

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

WILTON HIDEKI KAWAGUCHI



**MÉTODO INDICATIVO DE ESTABILIDADE PARA O BENZNIDAZOL E
INVESTIGAÇÃO DO PRODUTO DE DEGRADAÇÃO POR ESPECTROMETRIA DE
MASSAS DE ALTA RESOLUÇÃO**

CURITIBA

2018

WILTON HIDEKI KAWAGUCHI

**MÉTODO INDICATIVO DE ESTABILIDADE PARA O BENZNIDAZOL E
INVESTIGAÇÃO DO PRODUTO DE DEGRADAÇÃO POR ESPECTROMETRIA DE
MASSAS DE ALTA RESOLUÇÃO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área Insumos, Medicamentos e Correlatos, Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Roberto Pontarolo
Coorientadora: Profa. Dra. Iara José de Taborda
Messias-Reason

CURITIBA

2018

Kawaguchi, Wilton Hideki

Método indicativo de estabilidade para o Benznidazol e investigação do produto de degradação por espectrometria de massas de alta resolução / Wilton Hideki Kawaguchi – Curitiba, 2018.
118 f. : il. (algumas color) ; 30 cm

Orientador: Professor Dr. Roberto Pontarolo

Coorientadora: Professora Dra. Iara José de Taborda Messias-Reason

Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná.

Inclui bibliografia

1. Benznidazol. 2. Doença de Chagas. 3. Espectrometria de massas. 4. Validação analítica.
I. Pontarolo, Roberto. II. Messias-Reason, Iara José de Taborda. III. Universidade Federal do Paraná.
IV. Título.

CDD 615.19



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR CIÊNCIAS DA SAÚDE
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado de **WILTON HIDEKI KAWAGUCHI** intitulada: **Método indicativo de estabilidade para o benznidazol e investigação do produto de degradação por espectrometria de massas de alta resolução**, após terem inquirido o aluno e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua aprovação no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 22 de Fevereiro de 2018.

ROBERTO PONTAROLO

Presidente da Banca Examinadora (UFPR)

MICHEL LEANDRO DE CAMPOS

Avaliador Externo (UFPR)

FLAVIA LADA DEGAUT PONTES

Avaliador Externo (UFPR)

Aos meus pais Jaime Nobor Kawaguchi e

Liege Teruko Nakazawa Kawaguchi

por todo apoio, amor e carinho sempre.

AGRADECIMENTOS

São tantas as pessoas que passaram durante esta trajetória e que de alguma maneira contribuíram para este trabalho.

Agradeço primeiramente a Deus, por me guiar durante esta trajetória.

Aos meus amados pais, Jaime Nobor Kawaguchi e Liege Teruko Nakazawa Kawaguchi, por sempre me motivarem, me darem apoio, confiança, por estarem sempre ao meu lado, por acreditarem em mim. Nunca me deixar faltar nada. Pela dedicação e carinho.

Aos meus irmãos Heiti, Yudi e Maya, também por acreditarem em mim.

Amigo, companheiro em especial que de longe, me deu muito apoio, não só nesta etapa, que fez o esforço de poder vir me fazer mais feliz, sempre me dando atenção, carinho, compartilhando risos, conversas, viagens. Foi fundamental nesta caminhada.

Aos meus amigos que estiveram sempre por perto, me motivando e apoiando.

Aos amigos que fiz, não só durante o mestrado, como também desde o início que entrei no CEB. Que me ensinaram muitas coisas, que graças a eles levarei conhecimento para vida toda, são tantos que passaram, Thaís, João, Rômulo, por terem paciência e dedicação a ensinar. Letícia Leonart, por ter me ensinado muitas coisas desde o tempo como estagiário, aprendi muito, como preparo de soluções, preparo de amostras, até o manuseio de equipamentos, sempre muito disposta a ajudar em tudo, muito obrigado! Obrigado Letícia Bonâncio e Mariana. Flávia por ter tido paciência e dedicação em ensinar, sempre muito atenciosa, assim como a Raquel e o Breno, também dispostos a ensinar e ajudar. Victor por repassar seus conhecimentos desde o período de estágio, Ricardo, Leandro pelo pouco tempo de convívio também contribuíram no aprendizado. Andrea obrigado por sempre estar disposta a ajuda, por sua amizade, alegria e motivação e ao Michel que recém-chegado ao laboratório, sempre esteve disposto a ajudar em todos os momentos que fossem necessários.

Aos meus colegas e parceiros de laboratório, que entraram juntos no mestrado Bruna disposta a ouvir e dar conselhos, Brenda que trabalhamos sempre tentando ajudar no trabalho um do outro em todos os momentos, principalmente no início que foram difíceis, muito obrigado por contribuir com seus conhecimentos e André obrigado pelas dicas e sugestões na execução do trabalho. Nós quatro sempre buscando de alguma forma ajudar um ao outro nos trabalhos.

Aos amigos do GEATS, pelo apoio e por acreditarem, por terem me recebido, pela amizade.

As minhas colegas e amigas Laiane, Renata e Isadora, por sempre estarem ao meu lado, muitas conversas, risos, trocas de experiências, pelo convívio durante estes dois anos.

Aos amigos que fiz durante o mestrado, professores, técnicos e alunos de outros laboratórios, como o TECFAR muito obrigado por me acolherem, por me convidarem a participar de conversas, compartilhar conhecimentos, festividades, cafés, etc.

Aos professores Fábio, Mayumi, Tomoe, Cid, Almeriane, Itamar, que me deram oportunidade de adquirir novas experiências e novos conhecimentos.

A Andressa, professor Fábio e professor Dile, por me ajudarem em algumas etapas deste trabalho.

Em especial à Mariana Millan Fachi e Letícia Bonâncio Cerqueira, por me ajudarem muito, por dedicarem parte do tempo para me ensinarem, para ajudar em todos os momentos que passei, não foram só no período de mestrado, desde o início que entrei para a equipe, sempre sendo amigas para todas as horas, por me motivarem sempre, por me apoiarem em todos os momentos, foram eles tristes e felizes, por terem paciência muita paciência. Amizade que levarei para todo o sempre, seja por onde eu estiver! Muito Obrigado Mari e Leti!

À minha coorientadora Prof^a. Iara Messias-Reason, pela oportunidade de trabalhar neste projeto e apoio.

Ao Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco, por doação do material essencial utilizado para desenvolvimento deste projeto.

Ao Centro de Medicamentos do Paraná, pela doação de material para utilização durante processos deste trabalho.

Por fim, ao Prof. Roberto Pontarolo, meu admirável orientador, por desde o início que entrei no CEB, por me dar a oportunidade de aprender mais para crescer mais, consolidar conhecimentos que foram fundamentais nesta trajetória, não só no mestrado como desde o período de estágio. Mesmo vindo de outra instituição, abriu as portas para mim. Obrigado por acreditar, confiar, incentivar e pela paciência.

São poucas as palavras para agradecer a TODOS que fizeram e fazem parte da minha vida.

Muito Obrigado!

RESUMO

A doença de Chagas, causada pelo parasita *Trypanosoma cruzi*, é uma doença negligenciada e um problema de saúde pública. De acordo com a Organização Mundial de Saúde, cerca de oito milhões de pessoas no mundo possuem essa doença, sendo que grande parte dos afetados se encontra na América Latina. A transmissão clássica da doença se dá através do contato com as fezes do vetor triatomíneo, popularmente conhecido como barbeiro. Desta forma, os casos existentes no país atualmente são majoritariamente crônicos. Alguns poucos casos agudos têm sido relatados, resultantes da transmissão oral do parasita. A doença de Chagas pode ser curada se o tratamento for iniciado logo após a infecção. Atualmente, existem no mercado duas drogas para o tratamento da doença de Chagas, o benznidazol e o nifurtimox. No Brasil, apenas o benznidazol está disponível. O Brasil é um dos poucos produtores mundiais deste medicamento, exportando-o para outros países. Durante seu transporte, tanto ao exterior quanto dentro do país, existe a possibilidade de a droga ser exposta a condições adversas. Desta forma, é de suma importância a realização de estudos de estabilidade para garantir a eficácia e segurança do medicamento. Em vista disso, o objetivo deste trabalho foi identificar e caracterizar os produtos de degradação do benznidazol, bem como desenvolver e validar um método indicativo de estabilidade para este fármaco. O estudo de estabilidade empregado neste trabalho foi o estudo de estabilidade do insumo farmacêutico ativo, no qual são realizados testes de degradação forçada. Esse procedimento expõe o fármaco a ambientes extremos (base, ácido, luz, oxidação, calor) com o propósito de forçar sua degradação. Durante o estudo de degradação forçada, o benznidazol sofreu degradação por hidrólises ácida e alcalina, por oxidação e por fotólise. Os produtos de degradação formados foram caracterizados por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas de alta resolução. Além disso, um método por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos foi desenvolvido e validado para a indicação de estabilidade e quantificação do fármaco benznidazol. O método foi capaz de separar o fármaco de seus possíveis produtos de degradação. Com o auxílio deste método, também foi possível propor a cinética de degradação do fármaco nas condições de meio ácido, alcalino e oxidante. O método desenvolvido e validado neste trabalho demonstrou ser seletivo, linear, preciso, exato, isento de efeito matriz e robusto. O benznidazol por meio do ensaio de degradação forçada demonstrou ser instável em condições ácida, alcalina, oxidativo e fotolítico. Além disso, em meio ácido, alcalino e oxidante, benznidazol apresentou uma ordem de reação de primeira ordem para degradação. Neste trabalho foi comprovado que o benznidazol pode degradar quando exposto a condições não controladas, como por exemplo, de armazenamento e transporte. Este dado é de extrema relevância, devido ao Brasil é um dos principais produtores e exportadores mundiais dessa droga.

Palavras-chave: Benznidazol, validação, produtos de degradação, CLAE-DAD, espectrometria de massas, elucidação estrutural

Abstract

Chagas disease, caused by the parasite *Trypanosoma cruzi*, is a neglected disease and a public health problem. According to the World Health Organization, about eight million people worldwide have this disease, and most of those affected are in Latin America. The classic transmission of the disease occurs through contact with the feces of the triatomine vector, popularly known as kissing bug. In this way, the cases existing in the country are currently mostly chronic. Some few acute cases have been reported, resulting from the oral transmission of the parasite. Chagas disease can be cured if treatment is started shortly after infection. Currently, there are two drugs on the market for the treatment of Chagas' disease, benznidazole and nifurtimox. In Brazil, only benznidazole is available. Brazil is one of the few world producers of this medicine, exporting it to other countries. During transportation, both abroad and within the country, it is possible that the drug is exposed to adverse conditions. In such way, it is of paramount importance to carry out stability studies to ensure the efficacy and safety of the medicine. Therefore, the objective of this study was to identify and characterize the degradation products of benznidazole, as well as to develop and validate a method indicative of stability for this drug. We conducted the stability study of the active pharmaceutical ingredient, in which forced degradation tests are performed. This procedure exposes the drug to extreme environments (base, acid, light, oxidation, heat) for the purpose of forcing its degradation. During the forced degradation study, benznidazole was degraded by acid and alkaline hydrolysis, oxidation and photolysis. The degradation products formed were characterized by high performance liquid chromatography coupled to high resolution mass spectrometry. In addition, a high performance liquid chromatography method with diode arrangement detector was developed and validated for the indication of stability and quantification of benznidazole drug. The method was able to separate the drug from its possible degradation products. With the aid of this method, it was also possible to propose the degradation kinetics of the drug under acid, alkaline and oxidant conditions. The method developed and validated in this work has been shown to be selective, linear, precise, accurate, free of matrix effect and robust. Benznidazole through of the forced degradation test proved to be unstable under acidic, alkaline, oxidative and photolytic conditions. Furthermore, in acidic, alkaline and oxidation medium, benznidazole presented a first order reaction for degradation. In this work was proved that benznidazole can degrade to uncontrolled conditions, such as, storage and transport. This fact is of extreme relevance, due Brazil is one of the main producers and exporters worldwide of this drug.

Keywords: Benznidazole, validation, degradation product, HPLC-DAD, mass spectrometry, structural elucidation

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - CICLO DE TRANSMISSÃO VETORIAL DO TRYPANOSOMA CRUZI	27
FIGURA 2 - TRANSMISSÃO VETORIAL DO TRYPANOSOMA CRUZI	28
FIGURA 3 - EVOLUÇÃO CLÍNICA DA DOENÇA DE CHAGAS	30
FIGURA 4 - ESTRUTURA QUÍMICA DO FARMACO BENZNIDAZOL	34
FIGURA 5 - GRÁFICO REPRESENTATIVO DE UMA REAÇÃO QUÍMICA DE ORDEM ZERO	52
FIGURA 6 - GRÁFICO REPRESENTATIVO DE UMA REAÇÃO QUÍMICA DE PRIMEIRA ORDEM	52
FIGURA 7 - GRÁFICO REPRESENTATIVO DE UMA REAÇÃO QUÍMICA DE SEGUNDA ORDEM	53
FIGURA 8 - GRÁFICOS COMPARATIVOS DAS ORDENS DE REAÇÃO	53
FIGURA 9 - FLUXOGRAMA DO ESTUDO DE DEGRADAÇÃO FORÇADA: HIDRÓLISES	62
FIGURA 10 - FLUXOGRAMA DO ESTUDO DE DEGRADAÇÃO FORÇADA: OXIDAÇÃO	63
FIGURA 11 - FLUXOGRAMA DO ESTUDO DE DEGRADAÇÃO FORÇADA: FOTÓLISE	64
FIGURA 12 - CROMATOGRAMA APÓS OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO CROMATOGRÁFICO	71
FIGURA 13 - CROMATOGRAFIA REPRESENTANDO A PUREZA DOS PICOS PARA O ENSAIO DE SELETIVIDADE	72
FIGURA 14 - ESPECTROS UV EVIDENCIANDO A PUREZA DOS PICOS CROMATOGRÁFICOS	72
FIGURA 15 - COMPARAÇÃO DOS ESPECTROS DE UV DO BNZ ANTES DA DEGRADAÇÃO E APÓS DEGRADAÇÃO	74
FIGURA 16 - GRÁFICO DA LINEARIDADE DO BNZ	75
FIGURA 17 - GRÁFICO DE RESÍDUOS	76
FIGURA 18 - COMPARAÇÃO DAS CURVAS	77
FIGURA 19 - CROMATOGRAFIA OBTIDA APÓS O BNZ EXPOSTO À CONDIÇÃO ALCALINA	83
FIGURA 20 - CROMATOGRAMA DO BNZ OBTIDO POR LC-QToF-MS	84

FIGURA 21 - CROMATOGRAMA DA REAÇÃO DE DEGRADAÇÃO EM MEIO ALCALINO OBTIDO POR LC-QToF-MS.....	84
FIGURA 22 - ESPECTRO DE MASSAS REFERENTE AO PICO CROMATOGRÁFICO DE 2,99 MIN.....	85
FIGURA 23 - ESPECTRO DE MASSAS REFERENTE AO PICO CROMATOGRÁFICO DE 2,08 E 2,15 MIN	85
FIGURA 24 - ESTRUTURA QUÍMICA DOS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO EM MEIO ALCALINO	86
FIGURA 25 - ROTA DE DEGRADAÇÃO DO COMPOSTO OBTIDO POR HIDRÓLISE ALCALINA.....	87
FIGURA 26 - ROTA DE DEGRADAÇÃO POR HIDRÓLISE ALCALINA SEGUNDO SOFTWARE ZENETH.....	88
FIGURA 27 - CROMATOGRAFIA OBTIDA APÓS O BNZ EXPOSTO A CONDIÇÃO ÁCIDA	89
FIGURA 28 - CROMATOGRAMA DA REAÇÃO DE DEGRADAÇÃO EM MEIO ÁCIDO OBTIDO POR LC-QToF-MS	90
FIGURA 29 - ESPECTRO DE MASSAS REFERENTE AO PICO CROMATOGRÁFICO DE 2,90 MIN.....	90
FIGURA 30 - ESPECTRO DE MASSAS REFERENTE AO PICO CROMATOGRÁFICO DE 2,78 MIN.....	91
FIGURA 31 - ESPECTRO DE MASSAS REFERENTE AO PICO CROMATOGRÁFICO DE 2,78 MIN COM O PERFIL ISOTÓPICO	91
FIGURA 32 - PRODUTO DE DEGRADAÇÃO OBTIDO POR HIDRÓLISE ÁCIDA...	92
FIGURA 33 - ROTA DE DEGRADAÇÃO DO COMPOSTO OBTIDO POR HIDRÓLISE ÁCIDA	92
FIGURA 34 - CROMATOGRAMA DA REAÇÃO DE DEGRADAÇÃO EM MEIO OXIDANTE	93
FIGURA 35 - CROMATOGRAFIA DE DEGRADAÇÃO MEIO OXIDANTE OBTIDO POR LC-QToF-MS	94
FIGURA 36 - ESPECTRO DE MASSAS REFERENTE AO PICO CROMATOGRÁFICO DE 2,86 MIN.....	94
FIGURA 37 - CROMATOGRAMA DA REAÇÃO DE DEGRADAÇÃO POR EXPOSIÇÃO À LUZ.....	95

FIGURA 38 - CROMATOGRAMA DA REAÇÃO DE DEGRADAÇÃO POR LUZ OBTIDO POR LC- QTof-MS	96
FIGURA 39 - ESPECTRO DE MASSAS REFERENTE AO PICO CROMATOGRÁFICO DE 2,84 MIN.....	96
FIGURA 40 - CROMATOGRAMA DA REAÇÃO POR HIDRÓLISE NEUTRA/ TERMODEGRADAÇÃO.....	97
FIGURA 41 - PICOS CROMATOGRÁFICOS REFERENTES AO PRODUTO DE DEGRADAÇÃO E BNZ	98
FIGURA 42 - DECAIMENTO DO FÁRMACO BNZ EM FUNÇÃO DO TEMPO EM CONDIÇÃO ALCALINA.....	99
FIGURA 43 - MODELO INTEGRADO CONSIDERANDO CINÉTICA DE PRIMEIRA ORDEM PARA REAÇÃO EM MEIO BÁSICO	100
FIGURA 44 - MODELO INTEGRADO CONSIDERANDO CINÉTICA DE ORDEM ZERO PARA REAÇÃO EM MEIO BÁSICO.....	101
FIGURA 45 - MODELO INTEGRADO CONSIDERANDO CINÉTICA DE SEGUNDA ORDEM PARA REAÇÃO EM MEIO BÁSICO	101
FIGURA 46 - PICOS CROMATOGRÁFICOS REFERENTES AO PRODUTO DE DEGRADAÇÃO MEIO ÁCIDO E DECAIMENTO DO BNZ.....	102
FIGURA 47 - DECAIMENTO DO FÁRMACO BNZ EM FUNÇÃO DO TEMPO EM CONDIÇÃO ÁCIDA	103
FIGURA 48 - MODELO INTEGRADO CONSIDERANDO CINÉTICA DE PRIMEIRA ORDEM PARA REAÇÃO EM MEIO ÁCIDO	104
FIGURA 49 - MODELO INTEGRADO CONSIDERANDO CINÉTICA DE ORDEM ZERO PARA REAÇÃO EM MEIO ÁCIDO.....	104
FIGURA 50 - MODELO INTEGRADO CONSIDERANDO CINÉTICA DE SEGUNDA ORDEM PARA REAÇÃO EM MEIO ÁCIDO	105
FIGURA 51 - DECAIMENTO DO BNZ E FORMAÇÃO DE PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO.....	106
FIGURA 52 - DECAIMENTO DO FÁRMACO BNZ EM FUNÇÃO DO TEMPO EM CONDIÇÃO OXIDANTE.....	106
FIGURA 53 - MODELO INTEGRADO CONSIDERANDO CINÉTICA DE PRIMEIRA ORDEM PARA REAÇÃO EM MEIO OXIDANTE	107
FIGURA 54 - MODELO INTEGRADO CONSIDERANDO CINÉTICA DE ORDEM ZERO PARA REAÇÃO EM MEIO OXIDANTE.....	108

FIGURA 55 - MODELO INTEGRADO CONSIDERANDO CINÉTICA DE SEGUNDA ORDEM PARA REAÇÃO EM MEIO OXIDANTE	108
---	-----

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 - PARÂMETROS NECESSARIOS PARA A VALIDAÇÃO ANALÍTICA..	44
QUADRO 2 - LIMITES DO TEOR DO ANALITO QUE DEVEM ESTAR PRESENTES NA FAIXA DE TRABALHO DE LINEARIDADE PARA MÉTODOS ANALÍTICOS	46
QUADRO 3 - PARÂMETROS PARA AVALIAÇÃO DA ROBUSTEZ DO MÉTODO .	49
QUADRO 4 - DESCRIÇÃO DO INSUMO FARMACÊUTICO ATIVO BENZNIDAZOL	54
QUADRO 5 - DESCRIÇÃO DO COMPRIMIDO DE BENZNIDAZOL	54
QUADRO 6 PREPARO DAS AMOSTRAS PARA O ENSAIO DE LINEARIDADE	58
QUADRO 7 - PREPARO DAS AMOSTRAS PARA O ENSAIO DE EFEITO MATRIZ.....	59
QUADRO 8 - PREPARO DE AMOSTRAS PARA O ENSAIO DE EXATIDÃO	60
QUADRO 9 - PARÂMETROS PARA O ENSAIO DE ROBUSTEZ	60

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - NOVOS CASOS DA DOENÇA DE CHAGAS, DE ACORDO COM ANO E FORMA DE TRANSMISSÃO NO BRASIL DE 2006 A 2013.	32
TABELA 2 - LIMITES DOS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO DE ACORDO COM A PORCENTAGEM DO FÁRMACO	39
TABELA 3 - INTERVALO DE TEMPO PARA CONDIÇÃO BÁSICA	66
TABELA 4 - INTERVALO DE TEMPO PARA CONDIÇÃO ÁCIDA.....	67
TABELA 5 - INTERVALO DE TEMPO PARA CONDIÇÃO OXIDATIVA	67
TABELA 6 - RESULTADOS DO ENSAIO DE LINEARIDADE.....	75
TABELA 7 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA ENTRE ÁREAS E CONCENTRAÇÃO DE BNZ.....	76
TABELA 8 - ÁREAS DOS PICOS CROMATOGRÁFICOS DO BNZ OBTIDAS A PARTIR DAS ANÁLISES DO PADRÃO E AMOSTRA COM ADIÇÃO DE PADRÃO	77
TABELA 9 - RESULTADO DO TESTE ANOVA PARA EFEITO MATRIZ	78
TABELA 10 - COEFICIENTES OBTIDOS PARA A ANÁLISE DE EFEITO MATRIZ.	78
TABELA 11 - RESULTADO DO TESTE DE COMPARAÇÃO PARA O ENSAIO DE EFEITO MATRIZ	78
TABELA 12 - RESULTADOS DO ENSAIO DE REPETIBILIDADE	79
TABELA 13 - RESULTADOS DO ENSAIO DE PRECISÃO INTERMEDIÁRIA	79
TABELA 14 - RESULTADOS DO ENSAIO DE RECUPERAÇÃO OBTIDOS PELO MÉTODO DE ADIÇÃO DE PADRÃO	80
TABELA 15 - ESTATÍSTICA DE REGRESSÃO	81
TABELA 16 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) NO ENSAIO DE LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO.....	81
TABELA 17 - COEFICIENTES DE INSERÇÃO E COEFICIENTE ANGULAR.....	81
TABELA 18 - RESULTADOS DO ENSAIO DE ROBUSTEZ.....	82
TABELA 19 - TESTE DE HIPÓTESE DE CORRELAÇÃO PARA O MODELO LINEAR PARA CINÉTICA DE PRIMEIRA ORDEM EM MEIO BÁSICO	102
TABELA 20 - TESTE DE HIPÓTESE DE CORRELAÇÃO PARA MODELO LINEAR PARA CINÉTICA DE PRIMEIRA ORDEM EM MEIO ÁCIDO.....	105
TABELA 21 - TESTE DE HIPÓTESE DE CORRELAÇÃO PARA MODELO LINEAR PARA CINÉTICA DE PRIMEIRA ORDEM EM MEIO OXIDANTE.....	109

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APCI	- <i>Atmospheric-Pressure Chemical Ionization</i> (em Português, Ionização química à pressão atmosférica)
BNZ	- Benznidazol
CEMEPAR	- Centro de Medicamentos do Paraná
CI	- <i>Chemical Ionization</i> (em Português, Ionização química)
CD	- Grupo de Diferenciação
CLAE	- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
LC-QToF-MS	- Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada à espectrometria de massas do tipo quadrupolo tempo de voo.
CTLA	- <i>Citotoxic T-lymphocyte-associated Antigen</i> (em Português, Antígeno Citotóxico associado a Linfócito T)
CV	- Coeficiente de Variação
DAD	- Detector de Arranjo de Diodos
DNA	- Ácido Desoxirribonucléico
DNDi	- <i>Drugs for Neglected Diseases initiative</i> (em português, Iniciativa de Medicamentos para Doenças Negligenciadas)
DP	- Desvio Padrão
DPR	- Desvio Padrão Relativo
EI	- <i>Electron Ionization</i> (em Português, Ionização por elétron)
ELISA	- <i>Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay</i> (em português, Ensaio de Imunoabsorção Enzimática)
ESI	- <i>Electrospray Ionization</i> (em Português, Ionização por <i>Electrospray</i>)
FAB	- <i>Fast Atom Bombardment</i> (em Português, Bombardeamento por átomos rápidos)
HIV	- <i>Human Immunodeficiency Virus</i> (em Português, Vírus da Imunodeficiência Humana)
IUPAC	- <i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i> (em Português, União internacional de química pura e aplicada)
IC	- Inclinação da Curva
ICH	- <i>International Conference on Harmonisation</i>

IFA	- Insumo Farmacêutico Ativo
IFI	- Imunofluorescência Indireta
IFN- γ	- Interferon- γ
Ig	- Imunoglobulina
IL	- Interleucina
INMETRO	- Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial do Brasil
k	- Constante
LAFEPE	- Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco
LD	- Limite de Detecção
ln	- Logaritmo Natural
LQ	- Limite de Quantificação
LSIMS	- <i>Liquid-phase Secondary Ion Mass Spectrometry</i> (em Português, Espectrometria de massas de íon secundário em fase líquida)
MALDI	- <i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionization</i> (em Português, Ionização e dessorção a laser assistida por matriz)
MCP	- <i>Microchannel Plate</i> (em Português, Placa de microcanal)
m/z	- Relação massa/carga
NADPH	- <i>Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate</i> (em Português, Fosfato de dinucleótido de adenina e nicotinamida)
NFX	- Nifurtimox
NK	- <i>Natural Killer</i> (em Português, célula exterminadora Natural)
OMS	- Organização Mundial da Saúde
PCR	- <i>Polymerase Chain Reaction</i> (em português Reação em Cadeia Polimerase)
Q-ToF	- <i>Quadrupole-Time of Flight</i> (em Português, Quadrupolo-tempo de voo)
RE	- Resolução
RDC	- Resolução da Diretoria Colegiada
SQR	- Substância Química de Referência
ToF	- <i>Time of Flight</i> (em Português, Tempo de voo)
Th	- Linfócitos T auxiliar

TNF- α	- Fator de Necrose Tumoral- α
UV-Vis	- Ultravioleta-Visível
v/v	- Volume/volume

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	23
2.	OBJETIVOS	25
2.1	OBJETIVO GERAL	25
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
3.	REVISÃO DE LITERATURA	26
3.1	DOENÇA DE CHAGAS	26
3.1.1	Transmissão	28
3.1.2	Aspectos clínicos	30
3.1.3	Epidemiologia	31
3.1.4	Tratamento	32
3.1.5	Benznidazol	33
3.2	ESTABILIDADE DE MEDICAMENTOS	36
3.3	PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO	37
3.4	ESTUDOS DE ESTABILIDADE	37
3.5	CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA	40
3.6	CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ULTRA EFICIÊNCIA	41
3.7	CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS	42
3.8	VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS	44
3.8.1	Seletividade	45
3.8.2	Linearidade	46
3.8.3	Faixa de trabalho	46
3.8.4	Efeito matriz	47
3.8.5	Precisão	47
3.6.5.1.	Repetibilidade	47
3.6.5.2.	Precisão intermediária	48
3.6.5.3.	Reprodutibilidade	48
3.8.6	Exatidão	48
3.8.7	Limite de quantificação	49
3.8.8	Robustez	49
3.9	CINÉTICA DE REAÇÃO QUÍMICA	50

4.	MATERIAL E MÉTODOS	54
4.1	MATERIAL.....	54
4.1.1	Obtenção do insumo farmacêutico	54
4.1.2	Obtenção da forma farmacêutica.....	54
4.1.3	Reagentes e solventes	54
4.1.4	Equipamentos e <i>softwares</i>	55
4.2	PREPARO DAS SOLUÇÕES.....	55
4.2.1	Preparo da solução estoque	55
4.2.2	Preparo da solução intermediária	56
4.2.3	Preparo da solução amostra.....	56
4.3	DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO INDICATIVO DE ESTABILIDADE.....	56
4.3.1	Desenvolvimento e otimização dos parâmetros cromatográficos	56
4.4	VALIDAÇÃO DO MÉTODO CLAE-DAD	57
4.4.1	Seletividade	57
4.4.2	Linearidade e faixa de trabalho.....	57
4.4.3	Efeito matriz.....	58
4.4.4	Precisão.....	59
4.4.5	Exatidão.....	59
4.4.6	Limite de quantificação	60
4.4.7	Robustez	60
4.5	ENSAIO DE DEGRADAÇÃO FORÇADA	61
4.5.1	Degradação por hidrólise.....	61
4.5.2	Degradação por oxidação.....	62
4.5.3	Degradação por fotólise.....	63
4.6	IDENTIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO.....	64
4.7	CINÉTICA DA REAÇÃO QUÍMICA.....	66
5.	RESULTADOS E DISCUSSÕES	70
5.1	DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO INDICATIVO DE ESTABILIDADE.....	70
5.1.1	Desenvolvimento e otimização dos parâmetros cromatográficos	70
5.2	VALIDAÇÃO DO MÉTODO INDICATIVO DE ESTABILIDADE	71
5.2.1	Seletividade	71
5.2.2	Linearidade e faixa de trabalho.....	74

5.2.3	Efeito Matriz.....	76
5.2.4	Precisão.....	78
5.2.5	Exatidão.....	79
5.2.6	Limite de quantificação	81
5.2.7	Robustez	81
5.3	ENSAIO DE DEGRADAÇÃO FORÇADA E IDENTIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO	82
5.3.1	Hidrólise básica	82
5.3.2	Hidrólise ácida	88
5.3.3	Oxidação	92
5.3.4	Fotólise	95
5.3.5	Termodegradação/ hidrólise neutra	97
5.4	CINÉTICA DA DEGRADAÇÃO DO BENZNIDAZOL	98
5.4.1	Hidrólise básica	98
5.4.2	Hidrólise ácida	102
5.4.3	Oxidação	105
6.	CONCLUSÃO	110
	REFERÊNCIAS	111

1. INTRODUÇÃO

A doença de Chagas, também conhecida como tripanossomíase americana, foi descrita pela primeira vez pelo médico Carlos Chagas em 1909. Essa doença é causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*. A principal forma de transmissão é através do contato com as fezes contaminadas com o parasita, após a picada do inseto vetor triatomíneo, popularmente conhecido como barbeiro. Esta forma de transmissão encontra-se controlada no Brasil desde 2006, sendo que os poucos casos novos que têm sido relatados são devido à contaminação oral. Assim, a maioria dos doentes apresenta a forma crônica da doença. Outras formas de transmissão também são conhecidas, como a transmissão congênita, por transfusão sanguínea, e por transplante de órgãos (MONCAYO, 1999; VALDEZ et al., 2012; DNDI, 2016).

A doença de Chagas é considerada negligenciada (DNDI, 2016) pois ocorre em países pobres, com grandes problemas sociais e recebe pouca atenção das indústrias farmacêuticas. Essa doença é tipicamente de área rural, acometendo indivíduos moradores de casas feitas de barro, conhecidas como pau a pique, onde o vetor pode encontrar abrigo adequado. Porém, com a constante migração populacional, esta enfermidade passou a atingir também o meio urbano (SCHMUNIS, 2000; DIAS, 2007).

O diagnóstico da doença de Chagas é realizado por exame parasitológico ou imunológico, de acordo com a fase da enfermidade (aguda ou crônica) (MARTINS et al., 2000). Após a confirmação pelo diagnóstico, deve-se iniciar o tratamento medicamentoso da doença. Os medicamentos atualmente disponíveis no mercado internacional são o benznidazol e nifurtimox, sendo aprovado no Brasil somente o benznidazol (SERAFIM et al., 2011; VALDEZ et al., 2012). Estes são eficazes apenas na infecção aguda (quando a maior parte dos diagnósticos são feitos), infecção congênita e fase crônica recente (COURA; CASTRO, 2002). Além disso, podem causar eventos adversos graves tais como anorexia, neuropatia periférica, dermatopatias alérgicas, toxicidades renal e cardíaca e vômitos (TONIN et al., 2010; SERAFIM et al., 2011). Por ser o Brasil um dos principais produtores e exportadores mundiais de benznidazol, é de extrema importância se obter um rigoroso controle de estabilidade do medicamento, para saber se este necessita de adição de protetores específicos em sua formulação, como também para garantir sua qualidade durante o transporte e armazenamento.

Segundo a Organização Mundial de Saúde, estabilidade farmacêutica é a capacidade de um produto farmacêutico em manter as suas características químicas, físicas, microbiológicas e biofarmacêuticas dentro dos limites especificados durante todo o seu prazo de validade (MIRCO; ROCHA, 2013). A perda da estabilidade de um fármaco pode estar relacionada com a perda do efeito terapêutico ou com a formação de produtos de degradação tóxicos (MIRCO; ROCHA, 2013).

Existem vários tipos de estudos de estabilidade, que podem ser agrupados em três categorias: estudos preliminares, estudo de estabilidade do medicamento e estudo de estabilidade do insumo farmacêutico ativo. O estudo de estabilidade do medicamento, que tem por finalidade definir o prazo de validade do produto final, ainda pode ser subdividido em três tipos: acelerado, conduzido para obter um prazo de validade provisório; estudo de estabilidade de longa duração, que inicia-se simultaneamente com o estudo acelerado, com o objetivo de confirmar o prazo de validade final; e estudo de estabilidade de acompanhamento, realizado durante todo o período em que o medicamento estiver sendo comercializado (BRASIL, 2005a, 2015a).

Para realizar o estudo de estabilidade do medicamento, é necessário conhecer seus produtos de degradação. Para verificar se as substâncias encontradas durante a análise do medicamento são oriundas do fármaco, é conduzido primeiramente o estudo de estabilidade do insumo farmacêutico ativo (IFA), que visa identificar e qualificar os produtos de degradação do fármaco (BRASIL, 2012, 2015a). A formação dos produtos de degradação por meio da exposição dos medicamentos a condições forçadas é conhecida como estudo de degradação forçada. Neste estudo, o perfil de degradação é o conjunto de produtos de degradação formados a partir do medicamento submetido a determinadas condições, como temperatura, tempo, luz, umidade, pH e oxidação (SILVA, K. E. R. et al., 2009; MIRCO; ROCHA, 2013).

