

Catarina Sofia Matos de Jesus

# **Avaliação de Perfis de Degradação Química de Um Produto Farmacêutico**

**Dissertação apresentada para provas de Mestrado em Química, Área de especialização  
em Controlo da Qualidade e Ambiente**

Orientador: Professor Doutor Artur J. M. Valente

Co-orientadora: Doutora Mónica P. O. Pereira

**Julho 2014**

Universidade de Coimbra



Este trabalho está escrito de acordo com o novo acordo ortográfico.



“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”

*José de Alencar*



## Agradecimentos

Este espaço é dedicado àqueles que deram a sua contribuição para que este trabalho fosse realizado. Desejo agradecer a todas as pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização do mesmo.

Em primeiro lugar agradeço ao Professor Dr. Artur José Monteiro Valente pela forma como orientou o meu trabalho, pela competência científica, pela disponibilidade e generosidade, bem como pelas críticas, correções e sugestões relevantes feitas durante a orientação.

Agradeço à administração da Empresa X., pela oportunidade concedida em poder realizar este trabalho numa área de relevância na indústria farmacêutica, pela possibilidade de adquirir novos conhecimentos e de contactar com pessoas com experiência na área.

Agradeço à Dr<sup>a</sup> Mónica Pereira, Diretora de Controlo de Qualidade da Empresa X – Empresa X, e à Eng. Catarina Silva, gestora adjunta do laboratório de Controlo de Qualidade, do setor das Estabilidades, por todas as palavras de incentivo e compreensão evidenciadas ao longo da execução deste trabalho.

Agradeço a todos os colegas do laboratório do Controlo da Qualidade, pelas suas preciosas opiniões e sugestões, colaborando assim para o meu crescimento profissional, especialmente à Sandra Rodrigues, à Alexandra Pereira e à Isabel Melo por todo o apoio e carinho que me prestaram ao longo desta etapa.

Agradeço a todos os meus amigos, pela amizade, dedicação e ajuda nos momentos mais difíceis, especialmente à Ana Freitas, à Cátia Fernandes e à Ana Cancela, que mesmo longe estão sempre por perto.

Agradeço á minha família, por todas as palavras de incentivo e força prestadas ao longo de todo este meu percurso. Um enorme obrigado por acreditarem sempre em mim e naquilo que faço e por todos os ensinamentos de vida.

Quero agradecer também ao meu namorado pela paciência que teve comigo, pelo seu carinho, amor e dedicação prestado, mesmo nos momentos mais complicados. Sem ele nada disto era possível.

Agradeço de uma forma especial aos meus pais pelo encorajamento e carinho recebidos, pelas sábias lições de esperança, pelas palavras certas nos momentos certos, bem como pela compreensão e confiança necessária para realizar os meus sonhos.

Um sincero OBRIGADA a todos!

# Índice

Índice de Figuras.....	iii
Índice de Tabelas .....	v
Abreviaturas.....	vii
Resumo .....	ix
<i>Capítulo I</i> .....	1
<i>Introdução</i> .....	1
1.1 – A Empresa.....	3
1.2 – Estudos de Estabilidade.....	5
1.3 – Estabilidade Farmacêutica vs Cinética Das Reações Químicas .....	8
1.4 - Fatores Que Perturbam A Estabilidade Farmacêutica .....	10
1.4.1 – Fatores Externos .....	10
1.4.1.1 – Temperatura .....	10
1.4.1.2 – Luz .....	11
1.4.1.3 – Humidade .....	12
1.4.2 – Fatores Internos .....	13
1.4.2.1 – Hidrólise.....	13
1.4.2.2 – Fotólise.....	13
1.4.2.3 – Oxidação .....	14
1.4.3 – Fatores Característicos da Formulação.....	15
1.4.3.1 – Polimorfismo.....	15
1.4.3.2 – Incompatibilidade .....	16
1.4.3.3 – pH.....	16
1.4.3.4 – Tamanho da partícula.....	17
1.4.3.5 – Vaporização .....	17
1.5 - Produto Farmacêutico Em Estudo .....	18
1.6 – Processo de Esterilização De Produtos Farmacêuticos .....	23
1.7 – Objetivo.....	26

<i>Capítulo II</i> .....	29
<i>Parte Experimental</i> .....	29
2.1 – Reagentes e Soluções .....	29
2.2 – Métodos Experimentais.....	30
2.2.1 – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.....	30
2.2.2 – Potenciometria .....	34
2.3 – Procedimento Experimental .....	37
<i>Capítulo III</i> .....	39
<i>Resultados Experimentais e Discussão</i> .....	39
3.1 – Estudos de Estabilidade.....	41
3.1.1 – Estabilidade do Ondansetron Armazenado a 30°C / 75% HR.....	46
3.1.2 – Estabilidade do Ondansetron Armazenado a 40°C / 75% HR.....	47
3.2 – Estudos de Degradação .....	49
3.2.1 – Degradação Ácida.....	52
3.2.2 – Degradação Básica .....	54
3.2.3 – Degradação por Oxidação .....	57
3.2.4 – Degradação por Temperatura .....	59
3.2.4.1 – Degradação a 80°C durante 24 horas .....	59
3.2.4.2 – Degradação a 121°C durante 24 horas .....	60
3.2.4.3 – Degradação a 121°C durante 15 minutos.....	61
<i>Capítulo IV</i> .....	63
<i>Conclusões</i> .....	63
Referências Bibliográficas .....	69

## Índice de Figuras

**Figura 1** - Fotografia das atuais instalações da Empresa X.

**Figura 2** - Fotocinética de nifedipino em etanol quando submetido a irradiação contínua com luz monocromática de diferentes comprimentos de onda: 235, 282, 345, 370 e 390 nm.

**Figura 3** - Decomposição de cilazapril sob condições de humidade relativa (HR) variáveis e temperatura constante ( $T=70^{\circ}\text{C}$ ).

**Figura 4** - Mecanismo da hidrólise de uma amida num ácido carboxílico e numa amina.

**Figura 5** - Mecanismo da hidrólise de um éster num ácido carboxílico.

**Figura 6** - Fotodecomposição da acetazolamida.

**Figura 7** - Mecanismo de oxidação da epinefrina.

**Figura 8** - Estrutura Molecular do Ondansetron HCl.

**Figura 9** – Hidrogenação do resorcinol e posterior reação com fenilhidrazina.

**Figura 10** - Ciclização de Fisher do derivado de fenilhidrazona.

**Figura 11** – Metilação do derivado de 1,2,3,9-tetrahydro-4H-carbazol-4-ona.

**Figura 12** - Reação de Mannich do OND- III.

**Figura 13** - Condensação do OND-IV para formação do Ondansetron base.

**Figura 14** - Tratamento do OND-V com ácido para dar origem ao Cloridrato de Ondansetron dihidratado.

**Figura 15** - Níveis da impureza D em vários lotes de Ondansetron quando submetidos à esterilização.

**Figura 16** – a) Ilustração da separação de componentes de uma dada mistura por eluição.  
b) Sinal obtido pelo detetor à medida que se vai dando a eluição.

**Figura 17** – Equipamento de HPLC e seus respetivos constituintes

**Figura 18** – Esquema representativo de uma célula para determinações potenciométricas.

**Figura 19** – Cromatograma tipo de uma solução resolução de Ondansetron.

**Figura 20** – Curva de calibração linear das soluções padrão de Ondansetron para doseamento.

**Figura 21** – Curva de calibração linear das soluções padrão de Ondansetron para compostos relacionados.

**Figura 22** – Cromatograma do doseamento da amostra não degradada de Ondansetron.

**Figura 23** – Cromatograma dos compostos relacionados da amostra não degradada de Ondansetron.

**Figura 24** – Análise DAD da amostra resultante da degradação ácida.

**Figura 25** – Cromatograma da análise efetuada aos compostos relacionados da amostra da degradação ácida.

**Figura 26** - Análise DAD da amostra resultante da degradação básica.

**Figura 27** - Cromatograma da análise efetuada aos compostos relacionados da amostra da degradação básica.

**Figura 28** – Cromatograma da análise efetuada aos compostos relacionados da amostra da degradação por oxidação.

## Índice de Tabelas

**Tabela 1** – Descrição dos tipos e condições de estabilidade.

**Tabela 2** - Descrição das diferentes zonas climáticas para realização de estudos de estabilidade.

**Tabela 3** - Lista de impurezas e produtos de degradação do Cloridrato de Ondansetron dihidratado.

**Tabela 4** – Fases ligadas mais comumente aplicadas

**Tabela 5** – Tabela resumo do doseamento de Ondansetron (%) obtido no T0.

**Tabela 6** - Limites de impurezas de Ondansetron em estabilidade.

**Tabela 7** – Resultados obtidos na análise quantitativa das impurezas de Ondansetron em T0.

**Tabela 8** – Tabela resumo do doseamento de Ondansetron obtido no estudo do T3 a 30°C/75% HR.

**Tabela 9** - Análise quantitativa das impurezas de Ondansetron no T3 a 30°C/75% HR.

**Tabela 10** - Tabela resumo dos resultados de doseamento de Ondansetron obtido no estudo do T1 e T3 a 40°C/75% HR.

**Tabela 11** - Análise quantitativa das impurezas de Ondansetron no T1 e T3 a 40°C/75% HR.

**Tabela 12** - Tabela resumo do doseamento obtido para a amostra não degradada de Ondansetron.

**Tabela 13** - Análise quantitativa das impurezas da amostra não degradada de Ondansetron.

**Tabela 14** - Tabela resumo do doseamento obtido por degradação ácida do Ondansetron.

**Tabela 15** - Análise quantitativa das impurezas da amostra da degradação ácida.

**Tabela 16** - Tabela resumo do doseamento obtido por degradação básica do Ondansetron.

**Tabela 17** - Análise quantitativa das impurezas da amostra da degradação básica.

**Tabela 18** - Tabela resumo do doseamento obtido da degradação por oxidação do Ondansetron.

**Tabela 19** - Análise quantitativa das impurezas da amostra da degradação por oxidação.

**Tabela 20** - Tabela resumo do doseamento obtido da degradação do Ondansetron a 80°C durante 24h.

**Tabela 21** - Análise quantitativa das impurezas da amostra da degradação a 80°C durante 24h.

**Tabela 22** - Tabela resumo do doseamento obtido da degradação do Ondansetron a 121°C durante 24h.

**Tabela 23** - Análise quantitativa das impurezas da amostra da degradação a 121°C durante 24h.

**Tabela 24** - Tabela resumo do doseamento obtido da degradação do Ondansetron a 121°C durante 15min.

**Tabela 25** - Análise quantitativa das impurezas da amostra da degradação a 121°C durante 15min.

## **Abreviaturas**

HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

UPLC – Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência

GMP's – Boas Práticas de Fabrico

AIM – Autorização de Introdução no Mercado

RSD – Desvio Padrão Relativo

Tr – Tempo de Retenção

DOS - Doseamento

CR'S- Compostos Relacionados

DAD – Detetor de Arranjos de Díodos

UV/Vis – Ultravioleta / Visível

HR – Humidade Relativa



## Resumo

A estabilidade de um produto farmacêutico é um parâmetro de grande importância que tende a avaliar a qualidade, segurança e eficácia exigidas para o registro de produtos farmacêuticos, de modo a cumprir com as exigências legais. A determinação da estabilidade tem por base o cuidado existente com a saúde pública, visto que a falta de estabilidade pode comprometer a eficácia terapêutica assim como pode causar efeitos tóxicos como resultado da degradação dos fármacos.

Este trabalho tem como objetivo a execução e interpretação de resultados de análises de estabilidade de um estudo efetuado para o produto Ondansetron injetável. Além disso, pretende ainda avaliar-se, através de estudos de stress, que fatores afetam a degradação deste fármaco. Assim, será avaliado o impacto de vários fatores associados à cinética de degradação do Ondansetron.

Palavras-chave: fármacos, estudos de estabilidade, degradação química, Ondansetron.

## **Abstract**

The stability of a pharmaceutical product is a parameter of great to assess the quality, safety and efficacy required for registration of pharmaceutical products in order to comply with legal requirements. The determination of stability is based on the public health care requirements, since the lack of stability, and the consequent degradation may compromise the therapeutic efficacy and the possible toxic effects as well.

This study aims the implementation and interpretation of results of stability analysis for the Ondansetron Injection product. Degradation of the drug will be essentially assessed by studies of stress. This can be reached, we by assessing the effect of different factors, by stress studies, on the degradation kinetics of the Ondansetron.

**Keywords:** drugs, stability studies, chemical degradation, Ondansetron.

# *Capítulo I*

## *Introdução*



## **1.1 – A Empresa**

Este capítulo foi retirado por questões de confidencialidade.

Este capítulo foi retirado por questões de confidencialidade.

## 1.2 – Estudos de Estabilidade

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) a estabilidade em produtos farmacêuticos é descrita como a capacidade de um dado fármaco garantir as suas propriedades químicas, microbiológicas, físicas e biofarmacêuticas dentro de uma gama de valores específicos, ao longo do seu prazo de validade [3]. A estabilidade de um fármaco é avaliada por recurso a testes (testes de estabilidade) que têm como objetivo demonstrar que a qualidade de um princípio ativo ou de um produto farmacêutico varia em função do tempo sob a influência de diversos fatores, tais como, temperatura, humidade e luminosidade. Estes, pretendem ainda determinar um período de re-teste para os princípios ativos e um prazo de validade para os fármacos, bem como, definir as suas condições de armazenamento (de acordo com o regulamento para os testes de estabilidade elaborado pela Comissão Internacional de Harmonização - Q1A(R2) [4]. O motivo pelo qual se efetuam este tipo de estudos em produtos farmacêuticos deve-se em grande parte à preocupação existente com a saúde pública, pois a perda da estabilidade de um fármaco pode comprometer a sua eficácia terapêutica [5], assim como, pode proporcionar a formação de produtos de degradação tóxicos. Deste modo, o estudo em questão consiste num método que permite a avaliação, previsão e prevenção de problemas associados à qualidade do produto. Os estudos de estabilidade devem assegurar que a identidade, eficácia, pureza e inocuidade dos fármacos em questão, são asseguradas dentro dos limites especificados durante o seu prazo de validade. A OMS exige a comprovação da estabilidade assim como a determinação do prazo de validade dos produtos farmacêuticos, uma vez que, estes parâmetros são de elevada importância. Os procedimentos utilizados, tais como, a seleção do lote, as condições de armazenamento, a frequência dos testes, a gestão das amostras e os resultados obtidos são deliberados pelas autoridades reguladoras da saúde e pelas *guidelines* de referência, nomeadamente a ICH.

Existem cinco tipos de estabilidade que devem obedecer a limites especificados durante o prazo de validade de um fármaco [6], como pode ser observado na Tabela 1.

<b>Tipo de Estabilidade</b>	<b>Condições</b>
Química	Doseamento e impurezas indicadas na embalagem.
Física	Propriedades físicas originais (uniformidade, aparência, etc.)
Toxicológica	Não se deve registar aumento da toxicidade.
Terapêutica	O efeito terapêutico deve permanecer inalterado.
Microbiológica	A esterilidade ou resistência ao crescimento microbiológico.

**Tabela 1** – Descrição dos tipos e condições de estabilidade.

Quando estamos perante estudos de estabilidade, podemos realizar estudos on-going, testes de longo prazo ou testes acelerados [7,8]. No primeiro caso, pretende-se monitorizar um dado produto durante o seu prazo de validade, e deste modo concluir se o produto se mantém dentro das especificações, mesmo em certas condições de armazenamento. No que respeita os testes de longo prazo, estes são executados sob condições de armazenamento recomendadas, até re-teste (no caso de matérias primas) ou fim da validade (no caso de medicamentos) de modo a que se torne possível a elaboração de um perfil de estabilidade dos produtos. Este estudo permite assim a verificação das características físicas, químicas, biológicas e microbiológicas de um fármaco. Os resultados dos estudos a longo prazo apresentam uma elevada importância uma vez que permitem estabelecer ou confirmar o prazo de validade e recomendar as condições de armazenamento. Para testes acelerados existe o intuito de aumentar a taxa de degradação química ou física de um produto farmacêutico através de severas condições de armazenamento. Os resultados provenientes dos testes acelerados podem propiciar informações relevantes relativamente a mudanças químicas que poderão ocorrer num prazo mais longo. Deste modo, pretende-se através da realização destes testes simular condições de armazenamento severas, para além das que são especificadas como, por exemplo, aquando do transporte dos medicamentos [9].

As condições de armazenamento de qualquer produto farmacêutico são definidas de acordo com as zonas climáticas para as quais o produto irá ser comercializado. Assim, as condições de armazenamento e a duração do estudo devem, de certo modo, equiparar-se às condições reais de armazenamento, distribuição e aplicação.

Na tabela seguinte encontram-se descritos os vários tipos de zonas climáticas.

<b>Zona Climática</b>	<b>Definição</b>	<b>Condições de Armazenamento</b>
<b>I</b>	Temperada	21°C / 45% HR
<b>II</b>	Mediterrânea / Subtropical	25°C / 60% HR
<b>III</b>	Quente e Seca	30°C / 35% HR
<b>IV a)</b>	Quente e Húmida	30°C / 65% HR
<b>IV b)</b>	Quente e Muito Húmida	30°C / 75% HR

**Tabela 2** – Descrição das diferentes zonas climáticas para realização de estudos de estabilidade.

Um outro tipo de estudo que pode ser executado de modo a avaliar a estabilidade de um dado produto farmacêutico é o teste de degradação forçada, também conhecido por teste de stress. Este teste consiste num processo que envolve a degradação de um fármaco em condições mais severas do que aquelas que se verificam nos testes acelerados [7]. Segundo a

Conferência Internacional de Harmonização, os testes de stress são realizados de modo a evidenciar a estabilidade intrínseca de um dado fármaco. Destes são gerados dados relativos aos produtos de degradação assim como mecanismos de decomposição do ingrediente ativo [9].

Os estudos de degradação forçada envolvem fármacos que são sujeitos a condições austeras de fatores catalíticos externos e internos, tais como, calor, humidade, pH e luz. As amostras são colhidas ao longo do tempo e analisadas de modo a verificar se existe ou não degradação. As principais preocupações, durante os testes de estabilidade e o armazenamento aquando da distribuição dos fármacos, são as alterações químicas e físicas que podem ocorrer; deste modo, os estudos de degradação forçada servem para fornecer informações respeitantes à estabilidade dos fármacos durante o seu tempo de vida [10]. O tipo de estudo aplicado depende de fármaco para fármaco.

