



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA

JOSÉ IZAK RIBEIRO DE ARAÚJO

**ESTUDO DE ESTABILIDADE E AVALIAÇÃO DA CINÉTICA DE DEGRADAÇÃO
OXIDATIVA DO FÁRMACO POSACONAZOL**

Recife
2017

JOSÉ IZAK RIBEIRO DE ARAÚJO

**ESTUDO DE ESTABILIDADE E AVALIAÇÃO DA CINÉTICA DE DEGRADAÇÃO
OXIDATIVA DO FÁRMACO POSACONAZOL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica, Área de Concentração: Fármacos, Medicamentos e Insumos Essenciais para a Saúde, da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Inovação Terapêutica.

Orientador: Prof. Dr. José Lamartine Soares
Sobrinho

Coorientador: Prof. Dr. Danilo César Galindo
Bedor

**Recife
2017**

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Araújo, José Izak Ribeiro de

Estudo de estabilidade e avaliação da cinética de degradação oxidativa do fármaco Posaconazol / José Izak Ribeiro de Araújo. – 2017.

103 f. : il.

Orientador: José Lamartine Soares Sobrinho.

Coorientador: Danilo César Galindo Bedor.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Inovação Terapêutica, Recife, 2017. Inclui referências.

1. Farmacologia 2. Farmacocinética 3. Chagas, doença de I. Soares Sobrinho, José Lamartine (orientador) II. Bedor, Danilo César Galindo (coorientador) III. Título.

615.1

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2018 - 076

JOSÉ IZAK RIBEIRO DE ARAÚJO

**ESTUDO DE ESTABILIDADE E AVALIAÇÃO DA CINÉTICA DE DEGRADAÇÃO
OXIDATIVA DO FÁRMACO POSACONAZOL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica, Área de Concentração: Fármacos, Medicamentos e Insumos Essenciais para a Saúde, da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Inovação Terapêutica.

Aprovada em: 31/03/2017

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. José Lamartine Soares Sobrinho
(Universidade Federal de Pernambuco – Presidente e Examinador Interno)

Prof. Dr. Pablo Lopes Queiroz
(Universidade Federal da Paraíba – Examinador Externo)

Prof. Dr. Leslie Raphael de Moura Ferraz
(Faculdade Maurício de Nassau – Examinador Externo)

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus por ter me concedido a oportunidade de avançar profissionalmente e amadurecer pessoalmente no decorrer dessa jornada.

À minha família pelo o apoio e carinho em todos os momentos, em especial os meus pais, Ivanildo Araújo e Joilda Araújo; meus irmãos, Jonas Araújo e Lidjane Fernandes; meus tios com status de pais de coração, José Fernandes e Lindalva Araújo minha eterna gratidão.

Aos meus orientadores José Lamartine e Danilo Bedor por todas as contribuições científicas e empenho para que tecnicamente houvesse suporte para o desenvolvimento deste trabalho.

À professora Mônica Felts pela prontidão em disponibilizar os consumíveis para execução experimental.

À professora Larissa Rolim pelas valiosas contribuições e suporte analítico através do Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais e Sintéticos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP (Ribeirão Preto).

À todos que fazem parte do Núcleo de Desenvolvimento Farmacêutico e Cosmético (NUDFAC) e ao Laboratório de Tecnologia de Medicamentos (LTM) pela disponibilidade instrumental.

Aos amigos de trabalho do Núcleo de Controle de Qualidade de Medicamentos e Correlatos (NCQMC) pelas experiências vivenciadas e pelo acolhimento, Hannah Lyra, João Pontes, Maria Luiza, Thaisa Cardoso, Janira Alves, Lucas Danda, Felipe Marinho, Camila Barros, Amanda Quintas, Camila Figueiredo, obrigado por estarmos juntos nessa caminhada.

À Daniela Nadvorny pelo desenvolvimento dos estudos teóricos computacionais e pela boa companhia diária no laboratório.

Aos meus amigos Roseilton dos Santos, Letícia dos Santos e Alex de Deus pelas conversas e incentivos.

À minhas amigas de longa data Amanda Damasceno e Dayanne Casimiro por se fazerem presentes em todos os momentos dessa caminhada com generosidade e participação na discussão de idéias que me fizeram amadurecer cientificamente e pessoalmente.

Aos amigos Roberto Amando e Robersson Amando pela disponibilidade em ajudar, pelas palavras de apoio e pelos bons almoços de fim de semana.

Ao PPGIT, especialmente ao secretário Paulo Brito.

À FACEPE, pelo suporte financeiro.

À UFPE e ao contribuinte brasileiro.

“As grandes ideias encontram embaraços no seu começo”.

Pe. Marco Túlio Cícero

RESUMO

O posaconazol (POS) é um antifúngico pertencente a classe dos derivados triazólicos indicado para o tratamento de infecções fúngicas sistêmicas. Apresenta-se como alternativa promissora para o tratamento da doença de Chagas. Na busca de terapias com menor incidência de reações adversas, decorrentes do uso prolongado do agente terapêutico, o POS poderá compor novas formulações. Para obtenção de novos medicamentos, contendo apenas o POS ou em associação com outros fármacos é necessário um estudo para avaliar a estabilidade do princípio ativo isolado. Esse trabalho teve como objetivo avaliar a estabilidade através da condução de testes de degradação forçada para demonstrar a susceptibilidade do POS a uma série de condições e estabelecer um método indicativo de estabilidade que possa monitorar o decaimento do teor do POS, bem como detectar a presença de produtos de degradação e avaliar a cinética de degradação sob essas condições. O estudo de degradação forçada foi conduzido através da submissão do fármaco à hidrólise ácida (HCl) e básica (NaOH), oxidação (H_2O_2) e termólise à 85°C em estufa. As amostras foram avaliadas por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD) através da adaptação de um método indicativo de estabilidade desenvolvido composto por coluna C8 à 25°C, fase móvel MeOH:H₂O (75:25) com fluxo de 1 mL/ min em modo isocrático, volume de injeção 20µL. O POS foi considerado estável após as hidrólises ácida (HCl), básica (NaOH) e a termólise, sendo degradado em meio oxidativo (H_2O_2). As amostras submetidas ao meio oxidativo foram caracterizadas por espectrometria de massas de alta resolução (EMAR) com ionização por *electrospray* positivo e analisador de massas híbrido com quadrupolo e tempo de voo (ESI-QTOF), onde foi possível detectar as massas de 717 *m/z* e 733 *m/z* referentes aos produtos de degradação. Através dos métodos computacionais foi possível confirmar a rota degradação do POS com *locus* de decomposição no anel piperazina da molécula. Avaliou-se sua cinética de degradação para definir a ordem de reação em diferentes concentrações de (H_2O_2) à 0,6%(v/v); 1,2%(v/v) e 2,4%(v/v) à 25°C e na temperatura de 45°C em meio (H_2O_2) à 1,2%(v/v), bem como em pH 2,5; pH 5,0 e pH 7,5 em meio (H_2O_2) à 1,2%(v/v). A reação foi caracterizada como de segunda ordem para todas as condições. A partir dessa análise foi possível definir a constante de velocidade para cada condição (*k*) e o cálculo dos parâmetros cinéticos de meia-vida ($T_{1/2}$) e período de vida útil ($T_{90\%}$), onde foi verificado a redução dos valores obtidos para esses parâmetros de forma não proporcional à medida que se aumentava a concentração de (H_2O_2), a

temperatura e o meio oxidativo se tornava menos ácido. Este trabalho demonstra-se eficiente ao permitir delinear um perfil de estabilidade para o POS, através do método analítico estabelecido. À partir dos dados da cinética de degradação é possível direcionar o controle de processos para inibir instabilidades nas formulações vindouras.

Palavras-chave: Produtos de degradação. Cinética de decomposição. Ordem de reação.

ABSTRACT

Posaconazole (POS) is an antifungal belonging to the class of triazole derivatives indicated for the treatment of systemic fungal infections. It is presented as a promising alternative for the treatment of Chagas' disease. In the search for therapies with lower incidence of adverse reactions, resulting from the prolonged use of the therapeutic agent, the POS can compose new formulations. To obtain new drugs containing only the POS or in combination with other drugs, a study is needed to evaluate the stability of the isolated active principle. The objective of this work was to evaluate stability by conducting forced degradation tests to demonstrate the susceptibility of the POS to a series of conditions and to establish an indicative stability method that can monitor the decay of the POS content, as well as to detect the presence of degradation products and to evaluate degradation kinetics under these conditions. The forced degradation study was conducted by subjecting the drug to acid hydrolysis (HCl) and basic (NaOH) oxidation (H_2O_2) and thermolysis at 85°C in an oven. The samples were evaluated by high performance liquid chromatography with diode array detector (CLAE-DAD) by adapting a method of stability developed composed of C8 column at 25°C , mobile phase MeOH: H_2O (75:25) with flow of 1 mL/min in isocratic mode, injection volume $20\mu\text{L}$. The POS was considered stable after acid hydrolysis (HCl), basic (NaOH) and thermolysis, being degraded in an oxidative medium (H_2O_2). The samples submitted to the oxidative medium were characterized by high resolution mass spectrometry (HRMS) with ionization by electrospray positive and hybrid mass analyzer with quadrupole and flight time (ESI-QTOF), where it was possible to detect the masses of 717 m/z e 733 m/z for the degradation products. Through the computational methods it was possible to confirm the route degradation of the POS with decomposition locus in the piperazine ring of the molecule. Its degradation kinetics were evaluated to determine the order of reaction at different concentrations of (H_2O_2) at 0.6% (v/v); 1.2% (v/v) and 2.4% (v/v) at 25°C and at 45°C in 1.2% (v/v) medium (H_2O_2) as well as at pH 2.5; pH 5.0 and pH 7.5 in 1.2% (v/v) medium (H_2O_2). The reaction was characterized as second order for all conditions. From this analysis it was possible to define the velocity constant for each condition (k) and the kinetic parameters of the half-life ($T_{1/2}$) and the useful life ($T_{90\%}$), for these parameters in a non-proportional manner as the (H_2O_2) concentration was increased, the temperature and the oxidative medium became less acidic. This work proves to be efficient in allowing the delineation of a stability profile for the POS, through the established analytical

method. From the data of degradation kinetics it is possible to direct the control of processes to inhibit instabilities in the coming formulations.

Key-words: Degradation products. Kinetics of decomposition. Order of reaction.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Estruturas químicas dos fármacos itraconazol e posaconazol	29
Figura 2- Estrutura cristalina da enzima esterol 14-alfa desmetilase (CYP51) de <i>Trypanosoma cruzi</i> complexada com o posaconazol.	31
Figura 3- Cromatogramas: (a) branco das amostras; (b) padrão; (c) amostras submetidas a HCl 0,4M; (d) amostras submetidas a HCl 2,0M.....	65
Figura 4- Cromatogramas: (a) branco das amostras; (b) padrão; (c) amostras submetidas a NaOH 0,4M; (d) amostras submetidas a NaOH 2,0 M.	66
Figura 5- Proposta de rota de degradação do POS por hidrólise ácida e básica.....	67
Figura 6- Cromatograma do POS após exposição ao calor seco à 85°C durante 120 h.....	68
Figura 7- Cromatogramas: (a) branco das amostras; (b) padrão; (c) amostras submetidas a H ₂ O ₂ 1,2%, 25°C.....	69
Figura 8- Avaliação dos teores do POS, produto de degradação e balanço de massas obtido após a oxidação em solução de H ₂ O ₂ a 1,2% nos tempos de 0; 9; 24; 35; 48; 57; 72; 81 horas.	70
Figura 9- Produtos de degradação oxidativa do POS.....	71
Figura 10- Espectro de massas em ESI ⁺ da amostra de POS, após degradação em H ₂ O ₂ 1,2%, 25°C por 24 h.....	72
Figura 11- Espectros de massas em sequencial (EM/EM), modo ESI ⁺ , da amostra padrão de POS submetida a diferentes energias de colisão: 40 eV, 45 eV e 50 eV, respectivamente.....	73
Figura 12- Fragmentação estrutural do POS via EM/EM.	74
Figura 13- Reação de oxidação por peróxido de hidrogênio do composto nitrogenado A. ...	75
Figura 14- Provável mecanismo de ação de formação dos produtos de degradação	76
Figura 15- Representação gráfica das cinéticas de ordem zero (a), primeira ordem (b) e segunda ordem (c) para a degradação de POS submetido a estresse oxidativo (H ₂ O ₂ 1,2%, 25°C).	78
Figura 16- Representação gráfica das cinéticas de ordem zero (a), primeira ordem (b) e segunda ordem (c) para a degradação de POS submetido a estresse oxidativo (H ₂ O ₂ 0,6%, 25°C).	80
Figura 17- Representação gráfica das cinéticas de ordem zero (a), primeira ordem (b) e segunda ordem (c) para a degradação de POS submetido a estresse oxidativo (H ₂ O ₂ 2,4%, 25°C).	80
Figura 18- Representação gráfica das cinéticas de ordem zero (a), primeira ordem (b) e segunda ordem (c) para a degradação de POS submetido a estresse oxidativo (H ₂ O ₂ 1,2%, 45°C).	83

Figura 19- Representação gráfica das cinéticas de ordem zero (a), primeira ordem (b) e segunda ordem (c) para a degradação de POS submetido a estresse oxidativo (H_2O_2 1,2%, 25°C, pH 2,5).	86
Figura 20- Representação gráfica das cinéticas de ordem zero (a), primeira ordem (b) e segunda ordem (c) para a degradação de POS submetido a estresse oxidativo (H_2O_2 1,2%, 25°C, pH 5,0).	86
Figura 21- Representação gráfica das cinéticas de ordem zero (a), primeira ordem (b) e segunda ordem (c) para a degradação de POS submetido a estresse oxidativo (H_2O_2 1,2%, 25°C, pH 7,5).	87
Figura 22- Representação gráfica das cinéticas de ordem zero (a), primeira ordem.....	89
Figura 23- Análise do orbital de fronteira do POS.....	89

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Parâmetros de condução para realização dos estudos de estabilidade acelerada e de longa duração.....	33
Tabela 2- Limites de notificação, identificação e qualificação do (s) produtos (s) de degradação no decorrer do estudo de estabilidade.....	36
Tabela 3- Testes realizados para avaliar a degradação de POS.....	57
Tabela 4- Parâmetros cromatográficos.	60
Tabela 5- Testes realizados para avaliar a cinética de degradação de POS.....	63
Tabela 6- Resultados da adequação do sistema para POS e os PD's nas condições de estresse.	70
Tabela 7- Dados das áreas médias, valores de C, Log C e 1/C adquiridos em análise da solução de POS submetida a estresse oxidativo (H ₂ O ₂ 1,2%, 25°C), para a construção de gráficos e definição de ordem de reação	77
Tabela 8- Dados das áreas médias obtidas no tempo zero e após exposição, concentração, Log C e 1/C adquiridos em análise da solução de matéria-prima do POS submetida a estresse oxidativo (H ₂ O ₂ 0,6%, 25°C).	79
Tabela 9- Dados das áreas médias obtidas no tempo zero e após exposição, concentração, Log C e 1/C adquiridos em análise da solução de matéria-prima do POS submetida a estresse oxidativo (H ₂ O ₂ 2,4%, 25°C).	79
Tabela 10- Teor de POS após degradações oxidativas	81
Tabela 11- Parâmetros cinéticos calculados para POS.....	81
Tabela 12- Dados das áreas médias obtidas no tempo zero e após exposição, concentração, Log C e 1/C adquiridos em análise da solução de matéria-prima do POS submetida a estresse oxidativo (H ₂ O ₂ 3%, 45°C).	82
Tabela 13- Parâmetros cinéticos calculados para a solução de POS.	84
Tabela 14- Dados das áreas médias obtidas no tempo zero e após exposição, concentração, Log C e 1/C adquiridos em análise da solução de matéria-prima de POS submetida à estresse oxidativo (H ₂ O ₂ 1,2%; 25°C; pH 2,5)	84
Tabela 15- Dados das áreas médias obtidas no tempo zero e após exposição, concentração, Log C e 1/C adquiridos em análise da solução de matéria-prima de POS submetida à estresse oxidativo (H ₂ O ₂ 1,2%; 25°C; pH 5,0)	85

