



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

LORENA MARIA BARBOSA DE LIMA

**ESTUDO DE ESTABILIDADE: DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO INDICATIVO
POR CLAE-DAD E CARACTERIZAÇÃO DOS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO EM
HIDROLISE ÁCIDA DO CITRATO DE TAMOXIFENO (IFA) POR LC-MS-TOF**

RECIFE

2022

LORENA MARIA BARBOSA DE LIMA

**ESTUDO DE ESTABILIDADE: DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO INDICATIVO
POR CLAE-DAD E CARACTERIZAÇÃO DOS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO EM
HIDROLISE ÁCIDA DO CITRATO DE TAMOXIFENO (IFA) POR LC-MS-TOF**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Fármacos e Medicamentos.

Orientador (a): Prof. Dr. José Lamartine Soares Sobrinho

RECIFE

2022

L732e	Lima, Lorena Maria Barbosa de. Estudo de estabilidade: desenvolvimento de método indicativo por CLAE-DAD e caracterização dos produtos de degradação em hidrólise ácida do citrato de tamoxifeno (IFA) POR LC-MS-TOF / Lorena Maria Barbosa de Lima – 2022. 75 p. Orientador: José Lamartine Soares Sobrinho Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Recife, 2022. Inclui referências. 1. Cromatografia. 2. Hidrólise. 3. Produtos de degradação. 4. Espectometria de massas. Soares Sobrinho, José Lamartine (orientador). II. Título.	615 CDD (23.ed.) UFPE (CCS 2023 - 273)
-------	---	--

LORENA MARIA BARBOSA DE LIMA

**ESTUDO DE ESTABILIDADE: DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO INDICATIVO
POR CLAE-DAD E CARACTERIZAÇÃO DOS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO EM
HIDROLISE ÁCIDA DO CITRATO DE TAMOXIFENO (IFA) POR LC-MS-TOF**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Fármacos e Medicamentos.

Aprovada em: 27/07/2022

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. José Lamartine Soares Sobrinho (Orientador)

(Universidade Federal de Pernambuco – Presidente e Examinador Interno)

Prof. Dr. Carlos Eduardo Miranda de Souza (Centro Universitário da Vitória de Santo Antão – Examinador Externo)

Prof. Dr. Lucas Pereira Souza da Silva (Universidade Federal de Pernambuco – Examinador Externo)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, sem Ele nada existiria, e a Nossa Senhora da Conceição, por nunca me desamparar e por acolher em seu colo nos momentos que mais supliquei.

A minha mãe, Maria de Lourdes, que faz o possível e o impossível por mim. Pelo amor, compreensão e apoio em todos os momentos, meu eterno amor e gratidão. Te amo, Mainha.

Ao meu padrasto, Luis Gomes, por sempre estar por perto, ajudando em tudo que estava ao seu alcance.

Ao meu irmão, Luis Henrique, que é meu orgulho e exemplo de foco e determinação.

Ao meu esposo, José Rafael, por ser um dos maiores incentivadores para que hoje estivesse aqui. Obrigada por sempre acreditar em mim, pela paciência, companheirismo, e por dividir comigo as alegrias e tristezas.

Ao Prof. José Lamartine, meu orientador, por ter me proporcionado viver essa experiência, e por todas as contribuições científicas e suporte para o desenvolvimento desse trabalho.

À Prof^a. Monica Felts, pela destreza em providenciar o que fosse necessário para a vivência no laboratório, bem como por suas palavras positivas e estimulantes.

Aos meus queridos professores, Eduardo Miranda, pela base analítica na graduação, e Magaly Lyra, que desde o início acreditou em mim e foi minha maior incentivadora, apesar de não ter iniciado essa jornada no fim da graduação, como era de sua vontade. Se hoje estou aqui, devo muito a ela.

Ao meu amigo Francisco de Assis, meu “presente do mestrado”, como costumo chamá-lo. Obrigada por todo companheirismo, carinho, conselhos, choros e risadas. Você foi extremamente importante nessa caminhada, te levarei pra toda minha vida.

Ao meu grande amigo José Izak. Palavras me faltam para expressar a importância que tens pra mim. O seu apoio me fez chegar até aqui. Muito obrigada por nunca soltar a minha mão.

Ao querido Wellithom Viturino, por compartilhar seus conhecimentos e colaborar nos estudos incomuns.

Ao amigo Lucas Danda, que sempre esteve disponível para me ensinar, principalmente no uso do nosso amado cromatógrafo líquido de alta eficiência.

Aos amigos do Núcleo de Controle de Qualidade de Medicamentos e Correlatos (NCQMC), pelas experiências vivenciadas, pelo acolhimento e pelas palavras de incentivo. “Vai dar certo!”

Aos amigos, Macdouglass, Isabel Helena, Dayana Gomes, Elyda Dayane e Romildo Barreto. Nossas conversas, passeios e encontros tornaram esse momento mais leve.

Ao PPGCF, especialmente aos secretários Nerilin e Rilvan, por sempre estarem disponíveis.

À FACEPE, pelo suporte financeiro.

À UFPE, que financia toda essa estrutura.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas, Graças a Deus, não sou o que era antes.”

(KING, 2022)

RESUMO

O Tamoxifeno (TMX) é uma terapia hormonal utilizada para o câncer de mama pertencente ao grupo dos moduladores seletivos dos receptores de estrogênio (SERMs). Compõe a classe II da classificação biofarmacêutica, apresentando baixa solubilidade em água, baixa seletividade e biodisponibilidade, podendo causar efeitos adversos distintos e graves aos pacientes em tratamento. 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. Embora vários métodos espectroscópicos e cromatográficos sejam relatados para a determinação de tamoxifeno sozinho ou junto com seus derivados, metabólitos, ou em matrizes variadas, nenhum relato sobre a identificação dos seus produtos de degradação (PDs) ou impurezas estão disponíveis na literatura até o momento. Portanto, o presente estudo visou desenvolver um MEI por CLAE-DAD, para realizar o estudo de degradação forçada do TMX sob as condições de hidrólise ácida, detectar e quantificar os possíveis PDs, além de utilizar a espectrometria de massas, para caracterização dos PDs gerados nos ensaios forçados. Também foram realizados estudos de cinética de decaimento do teor do TMX. O método cromatográfico desenvolvido usou uma coluna Ascentis® Express C18 (250 x 4,6 mm; 5µm), a $\pm 25,5^{\circ}\text{C}$. A eluição isocrática utilizou Acetonitrila (ACN) e Tampão Fosfato (pH 3,0) 55:45 v/v como fase móvel, volume de injeção de 20 µL e fluxo de 1 mL/min. O TMX mostrou-se suscetível a condições ácidas assim como previsto na literatura e apresentou um decaimento de 66,82% e formação de três PDs. Avaliou-se sua cinética de degradação para definir a ordem de reação em meio ácido (HCL 1,0 M). A reação foi caracterizada como de ordem zero para a condição estudada e a partir dessa análise foi possível definir a constante de velocidade (k) e o cálculo dos parâmetros cinéticos de meia-vida ($T_{1/2}$) e período de vida útil ($T_{90\%}$), onde pode-se afirmar que a velocidade da reação independe das concentrações dos reagentes. O acoplamento do sistema LC-MS foi realizado através da ionização por electrospray em modo positivo, onde foi possível observar o sinal 372,2260 m/z $[M+H]^+$ como pico base do TMX. Para o PD1 e PD2 foi observada a presença de íons moleculares 360.1866 m/z $[M+H]^+$ e 404.2204 m/z $[M+H]^+$, o que nos sugere a perda de dois carbonos e a adição de uma hidroxila no anel aromático no primeiro caso e a adição de duas hidroxilas no anel aromático no segundo caso. Para o PD3, foi possível

observar um perfil de massas semelhante ao pico base do TMX de 372.2305 m/z [M+H]⁺, o que nos leva a deduzir que este produto de degradação é a forma isomérica do fármaco. A partir deste estudo de degradação forçada foi possível conhecer melhor os aspectos envolvidos na estabilidade do TMX e obtiveram-se informações estruturais de seus produtos de degradação que são escassos na literatura. Dessa forma temos mais suporte para prever e avaliar instabilidades em medicamentos à base deste fármaco.

Palavras-chave: cromatografia; hidrólise ; produtos de degradação; espectrometria de massas.

ABSTRACT

Tamoxifen (TMX) is a hormone therapy used for breast cancer belonging to the group of selective estrogen receptor modulators (SERMs). It composes class II of the biopharmaceutical classification, presenting low water solubility, low selectivity and bioavailability, which can cause distinct and serious adverse effects to patients undergoing treatment. On the other hand, the production of medicines requires the performance of studies that ensure the safe and effective use, among these, studies of forced degradation have great prominence. Although several spectroscopic and chromatographic methods are reported for the determination of tamoxifen alone or along with its derivatives, metabolites, or in various matrices, no reports on the identification of their degradation products (PDs) or impurities are available in the literature to date. Therefore, the present study aimed to develop a MEI by HPLC-DAD, to perform the study of forced degradation of TMX under the conditions of acid hydrolysis, detect and quantify the possible PDs, besides using mass spectrometry, to characterize the PDs generated in forced assays. Studies of decay kinetics of tmx content were also performed. The chromatographic method developed used an Ascentis® Express C18 column (250 x 4.6 mm; 5 μ m), at $\pm$ 25.5°C. Isocratic elution used Acetonitrile (ACN) and Phosphate Buffer (pH 3.0) 55:45 v/v as mobile phase, injection volume of 20 μ L and flow of 1 mL/min. The TMX was susceptible to acidic conditions as predicted in the literature and presented a decay of 66.82% and formation of three PDs. Its degradation kinetics was evaluated to define the reaction order in acid medium (HCL 1.0 M). The reaction was characterized as zero-order for the studied condition and from this analysis it was possible to define the velocity constant (k) and the calculation of the kinetic parameters of half-life (T_{1/2}) and useful life (T_{90%}), where it can be affirmed that the reaction velocity is independent of the concentrations of the reagents. The coupling of the LC-MS system was performed by electrospray ionization in positive mode, where it was possible to observe the signal 372.2260 m/z [M+ H]⁺ as the base peak of the TMX. For PD1 and PD2, the presence of molecular ions 360.1866 m/z [M+ H]⁺ and 404.2204 m/z [M+ H]⁺ was observed, suggesting the loss of two carbons and the addition of a hydroxyl in the aromatic ring in the first case and the addition of two hydroxyls in the aromatic ring in the second case. For PD3, it was possible to observe a mass profile similar to the base peak of TMX of 372.2305 m/z [M+ H]⁺, which leads us to deduce that these degradation

products is the isomeric form of the drug. From this study of forced degradation it was possible to better understand the aspects involved in the stability of TMX and obtained structural information of its degradation products that are scarce in the literature. Thus, we have more support to predict and evaluate instabilities in drugs based on this drug.

Keywords: chromatography; hydrolysis; degradation products; mass spectrometry.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Estrutura química do Citrato de Tamoxifeno.....	23
Figura 2 –	Expressões matemáticas que representam as ordens de reação.....	38
Figura 3 –	Expressões matemáticas que representam os parâmetros cinéticos.....	38
Figura 4 –	Lista de reagentes e materiais utilizados.....	40
Figura 5 –	Lista de equipamentos utilizados.....	41
Figura 6 –	Cromatogramas: (a) branco das amostras; (b) padrão; (c) amostras submetidas a HCl 0,1 M.....	48
Figura 7 –	Avaliação dos teores do TMX, produto de degradação e balanço de massas obtido após a hidrólise ácida (HCl a 1,0 M) nos tempos de 0; 12; 24; 48 e 72 horas.....	50
Figura 8 –	Representação gráfica das cinéticas de ordem zero (a), primeira ordem (b) e segunda ordem (c) para a degradação de TMX submetido a hidrólise ácida (HCl 1,0 M)	53
Figura 9 –	Espectro de massas de alta resolução do TMX obtido pelo sistema LC-MS-TOF no modo ESI +.....	56
Figura 10 –	Espectro de massas de alta resolução do PD1 obtido pelo sistema LC-MS-TOF no modo ESI +.....	58
Figura 11 –	Espectro de massas de alta resolução do PD1 obtido pelo sistema LC-MS-MS no modo ESI +.....	59
Figura 12 –	Estrutura química proposta para o PD1 e seu principal fragmento 360 <i>m/z</i>	60
Figura 13 –	Espectro de massas de alta resolução do PD2 obtido pelo sistema LC-MS-TOF no modo ESI +.....	61
Figura 14 –	Estrutura química proposta para o PD2.....	62
Figura 15 –	Mecanismo proposto para a hidroxilação do TMX e formação do PD2.....	63

Figura 16 –	Espectro de massas de alta resolução do PD3 obtido pelo sistema LC-MS-TOF no modo ESI +.....	64
Figura 17 –	Estrutura química proposta para o (Z)-TMX e (E)-TMX.....	65
Figura 18 –	Espectro de massas de alta resolução do PD2 obtido pelo sistema LC-MS-MS no modo ESI +.....	66
Figura 19 –	Caminho de fragmentação ESI-MS-MS proposto para PD2.....	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Condições de armazenamento e condições de realização de estudo de estabilidade de longa duração, de acompanhamento e acelerado para IFA.....	27
Tabela 2 –	Condições de armazenamento e condições de realização de estudo de estabilidade de longa duração e de acompanhamento para medicamentos.....	27
Tabela 3 –	Limites de notificação, identificação e qualificação do(s) produtos(s) de degradação durante o estudo de estabilidade..	30
Tabela 4 –	Parâmetros cromatográficos.....	44
Tabela 5 –	Resultados da adequação do sistema para TMX e os PDs em hidrólise ácida.....	49
Tabela 6 –	Dados das áreas médias obtidas no tempo zero e após exposição, concentração, Log C e 1/C adquiridos em análise da solução do TMX IFA submetido a hidrólise ácida (HCl 1,0 M).....	52
Tabela 7 –	Parâmetros cinéticos calculados para TMX.....	54
Tabela 8 –	Massa teórica e experimental, fórmula molecular e erro (ppm) para p PD1 e PD2.....	68

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN- Acetonitrila

ANVISA- Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ATD- Administração Total Diária

BM- Balaço de Massas

CLAE- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

DAD- Arrando de diodos

DMF- Dimetilformamida

DMSO- Dimetilsulfoxido

DPR- Desvio Padrão Relativo

EM- Espectrometria de Massas

ESI- Ionização por ElectrosprayeV-Eletrovolts

FDA- *Food and Drug Administration*

H₂O₂- Peróxido de hidrogênio

HCl- Ácido clorídrico

HER2- *Human Epidermal Growth Factor Receptor 2*

HPLC- *High Performance Liquid Chromatography*

IARC- *Internetal Agency for Research on Cancer*

ICH-*International Conference on Armonization*

IFA- Insumo Farmacêutico Ativo

INCA- Instituto Nacional do Câncer

IUPAC- União Internacional de Química Pura e Aplicada

K_a- Constante de dissociação

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

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

QbD- *Quality by Design*

r- Coeficiente de Correlação de Pearson

RDC-Resolução de Diretoria Colegiada

RE- Receptor de Estrógeno

RMN-Ressonância Magnética Nuclear

RP- Receptor de Progesterona

SCB- Sistema de Classificação Biofarmacêutica

SERMs- Moduladores Seletivos dos Receptores de Estrogênio

T_{1/2}-Meia-vida de degradação

T_{90%}-Meia vida-útil

TMX- Tamoxifeno

TPE- Trifeniletileno

Tr- Tempo de retenção

UV-Ultravioleta

UPLC- *Ultra High Performance Liquid Chromatography*

VIS- Visível

W/hm²-Watts por hora por metro quadrado

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	OBJETIVOS	20
2.1	GERAL	20
2.2	ESPECÍFICOS	20
3	REFERENCIAL TEÓRICO	21
3.1	CÂNCER DE MAMA	21
3.2	TAMOXIFENO	22
3.3	ESTABILIDADE	25
3.4	TESTES DE DEGRADAÇÃO FORÇADA	28
3.5	CONDIÇÕES DE DEGRADAÇÃO	31
3.5.1	<i>Hidrólise ácida e básica</i>	31
3.5.2	<i>Oxidação</i>	32
3.5.3	<i>Fotodegradação</i>	32
3.6	MÉTODO INDICATIVO DE ESTABILIDADE	33
3.7	ESPECTROMETRIA DE MASSAS POR TEMPO DE VÔO (EM-TOF)	35
3.8	AVALIAÇÃO DO BALANÇO DE MASSAS	36
3.9	CINÉTICA DE DEGRADAÇÃO	37
4	MATERIAIS E MÉTODOS	40
4.1	INSUMO	40
4.2	REAGENTES E MATERIAIS	40
4.3	EQUIPAMENTOS	41
4.4	MÉTODO INDICATIVO DE ESTABILIDADE (MIE)	41
4.4.1	<i>Fase móvel</i>	42
4.5	ESTUDO PRELIMINAR DE DEGRADAÇÃO FORÇADA	42
4.5.1	<i>Solução Mãe</i>	42
4.5.2	<i>Solução Padrão</i>	42
4.5.3	<i>Solução Ácida para degradação</i>	43
4.5.4	<i>Preparo das amostras para degradação por Hidrólise Ácida</i>	43
4.6	PARAMETROS CROMATOGRÁFICOS	43

4.7	ESTUDO DE CINÉTICA DE DEGRADAÇÃO	44
4.8	AVALIAÇÃO DO BALANÇO DE MASSAS	45
4.9	CARACTERIZAÇÃO DOS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS.	45
4.9.1	<i>Parâmetros de análise</i>	45
4.9.2	<i>Preparo do padrão</i>	46
4.9.3	<i>Preparo das amostras para degradação por Hidrólise Ácida</i>	46
5	RESULTADOS	47
5.1	ESCOLHA DO MÉTODO	47
5.2	ESTUDO DE DEGRADAÇÃO FORÇADA DO TAMOXIFENO	47
5.2.1	<i>Hidrólise ácida</i>	48
5.3	PARÂMETROS CROMATOGRÁFICOS	49
5.4	AVALIAÇÃO DO BALANÇO DE MASSA DA DEGRADAÇÃO ÁCIDA	50
5.5	ESTUDO DA CINÉTICA DE DEGRADAÇÃO: DEFINIÇÃO DA ORDEM DE REAÇÃO	51
5.5.1	<i>Cinética de degradação por hidrólise ácida com HCl 1,0 M</i>	51
5.6	CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL POR ESPETROMETRIA DE MASSAS	55
5.6.1	<i>Hidrólise ácida</i>	57
5.7	PERFIL DE FRAGMENTAÇÃO	65
6	CONCLUSÃO	69
	REFERÊNCIAS	70

1 INTRODUÇÃO

O câncer da mama é o tipo de câncer mais comum diagnosticado no mundo, seja em países desenvolvidos ou em desenvolvimento, com cerca de 2,3 milhões de casos anualmente. Para o triênio 2020-2022, estima-se que o Brasil terá 66.280 casos novos de câncer da mama, com um risco previsto de morte de 18.295, sendo 18.068 mulheres e 227 homens, segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA) (INCA, 2019; FATHONI et al., 2022; FIGUEROA et al., 2021).