A realização de testes de stress detém um papel demasiado importante na determinação da estabilidade dos fármacos, uma vez que apresenta vários benefícios, tais como:

- ❖ Determinação da sensibilidade de um produto farmacêutico perante fatores como temperatura, humidade, luz, pH, oxigénio e catalisadores;
- ❖ Determinação de características de estabilidade inerentes ao princípio ativo;
- ❖ Avaliação dos parâmetros específicos de testes que podem ser indicadores da estabilidade do produto;
- ❖ Auxilia na seleção da proteção da embalagem;
- ❖ Avaliação da integridade do material que envolve os fármacos, como por exemplo, os blisters;
- ❖ Auxilia na identificação de condições que devem ser utilizadas aquando do fabrico e armazenamento;
- ❖ Auxilia no estabelecimento de um prazo de validade;
- ❖ A caracterização dos produtos de degradação provenientes da degradação forçada, contribui para a compreensão da reação química que ocorre;
- ❖ Auxilia na prevenção de problemas associados à estabilidade e portanto na conceção de formulações mais robustas.

### 1.3 – Estabilidade Farmacêutica vs Cinética Das Reações Químicas

A determinação da estabilidade e a decisão do prazo de validade de um produto farmacêutico tem por base a velocidade a que ocorre a degradação dos fármacos e os fatores tais como, por exemplo, a concentração dos reagentes afetam essa mesma velocidade. Deste modo, a estabilidade farmacêutica relaciona-se diretamente com a cinética química da reação [11]. A degradação que se verifica nos produtos farmacêuticos é essencialmente de natureza química e ocorre a uma determinada velocidade [12;13]. Deste modo, existe um particular interesse em tomar conhecimento relativamente à ordem da reação bem como à velocidade que lhe está associada, quando se pretende estudar a estabilidade química de um dado fármaco.

De acordo com a cinética química, a velocidade da reação de degradação consiste na variação da concentração do produto farmacêutico em relação ao tempo. Por recurso a integrações analíticas da lei cinética podem obter-se as concentrações em função do tempo. Assim, e sabendo a velocidade inicial, é possível prever a concentração dos reagentes e produtos para qualquer valor de tempo (t).

Normalmente, as reações de degradação farmacêutica seguem todas as ordens. As reações que seguem uma cinética de ordem superior à de segunda ordem são raras e apresentam um certo grau de complexidade [14]. Diz-se que uma reação é de ordem zero quando a degradação do fármaco é independente da concentração dos reagentes e representa uma constante ao longo do tempo. Na equação 1 podemos observar a expressão matemática para reações de ordem zero,

$$-\frac{dC}{dt} = k_0 \quad \text{Equação 1}$$

onde, C é a concentração do fármaco, t corresponde ao tempo e  $k_0$  é a constante de velocidade de ordem zero. Por recurso à integração da equação 1, surge a equação 2,

$$C = C_0 - k_0 \cdot t \quad \text{Equação 2}$$

onde,  $C_0$  corresponde à concentração inicial do fármaco.

Por sua vez, as reações de primeira ordem ocorrem quando a degradação do fármaco apresenta uma relação de proporcionalidade entre a concentração do reagente e o tempo. A equação 3 representa a equação matemática que caracteriza uma cinética de primeira ordem, onde  $k_1$  corresponde à constante de velocidade de uma cinética desta ordem.

$$-\frac{dC}{dt} = k_1 \cdot C \quad \text{Equação 3}$$

Por integração da equação 3, surge a equação 4,

$$C = C_0 \cdot e^{-k_1 t} \quad \text{Equação 4}$$

Nas reações de segunda ordem, a velocidade da reação é diretamente proporcional ao quadrado da concentração do reagente. A equação 5 permite a determinação dessa mesma velocidade.

$$-\frac{dC}{dt} = k_2 \cdot C_A^2 \quad \text{Equação 5}$$

Neste caso  $k_2$  corresponde à constante de velocidade de uma cinética de segunda ordem e  $C_A$  é a concentração do reagente A que constitui o fármaco. Por integração da equação 5 surge a equação 6.

$$\frac{1}{C_A} = k_2 t + \frac{1}{C_0} \quad \text{Equação 6}$$

Dentro das reações de segunda ordem deve ainda considerar-se a possibilidade de existirem dois reagentes diferentes, e desse modo a lei da velocidade é exposta como representado na equação 7.

$$-\frac{dC_A}{dt} = -\frac{dC_B}{dt} = k_2 \cdot C_A C_B \quad \text{Equação 7}$$

Assim  $C_A$  é a concentração do reagente A e  $C_B$  é a concentração do reagente B que constituem o fármaco. A integração da equação anterior, permite obter a equação 8.

$$\frac{1}{C_{A0} - C_{B0}} \ln \left( \frac{C_{B0} \cdot C_A}{C_{A0} \cdot C_B} \right) = k_2 t \quad \text{Equação 8}$$

## 1.4 - Fatores Que Perturbam A Estabilidade Farmacêutica

A estabilidade de um fármaco é afetada por diversos fatores, alguns dos quais, com especial relevância para o presente trabalho, são em seguida descritos:

### 1.4.1 – Fatores Externos

#### 1.4.1.1 – Temperatura

A temperatura é um dos fatores que apresenta maior relevância na estabilidade farmacêutica, pois à medida que a temperatura se eleva a velocidade a que ocorre a degradação será superior. O aumento da velocidade, quando se registra um aumento da temperatura, pode ser expresso pela seguinte equação de Arrhenius [15],

$$K = A \cdot e^{-E_a/RT} \quad \text{Equação 9}$$

onde,  $k$  é a velocidade específica da reação,  $A$  é uma constante correspondente ao fator pré-exponencial,  $R$  corresponde à constante dos gases perfeitos (8,314 J/(K.mol)),  $E_a$  é a energia de ativação da reação, ou seja, a energia mínima para que uma reação ocorra (em kJ/mol) e  $T$  a temperatura absoluta. Por análise da equação anterior, podemos concluir que o sinal negativo para o expoente  $E_a/RT$  leva a que ocorra um aumento da constante de velocidade com o aumento da temperatura. Normalmente a equação 9 é utilizada sob a sua forma logarítmica, como re-escrita na equação 10.

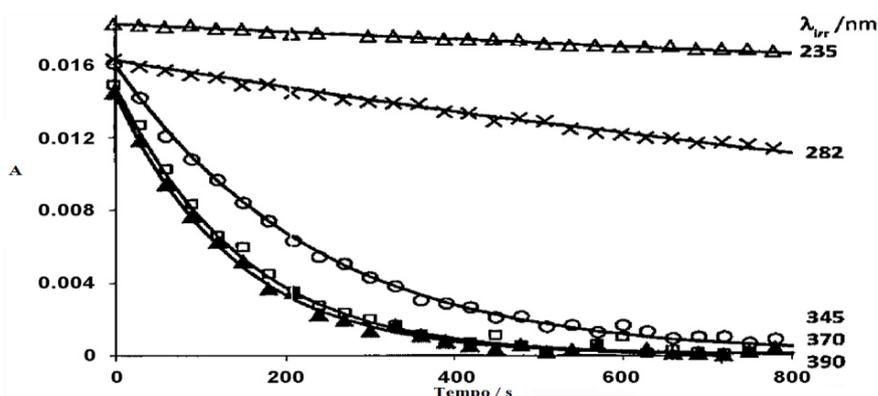
$$\log K = - \left( \frac{E_a}{2,303 \cdot RT} \right) + \log A \quad \text{Equação 10}$$

Esta equação assemelha-se à equação duma reta ( $y = mx+b$ ) e portanto o declive da reta de  $\log k$  em função de  $1/T$  traduz a  $E_a$ . A reta que é obtida a partir desta equação permite a previsão da estabilidade dos produtos farmacêuticos pela extrapolação dos dados do valor obtido a temperaturas elevadas. A equação de Arrhenius é aceitável para variações de temperatura em que  $A$  e  $E_a$  podem ser consideradas constantes [16,17]. Ao determinar o valor da energia de ativação ( $E_a$ ) pode determinar-se a sensibilidade da velocidade de degradação de um fármaco em função das variações de temperatura. A influência da temperatura pode ser reduzida pela correta seleção da forma de armazenamento: em temperatura ambiente, sob refrigeração ou congelamento.

### 1.4.1.2 – Luz

Um outro fator que influencia em grande medida a estabilidade farmacêutica é a luz. Para comprimentos de onda mais baixos, esta pode proporcionar uma  $E_a$  mais elevada que permite desenvolver reações de degradação química, como por exemplo a oxidação, e por conseguinte impulsionar a instabilidade dos fármacos, que a ela estão sujeitos.

No que respeita ao processo fotoquímico, pode dizer-se que as radiações são eficazes quando o sistema em questão detém capacidade para as absorver, para tal, é fundamental que a energia emitida pela luz seja absorvida pela molécula alvo. As reações fotoquímicas apresentam uma dificuldade acrescida no que respeita à sua cinética, quando comparadas com reações térmicas, uma vez que apresentam um maior número de variáveis a elas associadas [18]. As reações que são desencadeadas pela luz, geralmente possuem uma velocidade constante e são de ordem zero. A velocidade das reações de degradação pode ser afetada quando se faz incidir luz nos fármacos. Isto, deve-se ao facto de existirem diferentes espectros de distribuição da fonte de luz, a sua intensidade, também devido ao comprimento de onda dos fótons incidentes e ainda as propriedades espectrais das substâncias [19]. Por exemplo, segundo um estudo realizado por Maafi, a quantidade de nifedipino que é fotodegradada ao longo do tempo é proporcional ao comprimento de onda [18].

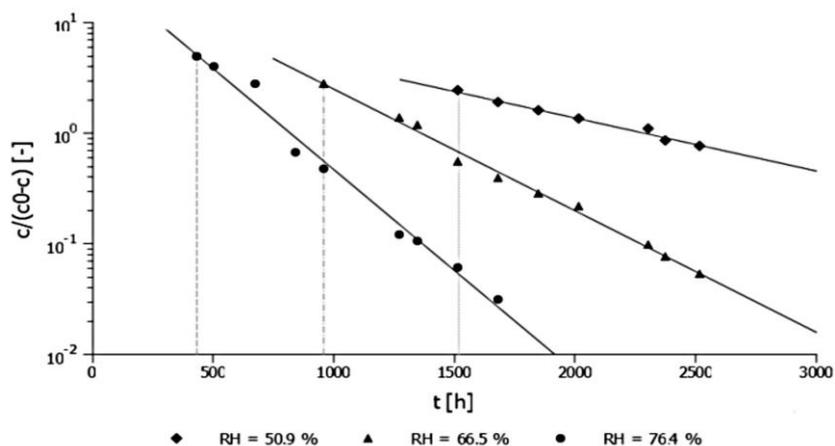


**Figura 2** – Fotocinética de nifedipino em etanol quando submetido a irradiação contínua com luz monocromática de diferentes comprimentos de onda: 235, 282, 345, 370 e 390nm [18].

A influência da luz pode ser reduzida pela correta seleção do material de embalagem.

### 1.4.1.3 – Humidade

A humidade é um outro fator que apresenta grande influência na estabilidade dos fármacos. Os produtos farmacêuticos higroscópicos, sofrem facilmente degradação por ação da humidade relativa (HR); no entanto, os não higroscópicos são afetados por este mesmo fator, nomeadamente quando se encontra associado o efeito da temperatura. Um aumento da humidade relativa, em condições de temperatura constante, conduz a alterações nos valores dos parâmetros cinéticos da reação [20].



**Figura 3** – Decomposição de cilazapril sob condições de humidade relativa (HR) variáveis e temperatura constante (T=70°C) [20].

De acordo com a Figura 3, pode observar-se que à medida que a humidade relativa dos fármacos aumenta, a sua decomposição ocorre para tempos (número de horas) reduzidos e de forma mais acentuada. A influência deste fator pode ser minimizada por recurso a embalagens impermeáveis. A humidade que se encontra presente nos fármacos afeta a estabilidade farmacêutica de dois modos. O primeiro baseia-se na adsorção da água à superfície do medicamento dando origem a uma camada de hidratação na qual a substância se dissolve e se deteriora. Tal, pode propiciar uma alteração do estado físico do fármaco e, naturalmente a sua reatividade, comprometendo a degradação do produto. Um segundo, consiste na degradação promovida pela água, levando por exemplo à hidrólise ou à hidratação. Neste caso, a velocidade de degradação é diretamente proporcional à concentração da água [21].

## 1.4.2 – Fatores Internos

### 1.4.2.1 – Hidrólise

Um outro fator que afeta a estabilidade química dos fármacos é a hidrólise. Isto deve-se ao facto de muitos dos produtos farmacêuticos apresentarem na sua composição grupos funcionais que promovem a hidrólise, tais como, amidas, ésteres, etc. Os compostos que apresentam ésteres na sua estrutura geralmente, são hidrolisados, através do ataque nucleofílico que ocorre entre o ião hidroxilo ou a água e o grupo éster, dando origem a um ácido carboxílico e um álcool. Produtos farmacêuticos tais como o ácido acetilsalicílico são facilmente hidrolisados visto que apresentam um grupo éster na sua estrutura química [22,23]. Os fármacos que possuem grupos amida na sua constituição são menos suscetíveis à hidrólise quando comparados com produtos farmacêuticos que contenham grupos ésteres, uma vez que as amidas são menos eletrofílicas, como pode ser observado nas Figuras 4 e 5 [24].

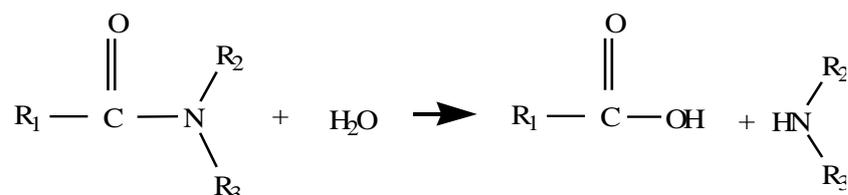


Figura 4 – Mecanismo da hidrólise de uma amida num ácido carboxílico e numa amina.

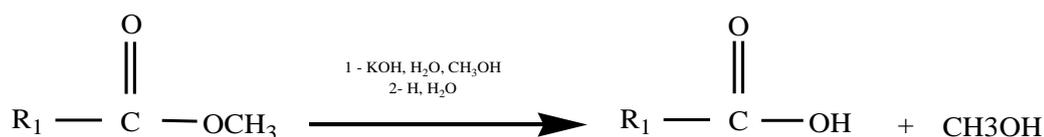


Figura 5 – Mecanismo da hidrólise de um éster num ácido carboxílico.

### 1.4.2.2 – Fotólise

A fotólise consiste na absorção de radiação por parte de uma substância ativa, de um dado produto farmacêutico. A absorção da radiação tanto pode ser efetuada pelos reagentes principais da reação fotoquímica assim como pelos reagentes fotossensibilizadores. Nestes, as moléculas transferem a energia absorvida da radiação para moléculas que posteriormente participarão na reação. De um modo geral, todos os princípios ativos detêm em si a capacidade de absorver radiações eletromagnéticas na zona do ultravioleta (UV) e do visível

(Vis) [25]. Quando estamos perante substâncias que apresentam máximos de absorção próximos da região do visível deparamo-nos com o facto de estas serem mais facilmente degradadas pela luz quando comparada com a luz ultravioleta. Assim, fármacos que apresentem na sua estrutura química átomos de oxigénio, azoto e enxofre encontram-se mais suscetíveis à fotodegradação [12,26]. De acordo com Vargas, o O<sub>2</sub> apresenta um papel fundamental na fotólise da acetazolamida. Na figura 6 podemos visualizar o produto resultante da fotodegradação da acetazolamida em meio aeróbio [27].

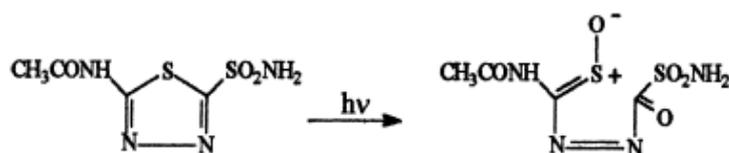


Figura 6 – Fotodecomposição da acetazolamida.

A fotodegradação pode ser acompanhada por reações térmicas ou, por outro lado, pode dar origem a um catalisador que promova essa mesma reação. Quando iniciada, a reação térmica, pode permanecer mesmo após a exposição à radiação. Deste modo, é imprescindível obter informações respeitantes à estabilidade térmica dos fármacos para a realização dos estudos de fotoestabilidade [28].

### 1.4.2.3 – Oxidação

Uma outra via de degradação química que pode ocorrer nos produtos farmacêuticos é a oxidação. Este fator afeta a estabilidade dos fármacos visto que, durante o processamento bem como durante o armazenamento a longo prazo destes, se encontra presente oxigénio que desencadeia a maioria das reações de oxidação.

As reações de oxidação que se podem verificar nos fármacos são dependentes da sua estrutura química assim como da influência de espécies reativas de oxigénio ou qualquer outro oxidante. No que respeita os produtos farmacêuticos, as reações de oxidação devem-se em grande parte à influência do oxigénio presente na atmosfera. Esta, numa fase inicial, decorre de um modo mais lento sendo que a velocidade de degradação aumenta à medida que decorre o processo.

Um produto que sofre facilmente oxidação é a epinefrina, dando origem a uma quinona (Figura 7) [29].

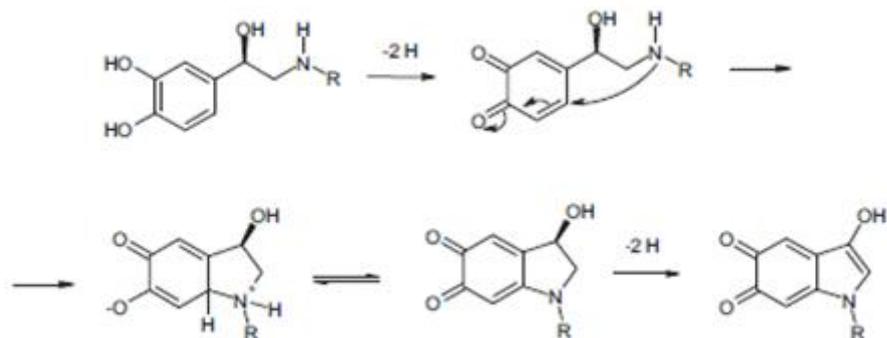


Figura 7- Mecanismo de oxidação da epinefrina.

### 1.4.3 – Fatores Característicos da Formulação

#### 1.4.3.1 – Polimorfismo

Existem muitas substâncias químicas que apresentam mais do que uma forma sólida. Cada uma dessas formas tem uma estrutura cristalina diferente e portanto diferem nas suas energias de cristalização, sendo termodinamicamente estáveis ao longo de determinadas gamas de temperatura e pressão. Este fenómeno denomina-se polimorfismo.

Polimorfos diferentes podem ter comportamentos físico-químicos distintos como, por exemplo, solubilidades e atividades biológicas. Este fenómeno deve-se a polimorfos diferentes conterem diferentes arranjos atômicos. No entanto, quando a substância altera o seu estado físico para líquido ou gasoso, estas características alteram-se uma vez que a estrutura cristalina do composto é destruída [30,31]. Existem vários fatores que podem dar origem a polimorfos; um exemplo é, o aquecimento seguido de um arrefecimento brusco.

