 anos para produtos farmacêuticos, permitindo assim o seu registro junto ao órgão sanitário responsável (O'DONNELL, BOKSER 2006; BRASIL, 2005).

Já no estudo de estabilidade de longa duração, o produto testado é exposto a condições de temperatura e umidade mais próximas das que ocorrem naturalmente, levando-se em consideração a zona climática onde são realizados. Através de seus resultados, pode ser concedido um prazo de validade provisório de 2 anos, mediante a apresentação dos resultados dos 12 primeiros meses do teste, que deverá ser confirmado com os resultados da duração total do estudo (BRASIL, 2005).

Por sua vez, o estudo de estabilidade de acompanhamento segue a mesma lógica dos estudos de estabilidade de longa duração no que diz respeito a execução do teste. Eles são delineados para reafirmar que o produto mantém suas características físicas, químicas, biológicas e microbiológicas conforme os resultados obtidos nos estudos de estabilidade de longa duração e só pode ser executado após finalização e comprovação de que não houve alteração do produto no estudo de longa duração (BRASIL, 2005).

As recomendações para realização dos estudos de estabilidade acelerada e de longa duração, levando-se em consideração a forma farmacêutica, material de embalagem e condições de armazenamento, encontram-se descritas na tabela 1:

Tabela 1. Parâmetros de condução para realização dos estudos de estabilidade acelerada e de longa duração.

Forma Farmacêutica	Condições de armazenamento	Embalagem	Temperatura e umidade (Acelerado)	Temperatura e umidade (Longa Duração)
Sólido	15°C- 30°C	Semipermeável	40°C ± 2°C/ 75% UR ±5% UR	30°C ± 2°C/ 75% UR ± 5% UR
Sólido	15°C- 30°C	Impermeável	40°C ± 2°C	30°C ± 2°C
Semissólido	15°C- 30°C	Impermeável	40°C ± 2°C 75% UR ±5% UR	30°C ± 2°C/ 75% UR ± 5% UR
Semissólido	15°C- 30°C	Impermeável	40°C ± 2°C	30°C ± 2°C
Líquidos	15°C- 30°C	Semipermeável	40°C ± 2°C/ 75% UR ±5% UR	30°C ± 2°C/ 75% UR ± 5% UR
Líquidos	15°C- 30°C	Impermeável	40°C ± 2°C	30°C ± 2°C
Gases	15°C- 30°C	Impermeável	40°C ± 2°C	30°C ± 2°C
Todas as formas farmacêuticas	2°C – 8°C	Impermeável	25°C ± 2°C	5°C ± 3°C
Todas as formas farmacêuticas	2°C – 8°C	Semipermeável	25°C ± 2°C/60 % UR ±5% UR	5°C ± 3°C
Todas as formas farmacêuticas	-20°C	Todas	-20°C ± 5°C	-20°C ± 5°C

Fonte: Adaptado de Brasil, 2005.

Os resultados dos estudos de estabilidade devem ser documentados e apresentar de forma detalhada informações quanto a aparência do produto, teor do princípio ativo e método analítico correspondente, limites microbianos, entre outros ensaios que se correlacionam com a forma farmacêutica (RHODS, 1995; BRASIL, 2005).

O guia traz ainda a recomendação de realização dos estudos de fotoestabilidade sempre que houver pertinência e a sua ausência deve ser justificada tecnicamente. A ANVISA recomenda a utilização das recomendações técnicas disponíveis em sua plataforma e que se baseiam nas recomendações trazidas no guia Q1B do ICH (ICH, 1996; BRASIL, 2005).

Os estudos de fotoestabilidade devem ser realizados igualmente em câmaras qualificadas e com a possibilidade de dois tipos de padrão de emissão de luz. No primeiro caso, os estudos podem ser realizados em câmara de foto estabilidade com lâmpada fluorescente que produza um padrão de emissão D65/ID65, para simular a luz UV e visível simultaneamente. Já no segundo caso pode-se utilizar uma câmara dividida em compartimentos dotados de lâmpadas que produzam, separadamente, padrões de emissão D65 e ID65. Estes padrões de emissão fornecem energia para os produtos testados de forma similar ao que estariam sujeitos a exposição pela luz do dia e da luz indireta de interiores. As diretrizes da ICH recomendam uma exposição total não inferior a 200 W/hm^2 na faixa de UV (320-400nm) e 1,2 milhões lux/h na faixa visível (400-800nm). (ICH, 1996; BAERTSCHI, 2010).

3.3 MÉTODOS INDICATIVOS DE ESTABILIDADE (MIE)

Com o advento das diretrizes da *International Conference on Harmonization* (ICH), a exigência do estabelecimento do método indicativo de estabilidade tornou-se clara e exigida e como essas diretrizes refletem as tendências atuais de inspeção de produtos farmacêuticos, elas carregam a força de regulação. Por isso, essas diretrizes foram incorporadas como lei na União Europeia, no Japão e nos Estados Unidos, mas na realidade além desses, outros países também as utilizam (ICH, 1993).

Por definição, os métodos indicativos de estabilidade podem ser entendidos como ensaios empregados na indústria farmacêutica com a finalidade de analisar amostras providas de estudos de estabilidade e têm como características a capacidade de realizar a separação, detecção e quantificação do insumo farmacêutico ativo na presença de seus produtos de degradação, mesmo que estes estejam em baixas concentrações. O MIE deve também apresentar seletividade, bem como prover informações estruturais e de rotas de degradação desses subprodutos que podem surgir durante o período de armazenamento (BAKSHI, 2002; FUCINA, 2012).

O desenvolvimento de um MIE pode se mostrar desafiador pela possibilidade da complexidade de amostras obtidas de degradação forçada, estudo necessário para montagem do MIE. A escolha do sistema de eluição, bem como de fases estacionárias a serem utilizadas pode não ser algo tão simples, já que sempre é possível serem detectados produtos de degradação até então desconhecidos. Por isso, é importante conhecer profundamente todas informações inerentes as propriedades físico-químicas do fármaco de interesse, como pKa, log P e solubilidade em diferentes solventes e meios utilizados em estudos de degradação forçada (SINGH, 2003).

Outras questões são geradas quando pensamos em amostras contendo altas concentrações de ácido, base e agentes oxidantes. Uma alternativa interessante têm sido a diluição das amostras para que se obtenha concentrações dentro de uma faixa aceitável. Para as amostras de degradação ácida e básica, a ação mais coerente parece ser a utilização agentes neutralizantes. No entanto, esta medida traz consigo algumas limitações como por exemplo a dificuldade de se obter concentrações equimolares desses agentes, além de haver uma recorrente precipitação de sais formados durante o processo de neutralização, principalmente em amostras com grandes quantidades de agente degradante (NGWA, 2010).

Além disso, ao considerarmos questões como tempo de uso de equipamento, gasto com solventes e eficiência na obtenção de resultados, é sempre interessante que a metodologia analítica proposta atenda todas as necessidades para as quais foram projetadas. Porém, quando se pensa em um MIE admite-se trabalhar com mais de uma metodologia. A depender do grau de degradação das amostras utilizadas na montagem desses métodos, há sempre a possibilidade de haver produtos de degradação estruturalmente correlacionados com o fármaco em estudo. Tal fato pode levar a um comportamento de eluição semelhante entre os diferentes analitos presentes na amostra e acabar gerando cromatogramas com pureza espectral inadequada, se estivermos trabalhando com métodos de detecção por UV, o que compromete o poder de análise de metodologias propostas. (PATEL RIDDHIBEN, 2011; RAO et al., 2015).

Para avaliar a qualidade de um MIE, muitos pesquisadores recorrem a investigação do balanço de massas em amostras degradadas. Esta avaliação consiste na obtenção de um valor percentual através da soma da resposta analítica do fármaco e de seus produtos de degradação em comparação com o mesmo fármaco em uma amostra padrão. Quanto mais próximo a 100% do valor inicial, maior a capacidade do método

em quantificar o fármaco na presença de seus produtos de degradação, sempre se levando em conta a margem de erro analítico (DEVI, 2011).

Nos casos em que se observa perda substancial de massa, devem ser feitos esforços para contabilizar a massa que falta, como por exemplo a consideração de fatores de resposta pela formação de produtos de degradação não cromóforos, composto de alta retenção ou até mesmo voláteis. No entanto, a FDA reconhece que o balanço de massa pode não ser obtido em todos os casos e enfatiza a eficácia da investigação para determinar a especificidade do ensaio e as vias de degradação. Apesar de apresentar muitos desafios para o desenvolvimento de um MIE, estas dificuldades podem ser superadas quando existe um bom planejamento experimental dos estudos de degradação forçada, escolha adequada de técnicas analíticas e sistema de eluição das amostras (REDDY et al., 201; SINGH et al., 2013).

3.4 ESTUDOS DE DEGRADAÇÃO FORÇADA

Os estudos de degradação forçada, também conhecidos como teste de estresse, decomposição forçada ou degradação intencional têm sido bastante discutidos e mostrado-se uma importante ferramenta no ramo farmacêutico. Sucintamente, esta avaliação consiste em submeter um fármaco ou produto acabado a condições forçadas de degradação superiores às estabelecidas para os testes de estabilidade acelerada (ICH, 2003; BRASIL, 2015; SRIVASTAVA, KUMAR, 2017).

Assim, a degradação forçada nos fornece informações para aprimoramento da estabilidade de produtos farmacêuticos, uma vez que permite avaliar o comportamento de fármacos submetidos a diferentes condições de estresse. Além disso, nos fornecem subsídio para elucidação de rotas de degradação de fármacos, produtos de degradação e são necessários para o desenvolvimento e validação de metodologias analíticas, como o MIE. Todas essas informações são de grande importância para o planejamento e melhoria de formulações, auxiliando na seleção de excipientes, sal ou éster, refinamento de processos produtivos, além da produção de amostras para o desenvolvimento de indicadores analíticos de estabilidade (KLICK et al., 2005; MAHESWARAN, 2012).

A *Internacional Conference on Armonization* (ICH), trouxe grandes avanços nos que diz respeito a normatização dos estudos de estabilidade e de degradação forçada. Embora essas avaliações não sejam abordagens novas na indústria farmacêutica, foi a

ICH que definiu as diretrizes para os testes de estresse (REYNOLDS, et al., 2002). O quadro 1 traz um resumo da evolução dos guias dos estudos de estabilidade sugeridos pela ICH ao longo do tempo:

Quadro 1. Diretrizes do ICH para a condução dos testes de degradação.

Guia	Abrangência	Ano
ICH Q1B	Testes de foto estabilidade de novos fármacos e produtos	1996
ICH Q1C	Teste de estabilidade para novas dosagens	1996
ICH Q1D	<i>Bracketing e Matrixing</i> designs para testes de estabilidade de novos medicamentos	2002
ICH Q1A (R2)	Testes de estabilidade de novos fármacos e medicamentos	2003
ICH Q3 A (R2)	Impurezas de novos fármacos	2006
ICH Q3B (R2)	Impurezas de novos medicamentos	2006

Fonte: adaptado de ICH, 2003.

Por outro lado, os requisitos de testes de estresse agora fazem parte do teste de estabilidade em nível global. Enquanto as diretrizes da ICH restringem os requisitos a novos medicamentos e produtos, a cobertura do teste de estresse em muitas outras diretrizes se estende a ativos e produtos já existentes (SINGH, 2003).

É muito importante saber quando realizar estudos de degradação forçada para o desenvolvimento de novos fármacos. A orientação da FDA determina que os testes de estresse devem ser realizados na fase III do processo de submissão regulatória. No entanto, o início do teste de estresse no início da fase pré-clínica ou fase I dos ensaios clínicos é altamente incentivado e deve ser conduzido com o fármaco para obter tempo suficiente para identificar produtos de degradação e elucidação da estrutura, bem como otimizar as condições de estresse (KATS, 2005).

No Brasil, a lei 6360 de 1976 introduziu pela primeira vez no país a ideia da necessidade da regulação da sanitária a que ficaria os medicamentos, insumos

farmacêuticos, correlatos, cosméticos, saneantes e outros produtos. Foi neste momento que se iniciou a discussão sobre pureza em medicamentos, que era entendida como o grau em que uma droga determinada contém outros materiais estranhos (BRASIL, 1976).

Por sua vez, a criação da ANVISA em 1999 e seu aprimoramento nos anos seguintes fez com que houvesse uma melhoria significativa nos padrões sanitários de produção de medicamentos nacionais. Cinco anos depois, foi publicada a Resolução RE nº 398 de 2004, Guia para a Realização de Estudos de Estabilidade, que trouxe pela primeira vez a recomendação de análise de produtos de degradação gerados em estudos de estabilidade. Um ano mais tarde, esta resolução foi revogada pela RE 01 de 2005, que trouxe entre outras recomendações, a necessidade de quantificação dos PDs e também a validação do método analítico correspondente, (PALMEIRA, 2003; BRASIL, 2004; BRASIL, 2005).

Já em 2013, a ANVISA publica a Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) 58 que tratava de regulamentação da notificação, identificação e qualificação de produtos de degradação em medicamentos. Este é considerado o primeiro documento oficial que traz os estudos de degradação forçada como requisitos necessários para fins de registro e renovação de registro de medicamentos no país, porém sem estabelecer nenhum prazo. Já em 2015, foi lançada a RDC 53, que da mesma forma, versa sobre os estudos de degradação e traz consigo prazos para as indústrias apresentarem os resultados destas avaliações e tem em vista a elaboração do perfil de degradação em medicamentos genéricos e similares com substâncias ativas sintéticas e semissintéticas (BRASIL, 2015).

Segundo esta resolução, as empresas fabricantes de medicamentos devem submeter o insumo farmacêutico ativo e o produto acabado às condições de estresse forçado por aquecimento, umidade, solução ácida, solução básica, solução oxidante, exposição fotolítica e íons metálicos, sempre que houver alterações na rota de síntese do insumo farmacêutico ativo e/ou mudanças qualitativas e quantitativas de excipientes na composição do produto acabado (BRASIL, 2015).

Além disso, são trazidos limites que determinam a necessidade de notificação, identificação e qualificação (avaliação de toxicidade) dos produtos de degradação gerados ao longo dos estudos de estabilidade. Esses limites são baseados na dose máxima diária do fármaco administrada por dia, tendo em conta o valor percentual dos

produtos de degradação administrados em relação a essa dose ou mesmo a administração total diária (ATD) de um produto de degradação, como descrito no quadro 2:

Quadro 2- Limites de notificação, identificação e qualificação do (s) produtos (s) de degradação no decorrer do estudo de estabilidade.

Tipos de Limites	Dose máxima diária	Limites
Limites de Notificação	$\leq$ g	0,1%
	>1g	0,05%
Limites de Identificação	<1mg	1,0% ou 5 μ g ATD, o que for menor
	1mg-10mg	0,5% ou 20 μ g ATD, o que for menor
	>10mg-2g	0,2% ou 2 mg ATD, o que for menor
	>2g	0,10%
Limites de Qualificação	>10 mg	1,0% ou 50 μ g ATD, o que for menor
	10mg-100mg	0,5% ou 200 μ g ATD, o que for menor
	>100 mg-2g	0,2% ou 3 mg ATD, o que for menor
	>2g	0,15%

Legenda: ATD= Administração total diária de um determinado produto de degradação.

Fonte: Adaptado de Brasil, 2015.

Embora sejam formalizados como requerimento regulamentar e uma necessidade científica, os guias oficiais fornecem orientações gerais e muito limitadas acerca da condução destes testes, o que leva a adoção de diferentes abordagens e consequentemente a obtenção de resultados variáveis. Muitas empresas desenvolvem políticas internas para os testes de degradação forçada, porém sem consenso sobre alguns aspectos (BLESSY et al., 2013; DE VIJLDER, 2018).

Alsante et al. (2003), realizou um estudo de *benchmarking* onde foi possível identificar uma diversidade significativa de avaliações entre as diferentes indústrias farmacêuticas analisadas. Os colaboradores dessas empresas reconhecem o papel crítico dos estudos de degradação forçada no processo de desenvolvimento de medicamentos,

mas a consideram como uma “ciência engenhosa” e reconhecem que seu desenvolvimento depende muito da experiência dos profissionais que conduzem esses estudos.

O grau de estresse necessário nos estudos de degradação forçada sempre despertou muitas discussões. A legislação brasileira recomenda uma degradação entre 10% e uma inferior àquela que levaria a total degradação do fármaco. No entanto, muitos autores consideram que uma degradação entre 5% e 20% mostra-se uma alternativa viável, principalmente para o desenvolvimento e validação de métodos cromatográficos. Por outro lado, admitem não ser necessário a degradação forçada resultar em um produto de degradação, caso o fármaco ou o medicamento tenham sido expostos as condições exigidas pela legislação. Nesta situação, ou em casos em que seja observada pouca degradação devido a uma grande estabilidade da molécula, deve ser feita uma avaliação crítica para verificar se esta foi exposta a uma energia superior a que estaria submetida nos estudos de estabilidade acelerada. Em caso afirmativo, os estudos podem ser interrompidos e uma nota de estabilidade para o fármaco pode ser feita (NGWA, 2010; BLESSY, 2014).

Além disso, o estresse excessivo de um determinado fármaco pode levar à geração de produtos de degradação secundários, podendo não representar de fato o que acontece nas condições normais de armazenamento ou em um estudo de estabilidade de longa duração (BLESSY, 2014). Outro aspecto prático dos testes de degradação forçada que geram algumas dúvidas em muitos profissionais diz respeito a respeito melhor maneira de preparar as amostras. Para fármacos ou matrizes de medicamentos que se apresentam pouco solúveis, recomenda-se a utilização de co-solventes ou ciclodextrinas para ajudar no processo de solubilização (ALSSANTE t al., 2003). No entanto, o uso de ciclodextrinas pode levar a interações com a molécula e proteger porções potencialmente reativas, evitando que reações de degradação ocorram. Ao passo que o uso de co-solventes pode além de afetar os mecanismos de degradação, induzir a geração de produtos como ésteres etílicos (KLICK, 2004).

Todas essas limitações acerca do delineamento dos estudos de degradação forçada podem ser explicadas pela grande variabilidade dos diferentes fármacos em suas propriedades físico-químicas, o que reflete na suscetibilidade às condições de estresse e os fazem ter diferentes vias de degradação e grandes diferenças em suas taxas de decaimento. Tais fatos levam uma dificuldade na tomada de decisões sobre as condições

de estresse a serem utilizadas, principalmente quando se trata de novos medicamentos (SARANJIT, SINGH, 2000).

3.4.1 Condições de degradação

4.4.1.1 Hidrólise ácida e básica

As reações de hidrólise compreendem um conjunto de reações de decomposição de um composto químico e têm como solvente a água. Por sua vez, a utilização de um catalizador ácido ou básico promove uma aceleração do ataque a grupos funcionais ionizáveis presentes na molécula gerando modificações estruturais (BLESSY et al., 2013).

Muitos autores consideram que o uso de hidróxidos de sódio e potássio, para catálise básica, e ácidos clorídrico ou sulfúrico, para catálise ácida, representa uma boa alternativa para este tipo de estudo (BLESSY et al., 2013). Em relação a concentração molar desses agentes que deve ser utilizada, observa-se que uma faixa entre 0,1 e 1 M tem atendido bem as necessidades de investigação de susceptibilidade dos fármacos a estas condições de estresse (HASAN et al. 2016; HASIN, 2017). No entanto, muitos autores também relatam o uso de maiores concentrações em seus estudos, o que demonstra que a seleção da concentração de ácido e base a serem utilizadas depende bastante da estabilidade deste fármaco a estas condições de estresse (STOILJKOVIĆ et al., 2014; NAAZNEEN, A. SRIDEVI, 2017).

Esta avaliação deve ter início em temperatura ambiente e caso não haja degradação adequada, pode-se recorrer ao aquecimento (SHARMA, MURUGESAN, 2017), porém não existe um consenso de qual temperatura deve ser usada. Algumas abordagens recomendam valores entre 50-70°C (BLESSY et al., 2013), no entanto é possível encontrar metodologias que trazem valores acima de 70° C (ALSANTE et al., 2003; HASSIB, 2017).

3.4.1.2 Oxidação

O peróxido de hidrogênio é amplamente utilizado em estudos de degradação forçada, principalmente por se apresentar pronto para uso e ter baixo custo. No entanto,

outros agentes oxidantes como íons metálicos, oxigênio e o indicador de radical azobisisobutironitrila (AIBN) também podem ser utilizados. O uso de peróxido de hidrogênio entre 0,1-3% (v/v) em pH neutro e temperatura ambiente pode ser considerado adequado para obtenção de produtos de degradação (ALSANTE et al., 2003; BASNIWAL, 2013).

Porém, diferentemente do que é posto para os testes de hidrólise, o uso combinado de peróxido de hidrogênio e aquecimento não é recomendado. Quimicamente o peróxido de hidrogênio é representado por H-O-O-H, no qual os ligantes O-O apresentam baixa estabilidade e o aumento da temperatura acelera o seu processo de decomposição. Tal processo resulta em radicais hidroxila, o que levaria a uma hidrólise básica e não em uma oxidação (SHARMA, MURUGESAN, 2017).

De um modo geral, a degradação oxidativa do fármaco envolve um mecanismo de transferência de elétrons para formar ânions e cátions reativos. Aminas, sulfetos e fenóis são suscetíveis à oxidação por transferência de elétrons para fornecer N-óxidos, hidroxilamina, sulfonas e sulfóxido. Os grupos funcionais com hidrogênio lábil como o carbono benzílico, o carbono alílico e o carbono terciário ou as posições α em relação a heteroátomos são suscetíveis à oxidação para formar hidroperóxidos, hidróxido ou cetona (BOCCARDI, 2015).

3.4.1.3 Fotodegradação

Para os estudos de fotólise em degradação forçada, recomenda-se uma exposição igual ou até três vezes superior àquela recomendada pelo ICH, como descrito na seção 4.2. As amostras podem se apresentar na forma sólida, solução ou até mesmo em suspensão, sempre se tomando o cuidado de que esteja totalmente exposta (ICH, 1996).

Na ausência de instrumento especificado, a luz natural pode ser usada, muito embora a distribuição espectral, bem como a intensidade varia ao longo do dia, de acordo com as condições climáticas e poluição atmosférica, o que torna a luz natural não adequada para testes com finalidade regulatória (SCYPINSKI, 2001).

Fármacos que apresentam em suas estruturas grupos funcionais como carbonilas, nitroaromático, N-óxido, cloretos de alqueno arilo, ligações fracas C – H, sulfetos e polienos são susceptíveis de introduzir fotossensibilidade a drogas e envolvem diferentes tipos de reação, como por exemplo isomerização, oxidação, redução,

descloração e fragmentação e envolvem mecanismos complexos nem sempre muito claros (SCYPINSKI, 2001; TONNESEN, H. H., 2004; AHMAD, I. et al., 2016).

3.4.1.4 Degradação por aquecimento

Para o estresse térmico, alguns autores recomendam a exposição do fármaco no estado sólido ao calor seco ou úmido, elevando a temperatura numa gradação de 10°C em relação a temperatura usada nos testes de estabilidade acelerada (MAHESWARAN, 2012; SINGH et al., 2013). No entanto, existe a possibilidade de se começar o teste com condições mais extremas, como por exemplo 80°C ou temperaturas ainda mais altas e testar em períodos mais curtos (2, 5, 8, 24 h), de modo que a taxa de degradação possa ser avaliada (BANKER, RHODES, 2002).

3.5 TÉCNICAS ANALÍTICAS UTILIZADAS NOS ESTUDO DE DEGRADAÇÃO FORÇADA

Devido à necessidade própria dos estudos de estabilidade em requerer a separação de múltiplos componentes, os métodos cromatográficos são preferidos neste tipo de análise. Além disso, têm apresentado precisão e sensibilidade adequadas, mesmo para pequenas quantidades de um dado analito (BAKSHI, SINGH, 2002).

Dentre as técnicas cromatográficas disponíveis, a cromatografia líquida apresenta, de um modo geral, grande possibilidade de aplicações quantitativas e qualitativas. Além disso, os cromatógrafos a líquido permitem o uso de diferentes sistemas de detecção, como UV, detectores de massas (MS) e até mesmo os de ressonância magnética nuclear (MRN) e também permitem o isolamento de produtos de degradação através de sistema preparativos. Tais características fazem desta técnica uma importante ferramenta para montagem de métodos analíticos de quantificação e caracterização de produtos de degradação e para atendimento das atuais exigências regulatórias. (REYNOLDS, et al., 2002, SIDDIQUI, 2017).

A utilização de detectores de EM (espectrometria de massas), RMN (ressonância magnética nuclear) de H e C, IR (índice de refração) se apresentam como uma alternativa interessante nos casos em que há problemas de balanço de massas devido à natureza não absorvente de alguns compostos e de seus produtos de degradação. Porém,

além de serem técnicas relativamente mais caras, existe restrições de uso como por exemplo a impossibilidade de se utilizar sistemas de eluição no modo gradiente com detectores de IR ou o uso de tampões não voláteis em detectores de massas. Isso demonstra que nenhuma técnica está livre de apresentar limitações e não são universalmente aplicáveis (ERMER, 1998; BAKSHI, SINGH, 2002).

Em relação a caracterização dos produtos de degradação, a abordagem mais utilizada consiste no isolamento e determinação de suas estruturas através de análises espectroscópicas e elementar com o auxílio de diversas técnicas. Porém, este é um trabalho que demanda muito esforço e até mesmo paciência, principalmente quando há a presença de muitos produtos de degradação na amostra (BAKSHI, SINGH, 2002;; THUMMAR, 2018).

Assim, segue-se uma tendência de utilizar a técnica de cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS), o que permite a obtenção de informações como peso molecular, fórmulas químicas, abundância isotópica, além do perfil de fragmentação de diversos compostos (NARAYANAM, SINGH, 2014). Em complemento, o sistema LC-RMN fornece dados que podem gerar informações estruturais a nível atômico na determinação de isômeros e epímeros (PELLECCHIA et al., 2008; NARAYANAMA et al., 2015). Essa abordagem conjunta tem fornecido uma identificação rápida e inequívoca de vários produtos de degradação em um curto intervalo de tempo.

3.5.1 Espectrometria de massas por tempo de voo (EM-TOF)

Do ponto de vista conceitual, no ramo da espectrometria de massas o analisador por tempo de voo (TOF) é um dos mais simples. Basicamente, o TOF separa os íons pela diferença de velocidade que desenvolvem no vácuo. Como ponto de partida, os íons são gerados na fonte de ionização e aqueles com a mesma carga recebem a mesma energia cinética, no entanto os íons que apresentam razão massa/carga menor (m/z) descrevem mais rapidamente a sua trajetória até o sistema de detecção. Assim, a relação massa/carga (m/z) de um íon pode ser deduzida a partir do seu tempo de voo através de um tubo de comprimento especificado que está sob vácuo. (STAFFORD et al., 1984).

Analisadores de massa TOF eram bem populares no advento da espectrometria de massas, no entanto não mostrou-se compatível com os métodos de ionização da

época, pois não geravam um pulso de íons bem definido. Avanços na área de computadores e o desenvolvimento de técnicas de ionização pulsada como MALDI e ESI, levaram a um incremento das possibilidades analíticas dessa técnica (GLISH, VACHET, 2003). Além disso, o desempenho de seus analisadores de massas melhorou consideravelmente, em particular em termos de resolução e precisão de massa, sendo possível se obter precisões em massa na faixa de partes por milhão (ppm) (PETROVIC et al., 2006).