Tabela 16- Dados das áreas médias obtidas no tempo zero e após exposição, concentração, Log C e 1/C adquiridos em análise da solução de matéria-prima de POS submetida à estresse oxidativo (H₂O₂ 1,2%; 25°C; pH 7,5) 85

Tabela 17- Parâmetros cinéticos calculados para a solução de POS. 87

LISTA DE QUADROS

Quadro 1- Características físico-químicas do posaconazol.....	30
Quadro 2- Diretrizes do ICH para a condução dos testes de degradação.....	35
Quadro 3- Expressões matemática que definem as ordens de reação.	43
Quadro 4- Expressões matemáticas que definem os parâmetros cinéticos das reações.	43
Quadro 5- Métodos analíticos aplicados ao posaconazol.....	44
Quadro 6- Impurezas de síntese do POS.....	50
Quadro 7- Produtos de degradação do POS.	52
Quadro 8- Reagentes utilizados nas análises.	56

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	- Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BNZ	- Benznidazol
CLAE	- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLUE	- Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência
DAD	- Detector de Arranjo de Diodos
DC	- Doença de Chagas
EM	- Espectrometria de Massas
ESI	- <i>Electrospray</i>
FDA	- <i>Food and Drug Administration</i>
HOMO	- <i>Highest Occupied Molecular Orbital</i>
ICH	- <i>International Conference of Harmonization</i>
IFA	- Insumo Farmacêutico Ativo
MIE	- Método Indicativo de Estabilidade
NFX	- Nifurtimox
OPAS	- Organização Pan-americana de Saúde
PD	- Produto de degradação
POS	- Posaconazol
QTOF	- <i>Quadrupole Time of Flight</i>
RMN	- Ressonância Magnética Nuclear
UV	- Ultravioleta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 OBJETIVOS	22
2.1 OBJETIVO GERAL.....	22
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
3 REVISÃO DE LITERATURA	24
3.1 DOENÇA DE CHAGAS: AGENTE ETIOLÓGICO, VETORES E FORMAS DE TRANSMISSÃO	24
3.1.1 Ciclo biológico.....	24
3.1.2 Manifestações clínicas	25
3.1.3 Epidemiologia	25
3.1.4 Tratamento	27
3.2 POSACONAZOL	29
3.3 ESTABILIDADE.	32
3.3.1 Testes de degradação forçada	34
3.3.2 Condições de degradação	36
3.3.2.1 Hidrólise ácida e básica	37
3.3.2.2 Degradação oxidativa	37
3.3.2.3 Degradação termolítica	38
3.4 MÉTODO INDICATIVO DE ESTABILIDADE	38
3.5 OTIMIZAÇÃO NA ELABORAÇÃO DOS TESTES DE DEGRADAÇÃO FORÇADA...39	
3.6 USO DE TÉCNICAS COMPLEMENTARES	40
3.6.1 Ferramentas computacionais.....	40
3.6.2 Técnicas hifenadas	41
3.6.3 Avaliação do balanço de massas	41
3.7 CINÉTICA DE DEGRADAÇÃO	42
3.8 ESTADO DA ARTE DOS ESTUDOS DE ESTABILIDADE DO POSACONAZOL	44
4 MATERIAL E MÉTODOS	56
4.1 REAGENTES	56
4.2 EQUIPAMENTOS	56
4.3 ENSAIOS DOS TESTES DE DEGRADAÇÃO FORÇADA.....	57
4.3.1 Soluções de degradação	57
4.4 MÉTODO INDICATIVO DE ESTABILIDADE	57

4.4.1 Preparo da fase móvel	58
4.4.2 Preparo do padrão	58
4.4.3 Preparo das amostras	58
4.4.3.1 Degradação oxidativa	58
4.4.3.2 Degradação hidrolítica ácida.	59
4.4.3.3 Degradação hidrolítica básica	59
4.4.3.4 Degradação termolítica	60
4.5 PARÂMETROS CROMATOGRÁFICOS	60
4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	60
4.7 CARACTERIZAÇÃO DOS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS.	61
4.7.1 Parâmetros de análise	61
4.7.2 Preparo das amostras	61
4.7.2.1 Padrão.	61
4.7.2.2 Degradação oxidativa	61
4.8 ESTUDO DA CINÉTICA DE DEGRADAÇÃO	62
4.9 DELINEAMENTO DOS ESTUDOS COMPUTACIONAIS	63
5 RESULTADOS	65
5.1 ESTUDOS DE DEGRADAÇÃO DO POSACONAZOL	65
5.2 PARÂMETROS CROMATOGRÁFICOS	69
5.3 AVALIAÇÃO DO BALANÇO DE MASSAS	70
5.4 CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DOS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO	71
5.4.1 Espectrometria de massas	71
5.5 AVALIAÇÃO DOS MECANISMOS DE REAÇÃO OXIDATIVA.	75
5.6 ESTUDO DA CINÉTICA DE DEGRADAÇÃO: DEFINIÇÃO DA ORDEM DE REAÇÃO.	77
5.6.1 Análise de variação da concentração de H₂O₂	77
5.6.2 Variação da temperatura	82
5.6.3 Efeito do pH sobre a oxidação	84
5.7 DELINEAMENTO DE ESTUDOS COMPUTACIONAIS	88
6 CONCLUSÃO	92
7 PERSPECTIVAS	94
REFERÊNCIAS	96

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Um dos requisitos para a obtenção do registro de um medicamento concedido pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) são os estudos de estabilidade, uma vez que a estabilidade é dependente de fatores intrínsecos (características físico-químicas dos ativos e a interação com os excipientes) e extrínsecos (fatores ambientais como umidade, temperatura), é necessário a realização de testes recomendados por guias internacionais e regulamentados pelas agências de controle sanitário com o intuito de acompanhar o comportamento do fármaco ou produto acabado à condições especiais de armazenamento (BRASIL, 2005; BRASIL, 2015).

Esse monitoramento é importante pois a instabilidade do fármaco ou do produto acabado pode gerar produtos de degradação que podem induzir a ineficácia ou redução dos efeitos terapêuticos previstos, bem como proporcionar riscos à segurança do paciente em razão da susceptibilidade a toxicidade. Para avaliar o perfil dos produtos de degradação de um fármaco é necessário submetê-lo aos testes de degradação forçada, que consiste na submissão do mesmo a condições mais drásticas que o estudo de degradação acelerado (SINGH *et al.*, 2013; RAO *et al.*, 2015).

A execução desses testes é um grande desafio para o setor analítico, uma vez que os guias e as resoluções trazem apenas explicações gerais de como conduzir os experimentos, pois cada fármaco possui características estruturais particulares que o torna especificamente susceptível a determinada condição, a partir daí os ensaios são direcionados. Esses testes são a base para o desenvolvimento do método indicativo de estabilidade que será a ferramenta analítica capaz de quantificar o decaimento do teor do fármaco bem como separar e identificar os produtos de degradação advindo do insumo farmacêutico ativo ou dos excipientes no caso do produto acabado (ALSANTE *et al.*, 2007; HUYNH-BA, 2009).

Com o método estabelecido e conforme a susceptibilidade do fármaco a determinada condição é possível realizar o estudo da cinética de degradação em que a influência de fatores como: concentração dos reagentes, temperatura, pH, dentre outros podem ser avaliados para estabelecer quais os parâmetros são críticos na definição da velocidade de reação, a compreensão desse tema permite um controle mais eficiente de processos, a escolha de veículos para a composição de formulações mais estáveis, bem como a orientação aos usuários sobre as condições ideais de armazenamento (SINKO, 2008; ALCÂNTARA *et al.*, 2013).

Com a finalidade de compreender a estabilidade do posaconazol, um dos fármacos promissores para amenizar os efeitos adversos do tratamento da doença de Chagas, este trabalho visou adaptar um método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD) desenvolvido por Garcia *et al.*, (2012), analisando se o mesmo é indicativo de estabilidade, além de utilizar outra técnica analítica para identificação dos produtos de degradação gerados nos ensaios forçados. Para tanto foi utilizada a espectrometria de massas de alta resolução (*high resolution mass spectrometry* – HRMS) com ionização por *electrospray* em modo positivo e analisador de massas sequencial no espaço quadrupolo e tempo de voo (ESI-QTOF), com o intuito de caracterizar os produtos de degradação através da elucidação estrutural e a partir dessas informações estabelecer as premissas da rota de degradação do fármaco. Por fim o trabalho tem como objetivo avaliar a cinética de degradação do fármaco, uma vez que não existe relato na literatura sobre o tema que é fundamental na construção do perfil de estabilidade.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a estabilidade e definir a cinética de degradação do fármaco posaconazol.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Realizar os estudos de degradação forçada do Posaconazol em diferentes condições de estresse (hidrólise ácida e básica, oxidação e degradação térmica);
- b) Estabelecer um método indicativo de estabilidade por CLAE-DAD;
- c) Caracterizar os produtos de degradação obtidos por degradação oxidativa via espectrometria de massas (QTOF);
- d) Determinar a cinética de degradação oxidativa do fármaco POS, através da variação dos parâmetros: concentração de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), temperatura e pH;
- e) Delinear estudos computacionais para corroborar os mecanismos de degradação citados na literatura e propostos neste trabalho.

REVISÃO DE LITERATURA

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 DOENÇA DE CHAGAS: AGENTE ETIOLÓGICO, VETORES E FORMAS DE TRANSMISSÃO

A doença de Chagas (DC) é causada pelo protozoário *Trypanossoma cruzi*, sendo a principal forma de transmissão através dos insetos hematófagos de hábitos noturnos popularmente conhecido como barbeiro, os quais podem transmitir a DC para mais de 150 espécies entre animais domésticos e selvagens (ZELEDÓN, 1981; RASSI, 2010).

Taxonomicamente são classificados pertencentes a ordem Hemiptera, família Reduviidae, subfamília Triatominae. Embora mais de 130 espécies de triatomíneos já foram identificadas, um número reduzido possui a capacidade de transmitir o *T. cruzi*. As espécies *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus* e *Triatoma dimidiata* são as mais recorrentes em relação a transmissão humana que também pode ocorrer de forma não-vetorial, através da transfusão sanguínea, transplante de órgãos, via congênita e oral através da ingestão de dejetos dos insetos em alimentos (ZELEDÓN, 1981; RASSI, 2010).

3.1.1 Ciclo biológico

O ciclo de vida do parasita é heteroxênico possuindo estágios de desenvolvimento no inseto (hospedeiro invertebrado) e no (hospedeiro vertebrado) homem ou em outros animais. No hospedeiro intermediário a forma tripomastigota se transforma em forma epimastigota e reproduz-se por divisão binária no intestino médio do vetor, em seguida transforma-se em tripomastigota metacíclico. No momento em que o inseto suga o sangue do homem ele enche o seu intestino e permite o deslocamento das fezes que entram em contato com a pele, onde, após leve fricção no local, a forma infectante consegue penetrar nas camadas da epiderme e da derme, promovendo o recrutamento de lisossomos das células hospedeiras. A partir daí consegue penetrar-las, posteriormente escapam dos vacúolos lisossomais no interior dessas células, se transformam em forma amastigota e se multiplicam por divisão binária, depois de intensa multiplicação retornam ao estágio de tripomastigota promovendo a lise das células hospedeiras e se dispersam através dos vasos sanguíneos e linfáticos onde se instalam principalmente em células musculares (cardíacas, lisas e esqueléticas) e ganglionares, onde são submetidas a novos ciclos intracelulares e depois de anos podem comprometer principalmente o funcionamento do sistema digestivo e cardíaco (NEVES, 2009; RASSI, 2010).

3.1.2 Manifestações clínicas

Do ponto de vista clínico é possível dividir a DC em duas fases a aguda e a crônica. A primeira abrange um período entre 4-8 semanas podendo ser sintomática ou assintomática, sendo a última mais frequente porque a carga parasitária em geral é pequena, de qualquer forma a evolução dos sintomas ocorrerá em detrimento do estado imunológico do hospedeiro. Uma das manifestações locais da fase aguda é o edema local na região do corpo onde houve a penetração do parasita, denominada sinal de Romaña, quando localizado na região bipalpebral ou chagoma de inoculação em outras partes do corpo. De uma forma geral os sintomas são febre, poliadenia, hepatomegalia, esplenomegalia e em menor frequência insuficiência cardíaca congestiva e perturbações neurológicas (MONCAYO, 2003; NEVES, 2009; RASSI, 2010).

Igualmente, a forma crônica pode ser assintomática (indeterminada) ou sintomática. A primeira é caracterizada pela ausência de sinais ou sintomas, onde os exames de imagem de órgãos do sistema digestivo e cardíaco apresentam-se normais. Já a forma sintomática é decorrente da mudança da fisionomia de tecidos da musculatura lisa e cardíaca ao longo de vários anos de latência do parasita, ocasionando o comprometimento do funcionamento dos órgãos do sistema cardíaco e digestivo (NEVES, 2009; RASSI, 2010; MARIN-NETO *et al.*, 2013).

3.1.3 Epidemiologia

Segundo estimativa da Organização Mundial da Saúde, cerca de 6-7 milhões de pessoas no mundo, abrangendo 21 países, principalmente na América Latina, podem estar infectadas com *Trypanosoma cruzi*, parasita causador da DC. Nas últimas décadas, no entanto, devido aos intensos fluxos migratórios de latino americanos, tem sido cada vez mais detectada nos Estados Unidos, Canadá, Europa e alguns países ocidentais do Pacífico, o que acarreta uma série de riscos nesses países que não são endêmicos e por isso possuem pouca experiência no controle de bancos de sangue para o diagnóstico de possíveis doadores infectados, uma vez que são necessários controles adicionais para evitar a transmissão por transfusão sanguínea, bem como a necessidade de cuidados médicos diferenciados já que os infectados podem vir a ter complicações cardíacas e digestivas (SCHUMINIS, 2007; COURA, 2010; OMS, 2016).

É de suma importância a conscientização da DC em áreas não endêmicas para que os gestores de saúde possam planejar estratégias de controle nas fontes potenciais de transmissão (transfusão sanguínea, transplante de órgãos e congênita), propiciar o diagnóstico

assertivo para casos suspeitos de forma a iniciar o quanto antes um tratamento terapêutico que proporcione uma melhor qualidade de vida para as pessoas infectadas. As demandas para o controle, diagnóstico e terapêutica eficazes deixam de ser vistas apenas como uma necessidade dos países endêmicos e passam a se tornar globais (SCHUMINIS, 2007; TANOWITZ, *et al.* 2011).

No Brasil, após a redução da população de vetores e dos casos de transmissão por transfusão o número de casos da forma aguda da doença reduziu significativamente. Ainda assim estima-se que entre 2-3 milhões de pessoas são portadoras da doença em sua forma crônica, com um registro de aproximadamente 58.928 óbitos entre os anos de 2000-2011. A doença de chagas é responsável por 76,7% de todos os casos de mortes por doenças tropicais negligenciadas, seguida da esquistossomose e leishmaniose com (6.319) 8,2% e (3.466) 4,5%, respectivamente, a população acometida tem uma média de idade de 65,6 anos e 57,3% é masculina (MARTINS-MELO, 2014; MARTINS-MELO, 2016).