Muitos dos produtos farmacêuticos apresentam polimorfos. Quando se encontram no estado cristalino, os fármacos exibem um nível de energia livre inferior e, conseqüentemente, apresentam um menor poder de reação comparativamente a fármacos amorfos que apresentam uma energia livre superior. No entanto, cada estado cristalino contém diferentes níveis de energia livre bem como diferentes níveis de reatividade química. A carbamazepina é um anticonvulsivo que existe em três formas não solvatadas ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) e numa forma di-hidratada, sendo o di-hidrato o que apresenta menor solubilidade.

A carbamazepina possui uma baixa solubilidade em água e uma alta permeabilidade intestinal. Neste caso, como a dissolução da droga é limitante da taxa de absorção do fármaco, há uma maior probabilidade do polimorfismo produzir algum efeito sobre a biodisponibilidade do medicamento. O polimorfismo é considerado um dos fatores atribuídos às características de dissolução irregular e a falhas clínicas. No que respeita à equivalência terapêutica, as transformações polimórficas são irrelevantes, como o é para o medicamento, e sua correspondente forma polimórfica. A carbamazepina, enquanto suspensão oral, provavelmente, existe como a forma di-hidratada. Neste caso, o controlo da forma no estado sólido seria desnecessária, visto que o di-hidrato corresponde à forma mais estável. Quando em comprimidos, a carbamazepina existe, provavelmente, como forma  $\beta$  existindo a possibilidade de transformação para a forma di-hidrato menos solúvel [32].

#### **1.4.3.2 – Incompatibilidade**

De um modo geral, os ativos não são administrados isoladamente pois são constituídos por um conjunto de excipientes que compõem a forma farmacêutica. Por sua vez, esta pode ser constituída por um ou mais ativos e assim podem reagir entre si ou até mesmo com os excipientes, colocando em causa a estabilidade e a eficácia do fármaco.

A mistura do ácido acetilsalicílico com estearato de magnésio, amplamente utilizado em comprimidos como lubrificante, é bem conhecida por estudos realizados, que dão conta da incompatibilidade associada a mudanças de comportamento térmico, sendo portanto necessário algum cuidado com outros sistemas pois tal fenómeno pode ser observado [33].

#### **1.4.3.3 – pH**

O pH é um fator que influencia em grande medida a velocidade das reações uma vez que as principais reações que desencadeiam a degradação dos produtos farmacêuticos são a hidrólise e a oxidação. Estas reações veem a sua velocidade aumentada por ação de ácidos e/ou bases, que servem como catalisadores [34]. Um fármaco para apresentar um bom desempenho deve, entre outros fatores, libertar os agentes terapêuticos de um modo eficaz como resposta ao ambiente local, como por exemplo o pH do meio. Tal deve verificar-se para reduzir os efeitos colaterais indesejados a outros tecidos.

De acordo com o estudo realizado por Rezaei, entre todos os estímulos aplicados, o pH ácido desencadeia a libertação seletiva de fármacos anticancerígenos, uma vez que o pH em tumores primários e metastáticos se encontra mais baixo do que o pH do tecido normal (7.4) e do pH intracelular dos seus lisossomas são ainda mais ácidas (pH 5-5,5). Por conseguinte a criação de um nanomaterial sensível ao pH, capaz de conduzir a droga ao tumor alvo, é um sistema estável a um pH fisiológico, no entanto sob condições ácidas não muito severas facilita a libertação do fármaco, podendo resultar num aumento significativo da eficácia terapêutica e numa diminuição da vertente citotóxica [35].

#### **1.4.3.4 – Tamanho da partícula**

O tamanho das partículas dos componentes, que constituem os fármacos desempenha um papel relevante na estabilidade química destes, uma vez que quanto maior é a área superficial da partícula, menor é a reatividade do produto. No que respeita à estabilidade físico-química de produtos farmacêuticos, o tamanho da partícula é também um fator que pode interferir. Geralmente, quando se trata de emulsões e suspensões estas podem estar sujeitas a alterações quer na sua aparência, alterações na uniformidade de dose, bem como, alterações na sua biodisponibilidade.

O tamanho da partícula tem um efeito significativo sobre a cinética dos fármacos e portanto a sua distribuição uniforme é considerada como uma condição essencial. Este é um fator que limita em grande medida as potenciais aplicações dos produtos farmacêuticos, uma vez que a sua estabilidade fica comprometida [36].

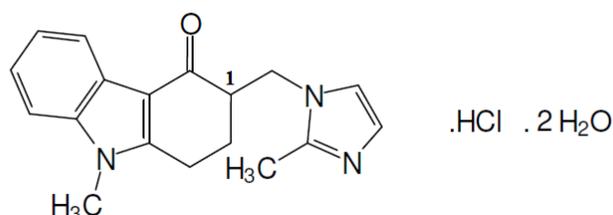
#### **1.4.3.5 – Vaporização**

Quando falamos em vaporização, referimo-nos à perda de um líquido, podendo este ser solvente de um dado produto farmacêutico. De um modo geral, este fator de degradação aumenta à medida que se eleva a temperatura e assim o fármaco pode ver a sua concentração aumentada ou, até mesmo, a uma sobredosagem aquando da administração deste. A vaporização pode promover um processo de precipitação se, se verificar um aumento da solubilidade do fármaco [37].

## 1.5 - Produto Farmacêutico Em Estudo

O produto farmacêutico que foi sujeito aos testes de degradação forçada, de modo a avaliar a sua estabilidade, foi o Ondansetron, sob a forma farmacêutica de uma solução injetável.

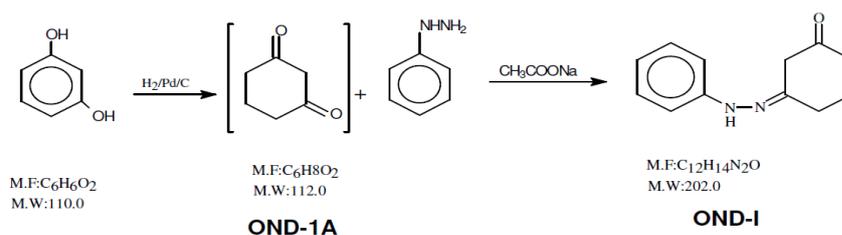
O Ondansetron sob a forma de cloridrato de Ondansetron, é um fármaco que pertence à categoria fármaco-terapêutica II – 6: Sistema nervoso cerebrosplinal. Antieméticos e antivertiginosos. Este fármaco está indicado na prevenção e tratamento de náuseas e vômitos causados pela quimioterapia ou radioterapia, fortemente emetizantes. Quimicamente, este produto farmacêutico é conhecido como 4H-carbazol-4-ona, 1,2,3,9-tetrahidro-9-metil-3-(2-metil-1H-imidazol-1-il)metil-monohidroclreto,(±)-dihidratado, estando a sua estrutura molecular representada na Figura 8.



**Figura 8** - Estrutura Molecular do Ondansetron HCl.

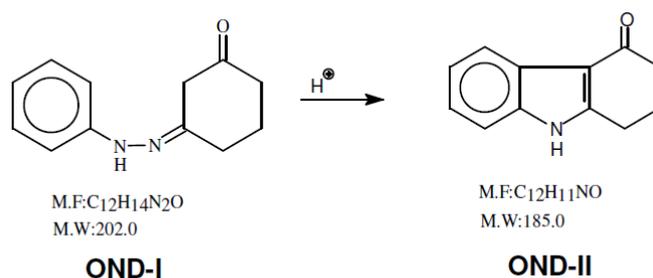
O Ondansetron, enquanto matéria-prima apresenta-se como um pó branco ou quase branco, sendo pouco solúvel em água e em álcool, ligeiramente solúvel em álcool isopropílico e em diclorometano e pouco solúvel em acetona, clorofórmio e acetato de etilo.

Relativamente ao processo de fabrico, a sequência de reações que dão origem ao cloridrato de Ondansetron dihidratado, encontra-se descrita nas Figura 9 a 14. No instante inicial, ocorre a hidrogenação do resorcinol para dar origem à 1,3 – dicetona (OND-1A). Esta, ao reagir com a fenilhidrazina e na presença de acetato de sódio permite chegar ao derivado de fenilhidrazona (OND-I) como se pode observar pelo esquema indicado na Figura 9 [38].



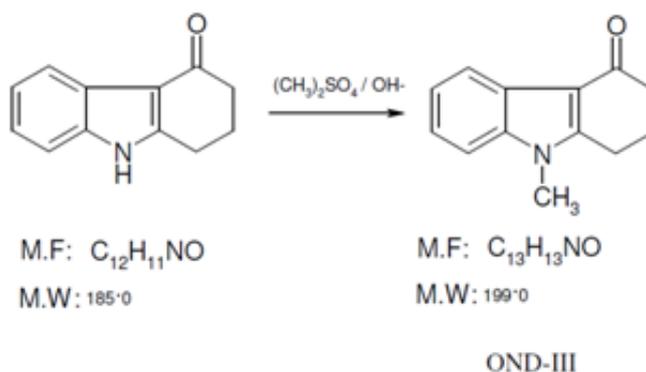
**Figura 9** – Hidrogenação do resorcinol e posterior reação com fenilhidrazina.

O derivado de fenilhidrazona sofre ciclização de Fisher, sob condições ácidas, e produz o derivado de carbazolona (OND-II) - Figura 10.



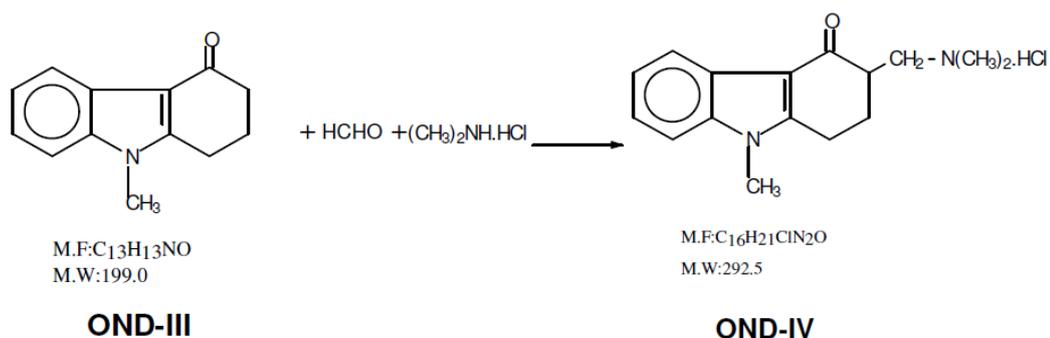
**Figura 10** - Ciclização de Fisher do derivado de fenilhidrazona.

Na Figura 11 verifica-se que o derivado de 1,2,3,9-tetrahidro-4H-carbazol-4-ona (OND-II) sofre metilação por ação do dimetilsulfato, em meio alcalino, dando origem a OND-III.



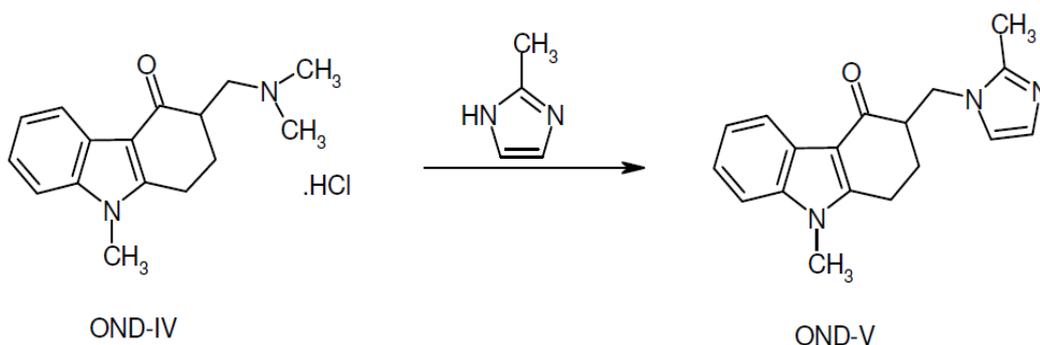
**Figura 11** - Metilação do derivado de 1,2,3,9-tetrahidro-4H-carbazol-4-ona.

O OND-III sofre uma reação de Mannich, na presença de formaldeído e cloridrato de dimetilamina, promovendo a aparecimento de um sal denominado de cloridrato-3-[(dimetilamino) metil]-1,2,3,9-tetrahidro-9-metil-4H-carbazol-4-ona (OND-IV), Figura 12.



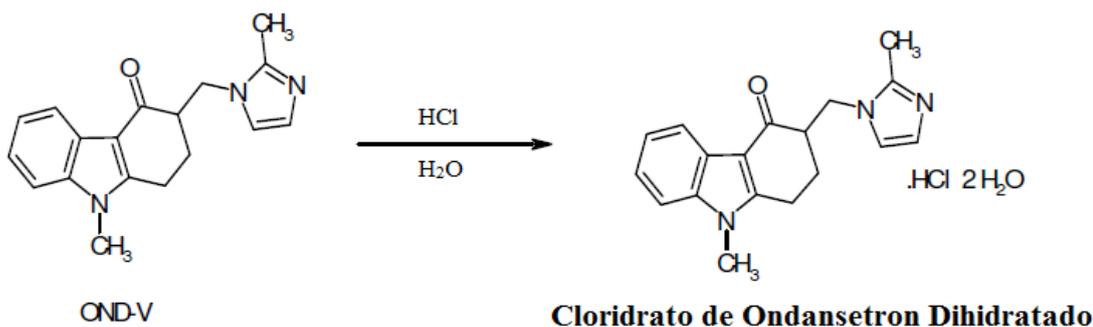
**Figura 10** – Reação de Mannich do OND- III.

Por condensação de OND-IV com 2-metilimidazol surge o Ondansetron (OND-V), tal como representado na Figura 13.



**Figura 11** – Condensação do OND-IV para formação do Ondansetron base.

O Ondansetron base (OND-V) é tratado com ácido clorídrico e água para se obter o cloridrato de ondansetron dihidratado, como pode ser observado na Figura 14.

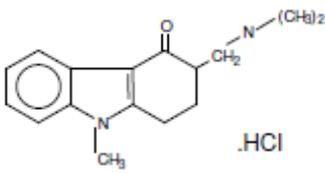
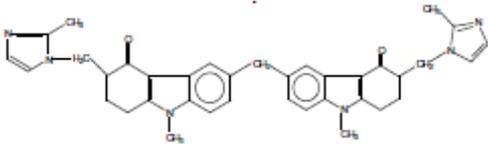
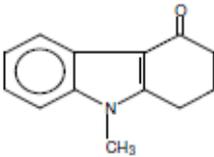
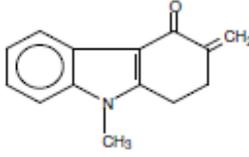
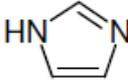
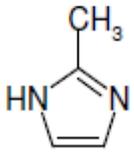
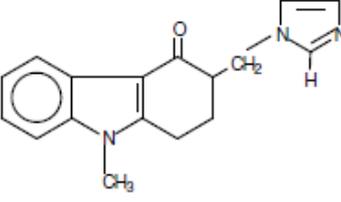
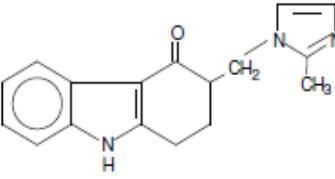


**Figura 14** – Tratamento do OND-V com ácido para dar origem ao cloridrato de Ondansetron dihidratado.

O cloridrato de Ondansetron dihidratado apresenta um centro assimétrico, como podemos observar na Figura 8 (carbono 1), e no que respeita à quiralidade do produto, pode dizer-se que é um composto racémico uma vez que resulta numa mistura de igual proporção dos isómeros S e R.

Em termos polimórficos não existem relatos da existência de mais do que uma forma para o caso do Ondansetron.HCl.H<sub>2</sub>O. No entanto, existem nove formas poliméricas distintas para produtos de cloridrato de Ondansetron monohidratado e anidro.

O cloridrato de Ondansetron dihidratado apresenta um perfil de impurezas. Estas encontram-se descritas na tabela seguinte.

Impureza	Estrutura Molecular	Fórmula Molecular	Origem da Impureza
A		$C_{20}H_{22}N_2O \cdot HCl$	Material de Partida
B		$C_{37}H_{38}N_6O_2$	Subproduto
C		$C_{13}H_{15}NO$	Material de Partida
D		$C_{14}H_{13}NO$	Produto de Degradação
E		$C_3H_4N_2$	Reagente
F		$C_4H_6N_2$	Reagente
G		$C_{17}H_{17}N_3O$	Subproduto
H		$C_{17}H_{17}N_3O$	Subproduto

**Tabela 3** – Lista de impurezas e produtos de degradação do Cloridrato de Ondansetron dihidratado.

A impureza A surge como um intermediário. Este é controlado durante o processo e pode ser encaminhado até ao produto final se não reagir. Já a impureza B surge durante a formação do Ondansetron livre de base. Por adição da mistura água + metanol na fase em que se verifica a ausência de base, podem remover-se substancialmente as impurezas B. Quanto à impureza C, esta aparece no material de partida, e tal como a impureza A, pode ser encaminhada para o produto final, se permanecer sem reagir. A impureza D, por sua vez, existe como um intermediário. O aparecimento da impureza E encontra-se relacionado com a aplicação do 2-metilimidazol. No que respeita a impureza F, o 2-metilimidazol é utilizado como matéria-prima na fase em que o Ondansetron se encontra sem base, e mesmo após a reação e a lavagem do produto com uma quantidade de água considerável, existe a possibilidade de retenção desta mesma impureza. A formação da impureza G será observada se o 2-metilimidazol apresentar mais do que 0,10% de imidazol. Por último, a impureza H surge como um subproduto [39].

## 1.6 – Processo de Esterilização De Produtos Farmacêuticos

Quando se menciona a esterilidade referimo-nos à ausência de microrganismos. Uma vez que a esterilidade de um produto não é garantida por testes, é necessária a aplicação de um processo de produção que se encontre devidamente validado. Deste modo, é essencial que o procedimento de esterilização escolhido para o produto e para o seu recipiente final não afete a eficácia do mesmo e possa garantir a sua integridade. Quando o processo não é cumprido, tal como foi estabelecido aquando da sua validação, pode comprometer o produto pois pode ser não-estéril ou até mesmo apresentar-se deteriorado. Sempre que se verificarem alterações ao procedimento é necessária uma revalidação.

De modo a minimizar a carga biológica na pré-esterilização, é necessário adotar certas medidas tais como o uso de componentes que possuam um nível baixo de contaminação microbiana. Sempre que existam suspeitas da existência de elementos suscetíveis à contaminação devido à sua origem, natureza ou método de preparação, é recomendável a aplicação de um processo de eliminação microbiológica. Estes métodos aplicam-se principalmente para inativar ou remover bactérias, leveduras e bolores. Sempre que possível, o processo usado recorre à esterilização do produto na sua embalagem final (esterilização terminal). Quando não se torna possível a esterilização por recurso a um filtro 0,22 micras então recorre-se a um processamento asséptico, sendo viável um tratamento adicional, como por exemplo, o aquecimento do produto no seu recipiente final. Em qualquer um dos casos, e de modo a manter a esterilidade do produto ao longo do seu período de vida útil, a presença do recipiente e a respetiva tampa é fundamental.