Considerando que o benznidazol é o único tratamento disponível no Brasil para a doença de Chagas e que o Brasil é um dos poucos produtores mundiais deste medicamento, e que o mesmo realiza exportação para outros países, o estudo de degradação forçada do insumo farmacêutico ativo é de extrema importância para se conhecer os produtos de degradação provenientes do ativo. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi identificar os produtos de degradação oriundos do benznidazol e desenvolver e validar um método por cromatografia líquida de alta eficiência indicativo de estabilidade para este fármaco.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver e validar um método indicativo de estabilidade para o fármaco benznidazol e identificar seus produtos de degradação.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Submeter o fármaco benznidazol a diferentes condições de degradação (ácido, alcalino, oxidativo, luz, temperatura);
- Desenvolver e validar um método indicativo de estabilidade para o benznidazol por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de Arranjo de Diodos (CLAE-DAD);
- Realizar um estudo cinético das reações de degradação;
- Identificar os produtos de degradação do benznidazol.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 DOENÇA DE CHAGAS

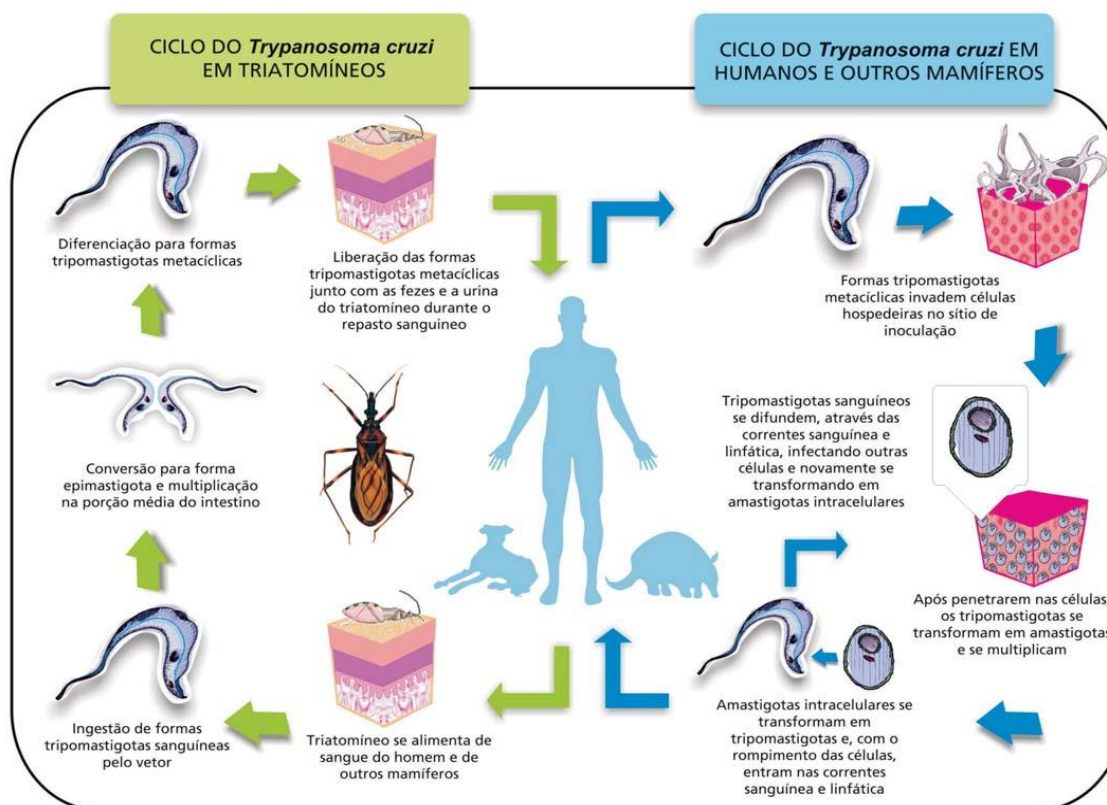
A doença de Chagas, também conhecida como tripanossomíase americana, foi descoberta e descrita pela primeira vez pelo médico e cientista brasileiro Carlos Ribeiro Justiniano das Chagas (Carlos Chagas) em 1909 (PRATA, 1981; KROPF, 2005).

Essa doença é causada pelo *Trypanosoma cruzi*, um protozoário hemoflagelado pertencente à família *Trypanosomatidae*, ordem Kinetoplastida. É possível observar nesse protozoário uma organela especial, em todas as suas formas evolutivas: o cinetoplasto (HOARE, 1986; LANA; TUFARI, 2012). Seu ciclo biológico é heteroxênico, ou seja, o parasita apresenta mais de um hospedeiro, sendo que a fase de multiplicação extracelular ocorre no hospedeiro invertebrado (vetor) e a fase intracelular, no vertebrado.

Quando o inseto vetor “barbeiro” está infectado com o *T. cruzi*, a forma esferomastigota circulante é encontrada no estômago e intestino do triatomíneo, que irá se diferenciar em epimastigota. Essa nova forma se multiplica por divisão binária, migra para o intestino posterior, e diferencia-se em tripomastigota metacíclico, considerada a forma infectante. Essa última forma é caracterizada por uma célula alongada com presença de um flagelo que auxilia em sua movimentação.

Quando o hospedeiro vertebrado é picado, ocorre a infecção através da entrada do parasita na forma tripomastigota metacíclico. No interior das células do hospedeiro, os parasitas adquirem uma forma sem flagelo e ovoide denominada amastigota, que apresenta uma rápida proliferação por divisão binária, gerando o rompimento celular e alcançando a corrente sanguínea e o sistema linfático, conforme demonstrado o ciclo da infecção no vetor e no hospedeiro vertebrado na (FIGURA 1). Após atingir o meio extracelular, o protozoário reassume a forma flagelada, acometendo mais células em novos ciclos e ocasionando danos principalmente em tecidos musculares lisos e cardíaco, podendo acarretar graves problemas, como insuficiência cardíaca e até a morte. (CHAGAS, 1909; LANA; TUFARI, 2012).

FIGURA 1 - CICLO DE TRANSMISSÃO VETORIAL DO TRYPANOSOMA CRUZI



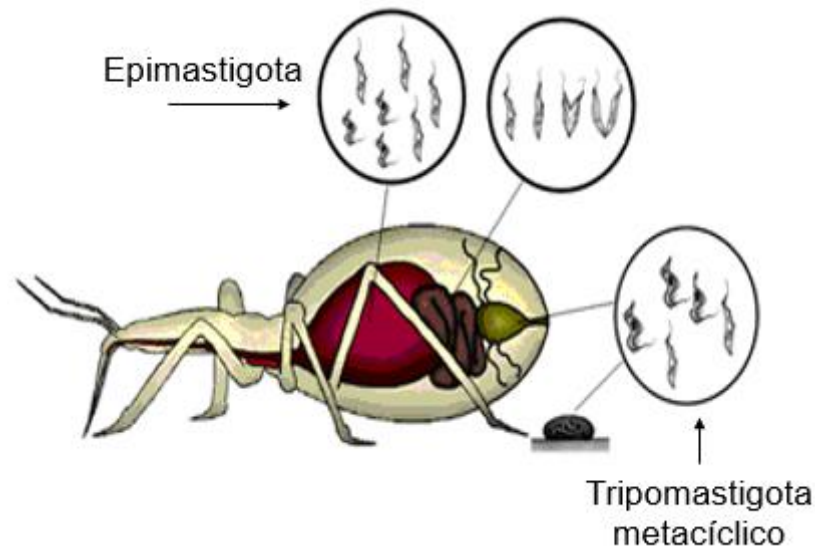
FONTE: (ARGOLO et al., 2008)

O hospedeiro invertebrado do *T. cruzi* é o inseto hematófago pertencente à ordem *Hemiptera*, família *Reduviidae*, subfamília *Triatominae*, conhecido popularmente como “barbeiro”, “chupão” ou “furão” (GALVÃO; JUSTI, 2015). O barbeiro pode ser encontrado em espaços silvestres (folhagens, pedras sobrepostas, palmeiras) como também em ambientes peridomiciliares, mais comumente em casas de paredes de barro que contém frestas, rachaduras e áreas circulantes. Algumas explicações para o processo de domiciliação dos triatomíneos foram propostas, porém este ainda não foi totalmente esclarecido. Alguns autores acreditam que a explicação para a domiciliação está ligada ao desmatamento, ocasionando a escassez das fontes naturais de alimento. Desta forma, os vetores acabam por migrar para as regiões domiciliares, onde convivem com animais domésticos e humanos (ARAGÃO, 1983; VILLELA et al., 2005; GALVÃO, 2014).

3.1.1 Transmissão

A transmissão do parasita *T. cruzi* por meio vetorial ocorre quando o inseto triatomíneo, durante o processo de alimentação do sangue do hospedeiro vertebrado (e.g. humanos), deposita suas fezes e/ou urina contendo o parasita próximos ao local da picada (FIGURA 2). O indivíduo, ao coçar o local da picada, acaba por levar estes dejetos contaminados para dentro do ferimento, entrando, então, o parasita na circulação sanguínea (SERAFIM et al., 2011; LANA; TUFARI, 2012).

FIGURA 2 - TRANSMISSÃO VETORIAL DO *TRYPANOSOMA CRUZI*



FONTE:(LIAC CENTRAL SOROLÓGICA, 2017)

No Brasil, a transmissão vetorial da doença de Chagas foi considerada interrompida no ano de 2006, graças a atividades como a vigilância epidemiológica, planos para reconhecimento da existência do vetor, dispersão de inseticidas nas casas e peridomicílios e também projetos e medidas educativas sanitárias (ARGOLO et al., 2008; SBC, 2011; SERAFIM et al., 2011; COSTA et al., 2013).

Contudo, outras formas de transmissão podem ocorrer, como por meio da transfusão sanguínea, que se destaca pela sua relevância epidemiológica principalmente em países não endêmicos, nos quais é considerada a principal via de transmissão (FERREIRA; SILVA, 2006; MORAES-SOUZA; FERREIRA-SILVA, 2011). Visando a minimizar esta forma de transmissão, o ideal é que o indivíduo acometido pela enfermidade, que apresenta antígenos parasitários no sangue e/ou tecidos por

toda a sua vida, seja excluído como doador de sangue (BRASIL, 2005b; LANA; TUFARI, 2012). A migração dos indivíduos afetados pela doença de Chagas da área rural para áreas urbanas tem gerado preocupação por este meio de transmissão, pois este acontecimento foi responsável pelo aumento da prevalência de doadores portadores da doença de Chagas nos hemobancos do país. A maior parte dos diagnosticados pela doença estão na fase crônica, um grupo de potenciais doadores de sangue, o que eleva o risco transfusional da doença de Chagas. Felizmente, este modo de transmissão tem se tornado cada vez mais raro, uma vez que o Ministério de Saúde implantou meios para se ter o controle em bancos de doação de sangue. Além disso, a constituição brasileira normatizou a prática da hemoterapia, instituiu a obrigatoriedade da seleção sorológica dos doadores, e proibiu a remuneração pela doação de sangue (DIAS, 2006).

A transmissão congênita é outra via de transmissão do parasita *T. cruzi*, sucedendo-se principalmente pela via transplacentária, mas também pode ocorrer pelo contato do sangue infectado da mãe com as mucosas do feto, no canal do parto. Esse tipo de transmissão pode ocorrer em qualquer fase da doença, sendo que o maior risco de transmissão é na fase aguda da doença (GONTIJO et al., 2009; SBC, 2011).

A transmissão oral tem chamado atenção da comunidade científica nos últimos anos, tendo sido responsável por alguns casos novos da doença. Essa via de infecção ocorre através da ingestão de alimentos (açai, caldo de cana, bacaba) contendo o triatomíneo infectado ou seus dejetos, animais que ingeriram o inseto vetor, e também através da amamentação. Nestes casos, a entrada do parasita pode ser pela mucosa da boca íntegra ou lesada (SBC, 2011; LANA; TUFARI, 2012; COSTA et al., 2013).

Nos laboratórios, a transmissão pode ocorrer através da manipulação de sangue de animais e de pacientes infectados, na cultura do parasita, em instrumentos de trabalhos contaminados, mau uso ou falta de equipamentos de proteção individual. Na sua maioria, este tipo de infecção é despercebido ou não diagnosticado. Fatores como desconhecimento, falta de atenção, mal uso de equipamentos de proteção individual, e falta de capacitação podem levar a este tipo de transmissão (SBC, 2011; LANA; TUFARI, 2012; COSTA et al., 2013).

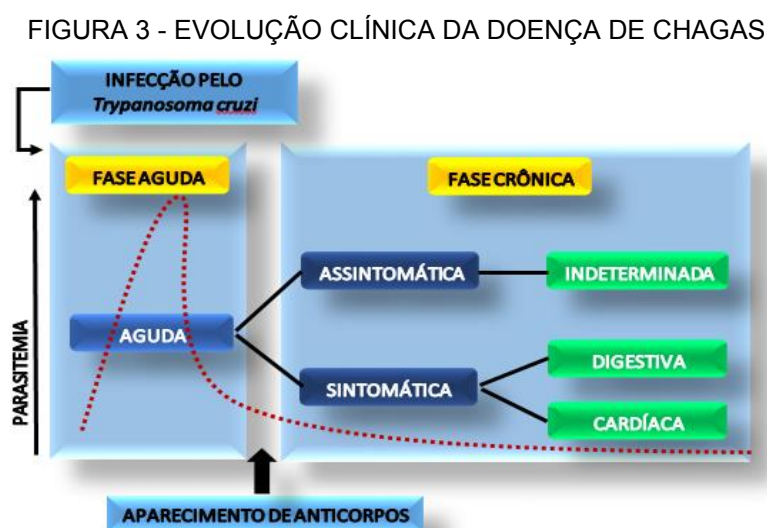
A transmissão transplantar ocorre através do transplante de órgãos infectados pelo parasita. O paciente que recebe o órgão infectado pode desenvolver a fase aguda da doença, uma vez que este faz uso de drogas imunossupressoras antes e após o

procedimento cirúrgico, apresentando menor resistência a infecções (LANA; TUFARI, 2012).

3.1.2 Aspectos clínicos

São inúmeros os fatores que agem diretamente ou indiretamente nas lesões ocasionadas pelo *T. cruzi* na doença de Chagas. Alguns desses fatores são específicos ao hospedeiro (idade, estrutura genética, raça, resposta imunitária a tipos celulares que interagem com o parasita, influências hormonais, deficiências nutricionais), e outros são devidos ao parasita (polimorfismo, virulência clonal, cepa). (PARKER; SETHI, 2011).

A doença de Chagas apresenta duas fases: a fase aguda e a fase crônica (FIGURA 3). A fase inicial da doença pode ser fatal na maioria dos casos graves, que correspondem a 10% de todos os casos, e em crianças menores de três anos, devido à meningoencefalite (COURA, 2003; MANOEL-CAETANO; SILVA, 2007).



FONTE: Adaptado de DUTRA et al. (2009).

Durante a fase aguda, em que há intensa multiplicação parasitária e invasão de células, em geral o indivíduo acometido se apresenta assintomático. Nesta fase, o diagnóstico pode ser feito por exames laboratoriais do sangue periférico, através da visualização de alta carga parasitária (HUGGINS et al., 1996). Quando sintomática, os sintomas manifestam-se nos primeiros 10 dias após a infecção, com sinais comuns a qualquer outra infecção sistêmica, como febre pouco elevada (em torno de 38 °C),

podendo ser do tipo contínua, remitente ou irregular, juntamente com outros sintomas, como edema, adenomegalia, esplenomegalia, hepatomegalia, cefaleia e alterações nervosas. Entretanto, a fase aguda passa despercebida em grande parte dos indivíduos (HUGGINS et al., 1996; REY, 2008; LANA; TUFARI, 2012).

Na transmissão vetorial, o indivíduo infectado pode apresentar manifestações locais, como o chagoma de inoculação, que se trata de um pequeno nódulo saliente presente na superfície cutânea da pele. Quando a lesão ocasionada pelo inseto acontece na região ocular, é denominada sinal de Romaña (edema bipálpebral unilateral) (TORRES, 1941; LARANJA et al., 1948; HUGGINS et al., 1996).

Os infectados pelo *T. cruzi*, após passarem pela fase aguda, que dura de dois a quatro meses, podem apresentar um período de latência, também denominado como fase crônica indeterminada, cuja duração pode ser de 10 a 30 anos. Este período ocorre em 50 a 70% dos infectados e é caracterizado pela diminuição das manifestações clínicas, podendo em muitos casos os indivíduos se tornarem assintomáticos. Apesar dos exames radiológicos cardíacos, de tubo digestivo e eletrocardiograma se encontrarem normais nesta etapa, a confirmação da doença pode ser realizada através de exames sorológicos positivos (LOPES; CHAPADEIRO, 1997; SBC, 2011).

Após o período de latência, os indivíduos evoluem para a forma crônica da doença. Esta fase é caracterizada pela baixa parasitemia e elevado número de anticorpos (HUGGINS et al., 1996). Após viverem anos sem sintomas, os indivíduos infectados pelo *T. cruzi* passam a ter manifestações clínicas relacionadas ao sistema digestivo (forma digestiva crônica da doença), cardíaco (forma cardíaca crônica), ou ambos (forma mista crônica), além de alteração na anatomia destes órgãos (REY, 2008).

3.1.3 Epidemiologia

Segundo a OMS, cerca de oito milhões de pessoas no mundo estão infectadas pelo *T. cruzi*, sendo que a maior parte encontra-se em áreas endêmicas de 21 países da América Latina. O número de óbitos relacionados à doença de Chagas nesta região é superior às demais doenças parasitárias: em torno de 10.000 mortes por ano (WHO, 2018).

Apesar de ser uma doença negligenciada, o Brasil contribuiu para diversos avanços para o combate à doença de Chagas. O Programa Nacional de Controle da Doença de Chagas, que teve início em 1950 e foi consolidado nos anos 1980, obteve um impacto positivo, alcançando a diminuição dos índices de triatomíneos. Além disso, foi imprescindível para o estabelecimento de um rigoroso controle transfusional e, por conseguinte, redução da transmissão da infecção por doações de sangue. Em 2006, o Brasil recebeu da Organização Pan-Americana de Saúde uma Certificação Internacional de Eliminação da Transmissão da doença Chagas pelo *Triatoma infestans*. Atualmente, praticamente todos os indivíduos acometidos por essa doença se encontram na fase crônica. Calcula-se que no Brasil existam 2 a 3 milhões de indivíduos infectados pelo *T. cruzi* (DIAS, 2006; FERREIRA; SILVA, 2006; FIOCRUZ, 2013). Na (TABELA 1) é possível observar que os novos casos da doença são baixos, e que a principal forma de transmissão é a oral, seguida pela vetorial (MINISTÉRIO DE SAÚDE, 2015).

TABELA 1 – NOVOS CASOS DA DOENÇA DE CHAGAS, DE ACORDO COM ANO E FORMA DE TRANSMISSÃO NO BRASIL DE 2006 A 2013.

Forma de transmissão	Ano de Notificação								Total	%
	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013		
Oral	106	92	68	169	68	117	127	96	843	65,71
Ignorada	8	59	24	34	36	61	49	54	325	25,33
Vetorial	4	4	11	16	25	10	8	20	98	7,64
Outras	-	-	1	1	1	1	3	4	11	0,86
Vertical	-	-	-	-	1	1	1	2	5	0,39
Total	118	156	104	220	131	190	188	176	1283	100

FONTE: Adaptado de Secretaria de Vigilância em Saúde - Ministério da Saúde (2015).

3.1.4 Tratamento

Em busca por meios terapêuticos para o tratamento da doença de Chagas, tem-se desenvolvido medicamentos com o intuito de alcançar a cura desta enfermidade. Porém, a eliminação completa do parasita do organismo do indivíduo infectado pelo *T. cruzi* ainda não foi alcançada (COSTA et al., 2013). Após um século da descoberta da doença de Chagas e de 40 anos da fabricação do primeiro medicamento, nos dias atuais somente duas drogas são utilizadas no controle da

doença (ALEXANDRE et al., 2014): o benznidazol (BNZ), desenvolvido no início da década de 1970 pelo laboratório Roche, com nome comercial de ROCHAGAN®; e o nifurtimox, comercializado internacionalmente como LAMPIT®. Esse último teve sua venda suspensa no Brasil na década de 1980, e posteriormente também foi suspenso na Argentina, Chile e Uruguai, devido a sua menor eficácia em relação ao BNZ e aos seus graves eventos adversos (IANNI et al., 1998; OLIVEIRA et al., 2008; SERAFIM et al., 2011). Ambos medicamentos atuam nas formas sanguíneas (tripomastigotas) e teciduais (amastigotas) do protozoário. Porém, como apresentam menor atividade sob as formas amastigotas, seu efeito na fase crônica é menor (ALEXANDRE et al., 2014; DIAS, 1997; OLIVEIRA et al., 2008; MARIN-NETO et al., 2009; SERAFIM et al., 2011; COSTA et al., 2013).

Estes medicamentos, devido à toxicidade, não devem ser administrados em grávidas, pacientes com insuficiência renal ou hepática, e em casos de doenças graves associadas com a doença de Chagas, tais como infecções sistêmicas, problemas cardíacos e neoplasias (COURA; CASTRO, 2002; RASSI et al., 2010). Nos indivíduos com mais de 50 anos, o risco de toxicidade dos fármacos pode ser maior do que em adultos mais jovens, sendo opcional o tratamento nestes casos (BERN et al., 2007; PEREZ-MOLINA et al., 2009; PARKER; SETHI, 2011). Existem relatos de que fatores como a idade e a fase da infecção podem estar envolvidos na efetividade do tratamento. Alguns pesquisadores sugerem que a variedade de cepas do parasita pode estar associada à dificuldade de se encontrar substâncias capazes de combater o protozoário (RIBEIRO et al., 1986; SOUSA, 1999; LESCURE et al., 2010; RASSI et al., 2010).

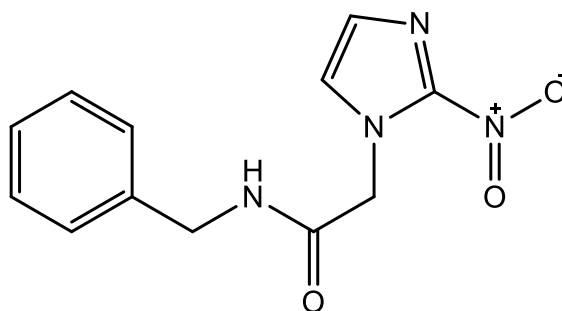
3.1.5 Benznidazol

O Benznidazol, cujo nome químico é 2-Nitro-N-(fenilmetil)-1-imidazol-1-acetamida (FIGURA 4) (ROCHAGAN®, Roche), foi inicialmente produzido e registrado pelo laboratório Roche. Atualmente, é produzido exclusivamente pelo Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco (LAFEPE) e disponibilizado pelo Sistema Único de Saúde. O BNZ é um composto nitro-heterocíclico, derivado do grupo nitroimidazólico (MARIN-NETO et al., 2009; SERAFIM et al., 2011). Apresenta um perfil de eficácia com altas taxas de cura na fase aguda e no início da fase crônica,

sendo pouco eficaz ou ineficaz na fase crônica tardia (DIAS; COURA, 1997; OLIVEIRA et al., 2008; BRITTA et al., 2015).

O BNZ apresenta-se como um pó cristalino, pouco amarelado, insípido, inodoro e estável ao ar, muito pouco solúvel em água, muito solúvel em dimetilsulfóxido, facilmente solúvel em dimetilformamida, solúvel em hexano, ligeiramente solúvel em etanol, metanol, acetato de etila e cloreto de metileno, pouco solúvel em acetona, muito pouco solúvel em clorofórmio, álcool isopropílico, glicerol e praticamente insolúvel em éter de petróleo. A faixa de fusão é de 188 °C a 190 °C. Sua fórmula molecular é $C_{12}H_{12}N_4O_3$ e a sua massa molecular é de 260,25 g.mol⁻¹. A massa exata e monoisotópica é 260,090942 g.mol⁻¹ (BRASIL, 2010).

FIGURA 4 - ESTRUTURA QUÍMICA DO FARMACO BENZNIDAZOL



FONTE: o autor (2018).

Nos indivíduos em fase crônica indeterminada, com manifestações cardíacas ou digestivas leves, sem manifestações clínicas ou ainda em crianças, recomenda-se o tratamento com BNZ com o propósito de retardar ou diminuir o avanço da doença para formas mais graves e diminuir sua transmissão (COURA; CASTRO, 2002; SBC, 2011; COSTA et al., 2013). Apesar de não curar a doença, estudos *in vivo* mostraram efeitos positivos ao se utilizar o medicamento na fase crônica avançada, como redução da parasitemia, da miocardite e baixa carga de anticorpos contra *T. cruzi* (MARIN-NETO et al., 2009).

O tratamento com BNZ apresenta alguns inconvenientes. Dentre eles, destacam-se as grandes doses administradas, o tempo de duração do tratamento, que varia de acordo com a fase da infecção, e a elevada ocorrência de eventos adversos causados pelo prolongado tratamento com doses elevadas (PALMEIRO-ROLDÁN et al., 2014; PRIOTTI et al., 2015).

O mecanismo de ação do BNZ não está totalmente esclarecido (OLIVEIRA et al., 2008; BUSCHINI et al., 2009). Porém, há relatos de que a ação ocorre pela formação de radicais livres e/ou metabólitos eletrofílicos. Nos derivados nitroimidazol, ocorre a redução do grupo nitro (NO₂) em grupo amino (NH₂) por ação das enzimas do tipo nitroredutase, presentes em células de protozoários ou bactérias. Essa reação leva à formação de intermediários radicalares, bem como de metabólitos eletrofílicos. O processo é iniciado pela ação da enzima NADPH citocromo P450 redutase, que atua sobre o grupo nitro (R-NO₂) da molécula nitroimidazol, induzindo a produção de um radical nitro intermediário (R-NO₂) e a formação de hidroxilamina (R-NHOH). O intermediário age na modificação covalente de macromoléculas como DNA, causando a fragmentação na cadeia e desestabilização da hélice, inibindo a síntese do DNA e levando à morte celular dos protozoários. Além desta alteração no DNA, outras macromoléculas são modificadas, como lipídeos e proteínas, acometendo o metabolismo do *T. cruzi*. Outro mecanismo de ação do BNZ seria pelo aumento da fagocitose, levando à lise e à inibição do crescimento do *T. cruzi* por meio de um mecanismo dependente de interferon- γ (IFN- γ) e através da enzima NADH-fumarato redutase, respectivamente (COURA; CASTRO, 2002; OLIVEIRA et al., 2008; BUSCHINI et al., 2009; SILVA, J. J. N. et al., 2009; PERDOMO et al., 2013; TROCHINE et al., 2014).

Concomitantemente, os metabólitos eletrofílicos citados acima, em virtude de sua alta reatividade e baixa especificidade, podem apresentar ação no hospedeiro humano, e efeitos citotóxicos que são observados durante o tratamento dos pacientes (SILVA, J. J. N. et al., 2009; PERDOMO et al., 2013; CAMPOS et al., 2014; TROCHINE et al., 2014). Os eventos adversos causados pelo BNZ podem ser classificados em três grupos: manifestações de hipersensibilidade (dermatite com erupções cutâneas, edema generalizado ou peritonial, febre, linfadenopatias, dores musculares e articulares), depressão da medula óssea (agranulocitose, neutropenia e púrpura trombocitopênica), e polineuropatia periférica (parestesias e polineurite) (CASTRO et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2008; SILVA, J. J. N. et al., 2009; ALEXANDRE et al., 2014).

A administração do BNZ é por via oral, em comprimidos de 100 mg para adultos e de 12,5 mg para crianças. A absorção do BNZ ocorre por via gastrointestinal, atingindo a concentração plasmática máxima entre 2 a 4 horas, com meia vida de eliminação de 12 horas. A eliminação dos metabólitos do fármaco são

predominantemente por via renal, podendo ocorrer em menor extensão também por via fecal (ALEXANDRE et al., 2014).

3.2 ESTABILIDADE DE MEDICAMENTOS

A estabilidade de um medicamento ou fármaco é estabelecida como a capacidade deste produto em preservar-se durante todo o período de estocagem e uso, dentro dos limites específicos, e apresentar as mesmas características de quando produzido. Também pode ser definida como o período compreendido entre o momento no qual o produto é fabricado até aquele em que sua potência está reduzida a não mais do que 10%, desde que os produtos de alteração estejam seguramente identificados e que os seus efeitos tenham sido previamente reconhecidos (BRASIL, 2005a).

Fatores ambientais como umidade, luz e temperatura, e outros relacionados ao próprio produto, como as propriedades químicas e físicas das substâncias ativas e dos excipientes farmacêuticos, assim como a forma farmacêutica e sua composição, o processo de fabricação, e o tipo e propriedade dos materiais de embalagem, podem ocasionar alterações na estabilidade dos produtos farmacêuticos (BRASIL, 2005a).

Os fatores que afetam a estabilidade dos medicamentos podem ser classificados em extrínsecos e intrínsecos:

- Fatores extrínsecos:
 - Temperatura: é o mais importante dos fatores de degradação, pois com o aumento da temperatura, aumenta a velocidade de degradação química;
 - Umidade: pode estar ou não sob influência da temperatura. Leva à alteração do estado físico do produto devido à aderência da água na sua superfície, gerando uma degradação indireta;
 - Luz: este fator pode provocar reações como redução e oxidação, que levam à degradação, assim como a intensidade e o comprimento de onda podem afiligr a velocidade da reação;
 - Oxidação: o oxigênio causa oxidação catalisada tanto pela luz como pela temperatura no meio onde os medicamentos são produzidos e armazenados.

- Fatores intrínsecos:
 - Hidrólise: mais comum dentre os fatores, causa a quebra das moléculas através da água;
 - pH: as principais reações de hidrólise e oxidação envolvidas na degradação de fármacos podem ser catalisadas por ácidos e bases, sendo o pH um fator capaz de acelerar ou diminuir a velocidade de reação. É necessário saber a faixa de pH em que a substância se encontra estável durante o processo de formulação do medicamento;
 - Relativos à formulação: polimorfismo dos componentes químicos, incompatibilidade entre os fármacos associados ou mesmo com os excipientes da formulação, o tamanho das partículas, vaporização caracterizada pela perda do solvente ou líquido da formulação (FINAZZI et al., 2013; MIRCO; ROCHA, 2013).

3.3 PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO

Produtos de degradação e impurezas em fármacos e excipientes são problemas recorrentes no setor farmacêutico (SINGH et al., 2012; FREITAS; NASCIMENTO, 2014). Estes precisam ser analisados pois alguns compostos gerados através da degradação podem exibir um potencial tóxico.

As impurezas são classificadas de acordo com sua origem em:

- a) Impurezas de origem da síntese química de fabricação;
- b) Impurezas residuais de solvente;
- c) Impurezas de degradação intrínsecas da reação de produtos;
- d) Impurezas de degradação por exposição; essas são produzidas com o tempo de vida do produto, através de oxidação com o ar atmosférico ou absorção de água. Essas impurezas são semelhantes as que são produzidas durante a exposição do ativo a condições forçadas (LEITE, 2009).

3.4 ESTUDOS DE ESTABILIDADE

Com o objetivo de garantir a integridade física, química, microbiológica, terapêutica e toxicológica do fármaco e da forma farmacêutica dentro dos limites específicos, sob influência dos fatores ambientais em função do tempo, recomenda-

se a execução de estudos de estabilidade (MATTHEWS, 1999; LUCAS et al., 2004; ANSEL et al., 2007)

Descrito pela Resolução - RE nº 1 de 29 de julho de 2005, o estudo de estabilidade possui como principal finalidade a determinação do prazo de validade do produto farmacêutico e o período de utilização em embalagem e condições de armazenamento especificadas. Além disso, também aborda a realização de testes de identificação e quantificação de produtos de degradação e o método analítico correspondente.

Os estudos de estabilidade podem ser agrupados em três categorias, a saber: estudo preliminar, estudo de estabilidade de medicamento e estudo de estabilidade do insumo farmacêutico ativo (BRASIL, 2005a).

Dentre estes estudos mencionados acima, o estudo de estabilidade de medicamento pode ser subdividido de acordo com a resolução supracitada nos seguintes estudos:

- 1) Estudo de Estabilidade Acelerado: estudo projetado para promover possível degradação química e/ou mudanças físicas de insumos farmacêuticos ativos em condições forçadas de armazenamento. Os resultados obtidos permitem avaliar o impacto de curtas exposições a condições fora daquelas estabelecidas. Esse estudo tem como objetivo estabelecer um prazo de validade provisório para o medicamento.
- 2) Estudo de Estabilidade de Longa Duração: inicia-se simultaneamente com o estudo acelerado. Este estudo contempla a verificação das características físicas, químicas, biológicas e microbiológicas de um produto farmacêutico ativo durante o prazo de validade esperado. Estes resultados têm por finalidade determinar ou confirmar o prazo de validade, recomendando assim as melhores condições de armazenamento, podendo aumentar ou reduzir o prazo de validade final do produto sugerido pela estabilidade acelerada.
- 3) Estudo de Estabilidade de Acompanhamento: Estudo preconizado para verificar se o produto farmacêutico mantém os mesmos resultados obtidos nos estudos de longa duração, bem como as mesmas características químicas, físicas, biológicas e microbiológicas. É realizado durante todo o período em que o medicamento/produto estiver sendo comercializado.

Os órgãos regulamentadores (ICH e Anvisa) normatizam que seja realizada a identificação, qualificação e notificação de produtos de degradação no decorrer dos estudos de estabilidade do medicamento, de acordo com a dose máxima do fármaco ingerida pelos pacientes, conforme descrito na (TABELA 2) (ICH, 2008; BRASIL, 2015a).

TABELA 2 - LIMITES DOS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO DE ACORDO COM A PORCENTAGEM DO FÁRMACO

	Dose máxima diária	Limites
Limites de Notificação	≤ 1g	0,1%
	> 1g	0,05%
	< 1mg	1,0%
Limites de Identificação	1mg – 10mg	0,5%
	> 10mg – 2mg	0,2%
	> 2g	0,1%
Limites de Qualificação	< 10mg	1%
	10mg – 100mg	0,5%
	> 100mg – 2g	0,2%
	> 2g	0,15%

FONTE: BRASIL (2015).

Para a realização do estudo de estabilidade do medicamento, inicialmente é necessário conhecer os produtos de degradação e saber se estes são oriundos do insumo farmacêutico ativo. Desta forma, primeiramente é realizado o estudo de estabilidade do IFA, que visa a identificar e qualificar os produtos de degradação do fármaco. É realizado sob determinadas condições de exposição, chamadas de “teste de degradação forçada” ou também denominado como estudo de estresse.

Por meio do monitoramento da formação de produtos de degradação, a segurança e eficácia dos fármacos é avaliada, pois a degradação pode ocasionar a perda parcial ou total da atividade terapêutica e/ou produção de compostos tóxicos (SILVA, K. E. R. et al., 2009). No estudo de degradação forçada, as amostras obtidas são submetidas a análises de quantificação dos produtos de degradação (BRASIL, 2005a; SILVA, K. E. R. et al., 2009).

A Anvisa recomenda o uso de métodos indicativos de estabilidade que sejam seletivos ao princípio ativo e a seus produtos de degradação para o estudo de estabilidade do medicamento e do IFA (BRASIL, 2005a, 2017). No entanto, metodologias para a análise de produtos de degradação não foram claramente estabelecidas pelo guia internacional de estabilidade do *International Conference on*

Harmonisation (ICH), assim como por outros órgãos regulatórios, mesmo o conceito do estudo de degradação forçada já sendo amplamente conhecido pelas indústrias farmacêuticas. Poucos fabricantes desenvolvem e validam métodos para a detecção e quantificação desses produtos. Além disso, a confiabilidade dos métodos indicativos de estabilidade pode ser comprometida devido à falta de informações detalhadas nas diretrizes analíticas, resultando em variações extremas na realização dos testes.

3.5 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

Desenvolvida na década de 1950, a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) ainda é a técnica analítica mais utilizada em métodos de separação. É uma técnica amplamente difundida, empregada em diversas áreas, como em indústrias químicas e farmacêuticas (MALDANER; JARDIM, 2009).

A cromatografia consiste em um processo físico-químico de separação de misturas homogêneas (duas ou mais substâncias). Essa técnica funciona de acordo com o princípio de que as substâncias presentes em uma mistura apresentam diferentes propriedades físico-químicas, incluindo a polaridade. Dessa forma, substâncias diferentes apresentam afinidades diferentes pelos solventes utilizados na fase móvel, e pelos constituintes da fase estacionária. De acordo com a afinidade apresentada, as substâncias interagem mais ou menos com as fases, migrando cada uma em um tempo diferente, o que resulta na separação dos compostos (COLLINS et al., 2006; MALDANER; JARDIM, 2009).

A fase estacionária é a fase fixa. Na CLAE, é conhecida como coluna de separação. Os analitos que estão sendo separados interagem com a fase estacionária até serem eluídos pela fase móvel, que consiste em um solvente ou uma mistura de solventes. De acordo com a polaridade das fases, a cromatografia pode ser classificada como em fase reversa e em fase normal (CASS; DEGANI, 2001; COLLINS et al., 2006).

A cromatografia em fase reversa é a mais utilizada nos laboratórios químicos e farmacêuticos. Nesse tipo de cromatografia, a fase móvel apresenta alta polaridade e a fase estacionária, baixa polaridade (com grupos octil, octadecil, silano, fenil, por exemplo). Já a cromatografia em fase normal tem polaridades invertidas, a fase estacionária é mais polar (grupos amina, nitrila, ciano ou diol) e a fase móvel apolar (SNYDER et al., 1997; TONHI et al., 2002). A cromatografia em fase reversa possui

certas vantagens em relação à cromatografia em fase normal, como por exemplo: uso de fases móveis menos tóxicas e de menor custo, fases estacionárias mais estáveis, rápido equilíbrio da coluna após a alteração da fase móvel, facilidade de empregar eluição por gradiente, boa reprodutibilidade dos tempos de retenção e análises mais rápidas (COLLINS et al., 2006).

As vantagens da CLAE em relação a outras técnicas de separação são: análises rápidas, alta resolução, alta eficiência (evidenciada por picos cromatográficos estreitos e bem definidos), baixos limites de detecção, excelente reprodutibilidade, obtenção de resultados qualitativos e quantitativos confiáveis e repetibilidade (HARRIS, 2005; COLLINS et al., 2006).