Essa neoplasia é tipificada pelo crescimento exacerbado de células epiteliais alteradas. Por meio de avaliação do padrão molecular é possível detectar precocemente a doença e caracterizar os subtipos do câncer utilizando três marcadores de identificação, os Receptores de Estrogênio (RE), Receptor de Progesterona (RP) e Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2) presentes nas células neoplásicas (INCA, 2020).

Em se tratando de terapia hormonal, na década de 70 foi descoberta a primeira droga-alvo para o câncer de mama conhecido como tamoxifeno (TMX) e em 1990 o mesmo foi aprovado pelo Food and Drug Administration (FDA) (CHEVALIER et al., 2017). O medicamento com nome de registro Nolvadex® foi o primeiro a ser comercializado utilizando o TMX como insumo farmacêutico ativo (IFA), e tem como indicação pacientes com carcinoma de mama RE e/ou RP positivos, por diminuir as chances de recidiva, aumenta a sobrevida, reduz o risco de um novo câncer na outra mama e de câncer de mama invasivo e também reduz as possibilidades de desenvolvimento do câncer de mama em mulheres de alto risco (SOCIETY, 2017).

A produção de um medicamento traz consigo muitas exigências, uma das principais estabelecidas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), como requisito para obtenção de registro, são os estudos de estabilidade, que tem o intuito de prover evidência quanto à variação da qualidade em função do tempo, fatores ambientais (temperatura, umidade e luz), além de outros fatores relacionados ao próprio produto, como as propriedades físicas e químicas, processo produtivo, materiais de embalagem, tudo isso podem influenciar diretamente na estabilidade do medicamento e acelerar o processo de degradação. Vale salientar a importância desse monitoramento pois é essa instabilidade do IFA ou do medicamento que pode

gerar produtos de degradação (PDs), podendo interferir na eficácia ou redução dos efeitos terapêuticos previstos, bem como elevar os riscos à segurança do paciente em razão da toxicidade (BRASIL, 2019).

Para que se possa avaliar o perfil dos PDs de um IFA, é necessário submetê-lo aos testes de degradação forçada, que consistem em expor o mesmo a condições forçadas que são superiores às estabelecidas para os testes de estabilidade acelerada. Esses testes são de grande relevância para uma satisfatória avaliação e aperfeiçoamento da estabilidade em produtos farmacêuticos, sendo uma ferramenta importante no esclarecimento das rotas de degradação e necessário para o seu desenvolvimento (ICH, 2003; BRASIL, 2015).

Apesar de sua relevância, os guias oficiais e resoluções trazem apenas informações gerais e limitadas, gerando dúvida no momento de execução dos testes. Vale salientar também que cada IFA tem características estruturais particulares que o torna especificamente susceptível a determinada condição, tornando os ensaios distintos. Outro foco é a identificação e elucidação estrutural dos PDs, pois requerem técnicas analíticas complexas, como a espectrometria de massa que, entre outras características, apresentam alto custo e ainda não são tão difundidas, exigindo manipulação e interpretação por profissionais qualificados, tornando-se um desafio para a indústria farmacêutica, principalmente as de menor porte (DE VIJLDER, 2018; SRIVASTAVA, KUMAR, 2017).

Embora vários métodos espectroscópicos e cromatográficos sejam relatados para a determinação de tamoxifeno sozinho ou junto com seus derivados, metabólitos, ou em matrizes variadas como efluentes e plasma, nenhum relato sobre a identificação dos seus produtos de degradação ou impurezas estão disponíveis na literatura até o momento. Portanto, o presente estudo visou desenvolver um método analítico, para realizar o estudo de degradação forçada do TMX sob as condições de hidrólise ácida, e detectar os possíveis PDs através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD), além de utilizar outra técnica analítica, neste caso a Cromatografia Líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS-TOF), para identificação e caracterização dos PDs gerados nos ensaios forçados e elucidar uma possível rota de degradação (ARELLANO et al., 2014; ARGHAVAN et al., 2021; BOBIN-DUBIGEON et al., 2019).

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Avaliar a estabilidade do TMX (IFA) através de estudos de degradação forçada, visando identificar os PDs e elucidar a rota de degradação dos produtos gerados.

2.2 ESPECÍFICOS

- a) Realizar os estudos de degradação forçada do TMX (IFA) em condições de estresse por hidrólise ácida;
- b) Desenvolver um método indicativo de estabilidade capaz de detectar e quantificar o TMX na presença dos seus produtos de degradação por CLAE-DAD;
- c) Identificar e caracterizar os PDs do TMX por LC-MS (TOF) e elucidar rota de degradação;
- d) Determinar a cinética de degradação do TMX em condições de estresse por hidrólise ácida.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 CÂNCER DE MAMA

Câncer é um termo que abrange mais de 100 diferentes tipos de doenças malignas que têm em comum o crescimento desordenado de células com código genético alterado. A carcinogênese é complexa e apresenta três etapas principais: iniciação, promoção e progressão. Na primeira etapa as células ficam expostas a agentes carcinogênicos, que interagem com o DNA dessas espécies resultando em efeitos genotóxicos. A segunda etapa é uma fase prolongada e reversível relacionada com a proliferação de células cancerosas. A terceira etapa é conhecida pela invasão de células tumorais, crescimento e metástase (INCA, 2020; IQBAL et al., 2018).

Considerada uma das doenças mais letais entre os seres humanos, o câncer apresenta grandes números. As estimativas GLOBOCAN 2018 (BRAY et al., 2018) realizadas pela International Agency for Research on Cancer (IARC) previram 18.1 milhões de novos casos no mundo no ano de 2018 e que causaria 9,6 milhões de óbitos. Elas também apontaram o câncer de mama feminino como sendo o segundo tipo de maior incidência, representado por 11,6%. Já no Brasil, o INCA estima para o triênio 2020-2022 que ocorrerão 66.280 novos casos de câncer, excluindo os casos de câncer de pele não melanoma, tornando o câncer de mama responsável por inúmeras mortes (INCA, 2019; FATHONI et al., 2022; FIGUEROA et al., 2021).

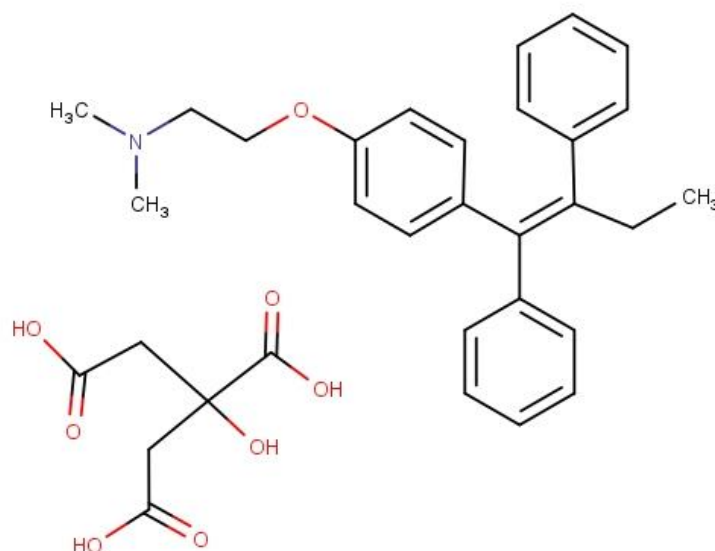
Sendo uma doença heterogênea, o câncer de mama é classificado de acordo com parâmetros clínicos, histopatológicos e moleculares para prever o comportamento do tumor e informar estratégias terapêuticas. A nível molecular geralmente são agrupados pela presença ou ausência de receptores de estrogênio (RE), receptores de progesterona (RP) e Human Epidermal Growth Factor 2 (HER2). Podendo ainda se subdividir em receptores hormonais positivos (RH +), que atuam como fator de crescimento e progressão para as células cancerosas, tumores HER2+ caracterizados pelos níveis mais elevados do que o normal dessa proteína e os tumores negativos, pois não possuem receptores de estrogênio e progesterona, e também não apresentam aumento da proteína HER2 (IQBAL et al., 2018; SILVA, 2016).

Alguns tumores apresentam maior crescimento na presença de estrógenos, dessa forma fármacos que impedem a ação hormonal, podem ser efetivos no tratamento, reduzindo a atuação desses hormônios em diferentes locais do corpo (KARTHIK et al., 2015). De modo geral, a terapia hormonal é realizada através do uso de substâncias semelhantes ou supressoras de hormônios, antagonistas, impedindo que os estrógenos se liguem a seus receptores para atuar como fator de crescimento das células mamárias malignas (ABOTALEB et al., 2018; SILVA, 2016).

3.2 TAMOXIFENO

Na década de 70 foi descoberta a primeira droga-alvo para o câncer de mama pertencente ao grupo dos moduladores seletivos dos receptores de estrogênio (SERMs), conhecido como Tamoxifeno (TMX) ou segundo IUPAC, 2-[4-[(Z)-1,2-diphenylbut-1-enyl]phenoxy]-N,N-dimethylethanamine. Esse Trifeniletileno (TPE) apresenta fórmula molecular $C_{26}H_{29}NO$, que, quando associado ao seu sal com fórmula $C_6H_8O_7$, possui fórmula $C_{26}H_{29}NO.C_6H_8O_7$ (Figura 1). A massa molecular exata do TMX é 371,2249 g/mol, e a do citrato de tamoxifeno é 563,6 g/mol. Apresenta-se como um pó cristalino branco, com densidade de 0,55-0,65 g/L, ponto de fusão em torno de 97°C e coeficiente de partição (log P) de 7,1. Solúvel em solventes orgânicos como etanol, metanol, dimetilsulfóxido (DMSO), dimetilformamida (DMF) e acetonitrila e baixa solubilidade em água. Dessa forma, de acordo com o Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB) o TMX pertence à classe II, sendo um fármaco de baixa solubilidade e alta permeabilidade nas membranas plasmáticas. É uma base fraca (pKa 8,85) e com a diminuição do pH, o tamoxifeno altera a sua conformação, havendo aumento na constante de dissociação (K_a), fornecendo um monocatión na molécula do fármaco ($TMXH^+$), no átomo de nitrogênio, gerando carga positiva (CHEVALIER et al., 2017; KEVADIYA et al., 2012; SILVA, 2020).

Figura 1 - Estrutura química do Citrato de Tamoxifeno.



Fonte: autoria própria.

O TMX foi aprovado pela primeira vez em 1977 pela FDA para o tratamento de mulheres com câncer de mama metastático, e nos anos seguintes, para o tratamento adjuvante do câncer de mama (CHEVALIER et al., 2017). Foi originalmente desenvolvido como uma pílula anticoncepcional, mas acabou estimulando o crescimento folicular e demonstrou ser tão eficaz quanto o Clomifeno na indução da ovulação em pacientes inférteis anovulatórias. Hoje, é usado para tratar todos os estágios do câncer de mama com receptor de estrogênio positivo em mulheres na pré-menopausa e pós-menopausa, como também na terapia hormonal para câncer de mama masculino (HUGHES-DAVIES et al., 2009; SOCIETY, 2017; TSUIKI et al., 1984).

É o Insumo Farmacêutico Ativo (IFA) do medicamento de registro Nolvadex® do laboratório AstraZeneca, que é comercializado na forma do sal de Citrato de Tamoxifeno, nas apresentações de comprimidos de 10mg, duas vezes ao dia, ou 20mg uma vez ao dia, por via oral. Sendo realizado o tratamento a longo prazo (por 5 anos, podendo estender para 10 anos), reduzindo o risco de recorrência da doença, aumenta a sobrevida, reduz a possibilidade de um novo câncer na outra mama e de câncer de mama invasivo (SOCIETY, 2017).

Os SERMs, citado anteriormente, são um grupo de diversas moléculas não esteroides, caracterizadas por sua capacidade de se ligar aos RE. Eles agem como agonistas ou antagonistas de ER dependendo do tipo de célula e tecido alvo, embora

efeitos independentes do receptor de estrogênio também tenham sido descritos. Como antagonista, o TMX inibe a proliferação das células cancerígenas nos tecidos mamários; sua ação como agonista se dá a nível ósseo, prevenindo a osteoporose; atua como agonista no útero, elevando o risco de hiperplasia endometrial e malignidade (FERNÁNDEZ-SUÁREZ et al., 2021; MANOEL, 2021; WONG et al., 2021).

O TMX inibe competitivamente a ligação do estrogênio ao seu receptor, o que é crítico para sua atividade nas células do câncer de mama. Seu uso causa uma diminuição no fator de crescimento tumoral alfa e no fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 e um aumento na globulina de ligação aos hormônios sexuais, limitando a quantidade de estradiol livre. Estudos mostram que essas mudanças reduziram os níveis de fatores que estimulam o crescimento do tumor (JORDAN, 1993).

Esse SERM também demonstrou induzir apoptose em células positivas para receptores de estrogênio. Acredita-se que essa ação seja resultado da inibição da proteína C quinase, que impede a síntese de DNA. Teorias alternativas para o efeito apoptótico do TMX vêm do aumento de aproximadamente 3 vezes nos níveis de íons cálcio intracelular e mitocondrial após a administração ou a indução do fator de crescimento tumoral β (RADIN; PATEL, 2016)

O TMX é uma pró-fármaco que requer ativação metabólica para realizar sua atividade farmacológica. A conversão ocorre principalmente a nível hepático pela enzima citocromo P450, através de desmetilação e hidroxilação, gerando vários metabólitos, principalmente o 4-OH-tamoxifeno, N-desmetiltamoxifeno, e endoxifeno (4-OH-N-desmetiltamoxifeno) que são notavelmente mais potentes do que o próprio fármaco original. A principal via é a N-desmetilação do TMX pelas enzimas CYP3A4 e CYP3A5, resultando na formação de N-desmetiltamoxifeno. O N-desmetiltamoxifeno pode ser hidroxilado pelo CYP2D6 em endoxifeno, um metabólito muito potente em termos de atividade antiestrogênica com altos níveis plasmáticos. Outra via metabólica é a hidroxilação do tamoxifeno em 4-OHtamoxifeno pelo CYP2D6. A atividade antiestrogênica do 4-OH-tamoxifeno é aproximadamente 30 a 100 vezes maior que a do TMX e comparável à do endoxifeno, no entanto, as concentrações plasmáticas de 4-OHtamoxifeno em humanos são cerca de seis vezes menores que as do endoxifeno (PASSOS et al., 2016; SOUZA et al., 2011).

O TMX é rapidamente absorvido após administração oral, atinge a concentração sanguínea máxima em 4-7 horas e um estado de equilíbrio dinâmico após 4-6 semanas de uso. Sua excreção ocorre principalmente através das fezes, e a meia-vida de eliminação é de aproximadamente 7 dias, calculada para o fármaco em si, enquanto que para o N-desmetiltamoxifeno, o principal metabólito circulante, é de 14 dias (AstraZeneca UK Limited).

Embora seja benéfico no tratamento do câncer de mama, seus efeitos adversos incluem: sintomas da menopausa, ondas de calor, sangramento vaginal, prurido vulvar, corrimento vaginal, menstruação irregular, toxicidade ocular, eventos tromboembólicos, trombocitopenia ou leucopenia, complicações ginecológicas, câncer endometrial (baixo grau), hiperplasia e pólipos endometriais, cistos ovarianos (AstraZeneca UK Limited).

O uso do TMX não é recomendado durante a gestação, uma vez que existem relatos de um pequeno número de abortos espontâneos, defeitos congênitos e morte fetal após seu uso, apesar de nenhuma relação causal ter sido estabelecida. Devido a isso, as mulheres devem ser informadas dos riscos potenciais para o feto, caso engravidem durante o tratamento ou dentro de 9 meses após o término da terapia. O mesmo se aplica a lactantes, ainda que não se tenha comprovação que é excretado no leite materno, seu uso não é recomendado. A decisão entre suspender a amamentação ou descontinuar o uso do TMX deve levar em consideração a importância do medicamento para a mãe (AstraZeneca UK Limited).

3.3 ESTABILIDADE

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) estabilidade farmacêutica é definida como sendo a capacidade do produto farmacêutico manter suas propriedades químicas, físicas, microbiológicas e biofarmacêuticas dentro dos limites especificados durante todo o seu prazo de validade (OMS, 1996). 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).

Na indústria farmacêutica, os estudos de estabilidade são um requisito regulatório necessário para a aprovação de qualquer registro de medicamento, sendo esse um de seus papéis mais importantes. O conhecimento da estabilidade das

moléculas auxilia no desenvolvimento das formulações, que vão desde a análise do melhor adjuvante que deve ser utilizado para promover adequadamente a integridade dos medicamentos até a embalagem que garanta o acondicionamento perfeito para prolongar a vida útil do produto, garantindo assim o controle de qualidade desde a produção até a gestão do usuário (HUYNH-BA, 2009; BLESSY et al., 2013).

Além das condições ambientais como temperatura, umidade e luminosidade, outros fatores podem influenciar diretamente na estabilidade dos medicamentos e acelerar seu processo de degradação, como por exemplo o processo produtivo, interação do fármaco com os excipientes ou até mesmo com os materiais de embalagens utilizados. Essas modificações envolvem diferentes mecanismos e estão diretamente relacionadas aos fatores citados anteriormente. Sendo assim, reações como a de hidrólise, racemização, redução, solvólise, entre outras, podem levar à perda ou redução da atividade farmacêutica, perda da função do excipiente, formação de produtos de degradação, perda da integridade do material de embalagem e até mesmo a descaracterização físico-química do medicamento (SILVA, 2019; BRASIL, 2019).