A inativação de microrganismos por meios físicos ou químicos segue uma lei exponencial, portanto, existe sempre uma probabilidade estatística de um dado microrganismo sobreviver ao processo de esterilização. Para um determinado processo, a probabilidade de sobrevivência é determinada pelo número, tipo e resistência dos microrganismos presentes, assim como, pelo meio ambiente no qual se encontram durante o tratamento [40].

A esterilização pode ser executada por vários métodos, são eles: a esterilização terminal; a esterilização por calor seco; a esterilização a vapor (aquecimento no autoclave); a esterilização por radiações ionizantes; a esterilização a gás; a esterilização por filtração ou ainda a esterilização por preparação asséptica. Estes métodos, podem sofrer algumas modificações ou até mesmo combinações de alguns deles se o processo se encontrar devidamente validado. Para todos os métodos de esterilização, as condições críticas de

operação são monitorizadas a fim de confirmar que as condições necessárias, previamente determinadas, abrangem todo o lote, durante todo o processo de esterilização.

Neste trabalho apenas será mencionada a esterilização por meio de vapor saturado sob pressão (aquecimento no autoclave). Sempre que estejamos perante soluções aquosas, esta esterilização é a recomendada, a menos que o produto seja termosensível. Durante todo este processo são adquiridos dados relativamente às condições físicas, nomeadamente temperatura e pressão, provenientes do interior do autoclave. As condições ao longo de cada ciclo são devidamente gravadas, por exemplo, sob a forma de um gráfico de temperatura em função do tempo. Quando se efetua este tipo de esterilização, obtém-se um valor de  $F_0$ . Este valor consiste na letalidade, que é expressa em termos do tempo equivalente a que a temperatura se encontra a 121°C, de um dado produto na sua forma final, com referência aos microrganismos que possuem um valor  $Z$  teórico de 10. O valor de  $F_0$  total deste tipo de processo tem em conta o aquecimento e o arrefecimento das diversas fases de cada ciclo, podendo ser calculado com base na integração das taxas de destruição de microrganismos relativamente ao tempo, num certo intervalo de temperatura.

Na equação 11 podemos visualizar a expressão matemática que permite a determinação do valor do  $F_0$ .

$$F_0 = D_{121}(\log N_0 - \log N) = D_{121} \log IF \quad \text{Equação 11}$$

em que,  $D_{121}$  corresponde ao valor  $D$  dos esporos de referência a 121°C,  $N_0$  corresponde ao número inicial de microrganismos viáveis,  $N$  é o número final de microrganismos viáveis, e o  $IF$  corresponde ao fator de inativação. O valor  $D$  (valor de redução decimal) é o valor de um parâmetro de esterilização que é necessário para reduzir o número de organismos a 10% do número original [41].

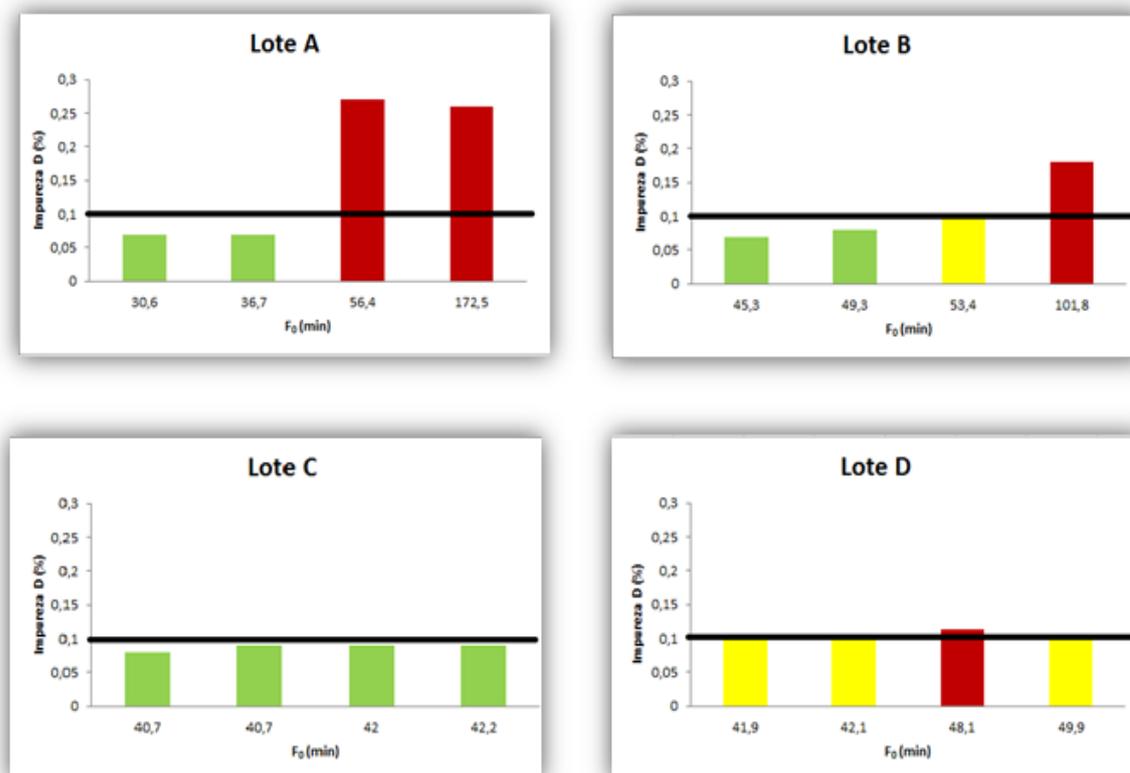
A equação 12 permite determinar o valor de  $Z$ , correspondente à resistência ao calor que cada microrganismo oferece quando ocorrem mudanças na temperatura. Por outras palavras, o valor de  $Z$  baseia-se na mudança de temperatura que é necessário acontecer para que o valor de  $D$  altere num fator de 10.

$$Z = \frac{T_2 - T_1}{\log D_1 - \log D_2} \quad \text{Equação 12}$$

O Ondansetron injetável é um fármaco que, tal como muitos outros, é esterilizado por recurso à esterilização por meio de vapor saturado sob pressão (aquecimento no autoclave).

O ciclo aprovado para a esterilização deste medicamento é um ciclo overkill. Um ciclo overKill consiste num ciclo a 121°C com F<sub>0</sub> de 15. Uma vez que se trata de uma solução aquosa, este tipo de esterilização é a mais viável. No entanto, verificou-se a dada altura que após a esterilização este produto farmacêutico apresentava um nível de impurezas mais elevado do que o normal, em especial no que respeita à impureza D. Perante tal evidência foi realizado um estudo de modo a compreender de que modo é que a impureza D variava com diferentes valores de F<sub>0</sub>.

Assim, foram analisados 4 lotes distintos de Ondansetron injetável, sendo cada lote dividido em 4 esterilizações, sendo que os resultados obtidos podem ser observados na Figura 15.



**Figura 15** – Níveis da impureza D em vários lotes de Ondansetron quando submetidos à esterilização.

De acordo com a figura anterior, podemos verificar que em todos os lotes, à medida que o tempo de esterilização da amostra (F<sub>0</sub>) de Ondansetron é superior, o nível da impureza D aumenta chegando mesmo a ultrapassar o valor limite da especificação, ou seja, 0,1%. Estes factos levam-nos a crer que o fator temperatura aliado ao fator tempo pode provocar uma degradação do fármaco que se pode traduzir num aumento das impurezas deste, em particular da impureza D.

## **1.7 – Objetivo**

Pelo que foi mencionado anteriormente, existe, portanto um certo interesse em compreender de que modo as elevadas temperaturas a que são submetidas as ampolas de Ondansetron, influenciam na degradação deste produto farmacêutico. Importa também compreender se a degradação a longo prazo é ou não afetada pelo facto do produto ter sofrido um ciclo mais agressivo

Neste trabalho pretende-se ainda verificar se existem outros fatores que, aliados ao fator tempo, apresentem impacto na estabilidade do fármaco em questão.

# *Capítulo II*

## *Parte Experimental*



## 2.1 – Reagentes e Soluções

Os reagentes utilizados neste trabalho como agentes de degradação foram os seguintes:

- Hidróxido de sódio 1M, preparado através da diluição de 20 mL de NaOH 10M para um balão de 200 mL com água milli-Q;
- Ácido clorídrico 1M, preparado diluindo 83 mL de HCl 37% (fabricante Fisher Chemicals) para 1000 mL com água milli-Q;
- Peróxido de hidrogénio 30%, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (fabricante Merck).

No que respeita as fases móveis, preparou-se uma fase móvel A que corresponde a uma solução aquosa de dihidrogenofosfato (dihidrogenofosfato de sódio dihidratado, fabricante Sigma-Aldrich) e ainda uma fase móvel B correspondente a uma mistura de fase móvel A com acetonitrilo (fabricante VWR Chemicals).

Como solvente foi utilizada água Milipore (H<sub>2</sub>O milli-Q), esta é uma água ultrapurificada sendo portanto bastante utilizada em laboratórios físico-químicos, em diversas aplicações analíticas dado o seu grau de pureza.

Para a preparação dos padrões recorreu-se a um padrão secundário. Este consiste numa matéria-prima cuja pureza foi aferida através de uma análise contra um padrão primário de pureza conhecida adquirido a uma farmacopeia. Assim, esta matéria-prima pode então ser utilizada para análises de quantificação como um padrão secundário.

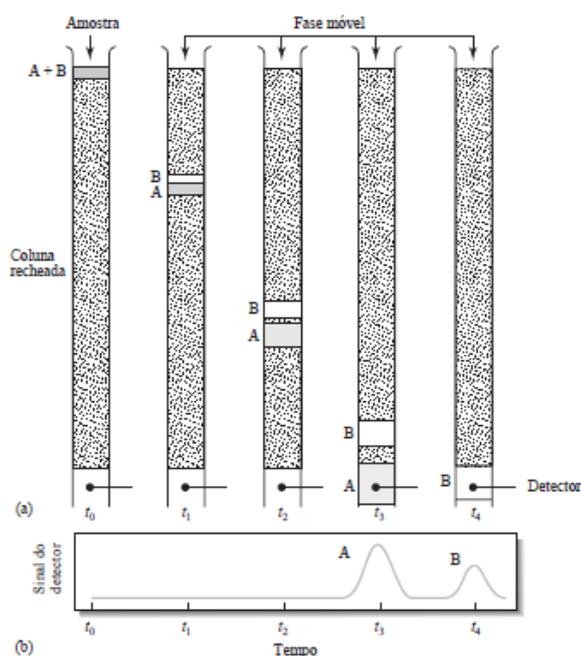
As amostras de Ondansetron não sofrem qualquer tipo de tratamento prévio antes de serem submetidas aos testes de degradação.

## 2.2 – Métodos Experimentais

### 2.2.1 – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Na execução deste trabalho, a análise das soluções padrão e amostras para quantificação do ativo e suas impurezas foi efetuada por cromatografia líquida de alta eficiência, vulgarmente designada por HPLC.

A cromatografia consiste num método que permite a separação, a identificação qualitativa e a determinação quantitativa dos componentes químicos de uma dada mistura. Em cromatografia é comum o uso de uma fase estacionária, normalmente retida numa coluna ou sobre uma superfície plana, e uma fase móvel que se faz passar através da fase estacionária transportando a mistura dos analitos. Esta última, tanto pode ser um líquido como um gás, ou ainda um fluido supercrítico. Quando numa amostra existem dois ou mais componentes, estes podem ser separados por eluição. A figura seguinte (Figura 16) retrata esquematicamente todo esse processo.



**Figura 16** – a) Ilustração da separação de componentes de uma dada mistura por eluição. b) Sinal obtido pelo detector à medida que se vai dando a eluição [42].

A coluna é revestida por um sólido inerte, finamente dividido que retém a fase estacionária na sua superfície. A fase móvel ocupa os espaços existentes entre as partículas desse material. Assim, a amostra é introduzida na coluna no instante  $t_0$ , e os componentes dividem-se entre a fase móvel e a estacionária.

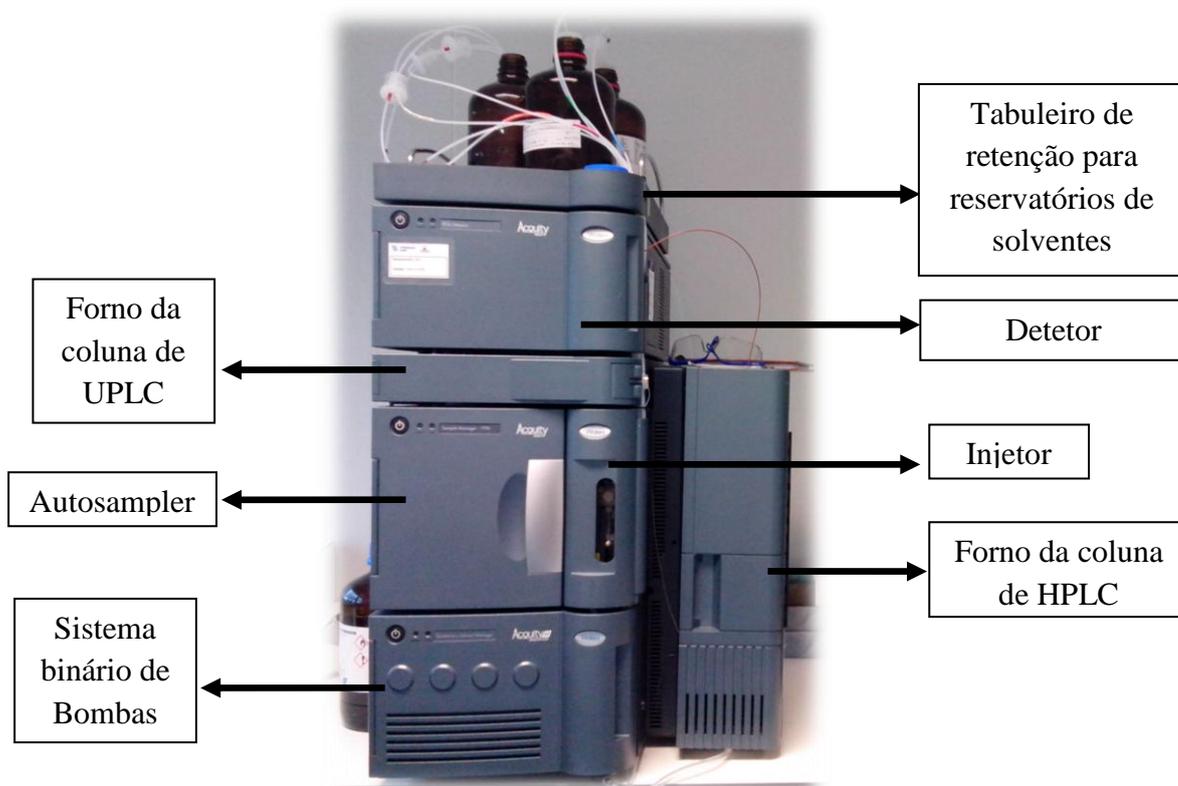
O processo de eluição ocorre ao fazer passar a amostra pela coluna por ação da fase móvel. Ao ser introduzida continuamente a fase móvel, a quantidade da amostra que se encontra retida na fase estacionária desloca-se através da coluna e ocorre uma divisão adicional entre as duas fases, como pode ser observado na Figura 16 a) para o tempo  $t_1$ . Este processo decorre de igual modo numa série contínua de transferências entre as duas fases. A velocidade média para a migração do soluto está diretamente relacionada com o tempo que permanece na fase móvel. Pode dizer-se que essa fração de tempo é pequena se os solutos apresentarem grande afinidade com a fase estacionária, e portanto, serão mais retidos como podemos observar para o componente B na figura anterior. Por outro lado, o tempo do analito na fase móvel será maior quando se verificar uma maior afinidade com esta, logo é eluído mais rapidamente, como podemos observar para o componente A da Figura 16. As diferenças existentes nas velocidades proporcionam a separação dos componentes da mistura ao longo da coluna. À medida que os componentes são eluídos da coluna são detetados pelo detetor produzindo um cromatograma semelhante ao ilustrado na Figura 16 – b [42].

A cromatografia líquida de alta eficiência surgiu nos anos 60 do século 20. Esta baseia-se nos avanços da cromatografia líquida clássica e distingue-se pelo uso de colunas mais estreitas, com diâmetro interno de 2-5mm, com empacotamento de partículas muito pequenas, 3-10  $\mu\text{m}$ , que compõem a fase estacionária. Este tipo de cromatografia, entre os vários tipos de cromatografia por eluição, é a mais utilizada [43]. Nesta, a fase móvel será um solvente líquido onde está contida a amostra sob a forma de uma mistura de solutos. Pode dizer-se que a cromatografia líquida é um dos métodos de separação mais eficaz e, por isso, apresenta uma grande versatilidade de aplicações. Estas vão desde a aplicação na química farmacêutica, na química forense, na bioquímica, nas ciências ambientais, na área alimentar, assim como também na toxicologia.

Com base no mecanismo de separação ou pelo tipo de fase estacionária pode classificar-se a cromatografia líquida de alta eficiência como sendo: partição ou cromatografia líquido-líquido, adsorção ou cromatografia líquido-sólido, troca iónica, cromatografia por exclusão, cromatografia por afinidade e cromatografia quiral.

No que respeita ao equipamento de HPLC, este é constituído por um sistema de bombas, um injetor, um forno onde se introduz a coluna, um detetor e ainda um sistema de aquisição de dados. A fase móvel é bombeada a partir de um ou mais reservatórios, sendo que esta é conduzida para a coluna, normalmente a uma velocidade constante, e posteriormente ao detetor [42].

Na Figura 17 podemos observar um equipamento de UPLC (cromatografia líquida de ultra eficiência) que tem também a funcionalidade de HPLC. A cromatografia líquida de ultra eficiência baseia-se nos mesmos princípios da cromatografia de alta eficiência mas utiliza fases estacionárias com partículas de menor diâmetro, abaixo de 2 $\mu$ m, e tem a capacidade de trabalhar a pressões acima de 100MPa. O uso de partículas menores em conjunto com as altas velocidades lineares da fase móvel aumenta a resolução e diminui os tempos de corrida, e consequentemente, o consumo de reagentes. A designação de UPLC é associada a uma marca específica de fabricantes de equipamentos deste género.



**Figura 17** – Equipamento de UPLC com a funcionalidade de HPLC e seus respetivos constituintes.

O sistema de bombas é essencial para fazer circular a fase móvel com um caudal controlado. Estas bombas encontram-se equipadas com sistemas controlados por microprocessadores, sendo capazes de transportar a fase móvel de modo constante (eluição isocrática) ou de modo variável (eluição por gradiente), de acordo com um programa pré-definido.