Assim, nos últimos anos TOF-MS vem se tornando uma importante ferramenta analítica e traz consigo diversas possibilidades de aplicação, tais como estudos de proteômica, lipidômica, caracterização fitoquímica, análise ambiental, metabolismo de fármacos, identificação e quantificação de produtos farmacêuticos e seus produtos de degradação (CHASSAIGNE et al., 2007; RAINVILLE et al., 2007; DENG et al., 2013). A principal vantagem de TOF/MS é a possibilidade de se obter uma análise completa de varredura de massas ao longo de cada cromatograma gerado. Além disso, o alto poder de resolução da técnica permite a precisão da medição em massa para moléculas pequenas, identificação do estado de carga de íons de carga múltipla e maior diferenciação de espécies isobáricas (dois compostos diferentes com a mesma massa, mas diferentes composições elementares e, portanto, diferentes massas exatas (FERRER et al., 2003, PETROVIC et al., 2006).

Geralmente, medições precisas de massa para um dado analito envolvem uma correção pontual da calibração, de forma a compensar a ligeira variação da calibração devido às oscilações de temperatura no tubo de voo do equipamento e as instabilidades das fontes de alimentação, através do uso de compostos de referência com massas conhecidas. Em princípio, se massas podem ser medidas com precisão suficiente, é possível atribuir composições elementares exclusivas a picos observados durante a realização de uma análise (FERRER et al., 2003).

Ferrer et al. (2003), destaca três características essenciais para fazer do instrumento TOF/MS uma ferramenta poderosa para identificar compostos desconhecidos, mesmo em matrizes complexas. A primeira seria pela possibilidade de coletar dados em uma ampla faixa de massas, sem que, no entanto, haja diminuição da sensibilidade, de modo que sensibilidade espectral total é alcançada; em segundo lugar, pela possibilidade de resolver interferências de sinais de interesse com alto poder de

resolução; e por fim pela possibilidade de obtenção de precisão adequada na medição de massa para a estimativa de composição.

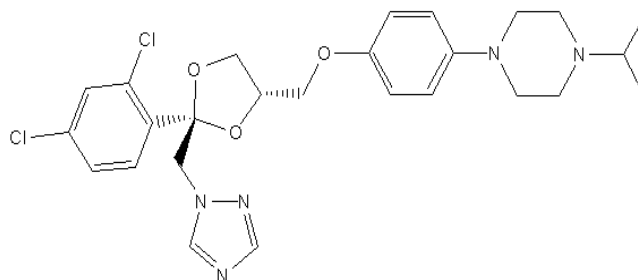
Assim, ao compararmos a Q-TOF-MS a outras técnicas de espectrometria de massas, pode-se dizer que ela apresenta uma vantagem distinta da sua seletividade devido à informação obtida da massa exata medições de íons de produto. Uma vantagem adicional está na possibilidade de se obter muitos espectros MS2 em uma única injeção. Outras características de seus métodos, como faixa linear e repetibilidade mostram-se bem satisfatórios, podendo-se se obter limites inferiores de quantificação de 1 ng/mL, o que pode ser considerado totalmente satisfatório para efeitos confirmatórios de produtos farmacêuticos em baixas concentrações (MILMAN, 2005; STOLKER, BRIKMAN, 2005).

Da mesma forma, é possível obter o perfil de fragmentação de moléculas precursoras e de se obter a massa precisa dos íons produto, de modo que cada fragmento pode receber uma fórmula empírica que são úteis para identificação de fragmentos iônicos. Tais características fazem da técnica uma importante ferramenta nos estudos de identificação e caracterização de produtos de degradação e metabólitos de fármacos (2004).

3.6 TERCONAZOL

O TCZ é um fármaco com ação antifúngica pertencente a classe dos triazóis de amplo espectro. Foi desenvolvido pela Janssen Pharmaceutica em 1983 com intenção de se obter um medicamento com atuação tópica aprimorada contra infecções fúngicas superficiais e representa o primeiro medicamento deste grupo comercializado para uso humano (HEERES; HENDRICKX; VAN CUTSEM, 1983. MAERTENS, 2004).

A denominação química do TCZ pela IUPAC é 1-[4-[[[(2R,4S)-2-(2,4-Diclorofenil)-2-(1H-1,2,4triazol-1-ilmetil)-1,3-dioxolan-4-il]metoxi]fenil]-4-(1metiletil)-piperazina (HEERES, 1983). Seu peso molecular é de 532,466 g/mol, com fórmula molecular dada por $C_{26}H_{31}Cl_2N_5O_3$ e massa monoisotópica de 531,18 g/mol. É caracterizado como um sólido branco, pouco solúvel em água. Conforme o sistema de classificação biofarmacêutico é considerado um fármaco de classe II (Baixa solubilidade e alta permeabilidade). A figura 1 traz a estrutura química do TCZ.

Figura 1- Estrutura química do fármaco terconazol.

Fonte: Autoria própria a partir do software ChenDraw Ultra.

As suas características físico-químicas e seus valores quantitativos estão presentes na Tabela 2 (RIZK et al., 2014; PUBCHEM, 2017).

Tabela 2.Características físico-químicas do TCZ.

Características físico-químicas	Valores correspondentes
Log de P a 25 ° C	4,8
Solubilidade	0,0116 g/L
Faixa de fusão	126,3
pKa	8,41

Fonte: autoria própria baseado nos dados disponíveis em Pubchen e Drug bank.

No Brasil, o TCZ está disponível comercialmente sob as formas farmacêuticas de creme vaginal 0,8% e óvulos 80 mg. Desde sua descoberta até então tem apresentado grande eficácia em regimes de tratamento de curto prazo da candidíase vulvovaginal, além de promover altas taxas de cura nos exames clínicos e micológicos, apresentando baixas taxas de reincidência quando comparado a outras drogas antifúngicas do grupo imidazol, particularmente em casos resistentes a outros medicamentos (RINGDAHL, 2000; RIZK et al., 2014).

Suas características de baixa permeabilidade têm limitado seus usos clínicos, embora alguns estudos estejam sendo feitos para superar esta limitação (ELNAGGAR et al., 2016). Abdelbary et al. (2016), obtiveram resultados promissores no tratamento de infecções fúngicas oculares através de estudo *in vivo* utilizando sistemas lipossomais

de entrega do TCZ. Os resultados obtidos demonstraram a não irritabilidade da formulação desenvolvida, que se apresentou segura para o uso tópico ocular.

Abd-Elsalam et al. (2018), desenvolveram um sistema micelar polimérico do TCZ que apresentou aumento da quantidade de fármaco retida na pele que foi avaliada através de estudos utilizando a pele dorsal de ratos. A análise de irritabilidade demonstrou resultados positivos, sendo a formulação considerada de natureza não irritante. Da mesma forma, Elnaggar et al. (2016) desenvolveram um sistema de nanogel e através de estudos de permeação *ex vivo* e *in vivo* foi possível demonstrar um incremento de permeação e altas índices de erradicação de *Candida* da pele. Tais resultados demonstram o alto potencial deste fármaco para o tratamento de infecções fúngicas e que há demanda de novos estudos nessa área.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 INSUMO

O TCZ, sob a forma de matéria prima com lote tr-16E31-M foi doado pela indústria farmacêutica HEBRON®, com pureza igual a 98,5% segundo laudo analítico emitido pela empresa fornecedora Lee Pharma ltda.

4.2 REAGENTES

A água ultrapura foi obtida pelo sistema de purificação de água da Elga Purelab Ultra da Elga Labwater (Lane End, Reino Unido) e os demais reagentes encontram-se na tabela a 3:

Tabela 3. Lista de reagentes utilizados.

Reagentes	Fabricante	Lote
Acetato de amônio	Vetec	70826
Ácido clorídrico	Vetec	40082
Hidróxido de amônio	J.T. Baker	J08026
Hidróxido de sódio	ISO FAR	132048
Metanol	J.T. Baker	PE173666
Peróxido de hidrogênio	Alphatec	24192
TuneMix®	Agilente	Lc13956

Fonte: autoria própria.

4.3 EQUIPAMENTOS

Os equipamentos utilizados foram todos calibrados e são descritos na tabela 4:

Tabela 4. Lista de equipamentos utilizados.

Equipamento	Marca	Modelo
Espectrômetro de massas QTOF	Bruker	Impact II
Estufa de secagem	Fanem	315 SE
pHmetro	Gehaka	PG1800
Banho ultrassônico	Unique	1400
Chapa magnética aquecedora	Fistan	----
UPLC	Shimadzu	NexeraX2
Agitador tipo Vórtex	Phoenix	AP56

Fonte: autoria própria.

4.4 MÉTODO INDICATIVO DE ESTABILIDADE (MIE)

As amostras providas dos estudos de degradação forçada foram analisadas por CLAE-DAD e os dados tratados pelo software Shimadzu LC solutions 1.0[®]. Como fase estacionária, foram testadas as colunas Kinetex C18 de 100 x 2.1 (Phenomenex, Torrance, USA), SunFire C18 de 50 x 2.1 mm (Waters, Massachusetts, EUA) e a coluna Gemini NX de 150 x 4,6 (Phenomenex, Torrance, USA). Para o sistema de eluição, foram testadas diferentes combinações de solventes a serem utilizados como fase móvel, levando em consideração as propriedades físico-químicas do fármaco em questão. O fluxo de fase móvel e o volume de injeção foram fixados em 1 mL.min⁻¹ e 20 µL, respectivamente. Já para o forno foi utilizado em temperatura ambiente.

4.4.1 Fase móvel

As fases móveis testadas foram constituídas pela combinação da fase orgânica metanol (B) com água (A); e metanol com acetato de amônio 5 mMol (A); em diferentes modos de eluição. Os sistemas de eluição avaliados são descritos na tabela 5.

O acetato de amônio 5 mMol foi preparado pesando-se 0,1925 g do sal e posteriormente dissolvidos com água ultrapura em balão de 0,5 L. Esta solução

preparada teve seu pH corrigido com hidróxido de amônio para um valor de aproximadamente $8 \pm 0,5$ e por fim foi filtrada em membrana $0,45 \mu\text{m}$ (millex®).

Tabela 5. Modos de eluição utilizados na fase de desenvolvimento do MIE.

Modo de eluição	Eluente A (%)	Eluente B (%)	Tempo em minutos
Isocrático 1	50	50	0-20
Isocrático 2	25	75	0-20
Gradiente	100	0	0--15
	100--30	0-70	15--35
	30--100	70--0	35--40

Fonte: autoria própria.

4.5 ESTUDO PRELIMINAR DE DEGRADAÇÃO FORÇADA

Para avaliar a susceptibilidade do TCZ frente às diferentes condições de estresse, foi realizado um estudo preliminar submetendo a matéria prima à degradação em meio ácido, básico, oxidativo, térmico e fotolítico. Este estudo teve o objetivo de acompanhar o teor final do fármaco e geração de possíveis produtos de degradação.

4.5.1 Preparo do padrão

A solução padrão foi preparada pesando-se 10 mg de TCZ, que foram transferidos para tubo de vidro e dissolvidas com 10 mL de metanol. A solução de 1 mg.mL^{-1} foi submetida a degaseificação por 5 minutos. Em seguida, foram pipetados 1 mL desta solução e diluídos com 9 mL de metanol, obtendo-se uma solução de $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$. As alíquotas das soluções foram retiradas com seringas e filtradas através das unidades filtrantes CROMAFIL® Xtra PVDF-45/25, com tamanho de poro de $0,45 \mu\text{m}$, e acondicionadas em vials para posterior análise cromatográfica.

4.5.2 Preparo das amostras

4.5.2.1 Degradação hidrolítica ácida

As amostras de TCZ para hidrólise ácida foram preparadas pesando-se em triplicata 10 mg de TCZ, que foram transferidos para tubo de vidro e dissolvidas com 10 mL de metanol. A solução de 1 mg.mL^{-1} foi submetida a desgaseificação por 5 minutos. Em seguida, foi pipetado 1 mL desta solução que foi diluída com 9 mL de ácido clorídrico 0,4 e 2 M, obtendo-se duas soluções de $100 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$. Alíquotas dessas amostras foram coletadas em 24, 48, 72, 96, 120 e 168 horas. As soluções foram retiradas com seringas e filtradas através das unidades filtrantes CROMAFIL® Xtra PVDF-45/25, com tamanho de poro de $0,45 \text{ } \mu\text{m}$, e acondicionadas em vials para posterior análise cromatográfica.

4.5.2.2 Degradação hidrolítica básica

As amostras de TCZ para hidrólise básica foram preparadas pesando-se em triplicata 10 mg de TCZ, que foram transferidos para tubo de vidro e dissolvidas com 10 mL de metanol. A solução de 1 mg.mL^{-1} foi submetida a desgaseificação por 5 minutos. Em seguida, foi pipetado 1 mL desta solução que foi diluída com 9 mL de solução de hidróxido de sódio 0,4 e 2 M, obtendo-se duas soluções de $100 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$. Alíquotas dessas amostras foram coletadas em 24, 48, 72, 96, 120 e 168 horas. As soluções foram retiradas com seringas e filtradas através das unidades filtrantes CROMAFIL® Xtra PVDF-45/25, com tamanho de poro de $0,45 \text{ } \mu\text{m}$, e acondicionadas em vials para posterior análise cromatográfica.

4.5.2.3 Degradação oxidativas

As amostras de degradação oxidativas foram preparadas pesando-se em triplicata 10 mg de TCZ, que foram transferidos para tubo de vidro e dissolvidas com 10 mL de metanol. A solução de 1 mg.mL^{-1} foi submetida a desgaseificação por 5 minutos. Em seguida, foi pipetado 1 mL desta solução, onde foi adicionada 0,3 e 0,6 mL de peróxido de hidrogênio para obtenção de soluções oxidativas a 1,5 e a 3%, respectivamente. Antes de analisadas, as amostras foram diluídas com metanol q.s.p. 10 mL, obtendo-se uma solução de $100 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$ de TCZ. Alíquotas foram coletadas em 24, 48 e 72 horas e

posteriormente filtradas através das unidades filtrantes CROMAFIL® Xtra PVDF-45/25, com tamanho de poro de 0,45 μm , acondicionadas em vials e aquecidas brandamente para eliminação do excesso de peróxido, antes de análise cromatográfica.

4.5.2.4 Degradação fotolítica

As amostras do fármaco submetidas à exposição fotolítica no seu estado sólido foram preparadas pesando-se 50 mg de TCZ que foi tamizado em malha 60 Mesh para obtenção de uma camada de pó fino e homogêneo em placa de Petri. Já as amostras em solução foram preparadas pesando-se 10 mg de TCZ, que foram transferidos para tubo de vidro e dissolvidas com 10 mL de metanol. A solução de 1 mg.mL^{-1} foi submetida a degaseificação por 5 minutos. Em seguida, 1 mL desta solução foi pipetado e diluído com 9 mL de metanol, obtendo-se uma solução de 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Tanto as amostras de TCZ no estado sólido, quanto as amostras em solução foram acondicionadas em câmara de fotoestabilidade de acordo com a opção 2 do guia Q1B do ICH (ICH, 1996). Após exposição, as amostras no estado sólido foram pesadas em triplicata e procedeu-se como descrito para o preparo de amostras de TCZ submetidas a exposição fotolítica no estado líquido. Posteriormente, alíquotas das soluções foram retiradas com seringas e filtradas através das unidades filtrantes CROMAFIL® Xtra PVDF-45/25, com tamanho de poro de 0,45 μm , e acondicionadas em vials para posterior análise cromatográfica.

4.5.2.5 Degradação térmica

Inicialmente, 50 mg de TCZ foi tamizado em malha 60 para obtenção de uma camada de pó fino e homogêneo em placa de Petri que foi levada à estufa com temperatura controlada a 90 °C por 120 horas. Posteriormente, 10 mg foram pesados em triplicata, transferidos para tubos de vidro de 10 mL e diluídos com 10 mL de metanol. A solução de TCZ 1 mg.mL^{-1} foi submetida a degaseificação por 5 minutos. Em seguida, foi pipetado 1 mL desta solução que foi diluída com 9 mL de metanol, obtendo-se uma solução de 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. As soluções foram retiradas com seringas e filtradas através das unidades filtrantes CROMAFIL® Xtra PVDF-45/25, com tamanho de poro de 0,45 μm , e acondicionadas em vials para posterior análise cromatográfica.

4.5.2.6 Degradação por umidade

Para este teste, 50 mg de TCZ foi tamizado em malha 60 para obtenção de uma camada de pó fino e homogêneo em placa de Petri. O ambiente com umidade controlada de 90 % UR foi obtido utilizando dessecador com solução de ácido sulfúrico 2 M. O dessecador foi vedado e mantido à temperatura ambiente e a umidade relativa no seu interior medida com o auxílio de um higrômetro, como descreve ESTULZER et al. (2006). As amostras foram submetidas à umidade relativa de 90% Posteriormente, 10 mg foram pesados em triplicata, transferidos para tubos de vidro de 10 mL e diluídos com 10 mL de metanol. A solução de TCZ 1 mg.mL^{-1} foi submetida a desgaseificação por 5 minutos. Em seguida, foi pipetado 1 mL desta solução que foi diluída com 9 mL de metanol, obtendo-se uma solução de $100 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$. As soluções foram retiradas com seringas e filtradas através das unidades filtrantes CROMAFIL® Xtra PVDF-45/25, com tamanho de poro de $0,45 \text{ }\mu\text{m}$, e acondicionadas em vials para posterior leitura cromatográfica.

4.6 ESTUDO DE CINÉTICA DE DEGRADAÇÃO

As cinéticas de degradação forçada foram realizadas apenas para as condições em que o TCZ mostrou-se susceptível ao decaimento. Dessa forma, essas avaliações foram realizadas para condições de degradação forçada por peróxido de hidrogênio e fotólise em solução.

Os tempos de coleta foram determinados levando em consideração a velocidade do processo de degradação que reflete diretamente a susceptibilidade do TCZ a tais condições. Assim, para condição oxidativa com o peróxido de hidrogênio, foram feitas análises nos tempos 0; 1; 2; 3; 4; 9; 24; 28; 32; 48; 52; 56 e 72 horas, já para degradação fotolítica em solução, as análises incluíram tempos de coleta de 0; 1; 2,5; 5; 10; 20; 30; 60; e 90 minutos.

As amostras foram preparadas de acordo com os procedimentos descritos nos itens 4.5.2.3 e 4.5.2.4 a fim de determinar a ordem de reação, a constante de velocidade de degradação (k) e os parâmetros cinéticos de meia-vida de degradação ($T_{1/2}$) e meia vida-útil ($T_{90\%}$) (SINKO, 2008).

Para definição da ordem de reação de degradação forçada foram construídos gráficos levando-se em consideração as variáveis de concentração *versus* tempo (ordem zero), logaritmo neperiano da concentração *versus* tempo (primeira ordem) e $1/\text{concentração}$ *versus* tempo (segunda ordem), para posterior análise do coeficiente de correlação (r). O modelo considerado mais adequado foi aquele que apresentou valor de r mais próximo de 1 (SINKO, 2008).

Após definição da ordem de reação, foi calculado o valor de k levando-se em consideração as expressões trazidas no quadro a seguir:

Quadro 3. Expressões matemáticas que definem as ordens de reação.

Ordem de reação	Expressão matemática
Ordem zero	$C = C_0 - k.t$
Primeira ordem	$\ln C = \ln C_0 - k.t$
Segunda ordem	$1/C = 1/C_0 + k.t$

Fonte: Adaptado de SINKO, 2008.

Após determinação do valor de k foram calculados os parâmetros cinéticos através das expressões trazidas no quadro abaixo:

Quadro 4. Expressões matemáticas que definem os parâmetros cinéticos das reações.

Ordem de reação	$T_{1/2}$	$T_{90\%}$
Ordem zero	$C_0/2k$	$(0,1 \times C_0) / k$
Primeira ordem	$0,693/k$	$0,16 / k$
Segunda ordem	$1 / C_0 \times k$	$1 / (9k \times C_0)$

Fonte: Adaptado de SINKO, 2008.

4.7 AVALIAÇÃO DE BALANÇO DE MASSAS

A avaliação de balanço de massas (BM) foi realizada para todos os tempos de análise descritos para o “O ESTUDO DE CINÉTICA DE DEGRADAÇÃO” através do acompanhamento de teor do TCZ e o aumento das áreas dos picos cromatográficos dos produtos de degradação através da seguinte equação:

$$BM = \frac{ATCZ\ D + APDs}{A\ P} \times 100$$

Onde BM representa o balanço de massas, ATCZ D a área média do TCZ remanescente nas amostras degradadas, APDs a área média dos produtos de degradação e AP área média das amostras padrão.

4.8 OTIMIZAÇÃO DA ESPECTROMETRIA DE MASSAS

4.8.1 Definição do modo de ionização e perfil de fragmentação

O modo de ionização por eletronebulização (ESI) do TCZ foi testado nas polaridades positiva e negativa no espectrômetro de massas Q-TOF, através de infusão direta. Foi utilizado um sistema de bomba de infusão acoplada a seringa com fluxo constante de 20 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$. O modo de varredura foi executado programando uma janela de análise entre 50 m/z e 700/ z , utilizando energia capilar de 3500 eV, nitrogênio como gás de secagem em uma vazão de 3 L/h e temperatura da fonte de 150°C. Para fragmentação do TCZ foi utilizada uma energia de colisão de 35 eV. A calibração da fonte foi realizada com a solução calibrante TUNEMIX®.

4.8.2 Otimização dos parâmetros da fonte e acoplamento LC-MS

As condições da fonte foram otimizadas de acordo com recomendações do fabricante, tendo em vista o fluxo de fase móvel utilizado. Foram ajustadas a temperatura da fonte, vazão do gás de secagem, voltagem capilar e voltagem da *EndPlate Offset*. O acoplamento LC-MS foi feito pelo software HyStar®.

4.9 CARACTERIZAÇÃO DOS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS

As amostras de TCZ que tiveram a formação de produtos de degradação observada pelo método LC-DAD foram analisadas através de injeção pelo sistema LC-MS/TOF. Através dessa análise foram obtidas informações de seus perfis de massas com a finalidade de conseguir informações para subsidiar a elucidação estrutural desses produtos de degradação. Os dados foram obtidos através de uma análise espectral da média das massas que compuseram os sinais cromatográficos através do software DataAnalysis® e o perfil de fragmentação MS² do TCZ foi feita com o auxílio da ferramenta MetFrag (RUTTKIES et al., 2016).

5 RESULTADOS

5.1 DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO

5.1.1 Cromatografia-HPLC DAD

O desenvolvimento do método foi iniciado utilizando a coluna Kinetex C18 de 100 x 2.1 (Phenomenex, Torrance, USA) no modo de eluição isocrático H₂O:MeOH (50:50), onde foi observado o pico do TCZ com tempo de retenção (TR) de 2,5 minutos e quando o método especificado foi aplicado para as amostras de degradação fotolítica, não produziu uma separação adequada entre o TCZ e os PDs gerados. O mesmo método foi testado utilizando a coluna SunFire C18 de 50 x 2.1 mm (Waters, Massachusetts, EUA) mas não houve melhoria significativa na resolução entre os PDs anteriormente mencionados.

Na tentativa de aumentar a retenção do TCZ nas colunas C18, foi utilizado acetato de amônio 5 mMol com pH ajustado para $8 \pm 0,5$, como fase aquosa e metanol como modificador orgânico. Para isso foi testada a coluna Gemini NX de 150 x 4,6 (Phenomenex, Torrance, USA), que suporta maiores faixas de pH (2 - 12) e um modo de eluição isocrático (25:75). Os resultados demonstraram uma melhoria significativa na separação dos PDs gerados na fotólise, tendo o TCZ TR de 8,13 min.

Para esta mesma coluna e fase móvel também foi testado o gradiente de 0/15, 35/70, 0/40 (Tmin/% de MeOH), onde pôde-se observar o pico do TCZ com TR de 33,65 minutos, sem apresentar, no entanto, resolução superior à obtida pelo método isocrático anteriormente descrito, que foi selecionado para avaliação das amostras de degradação forçada e teve o fluxo de fase móvel e o volume de injeção fixados em 1 mL.min⁻¹ e 20 µL, respectivamente. Já o forno foi utilizado em temperatura ambiente e todas as amostras foram analisadas usando um detector de DAD e os cromatogramas foram extraídos a 220 nm. O mesmo método foi adequadamente transferido para o sistema LC-MS/TOF, otimizando todos os parâmetros discutido na seção 4.8.2.

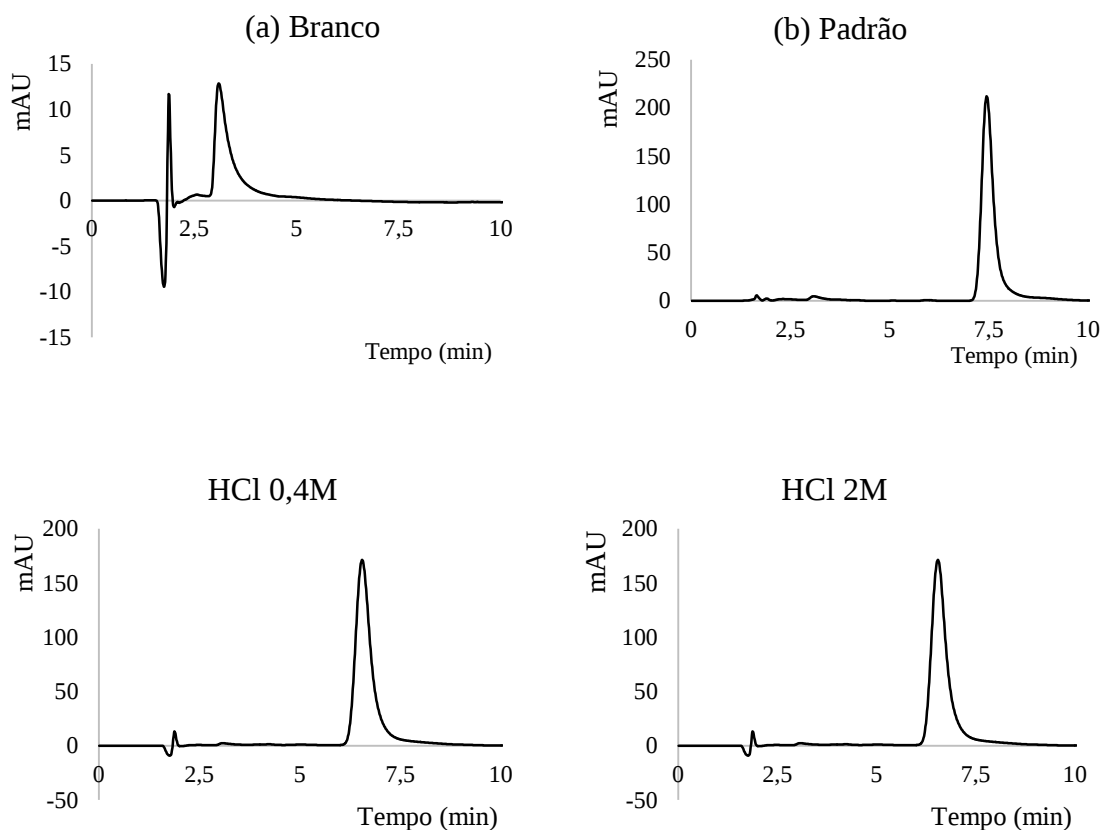
5.1.2 Degradação Forçada

Poucos são os estudos na literatura com o TCZ, principalmente aqueles relacionados estabilidade. Quando pensamos em método indicativo de estabilidade e avaliação de produtos de degradação, a busca nos bancos de dados PubMed, ScienceDirect e Google acadêmico utilizando a associação dos descritores de busca *terconazole and forced degradation; terconazole and stress testing; terconazole and stability indicating* resultaram em um único relato na literatura realizado por CHAVAN e colaboradores em 2018.