Durante as últimas décadas, tem havido grandes esforços para reduzir o número de mortes em decorrência da DC no continente, através de um maior conhecimento em relação ao ciclo natural da doença e o aprimoramento dos cuidados aos pacientes crônicos. Estima-se que entre 1 a 10% dos indivíduos neste estágio evolua para óbito. Em 2006, o país foi certificado como livre da transmissão por *T.infestans*, considerada a principal espécie na transmissão domiciliar. No entanto, devido à sua natureza crônica, as taxas de mortalidade caíram lentamente (BRASIL, 2011; LUQUETTI *et al.*, 2011; MARTINS-MELO, 2014; MARTINS-MELO, 2016).

Segundo dados do Boletim Epidemiológico do Ministério da Saúde (2015), de 2000 a 2013 foram notificados e confirmados 1570 casos da doença em sua forma aguda no país. Entre esses casos, observou-se que a forma de transmissão oral foi a mais frequente em todos os anos correspondendo a 68,9%, apesar da menor proporção, desde 2006 a transmissão vetorial continua persistente e é responsável por 6,9% das notificações (BRASIL, 2015).

A região Norte registrou a maior incidência de casos no país (91,1%), tendo sido o estado do Pará disparadamente líder com cerca de 75% do total ocorrido no Brasil. As regiões Nordeste, Sul, Centro-Oeste e Sudeste, apresentaram taxas de 1,8%; 1,7% e 0,8%, respectivamente. No estado do Pará mais de 50% dos indivíduos infectados apresentaram o início de sintomas entre os meses de agosto e novembro entre os anos de 2007 a 2013, período que coincide com os meses de safra do açaí (BRASIL, 2015).

Em todo território brasileiro entre os anos de 2005 e 2013, foram registrados 112 surtos, abrangendo 35 municípios da Região Amazônica englobando os estados do Pará

(75,9%), Amapá (12,5%), Amazonas (4,5%) e Tocantins (1,8%). A maioria dos surtos foram decorrentes da infecção por ingestão de alimentos típicos da região contaminados com *T. cruzi* através do inseto vetor, entre eles: açaí, bacaba, jaci, suco de caldo de cana e o palmito de babaçu (BRASIL, 2015).

Tendo em vista o aumento do número de casos da doença via transmissão oral a organização Pan-Americana de Saúde lançou em 2009, o Guia para vigilância, prevenção, controle e manejo clínico da doença de Chagas aguda transmitida por alimentos de forma a orientar os gestores da saúde de como conduzir as ações de diagnóstico, tratamento e prevenção no combate ao inseto vetor e orientação sobre a higienização de alimentos com alto risco de contaminação (OPAS, 2009).

3.1.4 Tratamento

O benznidazol (BNZ) e o nifurtimox (NFX) podem reduzir a carga parasitária e evitar a progressão da doença através da atuação sinérgica com o sistema imune, em indivíduos jovens de até 15 anos ou que tiveram infecção recente. No Brasil e na Argentina foram registrados a cura parasitológica em índices superiores a 60% dos casos, após tratamento com o BNZ, mas também há outros relatos na literatura em que o tratamento destinado a essa mesma faixa etária com BNZ e NFX, não induziu o mesmo resultado. A unanimidade é que ambos os fármacos têm atividade significativa durante a fase aguda e limitações para reduzir a carga parasitária durante a fase crônica (SILVEIRA, 2000; SOLARI *et al.*, 2001; COURA, 2002; OLIVIERI *et al.*, 2010; ANDRADE *et al.*, 2004; URBINA, 2009).

O NFX não é utilizado em países como o Brasil, Chile e Uruguai, devido à resistência de cepas do *T. cruzi*, restando como alternativa apenas o BNZ. Em relação ao mecanismo de ação, os dois atuam através da produção de radicais livres e metabólitos eletrofílicos por meio da ação de enzimas nitroredutases. Os efeitos adversos, provém desses radicais altamente reativos que atuam de forma inespecífica atingindo, o parasita e o organismo humano. Os efeitos adversos em relação ao NFX, mais comuns são: a sonolência, perda de peso e digestivas (náuseas, vômitos e cólicas), já o BNZ acarreta três grupos principais: hipersensibilidade (dermatite, erupção e *rash* cutânea), depressão da medula óssea e polineuropatia periférica, em conjunto podem levar a suspensão do tratamento (DIAS *et al.*, 2009; OLIVIERI *et al.*, 2002; PONTES *et al.*, 2010; FRANÇA *et al.*, 2014).

Atualmente há uma série de potenciais candidatos para o tratamento que atuam *in vitro* em culturas de células e tecidos contra o *T. cruzi*, eles estão divididos em sete classes:

inibidores da trypanotona, inibidores da cisteína protease, inibidores de pyrofosfato, inibidores da síntese de purinas ou proteínas, inibidores de fosfolipídios, inibidores do ergosterol e produtos naturais (APT, 2010).

Em geral, os representantes desses grupos atuam sozinhos ou de forma sinérgica com os medicamentos já estabelecidos no mercado (NFX e BNZ) para inibir enzimaticamente a produção de compostos sintetizados pelos protozoários e que são essenciais para o seu desenvolvimento e multiplicação. Entretanto a atuação farmacocinética e os riscos toxicológicos necessitam de estudos mais aprimorados, uma vez que alguns representantes demonstram elevado nível de toxicidade e teratogenicidade (WILKINSON *et al.*, 2008; APT, 2010).

A classe dos inibidores da biossíntese de ergosterol é representada por derivados azólicos (itraconazol, cetoconazol, fluconazol, ravuconazol, voriconazol e posaconazol) que originalmente foram desenvolvidos com a indicação terapêutica antifúngica. Possuem a vantagem, em detrimento das outras classes promissoras, em relação ao conhecimento do seu perfil de segurança, já que são utilizados há décadas para tal finalidade o que demanda menos recursos financeiros e maior celeridade na busca de novas alternativas terapêuticas. Em comparação às terapias atualmente disponíveis são mais potentes e seletivos em infecções agudas e crônicas e contra cepas de *T.cruzi* resistentes ao NFX e ao BNZ (URBINA, 2009; FRANÇA *et al.*, 2014).

A busca pelo menor custo em pesquisa e desenvolvimento é fundamental para o avanço no tratamento da DC, já que as indústrias farmacêuticas nacionais dos países endêmicos possuem um orçamento limitado para investirem na busca de novas entidades químicas para compor medicamentos inovadores e as grandes multinacionais não direcionam recursos para o financiamento de pesquisas para esse tipo de doença que em geral acomete um público de baixo poder aquisitivo, o que a torna uma doença negligenciada. No Brasil ações para ampliar o arsenal terapêutico tem sido tomada pelos governos através dos laboratórios públicos em parceria com entidades sem fins lucrativos e órgãos de cooperação internacional (RUBERTO *et al.*, 2013; FRANÇA *et al.*, 2014).

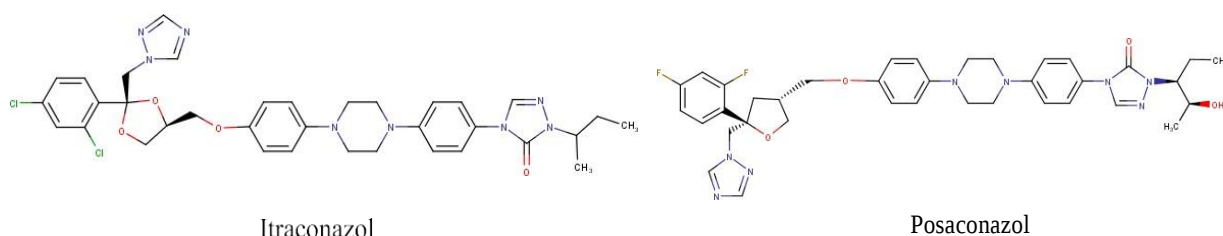
Atualmente, o Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco (LAFEPE) é o único fornecedor mundial do medicamento BNZ. Até o ano de 2011 existia apenas a produção de comprimidos em dose para adultos, contudo em 2012 a ANVISA concedeu o registro para a produção da formulação pediátrica, o que possibilitou um avanço em relação a segurança e eficácia no tratamento de milhares de crianças. Anteriormente o comprimido tinha que ser subdividido em até doze partes a depender do peso e da idade, resultando em grande parte dos

casos na administração de doses inadequadas, a nova formulação é ideal para bebês e crianças de até dois anos de idade, neste grupo o tratamento de forma regular pode levar a eliminação do parasita no primeiro ano de vida (DNDI, 2011)

3.2 POSACONAZOL

O posaconazol (POS) é um agente antifúngico, pertencente a classe dos derivados triazólicos e foi desenvolvido pelo instituto de pesquisa Schering-Plough[®], a partir de modificação estrutural do fármaco itraconazol com a substituição dos átomos de cloro por flúor no anel fenil e hidroxilação lateral do grupamento triazol, conforme pode-se visualizar na Figura 1. Essa modificação resultou em aumento de potência e espectro de atividade frente ao fármaco protótipo (BENNETT *et al.*, 2006).

Figura 1- Estruturas químicas dos fármacos itraconazol e posaconazol



Fonte: Autoria própria a partir do software Marvin Sketch (2016).

A denominação química do POS pela IUPAC é 4-[4-[4-[[(3R,5R)-5-(2,4-difluorofenil)-5-(1H-1,2,4-triazol-1-1-ilmetil)-3-furanil]metoxi]fenil]-1-piperazinil]-fenil]-2-[(1S,2S)-1-etil-2-hidroxi-propil]-2,4-dihidro-3H-1,2,4-triazol-3-ona. Com fórmula molecular correspondente a $C_{37}H_{42}F_2N_8O_4$, caracterizado como um sólido branco, insolúvel em água, considerado uma base fraca. Conforme o sistema de classificação biofarmacêutico é um fármaco de classe II (alta lipofilicidade e baixa solubilidade). As demais características físico-químicas e seus valores quantitativos estão presentes na Tabela 1 (COURTNEY *et al.*, 2004; SCHILLER, 2007; PUBCHEM, 2017).

Quadro 1- Características físico-químicas do posaconazol.

Características físico-químicas	Valores correspondentes
Coeficiente de lipofilicidade (Log P) à 25°C	4,77
Massa molecular	700,78 g/mol ⁻¹
Solubilidade em água à 25°C	0,027 mg/L
Faixa de fusão	170°C-172°C
Constante de dissociação (pka)	3,6 e 4,6

Fonte: Autoria própria baseado nos dados disponíveis em Pubchem, 2017.

O POS está disponível comercialmente com o nome de NOXAFIL[®], sob as formas de suspensão 40 mg/mL e comprimidos de liberação retardada 100 mg. Ambas estão indicadas ao tratamento profilático de infecções fúngicas sistêmicas ocasionadas pelos gêneros *Aspergillus*, *Cryptococcus*, *Coccidioides*, *Fusarium* e *Candida* em pacientes com idade superior a 13 anos; imunocomprometidos, em virtude de transplante de células-tronco hematopoiéticas, neoplasia hematológica maligna acompanhada de neutropenia prolongada devido a quimioterapia e rejeição a transplantes de órgãos e tecidos (RAAD *et al.*, 2006; CORNELLY *et al.*, 2007).

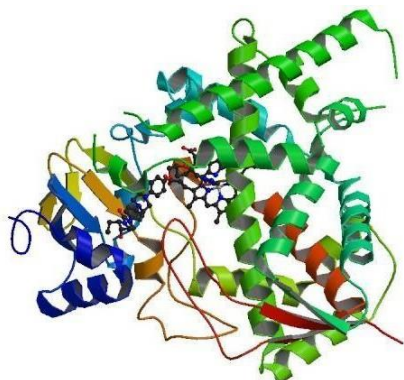
O POS é altamente lipofílico, sua administração é indicada durante ou imediatamente após uma refeição com suplemento nutricional lipídico, a ingestão concomitante de bebidas ácidas que reduzem o pH do meio, também favorece a sua absorção (PRASAD, 2015).

É um fármaco que apresenta boa biodisponibilidade por via oral, após a ingestão de 10 mL (40 mg/mL) na forma de suspensão em dose única, atinge a concentração máxima plasmática de 654 ng/ mL, após 10 horas da sua administração. A meia-vida de eliminação plasmática é de 20 horas, portanto sua eliminação é lenta. Como outros triazóis inibe a enzima CYP3A4, entretanto sua metabolização não é comprometida, pois essa via é considerada limitada. O POS é excretado de forma majoritária pelas fezes (76,9%), principalmente na forma inalterada ou excretado na urina (14%) como fármaco conjugado a glucoronídeos, através da ação da enzima UDP-glucuronosiltransferase 1A4 (UGT 1A4) ou em sua forma inalterada (KRIETER *et al.*, 2004; GHOSAL *et al.*, 2004).

Assim como outros azóis, o POS age bloqueando a atividade da enzima esteroide 14 α -desmetilase conforme a Figura 2, essa enzima possui em sua estrutura um grupamento heme tornando-a hábil ao processo oxidativo dos esteróis intermediários, o processo catalítico é interrompido quando o nitrogênio do anel azólico interage com o ferro do grupo heme, inviabilizando a ligação dos esteróis intermediários ao sítio ativo da enzima tendo como

consequência o interrompimento da citocinese, crescimento celular e o colapso da membrana celular, pois o parasita é incapaz de usar o colesterol disponível em mamíferos hospedeiros para suprir suas necessidades metabólicas (LEPESHEVA *et al.*, 2007; URBINA, 2009; DINIZ *et al.*, 2013; FRANÇA *et al.*, 2014).

Figura 2- Estrutura cristalina da enzima esterol 14-alfa desmetilase (CYP51) de *Trypanosoma cruzi* complexada com o posaconazol.



Fonte: Protein Data Bank, 2016

Em um estudo de Olivieri *et al.*, (2010) com modelos murinos comparando a ação do BNZ e do POS na prevenção de danos cardíacos e estímulo a resposta imune tripanocida foi observada a supressão da parasitemia na fase aguda da doença e a ação protetora cardíaca para ambos os fármacos. Contudo a quantificação do marcador enzimático CK-MB, que é indicativo de danos nos tecidos cardíacos foi menor após tratamento com o POS em comparação ao BNZ, o POS também foi mais eficiente na prevenção da esplenomegalia aguda e no controle do aumento do baço.

Em Ferraz *et al.*, (2007), após avaliação de modelos murinos com deficiência genética que inativava a produção de interferon gama (INF), importante citocina na indução dos macrófagos e das respostas imunes, foram a óbito após tratamento com o BNZ, enquanto que a atividade tripanocida do POS não foi inibida, o que sugere uma ação combinada entre o POS e os mecanismos de morte celular comandadas pelos macrófagos.

Segundo Diniz *et al.*, (2013) em avaliação experimental da interação positiva em tratamento concomitante e sequencial com os fármacos BNZ e o POS, os dois isoladamente atuaram inibindo a parasitemia em ratos, entretanto os picos dos índices foram menores nos animais tratados com o POS, quando administrados em conjunto reduziram os índices de parasitemia a taxas consideravelmente superiores ao tratamento sequencial e com uma dose ótima inferior em comparação a utilizada no uso sequencial e com um percentual de

sobrevivência superior à 80%, o que indica de forma evidente o efeito sinérgico terapêutico do uso combinado, com potencial redução dos efeitos colaterais e dos custos do tratamento.