3.6 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ULTRA EFICIÊNCIA

Grandes avanços ocorreram nas técnicas analíticas de cromatografia desde sua criação. Nos últimos anos, destacou-se o desenvolvimento de fases estacionárias com partículas de diâmetro inferior a 2,0 μm , o que acarreta análises com maior resolução cromatográfica e mais eficientes. Todavia, algumas limitações surgem ao serem utilizadas partículas diminutas, como o aumento da pressão e vazão de fase móvel não uniforme. Desta forma, para se adequar a essa nova tecnologia, foram desenvolvidas colunas com tamanhos menores e equipamentos com capacidade de tolerar altas pressões, que eliminaram esses contratempos (RUSSO et al., 2008; MALDANER; JARDIM, 2009).

A evolução da cromatografia líquida que suporta altas pressões é conhecida como cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE). Em relação à CLAE, a CLUE propicia redução no tempo de análise, redução no gasto de fase móvel, maior resolução cromatográfica, maior detectabilidade e eficiência (NGUYEN et al., 2006; RUSSO et al., 2008; MALDANER; JARDIM, 2009; KLIMCZAK; GLISZCZYNSKA-WIGLO, 2015).

3.7 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS

Existem diversos sistemas de detecção que podem ser acoplados à CLAE e CLUE, que são escolhidos de acordo com as características da amostra e as informações que se deseja obter. Os mais utilizados são o arranjo de fotodiodos ou UV-Visível, fluorescência e espectrômetro de massas (CASS; DEGANI, 2001).

Um detector de arranjo de fotodiodos fundamenta-se em um circuito integrado único que apresenta um sensor de radiação, um componente de armazenamento de carga e um elemento de leitura. O arranjo de diodos é composto em um único cristal de silício, onde cada diodo atua ao mesmo tempo como tradutor de intensidade luminosa/carga elétrica e como componente de armazenamento de carga (RAIMUNDO JR; PASQUINI, 1997).

O espectrofotômetro de arranjos de diodos utiliza um conjunto de óptica reversa, ou seja, a rede de difração é inserida entre a amostra e o detector e não entre a fonte de radiação e a amostra. Desta forma, a radiação policromática do PDA (*Photodiode arrays*) incide sobre a amostra. Diferentes comprimentos de onda que são monitorados simultaneamente pelos diodos do arranjo são dispersos por um monocromador fixo. Esta disposição com monocromador fixo traz algumas vantagens, como aquisição de um espectro sem distorções e em poucos milissegundos, assim como mede os comprimentos de onda com alta repetibilidade (RAIMUNDO JR; PASQUINI, 1997; LANÇAS, 2009).

A associação da cromatografia com a espectrometria de massas (EM) apresenta diversas vantagens, como alta seletividade, eficiência de separação, fornecimento da massa molar dos compostos e de informações estruturais (LIM; LORD, 2002).

A EM é uma ferramenta analítica poderosa utilizada para identificar composto desconhecidos, elucidar a estrutura química das moléculas e quantificar compostos conhecidos. Esta técnica fundamenta-se na ionização das moléculas de uma amostra, formando íons positivos ou negativos dependendo da característica da molécula e da fonte de ionização. Além disso, a EM também é capaz de fragmentar os íons em análise, o que é útil para a elucidação estrutural bem como para a quantificação de compostos. A espectrometria faz a separação destes átomos ou moléculas com base

na sua relação massa/carga (m/z). Basicamente, o equipamento é composto por uma fonte de ionização, conjunto de analisadores e um detector (LIM; LORD, 2002; KOSTIAINEN et al., 2003).

Existem diversas fontes de ionização que podem ser utilizadas na EM, como a MALDI (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization*), FAB (*Fast Atom Bombardment*), LSIMS (*Liquid-phase Secondary Ion Mass Spectrometry*), EI (*Electron Ionization*), CI (*Chemical Ionization*) e APCI (*Atmospheric pressure chemical ionization*). As fontes que apresentam melhor performance no acoplamento da EM à CLAE ou CLUE são a ESI (*Electrospray Ionization*) e a APCI, sendo ambas formas de ionização à pressão atmosférica. Com o uso destas fontes, são formados os íons $[M+H]^+$ (massa molecular mais um próton) ou outros adutos, no modo positivo; e $[M-H]^-$ (massa molecular menos um próton) ou outros adutos, no modo negativo (KORFMACHER, 2005; HOLCAPEK et al., 2008; LANÇAS, 2009).

A ESI é utilizada com moléculas lábeis, macromoléculas e moléculas pequenas polares. O mecanismo de ionização consiste na nebulização do analito dissolvido em um solvente em um tubo capilar sobre o qual é aplicada alta voltagem e temperatura. O líquido é então disperso pelo *electrospray* em um fino aerossol. As gotas produzidas se reduzem a partir da evaporação do solvente, até que a força do campo elétrico na sua superfície seja grande o suficiente para expelir os íons da gota (Limite de *Rayleigh*). A expulsão dos íons é chamada de explosão *Coulombica*. Os íons formados entram pelo cone, seguindo assim para o analisador através de efeitos de atração eletrostática e pelo vácuo (KORFMACHER, 2005; CROTTI et al., 2006; CHIARADIA et al., 2008).

Posteriormente à formação de íons, ocorre a separação pelos analisadores com base na sua relação m/z (GLISH; VACHET, 2003). Há diversos tipos de analisadores. Um dos mais utilizados para a elucidação estrutural é o analisador por tempo de voo (ToF), ou também, o quadrupolo-tempo de voo (Q-ToF). O analisador Q-ToF é um analisador híbrido com alta resolução, sensibilidade, velocidade de varredura e ampla faixa de massas analisadas (LEE et al., 1999; MA; ZHU, 2009). No Q-ToF, o quadrupolo é responsável por focalizar os íons em direção à cela de colisão e ao ToF, por meio da radiofrequência. Para que ocorra fragmentação do composto de interesse, a pressão dos gases é definida na cela de colisão de acordo com o método. Os íons produzidos na fonte de ionização são acelerados por um campo elétrico e extraídos até alcançarem o detector. A velocidade alcançada pelo íon é

inversamente proporcional à massa analisada (CHERNUSHEVICH et al., 2001; LIM; LORD, 2002; MA; ZHU, 2009). A utilização do Q-ToF apresenta a vantagem de gerar resultados de m/z com alta exatidão e resolução (erro de massa < 5 ppm). Além disso, permite realizar experimentos de fragmentação de massas, aumentando a capacidade de elucidação estrutural (WILLIAMSON; BARTLETT, 2007).

Finalmente, por meio dos detectores selecionados de acordo com o tipo de analisador, os analitos são detectados. No caso do QToF, acopla-se normalmente o *microchannel plate detector* (MCP) (LANÇAS, 2009).

3.8 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

Toda vez que um método analítico é desenvolvido, há necessidade de se verificar se este demonstra um comportamento adequado para as situações nas quais será utilizado. Para assegurar que um novo método produza dados confiáveis, deverá passar por um processo de avaliação chamado de validação (RIBANI, 2004; GIL; BATISTA FILHO, 2007a).

Validação de um método consiste em um processo de verificação, estimando sua eficiência no uso rotineiro, atendendo às exigências estabelecidas pelos órgãos regulamentadores (RIBANI et al., 2004; GIL; BATISTA FILHO, 2007b). Para o registro de novos produtos, os órgãos regulamentadores requerem a validação dos métodos utilizados nas análises qualitativas e quantitativas desenvolvidos para caracterização do fármaco. Para tal, existem documentos oficiais a serem adotados (RIBANI, 2004; ICH, 2005; CASSIANO et al., 2009; BRASIL, 2017).

A validação é realizada seguindo alguns parâmetros definidos pelos órgãos regulamentadores, como por exemplo, seletividade, linearidade, precisão, exatidão, sensibilidade e robustez. Estes variam de acordo com o tipo de validação e com o tipo do ensaio disposto (QUADRO 1).

QUADRO 1 PARÂMETROS NECESSARIOS PARA A VALIDAÇÃO ANALÍTICA

Parâmetro Avaliado	Identificação	Teste de Impurezas		Doseamento
		Quantitativo	Ensaio Limite	
Exatidão	Não	Sim	Não	Sim
Repetibilidade	Não	Sim	Não	Sim

Parâmetro Avaliado	Identificação	Teste de Impurezas		Doseamento
		Quantitativo	Ensaio Limite	
Precisão Intermediária	Não	Sim ⁽¹⁾	Não	Sim ⁽¹⁾
Seletividade ⁽²⁾	Sim	Sim	Sim	Sim
Limite de Detecção	Não	Não ⁽³⁾	Sim	Não
Limite de Quantificação	Não	Sim	Não	Não ⁽³⁾
Linearidade	Não	Sim	Não	Sim
Intervalo	Não	Sim	Não	Sim

FONTA: BRASIL (2017)

NOTA: (1) Nos casos em que foi conduzida a reprodutibilidade, não é necessário conduzir a precisão intermediária; (2) Nos casos de ensaios de identificação, pode ser necessária a combinação de dois ou mais procedimentos analíticos para atingir o nível necessário de discriminação; (3) Pode ser necessário em alguns casos.

3.8.1 Seletividade

Seletividade é o primeiro passo no desenvolvimento e validação de um método de separação. Este parâmetro avalia o grau de interferência de outras substâncias ativas, impurezas, excipientes e produtos de degradação na identificação do analito. A seletividade garante que o sinal de resposta seja exclusivamente do composto de interesse. A linearidade, exatidão e a precisão estarão comprometidas se a seletividade não for validada (ICH, 2005; BRASIL, 2017).

A seletividade pode ser avaliada de diferentes formas. A primeira delas é comparar a matriz isenta do analito com a matriz adicionada do analito. Na sobreposição destes dois resultados, não deve aparecer nenhuma outra substância no tempo de retenção do analito. Entretanto, este método é limitado devido à dificuldade de obtenção de matriz isenta do analito. Outra forma de se avaliar a seletividade é através da avaliação da pureza do pico, o que pode ser feito com detectores modernos (arranjo de diodos, espectrômetro de massas), com base na comparação do pico de uma amostra com o de um padrão. Ainda, outra maneira é através do método de adição de padrão, utilizado principalmente quando não é possível a obtenção da matriz sem o analito (JENKE, 1996; RIBANI, 2004; BRASIL, 2017).

3.8.2 Linearidade

A linearidade indica a capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração do analito, dentro de uma determinada faixa de concentração (RIBANI, 2004; BRASIL, 2017).

Para determinar a linearidade do método, no mínimo cinco concentrações diferentes devem ser avaliadas, ao redor de uma faixa de 80 a 120% da concentração alvo do teste. Como critério de aceitabilidade deste parâmetro, devem ser apresentados os seguintes dados: equação da reta de regressão de y em x , estimada pelo método dos mínimos quadrados, avaliação da associação linear por meio da determinação dos coeficientes de correlação (r) e de determinação (r^2), gráfico de dispersão de resíduos, avaliação da significância do coeficiente angular e apresentação gráfica dos resultados para facilitar a visualização (RIBANI, 2004; BRASIL, 2017).

3.8.3 Faixa de trabalho

Faixa de trabalho ou intervalo é a faixa entre os limites de quantificação inferior e superior de um método analítico (BRASIL, 2017). É determinada a partir dos dados de linearidade, juntamente com os resultados de precisão e exatidão, e depende da aplicação pretendida do método (BRASIL, 2017). As seguintes faixas de trabalho devem ser consideradas (QUADRO 2).

QUADRO 2 - LIMITES DO TEOR DO ANALITO QUE DEVEM ESTAR PRESENTES NA FAIXA DE TRABALHO DE LINEARIDADE PARA MÉTODOS ANALÍTICOS

I – Teor	De 80% a 120% da concentração teórica do teste;
II – Uniformidade de conteúdo	De 70% a 130% da concentração teórica do teste;
III – Teste de dissolução	De -20% da menor concentração esperada a +20% da maior concentração esperada a partir do perfil de dissolução;
IV – Determinação de impurezas	Do limite de quantificação até 120% da concentração no limite da especificação de cada impureza individual;
V – Determinação simultânea de teor e impurezas pelos procedimentos de normalização de área	Do limite de quantificação (LQ) até 120% da concentração esperada da substância ativa.

FONTE: BRASIL (2017)

3.8.4 Efeito matriz

A determinação do efeito matriz tem por finalidade identificar a influência de possíveis interferentes presentes na matriz na intensidade do sinal dos analitos. Esta determinação está relacionada à seletividade da técnica. Nas técnicas mais seletivas como a EM, os interferentes podem levar a alterações nos resultados, como alteração da linha de base, tempo de retenção, supressão ou o aumento do sinal (RIBANI, 2004; GONZÁLEZ et al., 2014; BRASIL, 2017).

3.8.5 Precisão

A precisão de um método analítico reflete o grau de concordância entre os valores das análises individuais, por meio da repetição de um procedimento experimental. Quanto maior a proximidade das determinações das múltiplas aferições, mais preciso é o método (ICH, 2005; IUPAC, 2014). Esse parâmetro é expresso pela dispersão dos resultados, calculando-se o desvio padrão relativo (DPR), também conhecido como coeficiente de variação (CV), de um número suficiente de amostras, determinada pela equação:

$$DPR = \frac{DP \text{ (desvio padrão)}}{\text{Concentração média determinada}} \times 100$$

Este parâmetro pode ser expresso por meio da repetibilidade, da precisão intermediária ou da reprodutibilidade.

3.6.5.1. Repetibilidade

Repetibilidade, conhecida também como precisão intra-corrída, demonstra a concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo método, realizadas sob as mesmas condições em um curto período, pelo mesmo analista, no mesmo instrumento e mesmo local. A determinação da repetibilidade deve ser feita utilizando, no mínimo, nove determinações, contemplando o intervalo linear do método analítico, ou seja, três concentrações: baixa, média e alta, com três réplicas em cada

nível ou seis réplicas a 100% da concentração alvo do teste, individualmente preparadas (RIBANI, 2004; BRASIL, 2017).

3.6.5.2. Precisão intermediária

A precisão intermediária mostra o efeito das variações devido a eventos ocorridos no mesmo laboratório, como diferentes analistas, dias diferentes ou equipamentos diferentes, ou uma combinação destes fatores. Expressa a concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo método (RIBANI, 2004; BRASIL, 2017).

3.6.5.3. Reprodutibilidade

Reprodutibilidade, ou precisão interlaboratorial, representa o grau de concordância entre os resultados das medições de um mesmo analito, realizadas sob condições variadas, como mudança de operador, local e equipamentos. Este parâmetro refere-se aos resultados dos estudos de colaboração entre laboratórios, de maneira a analisar a performance dos métodos, e deve ser considerado em situações como a padronização de procedimentos analíticos a serem incluídos, por exemplo, em farmacopeias (RIBANI, 2004).

3.8.6 Exatidão

Corresponde ao grau de concordância entre os resultados individuais do método analítico e um valor de referência aceito como verdadeiro. A exatidão é determinada com no mínimo nove pontos envolvendo três níveis de concentração (baixa, média e alta), com três réplicas em cada concentração (RIBANI, 2004; BRASIL, 2017). A exatidão é expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente, conforme a seguinte fórmula:

$$\text{Exatidão} = \frac{\text{concentração média experimental}}{\text{concentração teórica}} \times 100$$

3.8.7 Limite de quantificação

O limite de quantificação (LQ) constitui a menor quantidade do analito que pode ser quantificada com precisão e exatidão aceitáveis. O LQ é determinado como uma concentração, sendo que a exatidão e precisão das análises também devem ser registradas (BRASIL, 2017).

O LQ pode ser calculado de acordo com o método visual, através da relação sinal-ruído (considerando a relação de dez vezes o ruído da linha de base), ou baseado em parâmetros da curva analítica, através da seguinte fórmula:

$$LQ = \frac{10 \times DP_a}{IC}$$

Em que IC é a inclinação da curva de calibração, DP_a é o desvio padrão, que pode ser obtido de três formas: a partir do desvio padrão do intercepto com o eixo Y de no mínimo três curvas de calibração construídas contendo concentrações do analito próximas ao suposto limite de detecção; pelo desvio padrão residual da linha de regressão e por estimativa de ruído proveniente da análise de um número apropriado de amostras do branco (RIBANI, 2004; BRASIL, 2017).

3.8.8 Robustez

A robustez é comumente realizada no desenvolvimento de um método analítico. Demonstra a capacidade do método em resistir a pequenas ou deliberadas variações das condições analíticas (BRASIL, 2017).

Existem fatores que devem ser considerados na determinação da robustez do método analítico (QUADRO 3).

QUADRO 3 - PARÂMETROS PARA AVALIAÇÃO DA ROBUSTEZ DO MÉTODO

Preparo das Amostras	Estabilidade das soluções analíticas
	Tempo de extração
	Compatibilidade de filtros
Espectrofotometria	Variação de pH da solução
	Diferentes lotes ou fabricantes de solventes
Cromatografia Líquida	Variação do pH da fase móvel
	Variação na composição da fase móvel

	Diferentes lotes ou fabricantes de colunas
	Temperatura
	Fluxo da fase móvel
Cromatografia Gasosa	Diferentes lotes ou fabricantes de colunas
	Temperatura
	Velocidade do gás de arraste
Outras técnicas analíticas	As variações a serem testadas deverão ser avaliadas criticamente e seus resultados deverão ser apresentados

FORNE: BRASIL (2017)

3.9 CINÉTICA DE REAÇÃO QUÍMICA

A estabilidade e o prazo de validade de medicamentos e fármacos são estabelecidos baseados na cinética de reações, ou seja, no estudo da velocidade de degradação e do modo como essa velocidade é influenciada pela concentração dos reagentes, outras substâncias químicas que podem estar presentes na formulação, excipientes, e por fatores extrínsecos (NUDELMAN, 1975; BRASIL, 2010).

A degradação de medicamentos é causada por reações químicas que possuem velocidades específicas. Essas reações dependem da concentração dos reagentes, do pH, da temperatura, de radiação ou da utilização de outros catalisadores. Para que o estudo de estabilidade seja eficiente e efetivo, deve ser estabelecida a cinética química (NUDELMAN, 1975; LACHMAN et al., 2001).

Cinética química é o estudo da velocidade das reações químicas. Com o auxílio da cinética química, é possível compreender os mecanismos responsáveis pelas transformações químicas e prever quantitativamente estas transformações ao longo do tempo. Estas podem ser de origem química ou física, contribuindo na predição do prazo de validade por meio de modelos matemáticos (MEIRELLES, 2014).

O estudo da cinética química possibilita construir um modelo que expresse a velocidade com que os reagentes são convertidos em produtos, considerando parâmetros e ordens de reação (RUSSELL, 1994).

A velocidade de uma reação química pode ser expressa de diversas formas. Dentre elas, destacam-se a expressão pela velocidade de desaparecimento dos reagentes ou pela velocidade de formação dos produtos. A lei da velocidade ou equação da velocidade é uma equação algébrica que relaciona velocidade de reação com a concentração de reagentes (FOGLER, 1998).

Normalmente, o reagente é consumido na reação e atua como um agente limitante. A velocidade de consumo do reagente depende da concentração e da temperatura do meio. A velocidade da reação depende de uma constante de velocidade (k), que não se comporta verdadeiramente como uma constante, uma vez que é influenciada pela temperatura, mas é independente das concentrações das espécies envolvidas na reação (NUDELMAN, 1975; RUSSELL, 1994). O químico Arrhenius sugeriu a dependência da velocidade de reação com a temperatura, chamada de constante de $k_A(T)$.

$$k_A(T) = Ae^{-E_a/RT} = k_0e^{-E_a/RT}$$

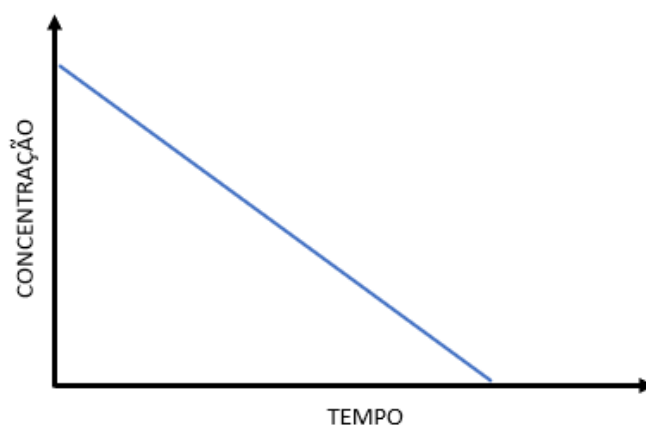
Em que $A = k_0$ = fator pré-exponencial ou fator de frequência; E_a = energia de ativação (J/mol ou cal/mol); R = constante dos gases 8,134 J/mol.K; T = temperatura absoluta (K).

A E_a é a energia mínima que as moléculas reagentes devem possuir antes que a reação possa ocorrer. A energia de ativação é determinada por meio de reações em várias temperaturas diferentes.

O estudo da cinética de degradação deve descrever de modo apropriado a ordem de reação dos parâmetros de Arrhenius. É preciso conhecer a ordem e a velocidade de reação, uma vez que as reações de degradação de produtos farmacêuticos ocorrem sob condições definidas, para assim poder determinar a concentração do fármaco em função do tempo (MEIRELLES, 2014).

As reações podem ser de ordem zero, primeira ordem e segunda ordem. As reações de ordem zero ocorrem quando a degradação do fármaco é independente da concentração dos reagentes e é constante ao longo do tempo. A concentração do fármaco diminui linearmente com o passar do tempo, como representado na (FIGURA 5).

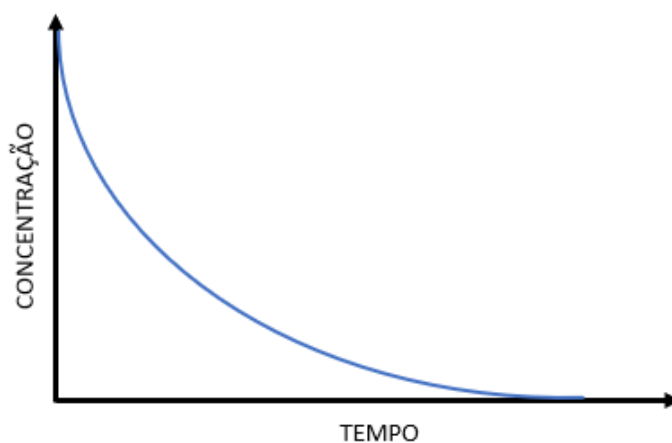
FIGURA 5 GRÁFICO REPRESENTATIVO DE UMA REAÇÃO QUÍMICA DE ORDEM ZERO.



FONTE: Adaptado de RUSSEL (1994).

A reação de primeira ordem ocorre quando a velocidade da reação depende da concentração do reagente. A degradação é diretamente proporcional à concentração existente de reagente ao longo do tempo (NUDELMAN, 1975). Para uma cinética de primeira ordem, a curva de concentração em relação ao tempo é exponencial, como exemplificado na (FIGURA 6).

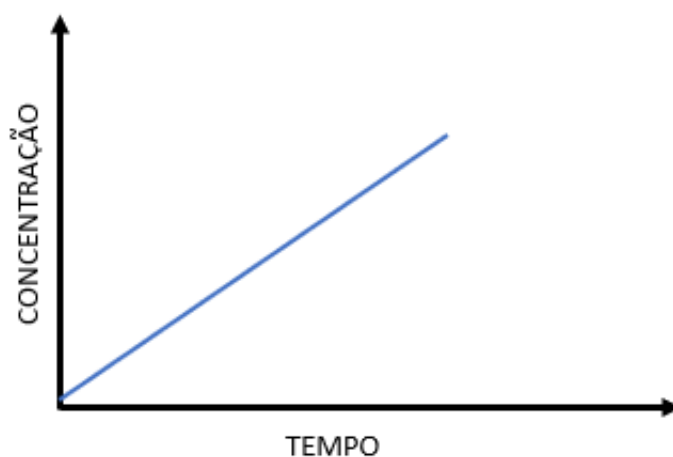
FIGURA 6 - GRÁFICO REPRESENTATIVO DE UMA REAÇÃO QUÍMICA DE PRIMEIRA ORDEM.



FONTE: Adaptado de RUSSEL (1994).

A reação de segunda ordem ocorre quando a velocidade de reação é proporcional ao produto das concentrações de dois reagentes, ou à segunda potência da concentração de um deles (MEIRELLES, 2014). O gráfico ilustrativo de uma reação química de cinética de segunda ordem está representado na (FIGURA 7).

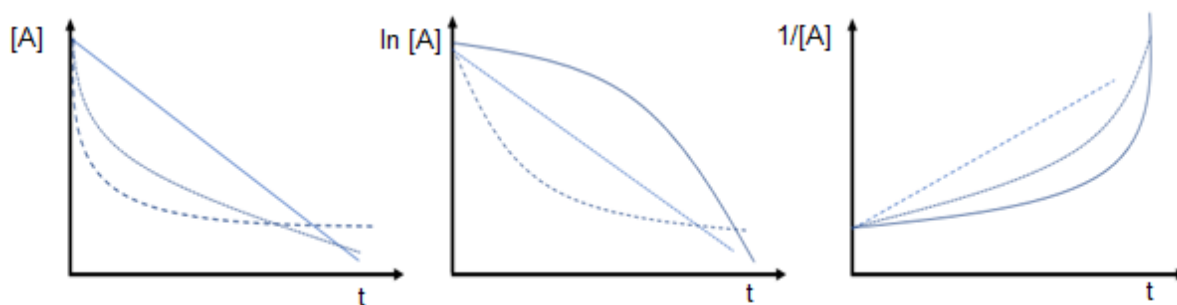
FIGURA 7 - GRÁFICO REPRESENTATIVO DE UMA REAÇÃO QUÍMICA DE SEGUNDA ORDEM.



FONTE: Adaptado de RUSSEL (1994).

Quando não se conhece a ordem de uma reação química, esta pode ser obtida através da construção e análise de gráficos, como demonstrado na (FIGURA 8). A ordem da reação será indicada através da linearização da curva obtida no gráfico. Contudo, este método pode gerar resultados não confiáveis se o tempo de reação não for suficientemente longo para a construção da curva corretamente.

FIGURA 8 - GRÁFICOS COMPARATIVOS DAS ORDENS DE REAÇÃO



FONTE: Adaptado de NETZ, ORTEGA (2002)

NOTA: Linha cheia – ordem zero; linha pontilhada – primeira ordem; linha tracejada – segunda ordem

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

4.1.1 Obtenção do insumo farmacêutico

O IFA BNZ foi doado pelo Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco (Recife/PE). A descrição do seu peso molecular, teor, lote, data de fabricação e validade estão apresentados no (QUADRO 4).

QUADRO 4 - DESCRIÇÃO DO INSUMO FARMACÊUTICO ATIVO BENZNIDAZOL

IFA	Peso molecular (g.mol ⁻¹)	Teor (%)	Lote	Data de Fabricação	Data de Vencimento
Benznidazol	260,253	99,1	17709	03/2016	03/2018

4.1.2 Obtenção da forma farmacêutica

Os comprimidos de BNZ 100 mg foram doados pelo Centro de Medicamentos do Paraná (CEMEPAR). As características do comprimido estão descritas no (QUADRO 5).

QUADRO 5 - DESCRIÇÃO DO COMPRIMIDO DE BENZNIDAZOL

Lote	Composição de ativos	Teor declarado	Validade
16070001	Benznidazol	100 mg	07/2019

NOTA: Os comprimidos utilizados contêm em sua formulação BNZ 100 mg e excipiente q.s.p.

4.1.3 Reagentes e solventes

Para a realização das análises, foi utilizado hidróxido de sódio (99%) da Merck (Darmstadt, Alemanha); Ácido Clorídrico (36,5%) da Vetec (Duque de Caxias, Brasil); Ácido Fórmico (99%) da Riedel-de Haën (Hanover, Alemanha); Formiato de Amônio (97%) da Spectrum Chemical (Gardena, EUA), água ultrapura obtida por meio do sistema Milli-Q (Millipore, Milford, EUA), acetonitrila da Panreac (Barcelona, Espanha).

4.1.4 Equipamentos e *softwares*

- Purificador de água Milli-Q- Millipore, A10 Gradiente (Milford, EUA);
Balança analítica Mettler Toledo, modelo Excellence Plus XP 205, com precisão de 0,01 mg (Columbus, EUA);
- Banho de ultrassom Branson 2510 (Danbury, EUA);
- Banho-maria da PolyScience (Niles, EUA);
- Cromatógrafo a líquido de alta eficiência Agilent 1100 Series equipado com detector DAD e *software* ChemStation® versão A.10.02;
- Coluna analítica Waters XBridge™ C₈ 5 µm, 4,6 x150 mm, número de Lote 0104370461;
- Espectrômetro de massas com analisador quadrupolo-tempo de voo, Xevo G2-S, Waters (Milford, EUA);
- Cromatógrafo a líquido de ultra eficiência Acquity H-Class da Waters Corporation (Milford, EUA) e *software* MassLynx V 4.1;
- *Software* Zeneth version 7.1.3 Copyright© Lhasa Limited
- *Software* MarvinSketch 15.12.14.0 Copyright© 1998-2015 ChemAxon Ltd.

4.2 PREPARO DAS SOLUÇÕES

4.2.1 Preparo da solução estoque

Para preparo da solução estoque, primeiramente o IFA foi pesado em balança analítica e transferido para um balão volumétrico de 10 mL. Em seguida, acetonitrila em volume suficiente para solubilização do fármaco foi adicionada ao balão. A solução foi levada ao banho de ultrassom por 10 min para garantir a solubilização do IFA. Por último, o volume do balão foi completado com acetonitrila, obtendo-se uma solução com concentração de 5 mg.mL⁻¹. A solução estoque foi armazenada em *freezer* a -40 °C.

4.2.2 Preparo da solução intermediária

A partir da solução estoque, foi preparada a solução intermediária, que consistiu na diluição da solução estoque em acetonitrila e água 1:1 (v/v), até chegar a uma concentração de 3 mg.mL^{-1} .

4.2.3 Preparo da solução amostra

Para o preparo da solução amostra dos comprimidos de BNZ, primeiramente foi determinado o peso médio de 10 comprimidos. Estes foram então pulverizados com auxílio de gral e pistilo, até se obter um pó fino. Em seguida, foi pesada uma quantidade de pó equivalente ao valor teórico de 10 mg de BNZ. O pó foi transferido para um balão volumétrico de 10 mL, ao qual foi adicionada uma quantidade de acetonitrila suficiente para solubilizar a amostra. O balão foi submetido ao ultrassom por 10 minutos, e logo após o seu volume foi completado com acetonitrila. A amostra foi homogeneizada e filtrada em filtro de fluoreto de polivinilideno (PVDF) de $0,2 \mu\text{m}$ de diâmetro, obtendo-se uma solução de concentração 1 mg.mL^{-1} . O filtrado foi diluído em acetonitrila:água, 1:1, (v/v) até a concentração final de $300 \mu\text{g.mL}^{-1}$

4.3 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO INDICATIVO DE ESTABILIDADE

4.3.1 Desenvolvimento e otimização dos parâmetros cromatográficos

Para o desenvolvimento do método, inicialmente o IFA foi submetido a condições de degradação ácida, alcalina, oxidante, luz e temperatura, para reconhecimento dos possíveis produtos de degradação. Com isso, as condições cromatográficas foram definidas de acordo com a resolução entre os picos com o perfil cromatográfico do BNZ e dos produtos de degradação.

Na seleção da fase móvel, foram testados diferentes solventes, pHs e diferentes proporções entre os solventes, eluídos tanto no modo isocrático como no modo gradiente. Para a seleção da fase estacionária, foram testadas as colunas XBridge™ C₁₈ (150 x 4,6 mm, 5 μm), C₈ (150 x 4,6 mm, 5 μm), ZORBAX Eclipse XDB-

CN (250 x 4,6 mm, 5 μ m), Atlantis[®] HILIC (150 x 2,1 mm, 3 μ m), ZORBAX Eclipse XDB-Phenyl (150 x 4,6 mm, 5 μ m).

Além disso, a vazão da fase móvel foi variada de 800 a 1200 μ L.min⁻¹ e a temperatura da coluna, em 25 a 40 °C. Foram testados os volumes de injeção de 10 e 20 μ L. O comprimento de onda foi selecionado conforme os resultados da varredura (200 a 400 nm).

4.4 VALIDAÇÃO DO MÉTODO CLAE-DAD

Após a definição e otimização dos parâmetros cromatográficos, o método foi submetido a testes de validação conforme os critérios descritos na Resolução – RDC nº 166, de 24 de julho de 2017, Anvisa, categoria referente a Doseamento, e também aos critérios do ICH Q2(R1) (2005) – *Validation of analytical procedures: text and methodology* (ICH, 1996; BRASIL, 2017).

4.4.1 Seletividade

Uma solução contendo o IFA foi preparada em uma concentração de 300 μ g.mL⁻¹ a partir da solução intermediária. Essa solução foi adicionada às soluções que haviam sido submetidas à degradação forçada na forma de *pool*, ou seja, a uma mistura de todos os meios de degradação testados. Então, a seletividade foi avaliada através da determinação da pureza dos picos individuais do BNZ e de seus produtos de degradação. Para a determinação da pureza, foi realizada a varredura no intervalo de 200 a 400 nm.

4.4.2 Linearidade e faixa de trabalho

As curvas de calibração foram estabelecidas a partir de triplicatas em cinco níveis de concentração, compreendendo uma faixa de 80 a 120% da concentração teórica alvo (QUADRO 6). As amostras foram preparadas a partir da solução estoque em acetonitrila e água (1:1 v/v).

QUADRO 6 PREPARO DAS AMOSTRAS PARA O ENSAIO DE LINEARIDADE

Nível	Nível (%)	Volume da Solução Intermediária (µL)	Volume de diluente ACN:H ₂ O (50:50 v/v) (µL)	Concentração (µg.mL ⁻¹)	Volume final (µL)
1	60	60	940	180	1000
2	80	80	920	240	1000
3	100	100	900	300	1000
4	120	120	880	360	1000
5	140	140	860	420	1000

A curva de calibração foi equacionada para se verificar a linearidade dentro do intervalo. A avaliação da associação linear entre as variáveis foi feita através dos coeficientes de correlação (r) e de determinação (r^2) e da avaliação da significância do coeficiente angular. Foi considerado como critério de aceitação um valor de r de no mínimo 0,99, coeficiente angular diferente de zero, e a homocedasticidade dos dados, utilizando um nível de significância de 5%.

A faixa de trabalho foi estabelecida a partir dos resultados do ensaio de linearidade, juntamente com os resultados de precisão e exatidão. Como mencionado, a faixa de trabalho estabelecida foi de 80 a 120% compreendendo as concentrações de 240, 300 e 360 µg.mL⁻¹ de BNZ.

4.4.3 Efeito matriz

O efeito matriz foi avaliado através da comparação entre os coeficientes angulares das curvas de calibração construídas com o IFA em solvente com os coeficientes angulares das curvas em solução feitas a partir dos comprimidos fortificados com o IFA. Para tal, foi determinada a linearidade para os mesmos níveis de concentração, empregando-se, no mínimo, cinco níveis de concentrações diferentes em triplicata.

Para a realização do ensaio, foram preparadas soluções nas mesmas concentrações utilizadas no ensaio da linearidade, conforme o (QUADRO 7).

QUADRO 7 - PREPARO DAS AMOSTRAS PARA O ENSAIO DE EFEITO MATRIZ

Nível	Nível (%)	Volume de Solução de amostra ¹ (µL)	Volume da Solução Intermediária ² (µL)	Volume de diluente ACN:H ₂ O (50:50 v/v) (µL)	Concentração (µg.mL ⁻¹)	Volume final (µL)
1	60	30	60	910	180	1000
2	80	30	80	890	240	1000
3	100	30	100	870	300	1000
4	120	30	120	850	360	1000
5	140	30	140	830	420	1000

NOTA: ¹ Concentração de 1 mg.mL⁻¹; ² Concentração de 3 mg.mL⁻¹

Como critério de aceitação, foi adotado o nível de significância de 5% no teste de hipótese nula. Para análise estatística, foi utilizado o *software* Excel com o suplemento ActionStat.

4.4.4 Precisão

A precisão do método foi determinada de duas formas: repetibilidade (precisão intra-corrída) e precisão intermediária (precisão intercorrída). Para a repetibilidade, foram realizadas seis análises para a concentração do ponto central (100%), por um mesmo analista, mesmo equipamento, em curto intervalo de tempo. A precisão intermediária foi determinada também por seis análises da mesma amostra na mesma concentração, executada por outro analista, no mesmo equipamento em um intervalo de dois dias.

As médias com os respectivos desvios padrões e os coeficientes de variação foram calculados para as amostras. O Teste t de Student foi utilizado para comparação das médias.

4.4.5 Exatidão

Para o ensaio de exatidão, nove soluções amostra foram diluídas para 30 µg.mL⁻¹. Em seguida, essas soluções foram fortificadas com soluções padrão visando a obter as concentrações de 80, 100 e 120% (respectivamente, 240, 300 e

360 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) em triplicata. O preparo dessas soluções é apresentado no (QUADRO 8).