Relativamente ao injetor, este permite introduzir a solução em análise na fase móvel conduzindo-a até à cabeça da coluna. Este processo pode ocorrer para pressões elevadas.

O sistema de injeção pode ser manual ou automático, no entanto, caracteriza-se por ter um ciclo fixo e o volume é variável. Hoje em dia, a maioria dos injetores são automáticos minimizando a ocorrência de erros associados à própria injeção.

Quanto às colunas, ou fases estacionárias, estas podem ser de vários tipos, de acordo com o seguinte:

- ❖ Sílica, alumina ou grafite porosa, utilizada em cromatografia de fase normal, em que a separação consiste nas diferenças de adsorção e/ou distribuição de massa;
- ❖ Resinas ou polímeros com grupos ácidos ou básicos, utilizados em cromatografia de troca iônica, onde a separação se fundamenta na competição entre os íons a serem separados e os da fase móvel;
- ❖ Sílica porosa ou polímeros porosos, utilizados na cromatografia por exclusão de tamanho, em que a separação se baseia nas diferenças entre os tamanhos/volume das moléculas;
- ❖ Suportes quimicamente modificados, constituídos por polímeros, sílica ou grafite porosa, utilizado na cromatografia líquida da fase reversa, onde a separação assenta principalmente na partição das moléculas entre as fases móvel e estacionária;
- ❖ Fases estacionárias quimicamente modificadas, para a separação de enantiómeros (cromatografia quiral).

Grande parte das separações, fundamentam-se em mecanismos de partição utilizando sílica quimicamente modificada como fase estacionária e solventes polares como a fase móvel. Um fator que apresenta alguma relevância na determinação das propriedades de separação do sistema cromatográfico é a natureza da fase ligada. Na tabela seguinte, estão descritas as fases ligadas mais aplicadas.

<b>Grupo Funcional</b>	<b>Estrutura</b>	<b>Coluna</b>
Hexil	Si-[CH <sub>2</sub> ] <sub>5</sub> -CH <sub>3</sub>	C <sub>6</sub>
Octil	Si-[CH <sub>2</sub> ] <sub>7</sub> -CH <sub>3</sub>	C <sub>8</sub>
Octadecil	Si-[CH <sub>2</sub> ] <sub>17</sub> -CH <sub>3</sub>	C <sub>18</sub>
Fenil	Si-[CH <sub>2</sub> ] <sub>n</sub> -C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>
Cianopropil	Si-[CH <sub>2</sub> ] <sub>3</sub> -CN	CN
Aminopropil	Si-[CH <sub>2</sub> ] <sub>3</sub> -NH <sub>2</sub>	NH <sub>2</sub>

**Tabela 4** – Fases ligadas mais comumente aplicadas.

Quanto às fases móveis, quando apresentam um pH na ordem dos 2.0 aos 8.0, é aconselhável utilizar colunas de fase reversa, uma vez que são estáveis nestas condições. Para uma gama de pH mais vasta deve utilizar-se grafite porosa ou partículas de materiais poliméricos. Em cromatografia líquida, recorre-se à fase normal na presença de solventes apolares, contudo, será empregue a fase reversa quando estamos perante fases móveis aquosas.

No que respeita aos detetores, pode afirmar-se que os espectrofotómetros ultravioleta / visível são os mais comuns. De qualquer modo, existem outros tais como: espectrofotómetros de fluorescência, refratómetros diferenciais, detetores eletroquímicos, espectrómetros de massa, entre outros.

Quando efetuamos uma análise em HPLC, devemos ter em conta o equilíbrio da coluna com a fase móvel e o fluxo que esta deve apresentar, bem como a temperatura até se obter uma linha de base consideravelmente estável. As soluções a analisar, tal como as de referência são posteriormente preparadas, consoante as especificações de cada método. [44]

Para a realização deste trabalho recorreu-se a um equipamento de UPLC com a funcionalidade de HPLC e que apresenta um detetor DAD UV-Vis, da marca Waters.

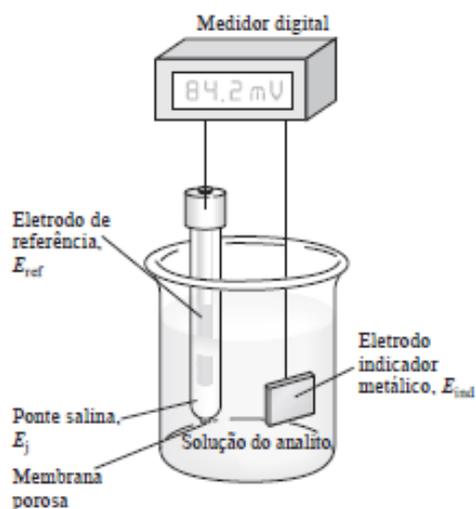
### **2.2.2 – Potenciometria**

A potenciometria é um método de análise que tem como fundamento a medida da diferença de potencial de células eletroquímicas, em circuito aberto. Este método, pode ser utilizado na determinação do ponto final de titulações potenciométricas ou ainda na determinação de concentrações de espécies iónicas, com base no potencial de eléctrodos de membranas seletivas a iões. Estes não apresentam qualquer tipo de perigo de interferência, sendo considerados como uma forma rápida e não destrutiva na quantificação de cations e aniões.

Os métodos potenciométricos apresentam uma panóplia de aplicações, como medidas de pH em produtos comerciais e utilização em laboratórios de análises clínicas; permitem também o controlo de poluentes em efluentes, etc.

No que respeita o equipamento necessário à análise de potenciometria, este é simples e barato. Dele fazem parte um eléctrodo de referência e um eléctrodo indicador, uma ponte salina

e um dispositivo de medida da diferença de potencial. Na Figura 18 pode observar-se um esquema representativo de uma célula utilizada em determinações potenciométricas [42].



**Figura 18** – Esquema representativo de uma célula para determinações potenciométricas.

O eletrodo de referência consiste numa meia-célula que possui um potencial de eletrodo conhecido que se mantém inalterável para temperaturas constantes, sendo independente da constituição da solução do analito. Este eletrodo deve ser robusto e deve manter o seu potencial constante mesmo por efeito de pequenas correntes. O eletrodo de referência pode ser de calomelano,  $\text{Hg}_2\text{Cl}_2$ , bastante utilizado uma vez que é facilmente preparado, no entanto, apresenta-se desvantajoso em situações em que ocorrem variações substanciais de temperatura durante as medidas. O eletrodo de referência pode ainda ser de prata/cloreto de prata,  $\text{Ag}|\text{AgCl}$ , encontrando-se estes disponíveis comercialmente em várias formas e tamanhos.

Por outro lado, o eletrodo indicador, que fica imerso na solução que contém o analito, apresenta um potencial que oscila de acordo com a concentração do analito. Este é considerado ideal quando responde de forma rápida e reprodutível a alterações na concentração de um analito. Os eletrodos indicadores podem ser metálicos, de membrana ou ainda baseados em transístores de efeito de campo seletivo de iões.

Quanto à ponte salina, esta, tem como função prevenir que ocorra mistura dos componentes da solução do analito com os componentes do eletrodo de referência.

A configuração de um *pHmeter* vulgar baseia-se num elétrodo indicador com membrana de vidro e um elétrodo de referência interno de Ag/AgCl, situados no centro de uma sonda cilíndrica. Este tipo de sonda é bastante conveniente quando comparado com um sistema de duas sondas pois pode apresentar um tamanho menor. A membrana de vidro sensível ao pH encontra-se na ponta da sonda. No interior desta membrana a concentração de protões é constante, no entanto, a concentração no seu exterior é determinada pela concentração dos protões presentes na solução. Esta diferença de concentração causa uma diferença de potencial, que pode ser medida por um medidor de pH e, portanto, o elétrodo gera diferenças de potencial (geralmente em milivolts) que são convertidos para uma escala de pH. Este equipamento é capaz de obter precisões na ordem dos 0,001 a 0,005 unidades de pH.

Como qualquer outro instrumento de análise, o *pHmeter* necessita de calibração de acordo com valores referenciados em cada solução de calibração, para tal, recorre-se a tampões com pH igual a 4, 7 e 9. A frequência das calibrações encontra-se relacionada com a frequência de análises efetuadas, bem como, com a qualidade do aparelho [42].

Para a realização deste estudo recorreu-se a um medidor de pH da marca Metrohm.

## 2.3 – Procedimento Experimental

De modo a efetuar um estudo que permita avaliar a estabilidade do Ondansetron foi necessário compreender em que medida é que o seu comportamento varia ao longo do tempo sob a influência de vários fatores, entre eles a temperatura, humidade e agentes de degradação. Assim, foram realizados estudos de estabilidade e testes de stress.

Os estudos de estabilidade, tal como discutido no capítulo 1.2, baseiam-se na avaliação do comportamento do fármaco ao longo do seu tempo de vida, sob a influência de diferentes fatores, e.g., a temperatura. Neste estudo foram analisadas amostras de Ondansetron de um dado lote armazenado em câmaras de estabilidade nas condições de temperatura e humidade relativa de 30°C/75%HR e 40°C/75%HR.

Os testes de stress, tal como referido no capítulo 1.2, consistem em submeter amostras deste fármaco a diversas degradações, tais como: degradação ácida com HCl, degradação básica com NaOH, degradação por oxidação com peróxido de hidrogénio e degradação por temperatura.

Para a degradação ácida, foi necessário misturar o conteúdo de várias ampolas de Ondansetron e medir o pH da amostra. De seguida, adiciona-se HCl 1M até se obter um pH de  $2 \pm 0,05$ . Esta mistura foi colocada a degradar durante um período de 3 horas numa estufa a 60°C. Posteriormente, a amostra é retirada da estufa, e quando se encontra à temperatura ambiente, é ajustado o pH com NaOH 1M para o seu pH inicial.

No que respeita a degradação básica, inicialmente misturaram-se o conteúdo de várias ampolas de Ondansetron e verificou-se qual o pH da amostra. De seguida, adicionou-se NaOH 1 M de modo a tornar a solução básica, com um pH de  $11 \pm 0,05$ . A amostra é colocada depois a degradar na estufa a 60°C, durante 3 horas. Passado esse tempo, deixa-se a amostra voltar à temperatura ambiente e ajusta-se o seu pH para o seu valor inicial utilizando HCl 1 M.

Quanto à degradação por oxidação, misturou-se o conteúdo de várias ampolas de Ondansetron e adicionou-se 2 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30%. Esta mistura permanece a degradar durante 24 horas, à temperatura ambiente e protegida da luz.

Por fim, a degradação por temperatura é efetuada colocando ampolas de Ondansetron na estufa à temperatura de 80°C durante um período de 24 horas. Uma outra condição utilizada para avaliar a influência deste fator na estabilidade do fármaco, foi colocar a amostra

a degradar a 121°C durante 24 horas. Avaliou-se ainda qual o impacto de uma segunda esterilização do Ondansetron (121° C durante 15 minutos no autoclave).

Em qualquer um dos tipos de degradação, as amostras são preparadas em duplicado. Cada amostra é injetada duas vezes, sendo os resultados reportados, a média das duas injeções.

Para a execução do estudo descrito anteriormente, foi necessário recorrer a uma coluna C18, 250 x 4,6 mm, 5 µm. O transporte das fases móveis foi realizado de modo variável e, portanto, verifica-se uma eluição por gradiente, iniciando com 100% de fase móvel A e 0% de fase móvel B, sendo que esta proporção é alterada ao longo do tempo de corrida da amostra.

## *Capítulo III*

### *Resultados Experimentais e Discussão*



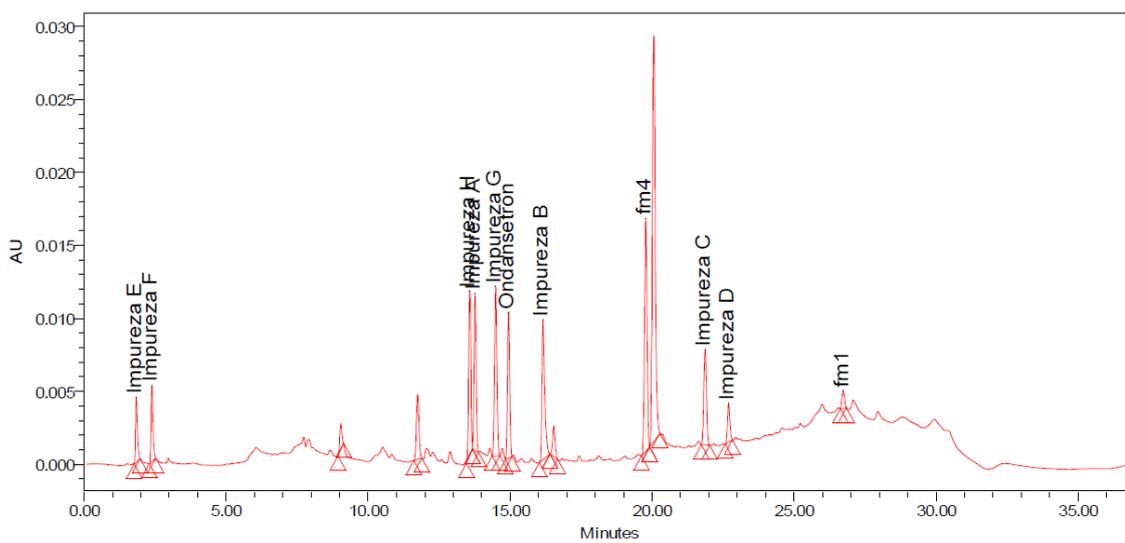
Nos estudos de estabilidade do Ondansetron são efetuadas análises microbiológicas, bem como, análises físico-químicas. Na análise físico-química são avaliados os seguintes parâmetros: aparência da solução, pH, partículas sub-visíveis, partículas visíveis, doseamento do Ondansetron e, produtos de degradação/impurezas. Neste trabalho apenas serão mencionadas as análises de doseamento, que pretende avaliar o comportamento do princípio ativo do Ondansetron, e as análises às impurezas / produtos de degradação, também denominados de compostos relacionados, do fármaco em si. Para a realização das análises, quer de doseamento (DOS) quer dos compostos relacionados (CR'S) é necessário satisfazer previamente certos requisitos de adequabilidade. Assim, numa fase inicial é necessário injetar uma solução resolução, que além de ser posteriormente utilizada como base para a identificação dos picos, é usada para avaliação dos parâmetros de adequabilidade do sistema como resolução e simetria, de acordo com os requisitos exigidos pelo método. Caso estes requisitos sejam cumpridos a análise poderá avançar, sendo injetadas três soluções de padrão de Ondansetron de concentrações variáveis, tanto para a análise de doseamento como de compostos relacionados, de modo a que se torne possível traçar uma curva de calibração linear que passe na origem. Estas retas têm de apresentar um coeficiente de correlação de valor igual ou superior a 0,998.

### **3.1 – Estudos de Estabilidade**

Os estudos de estabilidade são fundamentais para a submissão de produtos farmacêuticos, assim como, para provar a concordância destes com as boas práticas de fabrico (GMP'S) e a respetiva autorização de introdução no mercado (AIM). O planeamento de um estudo de estabilidade para um dado fármaco deve fundamentar-se na informação existente para a sua matéria-prima e em estudos relativos às fases de desenvolvimento do produto. As condições em que o produto é armazenado, a duração dos seus estudos e a frequência a que decorrem as análises, devem ser de tal modo, que permita traçar um perfil do seu comportamento ao longo do prazo de validade no mercado a que este se destina.

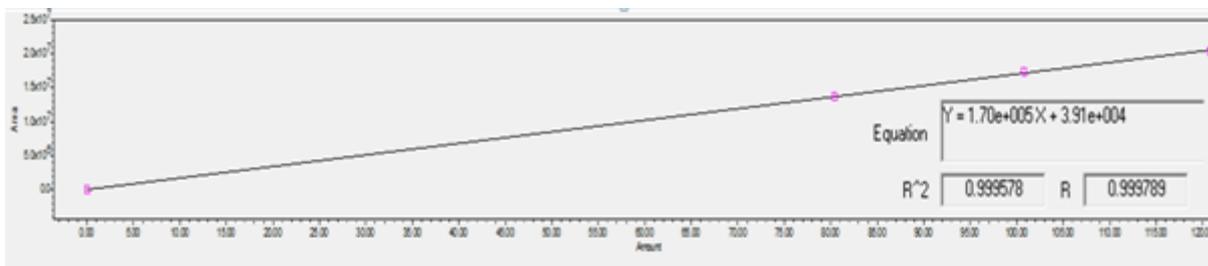
Uma vez que o Ondansetron apresenta uma maior incidência de exportação para as zonas climáticas III e IV, procedeu-se ao estudo da estabilidade deste fármaco nas condições de  $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C} / 75\% \text{ HR} \pm 5\% \text{ RH}$  e  $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C} / 75\% \text{ HR} \pm 5\% \text{ RH}$ .

Após a produção é necessário efetuar uma análise ao produto de modo a confirmar que este cumpre com as especificações para os ensaios descritos no dossier de AIM para o controlo do produto acabado. Assim foi realizada uma análise de T0, correspondente ao início do estudo de estabilidade quer de doseamento quer de compostos relacionados, entre outros ensaios. Numa fase inicial será injetada uma solução resolução ou solução de adequabilidade do sistema que auxilia posteriormente na identificação das impurezas de cada amostra. Na Figura 19 podemos visualizar um cromatograma tipo da solução resolução.



**Figura 19** – Cromatograma tipo de uma solução resolução de Ondansetron.

No que respeita à análise de doseamento, e tal como já acima descrito, foi necessário preparar três padrões de Ondansetron de concentrações compreendidas entre os 80% e os 120%, relativamente à concentração da amostra, de modo a obter uma curva de calibração linear, a passar na origem, a partir das áreas dos picos de cada solução padrão.



**Figura 20** – Curva de calibração linear das soluções padrão de Ondansetron para doseamento.

Como podemos observar na Figura 20, obteve-se um coeficiente de correlação de valor superior a 0,998. Com base na reta de regressão a partir das áreas dos picos obtidos com

as respetivas soluções padrão pode determinar-se o teor de Ondansetron nas amostras aplicando a equação 13,

$$x = \frac{y-b}{m} \quad \text{Equação 13}$$

em que x corresponde ao teor de Ondansetron em %, y é a área do pico de Ondansetron na solução amostra, b corresponde à interceção do eixo dos yy pela reta de regressão e m consiste no declive da reta.

O teor de Ondansetron é calculado como a média dos resultados individuais obtidos nas injeções das duas preparações de amostra. Para a análise do T0 é necessária a injeção de 6 amostras independentes.