3.3 ESTABILIDADE

A estabilidade dos produtos farmacêuticos ou mesmo do insumo farmacêutico ativo (IFA), pode ser compreendida como o período que abrange a estocagem e uso, em que são preservadas as condições e características especificadas no momento de fabricação. Em outra definição para ser considerado estável o produto não deve ter sua potência reduzida a índices superiores a 10%, desde que seus produtos de degradação sejam analisados quantitativamente e qualitativamente (SILVA *et al.*, 2009).

Existe uma maior vigilância em relação a estabilidade química das moléculas e dos produtos farmacêuticos, sendo este um importante parâmetro na avaliação da segurança e eficácia dos medicamentos (BLESSY *et al.*, 2013).

O conhecimento sobre a estabilidade das moléculas auxilia no desenvolvimento da formulação, a partir da análise de quais adjuvantes farmacotécnicos que serão utilizados para promover de forma adequada a integridade do fármaco e do produto. Também permite a escolha de embalagens mais viáveis para prolongar o tempo de vida útil de um produto, garantindo assim o controle de qualidade desde a produção até a administração pelos usuários, características essenciais no cumprimento das especificidades regulatórias exigidas como parte do dossiê de registro de um medicamento (HUYNH-BA, 2009; BLESSY *et al.*, 2013).

Conforme a resolução vigente RE nº 1, de 29 de julho de 2005, que traz em anexo o guia para a realização dos estudos formais, a estabilidade é dependente de fatores extrínsecos ou ambientais como: temperatura, umidade, luz, dentre outras; e intrínsecos, ou seja, inerentes ao produto como as propriedades físicas e químicas dos insumos ativos, excipientes e abrange a composição, forma farmacêutica, processos de fabricação, tipo e propriedades dos materiais de embalagem (BRASIL, 2005).

A RE nº 1, define que os testes de estabilidade sejam projetados em embalagens primárias em condições específicas com a finalidade de prever, determinar e acompanhar o período de utilização e o prazo de validade dos produtos farmacêuticos e divide os estudos de estabilidade formais em três tipos: acelerado, longa duração e acompanhamento conforme descrição a seguir:

- a) Acelerado: Os estudos são delineados para aumentar a velocidade de degradação física/química do fármaco ou produto acabado após submissão às

condições de armazenamento em temperatura e umidade relativa superiores aquelas ótimas de conservação, em câmaras de estabilidade devidamente qualificadas (BRASIL, 2005).

- b) Longa duração: Os estudos são delineados para monitorar se o produto farmacêutico permanece com suas características físicas, químicas, biológicas e microbiológicas durante e opcionalmente, depois do prazo de validade esperado, conforme condições de armazenamento especificadas e em câmaras conforme o item anterior (BRASIL, 2005).
- c) Acompanhamento: Os estudos são delineados para verificar se o produto mantém suas características físicas, químicas, biológicas e microbiológicas conforme os resultados obtidos nos estudos de estabilidade de longa duração, só pode ser executado após finalização deste e comprovado que não houve alteração do produto no estudo de longa duração (BRASIL, 2005). Os parâmetros para condução dos testes estão presentes na Tabela 1 (BRASIL, 2005).

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

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

Fonte: Adaptado de Brasil, 2005

Os estudos de estabilidade acelerado e de longa duração abrangem os testes de

doseamento, quantificação dos produtos de degradação, dissolução e pH, sendo os dois últimos realizados quando aplicáveis, a frequência dos testes ocorre nos tempos (0, 3 e 6 meses) e (0, 3, 6, 9, 12, 18, 24 meses), respectivamente. Outras análises como o de esterilidade, pirogênio e dureza podem ser realizadas no momento inicial e no último mês de ambos estudos especificações (BRASIL, 2005).

Já o de acompanhamento deverá ser realizado a cada 12 meses e deve abranger todos os testes já mencionados. O lote escolhido para o tempo zero de análise deve preferencialmente ser aquele com a data de fabricação mais recente, dessa forma minimiza-se o risco do produto nos estudos de longa duração não atender as especificações (BRASIL, 2005; HUYNH-BA, 2009).

No Brasil, para fins de registro e pós-registro de um produto pode ser concedido um prazo de validade provisório de 24 meses, caso seja aprovado o relatório do estudo de longa duração de 12 meses, este deve conter variação inferior ou igual a 5% do valor de análise da liberação do lote, preservadas as demais especificações ou estudo de estabilidade acelerado de 6 meses em conjunto com os primeiros 6 meses dos resultados do estudo de longa duração. Caso as variações de doseamento estejam entre 5,1 e 10,0% no estudo de estabilidade acelerado, o prazo de validade provisório poderá ser reduzido para 12 meses. Esse prazo de validade é confirmado por intermédio da apresentação do estudo de estabilidade de longa duração de 24 meses (BRASIL, 2005).

3.3.1 Testes de degradação forçada

Consiste na submissão dos insumos ativos e os produtos acabados, a condições mais drásticas que o estudo de degradação acelerado, para promover a formação de produtos de degradação que após identificados auxiliarão na determinação da estabilidade intrínseca da molécula e no estabelecimento das possíveis rotas de degradação (REYNOLDS *et al.*, 2002; BLESSY *et al.*, 2013; SINGH *et al.*, 2013).

São também chamados de testes de estresse e começaram a ser realizados desde a década de 60 pela indústria como parâmetro de controle de qualidade. Entretanto, a partir dos anos 90 a organização que representa os membros das indústrias dos EUA, Europa e Japão; o *International Conference Harmonization* (ICH) no intuito de facilitar a comercialização de produtos através da harmonização dos procedimentos visando a proteção à saúde dos cidadãos de danos ocasionados pela presença de impurezas, passaram a emitir diretrizes gerais na sua condução (ALCÂNTARA, *et al.*, 2013; MINÉ, 2013).

Estes guias não possuem poder de regulamentação, mas de uma forma geral são internalizados pelas agências regulatórias internacionais, apesar do avanço na discussão e das orientações sobre o tema, os guias não possuem maiores detalhes sobre a execução dos testes, o que torna um grande desafio para os analistas, conforme o Quadro 2 (ALCÂNTARA *et al.*, 2013).

Quadro 2- Diretrizes do ICH para a condução dos testes de degradação.

Diretriz	Guia
ICH Q1A (R2)	Testes de estabilidade de novos fármacos e medicamentos (2003).
ICH Q1B	Testes de foto estabilidade de novos fármacos e produtos (1996).
ICH Q1C	Testes de estabilidade para novas dosagens (1996).
ICH Q1D	Bracketing e Matrixing designs para testes de estabilidade de novos medicamentos (2002).
ICH Q2B	Validação de metodologia de métodos analíticos (2005).
ICH Q3A (R2)	Impurezas de novos fármacos (2006).
ICH Q3B (R2)	Impurezas de novos medicamentos (2006).

Fonte: Adaptado de Alcântara et al., 2013

Esses testes são necessários para demonstrar a especificidade e seletividade no desenvolvimento do método indicado de estabilidade (MIE), por isso eles devem antever os estudos de estabilidade formais (SEHRAWAT, 2010; BRASIL, 2015).

No Brasil, a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº53 de 4 de dezembro de 2015, publicada pela ANVISA regulamenta os parâmetros que devem ser cumpridos na condução dos testes. Conforme em seu artigo 2º esta resolução se aplica aos medicamentos com substâncias ativas sintéticas e semissintéticas classificados como novos, genéricos e similares, não sendo extenso a produtos de origem biológica/ biotecnológica ou que se encontrem na etapa de desenvolvimento dos estudos clínicos (BRASIL, 2015).

Segundo esta resolução, as amostras devem ser submetidas à degradação a partir dos testes de aquecimento, umidade, soluções ácida, básica e oxidante, exposição fotolítica e íons metálicos. Os fabricantes devem refazer os testes no caso de alterações da rota de síntese do IFA, mudanças quantitativas e qualitativas de excipientes do produto acabado e na existência de mais de um fornecedor para um insumo, deverá ocorrer avaliação individual de cada fornecedor (BRASIL, 2015).

A resolução também determina os valores limites de produtos de degradação para notificação, identificação e qualificação com base na administração total diária (ATD) de um determinado fármaco ou no percentual do PD frente a esse IFA, conforme o mais crítico, tendo

como referência a dose diária máxima como demonstrado na Tabela 2.

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

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

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

Fonte: Autoria própria baseado em Brasil, 2015.

Há várias discussões entre os pesquisadores a respeito de qual percentual de degradação é o ideal. Um valor entre 5% e 20% é considerado razoável para fins de validação dos ensaios cromatográficos. Para fins regulatórios a RDC nº53, especifica que os testes devem promover degradação superior à 10% e inferior àquela que levaria a degradação completa da amostra, o que segundo esta poderia comprometer o teste. Caso alguma condição de degradação não possa ser empregada ou o percentual de degradação for inferior a 10%, deverá haver justificativa técnica da empresa (BLESSY *et al.*, 2013; BRASIL, 2015).

Não é necessário que em todos os testes ocorra a degradação das moléculas. Eles podem ser finalizados, caso não haja degradação do fármaco ou do produto acabado, desde que exposto as condições de estresse contidas no protocolo de estabilidade. O excesso de estresse pode levar a formação de produtos de degradação secundários que podem não ser produzidos nos estudos formais de estabilidade e no período de vida útil do produto acabado, por isso se faz importante o ajuste ao nível de degradação desejado (MAHESWARAN, 2012; BLESSY *et al.*, 2013).

3.3.2 Condições de degradação

A seguir serão abordados os principais testes de degradação preconizados pelos guias e legislações que foram alvo de estudo neste trabalho.

3.3.2.1 Hidrólise ácida e básica

As reações hidrolíticas são aquelas em que a molécula de água age através da dissociação dos seus íons hidroxila (OH^-) e hidrogênio (H^+), sob uma determinada faixa de pH e promove alterações estruturais nos compostos orgânicos em análise (ANSEL *et al.*, 2007).

Esse processo pode ser catalisado através do uso de reagentes ácidos e básicos, os mais comumente empregados são o ácido clorídrico (HCl) e o hidróxido de sódio (NaOH), respectivamente. Entretanto outros ácidos como o oléico, cítrico, ascórbico, tartárico e bases como o hidróxido de potássio, carbonato de sódio, carbonato de potássio, sulfato de cálcio, podem ser utilizadas, assim como a escolha dos reagentes a concentração é determinada conforme a susceptibilidade dos compostos a cada meio, variando de (0,1 M-5,0 M), para ambos (BLESSY *et al.*, 2013; SINGH *et al.*, 2013).

Caso os compostos possuam baixa solubilidade em água, o uso de co-solvente orgânico é indicado, os mais empregados são: metanol, acetonitrila e tetraidrofurano, por serem predominantes na composição da fase móvel empregada nos sistemas cromatográficos. Em geral é assumido que os compostos são susceptíveis às condições mais brandas, portanto no início utiliza-se a temperatura controlada de 25°C e concentrações de ácido e base menores, elevando-se esses fatores de maneira gradual, caso não haja degradação. Esses testes não devem exceder o período de 7 dias (BLESSY *et al.*, 2013; RAO *et al.*, 2015).

As amostras podem ser neutralizadas utilizando ácido, base e tampão no intuito de parar a reação e preservar a coluna cromatográfica antes da injeção, caso o método utilizado seja por CLAE, entretanto esse procedimento pode afetar o equilíbrio ácido-base e remover os degradantes desejados (HUYNH-BA, 2009; BLESSY *et al.*, 2013).

3.3.2.2 Degradação Oxidativa

A oxidação é a via de degradação mais importante em relação a geração de produtos de degradação de compostos farmacêuticos. O IFA pode ser estável em condições ideais de armazenamento, mas pode ser sensível à formulação e ao processo de fabricação uma vez que os excipientes podem conter impurezas como metais e peróxidos que induzem a reação (FREED *et al.*, 2008).

Nos estudos de degradação, o peróxido de hidrogênio é o reagente mais empregado, devido a sua maior disponibilidade e menor custo, em relação a outros agentes oxidantes como os radicais iniciadores AIBN (2,2-azobis isobutironitrila) e ACVA (ácido azobis ciano valérico) que, apesar de serem mais específicos que o H_2O_2 , possuem um custo maior, mas podem ser

utilizados para confirmar os resultados da degradação via peróxido (HUYNH-BA, 2009; RAO *et al.*, 2015).

Como na condição anterior, a concentração de H_2O_2 é determinada conforme a susceptibilidade dos compostos, estudos relatam uma variação entre 0,1% e 30%, a temperatura de 25°C, pH neutro e tempo máximo de exposição das amostras de 7 dias. Esses são os parâmetros mais empregados, podendo haver aquecimento, caso a reação se processe de forma lenta (ALSANTE *et al.*, 2007; SINGH *et al.*, 2013; RAO *et al.*, 2015).

A eliminação ou redução da concentração de peróxido ocorre através do aquecimento prévio da amostra pré-injeção ao CLAE, caso esse procedimento não seja efetuado o pico registrado no cromatograma que caracteriza o H_2O_2 é de alta intensidade e pode interferir na análise qualitativa e quantitativa do fármaco e seus produtos de degradação.

Os compostos orgânicos que possuem grupos funcionais como aminas, sulfetos e fenóis são susceptíveis a oxidação desencadeando a formação de produtos N-óxidos, hidroxilaminas, sulfonas e sulfóxidos. Uma série de medidas preventivas no controle de processos podem ser tomadas como o monitoramento dos níveis de impurezas de peróxidos e metais pesados, adição de agentes redutores, antioxidantes e quelantes (ácido cítrico, EDTA), bem como a substituição de oxigênio dos recipientes de armazenamento por gases inertes como o nitrogênio (FREED *et al.*, 2008; RAO *et al.*, 2015).

3.3.2.3 Degradação Termolítica

As amostras dos IFA e os produtos acabados em estado sólido devem ser expostas ao calor seco e úmido, enquanto os líquidos devem ser expostos ao calor úmido. Os testes devem ser conduzidos a temperaturas na faixa entre 40°-80°C, por curtos períodos. O efeito da temperatura na degradação térmica de uma substância é estudado através da equação de Arrhenius:

$$K = Ae^{-E_a/RT}$$

Onde: K é a taxa de reação específica, Ae o fator de frequência, R a constante dos gases e T a temperatura absoluta (ALSANTE, *et al.*, 2007; BLESSY *et al.*, 2013).

3.4 MÉTODO INDICATIVO DE ESTABILIDADE

São procedimentos analíticos devidamente validados com o objetivo de monitorar

o decaimento do teor do IFA, após a exposição a condições de degradação, além de detectar e separar os produtos de degradação advindos do IFA e dos excipientes ou resultante da interação de ambos, no caso dos produtos acabados. O MIE pode ser usado para detectar como a estabilidade do fármaco e os PD's sofrem alterações com o tempo. O ideal é que este monitoramento seja proveniente de apenas um método analítico, contudo na impossibilidade da análise em conjunto, outros métodos devem ser desenvolvidos (RIDDHIBEN, 2011). Uma das ferramentas analíticas mais poderosas para tal finalidade é a cromatografia líquida de fase reversa (CLAE-FR), em virtude da capacidade de detecção, separação e quantificação de impurezas de forma precisa (RIDDHIBEN, 2011).

Na fase de desenvolvimento do MIE, a depender da extensão de degradação do IFA em determinada condição, pode ser que o pico que representa um PD coelua com o pico do IFA, de forma imperceptível nos cromatogramas. Essa avaliação pode ser feita através da especificidade do método com a análise da pureza de pico, ao utilizar técnicas hífenadas como a cromatografia líquida acoplada ao detector de massas (CLAE-EM) ou ultravioleta por meio do arranjo de fotodiodos (CLAE-DAD), porém essa análise se apresenta limitada em relação aos PD's que possuem um perfil de absorção no UV semelhantes ao IFA (REYNOLDS *et al.*, 2002; RIDDHIBEN, 2011, RAO *et al.*, 2015).