5.1.2.1 Hidrólise ácida e básica

O TCZ manteve-se estável, com decaimento médio de 0,25% (DPR= 0,64) e 0,27% (DPR= 0,26) nas amostras submetidas a HCl 0,4 M 2 M, respectivamente. Ao comparar os cromatogramas das amostras de branco, padrão e as submetidas a hidrólise ácida, trazidos na, foi possível observar que não houve formação de produtos de degradação para nenhuma das condições testadas. Isso pôde ser confirmado pelo resultado da pureza de pico igual a 1 para o sinal do TCZ em meio ácido, que apresentou tempo de retenção de 6,59 min, demonstrando que não houve coeluição de outros compostos na faixa de absorbância de 190 a 400 nm. A mudança no tempo de retenção do TCZ em meio ácido em relação a amostra padrão, que apresenta tempo de retenção igual a 7,49 min, pode estar relacionada ao pH da amostra (CANALS, 2001). A neutralização das amostras antes das análises representa uma boa alternativa para evitar tais mudanças, no entanto este procedimento resultou em cromatogramas com maiores variações nos tempos de retenção e formato de pico (NGWA, 2010).

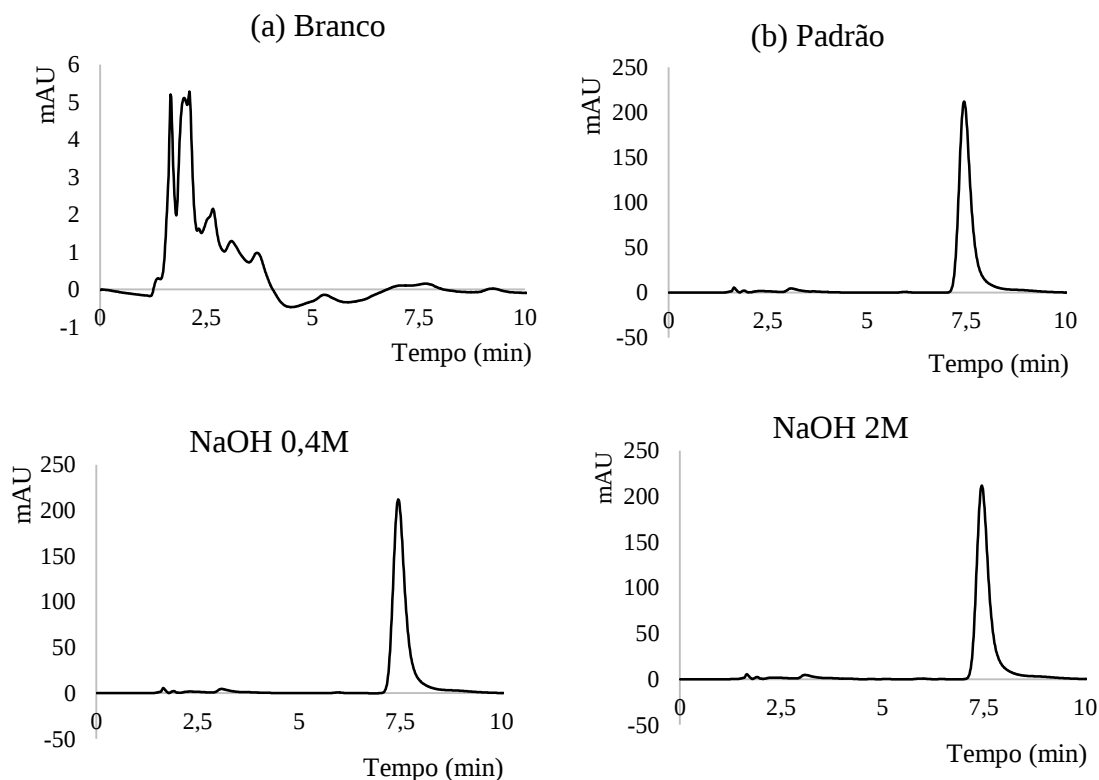
Figura 2. Cromatogramas de branco HCl (a), padrão TCZ (b), amostras de TCZ submetida a HCl 0,4 M (c) e amostras de TCZ submetida a HCl 2 M (d).



Fonte: Autoria própria.

Da mesma forma, as amostras de TCZ submetidas à hidrólise básica (NaOH) a 0,4 e 2 M durante 168 horas, mantiveram-se estáveis, com decaimento de 0,89 % (DPR= 0,39) e 0,60% (DPR= 0,52), respectivamente. Ao comparar os cromatogramas de branco, padrão e as submetidas à hidrólise básica, trazidos na figura 3, foi possível observar que não houve diminuição das áreas das amostras submetidas ao teste e nem a formação de produtos de degradação em ambas condições avaliadas. A análise de pureza de pico do TCZ com tempo de retenção de 7,49 min, apresentou valor igual a 1, o que evidencia a não coeluição de outros compostos na faixa de absorvância de 190 a 400 nm.

Figura 3. Cromatogramas de branco NaOH (a), padrão TCZ (b), amostras de TCZ submetida a NaOH 0,4 M (c) e amostras de TCZ submetida a NaOH 2 M (d).



Fonte: Autoria própria.

Estudos publicados com outros fármacos do grupo dos triazóis demonstram que a metodologia empregada pode influenciar nos resultados observados. Chavan et al. (2018) em seu estudo encontraram dois produtos de degradação gerados a partir do TCZ submetido à refluxo de HCl 1 M por 30 horas e com temperatura controlada a 80°C. Lotfy et al. (2014), em estudo de desenvolvimento de método indicativo de estabilidade para o fluconazol, relataram que não houve formação de produtos de degradação deste fármaco na presença de HCl e NaOH mantidos em contato por 72 horas em temperatura ambiente. Já Parikh et al. (2011), demonstraram a formação de produtos de degradação do itraconazol após exposição em HCl 1M por 2 horas e temperatura de 75°C. Tais resultados podem nos revelar a influência da temperatura nos ensaios de degradação forçada para triazóis em condições ácidas, o que pode ter refletido na ausência de degradação do TCZ para as condições empregadas neste trabalho.

5.1.2.2 Degradação oxidativa com peróxido de hidrogênio

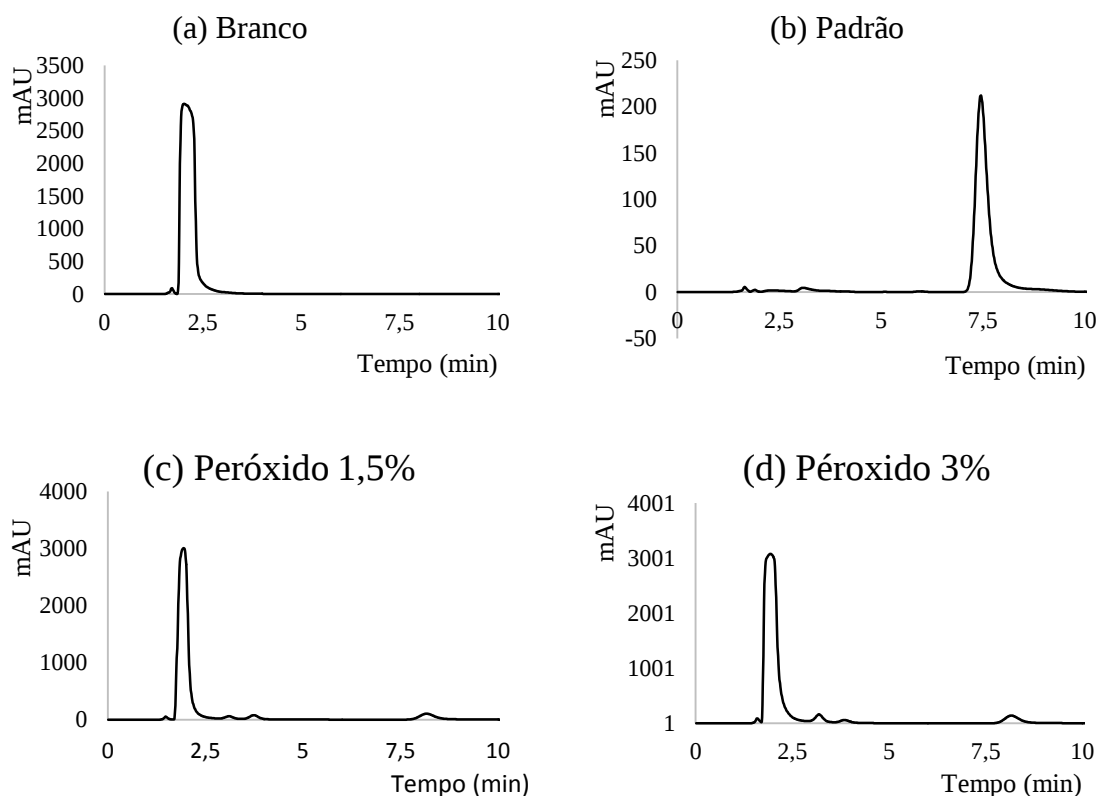
As amostras de TCZ submetidas à oxidação por peróxido 1,5 % e 3 % (v/v) evidenciaram decaimento de 39,43% (DPR= 0,609) e 42,29% (DPR= 3,52), respectivamente, com formação de produtos de degradação com tempo de retenção em 3,21 min (PD1) e 3,89 min (PD2), além do sinal que representa o pico do TCZ com tempo de retenção de 8,22 min. A pureza de pico para o TCZ foi de 1,0, demonstrando que não houve coeluição de outros compostos na faixa de absorbância de 190 a 400 nm. Esses resultados são trazidos na figura 4.

Tal resultado evidencia a capacidade do método em separar o TCZ de seus respectivos produtos de degradação originados da oxidação por peróxido de hidrogênio, embora não tenha sido possível eliminar o sinal do peróxido da análise. O aquecimento e a utilização de catalisadores representam uma opção para eliminação desse interferente, porém não é recomendado quando realizamos testes de degradação forçada, posto que tais alternativas podem gerar degradação da amostra em análise (ATIKINS, 2003; WASYLASCHUK et al., 2007).

Por sua vez, os resultados de estresse oxidativo do TCZ trazidos por Chavan et al. (2018) corroboram com os resultados apresentados neste trabalho, onde também foi possível evidenciar a alta reatividade do TCZ na presença de peróxido de hidrogênio. No trabalho do referido autor, os estudos foram realizados utilizando peróxido de hidrogênio 0,6% e temperatura ambiente e foram observados 4 produtos de degradação, embora não sejam apresentados cromatogramas para melhor visualização desses resultados. Diferenças metodológicas de preparo de amostra, além do diluente utilizado podem ter gerado essa divergência de resultados, o que demonstra a importância da padronização na condução dos testes de degradação forçada.

De modo geral, os fármacos pertencentes ao grupo dos triazóis apresentam grande susceptibilidade à oxidação por peróxido de hidrogênio nos testes de estresse. Isso se deve a presença de grupos químicos pertencentes à classe das piperazinas e de seus benzo análogos em suas estruturas (COMINS, JOSEPH, 1996; GARCIA, COSTA, MENDEZ, 2012).

Figura 4. Cromatogramas de branco peróxido (a), padrão TCZ (b), amostras de TCZ submetida a H_2O_2 1,5% (v/v) (c) e amostras de TCZ submetida a H_2O_2 3% (v/v) (d).



Fonte: autoria própria.

5.1.2.3 Degradação fotolítica

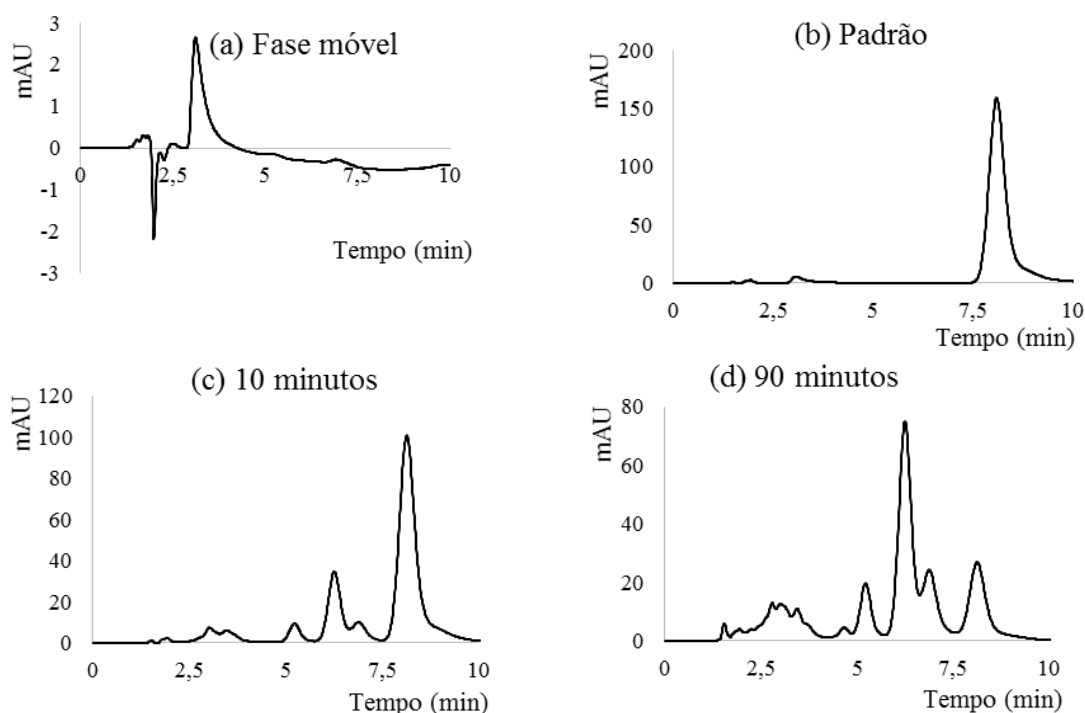
As amostras de TCZ no estado sólido submetidas à exposição fotolítica apresentaram um decaimento de 1,73% ($\text{DPR}=0,48$), porém não foi observada a formação de produtos de degradação. O pico cromatográfico do TCZ com tempo de retenção de 8,13 min apresentou pureza de pico com valor de 1,0, demonstrando que não houve coeluição de outros compostos na faixa de absorvância de 190 a 400 nm.

No entanto, as amostras de TCZ em solução submetidas à exposição fotolítica apresentaram um comportamento de alta instabilidade. A análise cromatográfica dessas amostras evidenciou o decaimento de 37,17% (DPR 1,19) e a formação de três produtos de degradação em apenas dez minutos de exposição. Foi possível observar produtos de degradação com Tr de 5,42 min (PD3), 6,54 min (PD4), 7,25 min (PD5), além do pico do TCZ com Tr de 8,53 min. Após 30 min de exposição foi observada a formação de

um quarto produto de degradação (PD6), com tempo de retenção de 4,8 min. Tais resultados são trazidos na figura 5.

Grande parte dos estudos de degradação forçada utilizam a matéria prima no seu estado sólido para os ensaios de fotodegradação, muito embora também seja relatada a sua utilização em forma de solução (BLESSY et al., 2014; BIAN; ZHANG, 2016). Chavan et al. (2018) em seu trabalho observaram que o TCZ no seu estado sólido se manteve estável, não havendo formação de produtos de degradação, porém a análise de fotodegradação em solução não foi realizada. Nardi et al. (2014), realizaram estudo de fotodegradação em soluções etanólicas do itraconazol, fármaco pertencente ao grupo dos triazóis, onde puderam observar extensiva degradação e a formação de 4 produtos de degradação. Adams et al. (2008), também relataram a formação de produtos de degradação do voriconazol em soluções metanólicas, após exposição à luz ultravioleta. Tais resultados demonstram a sensibilidade dos triazóis à fotodegradação quando em

Figura 5. Cromatogramas de branco fase móvel (a), padrão TCZ (b), amostras de TCZ submetida a fotodegradação (10 minutos) (c) amostras de TCZ submetida a fotodegradação (90 minutos) (d).

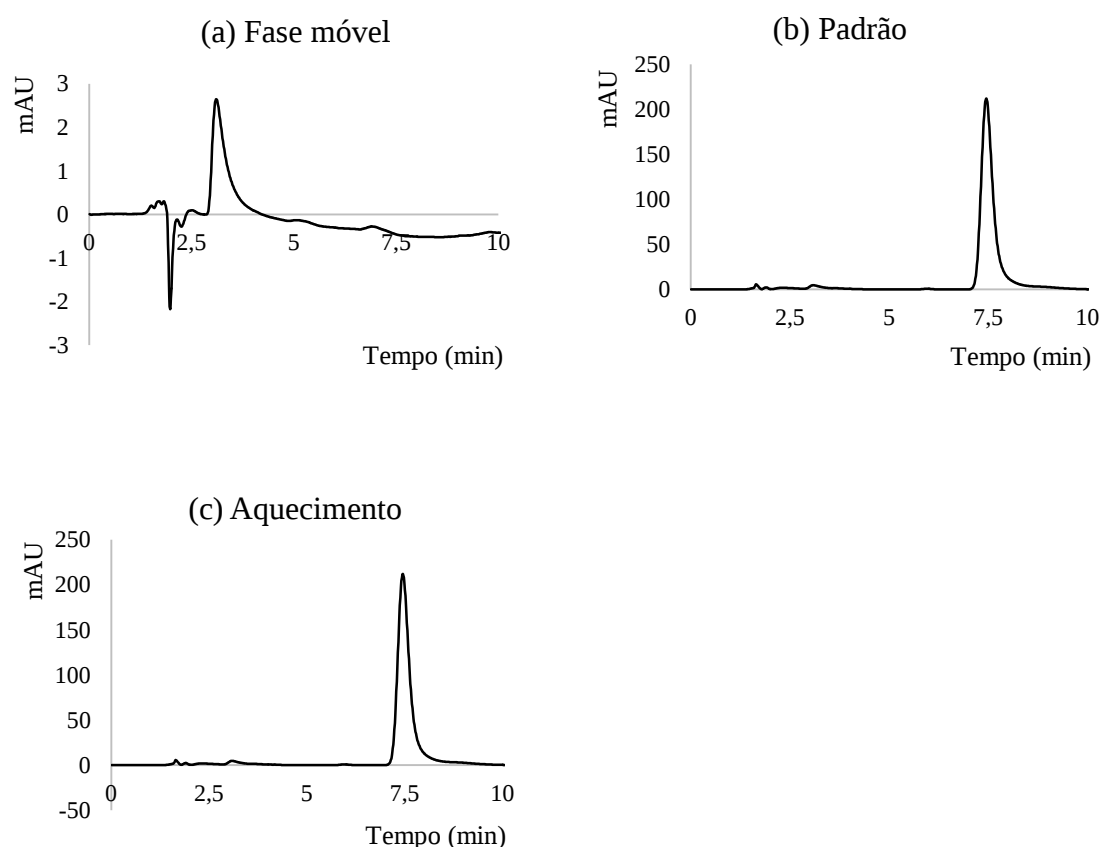


Fonte: autoria própria.

5.1.2.4 Degradação térmica

Nas amostras de TCZ submetidas à exposição térmica foi possível observar o pico cromatográfico do TCZ, com Tr de 7,49 min, que apresentou decaimento médio de 0,70% (DPR= 1,79), porém não foi possível observar a formação de produtos de degradação durante o tempo de exposição. Isso pôde ser confirmado pela análise de pureza de pico, que obteve valor de 1,0, demonstrando que não houve coeluição de outros compostos na faixa de absorvância de 190 a 400 nm. Os cromatogramas obtidos pelo estresse térmico são trazidos na figura 6.

Figura 6. Cromatogramas de branco fase móvel (a), padrão TCZ (b), amostras de TCZ submetida a aquecimento (c).



Fonte: autoria própria.

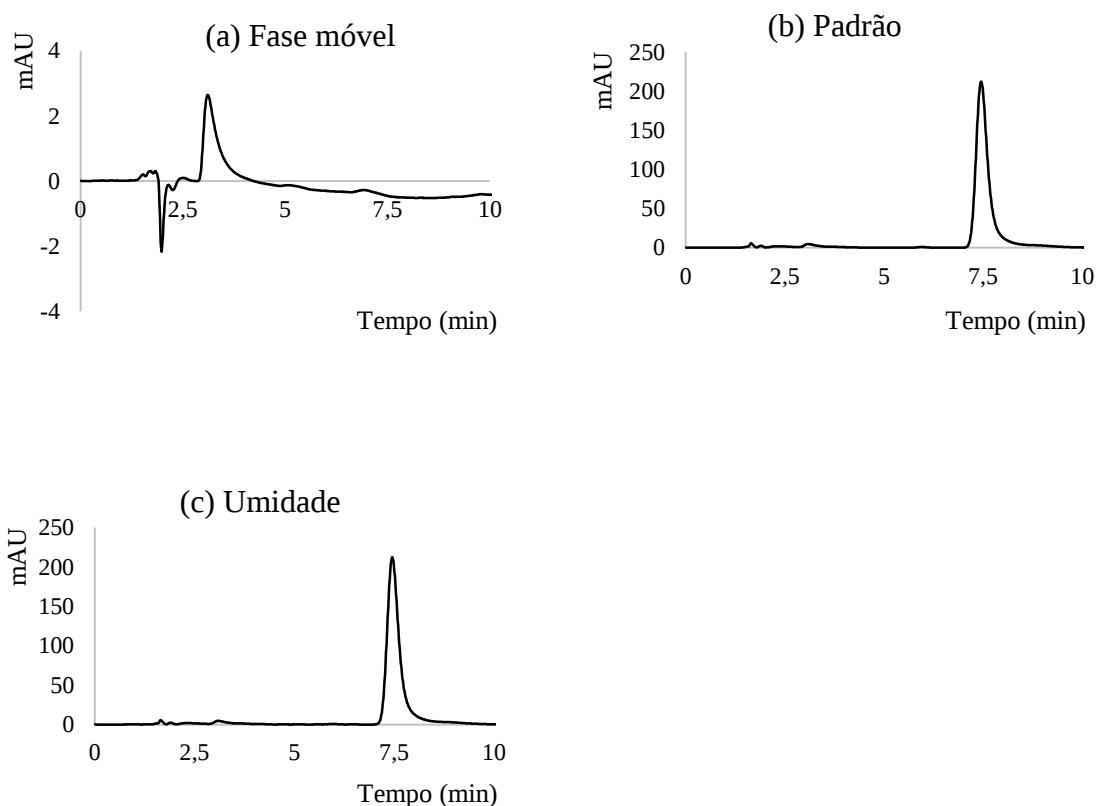
Tais resultados são corroborados por Chavan et al. (2018), que demonstrou ausência de degradação do TCZ após ser exposto por uma semana a 100°C. Mirza et al. (2012), apresentou resultados que demonstram estabilidade do itraconazol ao calor seco

a 100 °C por 8 horas, onde não foram observados picos significativos de produtos de degradação.

5.1.2.5 Degradação por umidade

Após exposição à alta umidade, a análise cromatográfica do TCZ trouxe um decaimento de 0,51% (DPR= 1,75), não sendo possível observar a formação de produtos de degradação. Além disso, o TCZ apresentou pureza de pico igual a 1,0 para o seu tempo de retenção que foi de 7,49 min. et al. (2018) não realizaram avaliação da estabilidade do TCZ a alta umidade, no entanto Parikh et al. (2011) evidenciaram que o itraconazol se manteve estável após exposição por um período de sete dias a 75% UR. Os cromatogramas obtidos pelo estresse térmico são trazidos na figura 7.

Figura 7. Cromatogramas de branco fase móvel (a), padrão TCZ (b), amostras de TCZ submetida a alta umidade (c).



Fonte: autoria própria.

5.1.3 Avaliação do balanço de massas

Os resultados de decaimento do teor do TCZ e o aumentos das áreas dos picos cromatográficos dos produtos de degradação, bem como o balanço de massas obtidos para as condições oxidativas por peróxido de hidrogênio 3% e 1,5%, assim como para fotólise são trazidos a seguir.

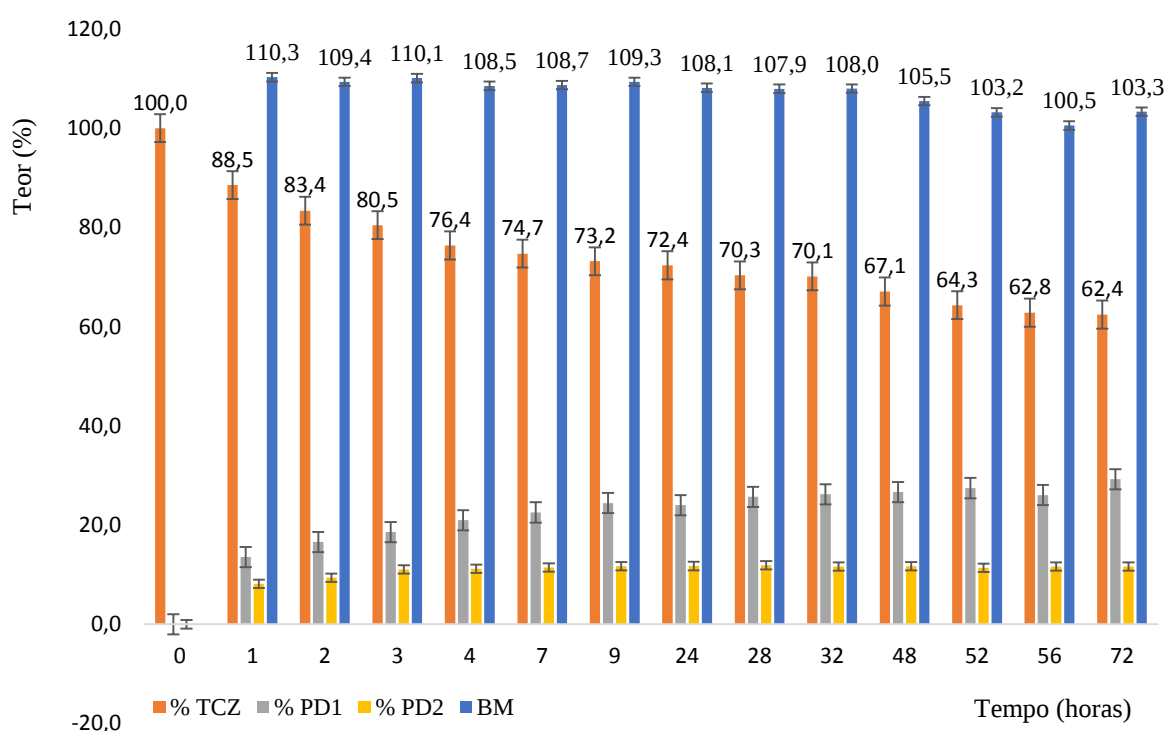
A figura 8 representa o balanço de massas obtido para oxidação com peróxido de hidrogênio 3%, onde observamos que a degradação do TCZ ocorre de forma mais intensa até 4 horas e após isso, desenvolve um decaimento mais lento. No tempo de 4 horas o TCZ apresenta um teor em cerca de 76%, semelhante ao resultado apresentado anteriormente, porém com um percentual de produtos de degradação de 32,5% em relação ao teor do TCZ e um balanço de massas de 108,5%.