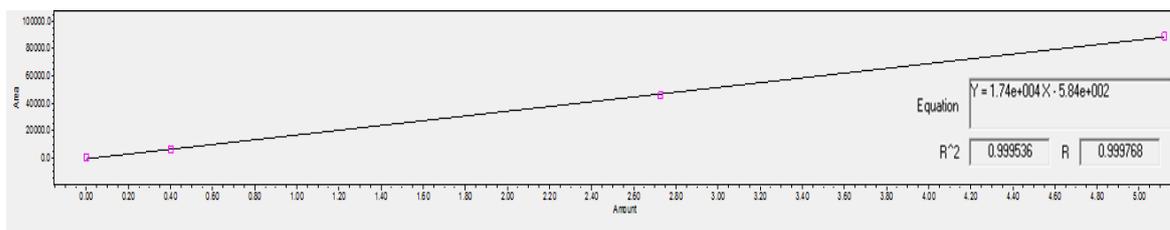
<b>Amostra</b>	<b>Injeção</b>	<b>Valor Doseamento (%)</b>
A1	1	99,389
	2	99,543
A2	1	100,261
	2	99,969
A3	1	99,916
	2	99,911
A4	1	100,134
	2	99,946
A5	1	100,130
	2	100,222
A6	1	100,091
	2	99,787
Média		99,9 %
RSD		0,26 %

**Tabela 5** - Tabela resumo do doseamento de Ondansetron (%) obtido no T0.

O valor do doseamento para o Ondansetron deve estar compreendido entre 95,0 e 105,0%, quer aquando da libertação do produto como durante o seu período de validade. De acordo com a Tabela 5, podemos concluir que o fármaco se encontra conforme e portanto cumpre com a especificação quanto ao doseamento do ativo.

De modo a avaliar a toxicidade que pode estar associada ao Ondansetron nas condições anteriormente referidas, procedeu-se à análise dos compostos relacionados. Para tal foi necessário preparar soluções padrão de Ondansetron cuja concentração varie entre 0,02% e 0,25%, em relação ao conteúdo nominal em Ondansetron. Tal como para o caso do

doseamento, é imprescindível o cálculo da reta de regressão a partir das áreas dos picos obtidas com as respectivas soluções padrão.



**Figura 21** - Curva de calibração linear das soluções padrão de Ondansetron para compostos relacionados.

Por análise da Figura 21, pode verificar-se que o coeficiente de correlação apresenta um valor superior a 0,998.

De modo a quantificar o teor de impurezas conhecidas e desconhecidas na solução amostra deve aplicar-se a equação 14,

$$[\%] CR'S = \frac{\text{Área (RS)} \times RF \times RRF \times 100}{q} \quad \text{Equação 14}$$

em que a “Área (RS)” corresponde à área do pico da impureza correspondente, obtido com a solução amostra, RF é a média dos fatores de resposta obtidos com as soluções padrão para determinação das impurezas, RRF corresponde ao fator de resposta relativo da impureza correspondente e q equivale ao conteúdo nominal de Ondansetron na solução amostra em mg/L. O método de análise utilizado define fatores de resposta relativos (RRF) para cada impureza. O valor de RF, anteriormente mencionado, é determinado para cada um dos três padrões com base na equação 15,

$$RF = \frac{\text{Quantidade de Ondansetron na solução padrão} \left(\frac{mg}{L}\right)}{\text{Área do pico do Ondansetron na solução padrão}} \quad \text{Equação 15}$$

O RF será então obtido através da média dos três RF's calculados através da equação acima descrita para cada um dos padrões.

O teor de impurezas conhecidas e desconhecidas é calculado como a média dos resultados individuais obtidos nas duas injeções das duas preparações de amostra. Os valores limite de especificação em estabilidade para cada impureza são, em seguida, apresentados:

<b>Impureza</b>	<b>Limite</b>
Imp. D	≤ 0,1 %
Imp. C	≤ 0,2 %
Imp. E	≤ 0,2 %
Imp. F	≤ 0,2%
Outras impurezas conhecidas, individuais (A, G, H)	≤ 0,2%
Impurezas desconhecidas, individuais	≤ 0,2%
Total, impurezas	≤ 0,5%

**Tabela 6** – Limites de impurezas de Ondansetron em estabilidade.

No entanto, relativamente à impureza B esta é reportada apenas a título informativo, não existindo assim um valor limite de especificação. De acordo com a análise realizada no T0, ou seja, no tempo inicial do estudo, o Ondansetron apresenta os seguintes valores de impurezas:

<b>Impureza</b>	<b>Valor</b>
Imp. D	0,1 %
Imp. C	<0,02 %
Imp. E	<0,02 %
Imp. F	0 %
Imp. B	0,04 %
Outras impurezas conhecidas, individuais (A, G, H)	0,04 % (G)
Impurezas desconhecidas, individuais	0,1 %
Total, impurezas	0,3 %

**Tabela 7** – Resultados obtidos na análise quantitativa das impurezas de Ondansetron em T0.

Por análise da Tabela 7, podemos concluir que o produto cumpre com as especificações, e portanto está apto para a colocação no mercado.

### 3.1.1 – Estabilidade do Ondansetron Armazenado a 30°C / 75% HR

A frequência a que decorrem estas análises depende do tipo de estudo em questão. Neste caso, sabendo que para a condição de armazenamento 30°C ± 2°C / 75% HR ± 5% RH se trata de um estudo de estabilidade a longo prazo, a frequência do estudo será de 3 em 3 meses, no primeiro ano, de 6 em 6 meses no segundo ano, e a partir daí, anualmente até ao fim do período de validade.

Uma vez que o lote em estudo foi produzido em Janeiro de 2014, apenas se teve a oportunidade de analisar o T0 (início do estudo, correspondente à data de entrega das amostras nas câmaras de estabilidade) e o T3 (3 meses após o início do estudo), nas condições anteriormente mencionadas. Para a análise do T3, o procedimento utilizado foi o mesmo do referido na seção 3.1, aquando da análise do T0.

Relativamente à análise do doseamento do Ondansetron, os resultados para as amostras em condições de armazenamento de 30°C / 75% HR, encontram-se na Tabela 8.

Amostra	Injeção	Valor Doseamento (%)
A1	1	99,056
	2	98,938
A2	1	99,138
	2	98,887
Média		99,0 %
RSD		0,11 %

**Tabela 8** - Tabela resumo do doseamento de Ondansetron obtido no estudo do T3 a 30°C/75%HR.

Comparativamente com o valor do T0 (99,9%), o doseamento do Ondansetron obtido para o T3 apresenta um ligeiro decréscimo, no entanto, este valor é inferior a 2%, valor de erro associado à própria análise. Verifica-se ainda que este valor se encontra dentro dos limites de especificação.

Uma vez que a degradação é independente da concentração do Ondansetron e portanto representa uma constante ao longo do tempo, pode dizer-se que tende a seguir uma cinética de ordem zero.

No que respeita à análise de compostos relacionados, para o parâmetro T3 obtiveram-se os valores representados na Tabela 9.

<b>Impureza</b>	<b>Valor</b>
Imp. D	0,07 %
Imp. C	<0,02 %
Imp. E	Não detetável
Imp. F	0,02 %
Imp. B	0,07 %
Outras impurezas conhecidas, individuais (A, G, H)	0,02 % (A) 0,05 % (G) 0,02 % (H)
Impurezas desconhecidas, individuais	<0,04 %
Total, impurezas	0,3 %

**Tabela 9** - Análise quantitativa das impurezas de Ondansetron no T3 a 30°C/75% HR.

Portanto, verifica-se que ao nível dos compostos relacionados não se observam alterações para o T3 relativamente ao T0.

De um modo geral, pode concluir-se que o fator temperatura a 30°C / 75% HR, não influencia a estabilidade do fármaco ao longo dos seus primeiros 3 meses de estudo, dando assim a indicação de que o produto é estável durante o prazo de validade. Contudo, 3 meses não é ainda tempo suficiente para concluir ou para prever com um grau de confiança aceitável acerca da estabilidade de um produto farmacêutico.

### **3.1.2 – Estabilidade do Ondansetron Armazenado a 40°C / 75% HR**

Nas condições de armazenamento a 40°C / 75% HR, considera-se que o estudo é acelerado, uma vez que estes são executados de modo a aumentar a taxa de degradação química ou física do fármaco através de condições de armazenamento extremas. Ao estabelecer uma comparação entre este estudo e o estudo a longo prazo (realizado a 30°C) podemos obter informação relativa a mudanças químicas que poderão ocorrer num prazo mais longo. A análise a 40°C / 75% HR permite ainda simular condições de armazenamento diferentes das indicadas como, por exemplo, as que poderão ocorrer durante o transporte.

Este tipo de estudos tem uma duração de 6 meses, sendo os testes realizados após 3 e 6 meses. Neste caso particular, devido a uma exigência específica de um dos países nos quais o produto será comercializado, os testes serão também efetuados após 1 mês. Uma vez que o

lote em estudo foi produzido em Janeiro de 2014, apenas tivemos oportunidade de analisar o T0 (mencionado na capítulo 3.1), o T1 e o T3.

Como referido no estudo para o T0 (capítulo 3.1), a análise de doseamento e dos compostos relacionados das amostras de Ondansetron só é efetuada mediante uma prévia injeção de padrões que permitam traçar uma curva de calibração, que coincida com uma equação de reta, de modo a obter um coeficiente de correlação não inferior a 0,998.

Relativamente à análise do doseamento do Ondansetron, os resultados para as amostras em condições de armazenamento de 40°C / 75% HR, encontram-se na Tabela 10.

<b>Amostra</b>	<b>Injeção</b>	<b>Valor Doseamento T1 (%)</b>	<b>Valor Doseamento T3 (%)</b>
A1	1	98,342	98,803
A1	2	98,619	98,685
A2	1	97,490	99,133
A2	2	98,395	99,136
Média		98,2 %	98,9 %
RSD		0,50 %	0,23 %

**Tabela 10** - Tabela resumo dos resultados de doseamento de Ondansetron obtido no estudo do T1 e T3 a 40°C/75%HR.

Por análise da Tabela 10, e considerando o valor obtido no doseamento do T0 (99,9%), pode verificar-se que em condições de armazenamento de 40°C e 75% HR o doseamento do Ondansetron apresenta-se ligeiramente mais baixo, contudo, não se considera que seja uma degradação representativa já que as diferenças obtidas são inferiores a 2% (tendo em consideração os erros experimentais). Tal como se verificou para as condições de armazenamento de 30°C / 75% HR a degradação é independente da concentração do Ondansetron e, portanto, é uma constante ao longo do tempo; i.e., pode ser descrita através duma cinética de ordem zero.

Quanto à análise de compostos relacionados, da amostra de Ondansetron nas condições de armazenamento anteriormente referidas, os resultados para o T1 e para o T3 encontram-se descritos na Tabela 11.

<b>Impureza</b>	<b>Valor (T1)</b>	<b>Valor (T3)</b>
Imp. D	0,06 %	0,07 %
Imp. C	0,02 %	<0,02 %
Imp. E	Não detetável	Não detetável
Imp. F	<0,02 %	0,02 %
Imp. B	0,02 %	0,07 %
Outras impurezas conhecidas, individuais (A, G, H)	0,11 % (G)	<0,02 % (A) 0,05 % (G) <0,02 % (H)
Impurezas desconhecidas, individuais	0,06 %	<0,04 %
Total, impurezas	0,4 %	0,3 %

**Tabela 11** – Análise quantitativa das impurezas de Ondansetron no T1 e T3 a 40°C/75% HR.

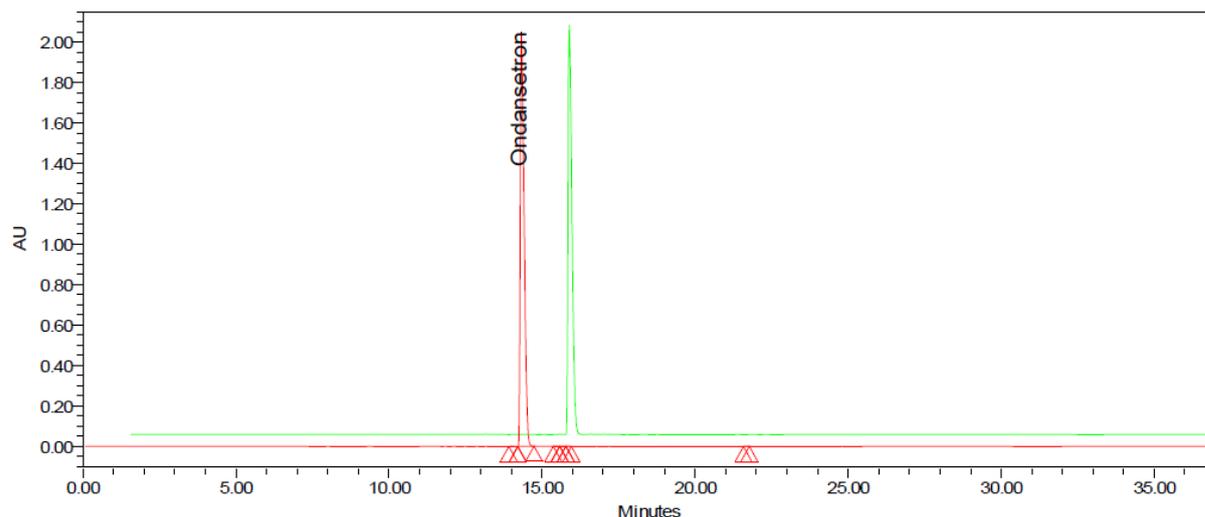
Por análise dos valores obtidos, e representados na tabela anterior, e tal como se verificou para a condição de 30°C/75% HR, pode considerar-se que o produto permanece estável, pelo menos durante os primeiros três meses após o início do estudo.

Uma vez realizadas as análises em tempos diferentes e em amostras armazenadas em condições de temperatura e humidade relativa distintas, e verificando que ao longo do tempo a temperatura não degrada o fármaco, ao ponto de não ser viável a sua administração, é necessário um estudo complementar que demonstre qual a estabilidade do Ondansetron perante a influência de outros fatores. Para tal recorre-se aos denominados testes de stress ou estudos de degradação, como será mencionado no capítulo 3.2.

### **3.2 – Estudos de Degradação**

De modo a avaliar a degradação que possa ocorrer perante os agentes de degradação em estudo, além de amostras degradadas foram também analisadas amostras de Ondansetron não degradadas. A amostra não degradada consiste numa amostra de Ondansetron que se encontra armazenada a 25°C / 60% HR. O procedimento para a análise de doseamento e dos compostos relacionados das amostras de Ondansetron só é efetuada mediante uma prévia injeção de padrões que permitam traçar uma curva de calibração linear, de modo a obter um coeficiente de correlação não inferior a 0,998, tal como descrito no capítulo 3.1.

Na Figura 22 podemos observar um cromatograma correspondente ao doseamento da amostra não degradada de Ondansetron.



**Figura 22** – Cromatograma do doseamento da amostra não degradada de Ondansetron.

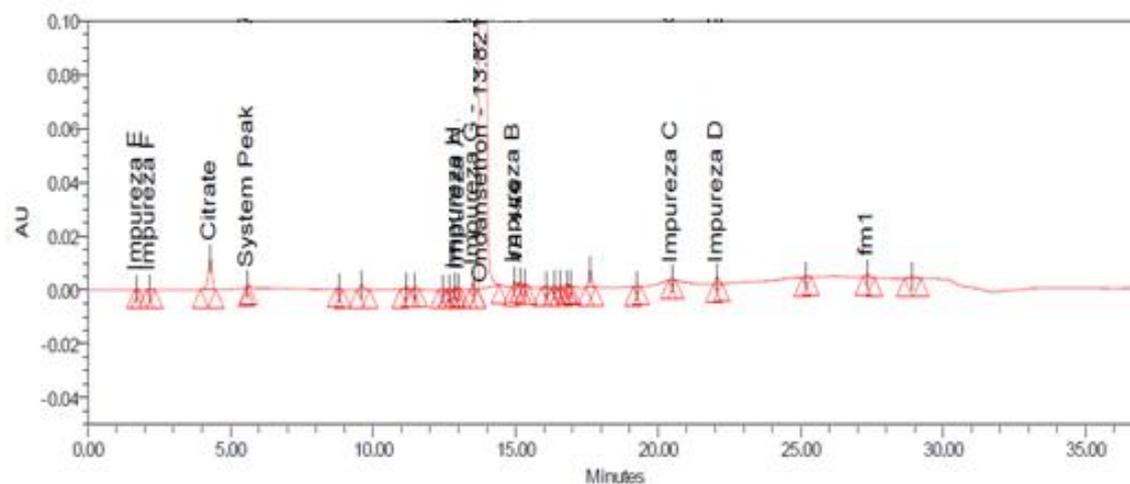
O cromatograma vermelho (Figura 22) corresponde à primeira injeção da amostra A1 e o cromatograma verde, da mesma figura, traduz a segunda injeção dessa mesma amostra.

Na tabela seguinte encontram-se resumidos os valores obtidos para o ensaio de doseamento efetuado na amostra não degradada.

Amostra	Injeção	Tempo de Retenção (min)	Área	Valor Doseamento (%)
A1	1	14.386	16994144	98,730
	2	14.391	17008140	98,811
A2	1	14.390	17029463	98,935
	2	14.390	17026673	98,919
Média			17014605	98,8 %
RSD				0,10 %

**Tabela 12** - Tabela resumo do doseamento obtido para a amostra não degradada de Ondansetron.

Paralelamente à análise de doseamento do Ondansetron é realizada uma análise aos compostos relacionados dessa mesma amostra. Na Figura 23 podemos atentar para o cromatograma dos compostos relacionados da amostra de Ondansetron não degradada.



**Figura 23** - Cromatograma dos compostos relacionados da amostra não degradada de Ondansetron.

Este cromatograma (Figura 23) traduz-se quantitativamente nos valores apresentados na Tabela 13.

<b>Impureza</b>	<b>Valor</b>
Imp. D	<0,02 %
Imp. C	<0,02 %
Imp. E	<0,02 %
Imp. F	<0,02 %
Imp. B	<0,02 %
Outras impurezas conhecidas, individuais (A, G, H)	<0,02 % (A) <0,02 % (G) <0,02 % (H)
Impurezas desconhecidas, individuais	<0,04 %
Total, impurezas	0,2 %

**Tabela 13** - Análise quantitativa das impurezas da amostra não degradada de Ondansetron.

Tanto os valores determinados pela análise do doseamento, como os valores determinados pela análise dos compostos relacionados encontram-se dentro dos limites especificados. Estes valores servirão de base para uma posterior comparação com as amostras degradadas.

### 3.2.1 – Degradação Ácida

Sabendo que o pH influencia em grande medida a velocidade das reações que desencadeiam a degradação dos produtos farmacêuticos, promoveu-se uma degradação ácida. Será de esperar que esta degradação proporcione um aumento da velocidade da reação por ação do ácido, que funciona como um catalisador.

Como mencionado no capítulo 2.2.2, este tipo de degradação requer que a amostra, a um pH de aproximadamente 2, seja sujeita a uma temperatura de 60°C durante 3 horas e ajustada de seguida ao seu valor inicial de pH, sendo posteriormente analisada.

Na tabela 14 encontram-se resumidos os valores dos ensaios de doseamento efetuados para a amostra de Ondansetron sujeita à degradação ácida.