Em 2019, a ANVISA publicou a RDC nº 318, onde estão estabelecidos os critérios para a realização de Estudos de Estabilidade de insumos farmacêuticos ativos e medicamentos, exceto biológicos, e dá outras providências. Esta resolução funciona como guia dos testes de estabilidade, orientando quais devem ser realizados para 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. Nela os estudos de estabilidade formal foram divididos em três tipos: acelerado, longa duração e acompanhamento (BRASIL, 2019).

Acelerado: este estudo é projetado para avaliar possíveis alterações físicas, químicas e microbiológicas, em condições forçadas de armazenamento, visando auxiliar na determinação do Prazo de Reteste do IFA ou Prazo de Validade do IFA e do medicamento e avaliar o efeito de curtas excursões fora dos Cuidados de Conservação preconizados;

Longa Duração: este estudo é projetado para verificação das características físicas, químicas e microbiológicas, nas Condições de Armazenamento e Prazo de Validade propostos, podendo também ser utilizado para definição do prazo de reteste do IFA;

Acompanhamento: este estudo é realizado com o objetivo de monitorar e confirmar o Prazo de Validade para o medicamento ou IFA e o Prazo de Reteste do IFA;

Tabela 1 - Condições de armazenamento e condições de realização de estudo de estabilidade de longa duração, de acompanhamento e acelerado para IFA.

Condição de Armazenamento	Estudo de Longa Duração ou de Acompanhamento	Estudo de Estabilidade Acelerado
-25°C a -15°C	-20°C±5°C	Não há
Refrigeração (2-8°C)	5±3°C	25°C±2°C/60%UR±5%UR ou 30°C±2°C/75%UR±5%UR ou 30°C±2°C/65%UR±5%UR
Temperatura ambiente controlada (entre 15°C e 25°C)	25°C±2°C/60%UR±5%UR	40°C±2°C/75%UR±5%UR
Temperatura ambiente (entre 15°C e 30°C) - proteger da umidade	30°C±2°C/70%UR±5%UR	40°C±2°C/75%UR±5%UR
	30°C±2°C/65%UR±5%UR	
Temperatura ambiente (entre 15°C e 30°C)	30°C±2°C/75%UR±5%UR	40°C±2°C/75%UR±5%UR

Fonte: adaptado de BRASIL, 2019.

Tabela 2 - Condições de armazenamento e condições de realização de estudo de estabilidade de longa duração e de acompanhamento para medicamentos.

Condição de Armazenamento	Estudo de Longa Duração ou de Acompanhamento	Estudo de Estabilidade Acelerado
-25°C a -15°C	-20°C±5°C	Não há
Refrigeração (2-8°C)	5±3°C	25°C±2°C/60%UR±5%UR ou 30°C±2°C/75%UR±5%UR ou

		30°C±2°C/65%UR±5%UR
Temperatura ambiente controlada (entre 15°C e 30°C) - produtos de base aquosa	30°C±2°C/35%UR±5%UR	40°C±2°C/25%UR±5%UR
Temperatura ambiente (entre 15°C e 30°C) - demais produtos	30°C±2°C/75%UR±5%UR	40°C±2°C/75%UR±5%UR

Fonte: adaptado de BRASIL, 2019.

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, sendo estes os estudos responsáveis por determinar prazo de validade ao produto (BRASIL, 2019).

Os estudos de estabilidade de longa duração e acelerado devem ser realizados nos tempos de 0, 3, 6, 9, 12, 18 e 24 meses e 0, 3 e 6 meses, respectivamente e obtendo resultados dentro dos limites aceitáveis no de longa duração, é dado seguimento com os estudos de acompanhamento que devem ser executados a cada 12 meses (BRASIL, 2019).

Quando se almeja registrar um produto, os mesmos devem apresentar relatório dos estudos de estabilidade acelerada concluído e de longa duração em andamento, dessa forma é concedido um prazo de validade provisório de 12 meses. Havendo mudanças significativas, que se resumem a qualquer resultado fora dos limites especificados na RDC nº 318, durante o período de 3 a 6 meses do estudo de estabilidade acelerado, o prazo de validade provisório pode ser reconsiderado para um tempo menor comparado ao inicial estipulado (BRASIL, 2019).

3.4 TESTES DE DEGRADAÇÃO FORÇADA

Testes de degradação forçada ou também conhecido como testes de estresse, é definido como ensaio de estabilidade para IFA ou produto acabado sob condições

extremas, mais ainda do que aquelas utilizadas para o estudo acelerado. Ele é o principal método utilizado para habilitar o desenvolvimento e a construção do perfil de estabilidade de uma matéria prima e produto final (SILVA, et al., 2009; SRIVASTAVA, KUMAR, 2017; ZHOU et al., 2017).

Quando submetido a uma ferramenta analítica desenvolvida, esta deve ser capaz de detectar, separar e quantificar a maior faixa e quantidade de PDs formados, ainda que nem todos sejam observados nos estudos de estabilidade (acelerada, longa duração e acompanhamento) (BLESSY et al., 2014; LIU et al., 2019; MAHESWARAN, 2012).

Seguindo as orientações da RDC nº 318, esses testes devem proporcionar a degradação em um nível adequado para avaliação da formação de produtos de degradação, sendo este inferior àquele que promoveria à degradação excessiva e completa da amostra (BRASIL, 2019).

A degradação em excesso pode estimular a formação de PDs secundários, ou seja, que não seriam formados durante o período de utilização ou prazo de validade do produto acabado, portanto não apresentam relevância analítica e podem dificultar a análise de PDs predominantes. (SHARMA; MURUGESAN, 2017; TEMBHARE; GUPTA; UMEKAR, 2019).

A RDC nº53, 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. Segundo esta resolução, as empresas fabricantes de medicamentos devem submeter suas amostras às condições de estresse forçado por aquecimento, umidade, solução ácida, solução básica, solução oxidante, exposição fotolítica e íons metálicos. A análise dos resultados deve considerar uma análise do perfil de degradação através da verificação da pureza cromatográfica do pico do IFA e a determinação dos fatores críticos que podem interferir na estabilidade do produto (BRASIL, 2015a).

A resolução ainda traz quando deve ser realizada uma notificação, identificação e qualificação dos PDs gerados ao longo dos estudos de estabilidade, referenciado na administração total diária (ATD) de um determinado fármaco ou no percentual do PD em comparação ao IFA, prevalecendo o mais crítico, tendo como referência a dose máxima diária. Devem constar nas especificações de liberação e estabilidade do

medicamento, os limites de aceitação para cada PD individual e o total de PDs (BRASIL, 2015a).

Tabela 3 - Limites de notificação, identificação e qualificação do(s) produtos(s) de degradação durante o estudo de estabilidade.

Tipos de limites	Dose máxima diária	Limites
Limite de Notificação	≤ 1 g	0,01 %
	> 1 g	0,05 %
Limite de Identificação	< 1 mg	1,0% ou 5 μ g ATD, o que for menor
	1 mg – 10 mg	0,5% ou 20 μ g ATD, o que for menor
	10 mg – 2 g	0,2% ou 20 mg ATD, o que for menor
	> 2 mg	0,10 %
Limite de Qualificação	< 10 mg	1,0% ou 50 μ g ATD, o que for menor
	10 mg – 100 mg	0,5% ou 200 μ g ATD, o que for menor
	> 100 mg – 2 g	0,2% ou 3 mg ATD, o que for menor
	> 2 g	0,15 %

(*ATD = Administração total diária de um produto de degradação)

Fonte: adaptado de BRASIL, 2015a.

Os limites de identificação correspondem aos valores acima do qual um PD deverá ter sua estrutura química identificada. Os limites de notificação são valores acima do qual um PD deverá ser reportado no(s) estudo(s) de estabilidade e por fim os limites de qualificação são valores acima do qual um PD deverá ser qualificado. (BRASIL, 2015a).

Para que os PDs sejam classificados como qualificados eles devem preencher no mínimo, um dos três requisitos descritos a seguir: ser um metabólito encontrado durante estudos em animais e humanos; a quantidade observada e o limite de

aceitação proposto para um PD não ultrapassar o limite adequado observado em estudos de toxicidade ou estiverem justificados na literatura ou em compêndios oficiais (BRASIL, 2015a).

3.5 CONDIÇÕES DE DEGRADAÇÃO

3.5.1 Hidrólise ácida e básica

As reações de hidrólise são definidas como um conjunto de reações de decomposição de um composto químico utilizando como solvente a água. Em contrapartida, a utilização de um catalisador ácido ou básico viabiliza uma aceleração do ataque a grupos funcionais ionizáveis que se encontram nas moléculas provocando modificações estruturais (BLESSY et al., 2013; SENGUPTA; CHATTERJEE; TEKADE, 2018).

Nas hidrólises ácida e básica, alguns reagentes são utilizados com maior frequência para acelerar essas reações, são eles: o ácido clorídrico (HCl) e o hidróxido de sódio (NaOH) respectivamente, que são os principais responsáveis pela geração de produtos de degradação primários na faixa desejável. A seleção do tipo e as concentrações de ácido ou base dependem da estabilidade da molécula a cada meio; porém devem manter uma faixa entre (0,01 M- 5,0 M), para ambos (NAAZNEEN, SRIDEVI, 2017; SINGH et al., 2013; RAO et al., 2015).

Estas avaliações devem iniciar em temperatura ambiente e com as concentrações dos agentes mais baixas e caso não ocorra degradação satisfatória, pode-se recorrer ao aquecimento elevando-se a temperatura gradativamente, como também as concentrações. Recomenda-se não exceder os testes por um intervalo de tempo superior a 7 dias (ALSANTE et al., 2007; SILVA, et al., 2009).

Se o composto em estudo for insolúvel ou apresentar baixa solubilidade em solução aquosa, indica-se o uso de co-solventes orgânicos, que deve ser escolhido dependendo da estrutura da molécula, sendo preferencialmente usados aqueles que compõem a fase móvel do sistema cromatográfico, tais como: acetonitrila, metanol e tetrahidrofurano, para produzir amostras de força cromatográfica semelhante e minimizar a perda de qualidade dos parâmetros cromatográficos de adequabilidade do sistema (BLESSY et al., 2014; SILVA, et al., 2009).

3.5.2 Oxidação

O peróxido de hidrogênio é amplamente utilizado em estudos de degradação forçada, devido seu baixo custo e disponibilidade comparados aos outros agentes. Sua concentração para utilização nos testes pode variar entre 0,1% e 30%, sendo aumentada aos poucos, de acordo com a sensibilidade do IFA, da mesma forma que na condição anterior. Mas nesse caso não é indicado submeter as amostras a altas temperaturas, mesmo se a molécula permanecer estável em altas concentrações de peróxido, visto que a reação apresenta maior risco associado ao aparecimento de oxidantes de radicais hidroxila indesejados. 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 (BAERTSCHI, ALSANTE, REED, 2011; SHARMA, MURUGESAN, 2017).

Um número significativo de IFA's são instáveis em meio oxidativo, portanto a oxidação é considerada uma via importante para a produção de produtos de degradação (HUYNH-BA, 2009; RAO et al., 2015).

Via de regra, o mecanismo de degradação oxidativo implica na transferência de elétrons para formar cátions e ânions reativos. As aminas, fenóis e sulfetos são susceptíveis à transferência eletrônica para formar N-óxidos, hidroxilaminas, sulfonas e sulfóxidos, tornando os IFAs que tem esses grupos funcionais também susceptíveis. Já os compostos que contêm grupos funcionais com hidrogênio lábil como o carbono benzílico, o carbono alílico e o carbono terciário ou as posições α em relação ao heteroátomo formam hidroperóxidos, hidróxidos ou cetona (BLESSY et al., 2014; RAO et al., 2015).

3.5.3 Fotodegradação

O estudo de fotodegradação pode ser considerado dentre os testes de estresse o que apresenta parâmetros de condução mais padronizados, isso se dá pelo fato das agências sanitárias de cada país, usarem como referência em suas resoluções as diretrizes do guia intitulado: Testes de fotoestabilidade para novos IFA's e produtos farmacêuticos, ICH 1QB (ICH, 1996).

É de fundamental importância expor que existe uma diferença entre os testes de fotoestabilidade e de fotodegradação. A fotoestabilidade tem a finalidade de demonstrar que o IFA ou produto acabado, quando exposto à luz, mantém-se dentro das especificações. Esse estudo requer avaliações práticas entre diversos modelos de exposição da amostra (protegida ou não), evitando alterações na formulação do produto. Sendo comprovado que não possui alterações se exposto à luminosidade direta, este é justificável não utilizar material de embalagem com poder de fotoproteção, caso contrário a recomendação da ANVISA é de que se proteja o produto de forma a evitar produtos de degradação pela luz, porém, caso a presença seja inevitável, a quantidade dessas impurezas deve ser monitorada. Por outro lado, a fotodegradação tem por finalidade obter informações a respeito da fotoestabilidade intrínseca da molécula e, portanto, pode ser comparado a um teste de estresse. São testes que desafiam a capacidade de um método indicativo de estabilidade em separá-los, quantificá-los e identificá-los de forma adequada. Neste caso, o IFA ou produto acabado deve sempre ser exposto sem a proteção por embalagem primária e ou secundária (ICH, 1996; BRASIL, 2019).

As diretrizes do ICH 1QB, apresentam os valores quantitativos dos parâmetros específicos para realização dos testes de fotoestabilidade, e que podem ser ajustados para condução da fotodegradação. A intensidade de luminosidade é um dos parâmetros importantes para condução dos dois testes, sendo indicado 1,2 milhão de lux-h (luz visível) e 200 w-h/m² (ultravioleta), para o primeiro e no mínimo duas vezes esse valor com o máximo de 6 milhões de lux-h para o segundo, conforme a extensão da degradação, e com finalidade de garantir a exposição adequada da amostra (ALSANTE et al., 2007; ICH, 1996; BRASIL, 2019).

3.6 MÉTODO INDICATIVO DE ESTABILIDADE

Os métodos indicativos de estabilidade são ferramentas analíticas empregadas na indústria farmacêutica capazes de analisar amostras provindas de estudos de estabilidade, detectando, separando e quantificando o IFA na presença de seus produtos de degradação, mesmo que estes se encontrem em concentrações muito baixas. O mesmo também se aplica ao produto acabado (BAKSHI, 2002; RAWAT, PANDEY, 2015).

O desenvolvimento de um MIE pode se mostrar desafiador pela provável complexidade de amostras obtidas de degradação forçada, sendo esse um estudo necessário para a sua montagem. 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 esse motivo, muitos pesquisadores preferem aperfeiçoar um método já existente na literatura, melhorando seu alcance. Outro ponto importante é conhecer profundamente todas informações relacionadas às 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).

Um dos métodos analíticos mais utilizados e que na maioria das vezes consegue alcançar os objetivos já citados é a cromatografia líquida de alta eficiência com detector de ultravioleta visível por meio de arranjo de diodos (CLAE UV-VIS/DAD, em inglês: *High performance liquid chromatography*, HPLC). Sua utilização advém da versatilidade proporcionada, a partir da variação de seus componentes (fase móvel, coluna cromatográfica e outros parâmetros analíticos) é possível separar compostos estruturalmente variados (MAGGIO, VIGNADUZZO, KAUFMAN, 2013, RAO, 2015).

O monitoramento de parâmetros de adequabilidade do método utilizado como: resolução, pureza do pico, assimetria e número de pratos teóricos, traz mais qualidade e eficiência na separação cromatográfica. Apesar da CLAE-DAD ser um dos métodos mais utilizados, existe uma limitação da sua parte, que decorre da possibilidade da formação de PDs que não possuem grupos cromóforos ou que são voláteis, isso justifica a necessidade de empregar outros detectores junto ao CLAE, como o espectrômetro de massas (EM), que é capaz de viabilizar informações estruturais claras, por apresentar alta resolução, como também a ressonância magnética nuclear acoplada a cromatografia (CLAE-RMN), que assim como a EM, também possui esta aplicação e dessa forma podem auxiliar na diferenciação de PDs com estruturas similares como no caso de epímeros e isômeros (MAHESWARAN, 2012; DEVI, 2011; SINGH et al., 2013).

3.7 ESPECTROMETRIA DE MASSAS POR TEMPO DE VÔO (EM-TOF)

O princípio de operação da Espectrometria de Massa por tempo de voo (EM – TOF) (em inglês, *Time-of-flight mass spectrometry*, MS-TOF), envolve a medida do tempo que um íon leva para viajar da fonte de íons até o detector, sendo considerado um dos métodos mais simples. Basicamente, no TOF, todos os íons recebem o mesmo acréscimo de energia cinética durante uma aceleração rápida, mas como eles têm diferentes valores de massa/carga (m/z), são progressivamente separados em grupos de acordo com a sua velocidade à medida que atravessam a região livre de campo entre a fonte de íons e o detector. Os íons vão em direção ao detector em sequência crescente de acordo com o valor de sua massa/carga, produzindo pulsos elétricos (STAFFORD et al., 1984; STEPHENS, 1946).

Em sua maioria, para se obter massas precisas de um possível analito, faz-se necessário o uso de um calibrante, um composto de massa conhecida, que possa compensar uma ligeira variação devido às alterações de temperatura que pode vir a ocorrer dentro do tudo de voo do equipamento, como também devido às instabilidades das fontes que alimentam o equipamento (FERRER et al., 2003).

A MS-TOF traz consigo uma vasta possibilidade de uso, tornando uma ferramenta analítica relevante para a pesquisa científica, podendo ser usada em caracterização fitoquímica, análise ambiental, estudos de proteômica, lipidômica, metabolismo de fármacos, identificação e quantificação de produtos farmacêuticos e seus produtos de degradação (RAINVILLE et al., 2007; DENG et al., 2013).

Dentre suas vantagens, pode-se elencar algumas como sendo as principais:

- Possibilidade de se obter uma análise completa de varredura de massas ao longo de cada cromatograma gerado;
- Alto poder de resolução da técnica permite a precisão da medição em massa para moléculas pequenas;
- Possibilidade de se obter muitos espectros de massa em tandem ou também chamado de MS2, em uma única injeção;
- 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; GROS; PETROVIC; BARCELO, 2006).