O MIE desenvolvido é então validado de acordo com a RDC nº 899 de 29/05/2003 que possui um guia para validação de métodos analíticos que orienta a determinação dos parâmetros de linearidade, exatidão, precisão, especificidade, limite de quantificação e detecção, robustez, dentre outros. Se o método não estiver sob os critérios de aceitação para validação, ele deverá ser modificado e revalidado (BRASIL, 2003; RIDDHIBEN, 2011).

3.5 OTIMIZAÇÃO NA ELABORAÇÃO E AVALIAÇÃO DOS TESTES DE DEGRADAÇÃO FORÇADA

Diante da exigência das agências regulatórias, recomendações de organizações com a finalidade de promover seguridade sanitária internacional como o ICH e do próprio controle de qualidade da indústria farmacêutica, durante a última década, tem sido descrito na literatura uma série de estudos de estabilidade a partir dos testes de degradação forçada. Entretanto em alguns casos há informações a respeito da susceptibilidade em determinados meios são conflitantes para um mesmo IFA ou produto acabado (BAKSHI, 2002; SINGH *et al.*, 2013).

Apesar da elaboração de vários guias de recomendação para condução dos testes, não existe consenso nos procedimentos em virtude da complexidade do tema, pois cada IFA ou

produto acabado, possui propriedades diferentes, o que dificulta a padronização na execução procedimental, por isso o setor regulado enfrenta dificuldades em extrair informações adequadas para guiar os seus estudos (BAKSHI, 2002; SINGH *et al.*, 2013).

Em estudo revisional Singh *et al.*, (2013) elencou uma série de orientações de forma a otimizar recursos na execução e avaliação dos resultados desses testes:

- a) Propriedades físico-químicas: Um bom desempenho na execução dos testes de degradação, advém do levantamento de uma série de informações a respeito das propriedades físico-químicas do fármaco: como a constante de dissociação ácida (pka) que auxilia na determinação da faixa de pH ótimo na fase móvel para evitar a retenção do IFA por um tempo prolongado, o coeficiente de partição (log P), a partir dele é possível indicar quais solventes são mais adequados para solubilizar o IFA (SINGH *et al.*, 2013).
- b) Susceptibilidade relatada às condições de estresse: É importante buscar na literatura dados referentes à condução dos testes de degradação forçada anteriormente realizados com o fármaco ou produto acabado de interesse à respeito dos solventes utilizados para solubilização do IFA, se houve sensibilização há esses solventes antes da exposição degradativa, se há métodos bioanalíticos incluindo aqueles compatíveis com as técnicas hifenadas (CLAE-EM) desenvolvidos para as entidades químicas de interesse, já que a área clínica é bastante propulsora no desenvolvimento analítico para avaliação farmacocinética e toxicológica. Na ausência de informações de métodos para análise in bulk, poderá ser utilizado como ponto de partida para seleção das condições cromatográficas (SINGH *et al.*, 2013).

3.6 USO DE TÉCNICAS COMPLEMENTARES

A caracterização estrutural dos possíveis produtos de degradação, bem como a avaliação da capacidade do método em quantificá-los podem ser verificados a partir dos seguintes itens.

3.6.1 Ferramentas computacionais

Com a análise estrutural dos grupos funcionais da molécula é possível inferir qual o *locus* de maior probabilidade de ataque nucleofílico/eletrofílico dos reagentes utilizados nas condições de degradação. Um suporte nessa avaliação é desempenhado pelos estudos *in silico*

a partir dos métodos computacionais que também podem prever a partir da análise de energia de dissociação de ligação, análise de orbital molecular e a teoria funcional da densidade.

Essa ferramenta é importante aliada na elucidação de produtos de degradação, podendo ser útil para corroborar os dados experimentais ou para a tomada de decisão de sintetizar tais compostos para avaliar a capacidade seletiva do método (SINGH *et al.*, 2013).

Um dos *softwares* mais utilizados é o Zeneth[®] e o Pharma D3[®], capazes de elucidar as rotas de degradação dos compostos orgânicos, outros podem prever a toxicidade através dos sistemas TOPKAT[®], DEREK[®], ONCOLOGIC[®], LAZAR[®] que conseguem inferir a genotoxicidade, carcinogênese e sensibilidade cutânea e o ASAP prime[®] que pode prever os componentes ideais (excipientes, processos de fabricação, embalagem) para reduzir a instabilidade das formulações de um produto (SINGH *et al.*, 2013).

3.6.2 Técnicas hífenadas

Devido a possibilidade dos produtos de degradação formados possuírem grupos não cromóforos ou produtos voláteis é importante avaliar o uso de detectores alternativos com CLAE, tais como de dispersão de luz evaporativa (ELSD) e corona aerossol carregado (CAD) ou a aplicação de técnicas ortogonais como cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM) e cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (CLAE-EM), sendo estas últimas capazes de fornecer informações estruturais inequívocas, quando de alta resolução, com exceção de isômeros e epímeros que necessitam de caracterização por CLAE-RMN (SINGH *et al.*, 2013).

3.6.3 Avaliação do balanço de massas

O cálculo do balanço de massas das amostras degradadas consiste na avaliação da capacidade do método em quantificar os produtos de degradação, o ideal é que esse valor se aproxime de 100%, em comparação com o teor do IFA do padrão. Entretanto às vezes a perda de massa pode ser extensa devido a formação de produtos de degradação voláteis e que não são submetidos a análise para detecção apropriada como mencionado acima ou que são altamente retidos na coluna. A FDA reconhece que o balanço de massa não pode ser obtido em todos os casos e enfatiza o rigor da investigação para determinar a especificidade do ensaio e as possíveis rotas de degradação (HUYNH-BA, 2009).

3.7 CINÉTICA DE DEGRADAÇÃO

A cinética compreende o estudo da velocidade na qual os processos ocorrem em detrimento dos fatores que a influenciam, tais como: concentração de reagentes, temperatura, pH, superfície de contato, catalisadores; ao fornecer dados das concentrações dos reagentes no decorrer das reações em um determinado intervalo de tempo é possível estabelecer os mecanismos e prever o estágio de transformação em uma determinada faixa de tempo (SINKO, 2008).

O estudo da cinética de degradação compreende o controle de qualidade do medicamento em escala industrial, uma vez que é um dos parâmetros de avaliação da estabilidade, a partir de dados experimentais é possível estabelecer correlações por equações matemáticas, a fim de obter uma determinada ordem de reação (SINKO, 2008; FLORENCE, 2011).

A ordem de reação pode ser determinada através do método da substituição, em que o resultado das concentrações do fármaco a cada tempo de exposição das reações é coletado para a construção de gráficos, sendo que após a plotagem dos valores, quanto mais próximo da unidade indicadora o valor do coeficiente de regressão linear em comparação a cada ordem, for obtido teremos determinado o modelo cinético que melhor descreve a reação (SINKO, 2008; FLORENCE, 2011).

Uma vez que a velocidade da reação seja independente das concentrações dos reagentes, esta é classificada como de ordem zero. Nesse caso, um gráfico de concentração (C) em função do tempo (t) dá origem a uma reta, cuja inclinação corresponde à constante de velocidade da reação (k). Quando a mesma depender da concentração de um dos reagentes, a reação segue cinética de primeira ordem, obtendo-se uma reta com a representação do logaritmo da concentração ($\log C$) em função do tempo (t). Já a reação de segunda ordem ocorre quando a velocidade de reação depende da concentração de dois reagentes, ou a segunda potência da concentração de um deles. Para esse tipo de reação, a representação do inverso da concentração ($1/C$) em função do tempo (t) fornece uma reta. As expressões matemáticas referentes às ordens de reação estão descritas no Quadro 3 (SINKO, 2008; GIL, 2010; FLORENCE, 2011).

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

Ordem de reação	Expressão matemática
Ordem zero	$C = C_0 - K.t$
Primeira Ordem	$\log C = \log C_0 - K.t$
Segunda Ordem	$1/C = 1/C_0 + K.t$

Fonte: Autoria própria

Nas expressões, C_0 representa a concentração do reagente no tempo zero, C é a concentração final, após determinado tempo de reação e o k é denominado como constante da velocidade específica, a partir do valor dessa constante é possível calcular os valores dos parâmetros cinéticos; meia-vida ($T_{1/2}$), intervalo de tempo necessário para que um fármaco degrade até metade da sua concentração original e tempo de vida útil ($T_{90\%}$), que corresponde ao intervalo de tempo necessário para que o fármaco degrade 10% de sua concentração inicial. As expressões matemáticas referentes a esses parâmetros são diferenciadas dependendo da ordem de reação conforme o Quadro 4 (SINKO, 2008).

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

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

Fonte: Autoria própria

O entendimento da velocidade com o qual o fármaco se decompõe em diferentes concentrações frente a determinado agente indutor (luz, temperatura, pH, ácido, base, oxidante, umidade) viabiliza que o setor produtivo que abrange a indústria farmacêutica e as farmácias de manipulação na etapa de desenvolvimento da pré-formulação selecione os veículos que retardarão ou evitarão o processo de degradativo, o que proporcionará um maior prazo de validade de uma determinada formulação, de modo que é possível orientar os usuários sobre qual a melhor forma de armazenagem para que o período de utilização seja maximizado, com isso os custos operacionais serão minimizados e haverá êxito em relação a segurança e qualidade.

3.8 ESTADO DA ARTE DOS ESTUDOS DE ESTABILIDADE DO POSACONAZOL

Não existe nos compêndios oficiais metodologia para doseamento ou avaliação da estabilidade do posaconazol, como ponto de partida foi realizado uma revisão dos trabalhos publicados entre 2001 e 2016, para nortear os parâmetros a serem seguidos neste estudo. A maioria dos estudos com posaconazol trata-se da análise do fármaco em amostras biológicas para ensaios clínicos e em menor extensão há trabalhos com o propósito de avaliar a estabilidade do mesmo, estes métodos foram descritos a seguir e encontra-se no Quadro 5.

Quadro 5- Métodos analíticos aplicados ao posaconazol.

Referência	Finalidade	Método utilizado	Condições de análise em CLAE	Tempo de retenção
Baietto <i>et al.</i> , 2010	Bioanalítico	CLAE-EM-ESI+	Coluna: C18 (150 x 4,6 mm; 5µm) Fase móvel: H ₂ O: ACN (20:80) acidificada com 0,05% de ácido fórmico Modo: gradiente Volume de injeção: 50 µL Fluxo: 1,0 mL/min λ: n/a Temperatura: 35°C	7,23 min
Shen <i>et al.</i> , 2007	Bioanalítico	CLAE-EM- APCI+ CLAE-EM-EM	Coluna: C18 (50 x 2,0 mm; 5µm) Fase móvel: H ₂ O:MeOH:CH ₂ O ₂ (90:10:0,1 v/v/v) / ACN:MeOH: CH ₂ O ₂ (90:10:0,1 v/v/v) Modo: gradiente Volume de injeção: 10 µL Fluxo: 250-500 µL λ e Temperatura: n/a; n/c	2,1 min
Xu <i>et al.</i> , 2013	Bioanalítico	CLAE-EM-ESI+ CLAE-EM-EM	Coluna: C18 (50 x 2,0 mm; 5µm) Fase móvel: ACN: H ₂ O:CH ₂ O ₂ (45:55:0,1 v/v/v) Modo: isocrático Volume de injeção: 10 µL Fluxo: 250 µL λ e Temperatura: n/a; n/c	1,5 min
Chae <i>et al.</i> , 2015	Bioanalítico	CLAE-EM-ESI+ CLAE-EM-EM	Coluna: C18 (50 x 2,1 mm; 3,5µm) Fase móvel: H ₂ O:ACN com 0,1% de ácido fórmico Modo: gradiente Volume de injeção: 120 µL Fluxo: 0,3 mL/min λ: n/a Temperatura: 40°C	n/c

El-Serafi., 2014	Bioanalítico	CLAE-EM-ESI+	Coluna: C18 (50 x 4,6 mm; 5µm) Fase móvel: CH ₂ O ₂ :ACN Modo: gradiente Volume de injeção: 1 µL Fluxo: 0,51 mL/min λ: n/a Temperatura: 40°C	2,9 min
Khalil <i>et al.</i> , 2015	Bioanalítico	CLAE-DAD	Coluna: C18 (250 x 0,21 mm; 2.6µm) Fase móvel: ACN:KH ₂ PO ₄ Modo: gradiente Volume de injeção: 80 µL Fluxo: 1,5 mL/ min λ: 262 nm Temperatura: 25°C	5,9 min
Hamdy., 2014	Analítico	CLAE-DAD	Coluna: C18 (250 x 4,6 mm; 5µm) Fase móvel: ACN: KH ₂ PO ₄ Modo: gradiente Volume de injeção: 20 µL Fluxo: 1,5 mL/ min λ: 262 nm Temperatura: 25°C	11 min
		CLUE-DAD	Coluna: C18 (50 x 2,1 mm; 1,3µm) Fase móvel: ACN:KH ₂ PO ₄ (45:55) Modo: isocrático Volume de injeção: 5 µL Fluxo: 0,4 mL/ min λ: 262 nm Temperatura: 40°C	3 min
Feng <i>et al.</i> , 2007	Estabilidade	CLAE-EM-ESI+ CLAE-EM-EM CLAE-RMN	Coluna: Quiral FR (250 x 4,6 mm; 10µm) Fase móvel: H ₂ O:ACN: com 0,1% de ácido trifluoroacético (C ₂ HF ₃ O ₂) Modo: gradiente Volume de injeção: Fluxo: 750 µL λ: 254 nm	22,3 min
Zhong <i>et al.</i> , 2012	Estabilidade	CLAE-EM-ESI+ CLAE-EM-EM CLAE-RMN	Coluna: C18 (150 x 2,1 mm; 3,5µm) Fase móvel: H ₂ O:ACN com 0,1 % de ácido fórmico (CH ₂ O ₂) Modo: gradiente Volume de injeção: 5 µL Fluxo: 200 µL λ: n/a	8,8 min
Garcia <i>et al.</i> , 2012	Estabilidade	CLAE-DAD	Coluna: C8 (250 x 4,6 mm; 5µm) Fase móvel: MeOH: H ₂ O (75:25) Modo: isocrático Volume de injeção: 20 µL Fluxo: 1,0 mL/min λ: 260 nm Temperatura: 25°C	8,5 min
Govind <i>et al.</i> , 2014	Estabilidade	CLAE-DAD	Coluna: C18 (250 x 4,6 mm; 5µm) Fase móvel: Tampão fosfato de potássio anidro: ACN (90:10) / ACN:H ₂ O (90:10) Modo: gradiente Volume de injeção: 5 µL Fluxo: 1,0 mL/min λ: 210 nm	14,5 min

Referência	Finalidade	Método utilizado	Condições de análise	Tempo de retenção
Kathirvel <i>et al.</i> , 2014	Estabilidade	CLAE-DAD	Coluna: C18 (150 x 4,6 mm; 5µm) Fase móvel: MeOH:H ₂ O (75:25) Modo: gradiente Volume de injeção: 10 µL Fluxo: 1,0 mL/min λ: 225 nm / 260 nm Temperatura: 25°C	26,3 min
Prasad <i>et al.</i> , 2015	Estabilidade	UCLAE-DAD	Coluna: C18 (100 x 2,1 mm; 1,7µm) Fase móvel: H ₂ O:ACN com 0,1% de ácido ortofosfórico (H ₃ PO ₄). Modo: gradiente Volume de injeção: 2 µL Fluxo: 0,5 mL/ min λ: 210 nm Temperatura: 30°C	4,6 min
Yang <i>et al.</i> , 2016	Estabilidade	CLAE-DAD CLAE-TOF-EM-ESI+ CLAE-EM-EM RMN	Coluna: SB Phenyl (75 x 4,6 mm; 3,5µm) Fase móvel: H ₂ O:THF (77:23) com 1% de ácido ortofosfórico (H ₃ PO ₄)/ H ₂ O:ACN (20:80) com 1% de ácido ortofosfórico (H ₃ PO ₄) Modo: gradiente Volume de injeção: 10 µL Fluxo: 1,5 mL/min λ: 260 nm Temperatura: 35°C	11,8 min

Legenda: n/c= não consta; n/a= não se aplica; λ: comprimento de onda.