As áreas recuperadas foram calculadas a partir da subtração das áreas obtidas para as amostras sem fortificação daquelas obtidas para as amostras fortificadas.

O resultado da exatidão foi expresso através da relação percentual de recuperação do BNZ comparado com a área teórica.

QUADRO 8 - PREPARO DE AMOSTRAS PARA O ENSAIO DE EXATIDÃO

Nível / %	Volume de Solução amostra ¹ (μL)	Volume da Solução Intermediária ² (μL)	Volume de diluente ACN:H ₂ O (50:50 v/v) (μL)	Concentração ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Volume final (μL)
1 / 80%	30	80	890	240	1000
2 / 100%	30	100	870	300	1000
3 / 120%	30	120	850	360	1000
- / 10%	30	-	970	30	1000

NOTA: ¹ - Concentração 1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$; ² - Concentração 3 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$

4.4.6 Limite de quantificação

O LQ foi estimado baseando-se nos parâmetros da curva de calibração, calculado pelo *software* Excel por análise de variância.

4.4.7 Robustez

A robustez foi avaliada em triplicata para o ponto central da curva analítica, correspondendo a 300 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de BNZ. Foram utilizadas as ferramentas estatísticas Teste F e Teste t de Student para avaliar o comportamento dos dados frente a pequenas alterações, descritas no (QUADRO 9).

QUADRO 9 - PARÂMETROS PARA O ENSAIO DE ROBUSTEZ

Parâmetro modificado	Varição 1	Nominal	Varição 2
Varição do pH da fase móvel	3,1	3,0	2,9
Varição na proporção da fase móvel	91:9	90:10	89:11
Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	41	40	39
Fluxo da fase móvel ($\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$)	0,9	1	1,1
Volume de injeção (μL)	19,9	20	20,1

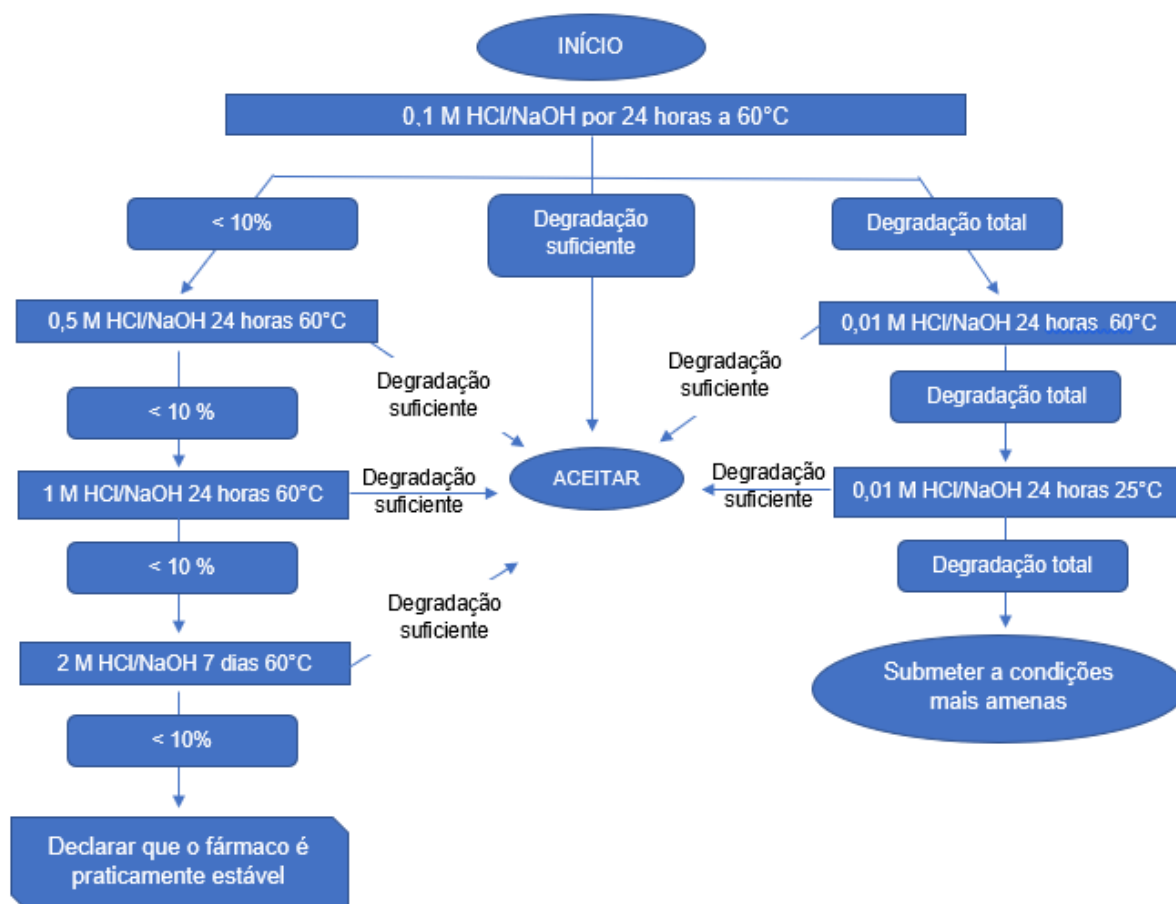
4.5 ENSAIO DE DEGRADAÇÃO FORÇADA

O estudo para obtenção dos produtos de degradação do BNZ foi realizado conforme o guia da Anvisa nº 04/2015 – “Guia para obtenção do perfil de degradação, identificação e qualificação de produtos de degradação em medicamentos”, de acordo com a Resolução da Diretoria Colegiada – RDC Nº 53, de dezembro de 2015 - Anvisa – que “Estabelece parâmetros para a notificação, identificação e qualificação de produtos de degradação em medicamentos com substâncias ativas sintéticas e semissintéticas, classificados como novos, genéricos e similares, e dá outras providências”; e de acordo com o guia internacional da *International Conference on Harmonisation (ICH) Q1A – “Stability Testing Guidelines: Stability Testing of New Drug Substances and Products”* (ICH, 1998; BRASIL, 2015a, 2015b).

4.5.1 Degradação por hidrólise

Para o estudo de degradação hidrolítica, foram utilizadas soluções de hidróxido de sódio para hidrólise em meio básico, soluções de ácido clorídrico para hidrólise em meio ácido e água ultra-pura para hidrólise neutra. As soluções contendo BNZ (1 mg.mL^{-1}) foram submetidas à temperatura de 60 °C em banho-maria, protegidas da luz, de acordo com o fluxograma mostrado na (FIGURA 9). O BNZ foi adicionado inicialmente às soluções de hidróxido de sódio 0,1 M, ácido clorídrico 0,1 M e água ultra-pura.

FIGURA 9 - FLUXOGRAMA DO ESTUDO DE DEGRADAÇÃO FORÇADA: HIDRÓLISES

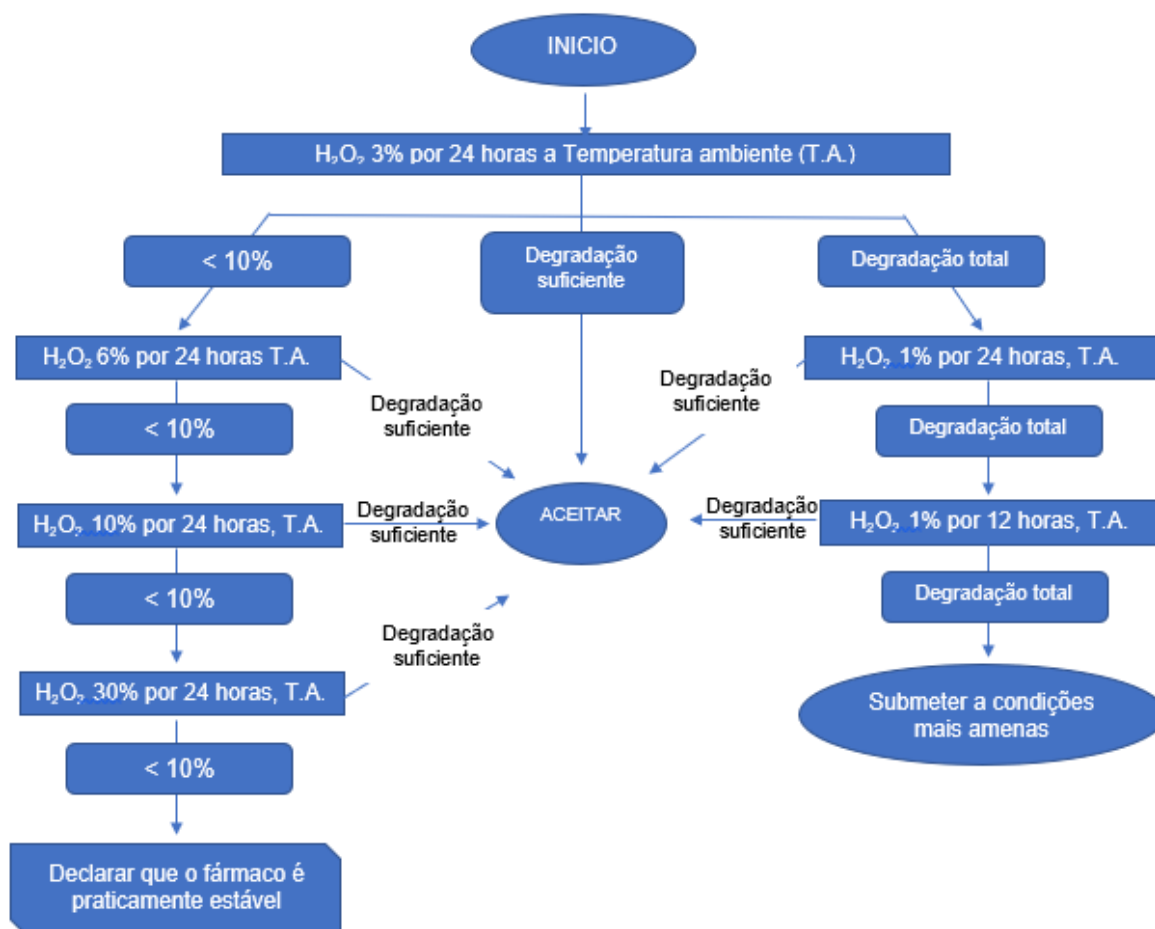


FONTE: Adaptado de SILVA et al. (2009)

4.5.2 Degradação por oxidação

Para a degradação oxidativa, inicialmente foi empregada solução de peróxido de hidrogênio a 3%, em temperatura ambiente e a 60 °C em banho-maria, protegidas da luz, conforme esquema mostrado na (FIGURA 10). O BNZ foi adicionado diretamente à solução de peróxido, tendo como concentração final 1 mg.mL⁻¹.

FIGURA 10 - FLUXOGRAMA DO ESTUDO DE DEGRADAÇÃO FORÇADA: OXIDAÇÃO

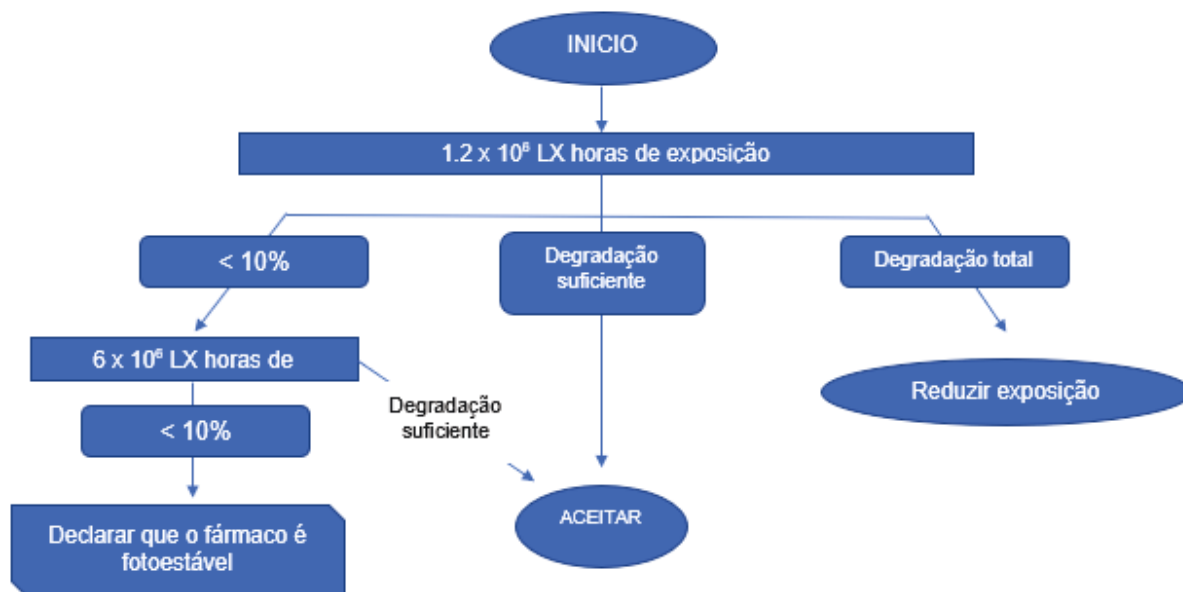


FONTE: Adaptado de SILVA et al. (2009).

4.5.3 Degradação por fotólise

A degradação fotolítica foi realizada com o auxílio de uma câmara contendo uma lâmpada fluorescente branca fria, padrão ISO 10977 (1993), e uma lâmpada fluorescente no ultravioleta próximo com espectro de 320 a 400 nm, conforme as diretrizes (ICH, 1996; BRASIL, 2015b). A metodologia está demonstrada no esquema da (FIGURA 11).

FIGURA 11 - FLUXOGRAMA DO ESTUDO DE DEGRADAÇÃO FORÇADA: FOTÓLISE



FONTE: Adaptado de SILVA et al. (2009).

4.6 IDENTIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO

Para orientação sobre quais produtos de degradação poderiam ser formados, foi utilizado o *software* Zeneth. Este *software* simula os possíveis produtos de degradação nas condições estabelecidas para a reação de degradação forçada.

Para a identificação dos produtos de degradação, foi utilizado o cromatógrafo a líquido de ultra eficiência acoplado ao espectrômetro de massas com analisador tipo quadrupolo-tempo de voo (Q-Tof) com fonte de ionização por *electrospray*. O nitrogênio de alta pureza foi utilizado como gás do cone e de solvatação, produzido por um gerador de nitrogênio da Peak Scientific Instruments (Chicago, EUA). Gás argônio com pureza >99,99% da White Martins Praxair Inc. (Curitiba, Brasil) foi utilizado como gás de colisão.

Os parâmetros espectrométricos da fonte de ionização foram otimizados para a análise de identificação estrutural com base no pico do BNZ, sendo estabelecido os seguintes parâmetros:

- Voltagem do capilar: 3.000 V;
- *Sampling cone*: 40.000V
- Temperatura da fonte: 150° C
- *Source offset*: 80 V

- Temperatura de dessolvatação: 350° C
- Gás do cone: 50 L.h⁻¹;
- Gás de dessolvatação: 400 L.h⁻¹
- Tempo de aquisição dos dados: 6,00 min.

Durante a análise, as massas adquiridas foram corrigidas por meio do *Lockspray*, constituído por leucina encefalina na concentração de 1000 ng.mL⁻¹ e com fluxo de 20 µL.min⁻¹. A checagem da calibração foi realizada diariamente, empregando como calibrante formiato de sódio 0,05 mmol.L⁻¹.

A faixa de leitura de massas foi definida de acordo com a *m/z* do IFA (261,0988 Da) em 50 a 500 Da. O modo de aquisição utilizado foi o *Resolution*, uma vez que o objetivo do método era a identificação de compostos. O método espectrométrico foi adquirido no modo MS^e. Neste modo, são aplicadas sequencialmente energias de colisão baixa e alta. Para energia baixa, foi utilizado 6V. Para energia alta, foi utilizada uma rampa variando de 20 a 40 V. Os resultados obtidos foram adquiridos no modo centroide e processados por meio do *software* MassLynx. V.4.1 da Waters Corporation (Milford, EUA). O modo de ionização positivo foi escolhido porque o analito apresenta grupos funcionais que facilmente aceitam próton (H⁺).

Para a cromatografia, foi realizada a transposição do método utilizado no CLAE-DAD para a LC-QToF-MS, ficando estabelecidos os seguintes parâmetros:

- UPLC® Acquity H-Class – Waters Co.
- Coluna: C₈ (100 x 2,1 mm, 1,7 µm), Acquity UPLC® BEH
- Fase móvel: (A) água com 0,1% ácido fórmico e (B) acetonitrila, eluída em modo gradiente, conforme segue:
 - Tempo 0 - 3,40min: 90 - 10% A;
 - Tempo 3,40 - 3,50min: 10 - 90% A;
 - Tempo 3,50 - 6,00min: 90%A;
- Fluxo: 500 µL.min
- Temperatura da coluna: 40° C
- Volume de injeção: 3 µL

4.7 CINÉTICA DA REAÇÃO QUÍMICA

Para a realização do estudo da cinética de degradação, foi selecionada a concentração de reagente que obteve os melhores resultados para cada método de degradação, através da monitorização do pico do IFA. Ou seja, a degradação não poderia ser tão intensa que fizesse desaparecer totalmente o IFA nem tão leve que deixasse fármaco intacto.

Para as reações de degradação, foram pesados exatamente cerca de 1 mg de BNZ, que foram transferidos para frascos com tampas que garantissem vedação total. As amostras foram solubilizadas em 1 mL de NaOH 0,1M para a degradação hidrolítica em meio básico, 1 mL de HCl 2M para a degradação hidrolítica em meio ácido, 1 mL de água ultra-pura para hidrólise em meio neutro, e 1 mL de H₂O₂ a 12% para reação de oxidação. Todas as soluções foram levadas a banho-maria à temperatura de 60 °C, protegidas da luz.

Os intervalos entre as análises cromatográficas após as reações de degradação foram estabelecidos de acordo com o comportamento da degradação. Nas (TABELAS 3, 4 e 5) são apresentados os intervalos para as condições básica, ácida e oxidante, respectivamente. Dessa forma, conforme a redução do pico do IFA, foi definido um intervalo maior ou menor de tempo para a condução das análises de cinética química.

TABELA 3 - INTERVALO DE TEMPO PARA CONDIÇÃO BÁSICA

	Tempo (horas)
T0	0
T1	12
T2	24
T3	48
T4	96
T5	120
T6	144

TABELA 4 - INTERVALO DE TEMPO PARA CONDIÇÃO ÁCIDA

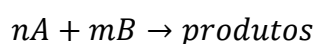
Tempo (horas)	
T0	0
T1	12
T2	24
T3	48
T4	96

TABELA 5 - INTERVALO DE TEMPO PARA CONDIÇÃO OXIDATIVA

Tempo (horas)	
T0	0
T1	12
T2	24
T3	48
T4	72
T5	96
T6	120

Para a determinação da cinética de reação, foi considerada a cinética de degradação do fármaco (A) com um reagente (B), formando produtos, com o objetivo de estabelecer a ordem da cinética da reação. Os reagentes, que atuaram como catalisadores, foram mantidos em excesso e constantes durante toda a reação.

Um sistema de funcionamento de forma de batelada, onde ocorre uma reação irreversível e sob condições à temperatura constante, foi utilizado.



Para obter o valor da ordem da reação, a metodologia de integração da equação diferencial que representa a cinética foi utilizada.

O modelo para um reator batelada em que um componente A está sendo formado com volume constante é da forma:

$$\frac{dC_A}{dt} = r_A \tag{01}$$

Neste caso, A está sendo consumido, sendo assim $(-r_A) = k_d C_A^n C_B^m$ e k_d é a constante de velocidade de reação, $p = n + m$ é a ordem global de reação e r_A é a velocidade de reação de decomposição do fármaco em $Mol.L^{-1}h^{-1}$.

Substituindo $-r_A$ na equação (01), tem-se

$$\frac{dC_A}{dt} = -[kC_B^m]C_A^n \quad (02)$$

Como o reagente B está em excesso e praticamente em concentração constante no sistema, a equação (02) pode ser reescrita resultando na equação (03).

$$\frac{dC_A}{dt} = -k_d C_A^n \quad (03)$$

Tem-se desta forma que $k_d = kC_B^m$

Com o modelo acima, a ordem da reação (p) será praticamente igual a (n), ou seja, a pseudo ordem da reação.

Primeiramente, será empregado o método integral, por ser simples e preciso, onde serão testadas as ordens de reação e, através da linearização das equações, os parâmetros serão determinados pelo método dos mínimos quadrados.

4.4.1 Cinética de ordem zero

Integrando a equação (03) para $n=0$, pode-se obter a equação algébrica (04), onde C_{A0} é a concentração inicial do fármaco e t é o tempo da reação desde o tempo inicial considerando $t=0$. Neste caso, o valor do parâmetro estimado k_d tem unidade de velocidade de reação $\mu Mol.L^{-1}h^{-1}$.

$$C_A = C_{A0} - k_d t \quad (04)$$

4.4.2 Cinética de primeira ordem

Integrando a equação (03) para $n=1$, pode-se obter a equação algébrica (05), onde C_{A0} é a concentração inicial do fármaco e t é o tempo da reação desde o tempo inicial considerando $t=0$. Para a cinética de primeira ordem k_d assume unidade de h^{-1} .

$$\ln\left(\frac{C_{A0}}{C_A}\right) = k_d t \quad (05)$$

4.4.3 Cinética de segunda ordem

Integrando a equação (03) para $n=2$, pode-se obter a equação algébrica (06), onde C_{A0} é a concentração inicial do fármaco e t é o tempo da reação desde o tempo inicial considerando $t=0$. Para a cinética de segunda ordem k_d assume unidade de $(\mu\text{Mol.L})^{-1}\text{h}^{-1}$.

$$\frac{1}{c_A} = \frac{1}{c_{A0}} + k_d t \quad (06)$$

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO INDICATIVO DE ESTABILIDADE

5.1.1 Desenvolvimento e otimização dos parâmetros cromatográficos

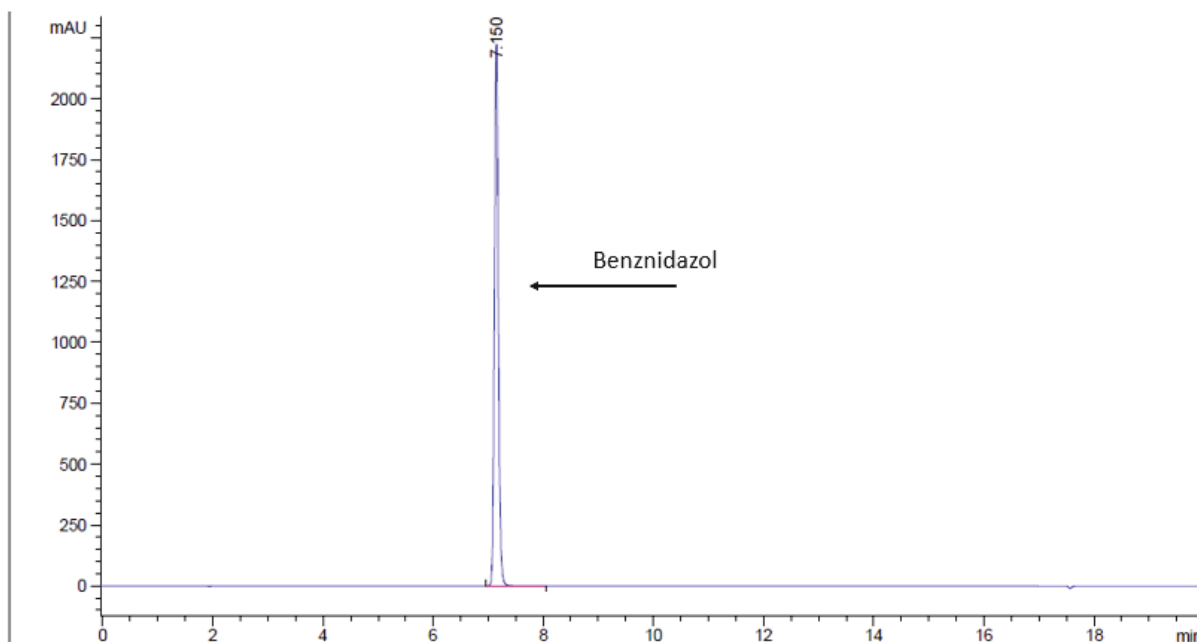
Dentre todas as colunas testadas, foi feita a escolha pela coluna XBridge™ C₈ (150 x 4,6 mm, 5µm) que apresentou melhor desempenho, de acordo com o perfil de separação, tempo de retenção, tempo de análise, ausência de saturação do pico cromatográfico do IFA e alta resolução cromatográfica. Para a detecção foi escolhido o comprimento de onda de 320 nm, após realizada uma varredura espectrofotométrica. Foram feitas análises utilizando diferentes composições e proporções de fase móvel (água, acetonitrila, metanol e formiato de amônio), tanto no modo isocrático e gradiente, optando-se pelo modo gradiente de eluição, por apresentar melhor separação cromatográfica.

Considerando todas as condições testadas para o fármaco em questão e seus produtos de degradação, foram definidos os seguintes parâmetros para a condução do método cromatográfico:

- Coluna: XBridge™ C₈ (150 x 4,6 mm, 5 µm), *Waters Corporation*;
- Fase móvel: (A) tampão formiato de amônio 20 mM pH 3,0 e (B) acetonitrila, eluída em modo gradiente, conforme segue:
 - Tempo 0 -15min: 90 - 10% A;
 - Tempo 15 - 15,10min: 10 - 90% A;
 - Tempo 15,10 - 20min: 90% A;
- Fluxo da fase móvel: 1000 µL.min⁻¹;
- Temperatura de forno: 40 °C;
- Volume de injeção: 20 µL;
- Comprimento de onda: 320 nm.

O cromatograma obtido para o analito após as condições otimizadas pode ser observado na (FIGURA 12).

FIGURA 12 - CROMATOGRAMA APÓS OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO CROMATOGRÁFICO



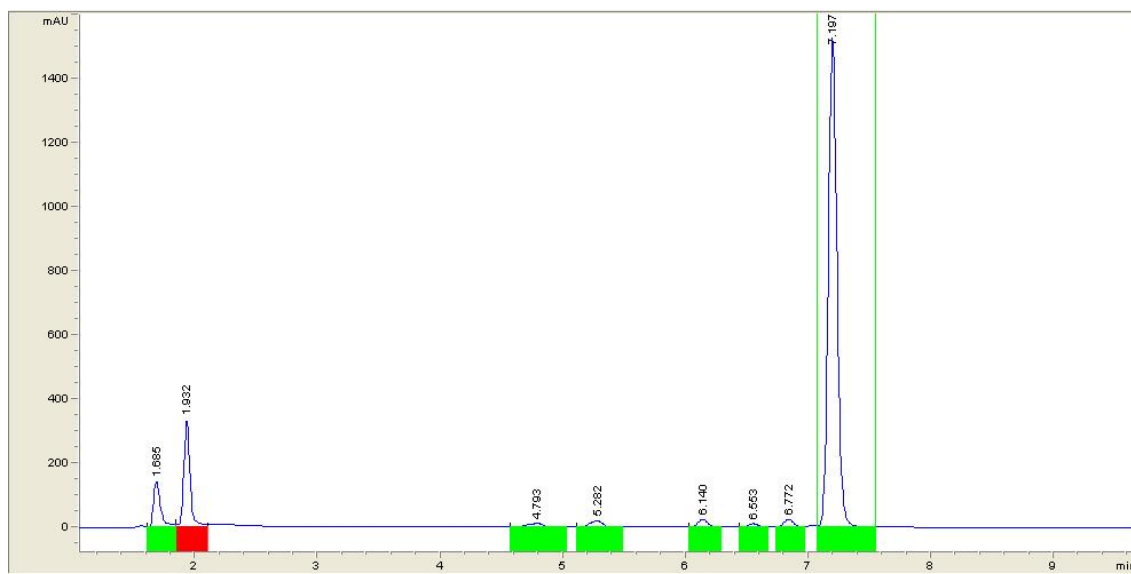
NOTA: Coluna XBridge™ C₈ (150 x 4,6 mm, 5 μm); fase móvel: (A) tampão formiato de amônio 20 mM pH 3,0 e (B) acetonitrila, modo de eluição gradiente; tempo 0 – 15min: 90 – 10% A, 15 – 15,10min: 10 – 90 % A, 15,10 – 20min: 90 %A; fluxo: 1000 μL.mL⁻¹; temperatura de forno: 40 °C; volume de injeção: 20 μL; comprimento de onda: 320 nm.

5.2 VALIDAÇÃO DO MÉTODO INDICATIVO DE ESTABILIDADE

5.2.1 Seletividade

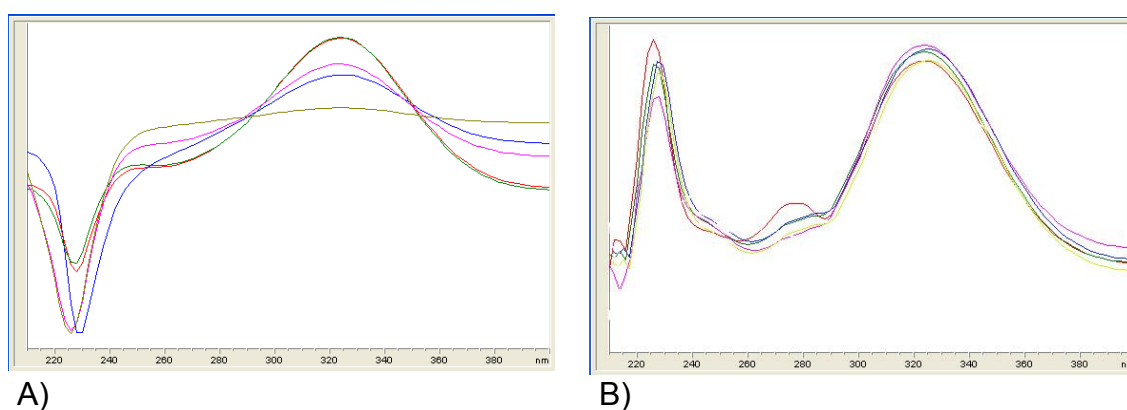
A seletividade foi estabelecida através da pureza dos picos individuais do BNZ e dos produtos de degradação, obtidos pelo teste de degradação forçada conforme as condições citadas anteriormente. Para a determinação da pureza, um detector de arranjo diodos (DAD) com intervalo de 200 a 400 nm foi utilizado. Conforme o *software* ChemStation® versão A.10.02, a pureza dos picos foi acima de 99,0%, estabelecidos com compensação da linha de base e com cálculo do espectro de pureza total. O cromatograma referente à pureza dos picos é apresentado na (FIGURA 13).

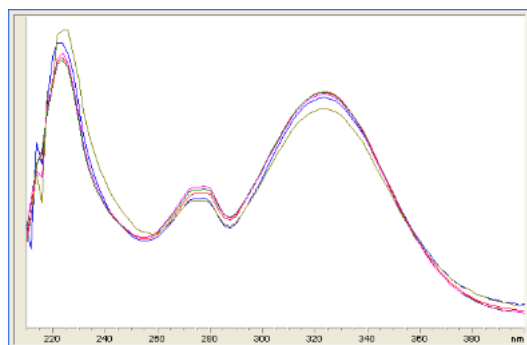
FIGURA 13 - CROMATOGRAFIA REPRESENTANDO A PUREZA DOS PICOS PARA O ENSAIO DE SELETIVIDADE



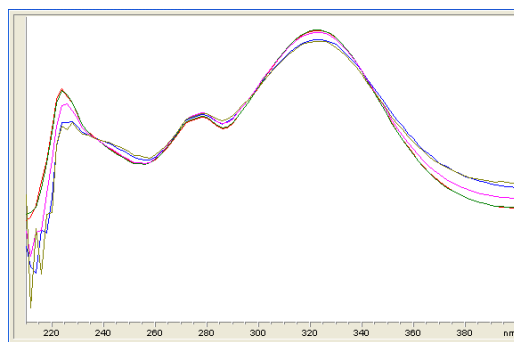
Na (FIGURA 14) são apresentados os espectros UV evidenciando a pureza dos picos cromatográficos. Para avaliação da pureza do pico do BNZ, foi realizada a comparação do IFA em solução (FIGURA 14-H) com o *pool* de degradação (FIGURA 14-G). A análise realizada pelo *software* ChemStation resultou em 99,8% de igualdade entre os espectros, confirmando que no tempo de retenção referente ao BNZ não há coeluição de interferentes (FIGURA 15).

FIGURA 14 - ESPECTROS UV EVIDENCIANDO A PUREZA DOS PICOS CROMATOGRÁFICOS

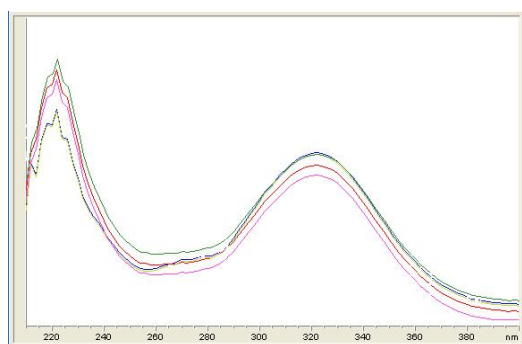




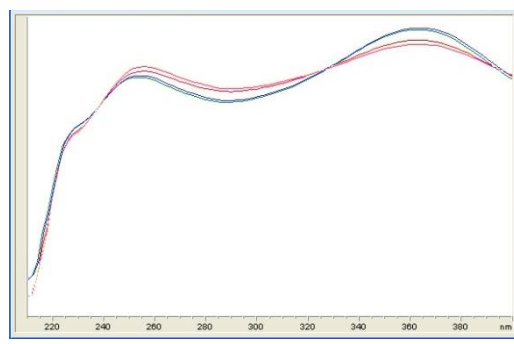
C)



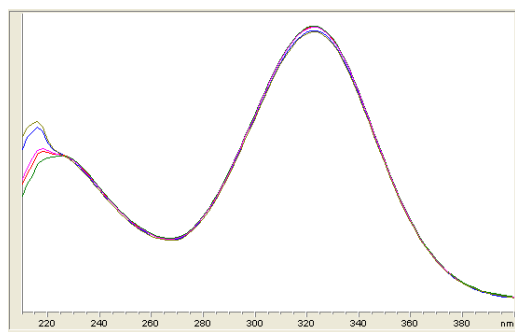
D)



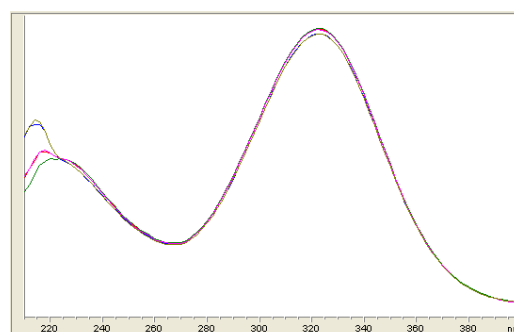
E)



F)



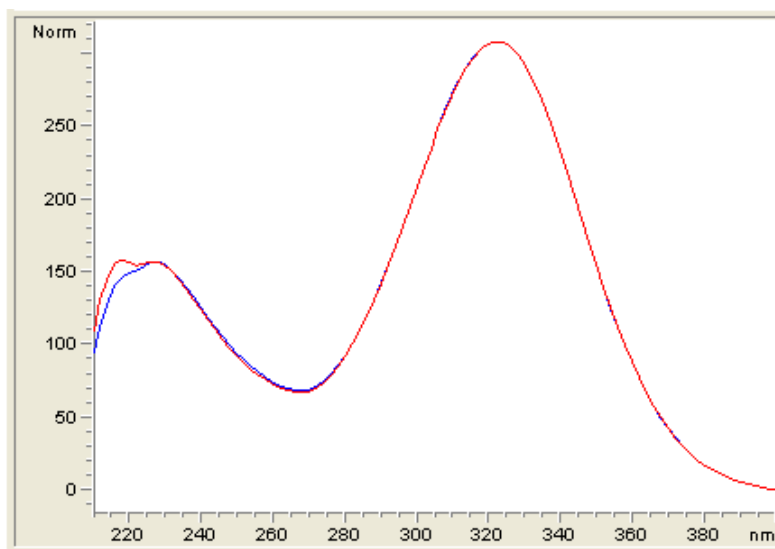
G)



H)

NOTA: Espectro de UV dos tempos de retenção A) 1,92min; B) 4,79min; C) 5,28min; D) 6,14min; E) 6,55min; F) 6,77min; G) 7,19min; H) Espectro UV do BNZ antes da degradação

FIGURA 15 - COMPARAÇÃO DOS ESPECTROS DE UV DO BNZ ANTES DA DEGRADAÇÃO E APÓS DEGRADAÇÃO



NOTA: Linha vermelha – BNZ antes de degradação; linha azul – BNZ após degradação

5.2.2 Linearidade e faixa de trabalho

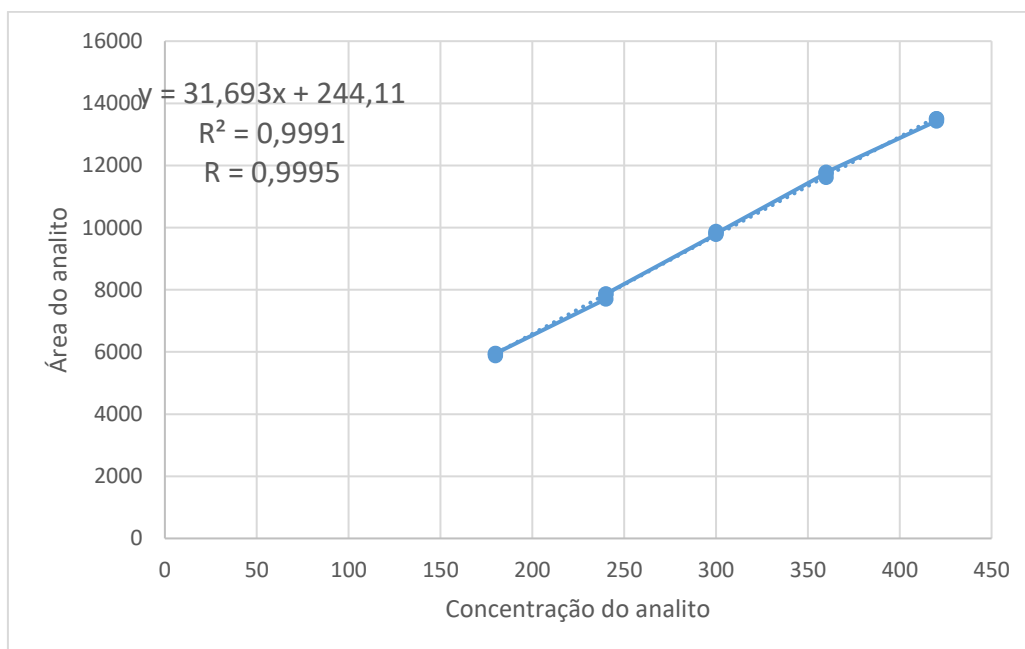
A linearidade foi determinada em cinco níveis de concentração, contemplando as faixas de 180 a 420 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para o BNZ, em triplicata, conforme a (TABELA 6). As curvas de calibração foram estabelecidas pelo *software* Excel. Os dados obtidos foram submetidos à análise de regressão linear, a partir da qual obteve-se a equação da reta e coeficiente de determinação (FIGURA 16). Com os resultados das áreas do pico cromatográfico, foi determinado o coeficiente de correlação (r) acima de 0,99, estando este de acordo com as resoluções.