Além dessas vantagens, Ferrer et al. (2003), considera três características como essenciais, que tornam a técnica MS-TOF uma ferramenta poderosa na identificação de compostos desconhecidos, mesmo estando em matrizes complexas. A primeira característica que engrandece é a viabilidade da técnica de coletar informações em uma larga faixa de massas, sem que haja diminuição da sua sensibilidade; em segundo, pela possibilidade de resolver interferências de sinais de interesse com elevado poder de resolução; e por fim pela possibilidade de adquirir precisão satisfatória que possa mensurar a massa de uma possível composição.

3.8 AVALIAÇÃO DO BALANÇO DE MASSAS

O balanço de massas (BM) consiste na obtenção de um valor percentual através da soma da resposta analítica do IFA e de seus PDs em comparação com uma amostra padrão do IFA. Quanto mais próximo a 100% do valor inicial, maior a capacidade do método em quantificar o IFA na presença de seus PDs, levando em conta a margem de erro analítico (DEVI, 2011; BRASIL, 2015b).

A avaliação do BM ajuda a definir se a estratégia analítica utilizada consegue detectar os PDs significantes, porém, diversos fatores dificultam a obtenção de um índice elevado de recuperação dos níveis iniciais, como por exemplo: desenvolvimento de produtos intermediários instáveis que apresentam natureza de absorção diferente da UV, por vias de reações complexas que podem ocorrer de forma paralela, consecutiva ou em cadeia; fator de resposta ineficaz ou desconhecido pela falta de padrões analíticos; picos não detectados devido à falta de grupos cromóforos ou volatilização dos PDs formados; limitação na detecção por UV decorrente da mudança no comprimento de onda (BAKSHI, SINGH, 2002; HUYNH-BA, 2009; SINGH et al., 2013).

Nos casos em que se observa perda substancial de massa, devem ser feitos esforços para contabilizar a massa que falta, no entanto, a FDA reconhece que o balanço de massas 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 (SINGH et al., 2013).

3.9 CINÉTICA DE DEGRADAÇÃO

Cinética em química é definida como o estudo da velocidade das reações em detrimento dos fatores que a influenciam, tais como: pH, temperatura, concentração de reagentes, superfície de contato, catalisadores. Quando aplicada ao contexto farmacêutico, é considerada um dos parâmetros de avaliação de estabilidade de IFAs ou produto acabado que direciona aos estudos de degradação forçada. Também impulsionam novas estratégias a serem usadas na pesquisa e desenvolvimento (P&D) de novas formulações para um controle de qualidade físico-químico adequado tendo como foco uma maior estabilidade da(s) molécula(s) avaliadas (BAERTSCHI; ALSANTE; REED, 2011; CONSTANTINO, 2014; SINKO, 2008).

Mediante os dados coletados nos processos experimentais, é possível estabelecer correlações através de equações matemáticas, a fim de obter uma determinada ordem de reação. A ordem de reação pode ser determinada através do método da substituição, que consiste na identificação da concentração do IFA em cada tempo de exposição e em seguida é elaborado um gráfico a partir do conjunto de dados. O modelo cinético será aquele que apresentar o coeficiente de correlação linear (r) mais próximo da unidade indicadora (FLORENCE, 2011; SINKO, 2008; TEMBHARE, GUPTA, UMEKAR, 2019).

Em geral, estas reações podem ser de ordem zero, quando a velocidade independe das concentrações dos reagentes. Nesse caso, um gráfico de concentração (C) em função do tempo (t) dá origem a uma reta, cuja inclinação corresponde à constante de velocidade da reação (k). Quando a velocidade de reação é proporcional à concentração de um reagente, a reação segue cinética de primeira ordem, obtendo-se uma reta com a representação do logaritmo da concentração ($\log C$) em função do tempo (t). Já a reação de segunda ordem que acontece mais raramente, é quando a velocidade de reação é proporcional ao produto das concentrações de dois reagentes. Para esse tipo de reação, a representação do inverso da concentração ($1/C$) em função do tempo (t) fornece uma reta. No quadro a seguir estão descritas as expressões matemáticas referentes às ordens de reação (SINKO, 2008; TEMBHARE, GUPTA, UMEKAR, 2019).

Figura 2 - Expressões matemáticas que representam 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.

Nas expressões do quadro, C_0 representa a concentração do reagente no tempo zero, C é a concentração final, após determinado tempo de reação (t) e o k é referente a constante da velocidade específica, que posteriormente permitirá calcular os parâmetros cinéticos de tempo de vida útil ($T_{90\%}$), que corresponde ao tempo necessário para que o IFA degrade 10% de sua concentração inicial e o tempo de meia-vida ($T_{1/2}$), intervalo de tempo necessário para que degrade até metade da sua concentração original. As expressões matemáticas para esses parâmetros são diferenciadas dependendo da ordem de reação e estão descritas no quadro abaixo (SINKO, 2008).

Figura 3 - Expressões matemáticas que representam os parâmetros cinéticos.

Ordem de Reação	Tempo de meia-vida ($T_{1/2}$)	Tempo de vida útil ($T_{90\%}$)
Ordem Zero	$C_0/2k$	$(0,1 \times C_0) / k$
Primeira Ordem	$0,693/k$	$0,16/ k$
Segunda Ordem	$1/ C_0.k$	$1/ (9k \times C_0)$

Fonte: adaptado de SINKO, 2008.

O entendimento da velocidade com o qual o fármaco se decompõe em diferentes concentrações e determinado agente indutor, pode ser um exercício de simples compreensão quando está relacionado a moléculas simples, de baixa complexidade estrutural que possuem reações definidas através de uma única etapa, já para compostos com muitos grupamentos funcionais e cadeias carbônicas

alongadas, em que as reações podem ser processadas paralelamente e seus produtos de degradação podem atuar como agente degradante do próprio IFA, tornam-se mais complexas (ARAÚJO, 2017).

A definição dos tempos de retirada de alíquotas para análise nos estudos de cinética de degradação, cabe ao pesquisador um bom planejamento, de forma a reduzir o gasto de consumíveis momentaneamente entre as análises, sem comprometer a estabilidade analítica. Para isso é importante ter o conhecimento prévio da susceptibilidade do composto em estudo aos reagentes ácidos, básicos e oxidativos, para que não aconteça uma degradação instantânea e não seja possível acompanhar a reação, nem permaneça estável por tempo demasiado, tornando as análises longas e com maior custo (ARAÚJO, 2017).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 INSUMO

O TMX, sob a forma de IFA com lote de número: TC- 20190802, foi cedido pela empresa farmacêutica Pharmapele®. Segundo certificado de análise do fornecedor Lepuge, apresenta doseamento de 99.5%. O IFA foi armazenado em recipiente não metálico, sem contato com a luminosidade e com temperatura entre 15°C e 30°C, como recomendado pelo fornecedor.

4.2 REAGENTES E MATERIAIS

A água ultrapura foi obtida através do purificador de água Milli-Q® (Millipore, Milford, EUA). Os demais reagentes e materiais estão descritos logo abaixo:

Figura 4 - Lista de reagentes e materiais utilizados.

REAGENTES E MATERIAIS	FABRICANTE	LOTE
Acetonitrila	Honeywell Riedel-de Haën™	DX418-BR
Ácido Clorídrico	Alphatec	28143-BL
Ácido Fórmico	ISO FAR	131716
Ácido Fosfórico	-----	-----
Filtro de membrana	Millipore™	B8PN70636
Filtro de seringa	Allcrom	FSNY25045
Fosfato de Potássio Monobásico	Cinética	6048
Seringa 3mL	Descarpack	SSALAA228A

Fonte: autoria própria.

4.3 EQUIPAMENTOS

Todos os equipamentos utilizados foram calibrados e certificados e estão descritos no quadro 4:

Figura 5 - Lista de equipamentos utilizados.

EQUIPAMENTO	MARCA	MODELO
Balança de precisão	Sartorius	CP225D
Banho ultrassônico	Branson	2510R-MT
Coluna	Sigma-Aldrich®	Ascentis® Express C18
Espectrômetro de massas QTOF	Bruker	Impact II
HPLC - DAD	Shimadzu	SPD-M10A
pHmetro	Micronal	B-474

Fonte: autoria própria.

4.4 MÉTODO INDICATIVO DE ESTABILIDADE (MIE)

As amostras oriundas dos estudos de degradação foram analisadas por CLAE-DAD, e os dados coletados foram tratados através do *software* Shimadzu LC solution 1.0®. Para o MIE desenvolvido, usou-se uma coluna Ascentis® Express C18 (250 x 4,6 mm; 5µm), a $\pm 25,5^{\circ}\text{C}$. A eluição isocrática foi empregada com Acetonitrila (ACN) e Tampão Fosfato (pH 3,0) na proporção de 55:45 v/v como fase móvel, com detecção de DAD em 236 nm. O volume de injeção foi de 20 µL, com um tempo de retenção entre 4 e 5 min e fluxo de 1 mL/min. O tempo de leitura do método foi de 10 min.

O método desenvolvido como ponto de partida, em comparação com outros métodos descritos na literatura, apresenta algumas vantagens listadas a seguir: tempo de retenção reduzido do TMX; uso de coluna sem grupamentos especiais; tempo de leitura relativamente curto e temperatura ambiente, descartando a necessidade de utilizar forno. Porém, existem alguns pontos menos vantajosos, mas que se fez

necessário diante dos testes realizados, que foi o uso de um solvente de maior custo para a fase móvel e a necessidade de um tampão, que em uso contínuo e dependendo da concentração acarretam maior desgaste ao sistema cromatográfico, mas, se preparado corretamente e seguindo as recomendações de limpeza do equipamento, esses danos são mínimos.

4.4.1 Fase móvel

A fase móvel utilizada foi constituída pela combinação de ACN e Tampão Fosfato pH 3.0, numa eluição isocrática de 55:45. Para preparar o tampão fosfato, pesou-se 3.042g de KH_2PO_4 (Fosfato de potássio monobásico), o qual foi dissolvido em 1L de água ultrapura. O pH foi ajustado com 189 μL de H_3PO_4 (Ác. Fosfórico) e em seguida filtrou-se no filtro a vácuo, utilizando membrana HV durapore em PVDF, 0,45U 47MM, Millipore™.

4.5 ESTUDO PRELIMINAR DE DEGRADAÇÃO FORÇADA

Para avaliar a sensibilidade do TMX em condição de estresse ácido, foram realizados estudos preliminares degradando a matéria-prima. O TMX foi exposto inicialmente a hidrólise ácida utilizando HCl a 1,0 M, por um período de 120h a $\pm 25^\circ\text{C}$. Este estudo foi desenhado para monitorar no decorrer do tempo, o teor final de fármaco e a produção de possíveis produtos de degradação.

4.5.1 Solução Mãe

Para preparar a solução mãe, pesou-se 10mg de TMX IFA, transferiu-se para um balão volumétrico de 100mL, adicionou-se ACN (grau HPLC) e submeteu-o à degaseificação por 5 minutos em banho ultrassônico. Ao término o volume foi aferido, obtendo-se a concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$.

4.5.2 Solução Padrão

Para preparar a solução usada como padrão, pipetou-se 2,4mL da solução mãe em balões de 10mL distintos e completou-se o volume com tampão fosfato. As

alíquotas das soluções foram retiradas com seringas e filtradas através de unidades filtrantes Allcrom PVDF-45/25, com tamanho de poro de 0,45 μm , tendo como acondicionante os vials, para posterior leitura cromatográfica. Dessa forma obteve-se uma concentração final de 24 $\mu\text{g/mL}$. Todo experimento foi feito em triplicata.

4.5.3 Solução Ácida para degradação

Foi utilizado uma solução de ácido clorídrico (HCl) 1,0 M, preparada de acordo com a Farmacopeia Brasileira 6ª edição, volume 1, 2019. Para que mesmo depois de diluída no momento da degradação ela mantivesse 1,0 M, foi necessário um ajuste na concentração. Dessa forma foram utilizados 17,4mL de HCl 37% em 50mL de água ultrapura, obtendo no final uma solução de HCl 4,16M.

4.5.4 Preparo das amostras para degradação por Hidrólise Ácida

O arranjo das amostras foi construído com o intuito de permitir uma degradação superior à 10% e inferior àquela que levaria a degradação total do ativo (BLESSY *et al.*, 2014). Considerando esta situação, o teste de degradação forçada foi preparado.

As amostras de TMX submetidas a hidrólise ácida foram retiradas da solução mãe, sendo alíquotas de 6 mL equivalentes a 24 μg , transferidas para balões de 25 mL, em seguida foi adicionado 6 mL da solução ácida de HCl 1,0 M e completado seus volumes com tampão fosfato pH 3.0. Alíquotas dessas amostras foram coletadas em 12, 24, 48, 72, 96 e 120 horas. As soluções foram retiradas com seringas, filtradas através das unidades filtrantes e acondicionadas em vials para posterior análise cromatográfica. Todo experimento foi realizado em triplicata.

4.6 PARAMETROS CROMATOGRÁFICOS

Os parâmetros cromatográficos como: pureza de pico, fator de capacidade (k'), número de pratos teóricos (N), fator de cauda (T) e resolução (R), foram avaliados com a finalidade de monitorar o desempenho da coluna e avaliar a capacidade do

método em mensurar o TMX na presença dos produtos de degradação e impurezas. Na tabela 4 estão listados as expressões matemáticas e especificações referentes a esses parâmetros.

Tabela 4 - Parâmetros cromatográficos.

Parâmetros cromatográficos	Expressão matemática	Especificações
Pratos teóricos (N)	$N = 16(tr/wb)^2$	$N \geq 2000$
Fator de capacidade (K')	$K' = t_r - t_m / t_m$	$0,5 \leq k' \leq 20$
Fator de calda (T)	$T = w0.05 / 2 f$	$0,9 \leq T \leq 1,5$
Resolução (R)	$R = 2 (t_2 - t_1) / w_1 + w_2$	$\geq 1,5$
Pureza de pico	Calculado pelo software	Valores próximos à 1,0

Fonte: adaptado de ARAUJO, 2017.

4.7 ESTUDO DE CINÉTICA DE DEGRADAÇÃO

A cinética de degradação foi realizada em condições ácida por uma solução de HCl a 1,0 M, pelo fato do TMX ter se mostrado sensível e apresentar decaimento nessa condição. As amostras foram preparadas conforme o item “Degradação por hidrólise ácida”, a fim de determinar a ordem de reação, a constante de velocidade (k) e os parâmetros cinéticos.

A faixa de tempo das coletas foram determinados levando em consideração um decaimento da concentração do ativo entre 10% e 50%. Dessa forma, foram feitas análises nos tempos 0; 12; 24; 48; 72; 96 e 120 horas.

A definição da ordem de reação foi demonstrada em gráficos levando em consideração para ordem zero as variáveis de concentração *versus* tempo, para primeira ordem foi o logaritmo neperiano da concentração *versus* tempo e para segunda ordem a 1/concentração *versus* tempo, para então analisar o coeficiente de correlação (r). O que apresentou o valor mais próximo de 1 foi considerado o modelo mais adequado (SINKO, 2008).

Após definição da ordem de reação, foi calculado o valor de k e em seguida os parâmetros cinéticos.

4.8 AVALIAÇÃO DO BALANÇO DE MASSAS

A avaliação do BM foi feito até o tempo onde o IFA se aproximou dos 30% de degradação como previsto nas diretrizes, neste caso foram feitos nos tempos de 0; 12; 24; 48 e 72 horas, através do decaimento do teor e o aumento das áreas dos picos dos PDs nos cromatogramas. Os cálculos consistem na soma dos percentuais dos PDs + o teor remanescente de TMX das amostras degradadas buscando se aproximar de 100%.

4.9 CARACTERIZAÇÃO DOS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS.

4.9.1 Parâmetros de análise

O método utilizado LC-MS-TOF precisou de modificações visto que não é viável o uso de tampões no equipamento. Desta forma usou-se uma coluna C18 (250 x 4,6 mm; 5 μ m). A eluição isocrática foi empregada com Acetonitrila (ACN) e água acidificada com ácido fórmico (pH 3,0) na proporção de 55:45 v/v como fase móvel. O volume de injeção foi de 20 μ L, com um tempo de retenção entre 3 e 4 min e fluxo de 0,7 mL/min. O tempo total de leitura do método foi de 7 min.

O modo de ionização por electrospray (ESI) foi executado em polaridade positiva em uma faixa de análise compreendida entre 50 m/z e 500 m/z . A voltagem do capilar foi fixada em 4500 eV e a da EndPlate Offset em 50 V. O nitrogênio foi utilizado como gás de secagem em uma vazão de 4 L/h e temperatura da fonte foi fixada em 150°C, seguindo recomendações do fabricante de acordo com o fluxo de fase móvel utilizado.

O acoplamento LC-MS foi feito pelo software HyStar (Bruker Daltonics) e os espectros de massas foram adquiridos e uma lista de picos foi gerada utilizando o

software DataAnalysis (Bruker Daltonics). Antes das análises, o espectrômetro de massas foi calibrado com uma solução calibrante Tune-Mix Electrospray Calibrant (Bruker Daltonics).

4.9.2 Preparo do padrão

Para preparar a solução usada como padrão, pipetou-se 2,4mL da solução mãe em três balões de 10mL distintos e completou-se o volume com água ultrapura. As alíquotas das soluções foram retiradas com seringas e filtradas através de unidades filtrantes Allcrom PVDF-45/25, com tamanho de poro de 0,45 μm , tendo como acondicionante os vials, para posterior leitura. Dessa forma obteve-se uma concentração final de 24 $\mu\text{g/ml}$. Todo experimento foi realizado em triplicata.

4.9.3 Preparo das amostras para degradação por Hidrólise Ácida

As amostras de TMX para hidrólise ácida foram retiradas da solução mãe, sendo alíquotas de 6 mL equivalentes a 24 μg , transferidas para balões de 10 mL, em seguida foi adicionado à solução ácida de HCl a 1,0 M e completado seus volumes com água ultrapura. Alíquotas dessas amostras foram coletadas com 24 horas de degradação, tempo suficiente para detectar o decaimento do IFA e dos produtos gerados. As soluções foram retiradas com seringas, filtradas através das unidades filtrantes e acondicionadas em vials para posterior análise cromatográfica. Todo experimento foi realizado em triplicata.