Fonte: Autoria própria

Um dos métodos desenvolvidos com o intuito de fazer a quantificação dos fármacos voriconazol, posaconazol e itraconazol de forma simultânea no plasma humano foi descrito por Baietto *et al.*, (2010). A amostra de plasma contendo os três fármacos, após passagem pelos processos de extração e precipitação de proteínas foi injetada diretamente no sistema cromatográfico acoplado ao detector de massas com ionização de amostra no modo electrospray positivo (CLAE-EM-ESI+) utilizando uma coluna de octadecilsilano C18 (150 x 4,6 mm, 5µ) com fase móvel composta por H₂O: ACN (20:80) acidificada com 0,05% de ácido fórmico, sistema gradiente, os fármacos eluíram com o tempo de 4,73 min, 7,23 min e 10,38 min, respectivamente. Após a validação da metodologia os resultados foram positivos e permitiu à quantificação correta dos três triazóis podendo ser aplicado nas práticas de rotina e em estudos farmacocinéticos.

Outro método desenvolvido por Shen, (2007), para determinação do POS em plasma foi utilizado em numerosos estudos conduzidos pelo instituto de pesquisa Schering-Plough para caracterizar a farmacocinética do posaconazol. Como no método anterior as amostras passaram

por um processo de extração de proteínas e o método utilizado foi o (CLAE-EM-APCI+), o uso da interface APCI para ionização das amostras, em vez do modo electrospray foi justificado devido a menor supressão de íons, também foi utilizado o método no modo (CLAE-EM-EM), para caracterizar a fragmentação da molécula. Foi empregado coluna C18 (50 x 2 mm, 5 μ); fase móvel composta por uma fase A: H₂O:MeOH:Ácido fórmico (90:10:0,1 v/v/v) e por uma fase B ACN:MeOH:Ácido fórmico (90:10:0,1 v/v/v), em modo gradiente, o POS apresentou tempo de retenção de 2,1 min. Após validação o método apresentou um valor baixo de limite de quantificação 5,0 ng/mL para uma amostra de 100 μ L, demonstrando-se muito sensível.

Em estudos clínicos, Xu *et al.*, (2013) com o objetivo de monitorar os níveis plasmáticos de POS, após a administração de 200 mg de uma suspensão oral do medicamento acompanhada da ingestão de uma refeição rica em lipídios, após extração das proteínas foi utilizado o método (CLAE-EM-ESI+/EM), coluna C18 (50 x 2mm, 5 μ), fase móvel ACN:H₂O:Ácido fórmico (45:55:0,1), em modo isocrático, o POS apresentou tempo de retenção de 1,5 min. Ao fim foi demonstrado que há um aumento da concentração plasmática de POS, quando administrado com alimentos gordurosos o que resulta numa maior eficácia no tratamento. Após validação o método demonstrou sensibilidade maior em relação aos outros relatados até então, com limite de quantificação inferior igual a 2ng/mL.

Recentemente o POS foi aprovado para o tratamento profilático de pacientes com neutropenia após quimioterapia de indução para leucemia mieloide aguda (LMA) ou síndrome mielodisplásica (SMD). Tendo em vista esta nova aplicação Chae *et al.*, (2015), resolveu realizar a monitorização terapêutica a partir do plasma de pacientes com tais malignidades hematológicas utilizando como referência método anterior de Xu *et al.*, (2013), alterando a fase móvel para o modo gradiente, apesar de não conter uma discussão mais aprofundada sobre os parâmetros analíticos, os autores obtiveram sucesso na avaliação clínica proposta.

Ainda com relação aos estudos clínicos El-Serafi *et al.*, (2014) resolveram quantificar o POS em tecidos de ratos incluindo diversos órgãos. Foi utilizado o método por (CLAE-EM-ESI+), coluna C18 (50 x 0,21 mm 2,6 μ m), fase móvel composta por Ácido fórmico: ACN em modo gradiente, o POS apresentou tempo de retenção de 2,9 min. O método demonstrou alta taxa de extração e boa reprodutibilidade com um limite inferior de quantificação de 500 ng/mL para uma amostra de 100 μ L para determinar a toxicidade nos órgãos.

Khalil *et al.*, (2015) desenvolveram um método para quantificação simultânea do POS e vincristina (VCR) em plasma. Após extração e purificação das amostras o material foi reconstituído em solvente orgânico e injetado em CLAE-DAD, composto por coluna C18(250

x 4,6 mm, 5 μ m), fase móvel ACN: 0,0015 M diidrogênio ortofosfato de potássio, modo gradiente. Os compostos POS, VCR e o itraconazol utilizado como padrão interno foram separados com Tr igual a 5,9 min; 8,3 min e 10,4 min, respectivamente com limite inferior de quantificação de 50 ng/mL para ambas. Após validado o método foi considerado aplicável para estudos farmacocinéticos de interação entre os fármacos.

Outros métodos foram desenvolvidos com o objetivo de quantificar o POS, Hamdy, (2014) desenvolveu um estudo comparando os métodos desenvolvidos por CLAE-DAD e CLUE-UV (cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada ao detector de ultravioleta) para a matéria-prima e a forma em suspensão. As condições cromatográficas foram: coluna C 18 (250 x 4,6 mm, 5 μ m), fase móvel composta por ACN: tampão diidrogênio ortofosfato de potássio à 15 mM, modo gradiente, o segundo por coluna C 18 (2,1 x 50 mm, 1,3 μ m), ACN: diidrogênio ortofosfato de potássio 15 mM (45:55 v/v), modo isocrático. O Tr do POS foi de 7,7 min e 1 min, respectivamente. Ambos ensaios se mostraram sensíveis e seletivos após validação, porém o método CLUE-UV por ter um tempo de corrida menor acarreta economia de solvente, além disso cromatograficamente a sua separação ao comparar o pico do POS com o adjacente (padrão interno de itraconazol) foi superior com fator de seletividade (α) de 2,66 e 1,25 para CLAE-DAD.

Feng *et al.*, (2001) desenvolveram o primeiro trabalho descrito na literatura que tratou da estabilidade do POS, após aquecimento a 150°C de amostra sólida em contato com o oxigênio atmosférico, durante 12 dias. Houve decaimento significativo do teor e a formação de produtos de degradação. Inicialmente foi utilizado um sistema (CLAE) semi-preparativo para separar e isolar quatro PD's majoritários provenientes da oxidação.

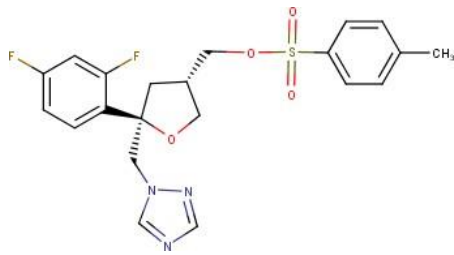
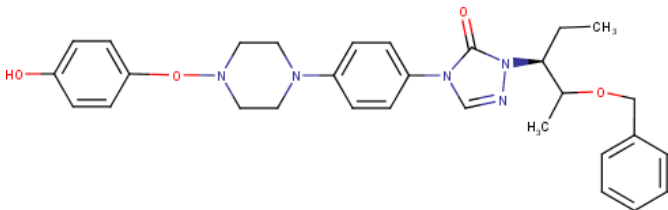
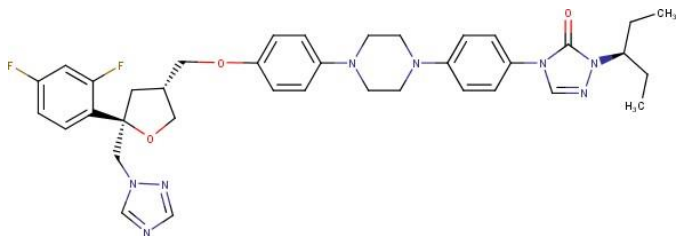
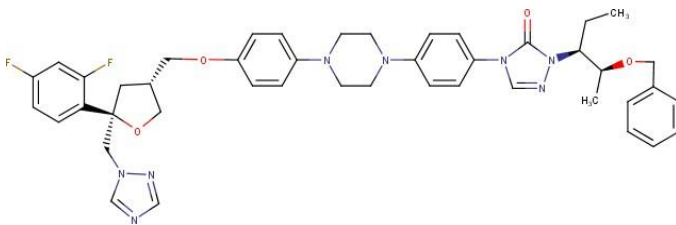
Em seguida foi utilizado o método CLAE analítico acoplado a espectrometria de massas composto de analisador triplo quadrupolo, com ionização de amostra no modo electrospray positivo (ESI+) para elucidar a massa das estruturas e o modo (CLAE-ESI-EM-EM) para revelar a fragmentação estrutural de cada íon molecular, devido a limitação desse método para identificar composto de alta similaridade estrutural, como por exemplo isômeros, foi utilizado um sistema CLAE acoplado a ressonância magnética nuclear (CLAE-RMN) que proporciona a elucidação estrutural de forma inequívoca. O sistema cromatográfico foi composto de coluna quiral de fase reversa (250 x 4,6 mm, 10 μ m), fase móvel composta por H₂O: ACN com 0,03%(v/v) de ácido trifluoroacético em modo gradiente, o Tr do POS foi igual a 22,3 min e dos quatro PD's foi de Tr_a= 25 min, Tr_b= 16 min, Tr_c= 19,5 min, Tr_d= 13 min, com valores de massas de 714, 730, 702 e 414 m/z, respectivamente. Pela primeira vez foi proposta uma rota de degradação tendo como *locus* de degradação o anel piperazina.

A partir do trabalho pioneiro anterior, outros surgiram no intuito de analisar a estabilidade do POS, em Zhong *et al.*, (2012) após a submissão de amostras a processos oxidativos e análise através dos métodos (CLAE-ESI-EM-EM/CLAE-RMN), coluna C18 (150 x 2,1 mm, 3,5 μ m), fase móvel H₂O:ACN, com 0,1 % de ácido fórmico em modo gradiente foi detectado a formação de um novo produto de degradação com Tr= 8,8 min e reafirmação do anel piperazina como centro reacional, desta vez a proposta rotacional sugere contração e não a fragmentação do mesmo, com massa de 687,32 m/z, onde foi possível inferir a perda de um grupo metileno. Onze anos depois do seu trabalho Feng *et al.*, (2012), sob as bases experimentais do trabalho anterior reafirmou que este novo produto de degradação sofre contração formando um produto de degradação dihidroimidazólio.

O primeiro trabalho publicado, propondo um método indicativo de estabilidade após submissão do POS, à testes de degradação forçada em diferentes condições (ácida, básica, oxidativa, térmica) foi desenvolvido por Garcia *et al.*, (2012). O método utilizado foi por CLAE-DAD, coluna C8 (250 x 4,6 mm, 3,5 μ m), fase móvel MeOH: Água (72:25v/v), modo isocrático, com a vantagem de não utilizar tampões. O POS foi estável às condições ácida, básica e térmica e sensível ao meio oxidativo (H₂O₂ 3%), com Tr= 8,5 min, foi registrado um pico no cromatograma representando um possível produto de degradação com Tr= 4,38 min, entretanto não foram utilizadas metodologias complementares para elucidação estrutural. O método foi validado, contudo a pureza de pico do provável PD não foi avaliada, apenas do POS que apresentou índice igual a 1,000000, portanto não houve coeluição com o PD. Além disso, não houve avaliação do balanço de massas.

Com a mesma intenção em desenvolver um MIE para quantificação do POS, Govind *et al.*, (2014) submeteram amostras em estado sólido aos testes de degradação forçada contemplando a maioria das condições preconizadas pelos guias (hidrólise; ácida, básica, neutra, oxidativa, térmica e fotolítica). Para testar a capacidade de separação do método foram utilizados quatro padrões de impurezas de síntese (1-tosilato, 2-hidroxi-triazol, 3-desihidroxi-posaconazol e 4-posaconazol benzilado). Essas estruturas encontram-se representadas no Quadro 6.

Quadro 6- Impurezas de síntese do POS.

Estrutura química	Nome comum e Identificação (IUPAC)
	Composto Tosilado (5R,cis)-Tolueno-4-ácido sulfônico-5- (2,4 difluorofenil)-5-5 (1H-1,2,4-triazol-1-il) metil tetrahydrofurano-3-il-metilester
	Composto Hidroxitriazol 1-((2S,3R)-2-(benziloxi) pentan-3-il)-4-4 (4-hidroxifenil) piperazin-1-il-fenil-1H-1,2,4-triazol-5(4H)-one
	Desidroxi posaconazol 4-(4-(4-(((3R,5R)-5-((1H-1,2,4-triazol-1-il) metil-5-(2,4-difluorofenil) tetrahydrofurano-3-il)metoxil) fenil) piperazin-1-il) fenil)-1-(pentan-3-il)-1H-1,2,4-triazol-5 (4H)-one
	Posaconazol benzilado 4-(4-(4-(((3R,5R)-5-((1H-1,2,4-triazol-1-il) metil-5-(2,4-difluorofenil) tetrahydrofurano-3-il) metoxil) fenil) piperazin-1-il) fenil)-1-((2S,3S)-2-(benziloxi) pentan-3-il) 1H-1,2,4-triazol-5 (4H)-one

Fonte: Adaptado de Govind *et al.*, (2014).

O método utilizado foi por CLAE-DAD, coluna C18 (250 x 4,6 mm; 5 µm), fase móvel composta pela fase A: tampão: ACN (90:10 v/v) e fase B: ACN: H₂O (90:10 v/v), o tampão utilizado foi o hidrogênio fosfato de potássio anidro, ajustado o pH para 5,5 com ácido ortofosfórico, modo gradiente. O tempo total de corrida foi de 45 minutos. Na solução padrão contaminada com todas impurezas o Tr para o POS foi 14,53 min e para as demais impurezas

foram as seguintes: 1= 16,6 min, 2= 17,4 min, 3= 29,5 min e 4= 34,3 min.

O POS mostrou-se mais susceptível, as condições básica e oxidativa, com percentuais degradados de 9% e 7%, respectivamente, sendo que das impurezas utilizadas como padrão, após degradação forçada surgiram apenas os compostos 3 e 4 que representaram percentuais insignificantes menores que 0,2%, outros picos registrados no cromatograma representam possíveis PD's que não tiveram demonstrado o parâmetro da pureza espectral.

Em relação às hidrólises ácida e neutra, fotólise e termólise o percentual de degradação foi inferior a 3%, novamente só foram registradas as impurezas 3 e 4 com percentuais mínimos. O método foi validado, mas o seu potencial indicador de estabilidade é questionável, assim como o anterior em nenhuma condição atingiu níveis superiores a 10% de degradação, os padrões de impurezas utilizados demonstraram apenas a capacidade de separação do método, não sendo esses os prováveis PD's majoritários, além da falta de detectores complementares que auxiliassem na elucidação estrutural de picos desconhecidos.