Amostra	Injeção	Tempo de Retenção (min)	Área	Valor Doseamento (%)
A1	1	14.318	18167134	105.563
	2	14.331	18160037	105.522
A2	1	14.333	18182689	105.654
	2	14.333	18148614	105.455
Média			18164618,5	105,5 %
RSD				0,08 %

**Tabela 14-** Tabela resumo do doseamento obtido por degradação ácida do Ondansetron.

Por análise da Tabela 14 podemos constatar que o valor do doseamento do Ondansetron não diminui; aliás, contrariamente ao esperado, aumentou comparativamente à amostra não degradada, exposta anteriormente.

De modo a compreender este aumento do valor do doseamento, foi efetuada uma análise complementar de DAD, ou seja, com detetor de arranjos de díodos. Este, deteta a absorção da região do UV ao visível, possuindo vários agrupamentos de fotodíodos de modo a obter informações relativas a uma ampla gama de comprimentos de onda.

A análise com DAD permite, portanto, avaliar a pureza do pico cromatográfico e assim pode compreender-se se existe, por exemplo alguma interferência, por baixo do pico do Ondansetron que leve a um aumento significativo do seu doseamento. Uma vez que a análise do doseamento é realizada a um comprimento de onda de 308nm, então deve selecionar-se uma gama de comprimentos de onda em que este se encontre abrangido. A análise consiste na

comparação do espectro obtido para a solução amostra com o espectro obtido para a solução padrão a 100 %. Na Figura 24 encontra-se a análise realizada com DAD.

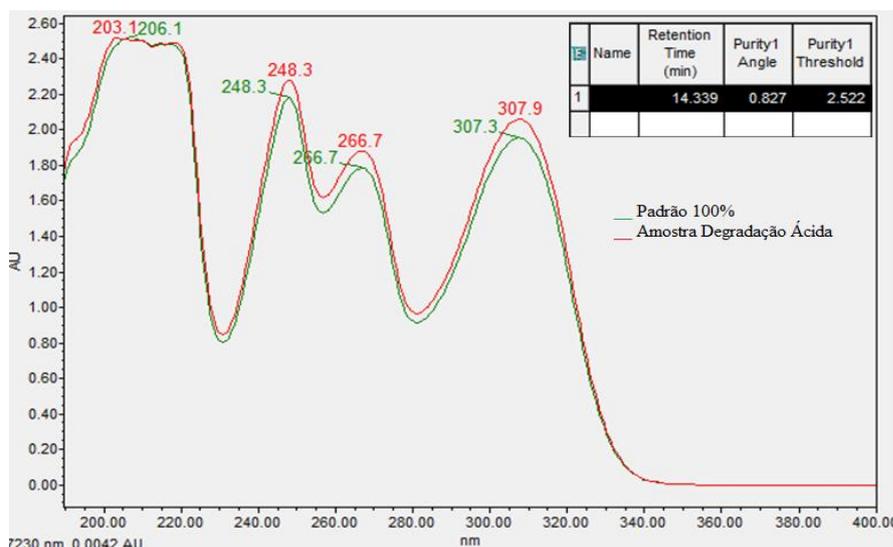


Figura 24 – Análise DAD da amostra resultante da degradação ácida.

De acordo com a figura anterior, podemos verificar que os picos do padrão e da amostra coincidem um com o outro e o ângulo de pureza (Purity Angle) apresenta um valor inferior ao do limiar da pureza (Purity Threshold), o que justifica que não existe nenhuma interferência por baixo do pico do Ondansetron e portanto este é puro. A realização de uma análise por espectrofotometria de massa seria fundamental para poder compreender este fenómeno.

Por outro lado, foi realizada a análise aos compostos relacionados de modo a verificar se a toxicidade da amostra de Ondansetron aumenta com a degradação a que esta foi sujeita.

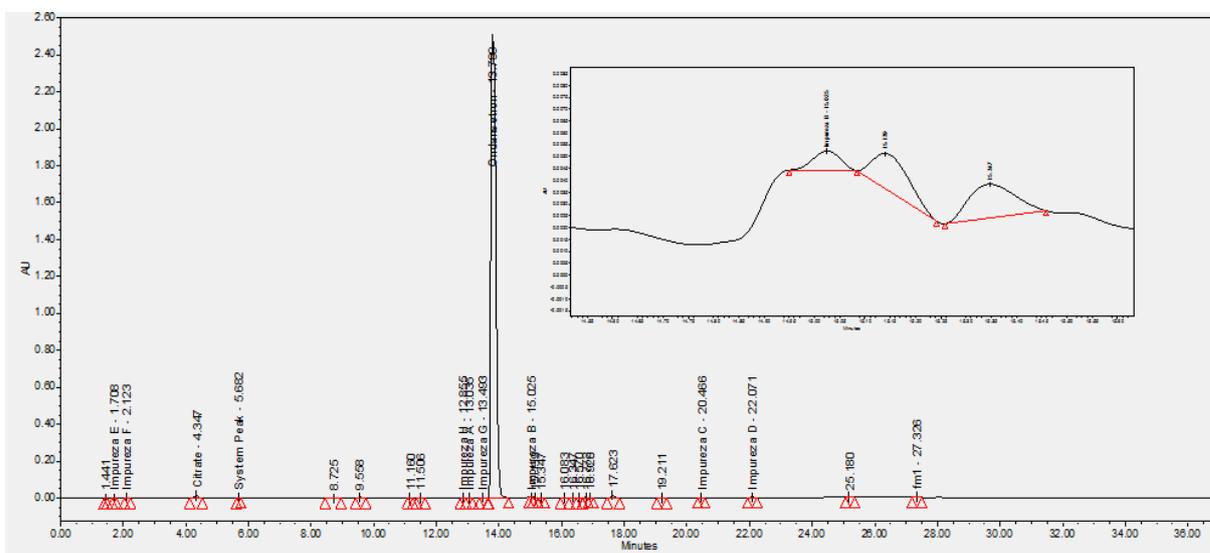


Figura 25 – Cromatograma da análise efetuada aos compostos relacionados da amostra da degradação ácida.

Na Figura 25 podemos observar o cromatograma da análise aos compostos relacionados da amostra da degradação ácida. Pelo que podemos observar através do *inset* da figura anterior, a impureza B não foi bem separada e portanto não apresenta uma boa resolução.

A análise detalhada das impurezas encontra-se na Tabela 15.

<b>Impureza</b>	<b>Valor</b>
Imp. D	<0,02 %
Imp. C	<0,02 %
Imp. E	<0,02 %
Imp. F	<0,02 %
Imp. B	<0,02 %
Outras impurezas conhecidas, individuais (A, G, H)	<0,02 % (A) <0,02 % (G) <0,02 % (H)
Impurezas desconhecidas, individuais	<0,04 %
Total, impurezas	0,2 %

**Tabela 15** - Análise quantitativa das impurezas da amostra da degradação ácida.

Ao promover a degradação em questão, seria expectável que o nível de impurezas da amostra assumisse um valor superior, no entanto, verifica-se que se mantém quando comparada com a amostra não degradada. Estes factos levam-nos a crer que devem ter ocorrido problemas com a coluna, já que existem impurezas que co-eluíram. Possivelmente o ácido utilizado na degradação danificou a coluna não permitindo que esta pudesse separar as impurezas de modo a obter uma boa resolução.

### **3.2.2 – Degradação Básica**

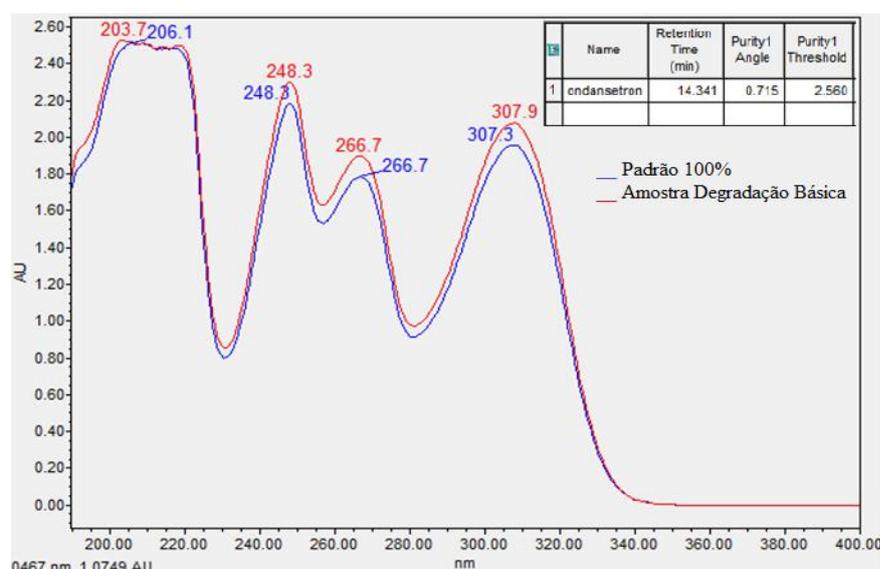
Tendo por base a análise mencionada para a degradação ácida, foi executada uma outra análise de modo a avaliar o impacto da degradação básica numa amostra de Ondansetron. Como referido no capítulo 2.2.2, este tipo de degradação requer que a amostra, a um pH de aproximadamente 11, seja sujeita a uma temperatura de 60°C durante 3 horas e de seguida se ajuste o pH ao seu valor inicial, sendo a amostra posteriormente analisada. Na Tabela 16 encontram-se resumidos os valores obtidos para o ensaio de doseamento efetuado para a degradação básica.

Amostra	Injeção	Tempo de Retenção (min)	Área	Valor Doseamento (%)
A1	1	14.335	18400030	106.920
	2	14.333	18393299	106.881
A2	1	14.337	18400959	106.925
	2	14.344	18404560	106.946
Média			18399712	106,9 %
RSD				0,03 %

**Tabela 16** - Tabela resumo do doseamento obtido por degradação básica do Ondansetron.

Na sequência do que ocorreu no estudo da degradação ácida, o valor determinado para o doseamento do ativo do Ondansetron aumentou após a degradação. Efetuou-se assim, uma análise de DAD, também para a degradação básica com o intuito de confirmar a pureza do pico do Ondansetron.

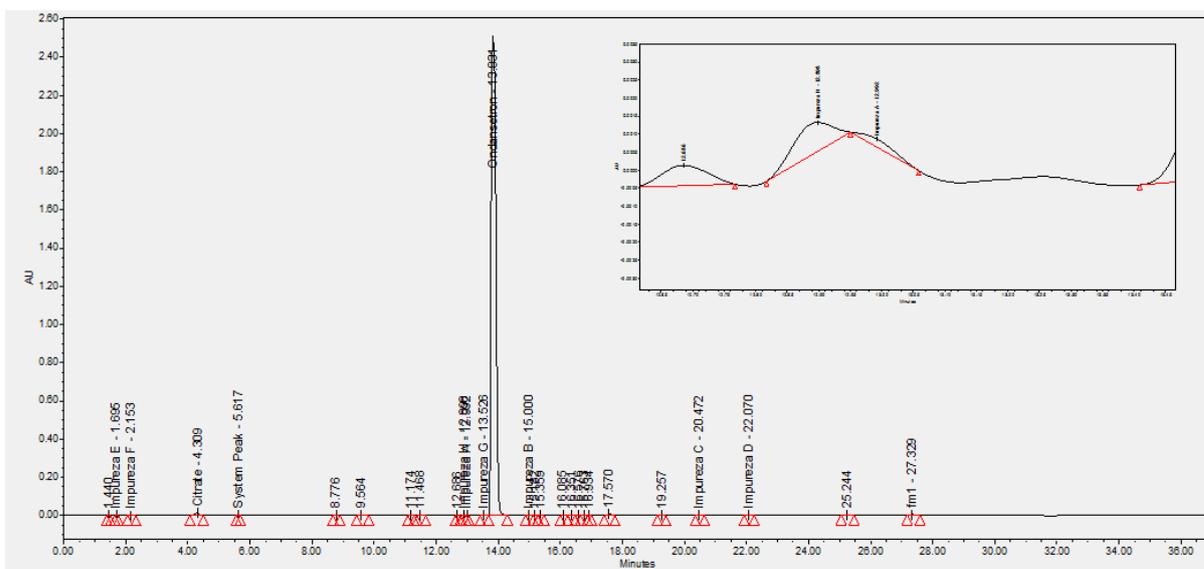
Na Figura 26 encontra-se a análise realizada com DAD para a amostra que sofreu degradação básica.



**Figura 26** - Análise DAD da amostra resultante da degradação básica.

Podemos constatar que os picos do padrão e da amostra coincidem um com o outro e o Purity Angle apresenta também um valor inferior ao do Purity Threshold, comprovando assim que não existe nenhuma interferência por baixo do pico do Ondansetron e portanto este é puro. A análise por espectrofotometria de massa seria, também para esta degradação, um passo imprescindível na compreensão do aumento do doseamento do Ondansetron.

Quanto aos produtos da degradação do Ondansetron, a figura seguinte revela-nos a análise que foi efetuada.



**Figura 27** - Cromatograma da análise efetuada aos compostos relacionados da amostra da degradação básica.

Tal como foi observado no estudo da degradação ácida, a Figura 27 demonstra, através do *inset* nela apresentado, a existência de duas impurezas (H e A) que não são bem separadas, não apresentando assim uma boa resolução. Os valores obtidos para cada uma das impurezas resultantes da degradação básica apresentam-se na Tabela 17.

<b>Impureza</b>	<b>Valor</b>
Imp. D	<0,02 %
Imp. C	<0,02 %
Imp. E	<0,02 %
Imp. F	<0,02 %
Imp. B	<0,02 %
Outras impurezas conhecidas, individuais (A, G, H)	<0,02 % (A) <0,02 % (G) <0,02 % (H)
Impurezas desconhecidas, individuais	<0,04 %
Total, impurezas	0,2 %

**Tabela 17** - Análise quantitativa das impurezas da amostra da degradação básica.

Por comparação com a análise da amostra não degradada verifica-se que o valor das impurezas, ao contrário do esperado já que se promove uma degradação, tende a manter-se constante. Deste modo, não se podem retirar conclusões quanto à amostra de Ondansetron que

sofreu degradação básica uma vez que existem impurezas que coeluíram, remetendo-nos para a possibilidade de problemas associados à coluna aquando a análise, tal como se verificou para a degradação ácida.

### 3.2.3 – Degradação por Oxidação

A estabilidade dos fármacos é afetada pela oxidação visto que, durante o processamento assim como durante o armazenamento a longo prazo destes, se encontra presente oxigénio que desencadeia a maioria das reações deste tipo. No entanto, não só a presença do oxigénio desencadeia a degradação por oxidação, pois em condições de fotólise esta também se verifica.

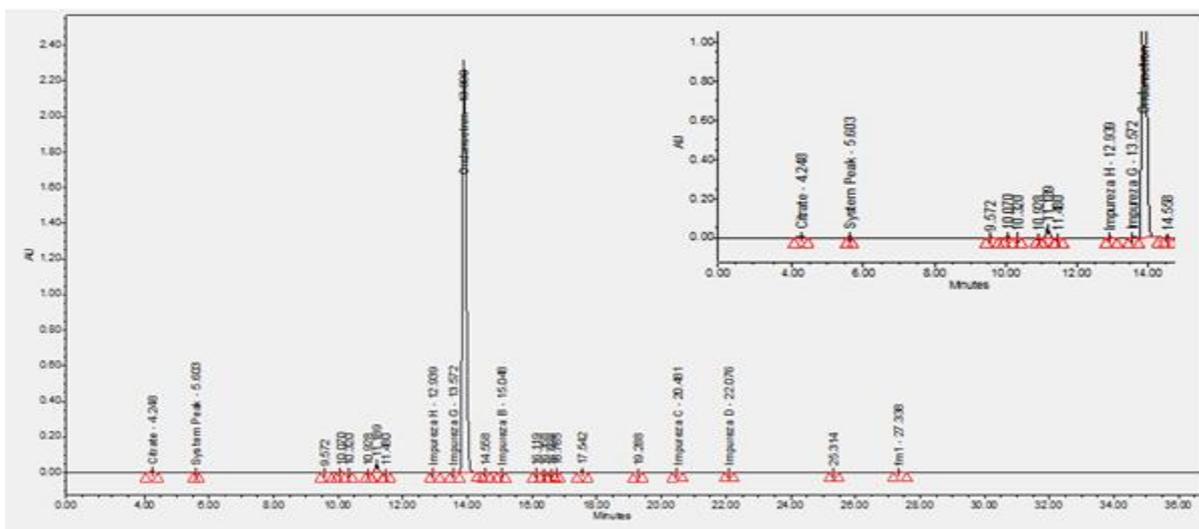
Uma vez que a molécula do Ondansetron se apresenta como uma molécula poli-insaturada, está sujeita a este tipo de degradação. Como mencionado no capítulo 2.2.2, a degradação por oxidação requer que se adicione à amostra de Ondansetron 2 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30%, deixando a solução final a degradar durante 24 horas, à temperatura ambiente e protegida da luz, sendo posteriormente analisada.

A análise de doseamento foi realizada para verificar qual o comportamento do ativo perante tais condições. Na Tabela 18 encontram-se os dados obtidos por essa mesma análise.

Amostra	Injeção	Tempo de Retenção (min)	Área	Valor Doseamento (%)
A1	1	14.338	13845438	80.386
	2	14.345	13846424	80.392
A2	1	14.355	13867963	80.517
	2	14.355	13861382	80.479
Média			13855301,8	80,4 %
Desvio Padrão				0,06 %

**Tabela 18** - Tabela resumo do doseamento obtido da degradação por oxidação do Ondansetron.

De acordo com a tabela anterior, verifica-se que ao submeter o fármaco em estudo à degradação por oxidação o ativo tende a degradar-se substancialmente, e portanto, apresenta um valor para o doseamento inferior ao obtido para a amostra não degradada (98,8 %). Posteriormente, é efetuada a análise aos compostos relacionados de modo a compreender em que medida é que a perda de ativo, por ação da degradação, se traduz em impurezas e assim avaliar o nível de toxicidade que lhe está associada.



**Figura 28** - Cromatograma da análise efetuada aos compostos relacionados da amostra da degradação por oxidação.

Por análise da Figura 28 constata-se a ausência de impurezas, tais como a E, F e A. Relativamente às outras impurezas, a sua análise quantitativa é traduzida na Tabela 19.

<b>Impureza</b>	<b>Valor</b>
Imp. D	<0,02 %
Imp. C	<0,02 %
Imp. E	Não detetada
Imp. F	Não detetada
Imp. B	<0,02 %
Outras impurezas conhecidas, individuais (A, G, H)	Não detetada (A) <0,02 % (G) <0,02 % (H)
Impurezas desconhecidas, individuais	<0,09 %
Total, impurezas	0,2 %

**Tabela 19** - Análise quantitativa das impurezas da amostra da degradação por oxidação.

Com base nos dados obtidos a partir da Figura 28 e da Tabela 19, pode concluir-se que após a degradação das amostras de Ondansetron por oxidação, o nível de impurezas mantém-se praticamente constante à exceção das impurezas desconhecidas que registam um ligeiro aumento. No entanto, este valor encontra-se dentro dos limites especificados. O facto de se registar a ausência de impurezas no cromatograma da amostra da degradação por oxidação, principalmente a impureza A, pode remeter-nos para a possibilidade de problemas na coluna que impedissem a sua deteção, por ação do peróxido de hidrogénio utilizado na degradação. De uma forma geral, foi possível perceber que a coluna usada é pouco resistente a condições

ácidas, básicas e oxidantes agressivas, alterando assim a sua seletividade e a capacidade para permitir a quantificação das impurezas.