5 RESULTADOS

5.1 ESCOLHA DO MÉTODO

Os estudos preliminares foram realizados de acordo com os relatos da literatura para o desenvolvimento do método HPLC para detecção e quantificação de TMX. Como a maioria dos métodos relatados descreve o uso de composição de fase móvel complexa (contendo solventes como acetonitrila, metanol, solução de trietilamina, tampão fosfato, formato de amônio, em um pH específico), taxa de fluxo variável (eluição isocrática/gradiente), química de coluna específica (C_8 e C_{18}), ajuste de temperatura, etc., para separação cromatográfica de TMX, seus produtos de degradação e impurezas relacionadas, foi previsto preparar um método HPLC simples, sensível e econômico para quantificação de TMX e seus produtos (SANDHU et al., 2016; LI et al., 2001; MANGLA et al., 2020).

Inicialmente, várias combinações de fase móvel foram testadas empregando acetonitrila, metanol, solução de trietilamina 1% e espécies tampão contendo fosfato de potássio com pH variável (entre 3,0 e 5,0) e taxa de fluxo variável (entre 0,5 e 2,0 mL/min). Os estudos preliminares sugeriram a seleção de acetonitrila e tampão fosfato (pH 3,0) com eluição isocrática nas proporções de 55:45 v/v, como misturas adequadas para a fase móvel, taxa de fluxo de 1mL/min em temperatura ambiente, volume de injeção foi de 20 μ L e uma separação cromatográfica mais rápida com duração total de 10 min, juntamente com simetria de pico adequada e cauda de pico mais baixa.

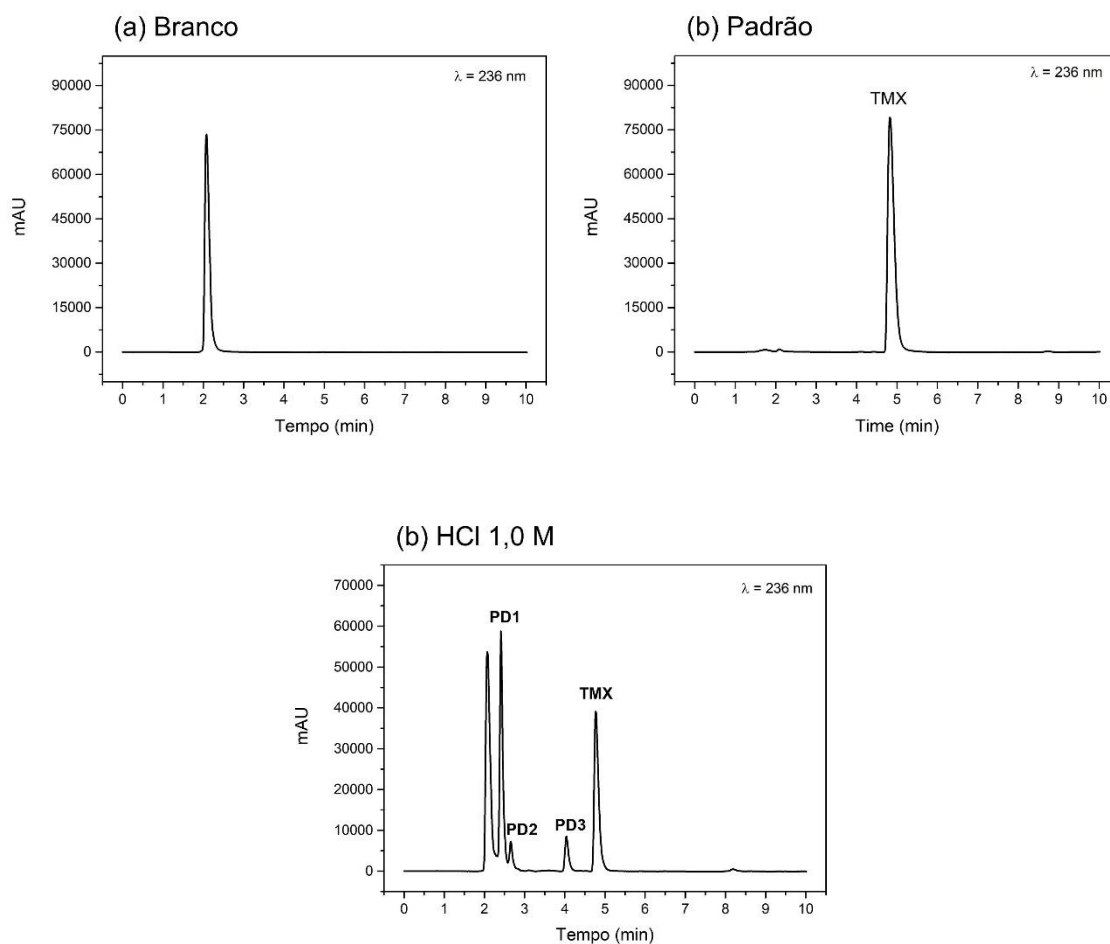
5.2 ESTUDO DE DEGRADAÇÃO FORÇADA DO TAMOXIFENO

A decisão de se fazer os estudos de degradação forçada do TMX submetendo-o apenas ao estresse ácido se deu a partir dos relatos encontrados na literatura onde a molécula se mostrava estável nos outros meios mais comumente estudados como o básico (NaOH), oxidativo (H_2O_2) e térmico, mostrando-se sensível e com decaimento de mais de 30% de seu teor quando submetido a degradação ácida (LI et al., 2001; MANGLA et al., 2020; SANDHU et al. 2016).

5.2.1 Hidrólise ácida

As amostras de TMX foram submetidas a hidrólise ácida (HCl) à 1,0 M, conforme metodologia. Nas primeiras 12 horas apresentaram um decaimento de 20,08% (DPR= 1,1822) e chegando a 66,82% (DPR= 0,7425) em 120 horas. No total três PDs foram formados sob essa condição e foram chamados de PD1, PD2 e PD3, com tempo de retenção de 2,41, 2,64 e 4,06 min respectivamente, além do pico que representa o TMX com tempo de retenção de 4,77 min. A pureza de pico para o TMX foi 1,0, constatando que não houve coeluição dos picos. Tal resultado evidencia a capacidade do método em separar o TMX de seus respectivos produtos de degradação originados da hidrólise ácida. Esses resultados são mostrados na figura 2.

Figura 6 - Cromatogramas: (a) branco das amostras; (b) padrão; (c) amostras submetidas a HCl 0,1 M.



Fonte: autoria própria.

Por sua vez, os resultados de estresse ácido do TMX trazidos por Li et al. (2001) apresentam semelhanças com os resultados apresentados neste trabalho, onde também foi possível evidenciar a sensibilidade do TMX na presença de soluções ácidas. No trabalho do autor referenciado, foi utilizado fluído gástrico sintético (NaCl e HCl pH 1,4) a 37°C durante 1 semana, para simular uma digestão. Foram detectados dois principais produtos de transformação, identificados como (E)-isômero do TMX e metabólito D. Apesar das diferenças metodológicas, pode-se considerar a semelhança do meio ácido a que foram submetidos, pois o HCl é o principal ácido presente no fluído gástrico humano.

5.3 PARÂMETROS CROMATOGRÁFICOS

Os parâmetros cromatográficos analisados obtiveram valores satisfatórios, dentro dos limites permitidos assim como descrito na metodologia. Esses resultados estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 - Resultados da adequação do sistema para TMX e os PDs em hidrólise ácida.

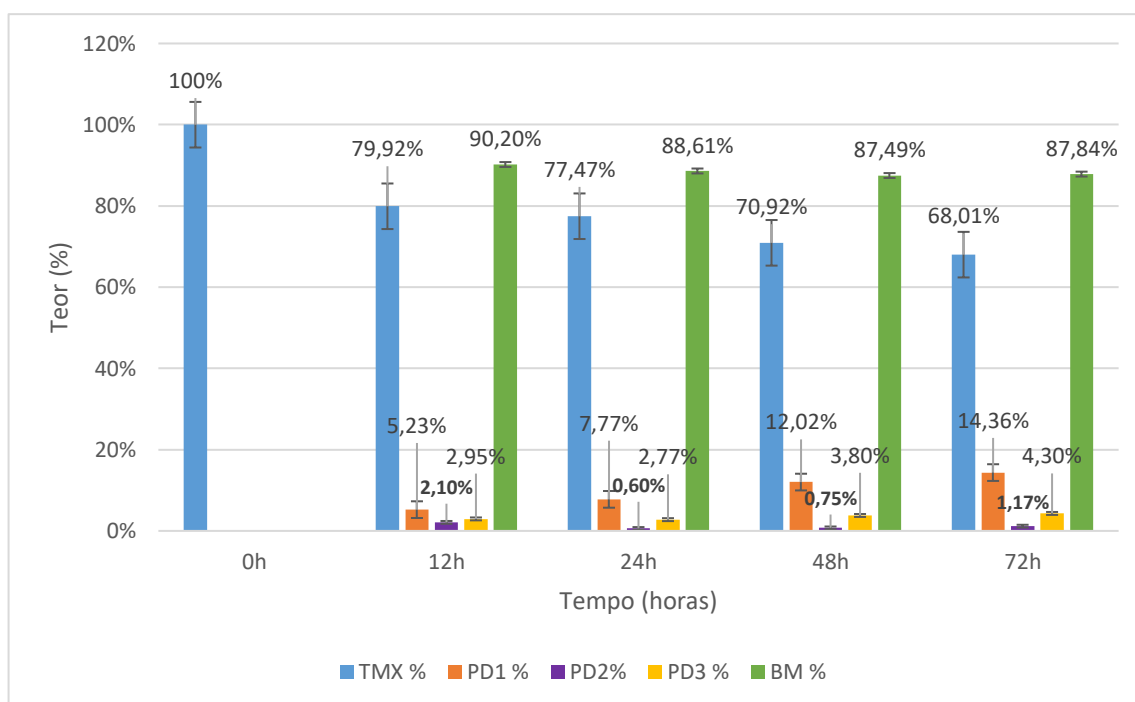
Parâmetros Cromatográficos	Condição de degradação			
	HCl 1,0 M – 72h			
	TMX	PD1	PD2	PD3
Número de pratos (N)	6521	4337	5822	7859
Fator de capacidade (K)	0,993	0	0,104	0,692
Fator de calda (T)	1,904	1,576	1,321	1,594
Resolução (R)	1,391	0	1,748	6,707

Fonte: autoria própria.

5.4 AVALIAÇÃO DO BALANÇO DE MASSA DA DEGRADAÇÃO ÁCIDA

Os resultados do decaimento do teor do TMX e o crescimento das áreas dos picos dos produtos de degradação, bem como o balanço de massas obtidos após degradação ácida com uma solução de HCl a 1,0 M, são trazidos na figura 3:

Figura 7: Avaliação dos teores do TMX, produto de degradação e balanço de massas obtido após a hidrólise ácida (HCl a 1,0 M) nos tempos de 0; 12; 24; 48 e 72 horas.



Fonte: autoria própria.

Após analisar os dados da Figura 3 e comparar os resultados das amostras submetidas a hidrólise ácida com a amostra padrão, pode-se notar que houve uma degradação do TMX de forma constante durante as 72 horas de exposição. Nas primeiras 12 horas o TMX apresenta um teor de 79,92% e um percentual dos produtos de degradação de 10,28%. Realizando o somatório do teor do TMX remanescente e dos produtos de degradação obteve-se um balanço de massas de 90,20%.

Nas horas finais do estudo observou-se uma degradação de forma mais intensa com um teor de TMX em 72 horas equivalente a 68,01% e um percentual de produtos de degradação de 19,83%, mostrando ter degradado em torno de 30% do fármaco e com balanço de massas equivalente à 87,84%. Os 12,16% restantes, podem ser atribuídos a produtos de degradação não cromóforos ou que não puderam ser

detectados com o método em questão ou até mesmo impurezas presentes no fármaco (SINGH *et al.*, 2013).

Apesar de não haver na legislação limites de aceitação para esse tipo de estudo, de um modo geral, o método HPLC-DAD apresentado foi capaz de quantificar o TMX, bem como seus produtos de degradação, de forma a alcançar um balanço de massas que pode ser considerado adequado para boa parte dos pontos analisados.

5.5 ESTUDO DA CINÉTICA DE DEGRADAÇÃO: DEFINIÇÃO DA ORDEM DE REAÇÃO

5.5.1 Cinética de degradação por hidrólise ácida com HCl 1,0 M

O estudo da cinética de degradação por hidrólise ácida, foi realizado através da observação do decaimento do teor do TMX e formação dos produtos de degradação, após ser exposto a uma solução de HCl 1,0 M. Com esta avaliação foi possível determinar a ordem de reação e a partir disso obter o valor da constante de velocidade (k), além dos parâmetros cinéticos de $T_{1/2}$ (meia-vida de degradação) e $T_{90\%}$ (vida-útil).

A tabela 6 apresenta os dados utilizados para a construção dos gráficos que indicaram a ordem de reação a partir da análise do coeficiente de correlação mais próximo de 1, que estão representados pela Figura 4, para a ordem zero (Figura 4a), primeira ordem (Figura 4b), segunda ordem (Figura 4c).

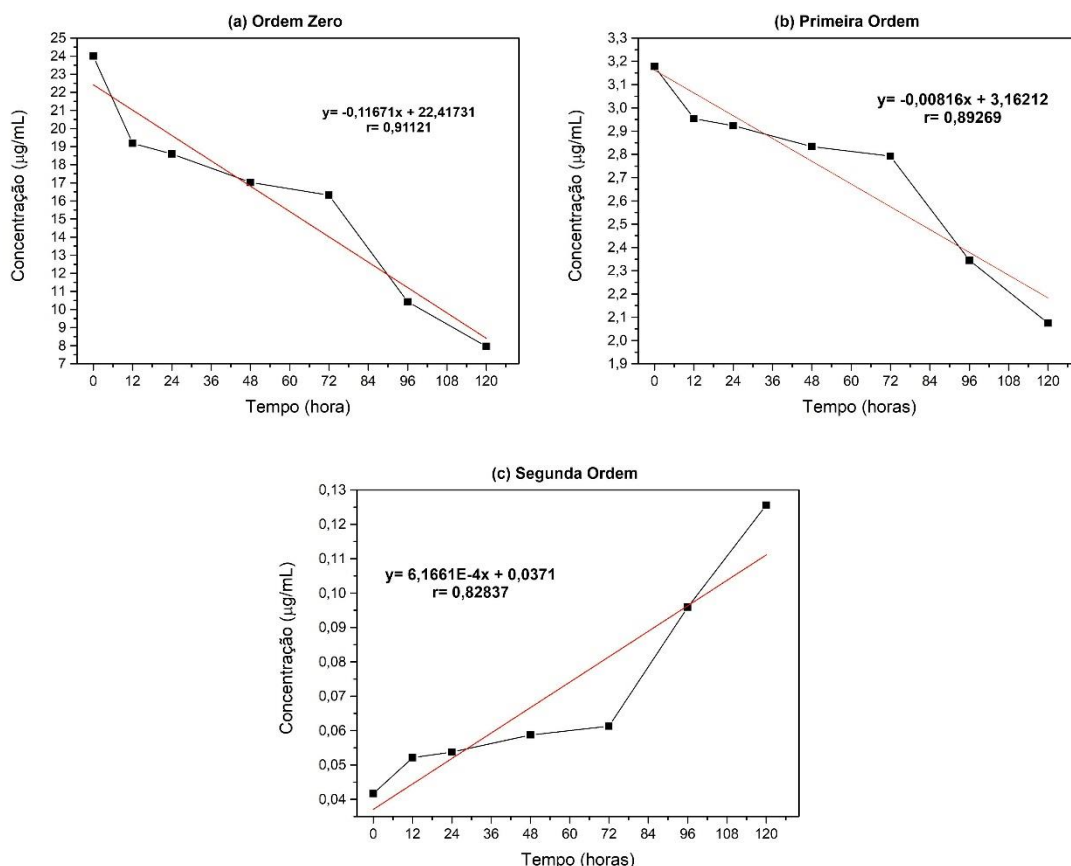
Tabela 6 - Dados das áreas médias obtidas no tempo zero e após exposição, concentração, Log C e 1/C adquiridos em análise da solução do TMX IFA submetido a hidrólise ácida (HCl 1,0 M).

Tempo (horas)	Área média (mAU)	DPR	C (µg/mL)	Log C (µg/mL)	1/C (µg/mL)
0	909672	0,2011	24,0000	3,1780	0,04166
12	726976	1,7655	19,1799	2,9538	0,05213
24	704746	0,5385	18,5934	2,9228	0,05378
48	645098	0,4890	17,0197	2,8343	0,05875
72	618685	0,1770	16,3229	2,7925	0,06126
96	395126	1,0730	10,4247	2,3441	0,09592
120	301834	0,7425	7,9633	2,0748	0,12557

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

Fonte: Autoria própria.

Figura 8- Representação gráfica das cinéticas de ordem zero (a), primeira ordem (b) e segunda ordem (c) para a degradação de TMX submetido a hidrólise ácida (HCl 1,0 M).



Fonte: autoria própria.

Frente aos resultados obtidos, foi possível observar que o decaimento do TMX exposto a uma solução de ácido clorídrico 1,0 M, apresentou o coeficiente de correlação ligeiramente maior para o modelo de ordem zero ($r = 0,91121$), quando comparado ao de primeira ordem ($r = 0,89269$) e segunda ordem ($r = 0,82837$). À vista disso, pode-se afirmar que a velocidade da reação independe das concentrações dos reagentes (SINKO, 2008). Porém, uma avaliação variando-se a concentração do agente degradante e/ou temperatura, deveria ter sido realizada para confirmação deste resultando ou se poderia existir alguma influência proveniente dessas mudanças.

Com a ordem da reação definida, foi possível calcular a constante da velocidade de degradação, o T90% e o T1/2 para a condição analisada.

Tabela 7- Parâmetros cinéticos calculados para TMX.