Kathirvel *et al.*, (2014) em desenvolvimento do MIE submeteu o POS as condições de estresse ácida, básica, oxidativa e térmica, utilizando a mesma estratégia do método anterior empregou os padrões de impurezas do POS seguintes: (1-intermediário A; 2-intermediário B; 3-diastereoisômero; 4-formil; 5-benzil) para demonstrar a capacidade de separação do método, entretanto não houve a formação dessas impurezas como PD's nos testes de degradação, aliás em contradição aos dados anteriormente relatados, o POS é considerado estável sob todas condições. O método utilizado foi validado por (CLAE-DAD), coluna C18 (150 x 4,6 mm; 5 µm), fase móvel MeOH: H₂O (75:25), modo gradiente, sem tampão. O Tr do POS registrado igual a 26,3 min e das impurezas entre 15 min e 30 min, com tempo total de corrida de 45 min.

Prasad, (2015) com o mesmo objetivo, em estabelecer um MIE utilizou o método via CLUE-DAD, que utiliza as mesmas bases metodológicas da CLAE tradicional, entretanto com tamanho da partícula de sílica de coluna e extensão menor C18 (100 x 2,1 mm; 1,7 µm), o que confere a característica de menor uso de solventes orgânicos, porque é possível utilizar um fluxo menor, sem perder a qualidade dos parâmetros cromatográficos reduzindo os custos da técnica e em consonância com a sustentabilidade ambiental. A fase móvel composta por H₂O: ACN em 0,1% de ácido ortofosfórico, modo gradiente. Os testes de degradação consistiram na submissão do POS ao estresse ácido, básico, neutro, oxidativo, fotolítico e térmico. Apenas a oxidativa e em menor extensão a térmica produziram produtos de degradação.

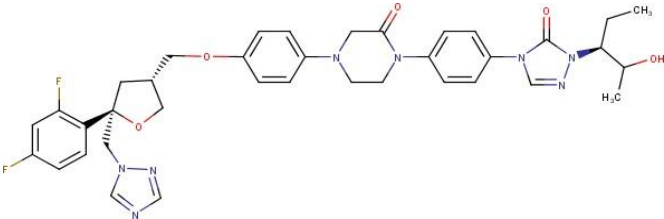
Foram adquiridos os mesmos padrões de síntese utilizados no trabalho de Govind *et al.*, (2014), para testar a capacidade de separação do método, onde obteve-se êxito, entretanto da mesma forma que o estudo anterior as impurezas de síntese 3 e 4 formadas no estresse tem

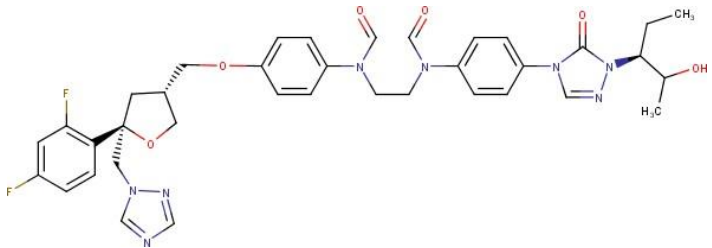
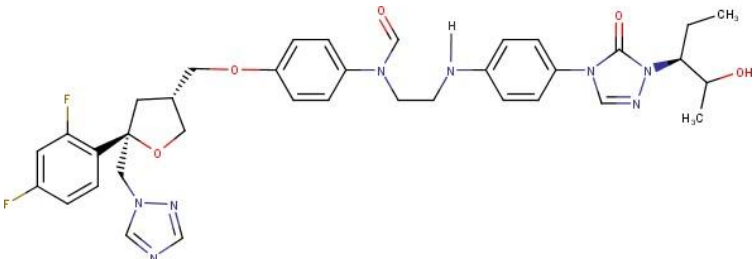
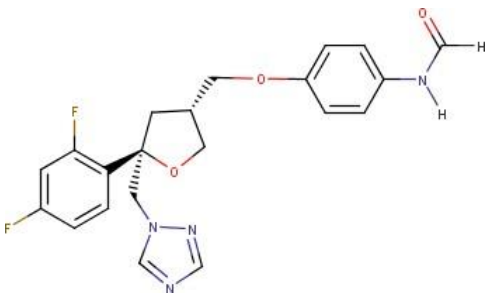
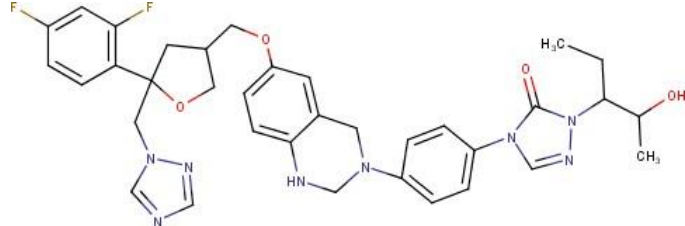
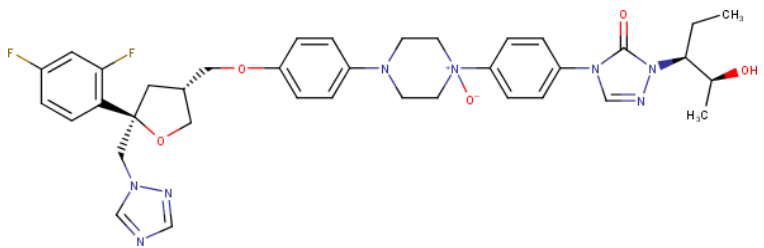
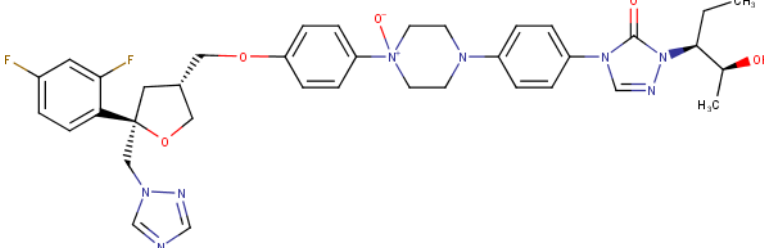
percentual insignificante comparado aos PD's majoritários, em 3 horas de POS à 60°C (1% H₂O₂), houve decaimento de 70% do teor inicial, sendo que o composto 3 com Tr = 6,5 min e 4 com Tr = 7,6 min representam 0,03% e os picos de compostos desconhecidos com Tr = 1,8 min e Tr = 2,5 min; configuram 58,7% do percentual decaído. O tempo total de corrida foi de 18 minutos.

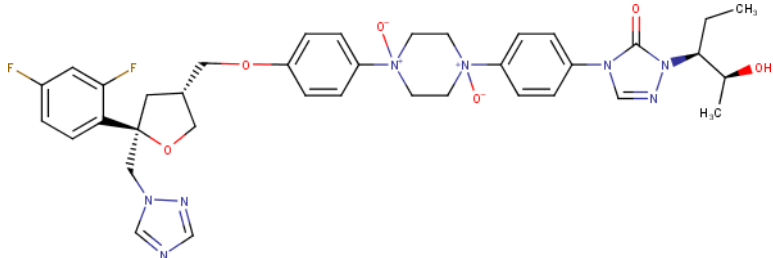
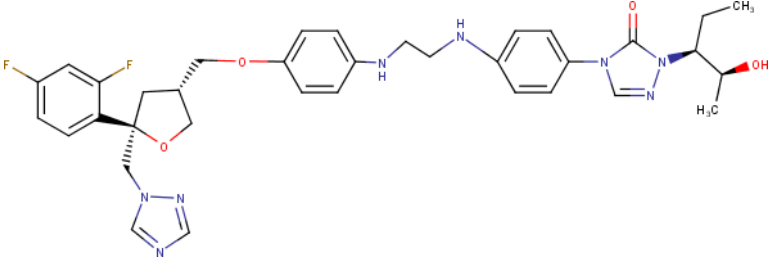
O trabalho mais recente propondo o estudo do perfil de degradação do POS, elaborado por Yang *et al.*, (2016); investigou a estabilidade sob várias condições de estresse (ácida, básica, oxidativa, termolítica e fotolítica). As amostras degradadas foram injetadas no CLAE-DAD analítico, coluna Zorbax SB-Phenyl (75 x 4,6 mm, 3,5 µm), fase móvel composta por duas fases A: H₂O: THF: Ácido fosfórico (77:23:1 v/v/v) e B: H₂O: ACN: Ácido fosfórico (20:80:1 v/v/v), modo gradiente. Em seguida, as amostras estressadas foram injetadas em CLAE-preparativo, para separar as frações contendo os PD's majoritários, seca-las via liofilização e injeta-las no (CLAE-ESI-TOF), (CLAE-EM-EM) e RMN de carbono e hidrogênio, para elucidação estrutural inequívoca.

Um total de quatro novos PD's foram detectados em sua maioria produtos N-óxidos resultante da susceptibilidade do anel piperazina. Como mensurado em outros trabalhos, o POS com 701 m/z e Tr = 11,8 min, foi mais sensível ao meio oxidativo, com a formação de três PD's (I = 717 m/z, II = 717 m/z, III = 733 m/z), com Tr = 1,2 min, 2,4 min e 3,5 min, respectivamente e em menor proporção houve sensibilidade ao meio ácido, básico e térmico com a formação de um PD (IV) com Tr = 4,2 min, mantendo-se estável ao estresse fotolítico. O diferencial deste trabalho está na elucidação estrutural dos PD's formados via técnicas hifenadas e a proposição da rota de degradação. Todos os PD's mensurados encontram-se no Quadro 7.

Quadro 7- Produtos de degradação do POS.

Estrutura química*	Origem	Razão massa/carga (m/z)
	Oxidação	715

	Oxidação	731
	Oxidação	703
	Oxidação	415
	Oxidação	688
	Oxidação	717
	Oxidação	717

	Oxidação	733
	Hidrólise Ácida/ Básica Termólise	675

* Obs: Os referidos autores não mencionaram a nomenclatura IUPAC em seus trabalhos.

Fonte: Adaptado de Feng *et al.*, (2001); Zhong *et al.*, (2012); Yang *et al.*, (2016).

Apesar do número considerável de publicações de metodologias para análise do POS, poucos métodos, propõem a análise da estabilidade intrínseca da molécula através dos MIE, em grande parte após submissão aos testes de degradação forçada, o fármaco manteve-se praticamente estável em todos os meios com exceção do oxidativo, entretanto os tempos de exposição empregados poderiam ter sido prolongados, além da submissão à concentrações mais elevadas dos reagentes utilizados ou até mesmo aquecimento a temperaturas mais elevadas, afim de desenvolver um método que possa separar, quantificar e identificar (quando necessário) o maior número de PD`s possíveis nos estudos de estabilidade formais. Como o POS mostrou-se menos estável a condição oxidativa, cabe analisar essa via de forma mais detalhada.

MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 REAGENTES

O POS, sob a forma de IFA com lote de número: C010-1407001 foi cedido pela empresa API Vanguard[®]. Segundo laudo analítico certificado pelo fornecedor, apresenta teor de pureza igual à 100,2%, ao qual foi utilizado como padrão de trabalho para o preparo das amostras padrões e submetidas as condições de degradação. Armazenado em recipiente não metálico, sem contato com a luminosidade, como recomendado pelo fabricante.

A água ultrapura foi obtida do purificador de água Milli-Q[®] (Millipore, Milford, EUA). Os demais reagentes estão descritos no Quadro 8.

Quadro 8- Reagentes utilizados nas análises.

Reagentes	Fabricante	Lote
Ácido Clorídrico	Química-moderna [®]	00770
Hidróxido de Sódio em lentilhas	Sigma-Aldrich [®]	SLBL1391V
Peróxido de Hidrogênio	Isofar [®]	28753
Metanol	J.T. Baker [®]	T37C15
Ácido Cítrico Anidro	Química-moderna [®]	04543
Acetato de Sódio Anidro	Dinâmica [®]	75242
Citrato de Sódio cristalizado	Isofar [®]	1964130
Fosfato de Potássio monobásico	Fmaia [®]	42205
Fosfato de Potássio dibásico	Dinâmica [®]	76590
Ácido acético glacial	Fmaia [®]	40500

Fonte: Autoria própria

4.2 EQUIPAMENTOS

Foram utilizados os equipamentos listados abaixo, estando devidamente calibrados e certificados:

- Balança analítica Sartorius[®], modelo CP225D (Alemanha).
- Banho-maria Haake[®], modelo BAN 001 (Estados Unidos).
- Cromatógrafo a líquido Shimadzu[®], com bomba quaternária FCV-10AL, injetor manual, detector equipado com arranjo de diodos (DAD) SPD- M10A e forno para coluna CTO-10A (Japão).
- Estufa de secagem e esterilização Fanem[®], modelo 315 SE (Brasil).
- Espectrômetro de massas Bruker[®], modelo Impact II QTOF (Estados Unidos).

- Lavadora ultrassônica Schuster[®], modelo L200 (Brasil).
- PHmêtro Micronal[®] modelo B474 (Brasil).

4.3 ENSAIOS DOS TESTES DE DEGRADAÇÃO FORÇADA

As condições iniciais para realização dos estudos de degradação forçada, foram determinadas conforme análise de susceptibilidade do fármaco a decomposição em meio alcalino, ácido, oxidativo e térmico. A Tabela 3 apresenta as condições iniciais em que o POS foi exposto, com a finalidade de avaliar com o decorrer do tempo, o teor final de fármaco presente e a formação dos produtos de degradação.

Tabela 3- Testes realizados para avaliar a degradação de POS.

Tipo de degradação	Tempo e Temperatura	Concentração
Hidrólise ácida (HCl)	120 h (25°C)	0,4 M e 2,0 M
Hidrólise alcalina (NaOH)	120 h (25°C)	0,4 M e 2,0 M
Oxidativa (H ₂ O ₂)	81 h (25°C)	1,2% (v/v)
Termólise (sólido)	120 h (85°C)	-----

Fonte: Autoria própria

4.3.1 Soluções de degradação

Foram utilizadas soluções de ácido clorídrico (HCl) 1,0 M e 5,0 M, hidróxido de sódio (NaOH), 1,0 M e 5,0 M, peróxido de hidrogênio (H₂O₂) à 3,0% preparadas de acordo com a Farmacopeia Brasileira 5ª edição, volume 1, 2010.

4.4 MÉTODO INDICATIVO DE ESTABILIDADE

As amostras derivadas dos estudos de degradação foram analisadas por (CLAE-DAD), sendo os dados tratados através do *software* Shimadzu LC solution 1.0[®]. Seguindo os parâmetros descritos pelo MIE desenvolvido por Garcia *et al.*, (2012) foi aplicado o uso de uma coluna C8 (250 x 4,6 mm; 5µm) à 25°C, como fase estacionária, uma solução de MeOH:H₂O (75:25), como fase móvel em modo isocrático, volume de injeção de 20 µL e fluxo de 1 mL.min¹.

Este método foi escolhido como ponto de partida, devido algumas vantagens

elencadas à seguir em comparação com outros métodos descritos na literatura: tempo de retenção reduzido do posaconazol equivalente à 8,5 minutos; uso de coluna sem grupamentos especiais; modo de eluição simplificado composto por solventes mais baratos e de menor impacto ao meio ambiente e sem a necessidade de tampões, que em uso contínuo e dependendo da concentração acarretam maior desgaste ao sistema cromatográfico; não coeluição dos picos representados pelos PD's e o fármaco.