A representação do balanço de massas para oxidação com peróxido de hidrogênio 1,5% é trazido na figura 9, onde podemos observar que houve uma degradação mais intensa do TCZ nas primeiras 9 horas de exposição, atingindo um teor em torno de 76% e um percentual de produtos de degradação de 28,9% em relação ao teor do TCZ. Através da soma desses valores foi possível calcular o balanço de massas que teve um valor de 104,9%. A partir de 32 horas de exposição, o balanço de massas para todos os tempos de análise demonstrou uma variação inferior a 5% em relação a soma do teor do TCZ e de seus produtos de degradação, o que pode ser considerado um valor adequado para este tipo de avaliação (BYRNE, VELASCO-TORRIJOS, REINHARDT, 2015; BHATT et al., 2018).

Apesar de não haver na legislação limites de aceitação para esse tipo de estudo, de um modo geral, o método LC-DAD apresentado foi capaz de quantificar o TCZ, bem como seus produtos de degradação, de forma a alcançar um balanço de massas que pode ser considerado adequado para boa parte dos pontos de análise, principalmente no ensaio que utilizou o peróxido de hidrogênio em menor concentração. Por outro lado, o fato de ter se obtido valores do balanço de massas com variação superior a 5%, o que ocorre principalmente no ensaio onde foi utilizado o peróxido de hidrogênio em sua maior concentração, nos leva a crer que haja uma possível interferência desse agente na quantificação dos produtos de degradação. Estudos posteriores serão realizados para estabelecer essa relação.

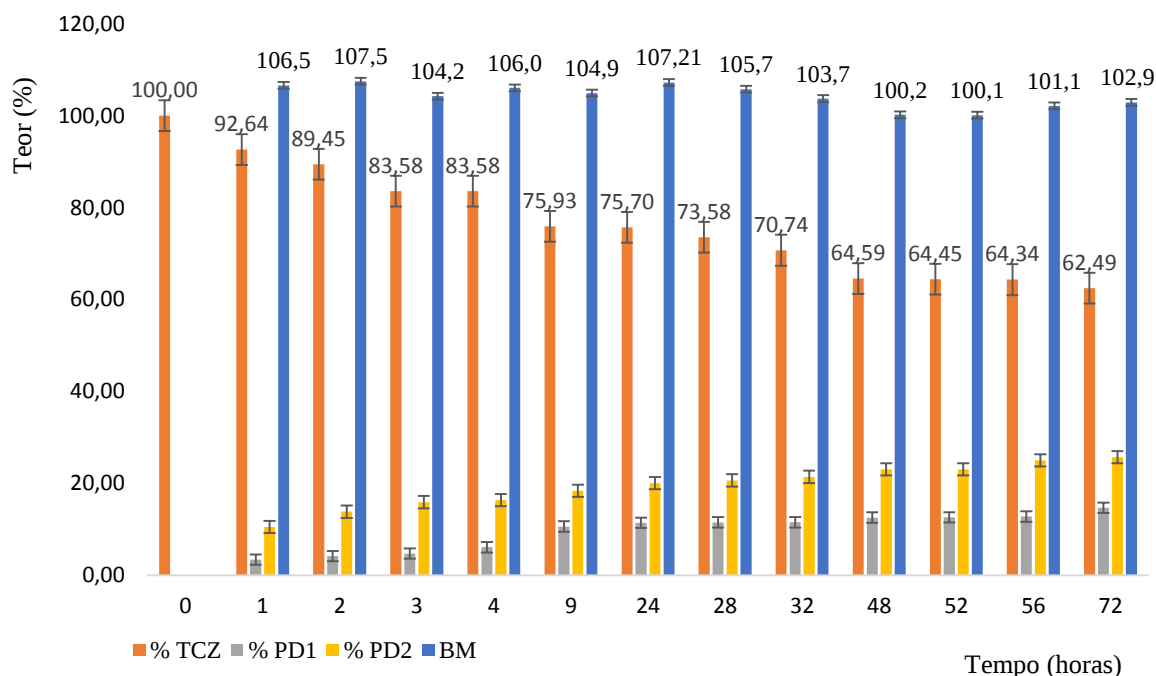
Além disso, foi possível observar que maiores concentrações de peróxido de hidrogênio tendem a formar o PD1 em maiores proporções, quando comparado ao PD2. Tal fato também poderia justificar o balanço de massas com maiores variações nessas condições, uma vez que o PD1 apresenta baixa resolução em relação ao sinal cromatográfico do H_2O_2 , já que uma melhor resolução diminui o risco da quantificação da área de compostos interferentes, por possibilitar a integração adequada do sinal de compostos em interesse. Pode-se, então, afirmar que a utilização de H_2O_2 em menores concentrações nos levaria a uma avaliação mais adequada do balanço de massas.

Figura 8. Avaliação dos teores do TCZ, produto de degradação e balanço de massas obtido após a oxidação em solução de H_2O_2 a 3 % nos tempos de 0; 1; 2; 3; 4; 7; 9; 24; 28; 32; 48; 52; 56 e 72 horas.



Fonte: autoria própria.

Figura 9. Avaliação dos teores do TCZ, produto de degradação e balanço de massas obtido após a oxidação em solução de H₂O₂ a 1,5 % nos tempos de 0; 1; 2; 3; 4; 7; 59; 24; 32, 48, 52, 56 e 72 horas.

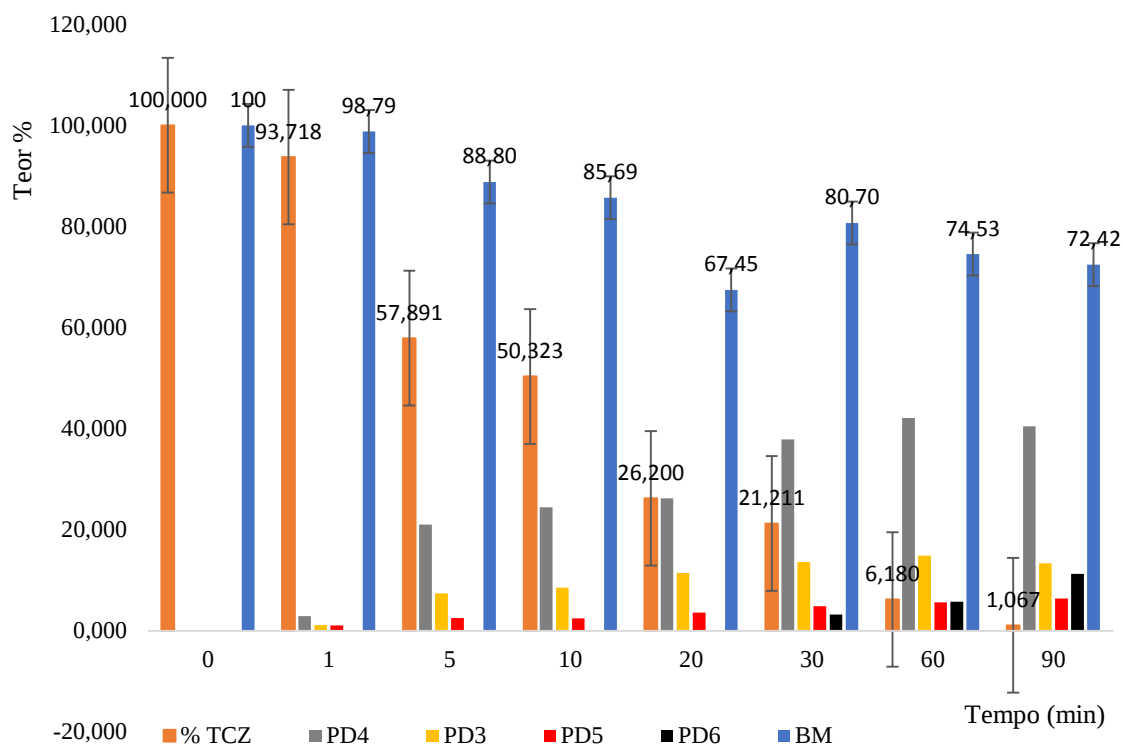


Fonte: autoria própria.

Ao observarmos a figura 10, podemos perceber que a degradação fotolítica do TCZ em solução metanólica apresenta comportamento de rápido decaimento. Com apenas 1 minuto de exposição, o TCZ atinge um teor em cerca de 93,72%, um percentual de produtos de degradação de 5% e balanço de massas de aproximadamente 98,8%. A partir de 5 minutos o balanço de massas apresenta baixos valores percentuais, chegando até 67,4% em 20 min. Em 90 minutos, último tempo de análise, o teor do TCZ decai para cerca de 1%, com um percentual de produtos de degradação de 71,4% e balanço de massas de 72,4%.

De um modo geral, as reações de fotodegradação são estabelecidas por reações primárias e secundárias de isomerização, oxidação, redução, descloração e fragmentação e envolvem mecanismos complexos nem sempre muito claros (TONNESEN, H. H., 2004; AHMAD, I. et al, 2016). Dessa forma, o não-balanço de massas para o TCZ a partir de 10 minutos de degradação fotolítica pode ser explicado pela possível formação de produtos de degradação secundários não cromóforos ou que não puderam ser detectados por esse método, como mencionam Singh et al., 2013.

Figura 10. Avaliação dos teores do TCZ, produto de degradação e balanço de massas obtido após fotólise nos tempos de 0; 1; 2; 3; 4; 5; 9; 24; 32, 48, 52, 56 e 72 horas.



Fonte: autoria própria.

5.2 ESTUDOS DE CINÉTICA DE DEGRADAÇÃO

5.2.1 Definição das ordens de reação

5.2.1.1 Cinética de degradação oxidativas com peróxido de hidrogênio

O estudo da cinética de degradação forçada por peróxido de hidrogênio foi realizado através da observação do decaimento do teor do TCZ exposto a esse agente nas concentrações de 3% e 1,5%(v/v). Com esta avaliação foi possível determinar a ordem das reações de degradação e a partir disso se obter valores de constante de velocidade de degradação (k), além dos parâmetros cinéticos de $T_{1/2}$ (meia-vida de degradação) e $T_{90\%}$ (meia vida-útil). A tabela 6 encontram-se os dados referentes as análises de amostras de TCZ exposto a peróxido de hidrogênio 3% e 25°C.

Tabela 6. Dados das áreas médias obtidas no tempo zero e após exposição, concentração, Log C e 1/C adquiridos em análise da solução de matéria-prima do TCZ submetida a estresse oxidativo (H₂O₂ 3%, 25°C).

Tempo (horas)	Áreas médias (mAU/min)	Desvio Padrão Relativo (N=3)	C (µg/mL)	Ln C (µg/mL)	1/C (µg/mL)
0	3806226	1,23	100,0000	4,6050	0,0100
1	2950987	3,63	77,5305	4,3507	0,2298
2	2931222	2,38	77,0112	4,3440	0,2302
3	2843892	1,05	74,7168	4,3137	0,2318
4	2754607	2,98	72,3711	4,2818	0,2335
7	2738649	0,94	71,9518	4,2760	0,2339
9	2684434	1,31	70,5274	4,2560	0,2350
24	2631814	1,34	69,1450	4,2362	0,2361
28	2530078	3,27	66,4721	4,1968	0,2383
32	2458619	0,32	64,5947	4,1681	0,2399
48	2393623	0,21	62,8870	4,1145	0,2430
52	2392146	2,43	62,8482	4,0951	0,2442
56	2285525	0,20	60,0470	4,0951	0,2442
72	2196398	3,52	57,7054	4,0554	0,2466

Legenda: mAU= área média do fármaco nos respectivos tempos de reação; DPR= desvio padrão relativo; C (µg/mL) = concentração do TCZ; Ln C (µg/mL) = logaritmo neperiano da concentração; 1/C (µg/mL) = inverso da concentração.

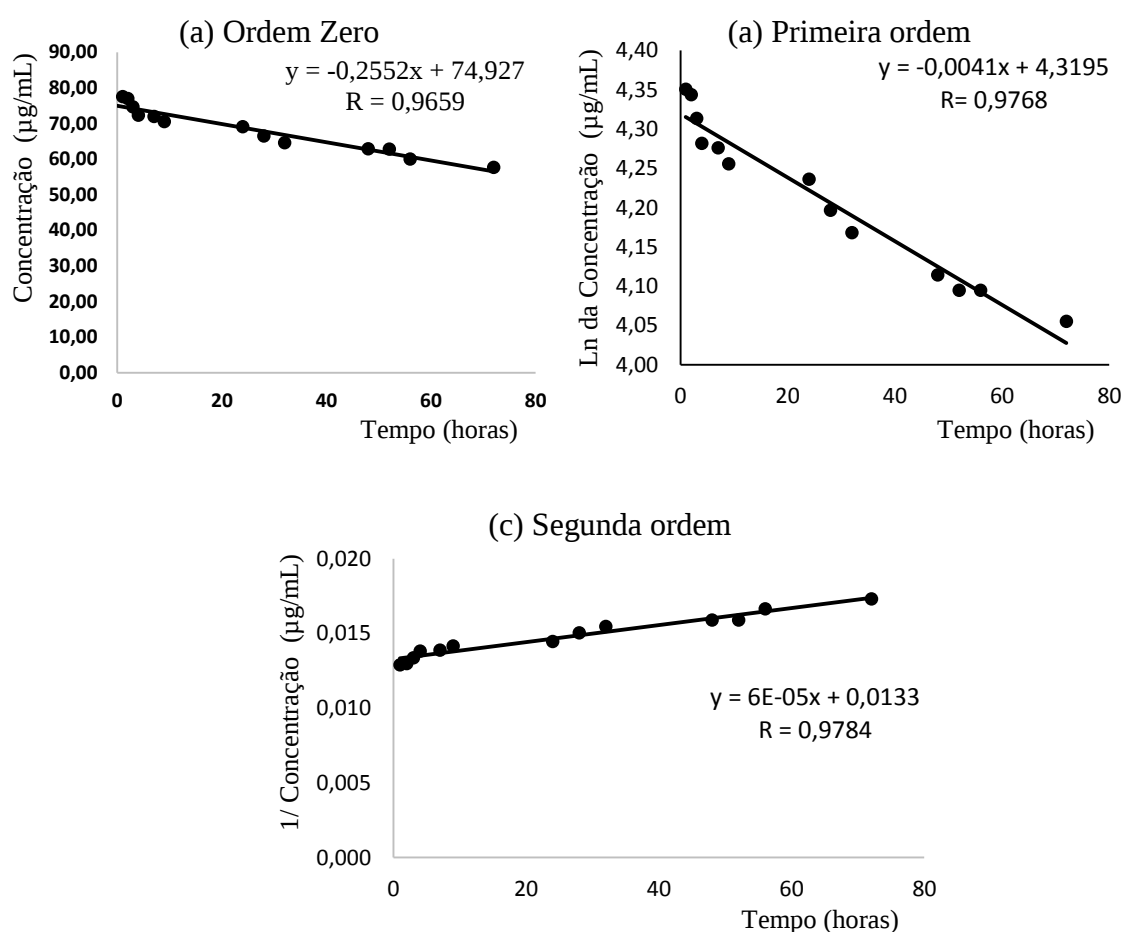
Fonte: Autoria própria.

Os dados trazidos na tabela 6, obtidos através do método indicativo de estabilidade proposto, foram utilizados para definição da ordem de reação de degradação forçada, através da construção dos gráficos representados na figura 11 para

ordem zero (Figura 11 a), primeira ordem (figura 11 b) e segunda ordem (figura 11 c) e posterior análise do coeficiente de correlação (r) mais próximo de 1.

Foi possível observar que o decaimento do TCZ exposto a peróxido de hidrogênio em temperatura ambiente apresentou coeficiente de correlação ligeiramente superior para o modelo de segunda ordem ($r= 0,9784$), quando comparado ao de primeira ($r=0,9768$) e ordem zero (0,9659). Dessa forma, podemos inferir que a velocidade de degradação depende ou da concentração de TCZ e de peróxido de hidrogênio, ou do quadrado da concentração de um destes (SINKO, 2008).

Figura 11. Representação gráfica das cinéticas de ordem zero (a), primeira ordem (b) e segunda ordem (c) para a degradação de TCZ submetido a estresse oxidativo (H₂O₂ 3%, 25°C).



Fonte: autoria própria.

Para avaliar a influência da concentração do agente oxidativo foi realizada outro teste de cinética de degradação forçada por peróxido de hidrogênio nos mesmos intervalos de tempo descritos anteriormente, porém em uma concentração de 1,5%. Os dados são trazidos na tabela e figuras a seguir:

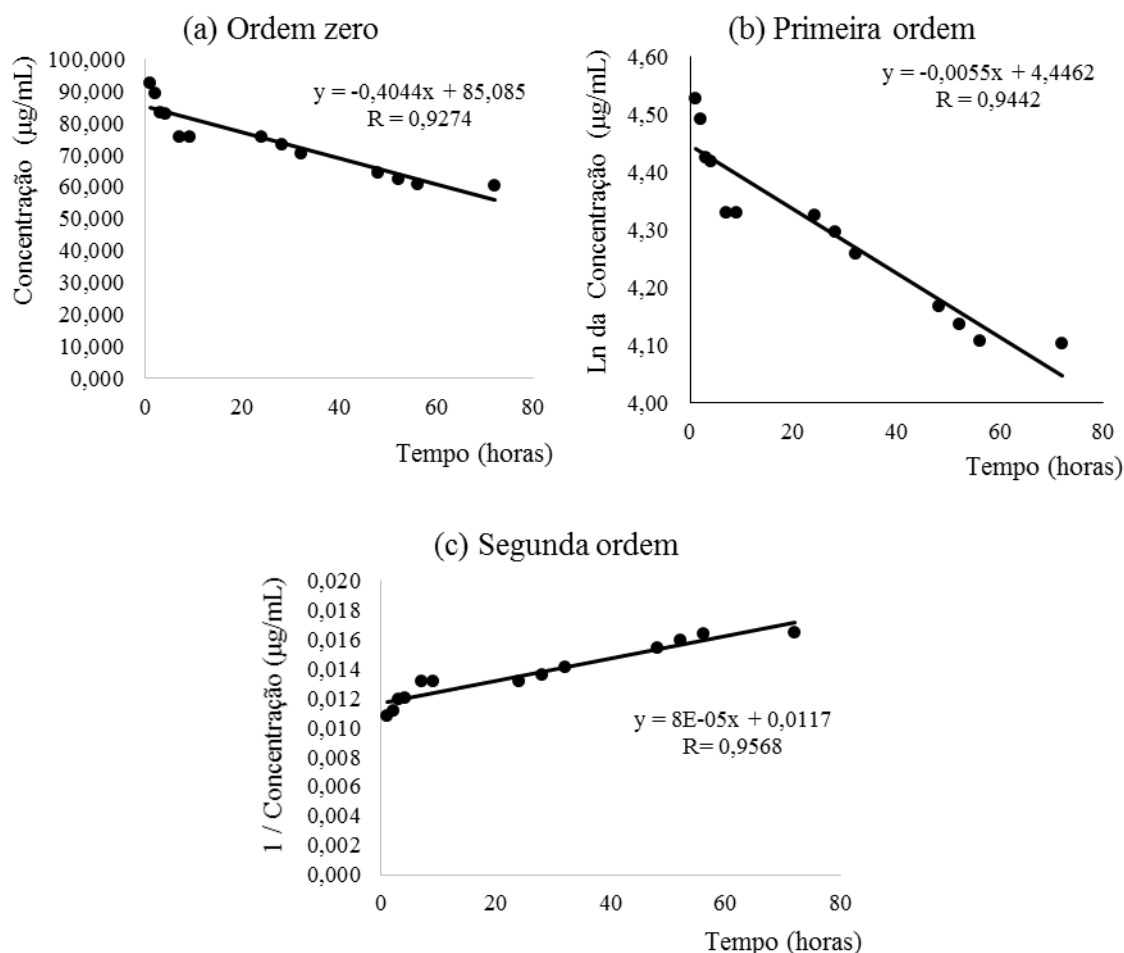
Tabela 7. Dados das áreas médias obtidas no tempo zero e após exposição, concentração, Log C e 1/C adquiridos em análise da solução de matéria-prima do TCZ submetida a estresse oxidativo (H₂O₂ 1,5%, 25°C).

Tempo (horas)	Áreas médias (mAU /min)	Desvio Padrão Relativo (N=3)	C (µg/mL)	Ln C (µg/mL)	1/C (µg/mL)
0	3806226	1,227	100,000	4,605	0,010
1	3525964	1,069	92,637	4,529	0,011
2	3404540	1,613	89,447	4,494	0,011
3	3181411	4,674	83,584	4,426	0,012
4	3162156	4,247	83,078	4,420	0,012
7	2893140	1,278	76,011	4,331	0,013
9	2889912	1,577	75,926	4,330	0,013
24	2881405	1,337	75,702	4,327	0,013
28	2800595	0,892	73,579	4,298	0,014
32	2692454	1,297	70,738	4,259	0,014
48	2458554	1,706	64,593	4,168	0,015
52	2386556	1,651	62,701	4,138	0,016
56	2315537	0,899	60,836	4,108	0,016
72	2305333	0,609	60,567	4,104	0,017

Legenda: mAU= área média do fármaco nos respectivos tempos de reação; DPR= desvio padrão relativo; C (µg/mL) = concentração do TCZ; Ln C (µg/mL) = logaritmo neperiano da concentração; 1/C (µg/mL) = inverso da concentração.

Fonte: Autoria própria.

Figura 12. Representação gráfica das cinéticas de ordem zero (a), primeira ordem (b) e segunda ordem (c) para a degradação de TCZ submetido a estresse oxidativo (H₂O₂ 1,5%, 25°C).



Fonte: Autoria própria.

Como descrito anteriormente, os dados trazidos na tabela 7 foram utilizados para construção de gráficos da figura 12 para verificar se a ordem reacional seria afetada pela mudança da concentração do agente oxidante. A avaliação dos resultados demonstrou uma manutenção do perfil cinético de decaimento do TCZ, onde também foi observado que o modelo de segunda ordem ($r=0,9568$) traz maior grau de correlação entre as variáveis. De um modo geral, os valores de correlação observados no estudo de cinética de degradação utilizando peróxido 3% foram superiores quando comparados ao uso de peróxido 1,5%, o que nos leva a pensar que a concentração de peróxido de hidrogênio é o fator que mais impacta a ordem de reação, porém uma avaliação variando-se a concentração de TCZ deveria ter sido realizada para confirmação deste resultado.

Já em relação ao teor final do TCZ nas diferentes concentrações de peróxido, foi possível observar que houve um acréscimo do percentual de TCZ degradado nas amostras com maior concentração desse agente oxidante, embora de forma não proporcional, o que nos leva a entender que esse decaimento apresenta diferentes velocidades em função do tempo de exposição.

Após tomar o perfil cinético de segunda ordem como melhor modelo de decaimento para o TCZ nas reações de oxidação e para visualizar melhor essa diferença de velocidades de reação ao longo do tempo de análise foi calculado o valor de k final (k_f), onde se considera todo o tempo de análise que foi de 72 h, e k inicial (k_i), calculado a partir de um tempo mais próximo aos pontos de início das análises, nesse caso 1 hora. Esses dados são trazidos na tabela 8.

Foi possível observar que a k_i para degradação nas amostras com concentração mais elevada de peróxido foi cerca de 29 vezes maior que a k_i nas amostras com 1,5%, o que justifica um decaimento mais pronunciado no teor das amostras com 3% de peróxido, observado na fase inicial da cinética de degradação forçada. Por outro lado, a k_f apresenta valores aproximados para as cinéticas em ambas concentrações do agente oxidante, o que evidencia uma diminuição da velocidade de decaimento do TCZ ao longo do tempo, mesmo para uma exposição em maiores concentrações de peróxido. Tais resultados corroboram com os valores finais de teor do TCZ que foram de 60,56% e 57,70% para as amostras submetidas a oxidação por peróxido nas concentrações de 1,5% e 3%, respectivamente, como mostrado na tabela 9. Após aplicação do teste t Student, o t calculado foi de 0,0637, valor inferior ao t tabelado de 0,0743, demonstrado que não houve diferença estatística significativa, com 95% de confiança, entre os teores finais do TCZ.

Da mesma forma, o $T_{90\%}$ para as duas condições analisadas mostram valores distintos, pois como já mencionado anteriormente, ficou claro que a reação apresenta velocidades de decaimento diferente ao longo do tempo. Por outro lado, o $T_{1/2}$ apresentou valores mais próximos para as diferentes condições, dada uma diminuição da velocidade de decaimento ao longo da cinética de degradação.

Tabela 8. Parâmetros cinéticos calculados para o TCZ na oxidação por peróxido.

Parâmetros cinéticos	H ₂ O ₂ 1,5%	H ₂ O ₂ 3%
K_i (ug.h)	6,18 x 10 ⁻⁴	2,90 x 10 ⁻³
K_f (ug.h)	9,04 x10 ⁻⁵	1,01 x 10 ⁻⁴
T_{90%} (h)	1,79	0,0425
T_½ (h)	110	98,21

Fonte: Autoria própria

Tabela 9. Teor de TCZ após degradações oxidativas.

Degradação oxidativas por peróxido de hidrogênio		
Concentração (v/v)	1,5%	3%
Tempo (horas)	72	72
Teor final (%)	60,56	57,70

Fonte: Autoria própria

5.2.1.1 Cinética de degradação fotolítica

Os dados trazidos na tabela 10, obtidos através do método indicativo de estabilidade proposto, foram utilizados para definição da ordem de reação de degradação forçada de exposição a luz, através da construção dos gráficos representados na figura 13 para ordem zero (Figura 13 a), primeira ordem (figura 13 b) e segunda ordem (figura 13 c) e posterior análise do coeficiente de correlação (r) mais próximo de 1.