Parâmetros cinéticos	HCl 1,0 M
K inicial ($\mu\text{g.h}$)	$4,01 \times 10^{-1}$
K final ($\mu\text{g.h}$)	$1,41 \times 10^{-1}$
T _{90%} (h)	5,97
T _{1/2} (h)	84,86

Fonte: autoria própria

Na literatura é utilizado apenas um valor de k, que se justifica quando a reação exibe apenas uma velocidade ao longo do tempo de análise, ou quando o intervalo de tempo analisado tenha sido insuficiente para verificar alterações na mudança da velocidade da reação de forma mais evidente, o que não foi o caso deste trabalho, em que, o tempo de exposição do TMX à condição ácida mencionada, apesar de ter tido intervalos maiores, não possui uma constante de velocidade única (ARAÚJO et al., 2019).

Após definir o perfil cinético de ordem zero como melhor modelo de decaimento para o TMX na hidrólise ácida e para visualizar melhor essa diferença de velocidades de reação ao longo do tempo de análise foi calculado o valor de k final (kf), onde se considerou o tempo de análise que havia degradado em média 50% do IFA e esse tempo foi de 96 h, e k inicial (ki), calculado a partir de um tempo mais próximo onde se obteve 10% de degradação, nesse caso 12 hora. Esses dados são trazidos na tabela 7.

Para o cálculo do tempo de meia-vida T_{1/2} (h), foi utilizado Kf (final) e para o cálculo de tempo de vida-útil T90% (h), foi utilizado o Ki (inicial). Essa diferenciação é fundamental para que não se sobrestime o T_{90%} (h), caso este seja avaliado com o valor de Kf, o inverso também é válido para o cálculo de T_{1/2} (h), caso seja avaliado com o valor de Ki (ARAÚJO et al., 2019).

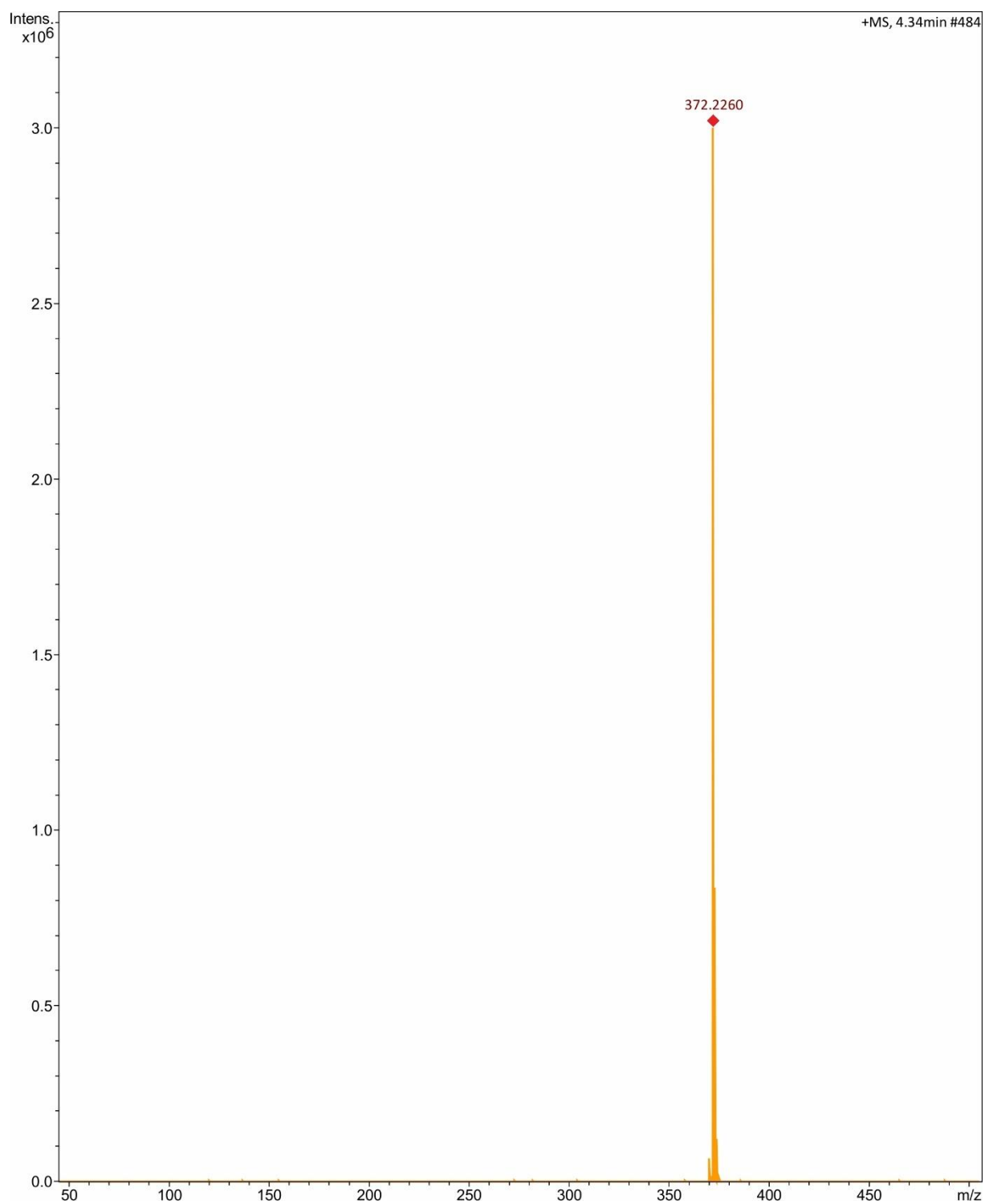
Os resultados dos cálculos dos parâmetros cinéticos estão apresentados na tabela 7 e seus números corroboram com a análise superficial feita com os valores de concentração obtidos pós degradação descritos na tabela 6.

5.6 CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL POR ESPETROMETRIA DE MASSAS

O método proposto foi transferido para o sistema LC-MS-TOF, sendo necessário algumas adequações como foi descrito na metodologia, e assim foram analisadas as amostras de TMX, bem como as amostras de degradação forçada provenientes de hidrólise ácida por HCl 1,0 M, com o intuito de se obter informações acerca das estruturas formadas. A formação de picos dos prováveis produtos de degradação já havia sido observada pelo HPLC-DAD.

A figura 5 mostra o espectro de massas obtido por ESI em modo positivo, onde é possível observar a protonação do TMX $[M+H]^+$ ($T_r = 4,34$ min), que possui massa exata de 371,2249 g/mol, resultando em um sinal de 372,2260 m/z evidenciado como pico base.

Figura 9- Espectro de massas de alta resolução do TMX obtido pelo sistema LC-MS-TOF no modo ESI +.



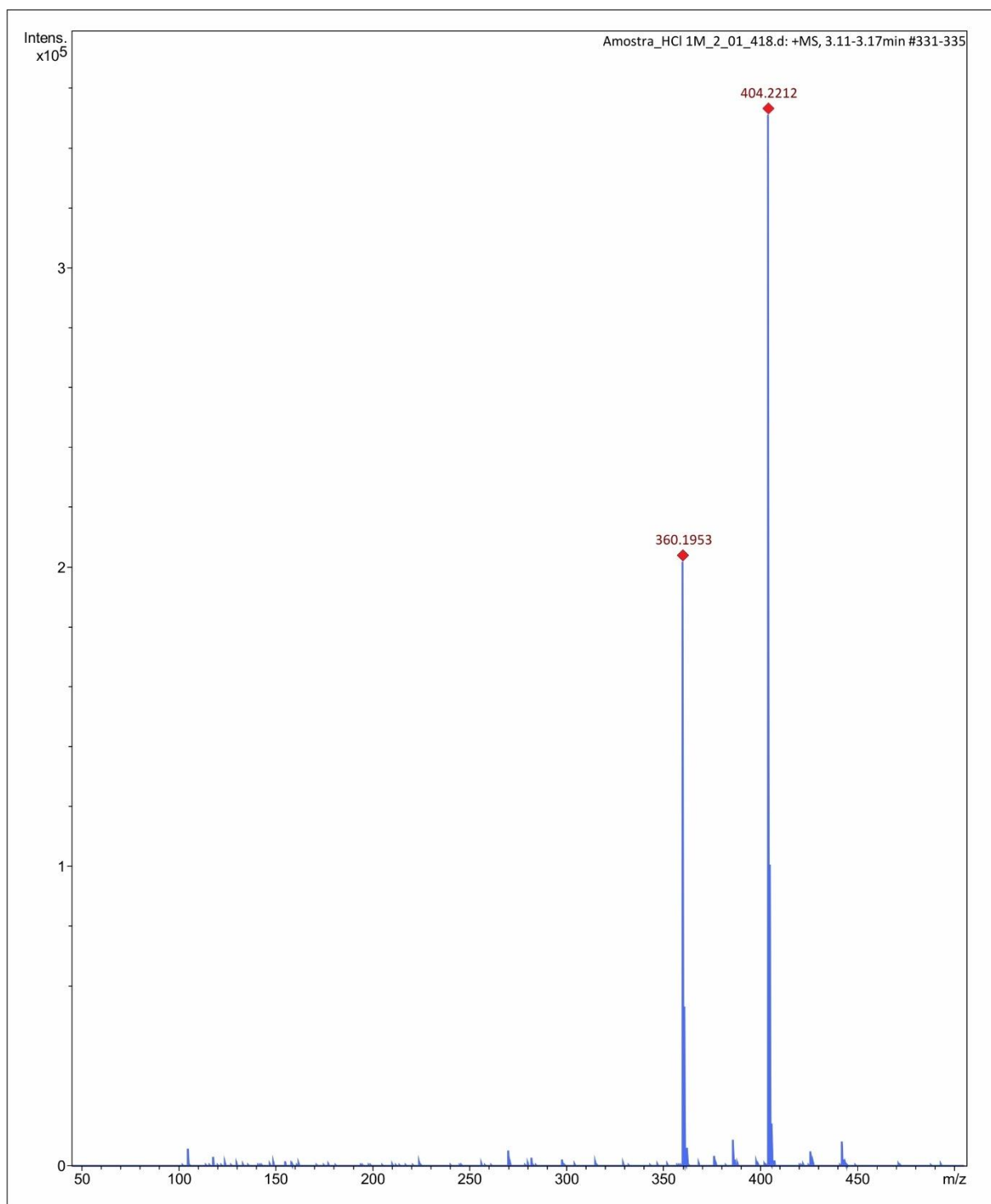
Fonte: autoria própria.

5.6.1 Hidrólise ácida

Analisando o PD1 ($T_r = 3,11$ min) trazido na figura 6, pôde-se observar a presença do pico base 360.1953 m/z $[M+H]^+$, que inicialmente supôs-se como possível produto de degradação.

Li et al. (2001), detectou em seus estudos quatro picos correspondentes a 404 m/z em tempos de retenção diferentes e como fragmento principal um pico 360 m/z , situação que se assemelha ao que foi encontrado nos espectros da degradação ácida realizada neste trabalho. Dessa forma pode-se sugerir que o que supôs-se ser o PD1, seja um fragmento gerado a partir do que realmente seria o produto de degradação com 404.2212 m/z ($T_r = 3,17$ min), massa semelhante à do PD2 que será citado mais à frente.

Figura 10- Espectro de massas de alta resolução do PD1 obtido pelo sistema LC-MS-TOF no modo ESI +.

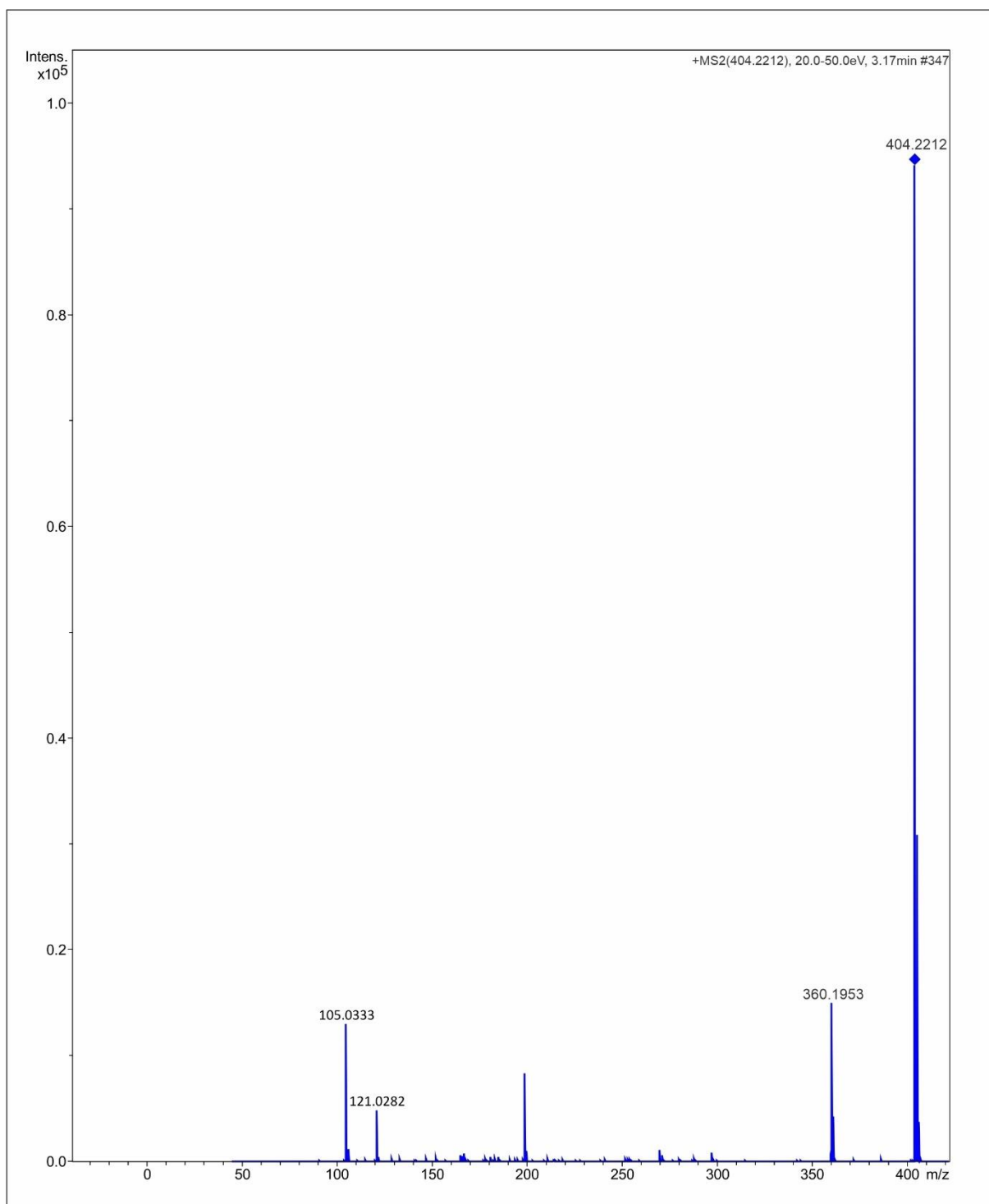


Fonte: autoria própria

A fragmentação do PD1 (Figura 7) evidenciou a presença de fragmento com valor de 360.1953 m/z o que corrobora a proposta sugerida. No entanto, para

confirmar esse achado mais estudos deverão ser feitos submetendo a molécula a condições mais brandas na fonte do equipamento.

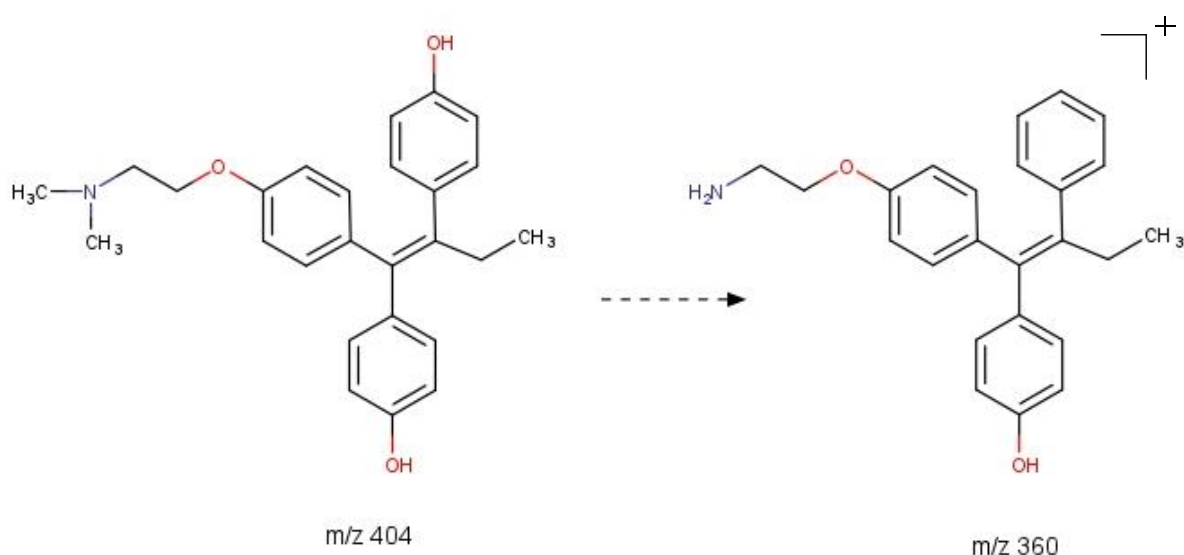
Figura 11- Espectro de massas de alta resolução do PD1 obtido pelo sistema LC-MS-MS no modo ESI +.