TABELA 6 - RESULTADOS DO ENSAIO DE LINEARIDADE

%	Conc. (mg/mL)	Conc. Real	Conc. Teórica	Área	DPR	Variâncias
60	180	182,30745	180	5947,1645	0,6639	1548,7405
		180,25978	180	5881,5732		
		182,45984	180	5952,0459		
80	240	237,26317	240	7707,5214	1,1257	7726,4748
		241,94472	240	7849,6757		
		242,27847	240	7868,1728		
100	300	302,24563	300	9789,0576	0,4742	2172,3020
		305,05283	300	9878,9785		
		302,98509	300	9812,7441		
120	360	363,60562	360	11754,6	0,7502	7728,6700
		359,33207	360	11617,7		
		364,45197	360	11781,7		
140	420	417,50123	420	13432,5	0,3062	1703,8033
		418,17259	420	13502,5		
		418,26433	420	13505,4		

NOTA: Conc – Concentração; DPR – Desvio Padrão Relativo

FIGURA 16 - GRÁFICO DA LINEARIDADE DO BNZ



Além disso, a igualdade de variância e a homocedasticidade da curva foram estabelecidas pelo teste C de Cochran, com homocedasticidade como hipótese nula. O valor de C para a curva foi de 0,370, sendo inferior ao valor crítico de 0,684 (cinco

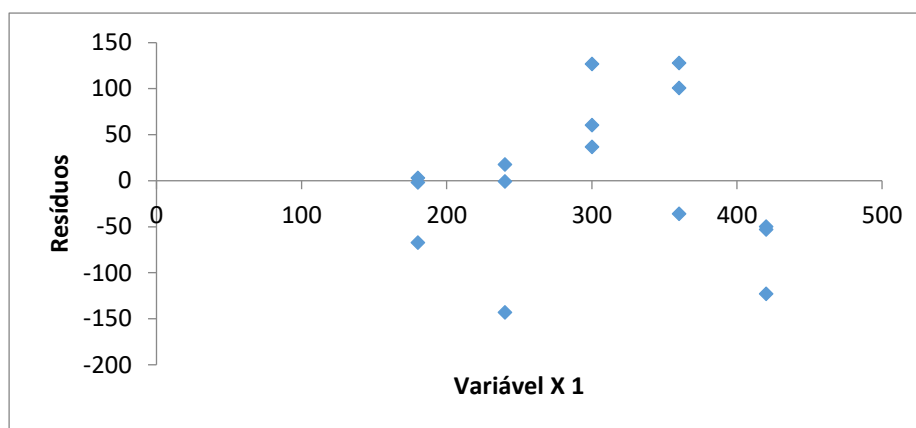
pontos da curva e três repetições para a variável y), estabelecendo que a hipótese nula é aceitável, ou seja, as variações são homocedásticas. A significância estatística dos coeficientes de inclinação das linhas foi determinada por análise de variância (ANOVA) e teste F (valor F crítico, com uma taxa de 5% de nível de significância), representados pela (TABELA 7). O valor de F (14897,919) foi maior que o valor crítico de 4,667, significando que o modelo proposto é adequado para descrever o fenômeno. Por análise visual dos gráficos de resíduos, pode-se observar que houve comportamento aleatório de distribuição, não apresentando nenhuma tendência (FIGURA 17).

TABELA 7 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA ENTRE ÁREAS E CONCENTRAÇÃO DE BNZ

ANOVA					
	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significação</i>
Regressão	1	108481953,9	108481953,9	14897,91971	2,81606E-21
Resíduo	13	94661,901	7281,684692		
Total	14	108576615,8			

NOTA: *gl* – graus de liberdade; *SQ* – soma de quadrados; *QM* – teste de variância

FIGURA 17 - GRÁFICO DE RESÍDUOS



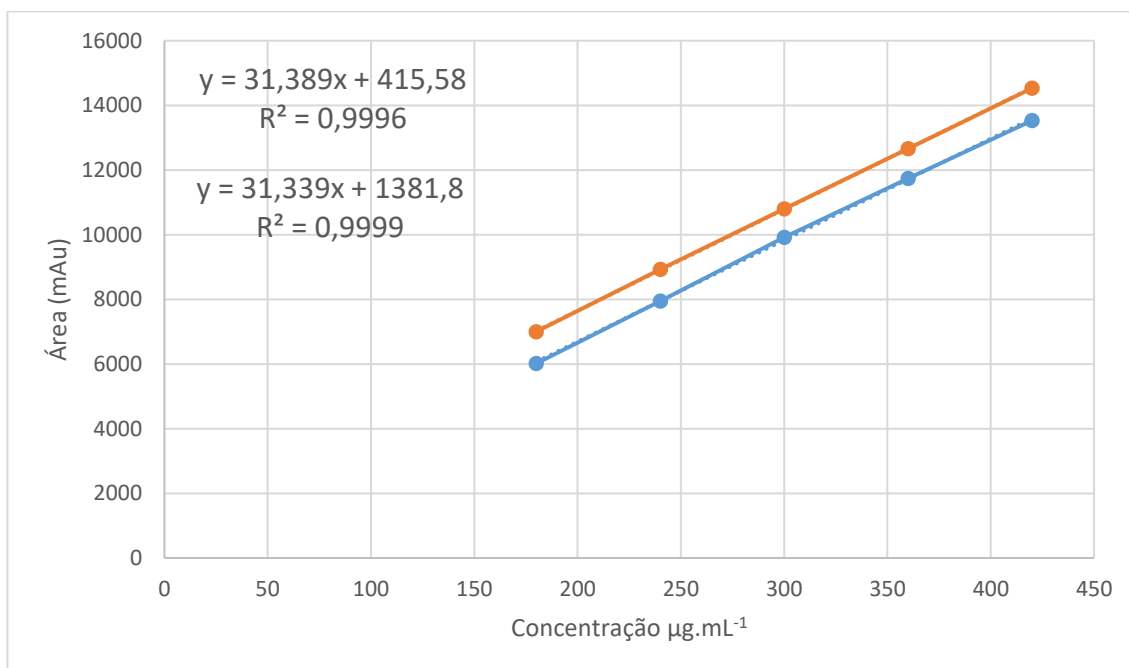
5.2.3 Efeito Matriz

Os resultados das áreas dos picos cromatográficos obtidos para análise de efeito matriz estão dispostos na (TABELA 8). As retas observadas na (FIGURA 18) foram traçadas. Comparando-se essas retas, é possível observar uma relação de paralelismo, indicando a ausência de interferência dos constituintes da matriz. O gráfico de dispersão mostra também as equações das retas e coeficientes de determinação (r^2).

TABELA 8 - ÁREAS DOS PICOS CROMATOGRÁFICOS DO BNZ OBTIDAS A PARTIR DAS ANÁLISES DO PADRÃO E AMOSTRA COM ADIÇÃO DE PADRÃO

Analito em solvente				
Concentração $\mu\text{g.mL}^{-1}$	Área 1	Área 2	Área 3	Média
180	5990,487	6010,062	6048,254	6016,267
240	7921,48	7935,457	7975,966	7944,301
300	9903,897	9850,202	10014	9922,7
360	11823,7	11701,9	11710,7	11745,43
420	13543,3	13502,7	13551	13532,33
Amostras fortificadas com padrão				
Concentração $\mu\text{g.mL}^{-1}$	Área 1	Área 2	Área 3	Média
180	7018,252	6969,392	7015,719	7001,121
240	8965,993	8893,372	8911,907	8923,757
300	10860,9	10709,3	10819	10796,4
360	12822,6	12813,9	12350,2	12662,23
420	14661,6	14488	14451	14533,53

FIGURA 18 - COMPARAÇÃO DAS CURVAS



NOTA: linha azul – sem matriz; linha laranja – com matriz

As análises de variação estatística ANOVA, os coeficientes e o teste de comparação também foram realizados para verificar a presença de efeito matriz. Os resultados podem ser visualizados nas (TABELAS 9, 10 e 11), respectivamente.

TABELA 9 - RESULTADO DO TESTE ANOVA PARA EFEITO MATRIZ

Fatores	G.L.	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	Estat. F	P-valor
Concentração	1	212476645	212476645	20671,60119	<0,001
Efeito Matriz	1	6785889,403	6785889,403	660,1911445	<0,001
Concentraçao:Efeito_Matriz	1	134,6723291	134,6723291	0,013102111	0,909748999
Resíduos	26	267245,5181	10278,67377		

NOTA: G.L. – graus de liberdade

TABELA 10 - COEFICIENTES OBTIDOS PARA A ANÁLISE DE EFEITO MATRIZ

Coeficientes				
Preditor	Estimativa	Desvio Padrão	Estat.t	P-valor
Intercepto	1381,758886	96,18111247	14,36621859	<0,001
Concentração	31,33883388	0,308501062	101,5842009	<0,001
Efeito Matriz SC	-966,1837897	136,0206337	-7,103214882	<0,001
Concentraçao:Efeito_MatrizSC	0,049939283	0,436286386	0,114464455	0,909748999

TABELA 11 - RESULTADO DO TESTE DE COMPARAÇÃO PARA O ENSAIO DE EFEITO MATRIZ

Teste de Comparação				
	G.L.	Soma de Quadrados	Estat. F	P-valor
Paralelismo	1	134,6723291	0,013102111	0,909748999

NOTA: G.L. - graus de liberdade

Portanto, é possível observar que todos os testes de comparação de curvas possuem p-valor maior que 0,05, não apresentando diferença significativa entre as curvas, com e sem matriz, ao nível de significância de 5%, sendo assim, o efeito matriz não é significativo.

5.2.4 Precisão

A repetibilidade e a precisão intermediária estão representadas nas (TABELAS 12 e 13), respectivamente. Como pode ser observado nas tabelas, foram obtidas variações menores que 5% para o BNZ. Além disso, o valor-p foi superior a 0,05 para todas as análises de repetibilidade e precisão intermediária, significando que as médias não são estatisticamente diferentes.

TABELA 12 - RESULTADOS DO ENSAIO DE REPETIBILIDADE

Analitos	Conc. (µg/mL)	Período 1	Período 2	Média ± DP	DPR	Valor-p
BNZ	300	313,3600	310,2121	311,5459 ± 1,7665	0,5670	0,3230
		310,1885	313,1025			
		309,9825	311,2498			
		308,3916	313,6958			
		311,2723	313,7279			
		312,9117	306,4568			

NOTA: Conc. – Concentração; DP – Desvio Padrão; DPR - Desvio Padrão Relativo

TABELA 13 - RESULTADOS DO ENSAIO DE PRECISÃO INTERMEDIÁRIA

Analitos	Conc. (µg/mL)	Período 1	Período 2	Média ± DP	DPR	Valor-p
BNZ	300	305,2121	303,3997	304,5811 ± 1,1785	0,3869	0,9847
		304,1025	303,4743			
		306,2498	304,5530			
		302,6958	305,7110			
		303,7279	306,2356			
		305,4568	304,6551			

NOTA: Conc. – Concentração; DP – Desvio Padrão; DPR - Desvio Padrão Relativo

5.2.5 Exatidão

As recuperações dos analitos foram realizadas por meio da razão entre a concentração média experimental e a concentração teórica do ensaio, obtidas através de três níveis de concentração (80, 100 e 120%).

Na (TABELA 14) é possível observar que foram obtidos valores satisfatórios de exatidão (>99,2%) para o fármaco. Sendo assim, o método foi considerado exato.

TABELA 14 - RESULTADOS DO ENSAIO DE RECUPERAÇÃO OBTIDOS PELO MÉTODO DE ADIÇÃO DE PADRÃO

Analito	Conc. ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Área teórica (médias \pm DP)	Intervalo de confiança*	Amostra (Área \pm DP)	Amostra fortificada (Área \pm DP)	Área recuperada (média)	Recuperação (%) \pm DP
BNZ	240	8247,33 \pm 125,29	7936,10 – 8558,56		9236,07 \pm 74,67	8228,53	99,8 \pm 2,5
	300	10099,20 \pm 24,74	10037,75 – 10160,65	1007,53 \pm 1,82	11121,07 \pm 40,17	10113,53	100,1 \pm 0,6
	360	11754,57 \pm 136,84	11414,64 – 12094,49		12669,37 \pm 50,54	11661,83	99,2 \pm 0,8

NOTA: Conc. – Concentração; DP - Desvio Padrão

5.2.6 Limite de quantificação

Através da obtenção da curva de calibração, o limite de quantificação foi calculado a partir do desvio padrão residual da linha de regressão, complementado pela análise de variância. Os resultados estão demonstrados nas (TABELAS 15, 16 e 17).

TABELA 15 - ESTATÍSTICA DE REGRESSÃO

R múltiplo	0,999563983
R-Quadrado	0,999128156
R-quadrado ajustado	0,999061091
Erro padrão	85,33278791
Observações	15

TABELA 16 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) NO ENSAIO DE LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO

	gl	SQ	MQ	F	F de significação
Regressão	1	108481953,9	1,08E+08	14897,92	2,81606E-21
Resíduo	13	94661,901	7281,685		
Total	14	108576615,8			

NOTA: gl – graus de liberdade; SQ – soma dos quadrados; QM – quadrado médio; F – teste de variância

TABELA 17 - COEFICIENTES DE INSERÇÃO E COEFICIENTE ANGULAR

	Coeficientes	Erro padrão	valor-p	Inferior 95,0%	Superior 95,0%
Interseção	244,1118537	80,9537	0,009939	69,22182169	419,0018856
Coeficiente Angular	31,69325695	0,2596	2,82E-21	31,13229691	32,25421699

Para isto, foram utilizados os valores do erro padrão da estatística de regressão equivalente ao desvio padrão dos resíduos e coeficiente angular (inclinação da curva).

$$LQ = \frac{10 \times 85,3327}{31,6932} = 26,9246$$

$$LQ = 26,9246 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$$

5.2.7 Robustez

O ensaio de robustez do método mostrou valores de $p > 0,05$ para todos os parâmetros modificados, demonstrando, assim, que os resultados não foram

considerados estatisticamente diferentes, ou seja, estas pequenas modificações não provocaram alteração na exatidão dos resultados. Os resultados obtidos para este parâmetro estão descritos na (TABELA 18).

TABELA 18 - RESULTADOS DO ENSAIO DE ROBUSTEZ

Parâmetros modificados	Condições	Área Média	Área DP	Teste t de Student
				(valor de p*)
Temperatura (°C)	39	9698,9300	28,8870	0,77
	40	9703,9205	47,3875	1,00
	41	9696,4850	36,2289	0,56
Volume de injeção (µL)	19,9	9646,1660	31,8818	0,13
	20	9703,9206	47,3875	1,00
	20,1	9742,5075	37,2008	0,11
pH FM	2,9	9682,5224	47,6469	0,56
	3,0	9703,9206	47,3875	1,00
	3,1	9687,8346	44,1287	0,67
Fluxo (mL.min ⁻¹)	0,9	9691,3538	30,3246	0,56
	1,0	9703,9206	47,3875	1,00
	1,1	9695,6217	34,5705	0,65
Proporção de FM (%)	89:11	9693,9589	36,8762	0,64
	90:10	9703,9206	47,3875	1,00
	91:9	9689,9544	28,8241	0,55

NOTA: * - Nível de confiança de 95%; FM – Fase móvel; DP – Desvio padrão

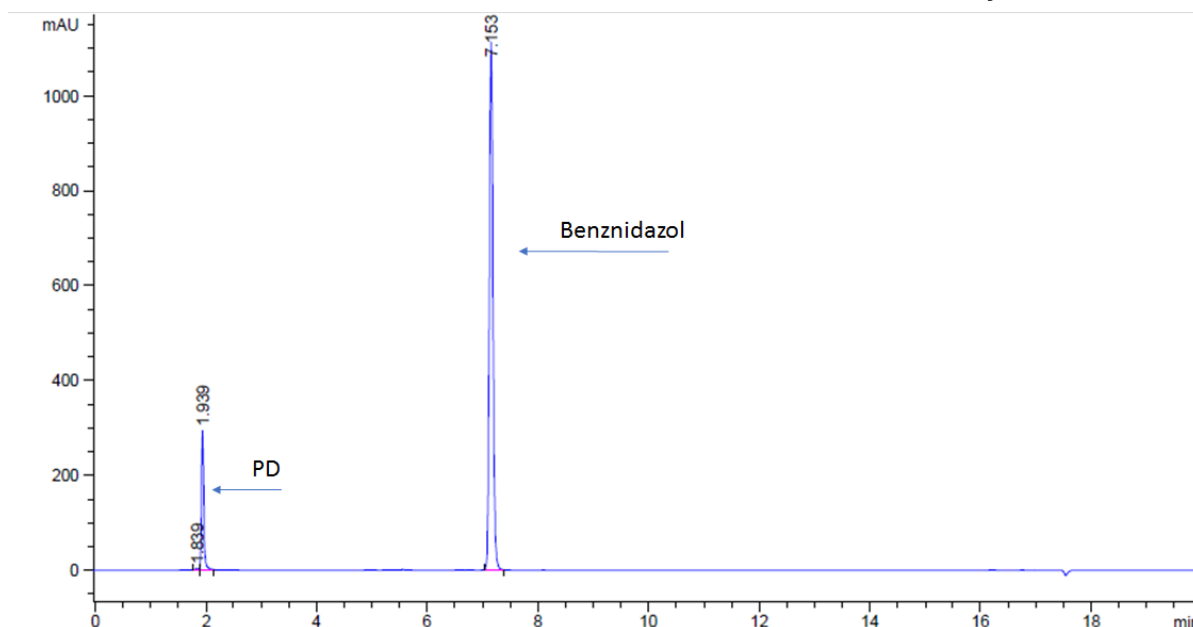
5.3 ENSAIO DE DEGRADAÇÃO FORÇADA E IDENTIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO

5.3.1 Hidrólise básica

Para a realização da hidrólise básica, o BNZ foi submetido à reação de degradação por NaOH 0,1 M, por um período de 12 horas. Em seguida, a amostra foi

analisada através do método cromatográfico desenvolvido e validado neste trabalho. Como pode ser observado no cromatograma representado pela (FIGURA 19), há formação de um produto de degradação no tempo de retenção de 1,93 min.

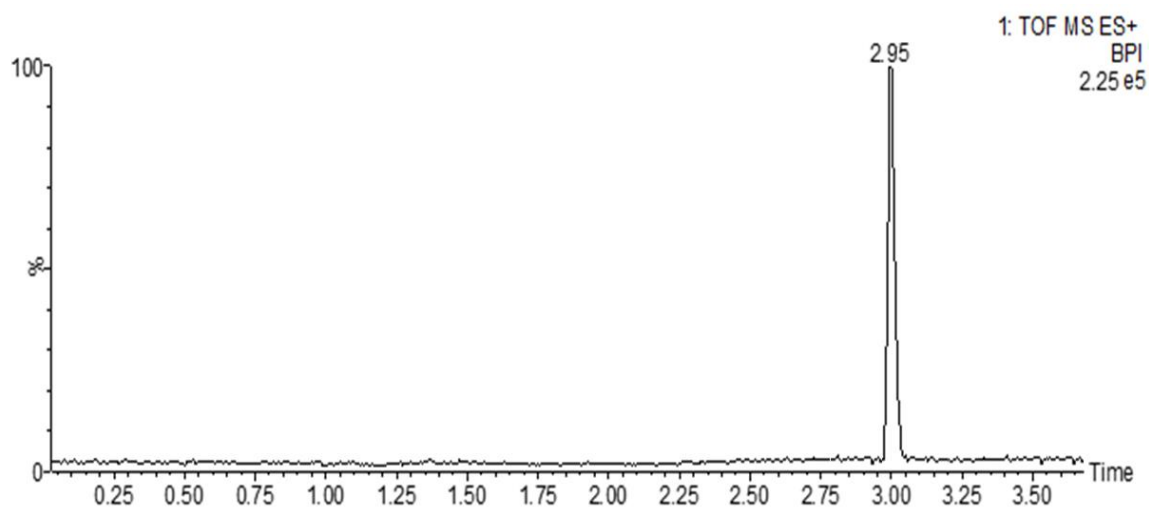
FIGURA 19 - CROMATOGRAFIA OBTIDA APÓS O BNZ EXPOSTO À CONDIÇÃO ALCALINA



NOTA: Coluna XBridge™ C₈ (150 x 4,6 mm, 5 μm); fase móvel: (A) tampão formiato de amônio 20 mM pH 3,0 e (B) acetonitrila, modo de eluição gradiente; tempo 0 – 15min: 90 – 10% A, 15 – 15,10min: 10 – 90 % A, 15,10 – 20min: 90 %A; fluxo: 1000 μL.mL⁻¹; temperatura de forno: 40 °C; volume de injeção: 20 μL; comprimento de onda: 320 nm.

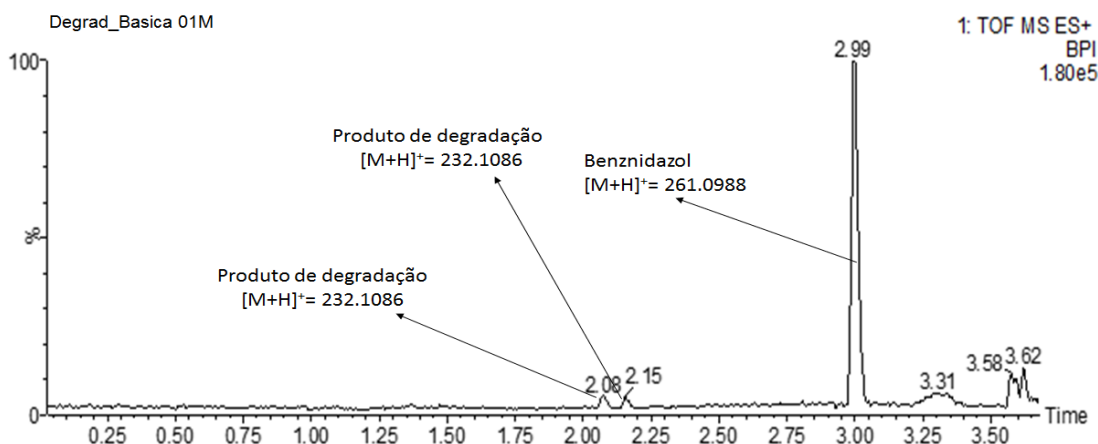
Em seguida, a amostra foi analisada por LC-QToF-MS para a identificação deste e de outros possíveis produtos de degradação. Podemos observar na (FIGURA 20) o cromatograma obtido do padrão do BNZ. O cromatograma obtido representado na (FIGURA 21), onde é possível observar o aparecimento de picos cromatográficos nos tempos 2,08; 2,15; e 2,99 min. O aparecimento de dois produtos de degradação (2,08 e 2,15 min) no CLUE é justificado por esta técnica apresentar maior resolução cromatográfica. Por meio da espectrometria de massas, foram identificadas as massas moleculares: m/z 232,1080 [M+H]⁺; 232,1080 [M+H]⁺, referentes aos produtos de degradação, que, possivelmente, são isômeros, pois apresentam a mesma massa molecular, e 261,0988 [M+H]⁺, referente ao BNZ, nos tempos de retenção de 2,08 (FIGURA 22); 2,15 e 2,99 min na (FIGURA 23).

FIGURA 20 – CROMATOGRAMA DO BNZ OBTIDO POR LC-QToF-MS



NOTA: Coluna C₈ (100 x 2,1 mm, 1,7 µL) Acquity UPLC® BEH; fase móvel: (A) água (0,1% ácido fórmico) e (B) acetonitrila, eluída em modo gradiente, 0 – 3,40min: 90 – 10% A; 3,40 – 3,50min: 10 – 90% A; 3,50 – 6,00min 90% A; fluxo de 500 µL.min⁻¹; temperatura da coluna 40 °C e volume de injeção 3 µL.

FIGURA 21 - CROMATOGRAMA DA REAÇÃO DE DEGRADAÇÃO EM MEIO ALCALINO OBTIDO POR LC-QToF-MS



NOTA: Coluna C₈ (100 x 2,1 mm, 1,7 µL) Acquity UPLC® BEH; fase móvel: (A) água (0,1% ácido fórmico) e (B) acetonitrila, eluída em modo gradiente, 0 – 3,40min: 90 – 10% A; 3,40 – 3,50min: 10 – 90% A; 3,50 – 6,00min 90% A; fluxo de 500 µL.min⁻¹; temperatura da coluna 40 °C e volume de injeção 3 µL.

FIGURA 22 - ESPECTRO DE MASSAS REFERENTE AO PICO CROMATOGRÁFICO DE 2,99 MIN

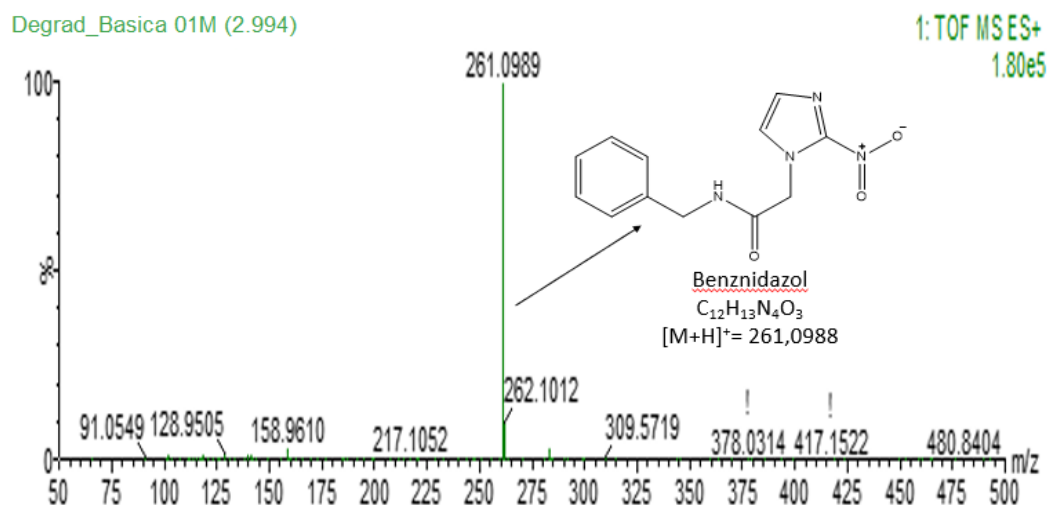
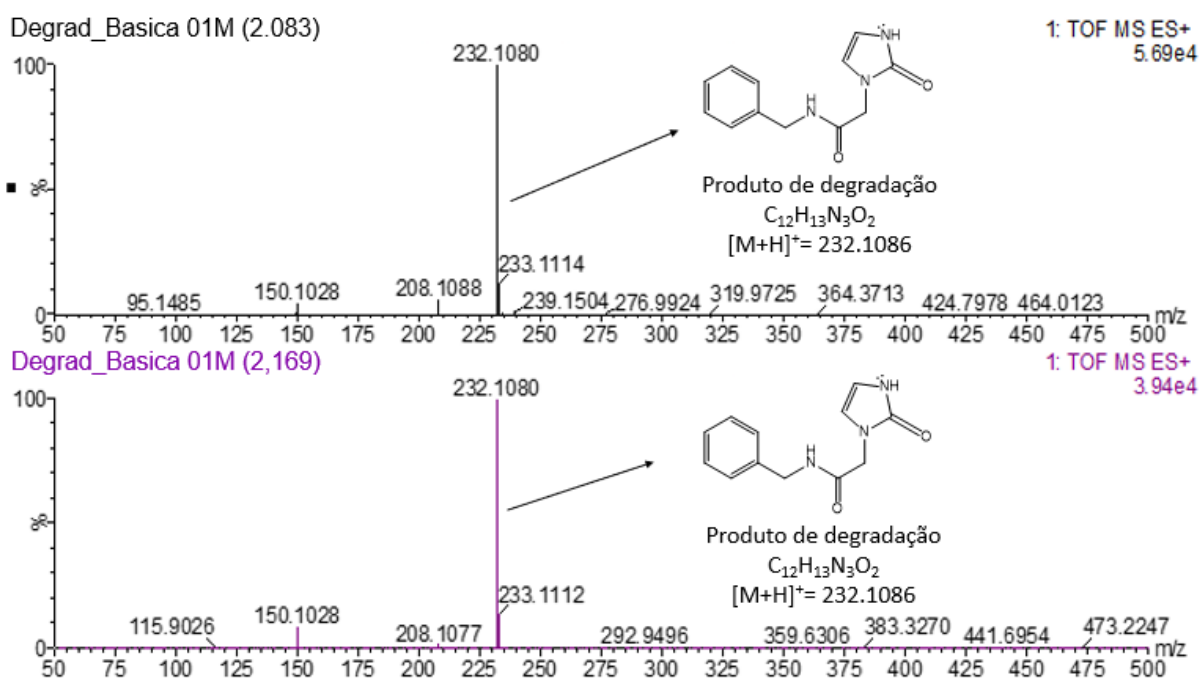
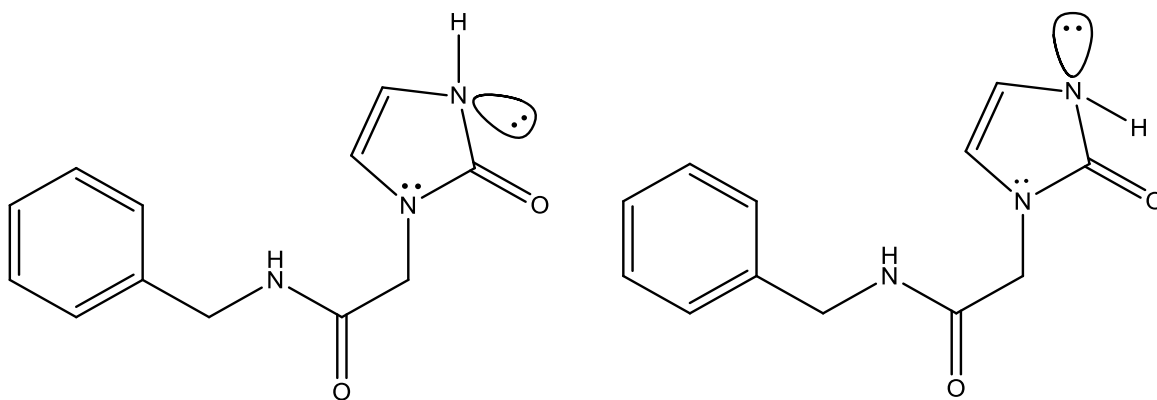


FIGURA 23 - ESPECTRO DE MASSAS REFERENTE AO PICO CROMATOGRÁFICO DE 2,08 E 2,15 MIN



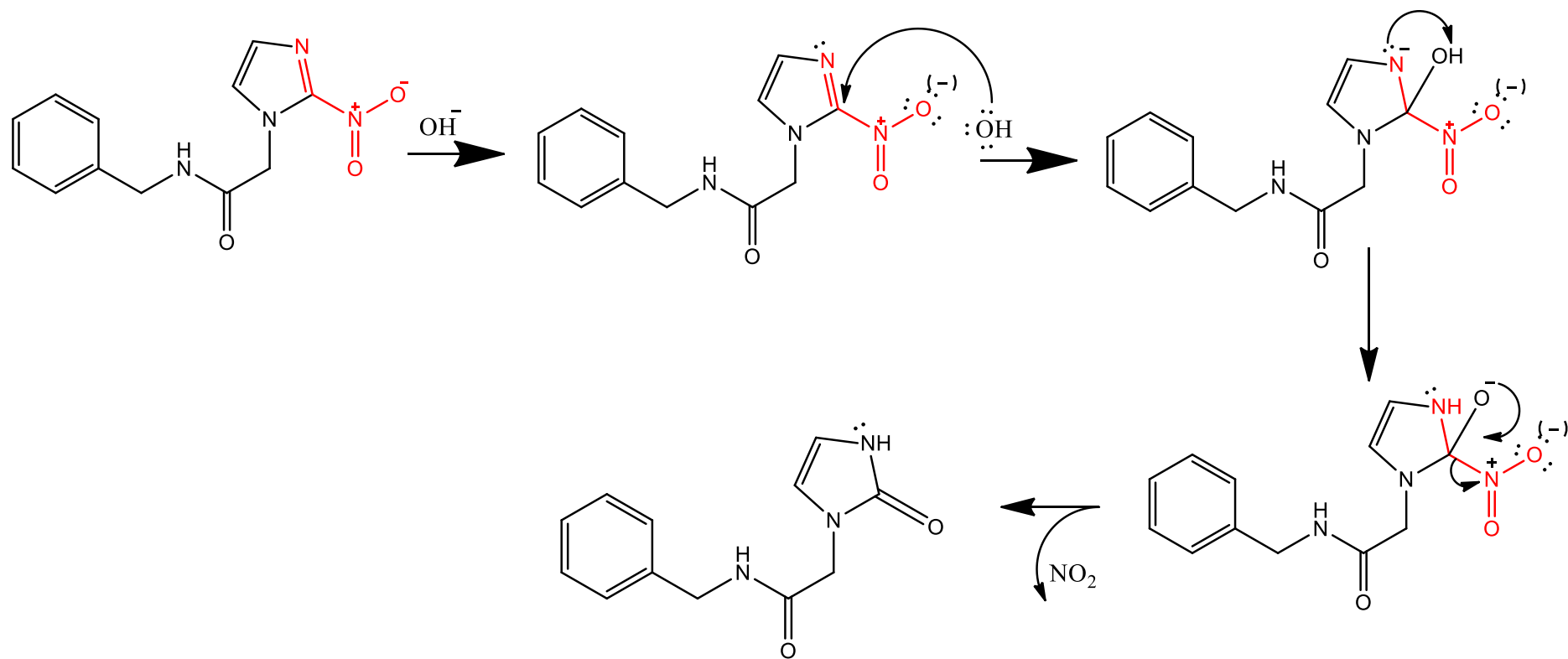
De acordo com a massa molecular encontrada para os produtos de degradação, e considerando o meio reacional básico, foi proposto um mecanismo de reação que resultou nas substâncias cujas fórmulas moleculares são $C_{12}H_{13}N_3O_2$, para ambos isômeros (erro de massa < 5 ppm). Para tentar diferenciar os isômeros, os espectros obtidos em alta energia foram analisados. O mesmo perfil de fragmentação foi observado para ambas as moléculas, sendo estas, então, consideradas diastereoisômeros (FIGURA 24). Estas foram nomeadas como N-benzil-2-(oxo-2,3-dihidro-1H-imidazol-1-il)acetamida.