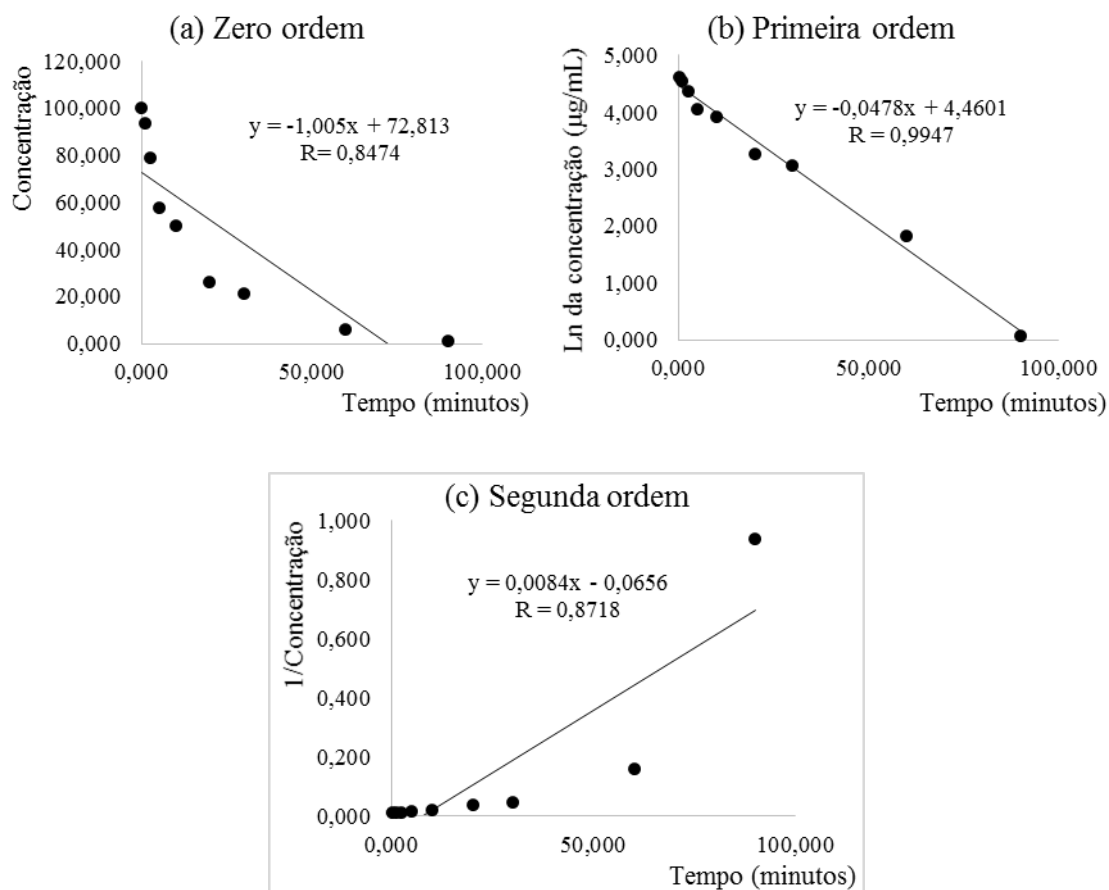
Tabela 10. Dados das áreas médias obtidas no tempo zero e após exposição, concentração, Log C e 1/C adquiridos em análise da solução de matéria-prima do TCZ submetida a fotólise.

Tempo (minutos)	Áreas médias (mAU/min)	CV (%) (N=3)	C (µg/mL)	Ln C (µg/m)	1/C (µg/mL)
0	139740528	1,811	100,000	4,605	0,010
1	130961552	1,895	93,718	4,540	0,011
2,5	110588064	1,190	79,138	4,371	0,013
5	80896688	1,511	57,891	4,059	0,017
10	70321104	2,361	50,323	3,918	0,020
20	36612452	3,835	26,200	3,266	0,038
30	24640996	4,713	21,211	3,055	0,047
60	8636221	0,024	6,180	1,821	0,162
90	1490639	0,573	1,067	0,065	0,937

Legenda: mAU= área média do fármaco nos respectivos tempos de reação; DPR= desvio padrão relativo; C (µg/mL) = concentração do TCZ; Ln C (µg/mL) = logaritmo neperiano da concentração; 1/C (µg/mL) = inverso da concentração.

Fonte: Autoria própria.

Figura 13. Representação gráfica das cinéticas de ordem zero (a), primeira ordem (b) e segunda a ordem (c) para a degradação de TCZ submetido a estresse fotolítico.



Fonte: Autoria própria.

De acordo com a figura 13, foi possível observar que os modelos cinéticos calculados apresentam dois intervalos lineares distintos de decaimento, porém com modelo de primeira ordem ($r = 0,9947$) foi possível obter uma melhor correlação entre as duas variáveis para todo o tempo de análise. Tal resultado mostrou-se superior quando comparado as correlações obtidas pelos modelos de segunda ($r = 0,8718$) e ordem zero ($r = 0,8474$). Dessa forma, podemos inferir que a velocidade de degradação depende a concentração de TCZ (BIANCHINI, CATELLANO, KAUFMAN, 2008).

Em relação ao teor do TCZ em solução metanólica foi possível observar que apresentou rápido decaimento, tendendo a sua quase total degradação em apenas 90 minutos. Este processo de decaimento do teor se deu de forma mais rápida nos primeiros 30 minutos de exposição, onde foi possível observar uma degradação de cerca de 79%.

Para melhor visualização deste resultado, calculou-se a constante de velocidade de degradação, onde se observa a k_i aproximadamente duas vezes maior que a k_f , com valores de $6,18 \times 10^{-2}$ ug.min e $3,19 \times 10^{-2}$ ug.min, respectivamente. Tendo em vista a grande susceptibilidade do TCZ para esta condição de estresse, as projeções de $T_{90\%}$ e $T_{1/2}$ foram calculados a partir de k_i e levando em consideração o tempo de 5 minutos, uma vez que os valores reais de ambos parâmetros cinéticos foram obtidos ainda nos primeiros 30 minutos de análise. O valor de $T_{90\%}$ obtido foi de 2,58 e o $T_{1/2}$ de 11,20 minutos. A tabela abaixo traz os dados anteriormente descritos.

Tabela 11. Parâmetros cinéticos calculados para o TCZ na fotodegradação.

Parâmetros cinéticos	
Ki (ug.min)	$6,18 \times 10^{-2}$
Kf (ug.min)	$3,19 \times 10^{-2}$
T _{90%} (min)	2,58
T _½ (k _i) (min)	11,20

Fonte: Autoria própria.

5.3 OTIMIZAÇÃO DA ESPECTROMETRIA DE MASSAS

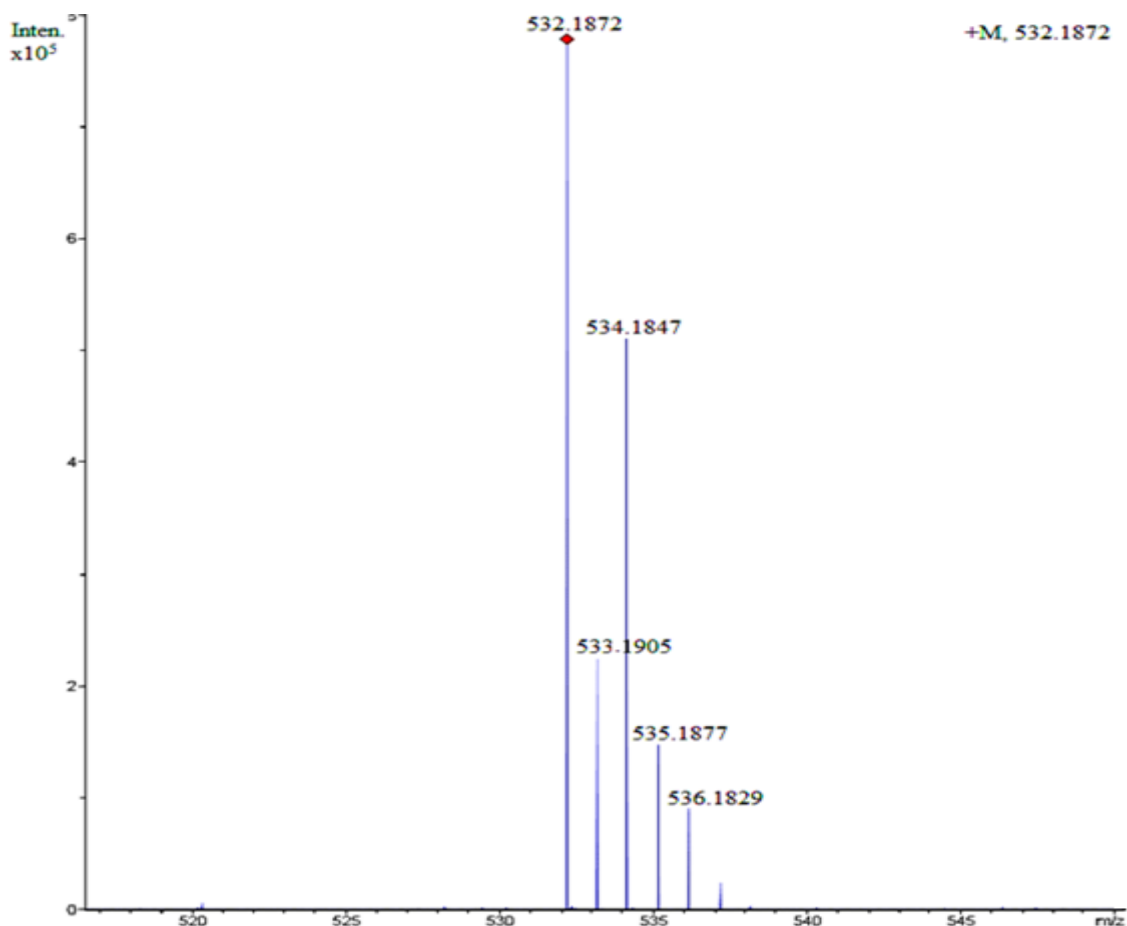
A ionização por eletronebulização (ESI) do TCZ foi testada nos modos positivos e negativos no espectrômetro de massas QTOF, com o objetivo de determinar o melhor modo para ser utilizado no método. Como resultado observou-se que o TCZ apresenta boa ionização em ambos os modos, porém foi escolhido o modo positivo por apresentar maior intensidade de sinal.

A temperatura da fonte foi otimizada de acordo com a vazão da fase móvel para 180°C, seguindo as recomendações do fabricante. A vazão do gás de secagem foi especificada em 4 L.h^{-1} , a voltagem do capilar foi fixada em 4500 eV e a da *EndPlate Offset* em 50 V.

A figura 14 mostra o espectro de massas obtido por ESI em modo positivo, onde é possível observar a protonação do TCZ $[M+H]^+$, que possui massa exata de 531,1872 g/mol, resultando em um sinal de 532,1872 m/z evidenciado como pico base. O perfil isotópico observado é característico de moléculas dicloradas, onde é visto sinais de

534,1847 m/z e 536,1829 m/z , que representam, respectivamente, as contribuições de massa de um e dois átomos de Cl_{37} .

Figura 14. Espectro de massas de alta resolução ampliado do TCZ obtido pelo sistema LC-MS-TOF no modo ESI +.



Fonte: autoria própria.

5.4 ELUIDAÇÃO ESTRUTURAL POR ESPETROMETRIA DE MASSAS DE ALTA RESOLUÇÃO

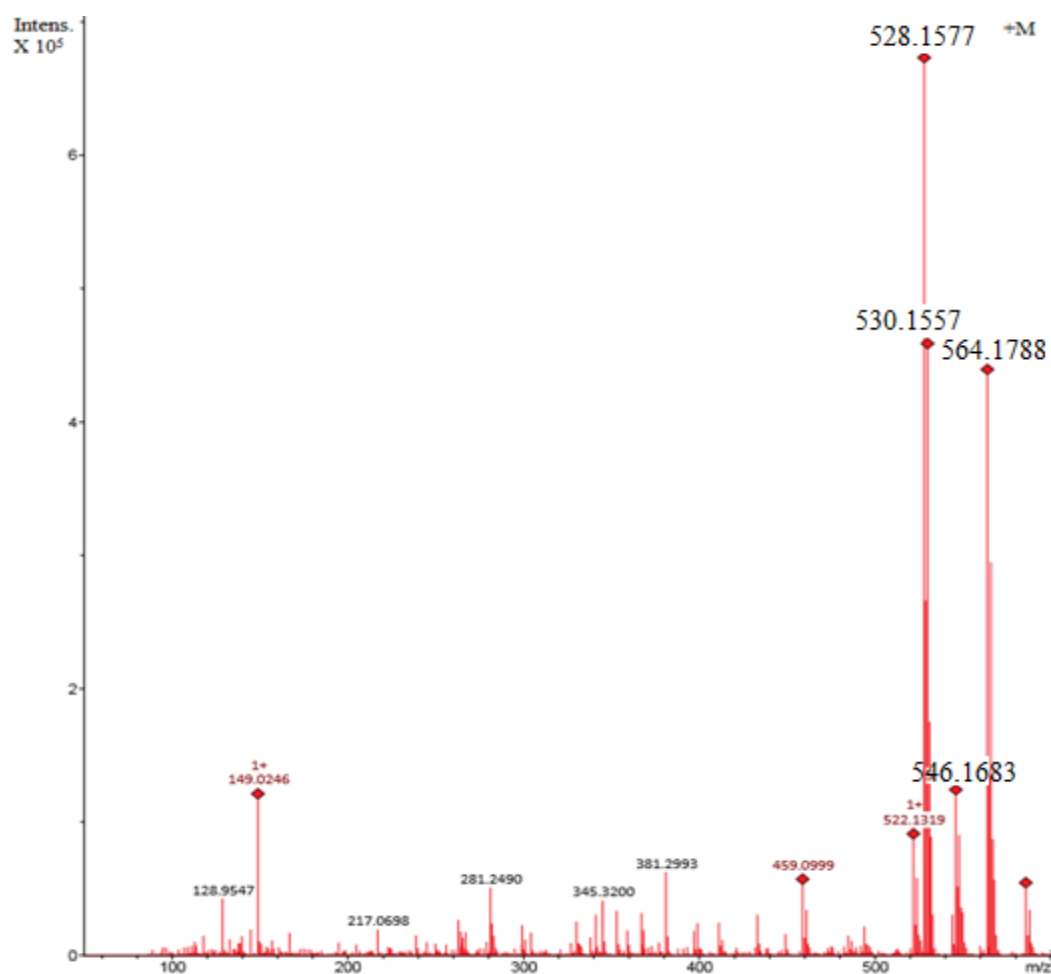
O método proposto foi adequadamente transferido para o sistema LC- MS-TOF, onde foram analisadas as amostras do de TCZ, bem como as amostras de degradação forçada provenientes de oxidação por peróxido de hidrogênio e fotólise, cuja formação de produtos de degradação já havia sido observada pelo UV-DAD, as amostras foram analisadas a fim de se obter informações acerca de suas estruturas moleculares.

5.4.1 Oxidação

Ao analisarmos o espectro de massas do PD1 ($T_r=3,21$ min) trazido na figura 15, podemos observar a presença do íon molecular 564.1788 m/z $[M+H]^+$ e foi possível evidenciar a presença do íon molecular que representa uma diferença de massas de 32 Da em relação a molécula protonada do TCZ. Tal resultado nos sugere uma adição de dois átomos de oxigênio no anel piperazina. Resultados semelhantes foram encontrados por Chavan et al. (2018), para o TCZ.

Da mesma forma, Yang et al. (2016), em estudo de degradação forçada para o posaconazol, demonstraram a formação de produtos de degradação oriundos de oxidação por peróxido de hidrogênio e representados pela dois átomos de oxigênio ao anel piperazina de sua estrutura. Segundo o autor, os átomos de nitrogênio deste anel representam o local de maior densidade eletrônica da molécula e ao reagir com o peróxido resultam em compostos chamados N-óxidos. Dessa forma, pode-se sugerir um mecanismo semelhante para os produtos de degradação do TCZ gerados pela oxidação por peróxidos.

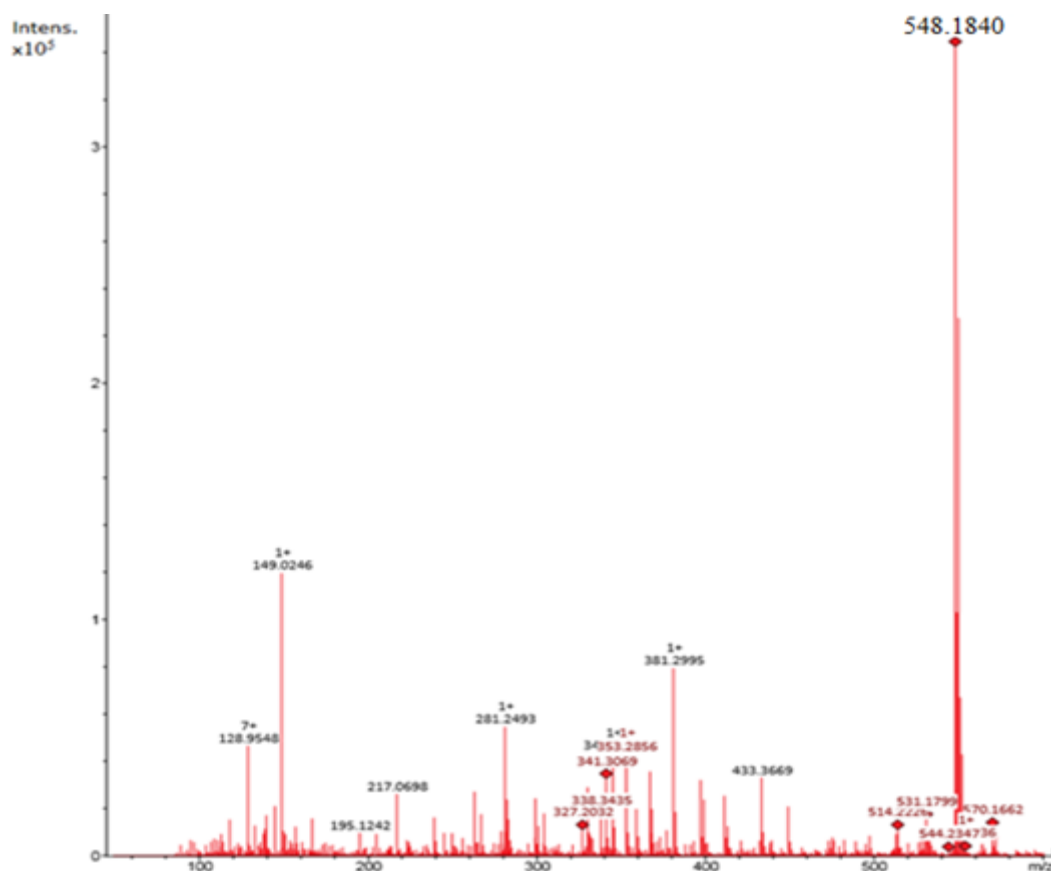
Figura 15. Espectro de massas de alta resolução do PD 1 obtido pelo sistema LC-MS-TOF no modo ESI +.



Fonte: autoria própria.

Para o PD 2 (Tr= 3,89 min), podemos observar a presença do íon molecular 548 m/z [M+ H]⁺, trazido na figura 16. A diferença de massa do TCZ [M+ H]⁺, para este produto de degradação é de 16 Da, o que nos leva a pensar que o PD2 é formado pela adição de um átomo de oxigênio na molécula original do fármaco. Para avaliar a formação de possíveis isômeros de posição deste produto de degradação, foi realizada análise de massa, onde apenas um pico apresentou perfil de 548 m/z.

Figura 16. Espectro de massas de alta resolução do PD 2 obtido pelo sistema LC-MS-TOF no modo ESI +.

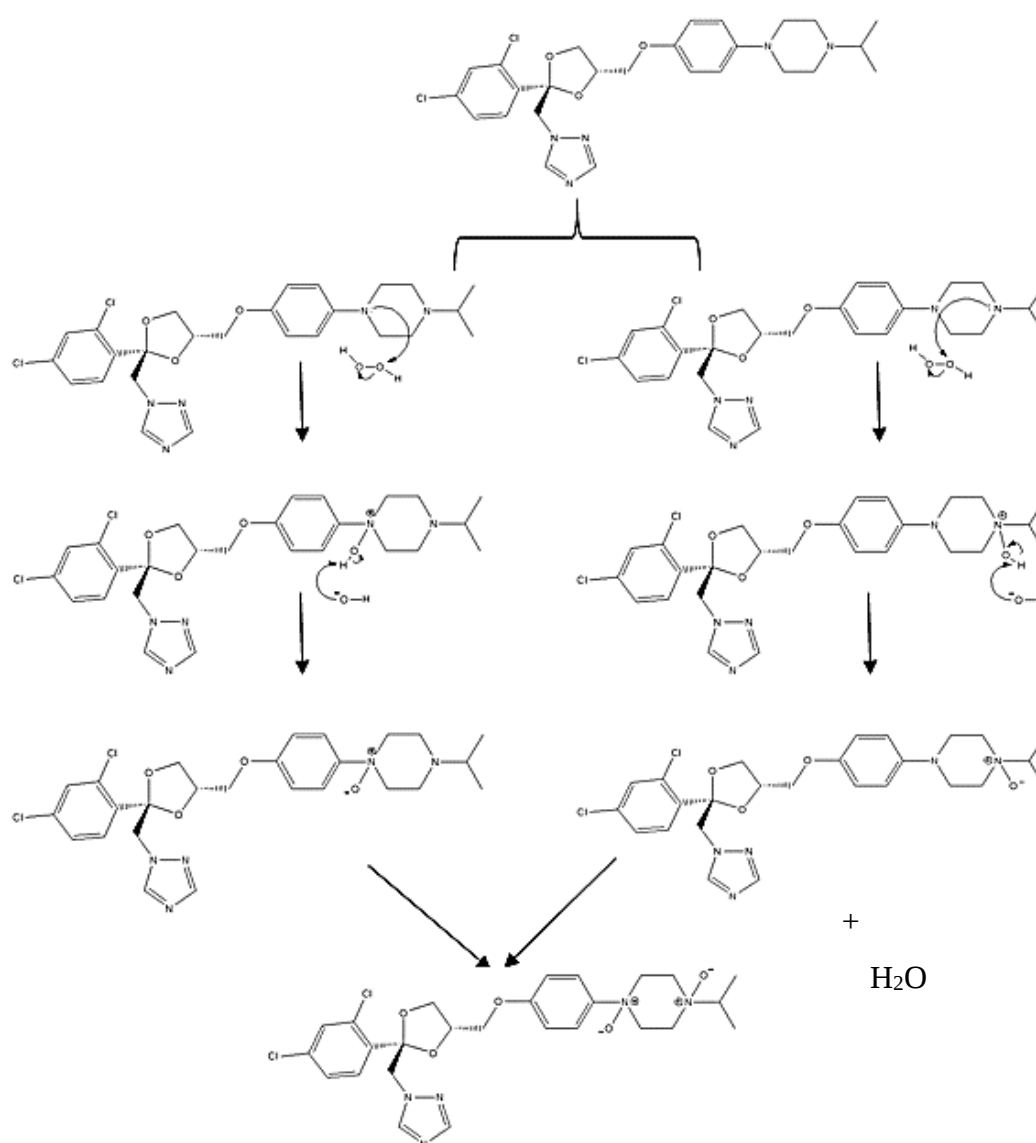


Fonte: autoria própria.

Ainda no trabalho de Chavan et al. (2018), através da oxidação do TCZ por peróxido de hidrogênio, foi observada a formação de dois produtos de degradação que apresentaram 548 m/z. Em seu estudo de caracterização por LC-MS/TOF, foi possível confirmar a formação de isômeros de posição gerados a partir da adição de átomos de oxigênio nos diferentes nitrogênios do anel peperazina. Além disso, através da análise de MS/MS desses produtos de degradação, os autores puderam observar que o N-óxido formado pelo nitrogênio do anel piperazina ligado diretamente ao grupamento isopropil apresentou um fragmento de 506 m/z, gerado a partir do rearranjo de Meisenheimer. Tal resultado não foi observado neste presente trabalho o nos dá um forte indício de que o sinal 548 m/z seja do N-óxido formado no nitrogênio do anel piperazina ligado diretamente ao grupo aromático.

Tomando como base os achados da literatura trazidos anteriormente, propõe-se que a formação de N-óxidos para o TCZ se dê pelo ataque nucleofílico dos nitrogênios de seu anel piperazina aos átomos de oxigênio das moléculas de peróxido de hidrogênio, seguida da formação de radicais hidroxila, que posteriormente capturam os átomos de hidrogênio dos grupamentos OH, resultando em N-óxidos e água. Tal mecanismo é trazido na figura 17.

Figura 17. Mecanismo de formação de N-óxidos do TCZ.

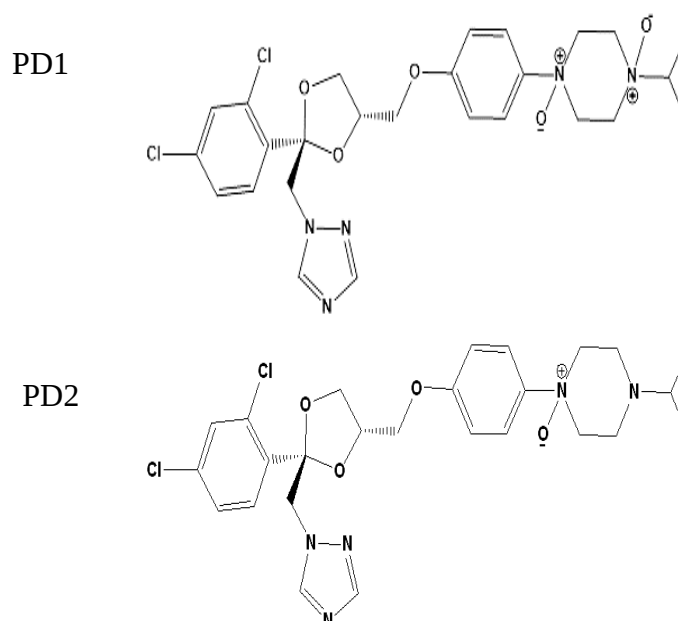


Fonte: autoria própria a partir do software ChenDraw Ultra.

Como descrito na avaliação de balanço de massas, a utilização de peróxido de hidrogênio 3% e 1,5% favoreceu a formação dos PDs 1 e 2, respectivamente. Dessa forma, podemos entender que a captação de apenas um átomo de oxigênio pelo anel piperazina ocorre principalmente em menores concentrações desse agente oxidante, enquanto o processo de dupla captação de dois átomos de oxigênio é favorecido por maiores concentrações.

Ao avaliar a capacidade oxidativa de compostos de quimicamente relacionados ao TCZ, Freed et al., (2008), evidenciaram que o estado de protonação dos nitrogênios do anel piperazina está diretamente ligado à sua susceptibilidade à oxidação. Dessa forma, algo semelhante pode ocorrer na formação de N-óxidos, uma vez que a adição de um átomo de oxigênio pode influenciar a densidade eletrônica do anel e reduzir a sua reatividade. O aumento da concentração de peróxido, por sua vez, parece favorecer a formação do segundo grupamento N-óxido, dado o aumento da disponibilidade dos radicais hidroxila gerados. A figura 18 traz as estruturas propostas para os PDs 1 e 2, obtidos através da oxidação por peróxido de hidrogênio.

Figura 18. Estruturas propostas para os produtos de degradação 1 e 2.