Fonte: autoria própria

Como proposta mecanística de fragmentação na fonte do PD1, sugerimos um a desmetilação da amina e a perda de uma das hidroxilas (Figura 8). Geralmente a maior ramificação é a mais rapidamente eliminada como radical (PAVIA et al., 2010; SANTOS, 2010)

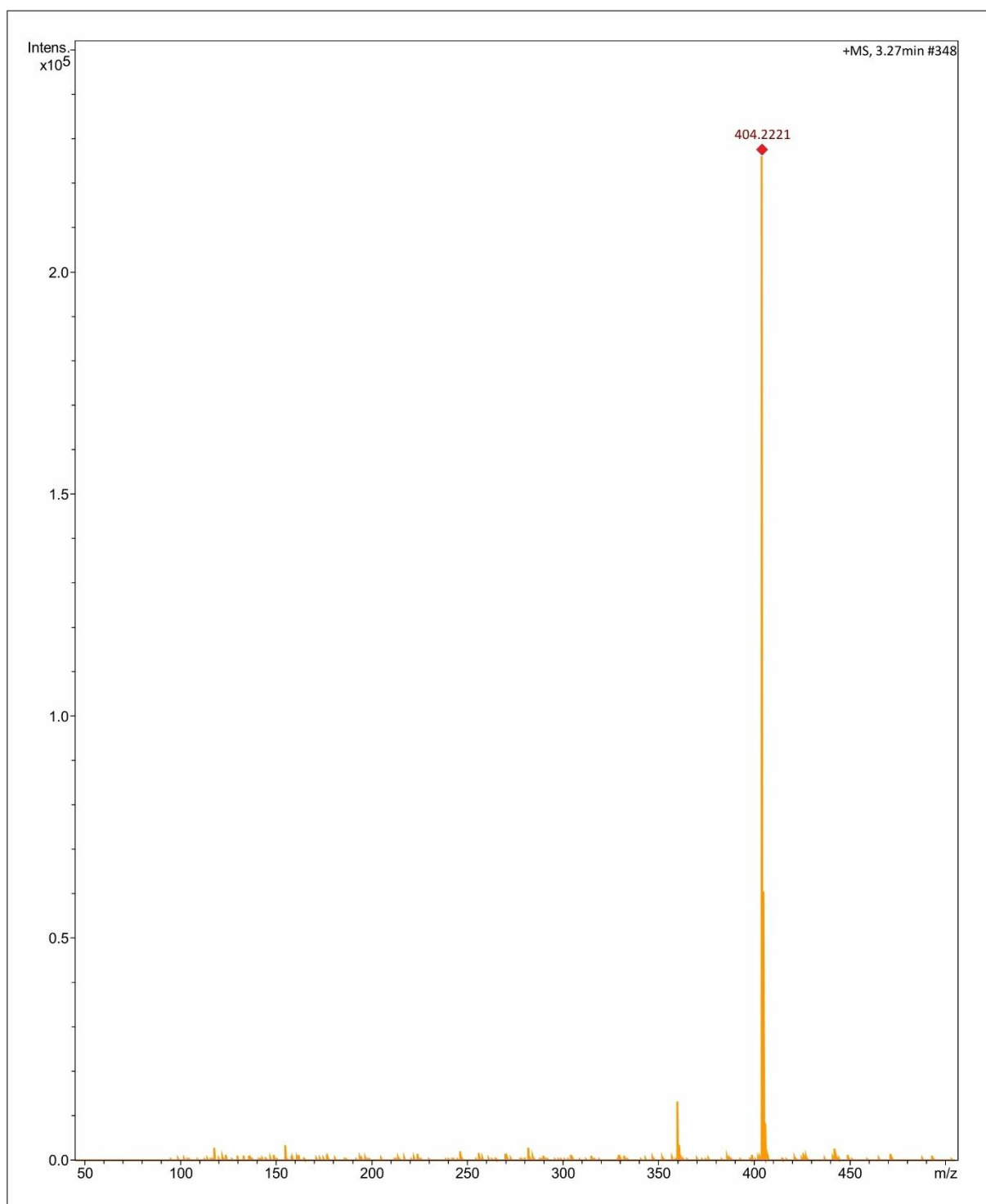
Figura 12- Estrutura química proposta para o PD1 e seu principal fragmento 360 m/z .



Fonte: autoria própria.

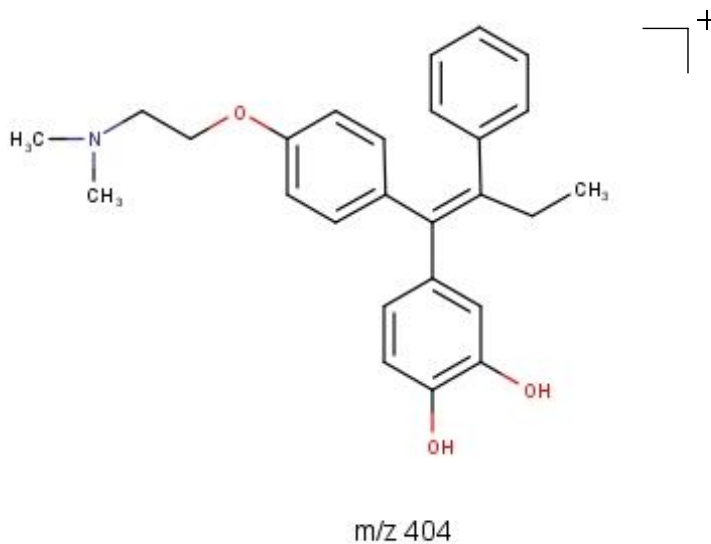
Na análise feita no espectro de massas do PD2 ($T_r = 3.27$ min) trazido na figura 9, pôde-se observar a presença do pico base 404.2221 m/z $[M + H]^+$ que apresenta uma diferença de massas de 32 Da em relação a molécula protonada do TMX, o que nos leva a pensar que o PD2 é formado pela adição de dois átomos de oxigênio na molécula protonada do IFA. Aplicando novamente Li et al. (2001) como referência, resultados semelhantes em seus estudos para o TMX são trazidos, onde através de uma simulação de digestão mediada por fluido gástrico sintético são formados PDs e o mesmo sugere a hidroxilação para um dos seus achados que corresponde com o PD2 (Figura 10), porém não apresenta mecanismo para tal sugestão.

Figura 13- Espectro de massas de alta resolução do PD2 obtido pelo sistema LC-MS-TOF no modo ESI +.



Fonte: autoria própria.

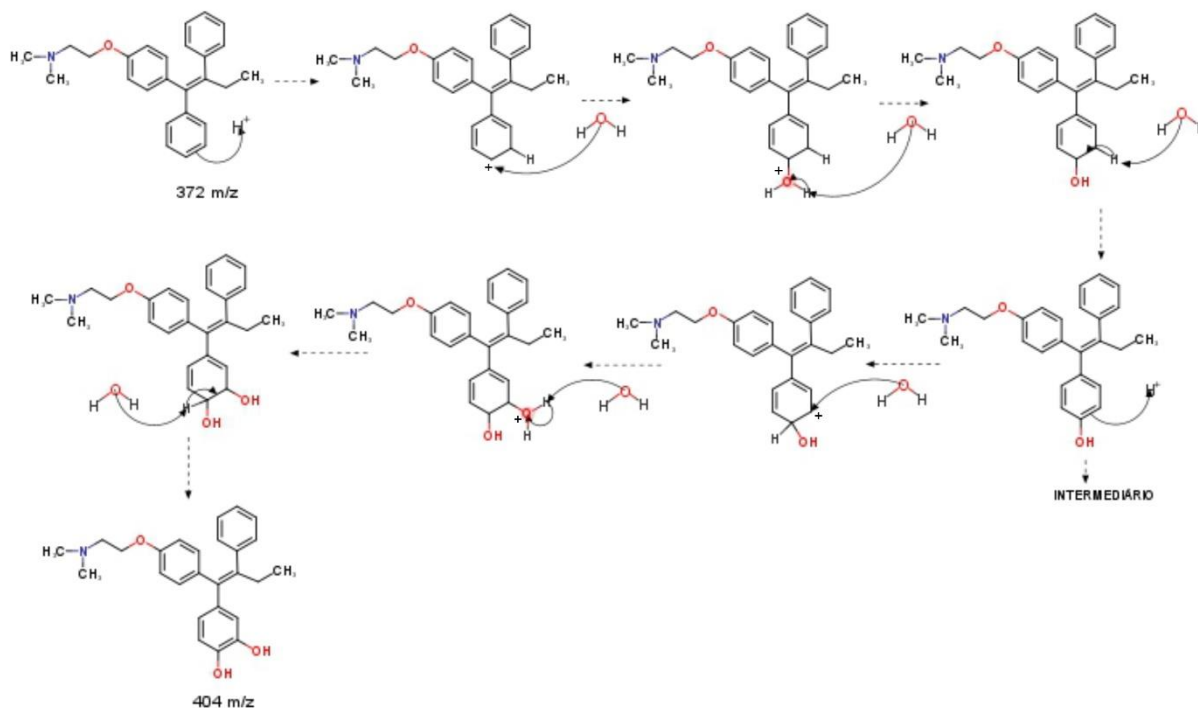
Figura 14- Estrutura química proposta para o PD2.



Fonte: autoria própria.

Tomando como base os achados da literatura propõe-se que a hidroxilação para o TMX, se dê pelo ataque do anel benzênico aos átomos de oxigênio presente na hidrólise ácida, seguida da formação de radicais hidroxilas. Tal mecanismo é sugerido na figura 11:

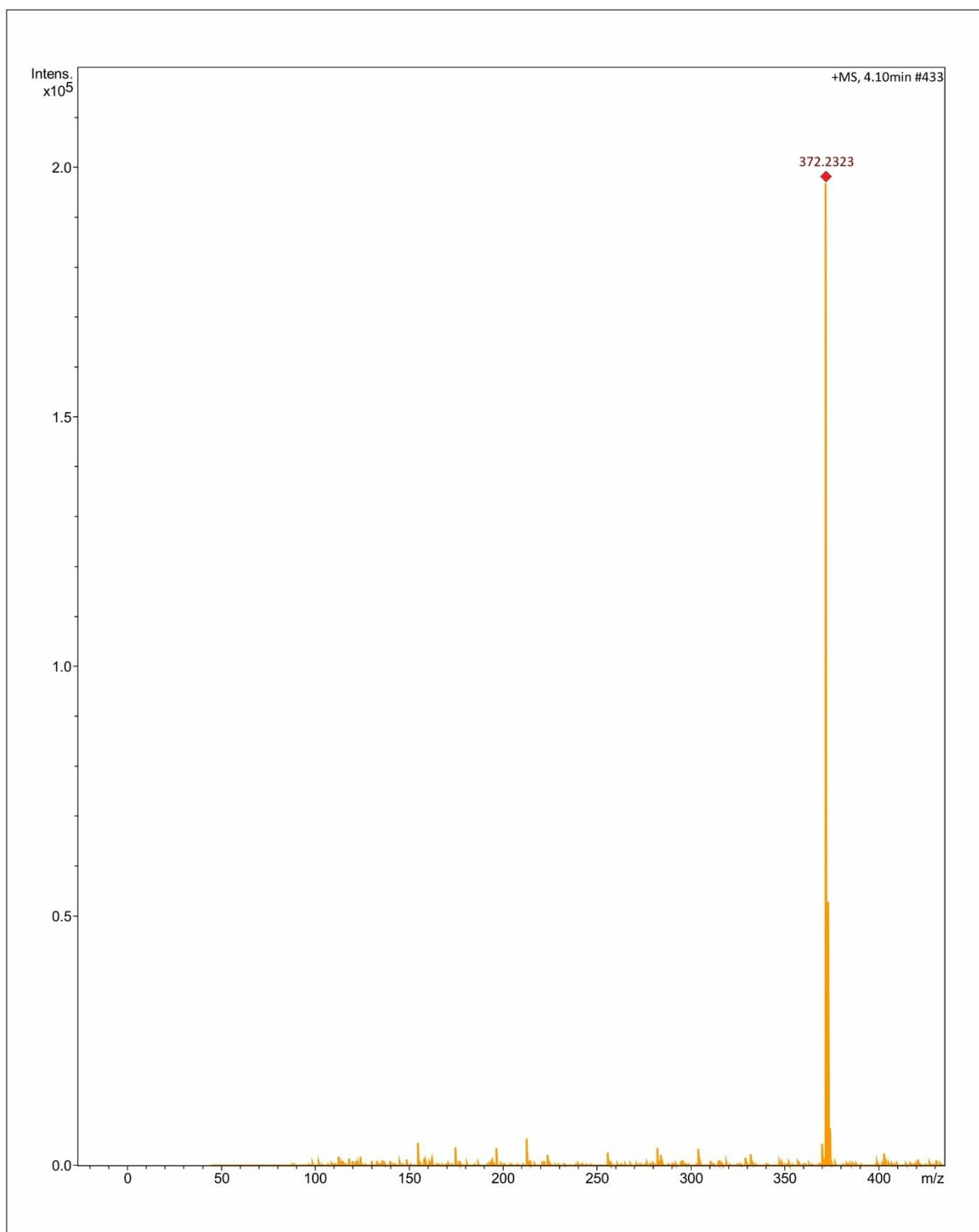
Figura 15- Mecanismo proposto para a hidroxilação do TMX e formação do PD2.



Fonte: autoria própria.

Para o PD3 ($Tr = 4,10$ min), podemos observar a presença do pico base 372.2323 m/z $[M + H]^+$, trazido na figura 12. O mesmo apresenta massa semelhante ao da molécula protonada no TMX, o que nos leva a crer que esse seja o pico da forma isomérica do IFA.

Figura 16- Espectro de massas de alta resolução do PD3 obtido pelo sistema LC-MS-TOF no modo ESI +.

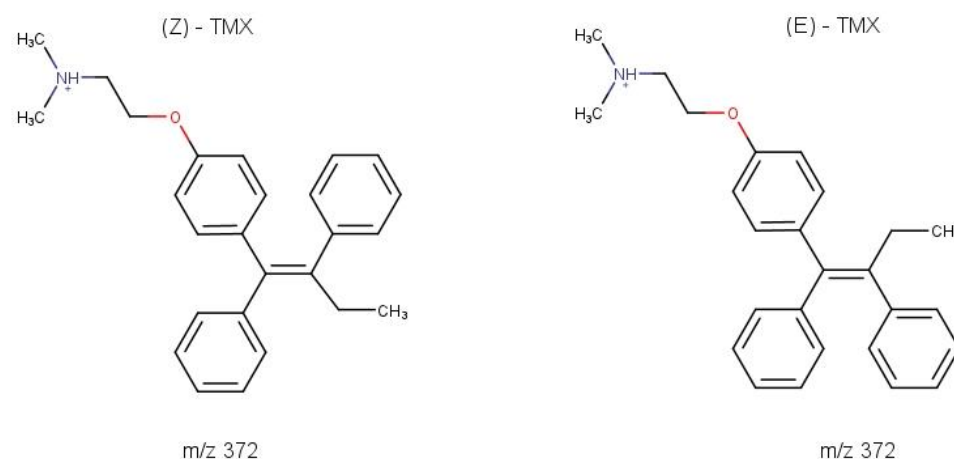


Fonte: autoria própria.

O TMX e outros análogos de TPE existem como isômeros geométricos, que podem diferir marcadamente em sua atividade agonística ou antagonista. O isômero (Z)-ou *trans* do TMX é antiestrogênico, enquanto o (E)-ou *cis* TMX é um agonista total de estrogênio (MANNIS, HANKS, BROWN, 1998).

Comparando o tempo de retenção do PD3 (Figura 12) com o do padrão (Figura 5) (Z)-TMX que é conhecida como a forma ativa do fármaco, podemos propor o pico do produto como (E)-TMX (Figura 13), com base no seu espectro de massa, e nos estudos de ordem de eluição trazidos por Mannis, Hanks, Brown (1998), onde diz que o (E)-TMX apresenta maior velocidade de eluição que o (Z)-TMX.

Figura 17- Estrutura química proposta para o (Z)-TMX e (E)-TMX.

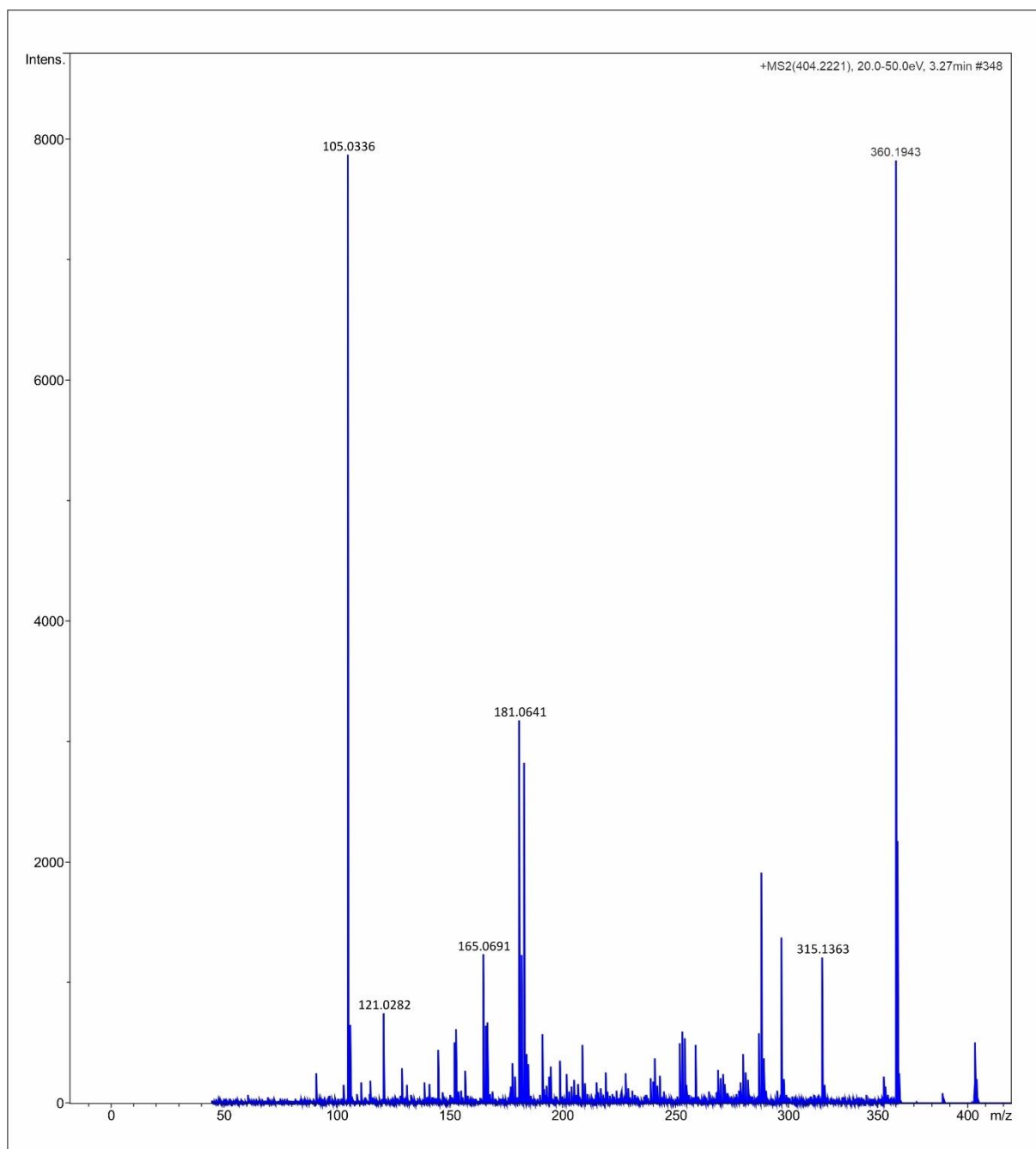


Fonte: autoria própria.