FIGURA 24 - ESTRUTURA QUÍMICA DOS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO EM MEIO ALCALINO



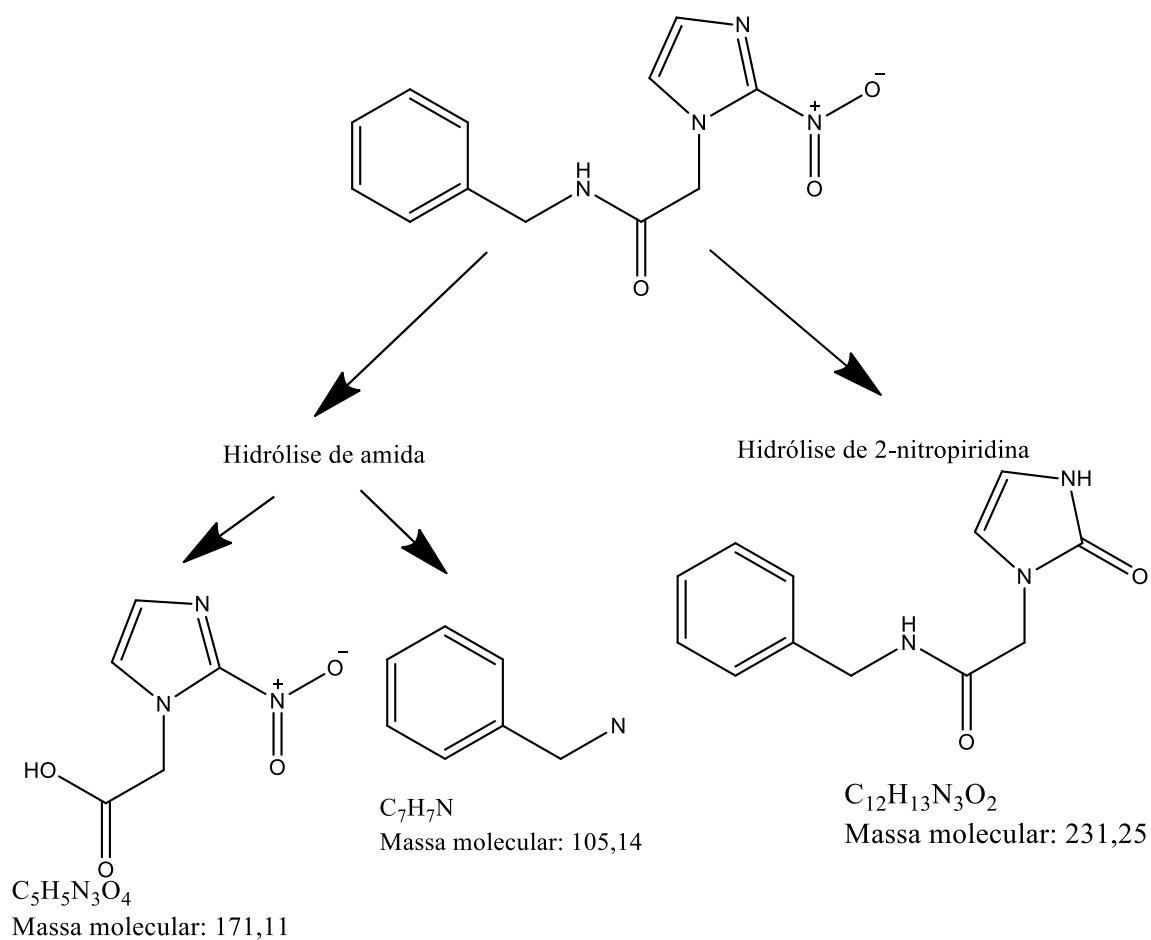
Com base na estrutura química identificada, a rota de degradação mostrada na (FIGURA 25) foi proposta.

FIGURA 25 - ROTA DE DEGRADAÇÃO DO COMPOSTO OBTIDO POR HIDRÓLISE ALCALINA



Estes resultados estão em concordância com os dados teóricos obtidos através do *software* Zeneth (FIGURA 26). Ainda, o *software* sugeriu um segundo produto de degradação, resultante de uma reação de hidrólise de amida. Entretanto, este não foi encontrado nas amostras analisadas.

FIGURA 26 - ROTA DE DEGRADAÇÃO POR HIDRÓLISE ALCALINA SEGUNDO SOFTWARE ZENETH

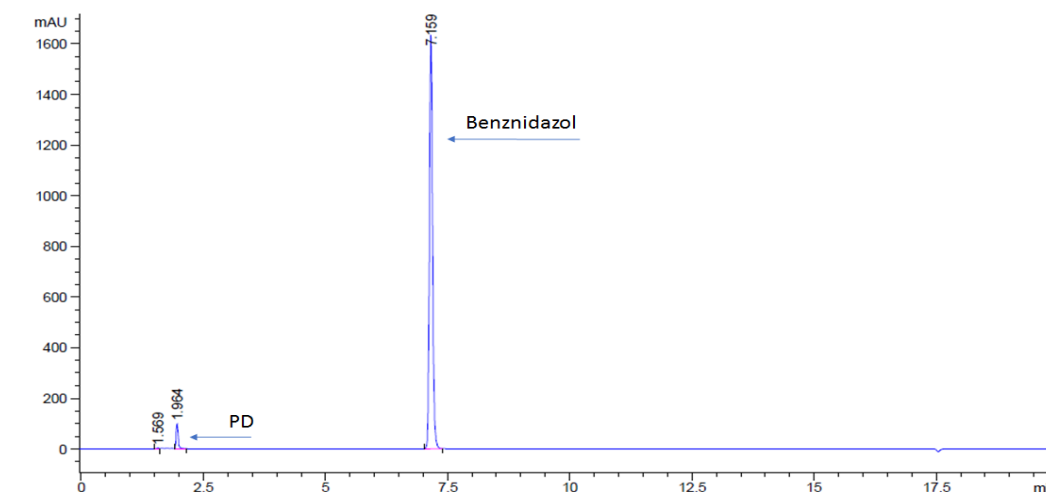


5.3.2 Hidrólise ácida

Para a realização da hidrólise ácida, o BNZ foi submetido à reação de degradação por HCl 0,1 M, por um período de 7 dias. Como não ocorreu degradação nesta condição, as soluções de BNZ foram expostas a soluções mais concentradas de ácido. Níveis ótimos de degradação foram atingidos com a concentração de HCl 2 M.

Através da análise por CLAE-DAD, a reação de degradação em meio ácido por 96 horas resultou no cromatograma representado pela (FIGURA 27), em que é possível notar a formação de um produto de degradação no tempo de retenção de 1,96 min.

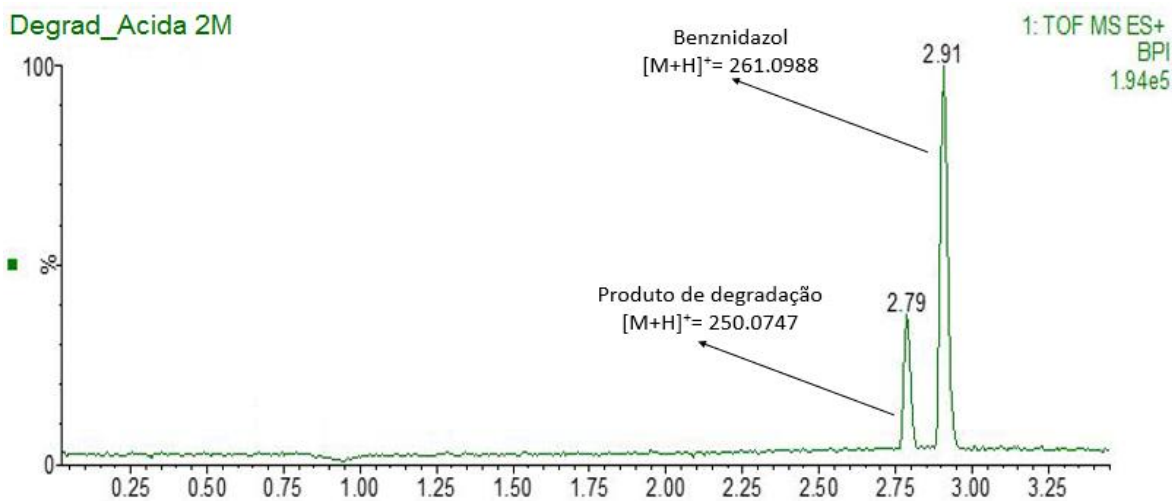
FIGURA 27 - CROMATOGRRAFIA OBTIDA APÓS O BNZ EXPOSTO A CONDIÇÃO ÁCIDA



NOTA: Coluna XBridge™ C₈ (150 x 4,6 mm, 5 μm); fase móvel: (A) tampão formiato de amônio 20 mM pH 3,0 e (B) acetonitrila, modo de eluição gradiente; tempo 0 – 15min: 90 – 10% A, 15 – 15,10min: 10 – 90 % A, 15,10 – 20min: 90 %A; fluxo: 1000 μL.mL⁻¹; temperatura de forno: 40 °C; volume de injeção: 20 μL; comprimento de onda: 320 nm.

Esta mesma amostra foi analisada por LC-QToF-MS. Com isso, foi possível observar o aparecimento de picos cromatográficos nos tempos de retenção 2,79 e 2,91 min, correspondentes a um possível produto de degradação e ao BNZ, respectivamente. As massas identificadas foram de m/z 250.0747 [M+H]⁺ e 261.0989 [M+H]⁺, apresentadas nas (FIGURAS 28, 29 e 30).

FIGURA 28 - CROMATOGRAMA DA REAÇÃO DE DEGRADAÇÃO EM MEIO ÁCIDO OBTIDO POR LC-QToF-MS



NOTA: Coluna C₈ (100 x 2,1 mm, 1,7 μL) Acquity UPLC® BEH; fase móvel: (A) água (0,1% ácido fórmico) e (B) acetonitrila, eluída em modo gradiente, 0 – 3,40min: 90 – 10% A; 3,40 – 3,50min: 10 – 90% A; 3,50 – 6,00min 90% A; fluxo de 500 μL.min⁻¹; temperatura da coluna 40 °C e volume de injeção 3 μL.

FIGURA 29 - ESPECTRO DE MASSAS REFERENTE AO PICO CROMATOGRÁFICO DE 2,90 MIN

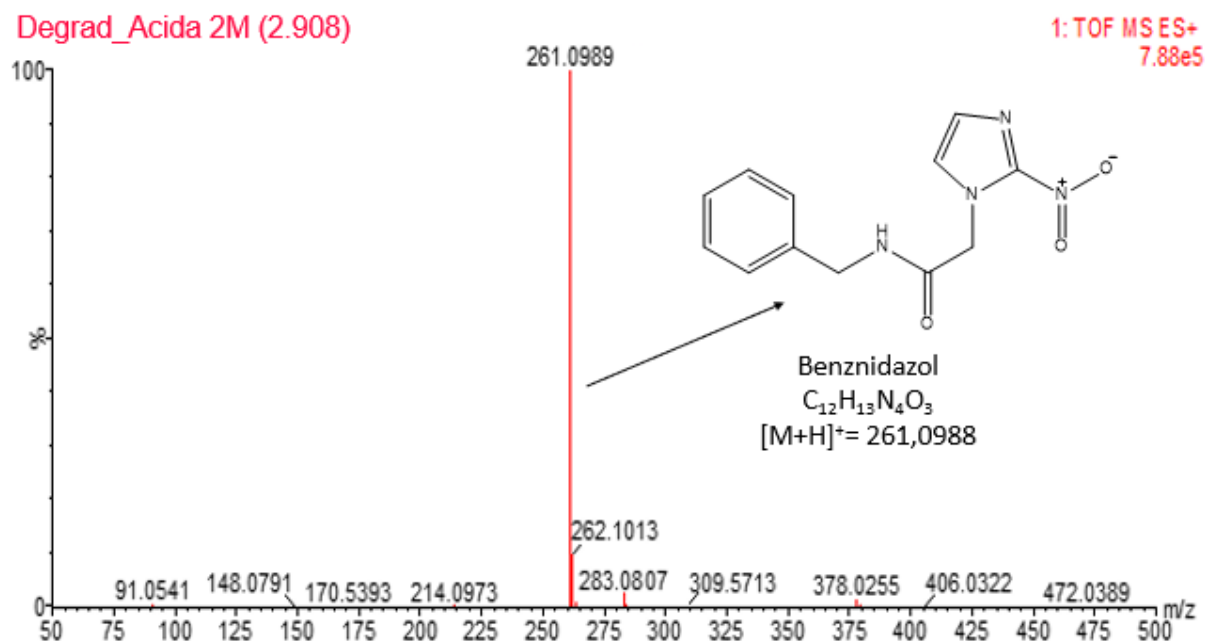
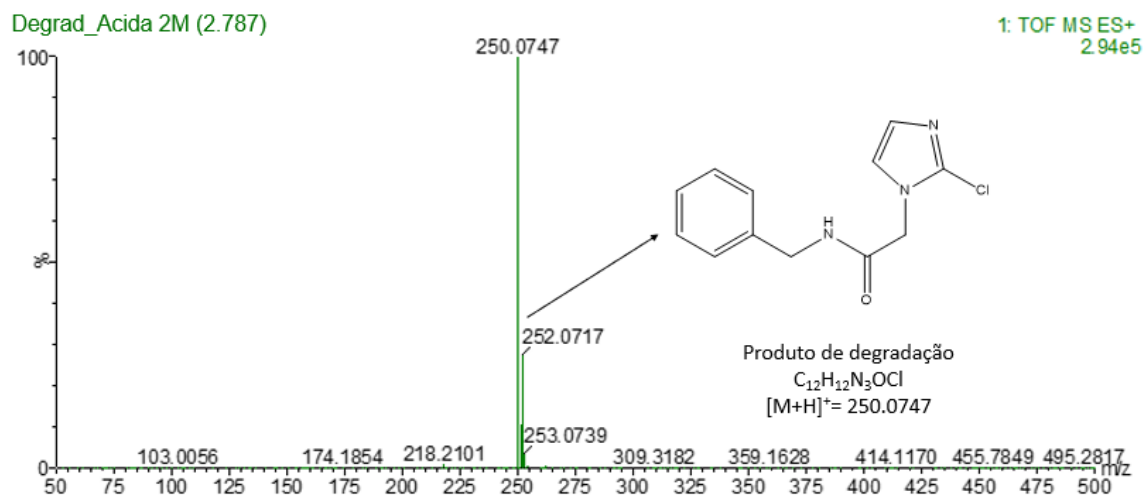


FIGURA 30 - ESPECTRO DE MASSAS REFERENTE AO PICO CROMATOGRÁFICO DE 2,78 MIN



Com base na estrutura da molécula do BNZ e no meio reacional, uma estrutura molecular foi sugerida, a massa molecular [M+H]⁺ 250,0747, caracteriza-se pela estrutura representada pela (FIGURA 32), com fórmula molecular C₁₂H₁₂N₃OCl (erro menor que 5 ppm). Esta foi nomeada como N-benzil-2-(cloro-2,3-dihidro-1H-imidazol-1-il)acetamida. Como pode ser observado na (FIGURA 31), não apenas é visto a massa exata de 250,0747 [M+H]⁺ como também podem ser vistas, 251,0781[M+H]⁺, 252,0716 [M+H]⁺ e 253,0734 [M+H]⁺ cuja as intensidades formam o perfil isotópico característico da molécula proposta, devido a presença de um átomo de cloro, que pode aparecer com 35 ou 37 neutrons de acordo com a sua proporção na natureza.

FIGURA 31 - ESPECTRO DE MASSAS REFERENTE AO PICO CROMATOGRÁFICO DE 2,78 MIN COM O PERFIL ISOTÓPICO

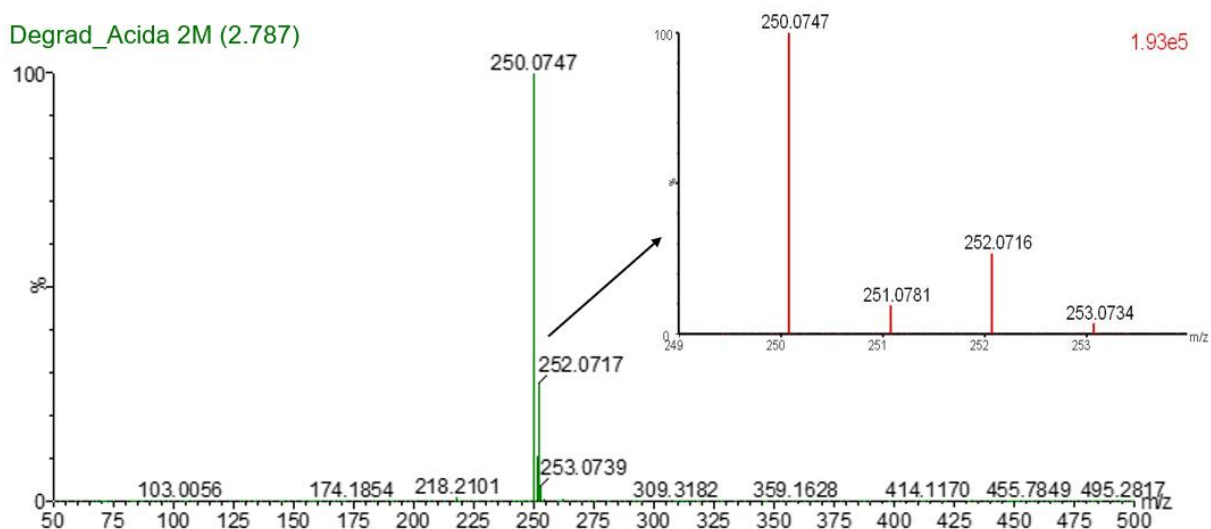
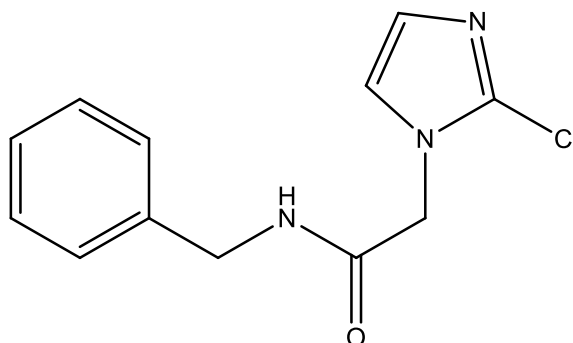
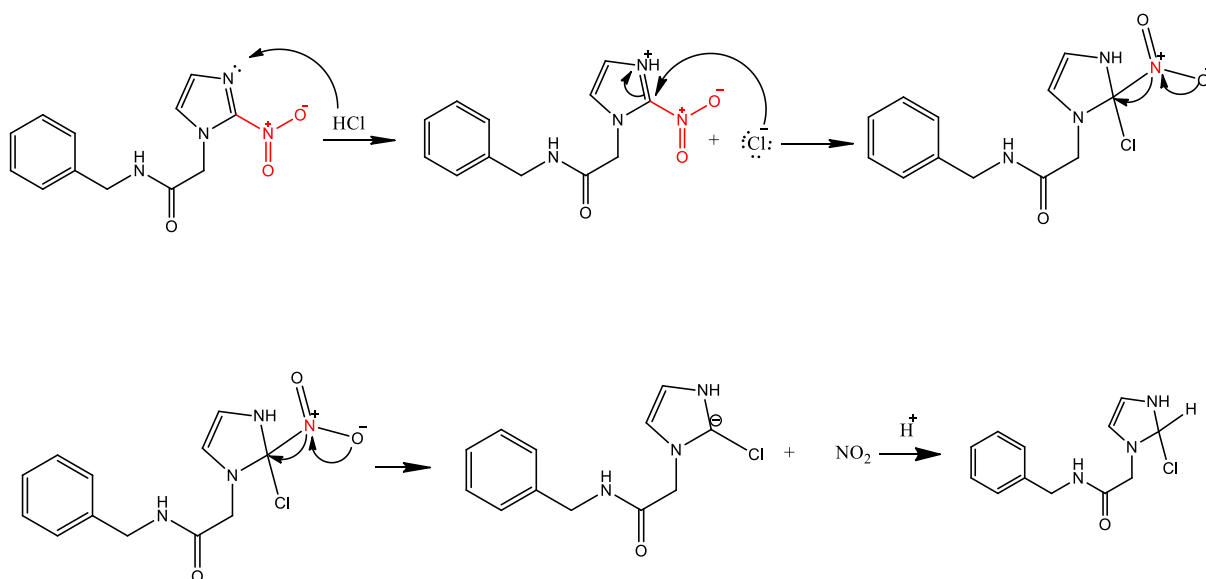


FIGURA 32 - PRODUTO DE DEGRADAÇÃO OBTIDO POR HIDRÓLISE ÁCIDA



Com base na estrutura química identificada, a rota de degradação mostrada na (FIGURA 33) foi proposta.

FIGURA 33 - ROTA DE DEGRADAÇÃO DO COMPOSTO OBTIDO POR HIDRÓLISE ÁCIDA



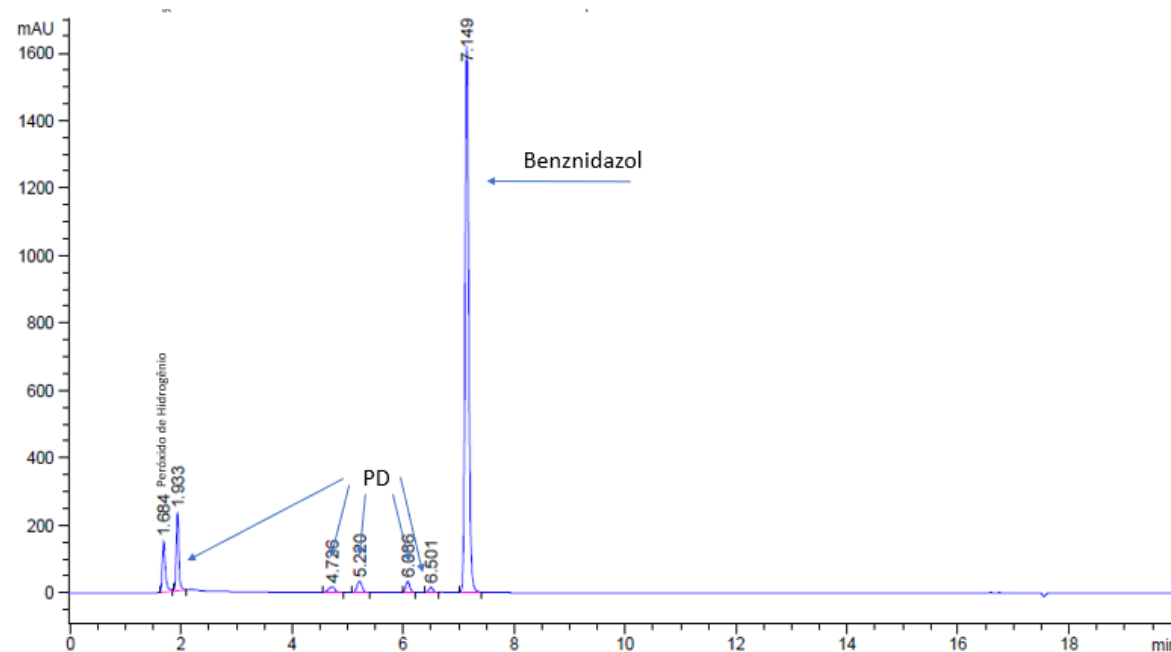
Segundo o *software* Zeneth, os produtos de degradação formados a partir da hidrólise em meio ácido seriam os mesmos compostos obtidos através da degradação por hidrólise em meio alcalino. Contudo, não foram encontradas as massas moleculares sugeridas.

5.3.3 Oxidação

Após um período de 48 horas, a amostra submetida à degradação oxidativa foi analisada por CLAE-DAD, obtendo-se o cromatograma representado na (FIGURA 34).

A partir do resultado da análise, observou-se a formação de cinco produtos de degradação nos tempos 1,93; 4,72; 5,22; 6,08; 6,50 min, enquanto o BNZ foi observado no tempo de 7,14 min.

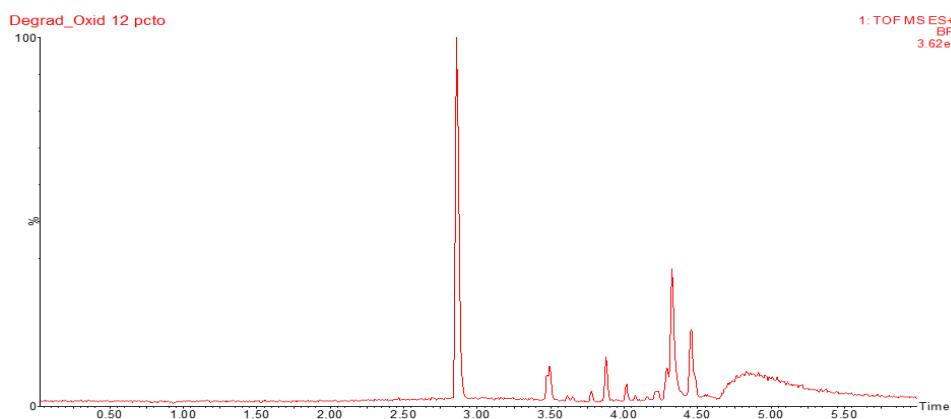
FIGURA 34 – CROMATOGRAMA DA REAÇÃO DE DEGRADAÇÃO EM MEIO OXIDANTE



NOTA: Coluna XBridge™ C₈ (150 x 4,6 mm, 5 μm); fase móvel: (A) tampão formiato de amônio 20 mM pH 3,0 e (B) acetonitrila, modo de eluição gradiente; tempo 0 – 15min: 90 – 10% A, 15 – 15,10min: 10 – 90 % A, 15,10 – 20min: 90 %A; fluxo: 1000 μL.mL⁻¹; temperatura de forno: 40 °C; volume de injeção: 20 μL; comprimento de onda: 320 nm.

Esta mesma amostra foi analisada por LC-QToF-MS, porém, não foram encontrados picos cromatográficos anteriores ao tempo de retenção do BNZ (2,86 min), como pode ser observado na (FIGURA 35). A ausência destes pode ser devido ao fato de os compostos observados por DAD é possível que seja de difícil ionização.

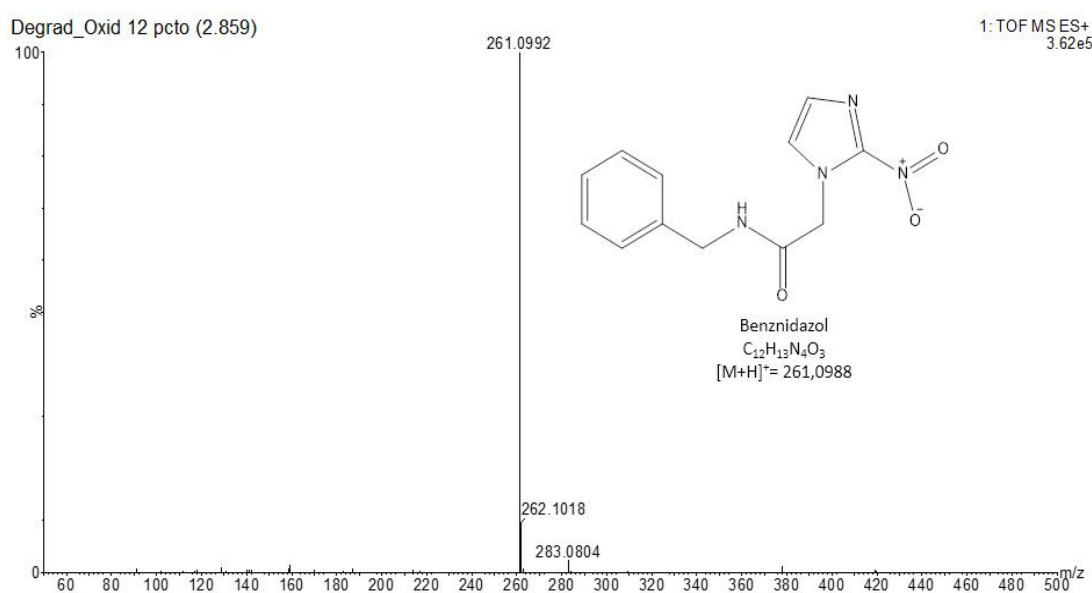
FIGURA 35 - CROMATOGRAFIA DE DEGRADAÇÃO MEIO OXIDANTE OBTIDO POR LC-QToF-MS



NOTA: Coluna C₈ (100 x 2,1 mm, 1,7 µL) Acquity UPLC® BEH; fase móvel: (A) água (0,1% ácido fórmico) e (B) acetonitrila, eluída em modo gradiente, 0 – 3,40min: 90 – 10% A; 3,40 – 3,50min: 10 – 90% A; 3,50 – 6,00min 90% A; fluxo de 500 µL.min⁻¹; temperatura da coluna 40 °C e volume de injeção 3 µL.

O pico referente ao BNZ foi confirmado pelo espectro de massas representado pela (FIGURA 36) e pela exatidão de massas (erro menor que 5 ppm).

FIGURA 36 - ESPECTRO DE MASSAS REFERENTE AO PICO CROMATOGRÁFICO DE 2,86 MIN



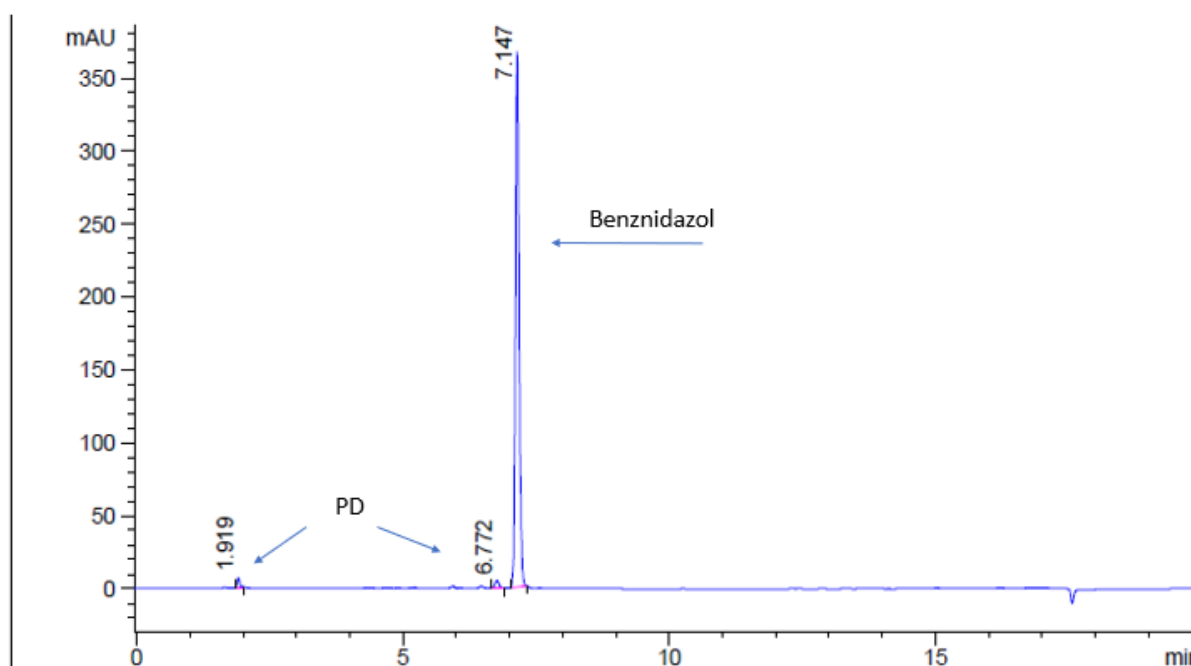
Utilizando o *software* Zeneth para a simulação da reação de degradação por oxidação, não foram encontrados produtos de degradação. Como há o aparecimento de picos cromatográficos sugestivos de possíveis produtos de degradação na análise por CLAE-DAD e há redução do pico do BNZ com o tempo, torna-se necessário a utilização futura de outras ferramentas analíticas para a elucidação desses

compostos, tais como Ressonância Magnética Nuclear (RMN), espectroscopia no infravermelho e ultravioleta.

5.3.4 Fotólise

Após 14 dias de exposição da amostra à condição fotolítica, houve o aparecimento de três picos cromatográficos, nos tempos de retenção 1,91; 6,77 e 7,14 min, correspondendo a dois possíveis produtos de degradação e ao BNZ, respectivamente (FIGURA 37).

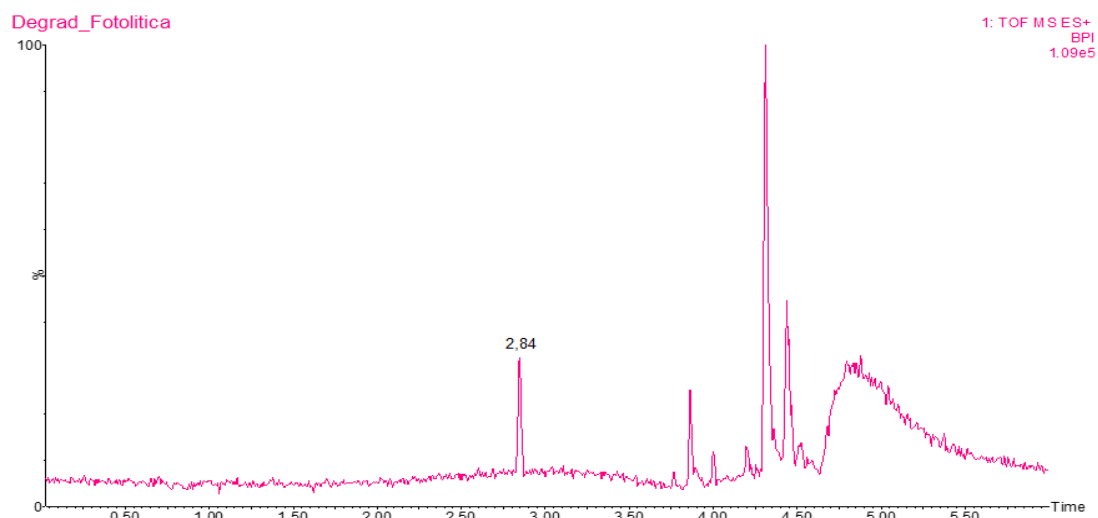
FIGURA 37 – CROMATOGRAMA DA REAÇÃO DE DEGRADAÇÃO POR EXPOSIÇÃO À LUZ



NOTA: Coluna XBridge™ C₈ (150 x 4,6 mm, 5 μm); fase móvel: (A) tampão formiato de amônio 20 mM pH 3,0 e (B) acetonitrila, modo de eluição gradiente; tempo 0 – 15min: 90 – 10% A, 15 – 15,10min: 10 – 90 % A, 15,10 – 20min: 90 %A; fluxo: 1000 μL.mL⁻¹; temperatura de forno: 40 °C; volume de injeção: 20 μL; comprimento de onda: 320 nm.

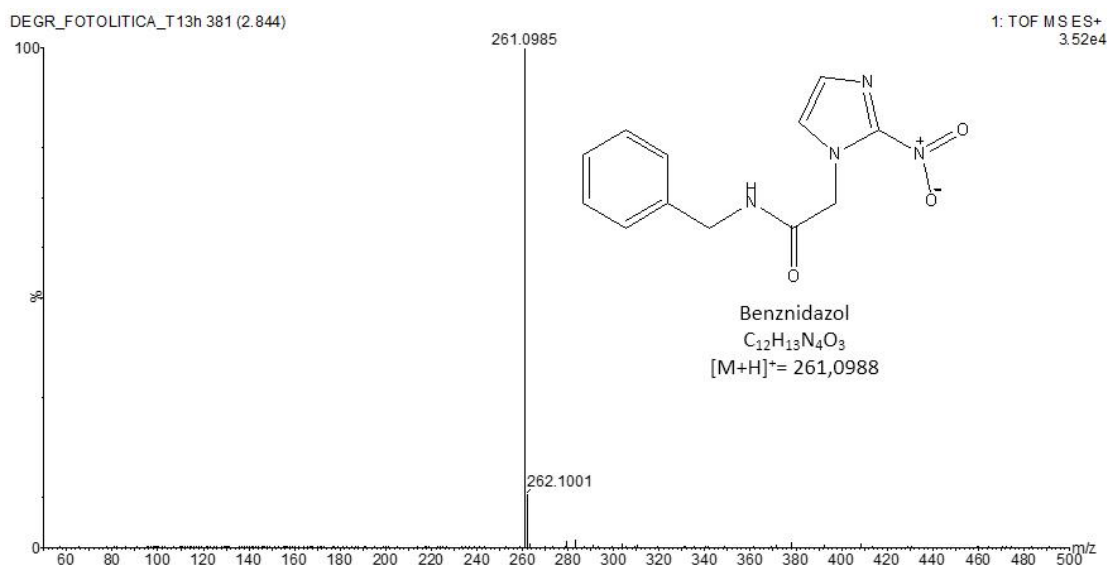
Esta mesma amostra foi analisada por LC-QToF-MS. Foi observado o aparecimento de um pico cromatográfico no tempo de retenção de 2,84 min, referente ao BNZ (FIGURA 38 e 39). O BNZ apresentou massa molecular de 261,0985 [M+H]⁺, com erro de massa menor que 5 ppm.