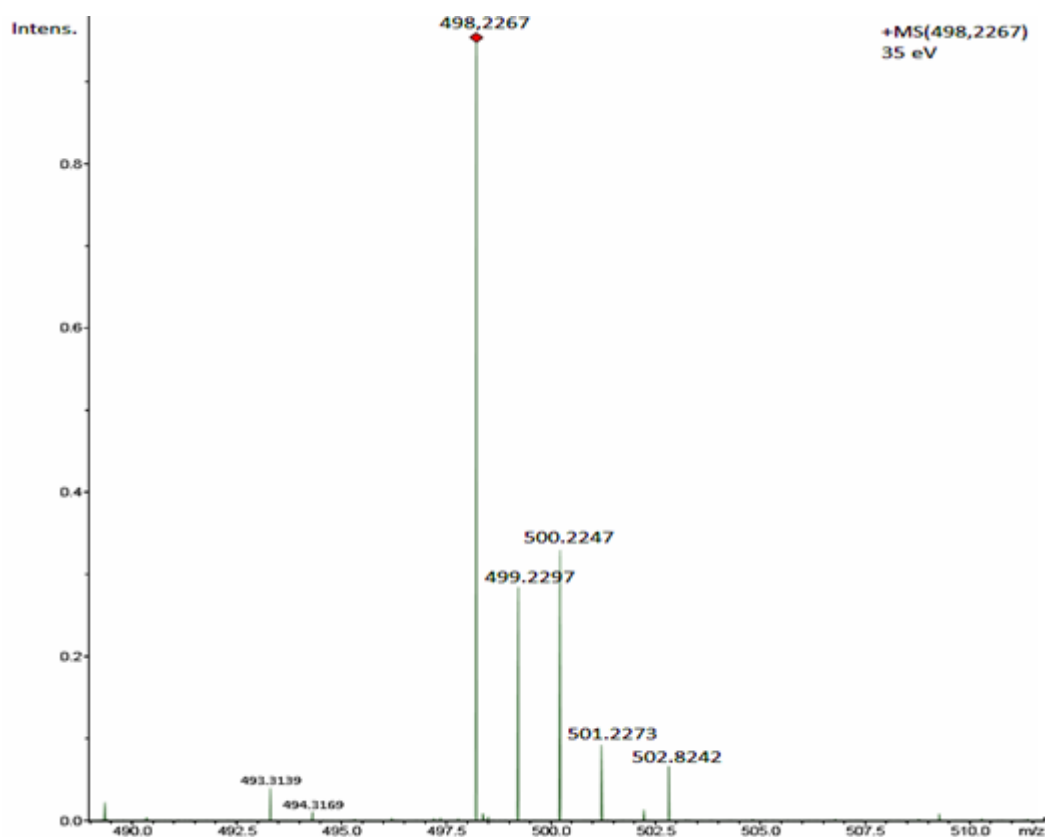


Fonte: autoria própria a partir do software ChenDraw Ultra.

5.4.2 Fotólise

Ao analisarmos o espectro de massas dos PDs 3 e 4 ($T = 5,45$ min e $6,54$ min, respectivamente), podemos observar que o íon molecular $498\text{ m/z } [M+H]^+$, apresenta padrão isotópico de moléculas monocloradas, onde pode ser observado seu isótopo $500\text{ m/z } [M+H]^+$, com aproximadamente $1/3$ (um terço) de sua abundância, como mostra a figura 19. Tal resultado nos leva a deduzir que estes produtos de degradação são formados pela perda de um átomo de cloro da molécula do TCZ em seu anel fenílico, um na posição orto e outro na posição para. Encinas et al. (1998) demonstraram que a perda de átomos de cloro mostrou-se como um ponto chave em reações de fotodegradação do diclofenaco. Mais recentemente, Kryczyk et al. (2014), realizaram estudo semelhante com o itraconazol onde foi observado a formação de produtos de degradação a partir do mecanismo de desalogenação com a perda de cloro.

Figura 19. Espectro de massas de alta resolução ampliado dos PDs 3 e 4 obtidos pelo sistema LC-MS-TOF no modo ESI +.



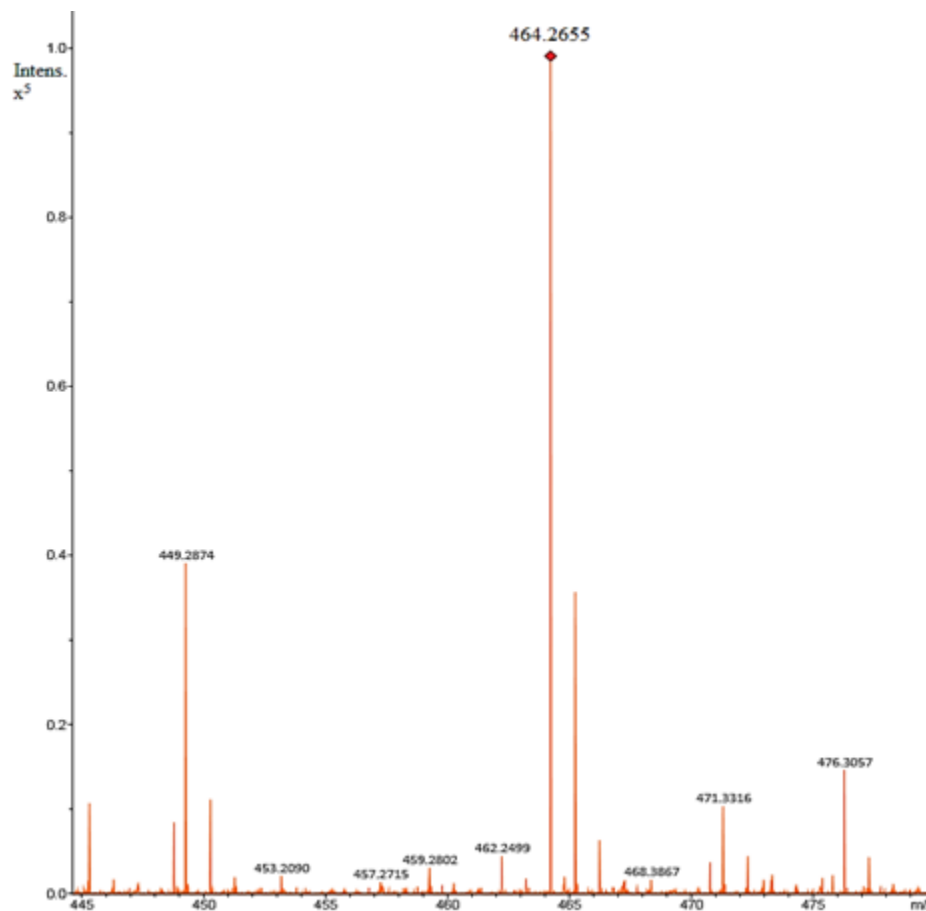
Fonte: autoria própria

Por outro lado, não é possível definir de fato qual pico cromatográfico representa a perda de cloro na posição orto ou para, uma vez que os PDs 3 e 4 ($T_r = 5,45$ min e $6,54$ min, respectivamente) apresentam o mesmo perfil de massas e o mesmo perfil de fragmentação, como discutido na seção 5.5. Nardi et. al (2014), em estudo de fotodegradação do itraconazol demonstrou que o fármaco é instável a irradiação UVB e sofre desalogenação primária na porção 2,4-diclorofenila, preferencialmente na posição orto, nos dando fortes evidências que o mesmo acontece para o TCZ. Dessa forma, podemos esperar que o PD 3 ($T_r = 5,45$ min) seja formado pela perda de cloro na posição orto do anel fenil, uma vez que é formado em menor proporção quando comparado ao PD 4 ($T_r = 6,54$ min), que pode ser atribuído a perda de cloro na posição para, porém apenas uma avaliação por RMN H^1 poderia confirmar este resultado através da análise do acoplamento dos átomos de hidrogênio.

Apesar de envolver reações complexas, Tonnesen (2004), traz discussões acerca dos mecanismos de fotoreações em moléculas com grupos de haleto de fenila, onde pode ser observada a formação de HCl e uma mistura de produtos de redução (Fenil-H) e substituição (Fenil-OR), em soluções aquosas e metanólicas. Tais mecanismos corroboram com os resultados obtidos, já que pôde-se observar reações de redução da porção 2,4-clorofenil da estrutura do TCZ. Por outro lado, não foi observado nenhum sinal com m/z que pudesse ser atribuído a um produto de degradação com radical fenil-O-R.

Já para o PD 6 ($T_r = 4,8$ minutos) seu perfil de massas evidenciou um sinal de $464 m/z [M + H]^+$, sem apresentar padrão isotópico para átomos de cloro, o que nos leva a concluir que este produto de degradação é formado pela perda dos dois átomos de cloro da porção fenílica do TCZ (figura 20). Porém, diferentemente do que foi observado nas reações de perda de apenas um átomo de cloro, a perda simultânea nas posições orto e para acontecem apenas a partir de 30 minutos de exposição.

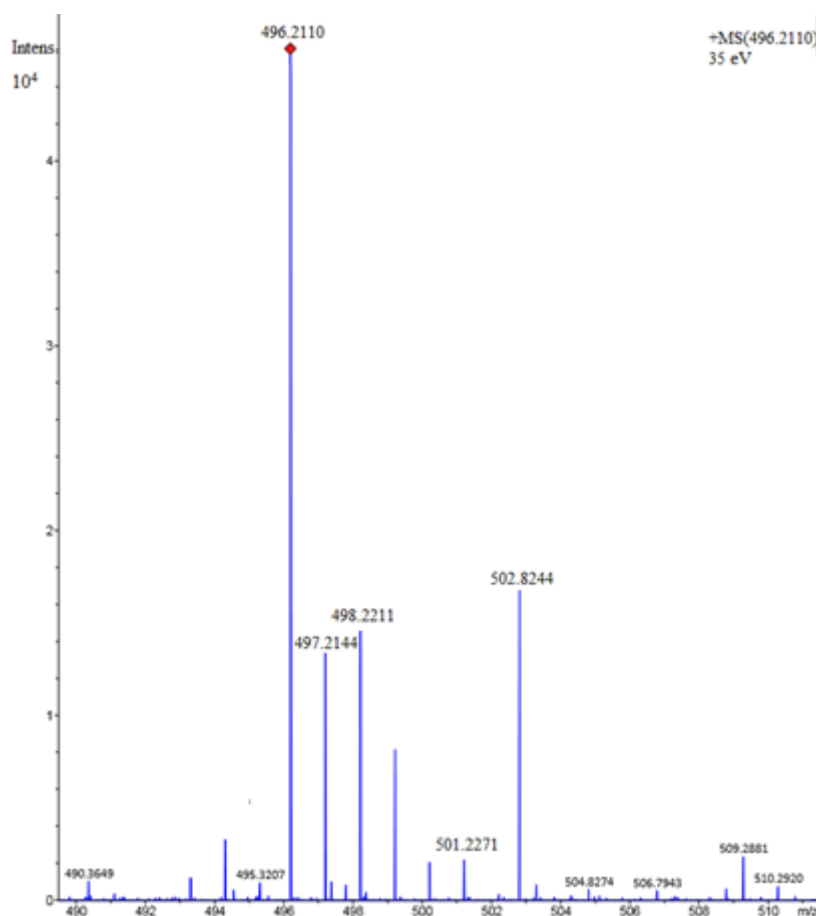
Figura 20. Espectro de massas de alta resolução ampliado do PD 6 obtido pelo sistema LC-MS-TOF no modo ESI $+$.



Fonte: autoria própria

O PD 5 ($T_r = 7,25$ min), apresentou perfil de massas que evidenciou um pico base de 496 m/z $[M + H]^+$, e perfil isotópico de moléculas monoclорadas (figura 21). No entanto, diferentemente do que foi observado para os PDs 3 e 4, este apresentou pico base 496 m/z $[M + H]^+$ e não 498 m/z $[M + H]^+$.

Figura 21. Espectro de massas de alta resolução ampliado do PD 5 obtido pelo sistema LC-MS-TOF no modo ESI +.



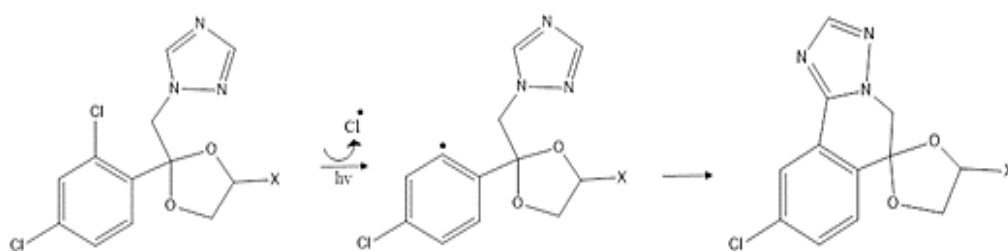
Fonte: autoria própria.

Além das reações de redução e substituição, as moléculas expostas à fotodegradação estão sujeitas à formação de radicais altamente reativos através da clivagem da ligação C-halogênio. Soldevila e Bosca (2012), demonstraram a formação de radicais de fluoroquinolonas em água após exposição a UVA, através da quebra da ligação do átomo de flúor do anel quinolônico. Nardi et al. (2014), realizaram estudo que evidenciou a formação de radicais reativos após reações de fotodesalogenação do itraconazol. Segundo o autor, a perda de cloro é seguida de outros eventos, que dependem do solvente utilizado neste tipo de avaliação. Em bons solventes doadores de H, os principais produtos de degradação seriam formados pela desalogenação redutiva, reação marcada pela perda de cloro e ganho de hidrogênio nas posições orto e/ou para, como descrito anteriormente. Já em solventes que agem como pobres doadores de H, o

principal produto de degradação formado surge do ataque do grupo triazol ao radical arila formado.

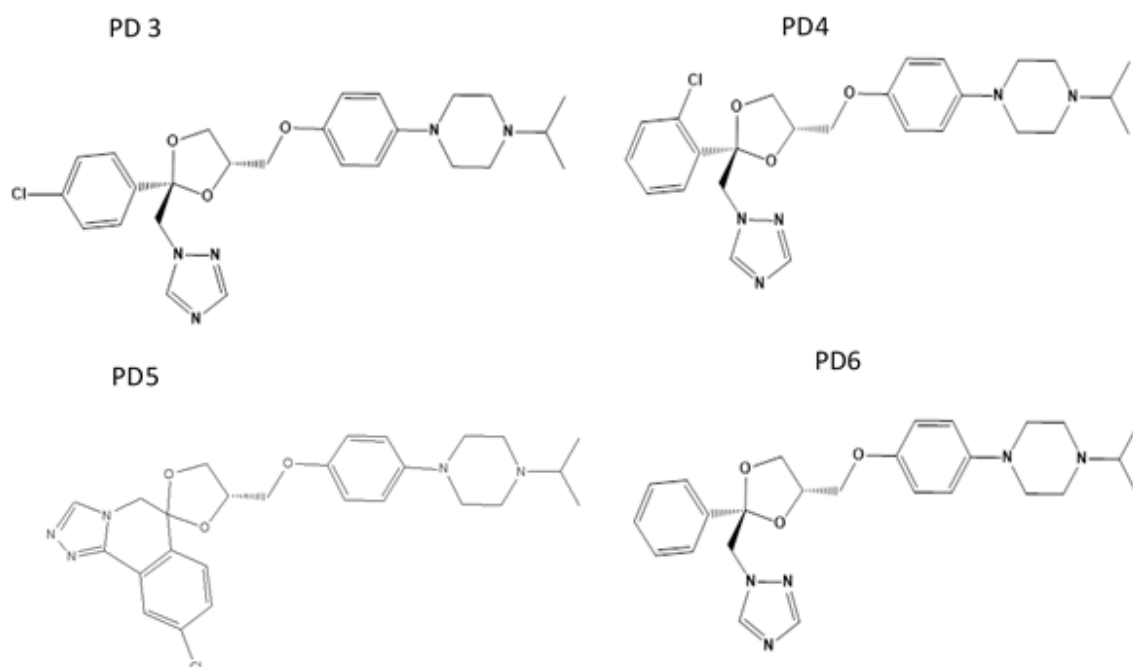
Dessa forma, acredita-se que o PD 5 seja formado através da quebra direta da ligação C-Cl, com posterior ciclização. A figura 22 traz uma representação do esquema mecanístico para fotodegradação via radical para o TCZ e a figura 23 traz as estruturas propostas para os PDs 3, 4, 5 e 6, obtidos através da fotodegradação.

Figura 22. Esquema representativo de fotodegradação para formação do PD5 através da via radicalar.



Fonte: adaptado de NARDI et al., (2014).

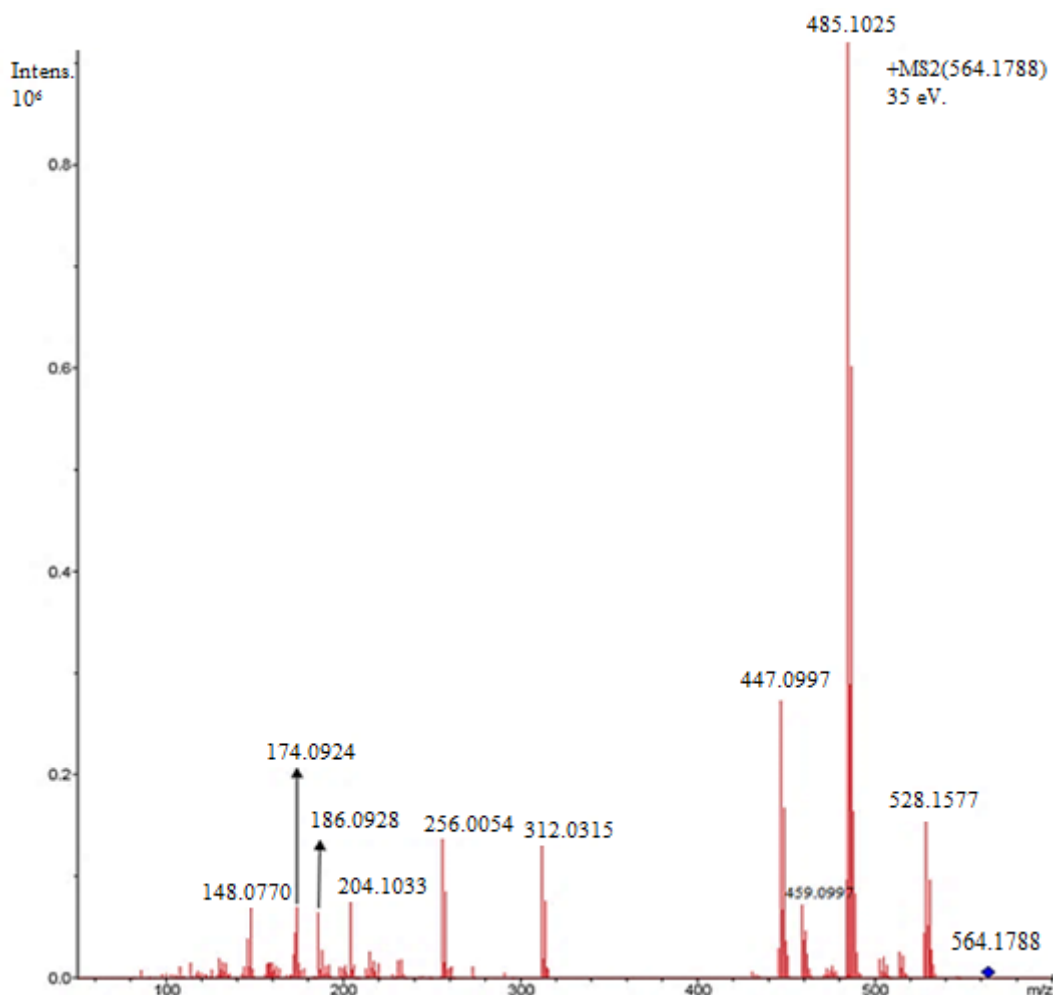
Figura 23. Estruturas propostas para os produtos de degradação 3, 4, 5 e 6.



Fonte: autoria própria a partir do software ChenDraw Ultra.

5.5 PERFIL DE FRAGMENTAÇÃO

Figura 24. Espectro MS/MS de alta resolução do PD1 obtido pelo sistema LC-MS-TOF no modo ESI +.

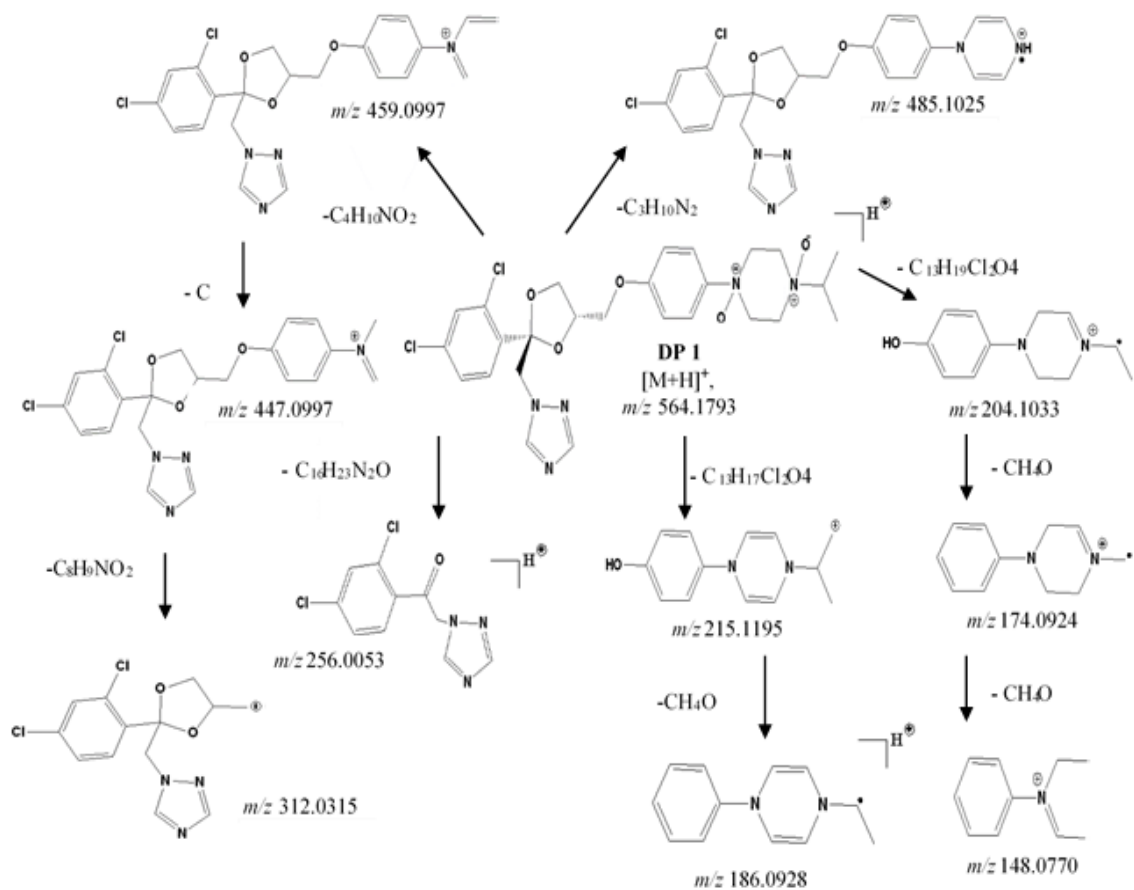


Fonte: autoria própria.

MS/MS do DP1 [(M + H)⁺, m/z 564]. O espectro de massa do DP1 [(M + H)⁺] mostra os íons produto em 528 m/z (perda de 2 H₂O de 564 m/z), 485 m/z (perda de C₃H₁₀N₂ de 564 m/z), 459 m/z (perda de C₄H₁₀NO₂ de 564 m/z), 256 m/z (perda de C₁₆H₂₃N₂O de 564 m/z), 204 m/z (perda de C₁₃H₁₉Cl₂O₄ de 564 m/z), 215 m/z (perda de C₁₃H₁₇Cl₂O₄ de 564 m/z), 447 m/z (perda de C de 459 m/z), 312 m/z (perda de C₈H₉NO₂ de 447 m/z), 186 m/z (perda de CH₄O de 2015 m/z), 174 m/z (perda de CH₄O de 204 m/z) e 148 m/z (perda de CH₄O de 174 m/z). O espectro MS/MS mostra instantânea perda de duas moléculas de 2 H₂O o que indica a possibilidade de degradação do produto N-óxido.

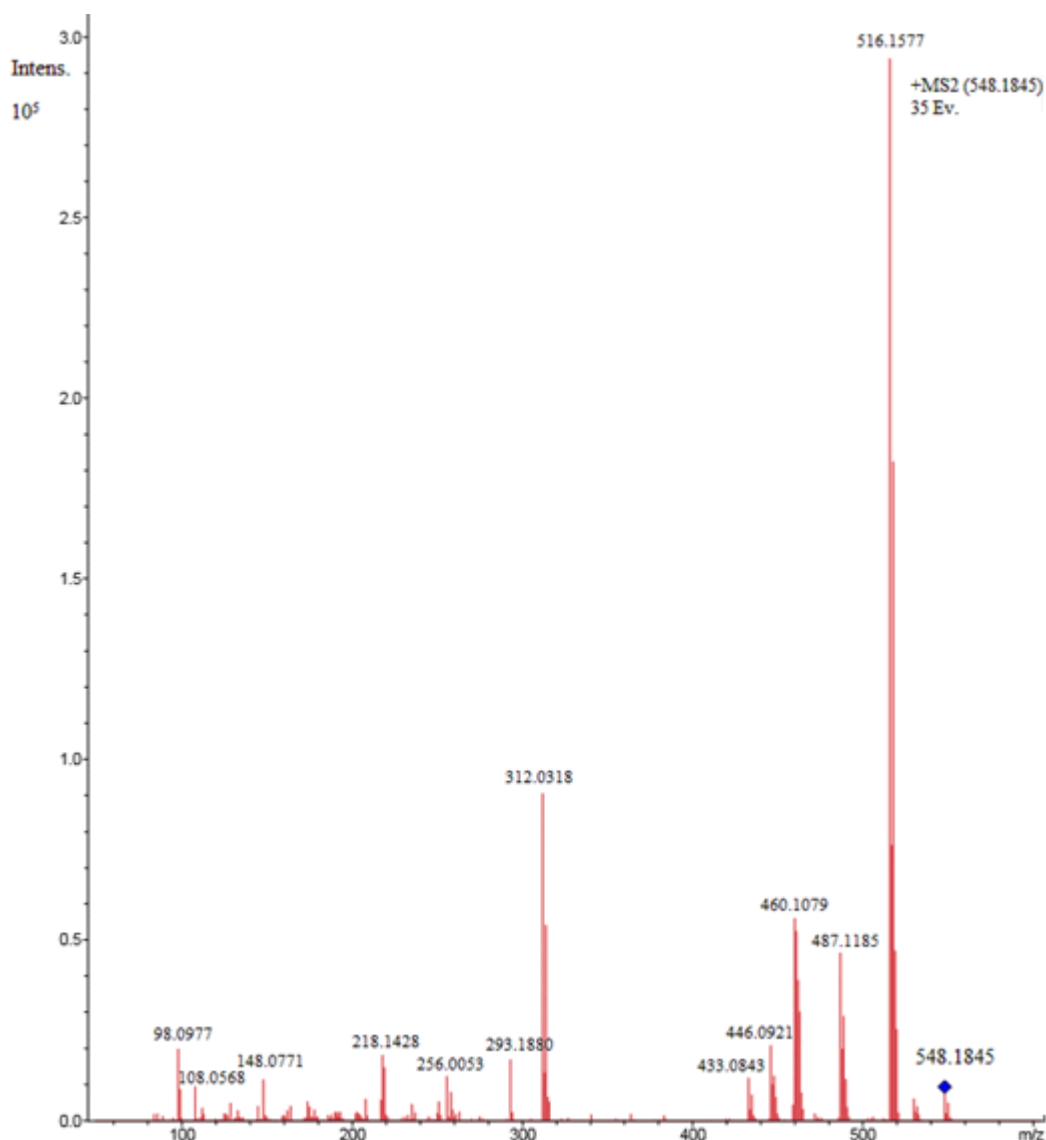
Figura 25. Caminho de fragmentação ESI/MS/MS proposto para PD 1.