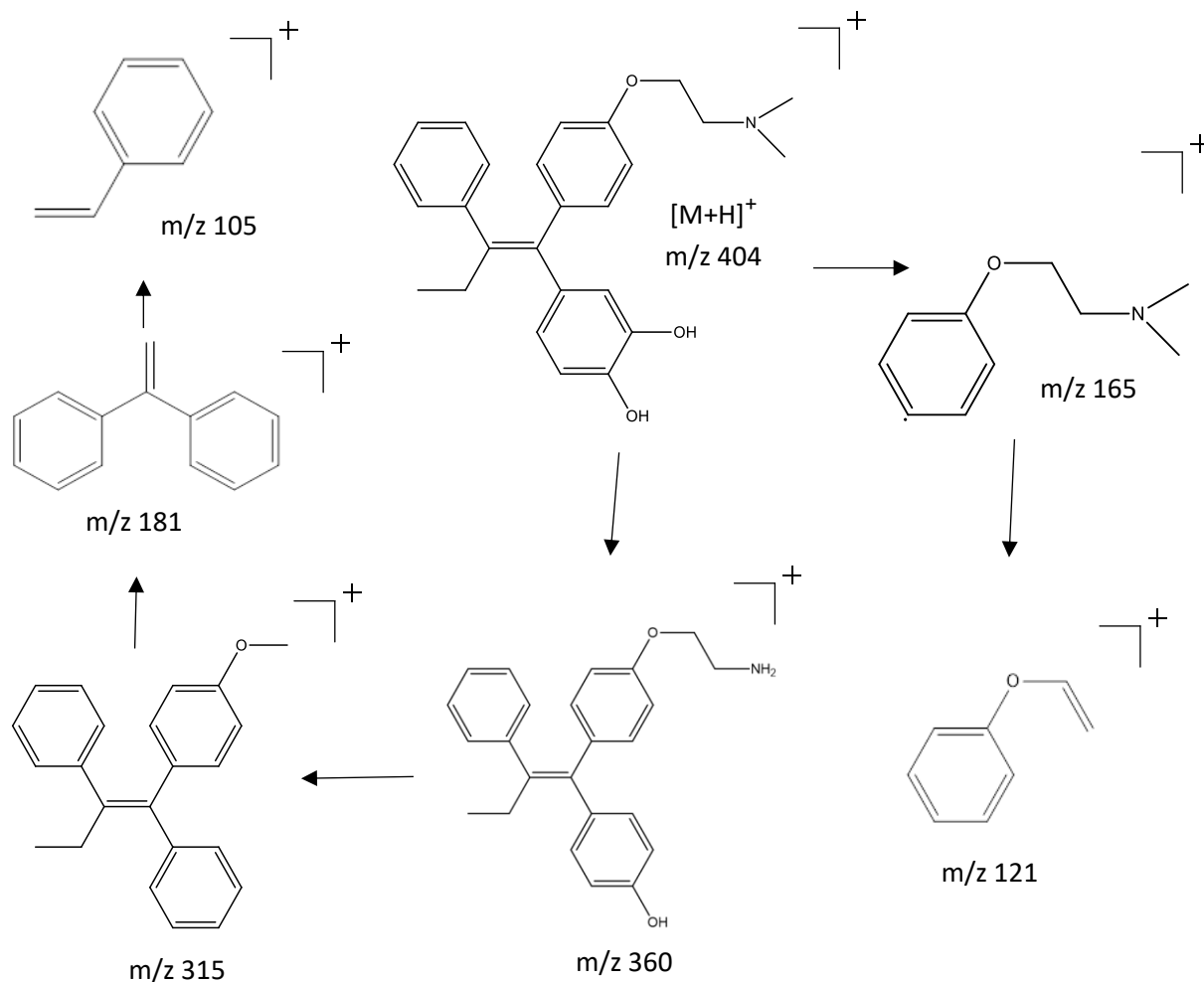
5.7 PERFIL DE FRAGMENTAÇÃO

Analisando o espectro de fragmentação do PD2 obtido utilizando uma energia de colisão entre 20 e 50 eV, é possível observar os íons fragmentos com 105 *m/z*, 121 *m/z*, 166 *m/z*, 181 *m/z*, 315 *m/z* e 360 *m/z*.

Figura 18- Espectro de massas de alta resolução do PD2 obtido pelo sistema LC-MS-MS no modo ESI +.



Fonte: autoria própria.

Figura 19- Caminho de fragmentação ESI-MS-MS proposto para PD2

Fonte: autoria própria.

MS/MS do PD2 $[(M + H)^+]$, 404 m/z . O espectro de massa do PD2 $[M + H]^+$ mostra os íons produto em 360 m/z (perda de C_2H_6O do produto intermediário 404 m/z), 315 m/z (perda de CH_3NO do 360 m/z), 180 m/z (perda de $C_9H_{11}O$ do 315 m/z), 105 m/z (perda de C_6H_5 do 315 m/z), 164 m/z (perda de $C_{16}H_{15}O_2$ do 404 m/z), 121 m/z (perda de C_2H_7N do 164 m/z).

As fórmulas estruturais dos PD1 e PD2 foram confirmadas através do software DataAnalysis. Para o PD3 não foi possível propor uma fórmula molecular com o software. Os dados são descritos na tabela 8.

Tabela 8- Massa teórica e experimental, fórmula molecular e erro (ppm) para p PD1 e PD2.

Composto	Fórmula molecular proposta	m/z calculada	m/z observada	Erro ppm
PD1	C ₂₆ H ₃₀ NO ₃	404.2220	404.2212	1.8
PD2	C ₂₆ H ₃₀ NO ₃	404.2220	404.2221	1.8

Fonte: autoria própria

6 CONCLUSÃO

A produção deste trabalho permitiu o desenvolvimento de um método analítico capaz de quantificar o TMX IFA frente a seus produtos de degradação gerados em condição de estresse forçado. O fármaco mostrou-se susceptível ao decaimento na condição de estresse ácido, assim como previsto na literatura, onde foi observada a formação de dois PDs já mencionados na literatura. Devido sua alta estabilidade as outras condições, básico, oxidativo e térmico, os testes para esses não foram conduzidos.

O método desenvolvido teve aplicabilidade prática para os estudos de cinética de degradação forçada, que evidenciaram comportamentos de ordem zero para degradação por hidrólise ácida. Além disso, o acoplamento do sistema LC-MS/TOF mostrou-se uma ferramenta eficaz para sugestão estrutural de moléculas que a literatura ainda não havia trazido, e tornando possível sugerir mecanismos de hidroxilação e desmetilação.

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

REFERÊNCIAS

- ABOTALEB, M. et al. Chemotherapeutic agents for the treatment of metastatic breast cancer: An update. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 101, n. February, p. 458–477, 2018.
- ALSANTE, K. M. et al. The role of degradant profiling in active pharmaceutical ingredients and drug products. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 59, n. 1, p. 29–37, 2007.
- ARAUJO, J.I.R. Estudo de estabilidade e avaliação da cinética de degradação oxidativa do fármaco Posaconazol. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós Graduação em Inovação Terapêutica. Universidade Federal de Pernambuco, 2017.
- ARELLANO, C. et al. An UPLC-MS/MS method for separation and accurate quantification of tamoxifen and its metabolites isomers. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 100, p. 254–261, 2014.
- ARGHAVAN, F. S. et al. Complete degradation of tamoxifen using $\text{FeNi}_3/\text{SiO}_2/\text{ZnO}$ as a photocatalyst with UV light irradiation: A study on the degradation process and sensitivity analysis using ANN tool. **Materials Science in Semiconductor Processing**, v. 128, 15 jun. 2021.
- BAKSHI, M.; SINGH, S. Development of validated stability- indicating assay methods : Critical review. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 28, p. 1011–1040, 2002.
- BAERTSCHI, S. W.; ALSANTE, K. M.; REED, R. A. *Pharmaceutical Stress Testing: Predicting Drug Degradation*. 2a ed. [s.l: s.n.], 2011.
- 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.
- BOBIN-DUBIGEON, C. et al. New UPLC-MS/MS assay for the determination of tamoxifen and its metabolites in human plasma, application to patients. **Future Science OA**, v. 5, n. 5, 2019.
- BRAY, F. et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: a Cancer Journal for Clinicians**, v. 68, n. 6, p. 394–424, 1 nov. 2018.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução-RDC Nº 318, de 6 de novembro de 2019. Estabelece os critérios para a realização de Estudos de Estabilidade de insumos farmacêuticos ativos e medicamentos, exceto biológicos, e dá outras providências. Brasília, DF. 2019.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Estimativa 2020: Incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro, p. 34, INCA, 2019.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. O que é Câncer? Rio de Janeiro, INCA, 2020.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Tipos de câncer: Câncer de mama. Rio de Janeiro, INCA, 2021.

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. Brasília, DF. 2015.

CHEVALIER, M. T. et al. Non-covalently coated biopolymeric nanoparticles for improved tamoxifen delivery. *European Polymer Journal*, [s.l.], v. 95, p.348-357, out. 2017. Elsevier BV.

CINAUSERO, M. *et al.* Determinants of Last-line Treatment in Metastatic Breast Cancer. **Clinical Breast Cancer**, v. 18, n. 3, p. 205–213, 2018.

CONSTANTINO, M. G; da Silva G. V. J; DONATE, P. M. Fundamentos de Química Experimental. 2. ed. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 2014.

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.

FATHONI, M. I. A. et al. Characteristics of breast cancer patients at dr. Sardjito Hospital for early anticipation of neutropenia: Cross-sectional study. **Annals of Medicine and Surgery**, v. 73, p. 103189, 1 jan. 2022.

FERNÁNDEZ-SUÁREZ, M. E. et al. Selective estrogen receptor modulators (SERMs) affect cholesterol homeostasis through the master regulators SREBP and LXR. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 141, p. 111871, 1 set. 2021.

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.

FIGUEROA, J. D. et al. The impact of the Covid-19 pandemic on breast cancer early detection and screening. **Preventive Medicine**, v. 151, p. 106585, 1 out. 2021.

FLORENCE, A. T.; ATTWOOD, D. Princípios Físico-Químicos em Farmácia. 2a ed. São Paulo: Pharmaboks, 2011.

GROS, M.; PETROVIC, M.; BARCELO, D. Development of a multi-residue analytical methodology based on liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) for screening and trace level determination of pharmaceuticals in surface and wastewaters. **Talanta**. 70(4):678-90, 2006.

HUGHES-DAVIES, L.; CALDAS, C.; WISHART, G. C. Tamoxifen: The drug that came in from the cold. *British Journal of Cancer*, v. 101, n. 6, p. 875–878, 2009.

HUYNH-BA, K. Handbook of Stability Testing in Pharmaceutical Development. 1ª edição. Newark, Delaware: Springer, 2009.

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

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

IQBAL, J. et al. **Potential phytocompounds for developing breast cancer therapeutics: Nature's healing touch** *European Journal of Pharmacology* Elsevier B.V., 15 maio 2018.

KARTHIK, G. M. *et al.* mTOR inhibitors counteract tamoxifen-induced activation of breast cancer stem cells. **Cancer Letters**, v. 367, n. 1, p. 76–87, 2015.

KEVADIYA, B. D. *et al.* Montmorillonite/poly-(-caprolactone) composites as versatile layered material: Reservoirs for anticancer drug and controlled release property. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 47, n. 1, p. 265–272, 2012.

KING, M. L. “Talvez não tenha conseguido fazer o... Marthin Luther King. Disponível em: <<https://www.pensador.com/frase/MjlyODg3Mw/>>.

KOMMANABOYINA, B.; RHODES, C.T. Trends in stability testing, with emphasis on stability during distribution and storage. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 25, p. 857-868, 1999.

LI, X. F.; CARTER, S.; DOVECHI, N. J.; ZHAO, J. Y.; KOVARIK, P.; SAKUMA, T. Analysis of tamoxifen and its metabolites in synthetic gastric fluid digests and urine samples using high-performance liquid chromatography with electrospray mass spectrometry. **Journal of chromatography. A**, 914(1-2), 5–12, 2001.

LIU, Y. *et al.* Mass spectrometry-based structure elucidation of small molecule impurities and degradation products in pharmaceutical development. *Trends in Analytical Chemistry*, v. 121, 2019.

MAGGIO, R. M.; VIGNADUZZO, S. E.; KAUFMAN, T. S. Practical and regulatory considerations for stability-indicating methods for the assay of bulk drugs and drug formulations. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, v. 49, p. 57–70, 2013.

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

MANGLA, B.; PATEL, K.; KUMAR, P.; KOHLI, K. Validation of forced degradation and stability indicating studies of Tamoxifen in nanoformulation using spectroscopic technique. **Materials Today: Proceedings**, 26, 3265-3270, 2020.

MANOEL, B.M. Influência da exposição *in utero* e lactacional ao tamoxifeno: repercussão tardia em parâmetros reprodutivos e comportamentais, em ratos machos adultos. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde. Universidade Federal da Grande Dourados, 2021.

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.

NOLVADEX-D [Bula]. Reino Unido: AstraZeneca UK Limited.

OMS. International Stability Testing: guidelines for stability testing of pharmaceutical products containing well established drug substances in conventional dosage forms. Annex 5, WHO Technical Report Series, 863, 1996.

PASSOS, M. P.; THIESEN, F. V.; SOUZA, A. P. D.; OLIVEIRA, L. M. Interação entre Inibidores da Recaptação de Serotonina e Tamoxifeno: Uma revisão da literatura. **Rev. Bras. Farm. Hosp. Serv. Saúde**, v.7, n.1, 40-44, 2016.

Pavia, D. L. et al. **Introdução à espectroscopia 4**. 2010.

RADIN, D. P.; PATEL, P. Delineating the molecular mechanisms of tamoxifen's oncolytic actions in estrogen receptor-negative cancers. *European Journal of Pharmacology*, v. 781, p. 173–180, 15 jun. 2016.

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.

RAWAT, T.; PANDEY, I. P. Forced degradation studies for drug substances and drug products- scientific and regulatory considerations. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, v. 7, n. 5, p. 238–241, 2015.

SANDHU, P. S. et al. QbD-Driven Development and Validation of a HPLC Method for Estimation of Tamoxifen Citrate with Improved Performance. **Journal of Chromatographic Science**, v. 54, n. 8, p. 1373–1384, 1 set. 2016.

SANTOS, P.M.C.C.P. Mecanismos de degradação de compostos de relevância biológica por radicais oxidantes. Dissertação de Doutorado. Departamento de Química Orgânica. Universidade Nova de Lisboa, 2010.

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.

SILVA, D.T.C. Desenvolvimento de sistemas de dispersões sólidas para liberação pH dependente do tamoxifeno. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal de Pernambuco, 2016.

SILVA, D.T.C. Desenvolvimento de sistema híbrido a partir do excipiente farmacêutico montmorillonita para liberação controlada do citrato de tamoxifeno.

Tese de Doutorado. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal de Pernambuco, 2020.

SILVA, J.W.V. Avaliação do perfil de estabilidade do Terconazol e caracterização de seus produtos de degradação. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal de Pernambuco, 2019.

SILVA, K.E.R., ALVES, L.D.S., SOARES, M.F.R., PASSOS, R.C.S., FARIA, A.R., ROLIM NETO, P.J. Modelos de Avaliação da Estabilidade de Fármacos e Medicamentos para a Indústria Farmacêutica. *Rev Cienc Farm Básica Apl*, 30(2):129-35, 2009.

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 Ciências Farmacêuticas. 5a ed. Porto Alegre: Artmed, 2008.

SHARMA, M. K.; MURUGESAN, M. Forced Degradation Study an Essential Approach to Develop Stability Forced Degradation Study an Essential Approach to Develop Stability Indicating Method. *Journal of Chromatographic Separation Techniques*, v. 8, n. 1, p. 1–4, 2017.

SOCIETY, A. C. Hormone Therapy for Breast Cancer. 2017.

SOUZA, R. D. M.; MARTINS, D. M. F.; CHEIN, M. B. C.; BRITO, L. M. O. Importância do CYP2D6 em usuárias de tamoxifeno no câncer de mama. **Revista FEMINA**, V. 39, n. 5, 267-274, 2011.

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.

Stephens W. E. "A Pulsed Mass Spectrometer with Time Dispersion". *Phys. Rev.* 69 (11–12): 691, 1946.

TEMBHARE, E.; GUPTA, K. R.; UMEKAR, M. J. An Approach to Drug Stability Studies and Shelf-life Determination. *Archives of Current Reserach International*, v. 19, n. 1, p. 1–20, 2019.

TSUIKI, A. et al. Induction of Ovulation with an Estrogen Antagonist, Tamoxifen. *The Tohoku Journal of Experimental Medicine*, v. 144, n. 1, p. 21–31, 1984.

WONG, K. Y. et al. Water extract of Er-xian decoction selectively exerts estrogenic activities and interacts with SERMs in estrogen-sensitive tissues. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 275, p. 114096, 15 jul. 2021.

ZHOU, D. et al. Drug Stability and Degradation Studies. In: Developing Solid Oral Dosage Forms. [s.l.] Elsevier Inc., 2017. p. 113–150.