FIGURA 38 – CROMATOGRAMA DA REAÇÃO DE DEGRADAÇÃO POR LUZ OBTIDO POR LC- QToF-MS



NOTA: Coluna C₈ (100 x 2,1 mm, 1,7 µL) Acquity UPLC® BEH; fase móvel: (A) água (0,1% ácido fórmico) e (B) acetonitrila, eluída em modo gradiente, 0 – 3,40min: 90 – 10% A; 3,40 – 3,50min: 10 – 90% A; 3,50 – 6,00min 90% A; fluxo de 500 µL.min⁻¹; temperatura da coluna 40 °C e volume de injeção 3 µL.

FIGURA 39 - ESPECTRO DE MASSAS REFERENTE AO PICO CROMATOGRÁFICO DE 2,84 MIN



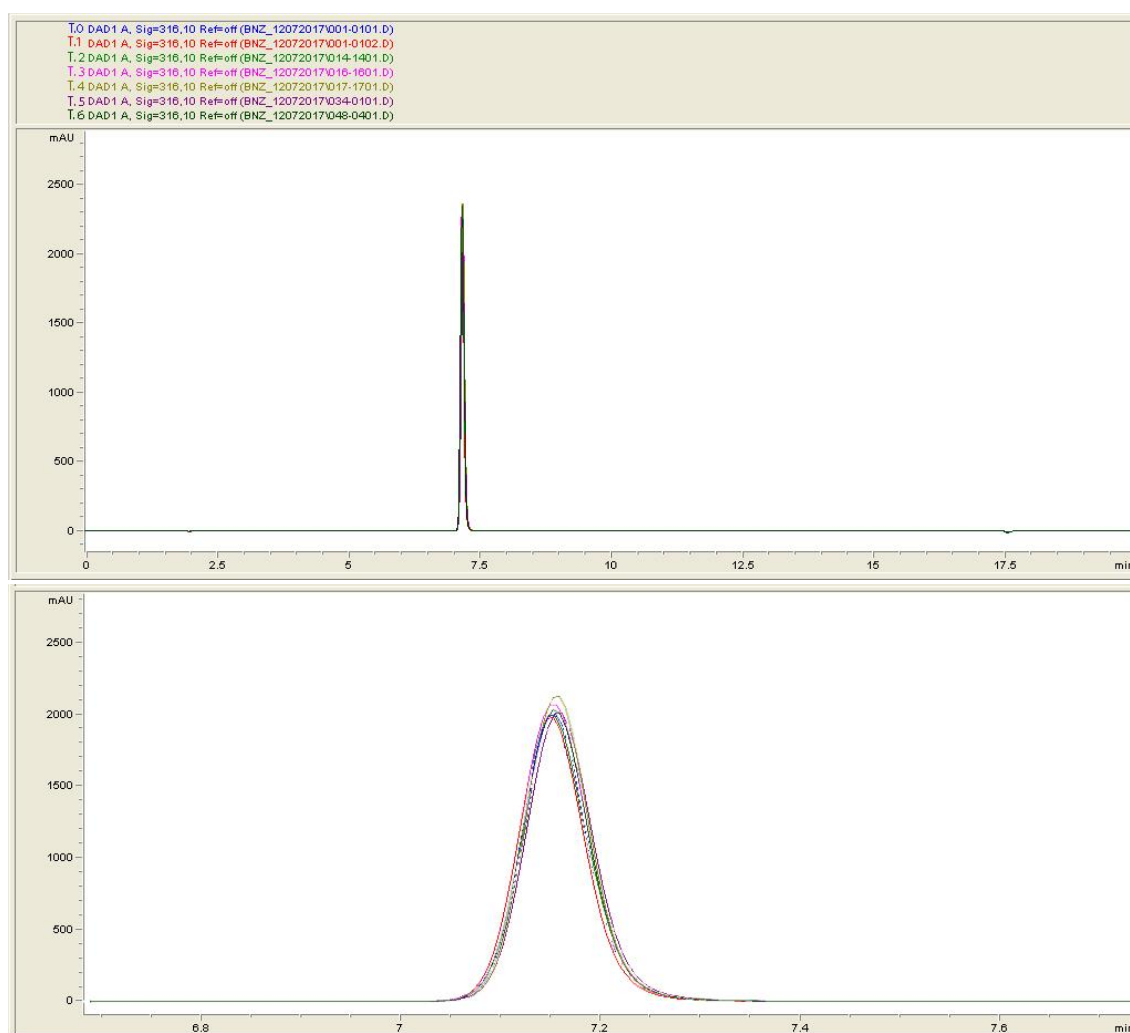
Ao realizar a simulação de degradação fotolítica pelo *software* Zeneth, o mesmo sugeriu uma reação de isomerização fotoquímica de nitrocomposto aromático. Porém, nenhum produto de degradação foi encontrado.

5.3.5 Termodegradação/ hidrólise neutra

O fármaco BNZ foi submetido à degradação térmica úmida/hidrólise neutra, inicialmente à temperatura de 60 °C em banho-maria. Contudo, devido à ausência de novos picos cromatográficos nesta condição, a amostra foi exposta a uma condição mais extrema (80 °C) por um período de 7 dias.

Após decorrido o tempo de exposição, as amostras foram analisadas novamente por CLAE-DAD. Novamente, não foi observado o aparecimento de novos picos cromatográficos, nem o decaimento significativo da área do analito que pudesse demonstrar algum sinal de degradação, o que é possível observar na (FIGURA 40) em que há sobreposição de todos os tempos.

FIGURA 40 - CROMATOGRAMA DA REAÇÃO POR HIDRÓLISE NEUTRA/ TERMODEGRADAÇÃO



NOTA: A) T.0 – Zero; T.1 – 12 horas; T.2 – 24 horas; T.3 – 48 horas; T.4 – 96 horas; T.5 – 120 horas; T.6 – 144 horas.

Os resultados da análise por CLAE-DAD estão em concordância com os resultados obtidos na análise por LC-QToF-MS e pelo *software* Zeneth: não há formação de produtos de degradação oriundos dessa condição.

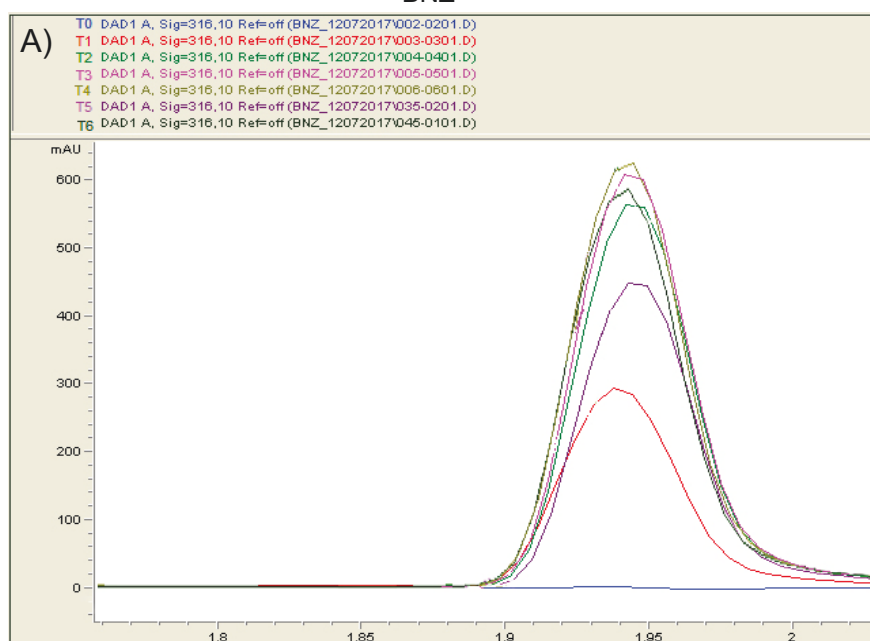
5.4 CINÉTICA DA DEGRADAÇÃO DO BENZNIDAZOL

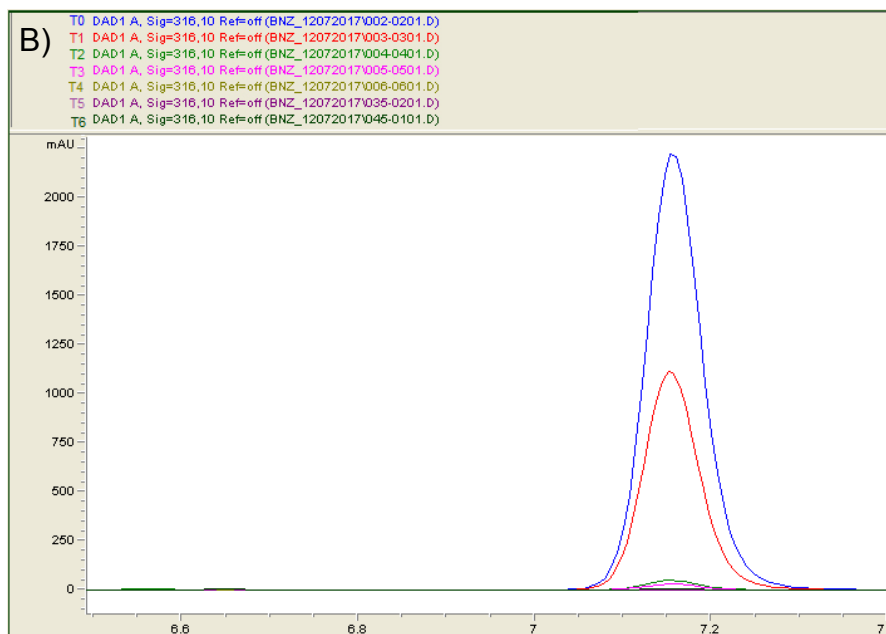
Em paralelo às análises já apresentadas neste trabalho, foi executado o estudo de cinética de degradação do BNZ em diferentes condições. A metodologia empregada foi a de integração. Os modelos de zero, primeira e segunda ordem foram considerados. As equações resultantes foram linearizadas e os parâmetros cinéticos, ordem e constante de reação foram estimados através da técnica dos mínimos quadrados. Avaliando-se o coeficiente de determinação (r^2) para as diferentes cinéticas, foi possível estabelecer a ordem adequada da reação.

5.4.1 Hidrólise básica

Para o estudo cinético em meio básico, as amostras foram coletadas em diferentes tempos até 144 horas. Na (FIGURA 41) pode ser observado o decaimento do BNZ.

FIGURA 41 - PICOS CROMATOGRÁFICOS REFERENTES AO PRODUTO DE DEGRADAÇÃO E BNZ

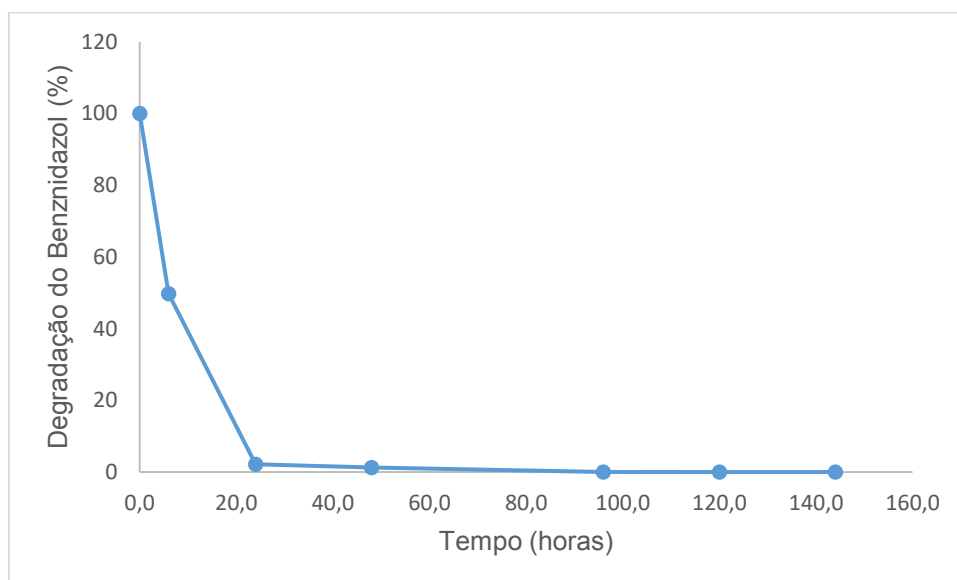




NOTA:A) Produto de degradação; B) BNZ; T0 – Zero; T1 – 12 horas; T2 – 24 horas; T3 – 48 horas; T4 – 96 horas; T5 – 120 horas; T6 – 144 horas.

Na (FIGURA 42) pode-se observar a porcentagem de decaimento do BNZ em função do tempo em meio de degradação alcalino.

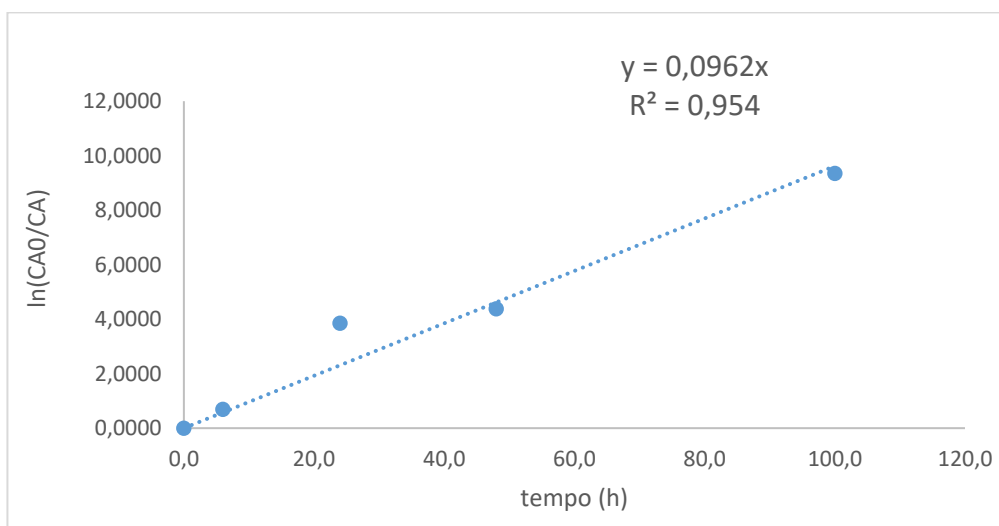
FIGURA 42 - DECAIMENTO DO FÁRMACO BNZ EM FUNÇÃO DO TEMPO EM CONDIÇÃO ALCALINA



A partir desses dados cinéticos, foi observado que a decomposição do BNZ em condição hidrolítica alcalina segue uma reação de primeira ordem, onde $n=1$. A partir da integração do modelo diferencial, considerando cinética de primeira ordem, é

possível obter uma equação linear: $\ln \frac{C_{A0}}{C_A} = k_d t$ onde, C_{A0} é a concentração inicial, C_A ($\mu\text{Mol.L}^{-1}$) é a concentração final do fármaco e t é o tempo da reação desde o tempo inicial, considerando $t=0$. Para a cinética de primeira ordem, k_d assume unidade h^{-1} . Através da aplicação do método dos mínimos quadrados, de $\ln\left(\frac{C_{A0}}{C_A}\right) \times t$, é possível obter uma relação linear e obter a constante de velocidade de reação que consiste no coeficiente angular da reta abaixo. Sendo assim, é possível afirmar que a velocidade da reação depende da concentração de reagentes na primeira ordem, uma vez que a velocidade de reação $-r_A = kC_A^1$ considerada possibilitou obter a transformação na equação linear e geração dos dados plotados na (FIGURA 43).

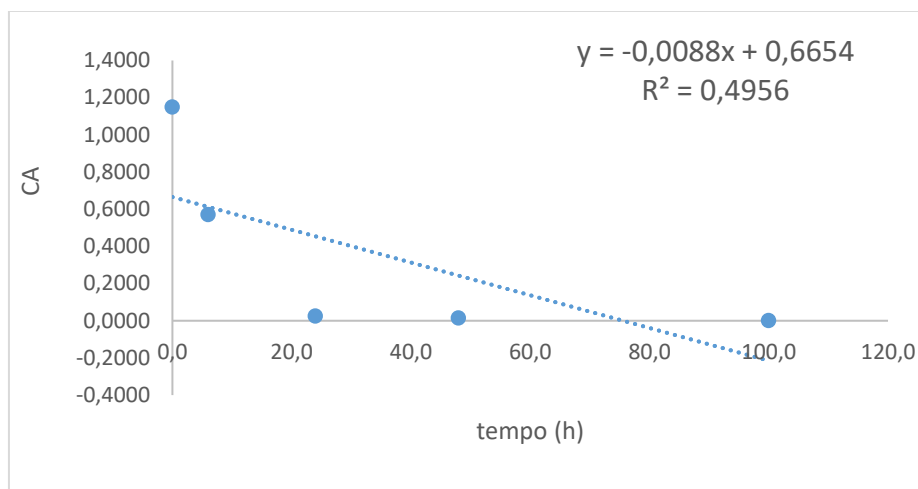
FIGURA 43 - MODELO INTEGRADO CONSIDERANDO CINÉTICA DE PRIMEIRA ORDEM PARA REAÇÃO EM MEIO BÁSICO



Pode-se expressar a velocidade de reação como $(-r_A) = 0,0962 C_A$. Neste caso a velocidade de reação depende linearmente da concentração de fármaco.

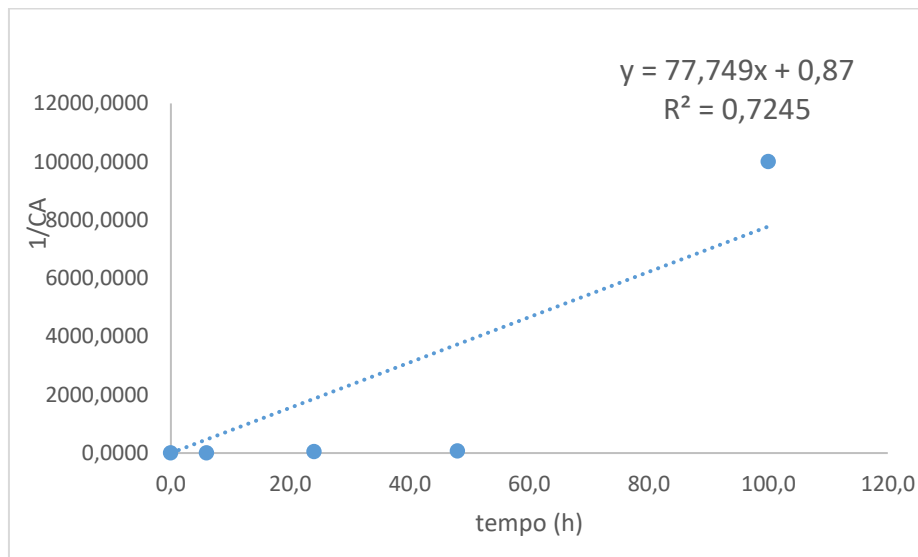
Obteve-se também a correlação da ordem zero e de segunda ordem, conforme as (FIGURAS 44 e 45), respectivamente.

FIGURA 44 - MODELO INTEGRADO CONSIDERANDO CINÉTICA DE ORDEM ZERO PARA REAÇÃO EM MEIO BÁSICO



O modelo de velocidade de reação para ordem zero é $(-r_A) = 0,0088 C_A$. A equação mostra que a velocidade de reação é constante ao longo do tempo.

FIGURA 45 - MODELO INTEGRADO CONSIDERANDO CINÉTICA DE SEGUNDA ORDEM PARA REAÇÃO EM MEIO BÁSICO



Obtendo-se o valor da constante de velocidade de reação para reação de segunda ordem, o modelo pode ser apresentado na forma $-r_A = 77,749 C_A$. Neste caso, é possível observar que a velocidade de decomposição depende da concentração de reagentes elevado à segunda potência.

Foi determinado por meio de cálculos estatísticos (teste t de Student) se há correlação linear, considerando-se um intervalo de confiança de 95% para o

coeficiente de determinação. Como o valor de t calculado foi maior do que o t tabelado, há correlação linear entre as variáveis para a reação de primeira ordem, confirmando a ordem de reação desta cinética (TABELA 19).

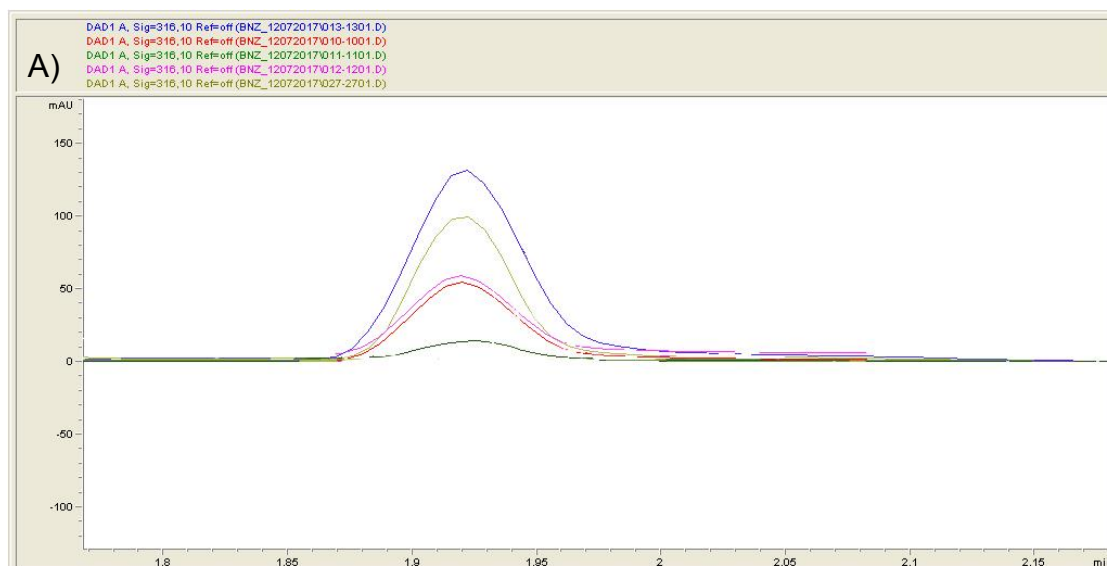
TABELA 19 - TESTE DE HIPÓTESE DE CORRELAÇÃO PARA O MODELO LINEAR PARA CINÉTICA DE PRIMEIRA ORDEM EM MEIO BÁSICO

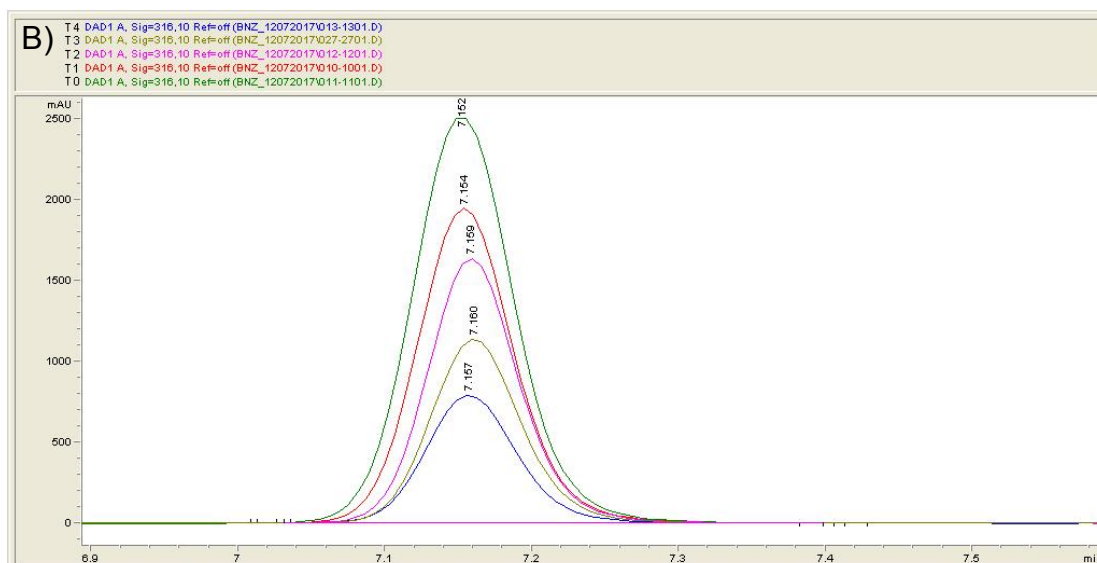
Parâmetro	Cinética		
	Zero ordem	Primeira ordem	Segunda ordem
n	4	4	4
r2	0,4956	0,954	0,7245
Tcalc	1,401822763	6,440361859	2,293366114
T tab(n-2;0,05)	3,18	3,18	3,18
Teste t	Tcalc < Ttab	Tcalc > Ttab	Tcalc < Ttab
Hipótese nula	Sem correlação	Sem correlação	Sem correlação
Hipótese alternativa	Com correlação	Com correlação	Com correlação
Observação	Não linear	Linear	Não linear

5.4.2 Hidrólise ácida

Para o estudo cinético em meio ácido, as amostras foram coletadas em diferentes tempos até 96 horas. Na (FIGURA 46) pode ser observado o aumento do produto de degradação e o decaimento do BNZ. Ao comparar com a hidrólise alcalina, nota-se que a degradação ácida foi mais lenta.

FIGURA 46 - PICOS CROMATOGRÁFICOS REFERENTES AO PRODUTO DE DEGRADAÇÃO MEIO ÁCIDO E DECAIMENTO DO BNZ

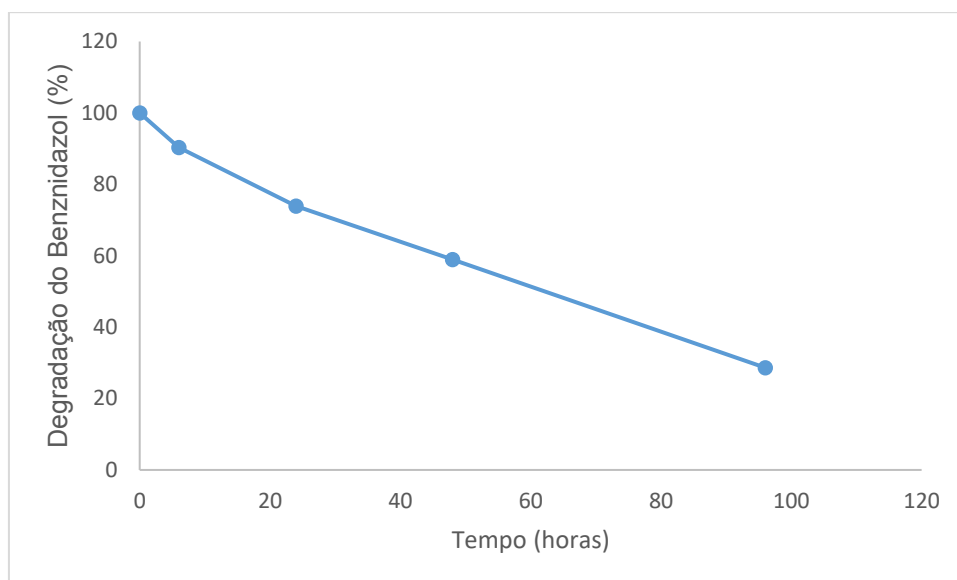




NOTA: A) Produto de degradação; B) BNZ; T0 – Zero; T1 – 12 horas; T2 – 24 horas; T3 – 48 horas; T4 – 96 horas

Na (FIGURA 47) pode-se observar o decaimento do fármaco BNZ, expresso em porcentagem (%), em função do tempo na reação de degradação em condição ácida.

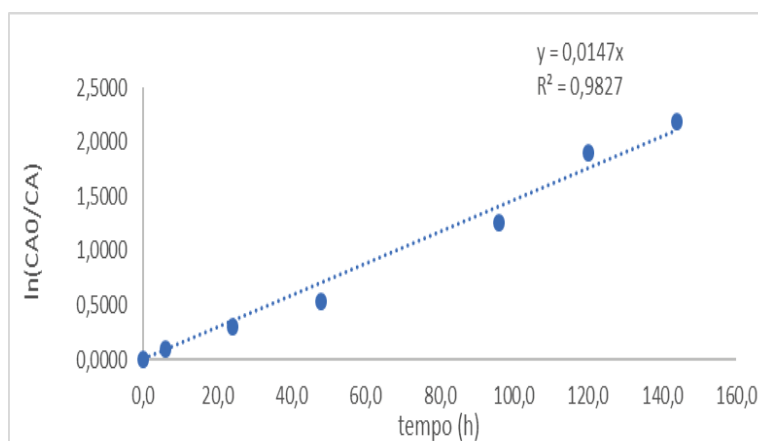
FIGURA 47 - DECAIMENTO DO FÁRMACO BNZ EM FUNÇÃO DO TEMPO EM CONDIÇÃO ÁCIDA



Os resultados cinéticos obtidos demonstraram que a decomposição do BNZ em condição hidrolítica ácida também segue uma reação de primeira ordem, onde $n=1$, conforme calculado pela equação $\ln \frac{C_{A0}}{C_A} = k_d t$ onde, C_{A0} é a concentração inicial, C_A ($\mu\text{Mol.L}^{-1}$) é a concentração final do fármaco e t é o tempo da reação desde o tempo

inicial considerando $t=0$. Para a cinética de primeira ordem, k_d assume unidade h^{-1} , conforme demonstrado na (FIGURA 48), atestando que a velocidade da reação depende linearmente da concentração do reagente limitante.

FIGURA 48 - MODELO INTEGRADO CONSIDERANDO CINÉTICA DE PRIMEIRA ORDEM PARA REAÇÃO EM MEIO ÁCIDO



A constante de velocidade de reação foi obtida através do coeficiente angular da reta. A velocidade de reação obtida é $(-r_A) = 0,015 C_A$ para a hidrólise ácida.

Nas (FIGURAS 49 e 50) é possível observar os gráficos e os coeficientes de determinação obtidos a partir das equações de zero e segunda ordem, respectivamente. A velocidade de reação é igual a $(-r_A) = 0,0072 C_A$ para a ordem zero e $(-r_A) = 0,0444 C_A^2$ para a de segunda ordem.

FIGURA 49 - MODELO INTEGRADO CONSIDERANDO CINÉTICA DE ORDEM ZERO PARA REAÇÃO EM MEIO ÁCIDO

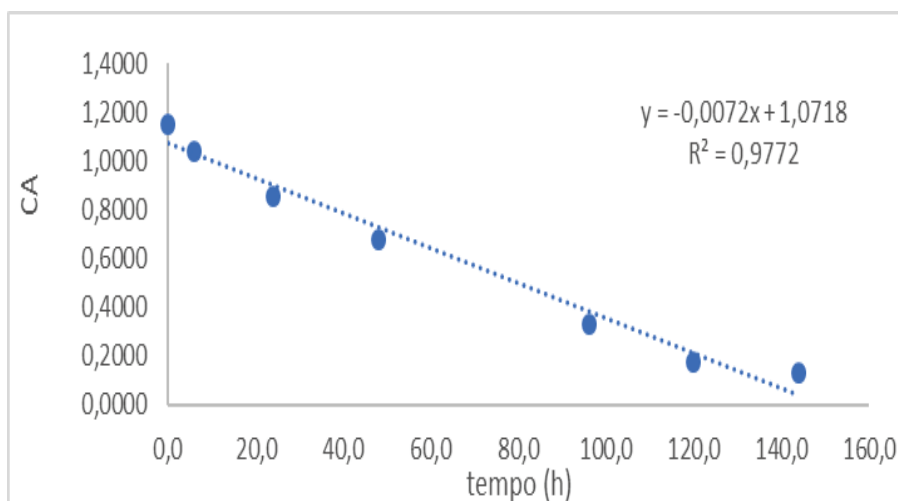
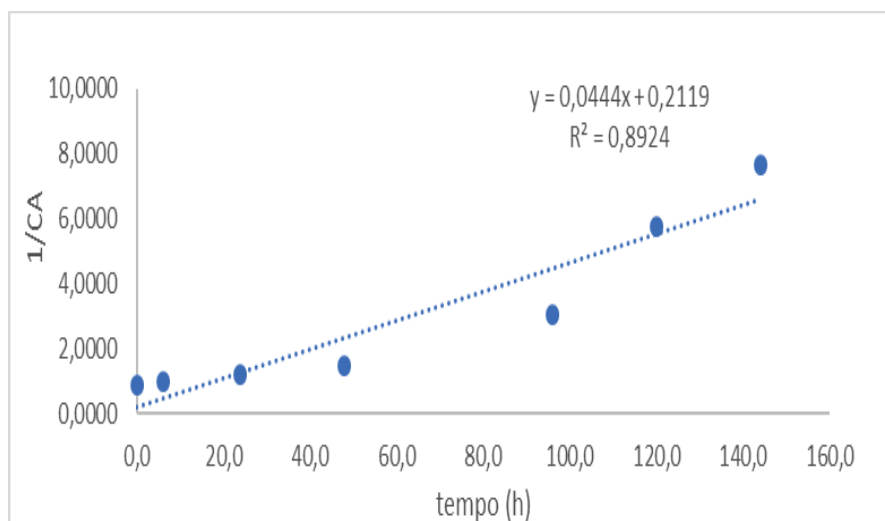


FIGURA 50 - MODELO INTEGRADO CONSIDERANDO CINÉTICA DE SEGUNDA ORDEM PARA REAÇÃO EM MEIO ÁCIDO



Os valores de t calculados para todas as ordens de reação foram superiores ao t tabelado (TABELA 20). Entretanto, a reação de primeira ordem apresentou maior correlação linear, confirmando que a cinética obedece uma cinética de primeira ordem.

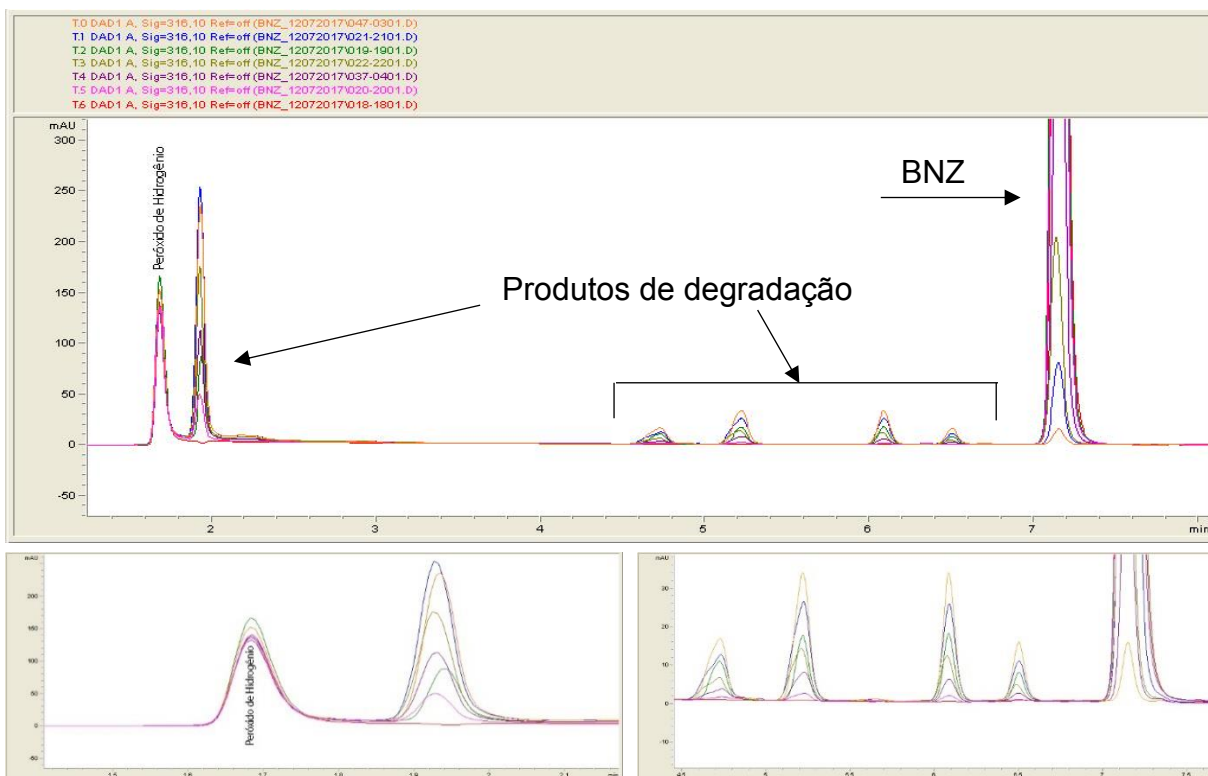
TABELA 20 - TESTE DE HIPÓTESE DE CORRELAÇÃO PARA MODELO LINEAR PARA CINÉTICA DE PRIMEIRA ORDEM EM MEIO ÁCIDO

Parâmetro	Cinética		
	Zero ordem	Primeira ordem	Segunda ordem
n	7	7	7
r2	0,9772	0,9827	0,8924
Tcalc	14,63892911	16,85281404	6,439596376
T tab(n-2;0,05)	2,57	2,57	2,57
Teste t	Tcalc > Ttab	Tcalc > Ttab	Tcalc > Ttab
Hipótese nula	Sem correlação	Sem correlação	Sem correlação
Hipótese alternativa	Com correlação	Com correlação	Com correlação
Observação	Linear	Mais correlacionado	Linear

5.4.3 Oxidação

Para o estudo cinético em meio oxidante, as amostras foram coletadas em diferentes tempos até 120 horas. Na (FIGURA 51) pode ser observado o aumento do produto de degradação e o decaimento do BNZ.