Faltando a estrutura do 528



Fonte: autoria própria.

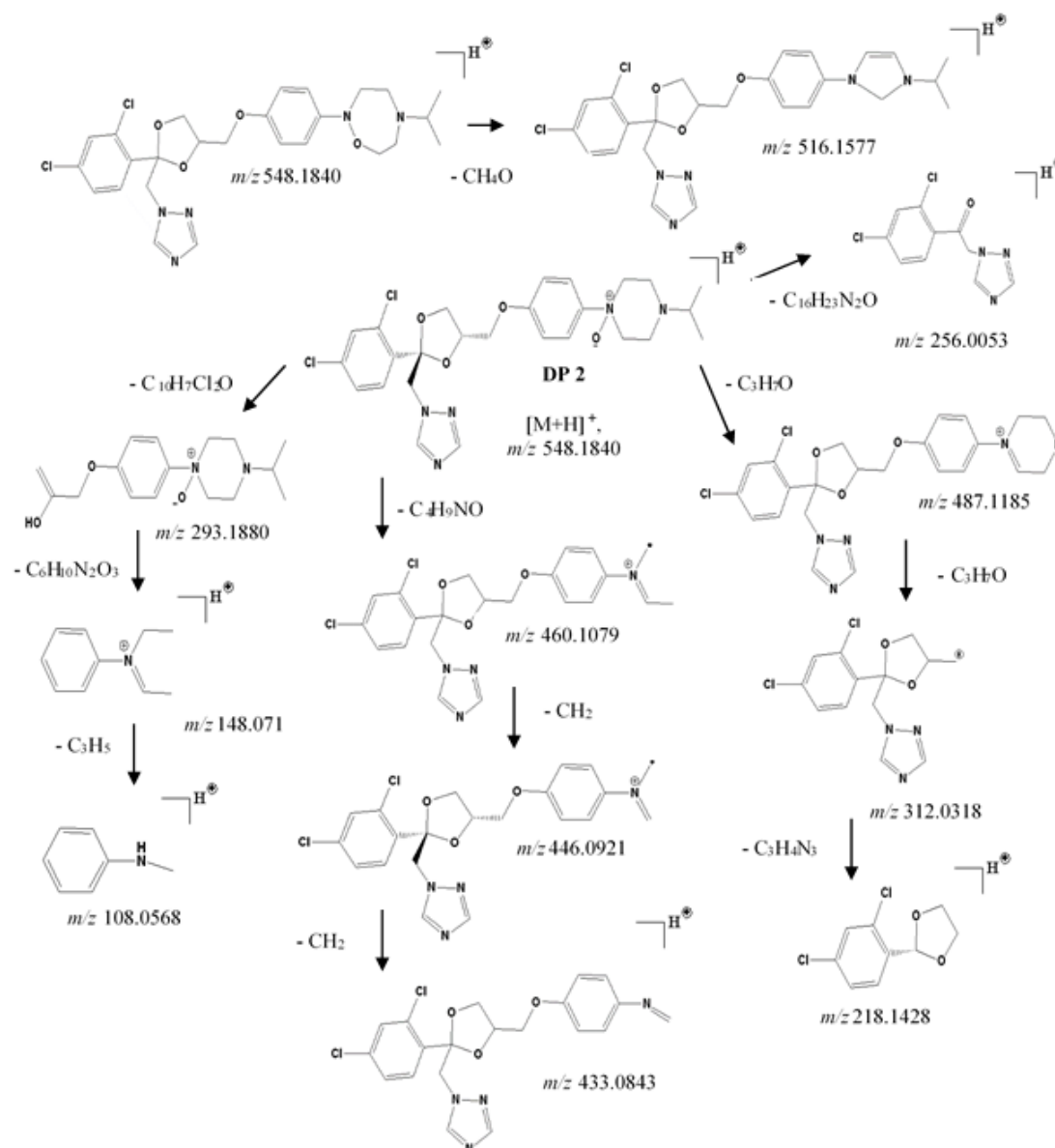
Figura 26. MS2 de alta resolução do PD2 obtido pelo sistema LC-MS-TOF no modo ESI +.



Fonte: autoria própria

MS/MS do DP2 $[(M + H)^+]$, m/z 548]. O espectro de massa do DP2 $[(M + H)^+]$ mostra os íons produto em 516 m/z (perda de CH_4O do produto intermediário 548 m/z), 487 m/z (perda de C_3H_7O de 548 m/z), 460 m/z (perda de C_4H_9NO de 548 m/z), 293 m/z (perda de $C_{10}H_7Cl_2O$ de 548 m/z), 256 m/z (perda de $C_{16}H_{23}N_2O$ de 548 m/z), 312 m/z (perda de C_3H_7O de 487 m/z), 218 m/z (perda de $C_3H_4N_3$ de 312 m/z), 446 m/z (perda de CH_2 de 460 m/z), 433 m/z (perda de CH_2 de 446 m/z), 148 m/z (perda de $C_6H_{10}N_2O_3$ de 293 m/z), 108 m/z (perda de C_3H_5 de 148 m/z).

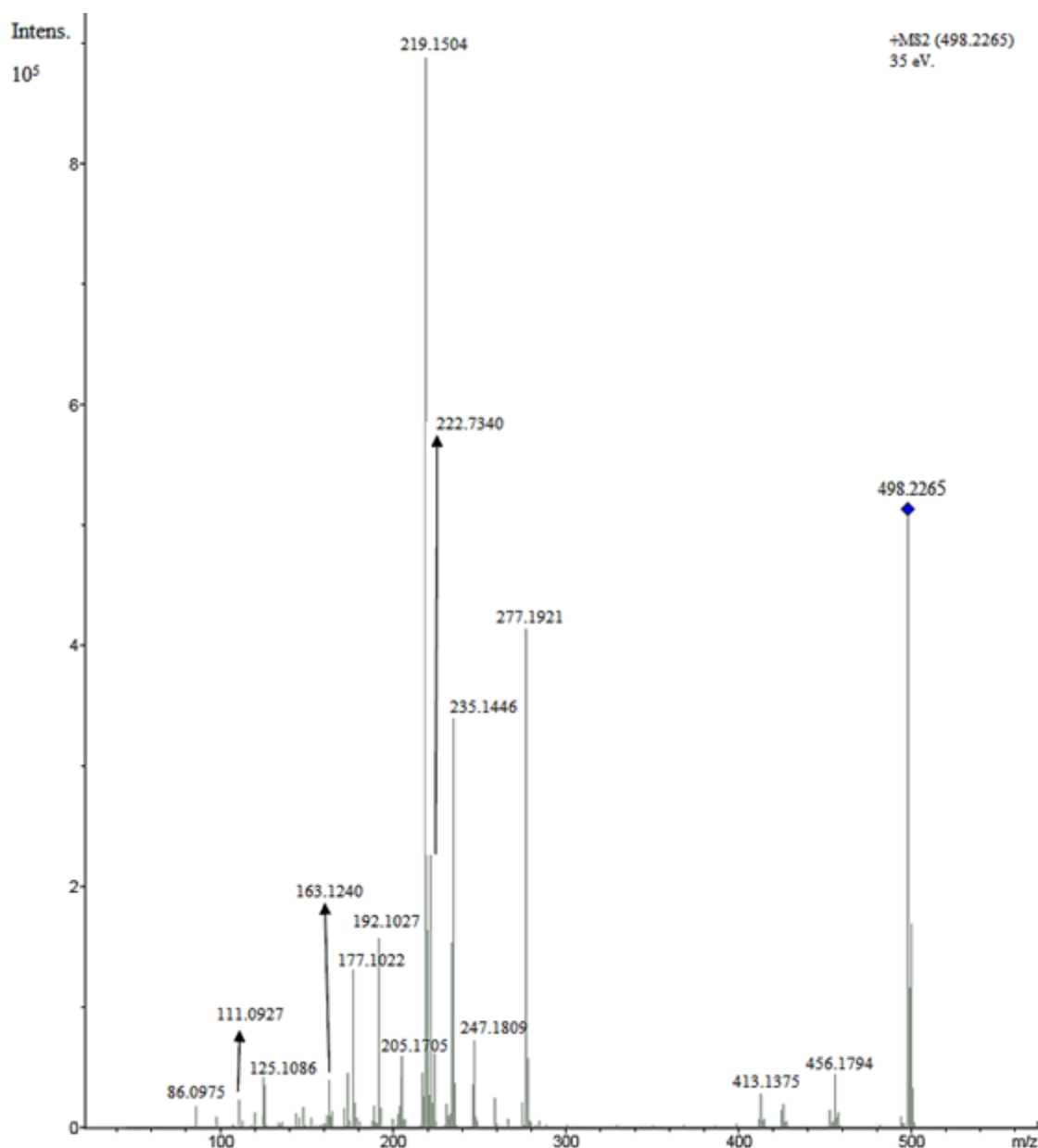
Figura 27. Caminho de fragmentação ESI/MS/MS proposto para PD 2.



Fonte: autoria própria

O espectro MS/MS mostrado na figura 26, evidenciou alta abundância do fragmento 516 m/z , o que pode ser explicado pela inserção do átomo de oxigênio do grupamento N-óxido no anel piperazina do PD 2, seguido da perda de metanol do composto intermediário 548 m/z . Tal mecanismo também é descrito por Kalariya et al. (2005), para o vilazodone e por Chavan et al. (2018), para o TCZ.

Figura 28. MS2 de alta resolução do PD 3 e 4 obtido pelo sistema LC-MS-TOF no modo ESI +.

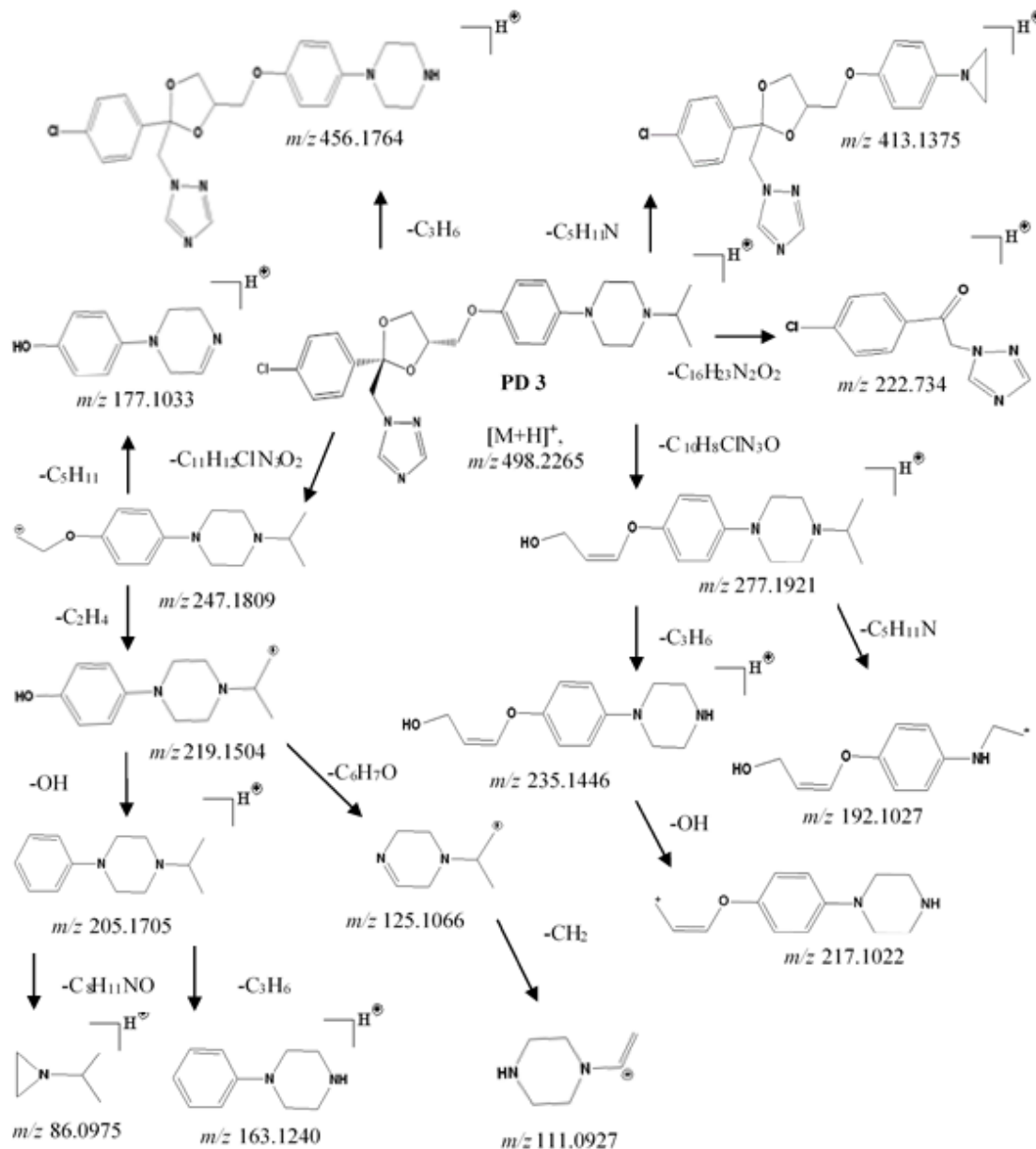


Fonte: autoria própria

MS/MS do DP3 e PD4 $[(M + H)^+]$, m/z 498]. O espectro de massa do DP3 e PD4 $[(M + H)^+]$ mostram os íons produto em 456 m/z (perda de C_3H_6 do produto intermediário 498 m/z), 413 m/z (perda de $C_5H_{11}N$ de 498 m/z), 277 m/z (perda de $C_{10}H_8N_3O$ de 498 m/z), 247 m/z (perda de $C_{11}H_{12}N_3O_2$ de 498 m/z), 222 m/z (perda de $C_{16}H_{23}N_2O_2$ de 498 m/z), 235 m/z (perda de C_3H_6 de 277 m/z), 192 m/z (perda de $C_5H_{11}N$ de 277 m/z), 217 m/z (perda de OH de 235 m/z), 219 m/z (perda de C_2H_4 de 247 m/z), 177 m/z (perda de

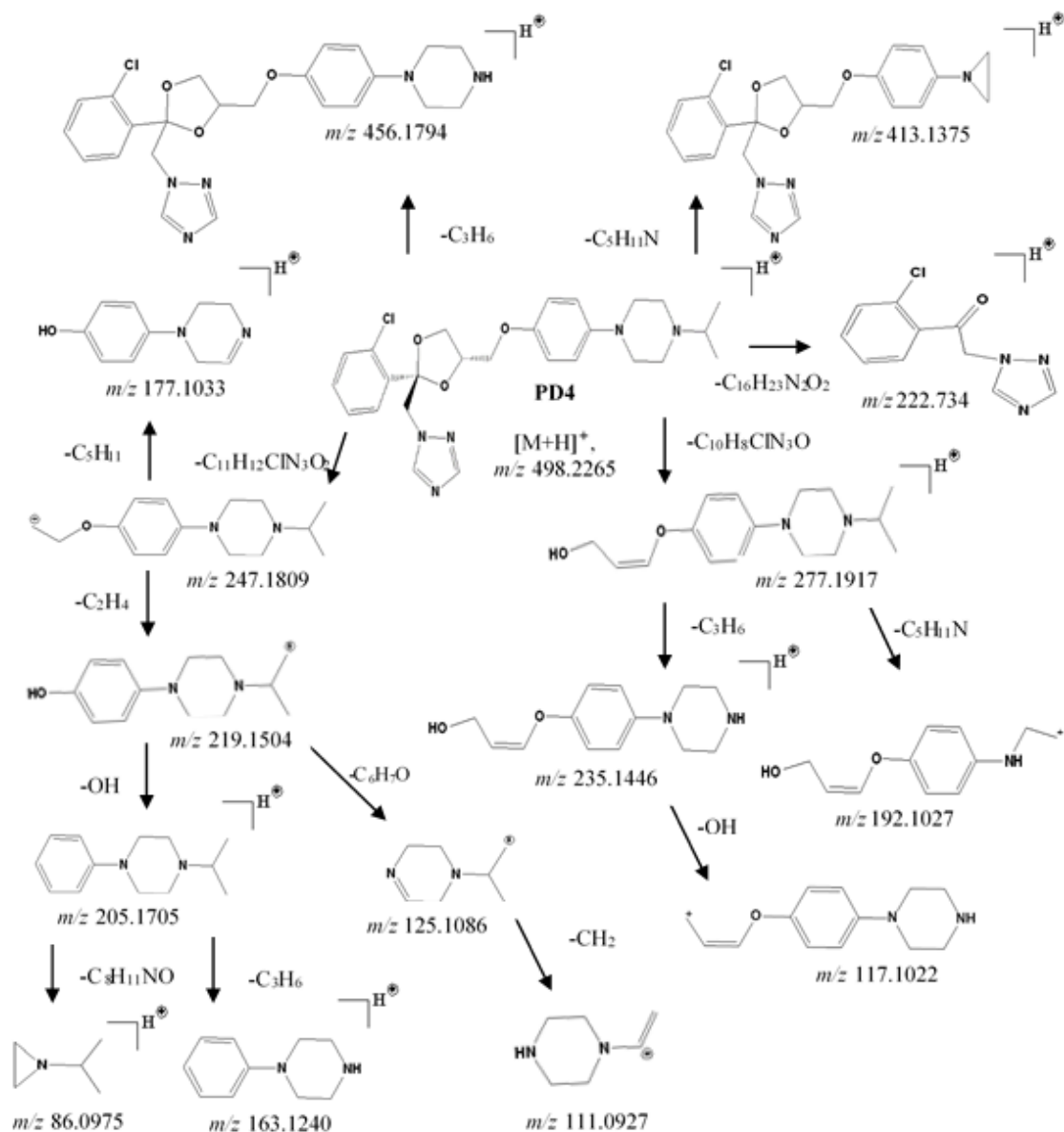
C_5H_{11} de 247 m/z), 205 m/z (perda de OH de 219 m/z), 163 m/z (perda de C_3H_6 de 205 m/z), 86 m/z (perda de $C_8H_{11}NO$ de 205 m/z), 125 m/z (perda de C_6H_7O de 219 m/z), 111 m/z (perda de CH_2 de 125 m/z).

Figura 29. Caminho de fragmentação ESI/MS/MS proposto para PD 3.



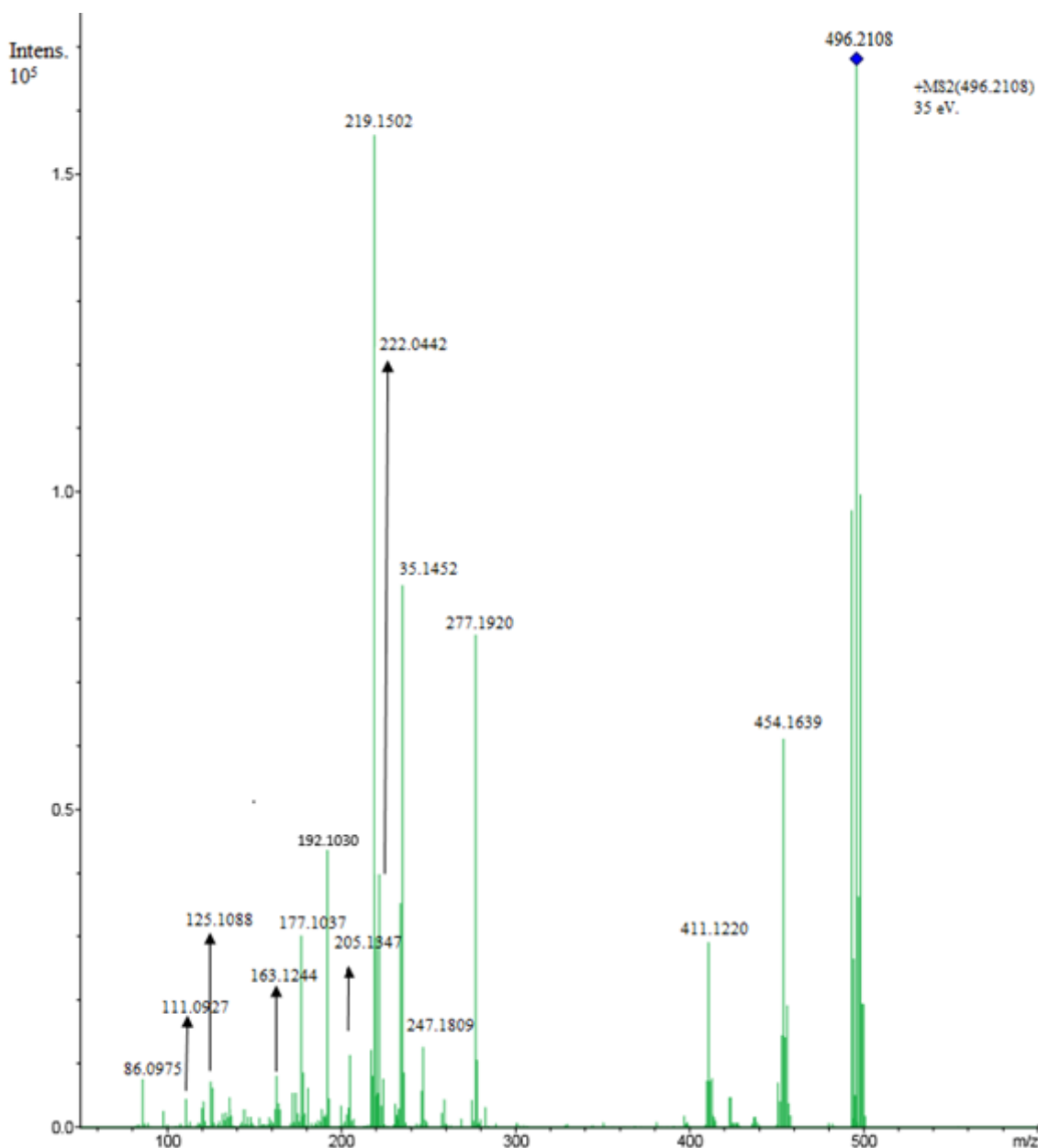
Fonte: autoria própria

Figura 30. Caminho de fragmentação ESI/MS/MS proposto para PD 4.



Fonte: autoria própria.

Figura 31. MS2 de alta resolução do PD5 obtido pelo sistema LC-MS-TOF no modo ESI +.

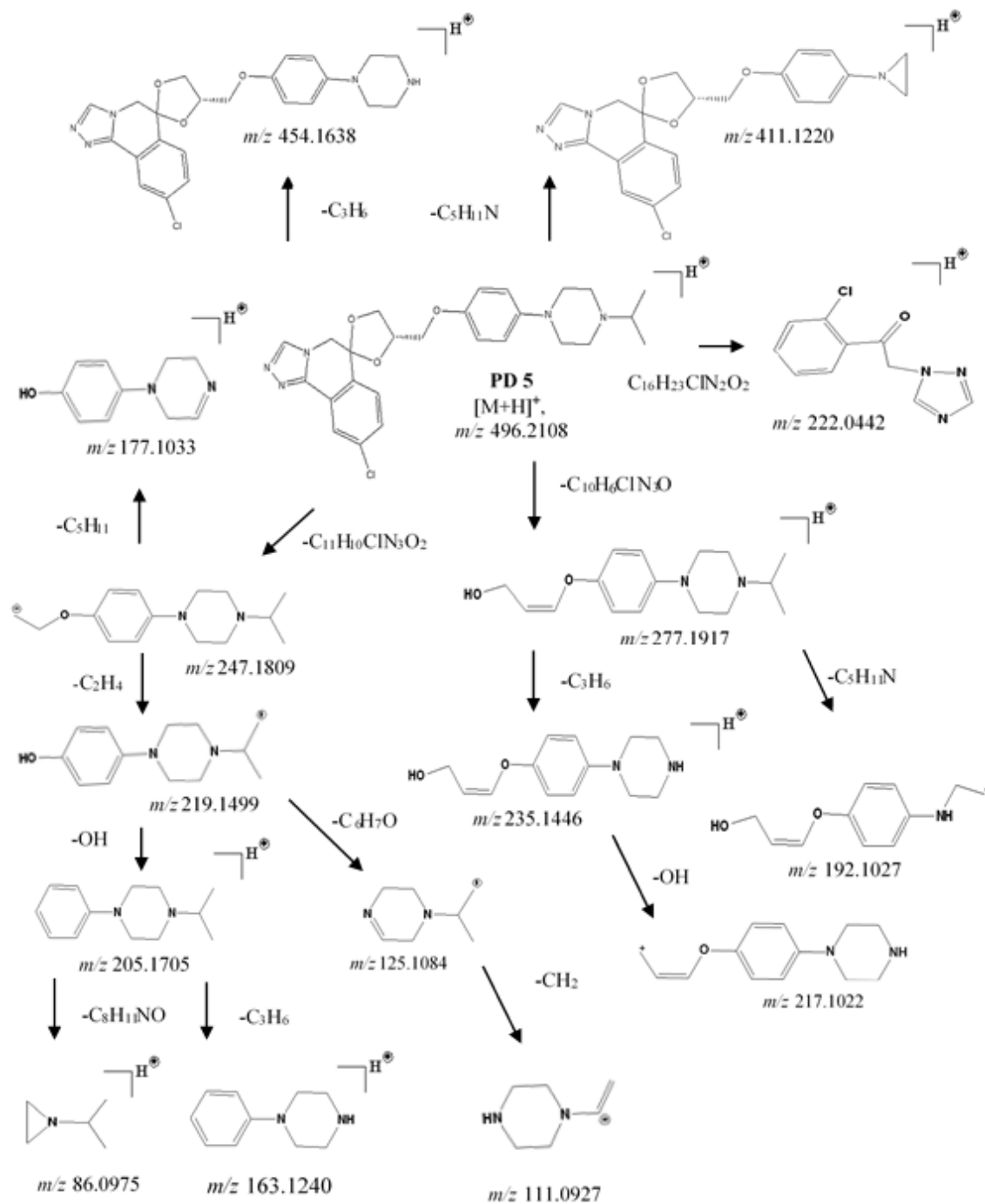


Fonte: autoria própria.