### 3.2.4 – Degradação por Temperatura

Como referido no capítulo 1.4.1.1 a temperatura apresenta grande relevância na estabilidade farmacêutica, uma vez que, à medida que esta se eleva a velocidade a que ocorre a degradação será superior. De modo a avaliar o impacto deste fator na estabilidade farmacêutica foram realizadas análises a amostras de Ondansetron que foram submetidas a diferentes condições de degradação por ação de temperatura.

#### 3.2.4.1 – Degradação a 80°C durante 24 horas

Numa fase inicial foi avaliado o comportamento do Ondansetron quando sujeito a uma temperatura de 80°C durante um período de 24 horas. A análise ao doseamento foi efetuada e os resultados apresentam-se na Tabela 20.

Amostra	Injeção	Tempo de Retenção (min)	Área	Valor Doseamento (%)
A1	1	14.503	16808404	98.588
	2	14.568	16800925	98.544
A2	1	14.518	16810510	98.600
	2	14.472	16788097	98.468
Média			16801984	98,6 %
RSD				0,06 %

**Tabela 20** - Tabela resumo do doseamento obtido da degradação do Ondansetron a 80°C durante 24h.

Com base nos resultados obtidos na análise do doseamento da amostra não degradada, verifica-se que o valor do ativo nas condições de temperatura de 80°C durante 24 horas decresce apenas 0,2%. Assim, pode concluir-se que a degradação é independente da concentração dos reagentes e representa uma constante ao longo do tempo, característico de uma cinética de ordem zero.

Este decréscimo obtido para o valor do doseamento poderá traduzir-se no entanto das impurezas e portanto foi fundamental a análise aos compostos relacionados.

<b>Impureza</b>	<b>Valor</b>
Imp. D	0,1 %
Imp. C	<0,02 %
Imp. E	Não detetada
Imp. F	0,02 %
Imp. B	0,07 %
Outras impurezas conhecidas, individuais (A, G, H)	<0,02 % (A) 0,05 % (G) <0,02 % (H)
Impurezas desconhecidas, individuais	<0,04 %
Total, impurezas	0,3 %

**Tabela 21** - Análise quantitativa das impurezas da amostra da degradação a 80°C durante 24h.

De acordo com os resultados anteriores podemos concluir que o Ondansetron se demonstra ser estável a 80°C, visto que, nas condições de degradação mencionadas, o ativo decresce apenas cerca de 0,2%, o que não se pode considerar uma verdadeira degradação. Observando a Tabela 21 comprova-se que as impurezas aumentam ligeiramente, em especial a D, a B e a G. Este ligeiro aumento não revela, no entanto, toxicidade para o Ondansetron uma vez que estas se encontram ainda assim dentro dos valores permitidos pela especificação.

### 3.2.4.2 – Degradação a 121°C durante 24 horas

Uma vez que em condições de degradação de 80°C durante 24 horas o Ondansetron não degrada o suficiente para perder a sua eficácia, ou por outro lado, não apresenta um risco para a saúde do utente visto que os níveis de impurezas determinados se encontram dentro dos limites estabelecidos, então promoveu-se uma outra degradação a 121°C durante o mesmo período de tempo. A análise ao doseamento do ativo encontra-se sintetizada na Tabela 22.

<b>Amostra</b>	<b>Injeção</b>	<b>Tempo de Retenção (min)</b>	<b>Área</b>	<b>Valor Doseamento (%)</b>
A1	1	14.501	14863596	87.121
	2	14.502	14853379	87.061
A2	1	14.514	14850499	87.044
	2	14.508	14893566	87.298
Média			14865260	87,1 %
RSD				0,12 %

**Tabela 22** - Tabela resumo do doseamento obtido da degradação do Ondansetron a 121°C durante 24h.

Verifica-se que a esta temperatura e durante este período de tempo, o fármaco tende a perder ativo, pois em relação à amostra não degradada este perde cerca de 11%, confirmando assim os resultados obtidos em lotes com diferentes esterilizações. A análise dos compostos relacionados é fundamental para compreender esta degradação.

<b>Impureza</b>	<b>Valor</b>
Imp. D	8,26 %
Imp. C	<0,02 %
Imp. E	Não detetada
Imp. F	2,94 %
Imp. B	0,05 %
Outras impurezas conhecidas, individuais (A, G, H)	<0,02 % (A e H) 0,04 % (G)
Impurezas desconhecidas, individuais	<0,04 %
Total, impurezas	11,4 %

**Tabela 23** - Análise quantitativa das impurezas da amostra da degradação a 121°C durante 24h.

Por análise das Tabelas 22 e 23, podemos concluir que o ativo do Ondansetron nas condições de degradação de 121°C durante 24 horas se degradada consideravelmente, sendo que esta degradação se transforma em impurezas. Na Tabela 23 podemos ver que se destacam as impurezas D e F que apresentam os aumentos mais significativos face à amostra não degradada, apresentando valores muito superiores ao valor limite e portanto nestas condições o Ondansetron revelou não ser estável, não se encontra portanto em conformidade com as especificações, tanto para doseamento como para compostos relacionados. Estes resultados vêm comprovar que é de facto a impureza D a mais sensível a aumentar consideravelmente o seu valor quando sujeita a elevadas temperaturas por períodos prolongados de tempo, tal como já se tinha verificado aquando do problema verificado anteriormente com a esterilização do fármaco.

### **3.2.4.3 – Degradação a 121°C durante 15 minutos**

De acordo com a análise anterior, podemos perceber que à temperatura de 121°C o Ondansetron sofre degradação, considerável, quando exposto durante 24h. Esta temperatura corresponde à que se verifica aquando a esterilização das ampolas deste fármaco. Assim, e de modo a compreender qual a influência desta temperatura no Ondansetron, foi simulada uma

segunda esterilização, submetendo este produto farmacêutico a um novo ciclo de esterilização de 121°C durante 15 minutos, num autoclave.

Os resultados da análise do doseamento estão sintetizados na Tabela 24.

Amostra	Injeção	Tempo de Retenção (min)	Área	Valor Doseamento (%)
A1	1	14.490	16738727	98.177
A1	2	14.479	16743079	98.203
A2	1	14.475	16757950	98.290
A2	2	14.485	16756795	98.284
Média			16749138	98,2 %
RSD				0,06 %

**Tabela 24** - Tabela resumo do doseamento obtido da degradação do Ondansetron a 121°C durante 15min.

Nas condições referidas, verifica-se que este novo ciclo de esterilização não apresenta grande impacto no doseamento do ativo. O decréscimo que é observado poderá estar relacionado com o erro da própria análise visto ser inferior a 2%., Conclui-se assim que, mesmo após uma segunda esterilização o ativo apresenta-se dentro dos limites permitidos pela especificação.

Ao sujeitarmos o Ondansetron às condições anteriormente mencionadas, verifica-se que a reação que ocorre tende a seguir uma cinética de ordem zero visto que a degradação é independente da concentração e assim representa uma constante ao longo do tempo.

A análise dos compostos relacionados, para complementar este estudo, foi realizada e apresenta-se na Tabela 25.

Impureza	Valor
Imp. D	0,11 %
Imp. C	<0,02 %
Imp. E	Não detetada
Imp. F	0,03 %
Imp. B	0,07 %
Outras impurezas conhecidas, individuais (A, G, H)	<0,02 % (A)
	0,06 % (G)
	<0,02 % (H)
Impurezas desconhecidas, individuais	0,08 %
Total, impurezas	0,4 %

**Tabela 25** - Análise quantitativa das impurezas da amostra da degradação a 121°C durante 15min.

Comparativamente à amostra não degradada verifica-se que impurezas como a D, B, G e as impurezas desconhecidas apresentam um ligeiro acréscimo, sendo a D a que causa maior impacto visto que se encontra no limite da especificação, ou seja, 0,1 %. No entanto de acordo com os dados obtidos, quer na análise do DOS quer na análise dos CR'S, pode deduzir-se que mesmo após uma segunda esterilização o Ondansetron mantém a sua estabilidade.



# *Capítulo IV*

## *Conclusões*



Com a realização deste projeto foi possível concluir, com base nos resultados dos estudos de estabilidade, que o Ondansetron injetável é um produto bastante estável, sendo que até ao ponto de análise estudado, 3 meses, com amostras do produto armazenado a 30°C e 40°C, tanto o doseamento como os compostos relacionados não sofrem alterações significativas, mantendo-se todos os parâmetros abaixo do limite da especificação para o prazo de validade do produto.

Relativamente aos estudos de stress, conclui-se que o produto é bastante afetado pela degradação por oxidação uma vez que ao nível do doseamento, este perde uma considerável percentagem de ativo traduzindo-se no ligeiro aumento das impurezas desconhecidas. O Ondansetron injetável perde assim eficácia pois o doseamento está consideravelmente abaixo dos limites, perdendo quase 20% relativamente à amostra não degradada.

No que respeita à degradação por temperatura verifica-se que este fator aliado ao tempo de exposição apresenta um grande impacto na estabilidade do produto farmacêutico, pois para condições de temperaturas mais elevadas (121°C) e uma exposição mais prolongada o Ondansetron deixa de obedecer aos limites especificados, tanto para doseamento como para compostos relacionados. De facto, é possível observar um decréscimo de cerca de 11% da percentagem de ativo que se traduz no correspondente aumento de compostos relacionados. O aumento deste parâmetro deve-se quase inteiramente ao aumento da impureza D, sendo que esta é maioritariamente afetada pela degradação por temperatura, sofrendo um incremento bastante significativo quando o produto está sujeito a 121°C durante 24h. No entanto, estando sujeito a esta mesma temperatura durante apenas 15 min, simulando uma nova esterilização, ambos os parâmetros descritos cumprem com a especificação, ainda que a impureza D se apresente no limite de especificações.

Quanto às degradações ácida e básica verificou-se que impurezas como a A, B e H coeluíram e portanto não se podem retirar conclusões uma vez que ocorreram problemas com a coluna, possivelmente por ação dos solventes utilizados, e portanto seria importante efetuar uma nova abordagem a estas degradações de modo a avaliar o impacto que causariam no Ondansetron. O recurso à análise por espectrofotometria de massa seria fundamental para compreender o aumento que se registou na análise do doseamento.

De um modo geral, pode concluir-se, com base nos estudos de estabilidade e testes de degradação efetuados que o Ondansetron injetável é um fármaco que apresenta uma grande estabilidade nas condições de armazenamento descritas. Do ponto de vista do processo

produtivo, este estudo indica que o tempo a que o produto fica exposto a 121°C durante a esterilização final é crítico, uma vez que o produto demonstrou instabilidade à referida temperatura. Contudo após a esterilização, a degradação parece parar, permitindo que o produto se mantenha conforme durante o prazo de validade.

## Referências Bibliográficas

- [1] M. Jesus, Manual de Acolhimento, Empresa X – Laboratórios Almiro, 2013.
- [2] <http://www.Empresa Xgenericos.pt/234/fabrica-Empresa X-9.htm>, Acedido a 10 Fev. 2014.
- [3] WHO, WHO Expert Committee on Specifications for Pharmaceutical Preparations, WHO Technical Report Series, 863, 34<sup>th</sup>, Geneva, 1996.
- [4] <http://www.ich.org/products/guidelines/quality/article/quality-guidelines.html>, Acedido a 03 Fev. 2014.
- [5] Y. Guo, E. Shalaev, S. Smith, Physical stability of pharmaceutical formulations: solid-state characterization of amorphous dispersions, Trends in Analytical Chemistry, 2013, 49, 137-144.
- [6] H.C. Ansel, V. A. Loyd, N.G. Popovich, Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Philadelphia, 7ed, 1999.
- [7] Y.K. Agrawal *et al*, Development of forced degradation and stability indicating studies of drugs - A review, Journal of Pharmaceutical Analysis, 2013, 4, 159-165.
- [8] K.E.R. Silva *et al*, Modelos de Avaliação da Estabilidade de Fármacos e Medicamentos para a Indústria Farmacêutica, Ver. Ciênc. Farm. Bás. e Apli., 2009, 30, 129-135.
- [9] ICH, Guidance for Industry Q1A(R2) Stability Testing of New Drug Substances and Products, Rev.2, 2003.
- [10] S. Singh, M. Junwal, *et al*, Forced degradation studies to assess the stability of drugs and products, Trends in Analytical chemistry, 2013, 49, 71-88.
- [11] M.A. Sheraz, *et al*, Effect of phosphate buffer on the complexation and photochemical interaction of riboflavin and caffeine in aqueous solution: A kinetic study, Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry, 2014, 273, 17–22.
- [12] J. Deng, Y. Shao *et al*, Degradation of the antiepileptic drug carbamazepine upon different UV-based advanced oxidation processes in water, Chemical Engineering Journal, 2013, 222, 150–158.
- [13] C. Foti, K. Alsante, *et al*, Tools and workflow for structure elucidation of drug degradation products, Trends in Analytical chemistry, 2013, 49, 89–99.
- [14] S.J. Formosinho, L. G. Arnaut, Cinética Química – Estrutura Molecular e Reactividade Química, Imprensa da Universidade de Coimbra, 2003.
- [15] R. Chang, Química, McGraw-Hill, 8 ed. 2005.
- [16] J.A. Bernabeu, M. A. Camacho, *et al*, Statistical evaluation for stability studies under stress storage condition, Il Farmaco, 2001, 56, 877-883.

- [17] I.T. Some, P. Bogaerts, *et al*, Incorporating batch effects in the estimation of drug stability parameters using an Arrhenius model, *International Journal of Pharmaceutics*, 1999, 184, 165-172.
- [18] W. Maafi, M. Maafi, Modelling nifedipine photodegradation, photostability and actinometric properties, *International Journal of Pharmaceutics*, 2013, 456, 153-164.
- [19] G. Ioele, M. Luca, *et al*, The difficulties for a photolabile drug in topical formulations: The case of diclofenac, *International Journal of Pharmaceutics*, 2014, 465, 284-290.
- [20] S. Paszun, B. Stanis, A. Gradowska, Cilazapril stability in the presence of hydrochlorothiazide in model mixtures and fixed dose combination, *Acta Poloniae Pharmaceutica*, 2013, 70, 1079-1085.
- [21] Z. Yang, W. McAuley, *et al*, Stabilisation of amorphous drugs under high humidity using pharmaceutical thin films, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2013, 84, 555,565.
- [22] M. Segovia, F. Martinez, J.M. Alvarez, Alkaline hydrolysis of acetylsalicylic acid in cationic micelles of N-cetyl-N-ethyl-N,N-dimethylammonium bromide, *Colloids Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, 1996, 106, 1-10.
- [23] P. Masson, M. Froment, *et al*, Butyrylcholinesterase-catalysed hydrolysis of aspirin, a negatively charged ester, and aspirin-related neutral esters, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1998, 1387, 41-52.
- [24] K.P.C. Vollhardt, N.E. Schore, *Química Orgânica – Estrutura e função*, Bookman, 4ed, 2004.
- [25] D. F. Kassinos, *et al*, Transformation products of pharmaceuticals in surface waters and wastewater formed during photolysis and advanced oxidation processes – Degradation, elucidation of byproducts and assessment of their biological potency, *Chemosphere*, 2011, 85, 693-709.
- [26] A.Y.C. Lin, Y.C. Lin, W.N. Lee, Prevalence and sunlight photolysis of controlled and chemotherapeutic drugs in aqueous environments, *Environmental Pollution*, 2014, 187, 170-181.
- [27] F. Vargas, M.V. Hisbeth, J.K. Rojas, Photolysis and photosensitized degradation of the diuretic drug acetazolamide, *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 1998, 118, 19-23.
- [28] D.J.L. Prak, E. A. Milewski, *et al*, Influence of pH, temperature, salinity, and dissolved organic matter on the photolysis of 2,4-dinitrotoluene and 2,6-dinitrotoluene in seawater, *Marine Chemistry*, 2013, 157, 233-241.
- [29] L. Hoellein, U. Holzgrabe, Ficts and facts of epinephrine and norepinephrine stability in injectable solutions, *International Journal of Pharmaceutics*, 2012, 434, 468-480.
- [30] J. Bernstein, *Polymorphism in Molecular Crystals*, IUCr Monographs on Crystallography, Clarendon Press, 2002, 14, 257.
- [31] I. N. Levine, *Physical Chemistry*, McGraw Hill, 6ed, 2009.

- [32] A.S. Raw, M.S. Furness, *et al*, Regulatory considerations of pharmaceutical solid polymorphism in Abbreviated New Drug Applications (ANDAs), *Advanced drug Delivery Reviews*, 2004, 56, 397-414.
- [33] S. Wissing, D.Q.M. Craig, An investigation into the use of stepwise isothermal high sensitivity DSC as a means of detecting drug-exciptient incompatibility, *International Journal of Pharmaceutics*, 2000, 199, 141–150.
- [34] X.Q. Wang, Q. Zhang, pH-sensitive polymeric nanoparticles to improve oral bioavailability of peptide/protein drugs and poorly water-soluble drugs, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2012, 82, 219-229.
- [35] S.J.T. Rezaei, H.S. Abandansari, *et al*, pH-responsive unimolecular micelles self-assembled from amphiphilic hyperbranched block copolymer for efficient intracellular release of poorly water-soluble anticancer drugs, *Journal of Colloids and Interface Science*, 2014, 425, 27-35.
- [36] Z. Cao, J. Liu, *et al*, Highly uniform and stable cerasomal microcapsule with good biocompatibility for drug delivery, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2014, 116, 327-333.
- [37] S. Xu, W.G. Dai, Drug precipitation inhibitors in supersaturable formulations, *International Journal of Pharmaceutics*, 2013, 453, 36-43.
- [38] NATCO, Certificate of Suitability of Ondansetron Hydrochloride Dihydrate, Quinquennial Renewal, 2009.
- [39] IPCA, Ondansetron Hydrochloride Ph. Eur., Common Technical Document, 2012.
- [40] European Pharmacopeia, Methods of preparation of sterile products, Acedido a 09 Mai. 2014.
- [41] European Pharmacopeia, Application of the F0 concept to steam sterilization of aqueous preparations, Acedido a 09 Mai. 2014.
- [42] A.D. Skoog, D.M. West, *et al*, *Fundamentos de Química Analítica*, Thomson, 8ed, 2006.
- [43] CF Simpson, *Practical High Performance Liquid Chromatography*, Heyden & Son, London, 1978.
- [44] European Pharmacopeia, *Liquid Chromatography*, Acedido a 05 Fev. 2014.