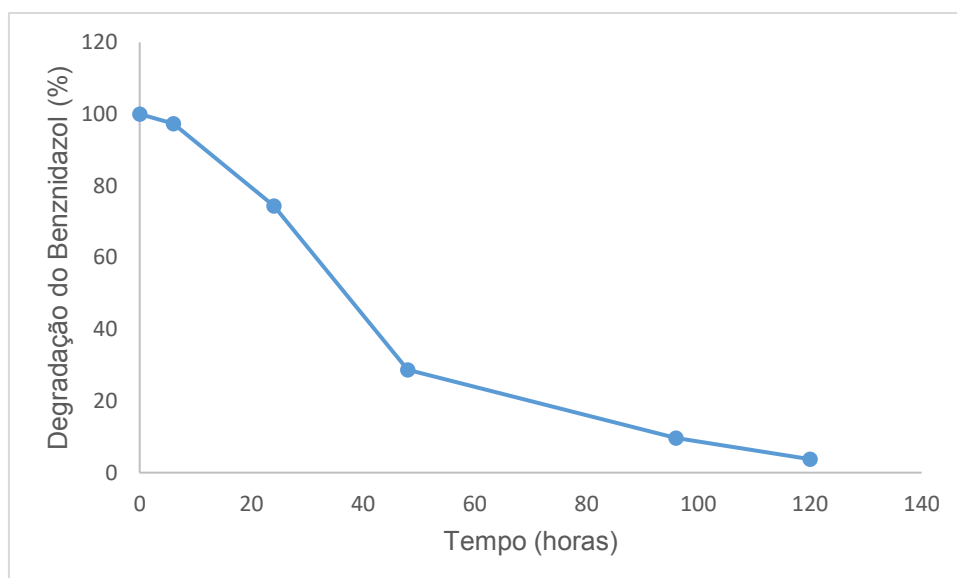
FIGURA 51 - DECAIMENTO DO BNZ E FORMAÇÃO DE PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO



Nota: T.0 – zero; T.1 – 12 horas; T.2- 24 horas; T.3 – 48 horas; T.4 – 72 horas; T.5 – 96 horas; T.6 – 120 horas.

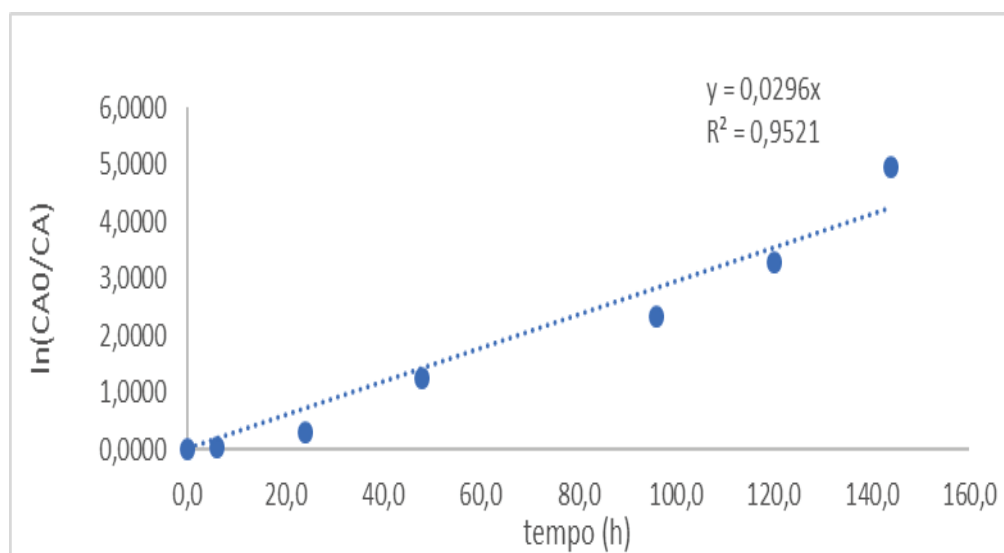
Na (FIGURA 52) pode-se observar o decaimento do fármaco BNZ, expresso em porcentagem (%), em função do tempo na reação de degradação em condição oxidante.

FIGURA 52 - DECAIMENTO DO FÁRMACO BNZ EM FUNÇÃO DO TEMPO EM CONDIÇÃO OXIDANTE



A decomposição do BNZ em condição oxidante apresentou resultados cinéticos seguindo uma reação de primeira ordem, onde $n = 1$, conforme calculado também pela equação $\ln \frac{C_{A0}}{C_A} = k_d t$ onde, C_{A0} é a concentração inicial, C_A ($\mu\text{Mol.L}^{-1}$) é a concentração final do fármaco e t é o tempo da reação desde o tempo inicial considerando $t=0$. Para a cinética de primeira ordem, k_d assume unidade h^{-1} conforme demonstrado na (FIGURA 53), atestando que a velocidade da reação depende linearmente da concentração de reagentes.

FIGURA 53- MODELO INTEGRADO CONSIDERANDO CINÉTICA DE PRIMEIRA ORDEM PARA REAÇÃO EM MEIO OXIDANTE



A velocidade de reação foi calculada a partir da equação $(-r_A) = kC_A^n$. A velocidade de reação obtida para esta ordem de reação foi de $(-r_A) = 0,0296 C_A$.

Nas (FIGURAS 54 e 55) é possível observar os gráficos e os coeficientes de determinação obtidos a partir das equações de zero e segunda ordem, respectivamente. A velocidade de reação é igual a $(-r_A) = 0,0084 C_A$ para a ordem zero e $(-r_A) = 0,444 C_A^2$ para a de segunda ordem.

FIGURA 54 - MODELO INTEGRADO CONSIDERANDO CINÉTICA DE ORDEM ZERO PARA REAÇÃO EM MEIO OXIDANTE

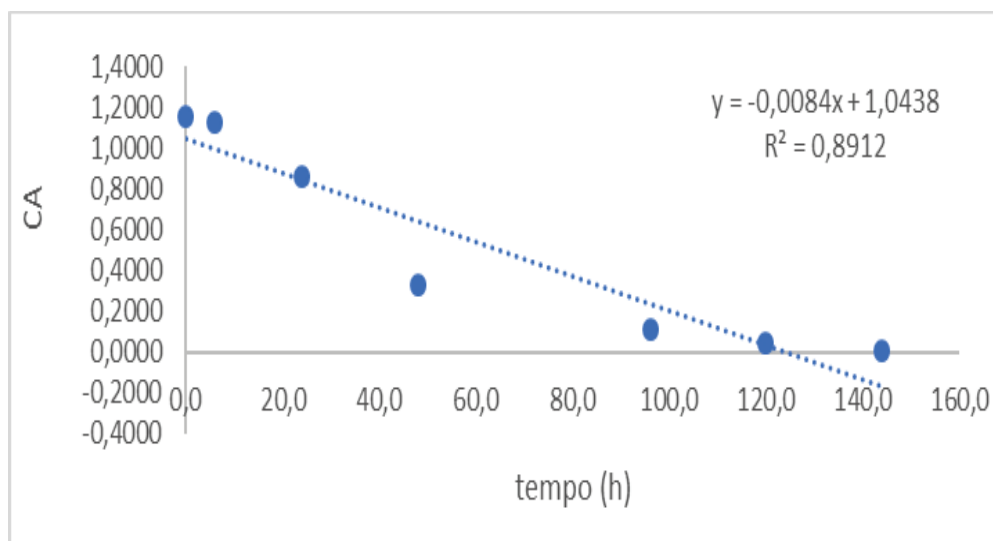
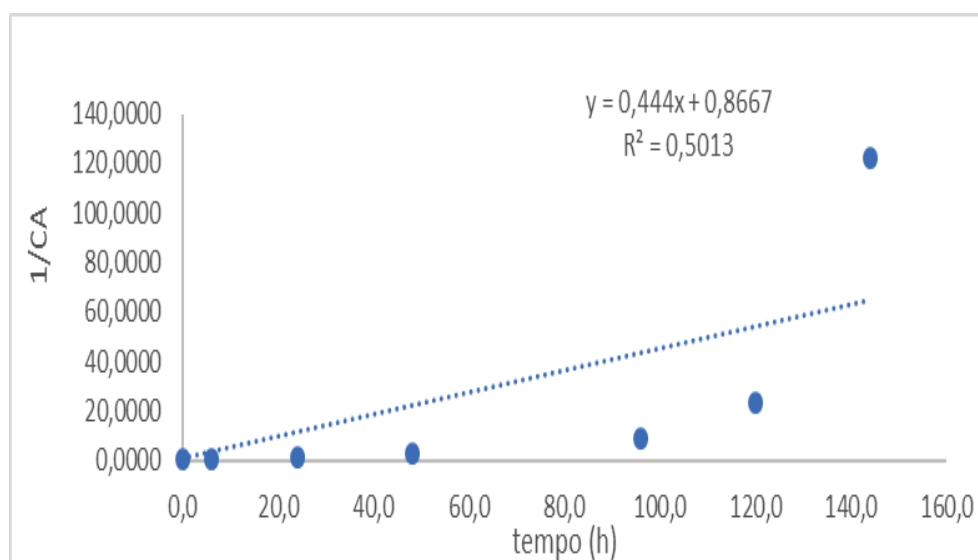


FIGURA 55 - MODELO INTEGRADO CONSIDERANDO CINÉTICA DE SEGUNDA ORDEM PARA REAÇÃO EM MEIO OXIDANTE



Também foi realizado o teste t para esta cinética de reação, no qual foram analisadas todas as ordens de reação determinadas. É possível observar pela (TABELA 21) que a cinética de primeira ordem foi a que apresentou maior correlação.

TABELA 21 - TESTE DE HIPÓTESE DE CORRELAÇÃO PARA MODELO LINEAR PARA CINÉTICA DE PRIMEIRA ORDEM EM MEIO OXIDANTE

Parâmetro	Cinética		
	Zero ordem	Primeira ordem	Segunda ordem
n	7	7	7
r²	0,8912	0,9521	0,5013
T_{calc}	6,399678301	9,969159123	2,241889332
Teste t	T _{calc} > T _{tab}	T _{calc} > T _{tab}	T _{calc} < T _{tab}
Hipótese nula	Sem correlação	Sem correlação	Sem correlação
Hipótese alternativa	Com correlação	Com correlação	Com correlação
Observação	Menor correlação	Maior correlação	Sem correlação

6. CONCLUSÃO

O método analítico indicativo de estabilidade por CLAE-DAD desenvolvido e validado neste trabalho demonstrou ser adequado para a quantificação do fármaco benznidazol. Os parâmetros estabelecidos na validação demonstraram que o método é seletivo, linear, preciso, exato, isento de efeito matriz e robusto.

Os ensaios de degradação forçada demonstraram que o BNZ é instável em meio básico, ácido, oxidativo e fotolítico. Foi comprovado que os três primeiros meios citados apresentaram uma ordem de reação de primeira ordem para a degradação do BNZ. Com o auxílio da cinética química, foi possível compreender os mecanismos responsáveis pelas transformações químicas e prever quantitativamente estas transformações ao longo do tempo. As reações de primeira ordem observadas indicaram que a velocidade da reação depende da concentração do reagente, numa relação diretamente proporcional. Por outro lado, o fármaco foi estável quando exposto à degradação por hidrólise neutra.

Foi possível identificar e elucidar a estrutura de três produtos de degradação provenientes do IFA, formados a partir de condições alcalinas e um a partir de meio ácido, respectivamente: N-benzil-2-(oxo-2,3-dihidro-1H-imidazol-1-il)acetamida e N-benzil-2-(chloro-2,3-dihidro-1H-imidazol-1-il)acetamida.

Por meio deste trabalho, foi comprovado que o benznidazol pode vir a sofrer degradação quando exposto a condições não controladas, como, por exemplo, de armazenamento e transporte. Este dado é de extrema relevância uma vez que o Brasil é um dos principais produtores e exportadores mundiais dessa droga. Dessa forma, é fundamental que as indústrias brasileiras estejam familiarizadas com o processo de monitoramento dos produtos de degradação e do próprio fármaco durante a fabricação e comercialização do mesmo.

As perspectivas futuras para esse trabalho incluem a utilização de outras ferramentas analíticas, visando a elucidação estrutural dos compostos obtidos no estudo de degradação forçada, estudo da toxicidade e avaliação da atividade tripanocida destes produtos de degradação.

REFERÊNCIAS

ALEXANDRE, J. P. DE O.; TESTON, A. P. M.; JÚNIOR, G. Z. Tratamento etiológico da doença de Chagas : um antigo problema de saúde pública. **Revista UNINGÁ Review**, v. 20, p. 91–96, 2014.

ANSEL, H. C.; POPOVICH, N. G.; ALLEN-JR, L. V. **Farmacotécnica: formas farmacêuticas & sistemas de liberação de fármacos**. 8th ed. Porto Alegre: Artmed, 2007.

ARAGÃO, M. B. Domiciliação de triatomíneos ou pré-adaptação à antropofilia e à ornitofilia? **Revista de Saude Publica**, v. 17, n. 1, p. 51–55, 1983.

ARGOLO, A. M.; FELIX, M.; PACHECO, R.; COSTA, J. **Doença de Chagas e seus principais vetores no Brasil**. 2008.

BERN, C.; MONTGOMERY, S. P.; HERWALDT, B. L.; et al. Evaluation and Treatment of Chagas Disease in the United States. **JAMA**, v. 298, n. 18, p. 2171, 2007.

BRASIL. Resolução RE nº 1 de 29 de julho de 2005 - Determina o Guia para a Realização de Estudos de Estabilidade – Revoga o disposto na Resolução RE nº 398 de 12 de novembro de 2004. , 2005a. Brasília: Diário Oficial da União.

BRASIL. Concenso Brasileiro em Doença de Chagas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 38, n. 3, p. 1–29, 2005b. Secretaria de vigilância em saúde do ministério da saúde.

BRASIL. Farmacopeia Brasileira. , v. 2, n. 5, p. 1–899, 2010.

BRASIL. Resolução - RDC Nº 45 , de 9 de agosto de 2012 - Dispõe sobre a realização de estudos de estabilidade de insumos farmacêuticos ativos. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**, 2012. Brasília: Diário Oficial da União.

BRASIL. Resolução RDC nº 53, de 4 de dezembro de 2015. Estabelece parâmetros para a notificação, identificação e qualificação de produtos de degradação em medicamentos com substâncias ativas sintéticas e semissintéticas, classificados como novos, genéricos e simi. , 2015a. Brasília: Diário Oficial da União.

BRASIL. Guia para obtenção do perfil de degradação, e identificação e qualificação de produtos de degradação em medicamentos. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**, 2015b.

BRASIL. Resolução RDC nº 166 de julho de 2017 Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras p. , 2017. Brasília: Diário Oficial da União.

BRITTA, E. A.; SCARIOT, D. B.; FALZIROLLI, H.; et al. 4-Nitrobenzaldehyde thiosemicarbazone: a new compound derived from S-(-)-limonene that induces

mitochondrial alterations in epimastigotes and trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. **Parasitology**, v. 142, n. 7, p. 978–988, 2015.

BUSCHINI, A.; FERRARINI, L.; FRANZONI, S.; et al. Genotoxicity Reevaluation of Three Commercial Nitroheterocyclic Drugs: Nifurtimox, Benznidazole, and Metronidazole. **Journal of Parasitology Research**, v. 2009, p. 1–11, 2009.

CAMPOS, M. C. O.; LEON, L. L.; TAYLOR, M. C.; KELLY, J. M. Benznidazole-resistance in *Trypanosoma cruzi*: Evidence that distinct mechanisms can act in concert. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 193, n. 1, p. 17–19, 2014. Elsevier B.V.

CASS, Q. B.; DEGANI, A. L. G. **Desenvolvimento de métodos por HPLC fundamentos, estratégia e validação**. São Carlos:EdUFSCar, 2001.

CASSIANO, N. M.; BARREIRO, J. C.; MARTINS, L. R. R.; OLIVEIRA, R. V.; CASS, Q. B. Validação em métodos cromatográficos para análises de pequenas moléculas em matrizes biológicas. **Química Nova**, v. 32, n. 4, p. 1021–1030, 2009.

CASTRO, J. A.; MECCA, M. M. DE; BARTEL, L. C. Toxic side effects of drugs used to treat Chagas' disease (American trypanosomiasis). **Human & Experimental Toxicology**, v. 25, n. 8, p. 471–479, 2006.

CHAGAS, C. Nova tripanozomíase humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 1909.

CHERNUSHEVICH, I. V.; LOBODA, A. V.; THOMSON, B. A. SPECIAL FEATURE: An introduction to quadrupole – time-of-flight mass spectrometry. **JOURNAL OF MASS SPECTROMETRY**, p. 849–865, 2001.

CHIARADIA, M. C.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. **Química Nova**, v. 31, n. 3, p. 623–636, 2008.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de cromatografia**. Campinas: UNICAMP, 2006.

COSTA, M.; TAVARES, V. R.; AQUINO, M. V. M.; MOREIRA, D. B. Doença de chagas: uma revisão bibliográfica. , 2013.

COURA, J. R. Tripanosomose, doença de Chagas. **Ciência e Cultura**, v. 55, n. 1, p. 30–33, 2003.

COURA, J. R.; CASTRO, S. L. DE. A Critical Review on Chagas Disease Chemotherapy. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 1, p. 3–24, 2002.

CROTTI, A. E. M.; VESSECCHI, R.; LOPES, J. L. C.; LOPES, N. P. Espectrometria de massas com ionização por “Electrospray”: Processus químicos envolvidos na formação de íons de substâncias orgânicas de baixo peso molecular. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 287–292, 2006.

DIAS, J. C. Cecílio Romana, o sinal de Romana e a doença de Chagas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 30, n. 5, p. 407–413, 1997.

DIAS, J. C. P. Doença de Chagas e transfusão de sangue no Brasil : vigilância e desafios. **Revista Brasileira de hematologia**, v. 28, n. 2, p. 83–84, 2006.

DIAS, J. C. P. Globalização, iniquidade e doença de Chagas. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 23, n. suppl.1, p. S13–S22, 2007.

DIAS, J.; COURA, J. **Clínica e terapêutica da Doença de Chagas, uma abordagem prática para o clínico geral**. 1997.

DNDI. Disease & Projects. About Chagas Disease. Disponível em: <<http://www.dndi.org/diseases-projects/chagas/chagas-disease-background/>>. Acesso em: 29/3/2016.

FERREIRA, I.; SILVA, T. transmissão da doença de Chagas pelo *Triatoma infestans* no Brasil: um fato histórico; Transmission elimination of Chagas' disease by *Triatoma infestans*. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop**, v. 39, n. 5, p. 507–509, 2006.

FINAZZI, T. M.; INTEGRADAS, F.; IMACULADA, M.; et al. REVISÃO DAS LEGISLAÇÕES QUE VIGORAM SOBRE A ESTABILIDADE DOS MEDICAMENTOS NA INDÚSTRIA FARMACÊUTICA BRASILEIRA. , p. 21–38, 2013.

FIOCRUZ. Doença de Chagas. Disponível em: <<https://agencia.fiocruz.br/doença-de-chagas>>. Acesso em: 30/6/2016.
FOGLER, H. S. **Elements of Chemical Reaction Engineering**. Prentice Hall PTR, 1998.

FREITAS, N. C. C.; NASCIMENTO, A. P. Estudo de degradação forçada e avaliação da especificidade do método analítico para determinação de teor em atenolol comprimidos. **Revista de Ciências Farmaceuticas Basica e Aplicada**, v. 35, n. 2, p. 283–289, 2014.

GALVÃO, C. **Vetores da doença de Chagas no Brasil (Série Zoologia: guias e manuais de identificação/Sociedade Brasileira de Zoologia**. Curitiba: SciELO Books, 2014.

GALVÃO, C.; JUSTI, S. A. An overview on the ecology of Triatominae (Hemiptera:Reduviidae). **Acta Tropica**, v. 151, n. 1, p. 116–125, 2015. Elsevier B.V.

GIL, E. S.; BATISTA FILHO, R. O. P. Validação de Processos. In: E. Gil (Ed.); **Controle Físico-químico de qualidade de medicamentos**. 2nd ed., p.47–52, 2007a. São Paulo: Pharmabooks.

GIL, E. S.; BATISTA FILHO, R. O. P. Validação de Processos. **Controle físico-químico de qualidade de medicamentos**. 2nd ed., p.47–52, 2007b. São Paulo: Pharmabooks.

GLISH, G. L.; VACHET, R. W. The basics of mass spectrometry in the twenty-first century. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 2, n. 2, p. 140–150, 2003.

GONTIJO, E. D.; ANDRADE, G. M. Q.; SANTOS, S. E.; et al. Triagem neonatal da infecção pelo *Trypanosoma cruzi* em Minas Gerais, Brasil: transmissão congênita e mapeamento das áreas endêmicas. **Revista do Sistema Único de Saúde do Brasil**, v. 18, n. 3, p. 243–254, 2009.

GONZÁLEZ, O.; BLANCO, M. E.; IRIARTE, G.; et al. Bioanalytical chromatographic method validation according to current regulations, with a special focus on the non-well defined parameters limit of quantification, robustness and matrix effect. **Journal of Chromatography A**, v. 1353, p. 10–27, 2014. Elsevier B.V.

HARRIS, D. C. **No Title Análise Química Quantitativa**. 6th ed. Rio de Janeiro: LTC, 2005.

HOARE, CECIL A. Morphological and taxonomic studies of. **South African Journal Of Botany**, v. 11, n. 2, p. 200–207, 1986.

HOLCAPEK, M.; KOLAROVA, L.; NOBILIS, M. High-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry in the identification and determination of phase I and phase II drug metabolites. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 391, n. 1, p. 59–78, 2008.

HUGGINS, D. W.; MALTA, J.; MEDEIROS, L. B.; VASCONCELLOS, D.; JARDIM, E. Quadro Clínico. In: J. Malta (Ed.); **Doença de Chagas**. p.39–80, 1996. São Paulo: Sarvier.

IANNI, B. M.; MADY, C.; PAULO, S. Terapêutica da Forma Crônica da Doença de Chagas . É Eficaz o Tratamento Etiológico ? **Arq Bras Cardiol**, v. 70, n. n° 1, p. 59–61, 1998.

ICH. Guidance for industry Q1B photostability testing of new drug substances and products. **International Conference on Harmonization**, v. 62, n. November, p. 27115–27122, 1996.

ICH. ICH Topic Q 1 A Stability Testing Guidelines : Stability Testing of New Drug Substances and Products NOTE FOR GUIDANCE ON STABILITY TESTING : STABILITY. **International Conference on Harmonization**, , n. December 1993, 1998.

ICH. ICH Topic Q2 (R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. **International Conference on Harmonization**, v. 4, p. 17, 2005.

ICH. Guidance for Industry Q3A Impurities in New Drug Substances. **International Conference on Harmonization**, v. 2, p. 1–14, 2008. Disponível em:

<<http://www.fda.gov/cder/guidance/index.htm>%0A<http://www.fda.gov/cber/guidelines.htm>.%0A<https://www.fda.gov/ucm/groups/fdagov-public/@fdagov-drugs-gen/documents/document/ucm073385.pdf>>. .

IUPAC. IUPAC Compendium of Chemical Terminology. **International Union of Pure and Applied Chemistry**, 2014. Disponível em: <<http://goldbook.iupac.org>>. .

JENKE, D. R. Chromatographic Method Validation: A Review of Current Practices and Procedures. I. General Concepts and Guidelines. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 19, n. 5, p. 719–736, 1996.

KLIMCZAK, I.; GLISZCZYNSKA-WIGLO, A. Comparison of UPLC and HPLC methods for determination of vitamin C. **Food Chemistry**, v. 175, p. 100–105, 2015.

KORFMACHER, W. A. Principles and applications of LC-MS in new drug discovery. **Drug discovery today**, v. 10, n. 20, p. 1357–67, 2005.

KOSTIAINEN, R.; KOTIAHO, T.; KUURANNE, T.; AURIOLA, S. Liquid chromatography/atmospheric pressure ionization - Mass spectrometry in drug metabolism studies. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 38, n. 4, p. 357–372, 2003.

KROPF, P. Ciência, saúde e desenvolvimento: a doença de Chagas no Brasil. **Tempo**, v. 10, n. 19, p. 107–124, 2005.

LACHMAN, L.; LIEBERMEN, H. A.; KANIG, J. L. **Teoria e Prática na Indústria Farmacêutica**. 1st ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2001.

LANA, M. DE; TUFARI, W. L. Parasitologia Humana. In: D. P. Neves (Ed.); **Parasitologia Humana**. 12th ed., p.89–114, 2012. São Paulo: Atheneu.

LANÇAS, F. M. A cromatografia líquida moderna e a espectrometria de massas: Finalmente “compatíveis”? **Scientia Chromatographica**, v. 5, n. 1, p. 27–46, 2009.

LARANJA, F. S.; DIAS, E.; NOBREGA, G. Clínica e terapêutica da doença de Chagas. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 46, n. 2, p. 473–529, 1948.

LEE, M. J.; MONTE, S.; SANDERSON, J.; HASKINS, N. J. A Preliminary Study Using Fast Gradient Liquid Chromatography Coupled to a Quadrupole Orthogonal Time-of-flight Mass Spectrometer. **RAPID COMMUNICATIONS IN**

MASS SPECTROMETRY, v. 221, p. 216–221, 1999.

LEITE, F. Impurezas de Degradação. **Scientia Chromatographica**, v. v.1, p. 63–72, 2009.

LESCURE, F. X.; LOUP, G. LE; FREILIJ, H.; et al. Chagas disease: Changes in knowledge and management. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 10, n. 8, p. 556–570, 2010. Elsevier Ltd.

LIAC CENTRAL SOROLÓGICA. Ciclo do Trypanosoma cruzi no inseto vetor. Disponível em: <http://www.liacentralsorologica.com.br/noticias_chagas.html>. Acesso em: 3/4/2017.

LIM, C.-K.; LORD, G. Current developments in LC-MS for pharmaceutical analysis. **Biological & pharmaceutical bulletin**, v. 25, n. 5, p. 547–557, 2002.

LOPES, E. R.; CHAPADEIRO, E. Anatomia patológica da doença de chagas humana. **Clínica e terapêutica da doença de Chagas: uma abordagem prática para o clínico geral**, p. 486, 1997.

LUCAS, T. I.; BISHARA, R. H.; SEEVERS, R. H. A stability program for the distribution of drug products. **Pharmaceutical Technology**, v. 28, n. 7, p. 68–73, 2004.

MA, S.; ZHU, M. Chemico-Biological Interactions Recent advances in applications of liquid chromatography – tandem mass spectrometry to the analysis of reactive drug metabolites. **Chemico-Biological Interactions**, v. 179, p. 25–37, 2009.

MALDANER, L.; JARDIM, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia líquida de ultra eficiência. **Química Nova**, v. 32, n. 1, p. 214–222, 2009.

MANOEL-CAETANO, F. D. S.; SILVA, A. E. Implications of genetic variability of Trypanosoma cruzi for the pathogenesis of Chagas disease. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 23, n. 10, p. 2263–2274, 2007.

MARIN-NETO, J. A.; RASSI JR, A.; AVEZUM JR, A.; MATTOS, A. C.; RASSI, A. The BENEFIT trial: testing the hypothesis that trypanocidal therapy is beneficial for patients with chronic Chagas heart disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. suppl 1, p. 319–324, 2009.

MARTINS, L. P.; ROSA, J. A. DA; CASTANHO, R. E.; SAUNITI, G. L.; MEDEIROS, H. Susceptibilidade de Rhodnius neglectus, Rhodnius robustus et Triatoma infestans (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) à infecção por duas cepas de Trypanosoma cruzi (Kinetoplastidae, Trypanosomatidae) utilizando xenodiagnóstico artificial. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 33, n. 6, p. 559–563, 2000.

MATTHEWS, B. R. Regulatory Aspects of Stability Tests in Europe. , v. 25, n. 7, p. 831–856, 1999.

MEIRELLES, L. M. A. Estabilidade De Medicamentos: Estado. **Revista Eletrônica de Farmácia**, , n. 4, p. 6–26, 2014.

MINISTÉRIO DE SAÚDE. Boletim Epidemiológico. **Secretaria de Vigilância em saúde**, v. 46, n. 21, p. 1–9, 2015.

MIRCO, J.; ROCHA, M. S. **Estudo de estabilidade de medicamentos**, 2013. Centro de Pós Graduação Oswaldo Cruz.

MONCAYO, A. Progress Towards Interruption of Transmission of Chagas Disease. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, n. SUPPL. 1, p. 401–404, 1999.

MORAES-SOUZA, H.; FERREIRA-SILVA, M. M. O controle da transmissão transfusional Control of transfusional transmission. , v. 3, p. 64–67, 2011.

NGUYEN, D. T.-T.; GUILLARME, D.; RUDAZ, S.; VEUTHEY, J.-L. Fast analysis in liquid chromatography using small particle size and high pressure. **Journal of Separation Science**, v. 29, n. 12, p. 1836–1848, 2006.

NUDELMAN, N. S. **Estabilidade de Medicamentos**. Buenos Aires: El Ateneo, 1975.

OLIVEIRA, M. D. F.; NAGAO-DIAS, A. T.; DE, V. M. O. Tratamento etiológico da doença de chagas no Brasil. **Rev Patol Trop**, v. 37, n. 3, p. 209–228, 2008.

PALMEIRO-ROLDÁN, R.; FONSECA-BERZAL, C.; GÓMEZ-BARRIO, A.; et al. Development of novel benznidazole formulations: Physicochemical characterization and in vivo evaluation on parasitemia reduction in Chagas disease. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 472, n. 1–2, p. 110–117, 2014.

PARKER, E. R.; SETHI, A. Chagas Disease: Coming to a Place Near You. **Dermatologic Clinics**, v. 29, n. 1, p. 53–62, 2011.

PERDOMO, V. G.; RIGALLI, J. P.; VILLANUEVA, S. S. M.; et al. Modulation of biotransformation systems and ABC transporters by benznidazole in rats. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 10, p. 4894–4902, 2013.

PEREZ-MOLINA, J. A; PEREZ-AYALA, A.; MORENO, S.; et al. Use of benznidazole to treat chronic Chagas' disease: a systematic review with a meta-analysis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 64, n. 6, p. 1139–1147, 2009.

PRATA, A. **Carlos Chagas: Coletânea de trabalhos científicos**. Brasília: Universidade de Brasília, 1981.

PRIOTTI, J.; FERREIRA, M. J. G.; LAMAS, M. C.; et al. First solid-state NMR spectroscopy evaluation of complexes of benzimidazole with cyclodextrin derivatives. **Carbohydrate Polymers**, v. 131, p. 90–97, 2015. Elsevier Ltd.

RAIMUNDO JR, I. M.; PASQUINI, C. Espectrofotometria multicanal e arranjo de fotodiodos. **Química Nova**, v. 20, n. 1, p. 83–88, 1997.

RASSI, A.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas disease. **The Lancet**, v. 375, n. 9723, p. 1388–1402, 2010. Elsevier Ltd.

REY, L. **Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nos trópicos ocidentais**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

RIBANI, M. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. , v. 27, n. 5, p. 771–780, 2004.

RIBANI, M.; GRESPAN BOTTOLI, C. B.; COLLINS, C. H.; FONTES JARDIM, I. C. S.; COSTA MELO, L. F. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771–780, 2004.

RIBEIRO, R. D.; NETO, F. M. B.; JUNIOR, J. C. DO P.; ALBUQUERQUE, S. DE. Comportamento de formas sangüícolas do trypanosoma cruzi obtidas de camundondos utilizados como filtros biológicos, em cultura e em triatomíneo. **Rev. Saúde públ.**, v. 20, n. 2, p. 129–132, 1986.

RUSSELL, J. B. **Química Geral Vol. 2**. 2nd ed. São Paulo: Pearson Makron Books, 1994.

RUSSO, R.; GUILLARME, D.; NGUYEN, D. T.; et al. Pharmaceutical applications on columns packed with sub-2 micrometer particles. **Journal of chromatographic science**, v. 46, n. 3, p. 199–208, 2008.

SBC. **I Diretriz Latino-Americana para o Diagnóstico e Tratamento da Cardiopatia Chagásica**. 2011.

SCHMUNIS, G. A. La reforma del sector salud , descentralización , prevención y control de enfermedades transmitidas por vectores Health system , decentralization , and the control of vector-borne diseases. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 16, p. 117–123, 2000.

SERAFIM, E. O. P.; CHIN, C. M.; RIBEIRO, M. L.; ARAÚJO, D. DOS S. Abordagem da latenciação de fármacos como ferramenta para descoberta de novos antichagásicos. **Revista Uniara**, v. 14, n. 1, p. 140–157, 2011.

SILVA, J. J. N.; THIEMANN, O. H.; OLIVA, G.; ANDRICOPULO, A. D. Quimioterapia da doença de Chagas: estado da arte e perspectivas no desenvolvimento de novos fármacos. **Quim. Nova**, v. 32, n. 9, p. 2444–2457, 2009.

SILVA, K. E. R.; ALVES, L. D. S. .; SOARES, M. F. R. .; et al. Modelos de Avaliação da Estabilidade de Fármacos e Medicamentos para a Indústria Farmacêutica. **Revista de Ciências Farmaceuticas Basica e Aplicada**, v. 30, n. 2, p. 129–135, 2009.

SINGH, S.; HANDA, T.; NARAYANAM, M.; et al. A critical review on the use of modern sophisticated hyphenated tools in the characterization of impurities and degradation products. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 69, p. 148–173, 2012. Elsevier B.V.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; GLACH, J. L. **Practical HPLC method development**. 2nd ed. Wiley Interscience, 1997.

SOUSA, M. A. DE. Morphobiological Characterization of *Trypanosoma cruzi* Chagas , 1909 and its Distinction from other Trypanosomes. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 94, n. 1, p. 205–210, 1999.

TONHI, E.; COLLINS, K. E.; JARDIM, I. C. S. F.; COLLINS, C. H. Fases estacionárias para cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR) baseadas em superfícies de óxidos inorgânicos funcionalizados. **Quimica Nova**, v. 25, n. 4, p. 616–623, 2002.

TONIN, L. T. D.; PANICE, M. R.; NAKAMURA, C. V.; et al. Antitrypanosomal and antileishmanial activities of novel N-alkyl-(1-phenylsubstituted-??-carboline)-3-carboxamides. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 64, n. 6, p. 386–389, 2010.

TORRES, C. M. Sobre a anatomia patológica da doença de Chagas. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 36, n. 3, p. 391–404, 1941.

TROCHINE, A.; CREEK, D. J.; FARAL-TELLO, P.; BARRETT, M. P.; ROBELLO, C. Benznidazole Biotransformation and Multiple Targets in *Trypanosoma cruzi* Revealed by Metabolomics. (M. P. Pollastri, Ed.) **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 5, p. e2844, 2014.

VALDEZ, R. H.; TONIN, L. T. D.; UEDA-NAKAMURA, T.; et al. In Vitro and In Vivo Trypanocidal Synergistic Activity of N-Butyl-1-(4-Dimethylamino)Phenyl-1,2,3,4-Tetrahydro- -Carboline-3-Carboxamide Associated with Benznidazole. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, p. 507–512, 2012.

VILLELA, M. M.; CATALÁ, S.; JUBERG, J.; SILVA, I. G.; DIAS, J. C. P. Patterns of antennal sensilla of *Panstrongylus megistus* from three Brazilian states. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 7, p. 699–702, 2005.

WHO. Chagas Disease (American Trypanosomiasis). Fact Sheet. Disponível em: <<http://www.who.int/chagas/epidemiology/en/>>. Acesso em: 22/1/2018.

WILLIAMSON, L. N.; BARTLETT, M. G. Quantitative liquid chromatography / time-of-flight mass spectrometry. **Biomedical Chromatography**, p. 567–576, 2007.