MS/MS do PD5 $[(M + H)^+]$, m/z 496]. O espectro de massa do DP5 $[(M + H)^+]$ mostram os íons produto em 454 m/z (perda de C_3H_6 do produto intermediário 496 m/z), 411 m/z (perda de $C_5H_{11}N$ de 496 m/z), 277 m/z (perda de $C_{10}H_6N_3O$ de 496 m/z), 247 m/z (perda de $C_{11}H_{10}ClN_3O_2$ de 498 m/z), 222 m/z (perda de $C_{16}H_{21}ClN_2O_2$ de 498 m/z), 235 m/z (perda de C_3H_6 de 277 m/z), 192 m/z (perda de $C_5H_{11}N$ de 277 m/z), 217 m/z (perda de OH de 235 m/z), 219 m/z (perda de C_2H_4 de 247 m/z), 177 m/z (perda de C_5H_{11}

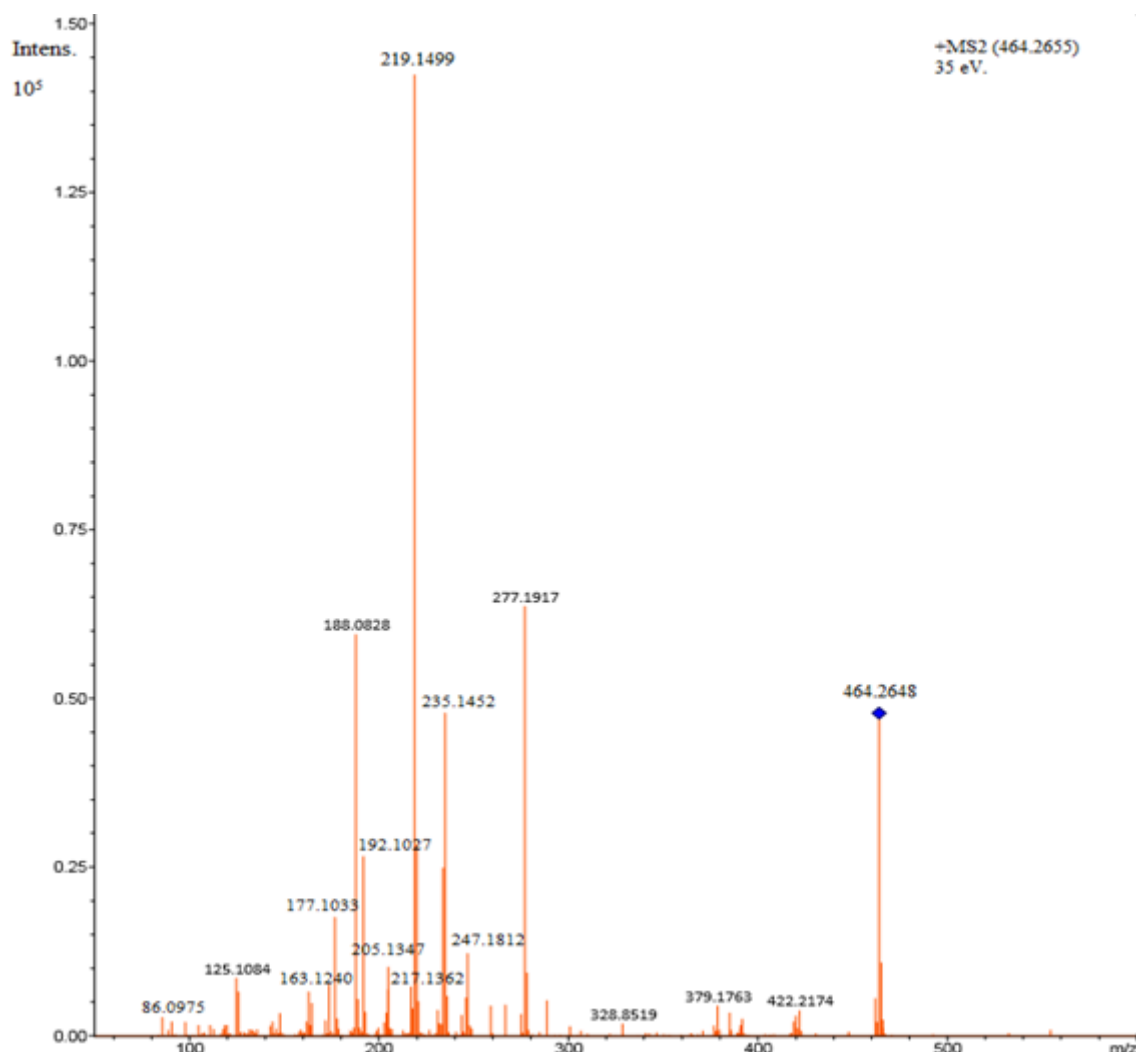
de 247 m/z), 205 m/z (perda de OH de 219 m/z), 163 m/z (perda de C_3H_6 de 205 m/z), 86 m/z (perda de $C_8H_{11}NO$ de 205 m/z), 125 m/z (perda de C_6H_7O de 219 m/z), 111 m/z (perda de CH_2 de 125 m/z).

Figura 32. Caminho de fragmentação ESI/MS/MS proposto para PD 5.



Fonte: autoria própria.

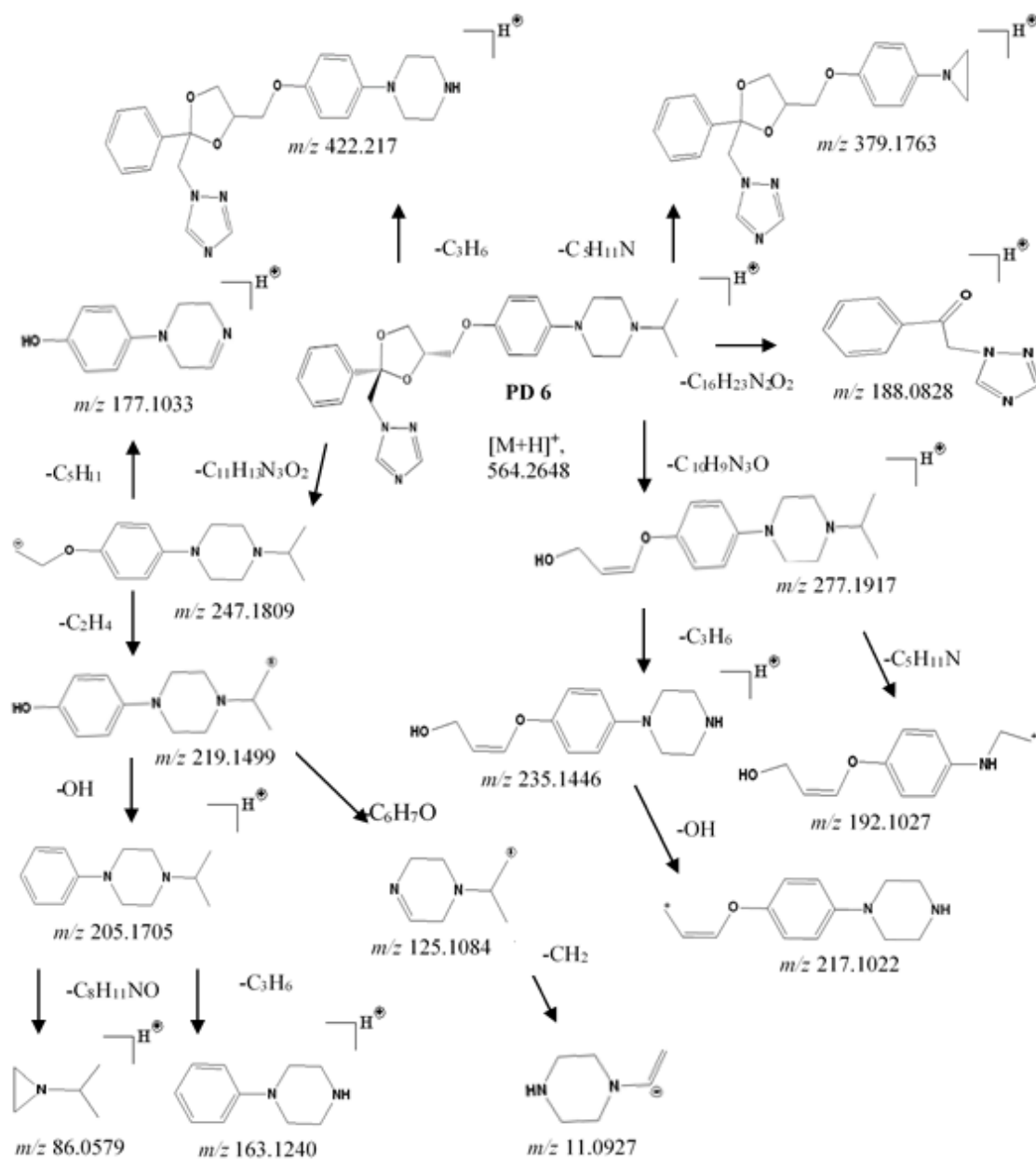
Figura 33. MS2 de alta resolução do PD 6 obtido pelo sistema LC-MS-TOF no modo ESI +.



Fonte: autoria própria.

MS/MS do PD6 $[(M + H)^+]$, m/z 464]. O espectro de massa do DP5 $[(M + H)^+]$ mostram os íons produto em 422 m/z (perda de C_3H_6 do produto intermediário 464 m/z), 379 m/z (perda de $C_5H_{11}N$ de 464 m/z), 277 m/z (perda de $C_{10}H_9N_3O$ de 496 m/z), 247 m/z (perda de $C_{11}H_{13}N_3O_2$ de 463 m/z), 188 m/z (perda de $C_{16}H_{23}N_2O_2$ de 464 m/z), 235 m/z (perda de C_3H_6 de 277 m/z), 192 m/z (perda de $C_5H_{11}N$ de 277 m/z), 217 m/z (perda de OH de 235 m/z), 219 m/z (perda de C_2H_4 de 247 m/z), 177 m/z (perda de C_5H_{11} de 247 m/z), 205 m/z (perda de OH de 219 m/z), 163 m/z (perda de C_3H_6 de 205 m/z), 86 m/z (perda de $C_8H_{11}NO$ de 205 m/z), 125 m/z (perda de C_6H_7O de 219 m/z), 111 m/z (perda de CH_2 de 125 m/z).

Figura 34. Caminho de fragmentação ESI/MS/MS proposto para PD 6.



Fonte: Autoria própria.

6 CONCLUSÃO

A realização deste trabalho permitiu o desenvolvimento de um método analítico capaz de quantificar, com seletividade, o TCZ IFA frente a seus produtos de degradação gerados nas diferentes condições de estresse testadas. O fármaco manteve-se estável nas condições de estresse ácido, básico, fotolítico (para o estado sólido), alta temperatura e alta umidade. Por outro lado, mostrou-se susceptível ao decaimento nas condições de estresse oxidativo, onde foi observada a formação de dois PDs de degradação já mencionados na literatura. Na fotólise foi evidenciada a formação de 4 PDs ainda não relatados.

O método desenvolvido teve aplicabilidade prática para os estudos de cinética de degradação forçada, que evidenciaram comportamentos de segunda e primeira ordem para degradação oxidativa e fotolítica, respectivamente. Além disso, o acoplamento do sistema LC-MS/TOF mostrou-se uma ferramenta eficaz para proposição estrutural de moléculas e foi possível sugerir a formação de N-óxidos na oxidação e de PDs gerados inicialmente pela perda de átomos de cloro na fotólise.

Dessa forma, foi possível ampliar o conhecimento acerca da estabilidade do TCZ IFA e espera-se com isso viabilizar sua segurança e eficácia, através de uma melhor compreensão de possíveis instabilidades em medicamentos à base deste fármaco.

7 PERSPECTIVAS

- Isolar os produtos de degradação gerados na fotólise por cromatografia semipreparativa;
- Prosseguir com a caracterização estrutural por RMN;
- Realizar estudos de citotoxicidade para os PDs isolados;

REFERÊNCIAS

ABDELBARY, A. A. et al. Fabrication of novel ultradeformable bilosomes for enhanced ocular delivery of terconazole: in vitro characterization, ex vivo permeation and in vivo safety assessment. **International journal of pharmaceutics**, v. 513, p. 688-696, 2016.

ABD-ELSALAM, W. H. et al. Formulation and in vivo assessment of terconazole-loaded polymeric mixed micelles enriched with Cremophor EL as dual functioning mediator for augmenting physical stability and skin delivery. **Drug delivery**, v. 25, p. 484-492, 2018.

ADAMS, A. I. et al. LC stability studies of voriconazole and structural elucidation of its major degradation product. **Chromatographia**, vol. 69, p. 115-122. 2009.

AHUJA S. S. **Handbook of modern pharmaceutical analysis**, 1ª edição. New York. Academic Press, 2001.

ALAAT, S. M., et al. Novel lecithin-integrated liquid crystalline nanogels for enhanced cutaneous targeting of terconazole: development, in vitro and in vivo studies. **International Journal of Nanomedicine**, vol. 11, pag. 5531-5547, 2016.

BAERTSCHI, S. W.; ALSANTE, K. M.; TONNESEN, H. H. A critical assessment of the ICH guideline on photostability testing of new drug substances and products (Q1B): Recommendation for revision. **Journal of pharmaceutical sciences**, vol. 99, p. 2934-2940, 2010.

BANKER, G.S.; RHODES, C.T. **Modern Pharmaceutics**. 4ª edição. New York. Marcel Dekker, 2002.

BIAN, X.; ZHANG, J. Photodegradation of sulfadiazine in aqueous solution and the affecting factors. **Journal of Chemistry**, vol. 2016, p. 1-5, 2016.

BIANCHINI, R. M.; CASTELLANO, P. M.; KAUFMAN, T. S. Validated stability-indicating HPLC method for the determination of pridinol mesylate. Kinetics study of its degradation in acid medium. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 48, p. 1151-1160, 2008.

BLESSY, M. R. D. P. et al. Development of forced degradation and stability indicating studies of drugs—A review. **Journal of pharmaceutical analysis**, vol. 4, p. 159-165, 2014.

BHATT, N. P. et al. Development and Validation of Stability Indicating Assay Method and Characterization of Degradation Product for Brexpiprazole Bulk by RPHPLC. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, vol. 10, p. 55-66, 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução - 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, 2015.

BYRNE, J.; VELASCO-TORRIJOS, T.; REINHARDT, R. An RP-HPLC method for the stability-indicating analysis of impurities of both fusidic acid and betamethasone-17-valerate in a semi-solid pharmaceutical dosage form. **Journal of chromatographic science**, v. 53, p. 1498-1503, 2015.

CARSTENSEN, J. T. **Drug Stability, Principles and Practices**, Marcel Dekker, New York (2000).

CANALS, I. et al. Retention of ionizable compounds on HPLC. 8. Influence of mobile-phase pH change on the chromatographic retention of acids and bases during gradient elution. **Analytical chemistry**, v. 73, p. 4937-4945, 2001.

CHASSAIGNE, H.; NORGAARD, J. V.; VAN HENGEL, A. J. Proteomics-based approach to detect and identify major allergens in processed peanuts by capillary LC-Q-TOF (MS/MS). **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 55, p. 4461-4473, 2007.

CHAVAN, B. B.; PRASANNA, G. L.; RADHAKRISHNANAND, P; et al. Development of a stability-indicating UPLC method for terconazole and characterization of the acidic and oxidative degradation products by UPLC-Q-TOF/MS/MS and NMR. **New Journal of Chemistry**, v. 42, p. 10761-10773, 2018.

DE VIJLDER, T. et al. A tutorial in small molecule identification via electrospray ionization-mass spectrometry: The practical art of structural elucidation. **Mass spectrometry reviews**, v. 37, n. 5, p. 607-629, 2018.

DENG, S.; WEST, B. J.; JENSEN, C. J. UPLC-TOF-MS characterization and identification of bioactive iridoids in Cornus mas fruit. **Journal of analytical methods in chemistry**, vol. 2013, p. 1-7, 2013.

DEVI, M. Lalitha, et al. A Validated Stability-Indicating RP-HPLC Assay Method for Amsacrine and its Related Substances. **Journal of chromatographic science**, vol. 49, p. 489-494, 2011.

ENCINAS, S.; BOSCA, F.; MIRANDA, M. A. Phototoxicity associated with diclofenac: a photophysical, photochemical, and photobiological study on the drug and its photoproducts. **Chemical research in toxicology**, vol. 11: vol. 946-952, 1998.

ERMER, Joachim. The use of hyphenated LC-MS technique for characterisation of impurity profiles during drug development. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, vol. 18, p. 707-714, 1998.

FERRER, I. et al. Liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometric analyses for the elucidation of the photodegradation products of triclosan in wastewater samples. **Rapid communications in mass spectrometry**, vol. 18, p. 443-450, 2004.

FERRER, I.; THURMAN, E.M. Liquid chromatography/time-of-flight/mass spectrometry (LC/TOF/MS) for the analysis of emerging contaminants. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, vol. 22, p. 750-756, 2003.

FROMTLING, ROBERT A. Overview of medically important antifungal azole derivatives. **Clinical Microbiology Reviews**, vol 1, p. 187-217, 1988.

FUCINA, Giovana, et al. Development and validation of a stability indicative HPLC-PDA method for kaurenoic acid in spray dried extracts of *Sphagneticola trilobata* (L.) Pruski, Asteraceae. **Talanta**, vol. 101, p. 530-536, 2012.

GARCIA, C. V.; COSTA, G. R.; MENDEZ, A. S. L. Stability-indicating HPLC method for posaconazole bulk assay. **Scientia pharmaceutica**, vol. 80, p. 317-328, 2012.

GLISH, G. L.; VACHET, R. W. The basics of mass spectrometry in the twenty-first century. **Nature reviews Drug discovery**, vol 2, p. 140, 2003.

HASAN, M. et al. Transition metal complexes of naproxen: synthesis, characterization, forced degradation studies, and analytical method verification. **Journal of analytical methods in chemistry**, vol. 2016, p 11-21, 2016.

HASIN, F. Forced degradation and stability indicating studies of imatinib tablete. **World Journal of Pharmaceutical Research**, vol. 6, p. 55-61, 2017.

HASSIB, S. T. et al. Reversed-phase liquid chromatographic method for determination of daclatasvir dihydrochloride and study of its degradation behavior. **Chromatographia**, vol. 80, p. 1101-1107, 2017.

HEERES, J.; HENDRICKX, R.; VAN CUTSEM, J. Antimycotic azoles. 6. Synthesis and antifungal properties of terconazole, a novel triazole ketal. **Journal of medicinal chemistry**, v. 26, n. 4, p. 611-613, 1983.

HUYNH-BA, K. **Handbook of Stability Testing in Pharmaceutical Development**. 1^a edição. Newark, Delaware: Springer, 2008.

ICH- Q1A (R2):**Harmonised Tripartite Guideline Stability Testing of New Drug Substances and Products**, 2003.

ICH. **Stability Testing of New Drug Substances and Products. International Conference on Harmonisation**, 1993.

ICH- Q1 B. **Stability Testing: Photostability testing of new drug substances and product**, 1996.

JAIN, D; BASNIWAL, P. K. Forced degradation and impurity profiling: recent trends in analytical perspectives. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 86, p. 11-35, 2013.

KALARIYA, P. D. et al. Identification of hydrolytic and isomeric N-oxide degradants of vilazodone by on line LC–ESI–MS/MS and APCI–MS. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 102, p. 353-365, 2015.

KENNEDY, B. K.; FRIEDMANN, N. Terconazole cream and suppositories: plasma terconazole following vaginal administration. **Gynäkologisch-geburtshilfliche Rundschau**, vol.25, p. 26-32, 1985.

KLICK, S. et al. Stress testing of drug substances and drug products. **Pharmaceutical Technology**, vol. 29: p. 48-66, 2005.

KOMMANABOYINA, B.; RHODES, C. T. Trends in stability testing, with emphasis on stability during distribution and storage. **Drug development and industrial pharmacy**, vol. 25, 857-868, 1999.

LEPESHEVA, G. I. et al. Sterol 14 α -demethylase as a potential target for antitrypanosomal therapy: enzyme inhibition and parasite cell growth. **Chemistry & biology**, vol. 14, p. 1283-1293, 2007.

LIU, LEI. et al. Stability-indicating reversed-phase HPLC method development and characterization of impurities in vortioxetine utilizing LC–MS, IR and NMR. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, vol. 117, p. 325-332, 2016.

LOTFY, H. M.; ABDEL-ALEEM, A. A.; MONIR, H. H. Stability-indicating high performance liquid chromatographic determination of fluconazole in the presence of its oxidative degradation product kinetic and stress study. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, vol. 36, p. 1013-1029, 2013.

MAERTENS, J. A. History of the development of azole derivatives. **Clinical Microbiology and Infection**, vol. 10, p. 1-10, 2004.

MAHESWARAN, R. et al. FDA PERSPECTIVES-Scientific Considerations of Forced Degradation Studies in ANDA Submissions. **Pharmaceutical Technology**, vol. 36, p. 73-86, 2012.

MICHAEL, K. Forced Degradation Studies: Regulatory Considerations and implementation stress testing studies are conducted to challenge specificity of stabilityindicating and impurity-monitoring methods as part of validation protocol. *Biopharm International*, vol. 18, p. 1-7, 2005.

MILMAN, B. L. Identification of chemical compounds. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, vol. 24, p. 493-508. 2005.

MIRZA, Mohd Aamir; TALEGAONKAR, Sushama; IQBAL, Zeenat. Quantitative analysis of itraconazole in bulk, marketed, and nano formulation by validated, stability indicating high performance thin layer chromatography. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, vol. 35, p. 1459-1480, 2012.

NAAZNEEN, S.; SRIDEVI, A. Development of assay method and forced degradation study of valsartan and sacubitril by RP-HPLC in tablet formulation. **International journal of applied pharmaceutics**, vol. 9, p. 9-15, 2017.

NARAYAN, S.; MANUPRIYA, C. A Review on Stability Studies of Pharmaceutical Products. *International Journal of Applied Pharmaceutical and Biological Research*, v. 2, n. 3, p. 67-75, 2017.

NARAYANAM, M.; SINGH, S. Characterization of stress degradation products of fosinopril by using LC-MS/TOF, MSn and on-line H/D exchange. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, vol. 92, p. 135-143, 2014.

NARDI, G. et al. Generation of reactive aryl radical intermediates in the reductive photodehalogenation of itraconazole. **RSC Advances**, vol. 4, p. 2687-2693, 2014.

NES, W. D. Biosynthesis of cholesterol and other sterols. **Chemical reviews**, vol. 111, p. 6423-6451, 2011.

NGWA, G. Forced degradation as an integral part of HPLC stability-indicating method development. **Drug delivery technology**, vol. 10, p. 56-59, 2010.

NYIRJESY, P.; SOBEL, J. D. Vulvovaginal candidiasis. **Obstetrics and gynecology clinics of North America**, vol. 30, n. 4, p. 671-684, 2003.

O'Donnell PB, B. A. D. Stability of pharmaceutical products. In: Troy DB, ed. Remington: the science and practice of pharmacy. 21^a edição. Philadelphia: The university of the sciences, Cap. 52, p. 1025-1036, 2006.

PALMEIRA FILHO, P. L.; PAN, S. S. K. Cadeia farmacêutica no Brasil: avaliação preliminar e perspectivas. **BNDES Setorial**, vol. 18, p. 3-22, 2003.

PARIKH, S. K., et al. Stability-indicating high-performance thin-layer chromatographic method for analysis of itraconazole in bulk drug and in pharmaceutical dosage form. **Pharmaceutical methods**, vol. 2.2, p. 88-94, 2011.

PELLECCHIA, M. et al. Perspectives on NMR in drug discovery: a technique comes of age. **Nature Reviews Drug Discovery**, vol. 7, p. 738-740, 2008.

RAINVILLE, P. D. et al. Novel application of reversed-phase UPLC-oeTOF-MS for lipid analysis in complex biological mixtures: A new tool for lipidomics. **Journal of Proteome Research**, vol. 6, p. 552-558, 2007.

RAO, B.V et al. A review on stability indicating HPLC method development. **World journal of pharmacy and pharmaceutical sciences**, vol. 4, p. 405-423, 2015.

REDDY, Gosula Venkat Ram, et al. Development and validation of a stability-indicating UPLC method for rosuvastatin and its related impurities in pharmaceutical dosage forms. **Química Nova**, vol. 34, p. 250-255, 2011.

REYNOLDS, D. W. et al. Conducting forced degradation studies. **Pharmaceutical technology**, vol. 26, p. 48-56, 2002.

RIDDHIBEN, P. et al. **International Research Journal of Pharmacy**, v. 2, p. 79–87, 2011.

RINGDAHL, E. N. Treatment of recurrent vulvovaginal candidiasis. **American family physician**, vol. 61, p. 3306-12, 3317, 2000.

RIZK, M. et al. Micellar liquid chromatographic determination of sertaconazole and terconazole in bulk, pharmaceutical dosage forms and spiked human plasma. **Bulletin of Faculty of Pharmacy, Cairo University**, vol. 52, n.1, p. 155-164, 2014.

RUTTKIES, Christoph et al. MetFrag relaunched: incorporating strategies beyond in silico fragmentation. **Journal of cheminformatics**, v. 8, p. 3-18, 2016.

SENGUPTA, P; CHATTERJEE B; TEKADE R. K. Current regulatory requirements and practical approaches for stability analysis of pharmaceutical products: A comprehensive review. **International journal of pharmaceutics**, vol 543, p. 328-344, 2018.

SHAH, Ravi P.; SAHU, Archana; SINGH, Saranjit. Identification and characterization of degradation products of irbesartan using LC–MS/TOF, MS_n, on-line H/D exchange and LC–NMR. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, vol. 51, p.1037-1046, 2010.

SHARMA, M. K.; MURUGESAN, M. Forced Degradation Study an Essential Approach to Develop Stability Indicating Method. **Journal of Chromatography Separations Techniques**, vol. 8, p. 349-352, 2017.

SINGH, S. et al. Forced degradation studies to assess the stability of drugs and products. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, vol. 49, p. 71-88, 2013.

SINKO, P.J. Físico. **Farmácia e Ciencias Farmacêuticas**. 5ª edição. Porto Alegre. Artmed, 2008.

SOLDEVILA, S.; BOSCA, F. Photoreactivity of fluoroquinolones: nature of aryl cations generated in water. **Organic letters**, vol. 14, p. 3940-3943, 2012.

SRIVASTAVA, R. K.; KUMAR, S. S. An updated review: forced degradation study. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science*, v. 6, n. 6, p. 709-26, 2017.

STAFFORD JR, G. C., et al. Recent improvements in and analytical applications of advanced ion trap technology. **International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes**, vol. 60, p. 85-98, 1984.

STOILJKOVIC, Z. Z., et al. Investigation of forced and total degradation products of amlodipine besylate by liquid chromatography and liquid chromatography-mass spectrometry. **Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly**, vol. 20, p. 295-304, 2014.

STOLKER, A. A. M.; BRINKMAN, U. A. T. Analytical strategies for residue analysis of veterinary drugs and growth-promoting agents in food-producing animals - a review. **Journal of chromatography A**, vol. 1067, p. 15-53, 2005.

STULZER, H. K.; SILVA, M. A. S. Estudo de estabilidade de grânulos revestidos e comprimidos contendo Captopril. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, vol. 25, 497-504, 2007.

THUMMAR, M. et al. Validated stability indicating assay method of olaparib: LC-ESI-Q-TOF-MS/MS and NMR studies for characterization of its new hydrolytic and oxidative forced degradation products. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, vol. 160, p. 89-98, 2018.

WASYLASCHUK, W. R. et al. Evaluation of hydroperoxides in common pharmaceutical excipients. **Journal of pharmaceutical sciences**, vol. 96, p.106-116, 2007.

WILEY, W. C.; MCLAREN, Ii H. Time-of-flight mass spectrometer with improved resolution. **Review of scientific instruments**, vol. 26, p. 1150-1157, 1955.