4.4.1 Preparo da fase móvel

A fase móvel foi preparada com a mistura de MeOH e água ultrapura na proporção (75:25), respectivamente, após serem aferidos separadamente foram transferidos para balão. Em seguida a solução resultante foi desgaseificadas em banho ultrassônico por 5 minutos.

4.4.2 Preparo do padrão

A solução padrão foi preparada em triplicata, pesou-se 5 mg de POS (padrão interno) transferiu-se para balões volumétricos de 50 mL, foi adicionado 25 mL da solução de (MeOH: H₂O) na mesma proporção utilizada na fase móvel, submeteu-se à desgaseificação por 5 minutos, ao término o volume foi aferido com a respectiva solução, obtendo-se a concentração de 100µg/mL. Transferiu-se 5 mL para balões de 25 mL, completando os volumes com MeOH. As alíquotas das soluções foram retiradas com seringas e filtradas através das unidades filtrantes CROMAFIL[®] Xtra PVDF-45/25, com tamanho de poro de 0,45 µm, tendo como acondicionante os vials, para posterior leitura cromatográfica. Obteve-se a concentração final de 20µg/mL.

4.4.3 Preparo das amostras

As amostras foram preparadas com o intuito de promover uma degradação superior à 10% e inferior àquela que levaria a degradação completa da amostra (BLESSY *et al.*, 2014). Considerando este aspecto, os testes de degradação forçada foram preparados como descrito a seguir.

4.4.3.1 Degradação oxidativa

Foram preparadas três soluções de POS, a partir da solubilização de 5 mg do

fármaco em 25 mL de metanol, em balões volumétricos de 50 mL, em seguida as amostras foram desgaseificadas por 5 minutos e aferiu-se o volume com MeOH para atingir uma concentração teórica de 100 µg/mL.

Dessas soluções foram retiradas alíquotas de 10 mL e transferidas para balões volumétricos de 25 mL, com posterior adição de 10 mL da solução degradativa de peróxido de hidrogênio à 3% e aferiu-se com MeOH. Na seguinte faixa de tempo da reação (9h; 24h; 35h; 48h; 57h; 72h e 81h), foram transferidas alíquotas de 5 mL para balões volumétricos de 10 mL e aferiu-se com MeOH.

As alíquotas das soluções foram retiradas com seringas e filtradas através das unidades filtrantes tendo como acondicionante os vials que foram aquecidos por 5 minutos a 40 °C para diminuir a intensidade do registro dos picos de H₂O₂ em posterior leitura cromatográfica.

4.4.3.2 Degradação hidrolítica ácida

Foram preparadas três soluções de POS, a partir da solubilização de 5 mg do fármaco em 25 mL de metanol, em balões volumétricos de 50 mL, em seguida as amostras foram desgaseificadas por 5 minutos e aferiu-se o volume com MeOH para atingir uma concentração teórica de 100 µg/mL.

Dessas soluções foram retiradas alíquotas de 10 mL e transferidas para balões volumétricos de 25 mL, com posterior adição de 10 mL da solução degradativa de HCl (1,0 M e 5,0 M) e aferiu-se com MeOH, mantendo-se a temperatura de 25°C, por 120h. A cada tempo de análise, uma alíquota de 5mL foi transferida para balões volumétricos de 10 mL e aferiu-se com MeOH.

4.4.3.3 Degradação hidrolítica básica

Foram preparadas três soluções de POS, a partir da solubilização de 5 mg do fármaco em 25 mL de metanol, em balões volumétricos de 50 mL, em seguida as amostras foram desgaseificadas por 5 minutos e aferiu-se o volume com MeOH para atingir uma concentração teórica de 100 µg/mL.

Dessas soluções foram retiradas alíquotas de 10 mL e transferidas para balões volumétricos de 25 mL, com posterior adição de 10 mL da solução degradativa de NaOH (1,0 M e 5,0 M) e aferiu-se com MeOH, mantendo-se a temperatura de 25°C, por 120 h. A cada tempo

de análise, uma alíquota de 5mL foi transferida para balões volumétricos de 10 mL e aferiu-se com MeOH.

4.4.3.4 Degradação termolítica

Inicialmente 100 mg de POS foi transferido para tamis de malha 60, durante a tamisação a amostra foi distribuída homogeneamente a uma altura limite de 3 mm em placa de Petri e foi levada à estufa numa temperatura controlada de 85°C. Após 120 horas retirou-se 2,5 mg do POS em triplicata e transferiu-se para balões volumétricos de 25 mL, foi adicionado 12 mL da solução de (MeOH: H₂O) na mesma proporção utilizada na fase móvel, submeteu-se a desgaseificação por 5 minutos, ao término o volume foi aferido com a respectiva solução. Em seguida 2 mL foram transferidos para balões de 10 mL e aferiu-se com a fase móvel.

4.5 PARÂMETROS CROMATOGRÁFICOS

Com a finalidade de monitorar o desempenho da coluna e avaliar a capacidade do método em mensurar o POS na presença dos produtos de degradação e demais componentes analíticos foram avaliados os parâmetros: pureza de pico, fator de capacidade (k'), número de pratos teóricos (N), fator de cauda (T) e resolução (R) para cada condição de degradação. As expressões matemáticas e especificações referentes a esses parâmetros estão presentes na Tabela 4.

Tabela 4- Parâmetros cromatográficos.

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

Fonte: Adaptado de Harris, 2011.

Onde: w: largura da base do pico; $w_{0,05}$: largura do pico a 5% da altura; f: porção anterior do pico, em relação à largura a 5% da altura; t_r : tempo de retenção; t_m : tempo morto.

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram apresentados com base nos cálculos da média, desvio padrão,

coeficiente de correlação linear, a partir das triplicatas realizadas para cada condição de degradação forçada analisada. Os dados estatísticos e a representação gráfica dos resultados foram obtidos através do software Origin 9[®], OriginLab, 2012 (Massachusetts, EUA).

4.7 CARACTERIZAÇÃO DOS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS

4.7.1 Parâmetros de análise

A análise foi realizada por infusão direta (Flow injection analysis – FIA), a partir de uma bomba de infusão acoplada a uma seringa. As amostras foram injetadas com vazão de 20 µL/min. O espectrômetro foi programado com ionização no modo electrospray positivo (ESI+), com scan entre 50 *m/z* e 3.000 *m/z* utilizando como energia de capilar 3,5 kV; energia de colisão entre 40 eV e 50 eV, nitrogênio como gás de nebulização à 4L/min à temperatura de 180°C. O equipamento foi calibrado com trifluoroacetato de sódio (NaTFA) à 200 µg/mL.

4.7.2 Preparo das amostras

4.7.2.1 Padrão

A solução de POS (padrão interno) foi preparada à partir da solubilização de 5 mg de POS em balões volumétricos de 50 mL, foi adicionado 25 mL da solução de (MeOH: H₂O) na mesma proporção utilizada na fase móvel, submeteu-se à desgaseificação por 5 minutos, ao término o volume foi aferido com a respectiva solução, obtendo-se a concentração de 100 µg/mL.

4.7.2.2 Degradação oxidativa

Foram preparadas três soluções de POS, a partir da solubilização de 5 mg do fármaco em 25 mL de metanol, em balões volumétricos de 50 mL, em seguida as amostras foram desgaseificadas em banho ultrassônico por 5 minutos e aferiu-se o volume com MeOH para atingir uma concentração teórica de 100 µg/mL.

Dessas soluções foram retiradas alíquotas de 10 mL e transferidas para balões volumétricos de 25 mL, com posterior adição de 10 mL da solução degradativa de peróxido de hidrogênio à 3% e aferiu-se com MeOH. Após 24 horas de exposição do POS, foi retirado 150

μL para balões de 25 mL e aferiu-se com MeOH obtendo-se uma concentração próxima a 200 ng/mL.

4.8 ESTUDO DA CINÉTICA DE DEGRADAÇÃO

Em virtude da susceptibilidade do POS a degradação oxidativa, prosseguiu-se com os estudos de cinética para essa condição, onde inicialmente foi realizado o ensaio, com as amostras preparadas conforme o item 4.3.4.1, a fim de determinar a ordem de reação, a constante de velocidade (k) e os parâmetros cinéticos.

Para avaliar a influência dos reagentes na determinação da ordem de reação foram realizados experimentos mantendo-se constante a concentração inicial de leitura do POS em (20μg/mL) e a temperatura (25°C), variando-se a concentração de H₂O₂ para (0,6% e 2,4%).

Como a temperatura também é um dos fatores que influenciam a velocidade das reações, estabeleceu-se a necessidade de analisar a degradação oxidativa em faixas superiores à (25°C), com a finalidade de proporcionar a degradação de maneira gradual e não instantânea, que possibilite a observação do comportamento da reação. Selecionou-se a temperatura de (45°C) e foi descartado delinear experimentos acima desta, uma vez que o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) possui sensibilidade ao calor decompondo-se.

Conforme Freed *et al.*, (2008), o controle de pH tem um efeito significativo na velocidade de oxidação de compostos nitrogenados, que contém aminas primárias. Em solução de H₂O₂, esses compostos formam produtos de degradação (N-óxidos). Como o POS enquadra-se nesse grupo, torna-se pertinente avaliar esse parâmetro. Foram delineados experimentos, utilizando tampões equimolares preparados a partir da equação de Henderson-Hasselbalch: $\text{pH} = \text{pKa} + \log [\text{base}] / [\text{ácido}]$. Em que o pH da solução tampão é determinado segundo o pKa (constante de dissociação do ácido) e das concentrações de equilíbrio ácido-base, do ácido e da base conjugada.

Segundo Atkins, (2006), os sais para o preparo dos tampões devem possuir preferencialmente um valor de pka, variando uma unidade em relação ao pH desejado. Obedecendo essa regra calculou-se os valores das massas do ácido e da base conjugada com a finalidade de obter soluções tampões com pH 2,5 (citrato de sódio/ácido cítrico); pH 5,0 (acetato de sódio/ácido acético) e pH 7,5 (fosfato de potássio monobásico/ dibásico), com os sais possuindo os valores de pka de 3,15; 4,74 e 6,86, respectivamente.

As soluções tampões apresentaram concentração final de 10 mM. Os valores de pH para cada solução tampão foram verificados a partir da análise em pHmêtro, obtendo-se êxito

frente as proporções de massas calculadas.

As amostras foram preparadas em triplicata, a partir da solubilização de 1 mg do fármaco em 10 mL de MeOH, em balões volumétricos de 25 mL, em seguida foram desgaseificadas em banho ultrassônico por 5 minutos, adicionou-se 10 mL das respectivas soluções tampões e 1 mL de H₂O₂ à 30%. Aferiu-se o volume com o tampão para atingir uma concentração teórica inicial de 40 µg/mL.

As condições cinéticas empregadas encontram-se resumidamente na Tabela 5.

Tabela 5- Testes realizados para avaliar a cinética de degradação de POS.

Cinética de degradação		
Concentração de peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂)	Temperatura	pH
0,6% (v/v)	25°C	sem controle
1,2% (v/v)	25°C	sem controle
2,4% (v/v)	25°C	sem controle
1,2% (v/v)	45°C	sem controle
1,2% (v/v)	25°C	2,5
1,2% (v/v)	25°C	5,0
1,2% (v/v)	25°C	7,5

Fonte: Autoria própria

4.9 DELINEAMENTO DOS ESTUDOS COMPUTACIONAIS

Uma vez proposto que o mecanismo de degradação oxidativa do posaconazol ocorre através dos nitrogênios localizados na parte central de sua molécula, alguns cálculos foram realizados com o objetivo de corroborar com este comportamento. Inicialmente a estrutura de menor energia do fármaco foi calculada através do método B3LYP/6-31++G (d,p) com o programa GAUSSIAN 09[®]. Em seguida com a estrutura otimizada foi determinado o orbital de fronteira HOMO e potencial eletrostático.

RESULTADOS

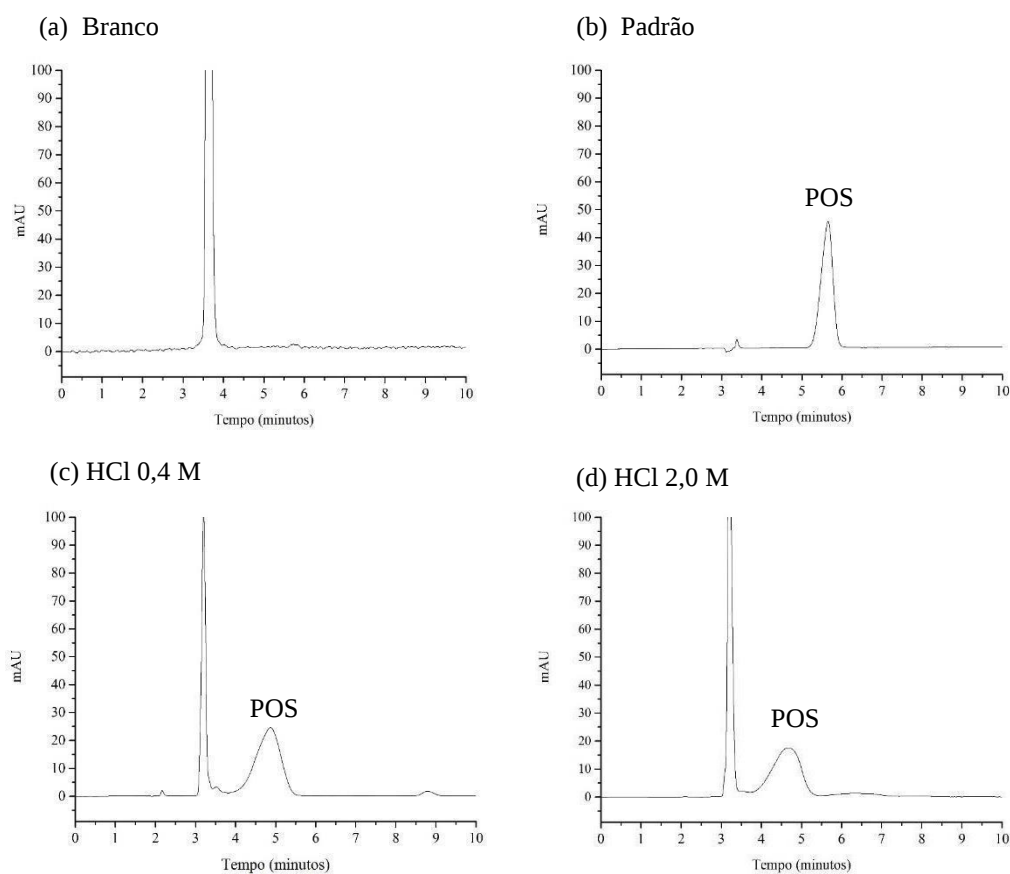
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ESTUDO DE DEGRADAÇÃO DO POSACONAZOL

a) Hidrólise ácida

As amostras de POS foram submetidas à hidrólise ácida (HCl) à 0,4M e posteriormente à (HCl) 2,0M durante 120 horas, conforme metodologia. O POS manteve-se estável, com decaimento médio de 0,6% (DPR=1,59) e 1,8% (DPR=2,15), respectivamente. Após sobreposição com o branco da amostra representado na Figura 3, foi possível observar que não houve a formação de produtos de degradação para ambas condições e a partir da análise espectral da pureza de pico registrada para o POS com $T_r = 4,2$ min foi equivalente a 1,0; portanto não houve coeluição de picos.

Figura 3- Cromatogramas: (a) branco das amostras; (b) padrão; (c) amostras submetidas a HCl 0,4M; (d) amostras submetidas à HCl 2,0M.

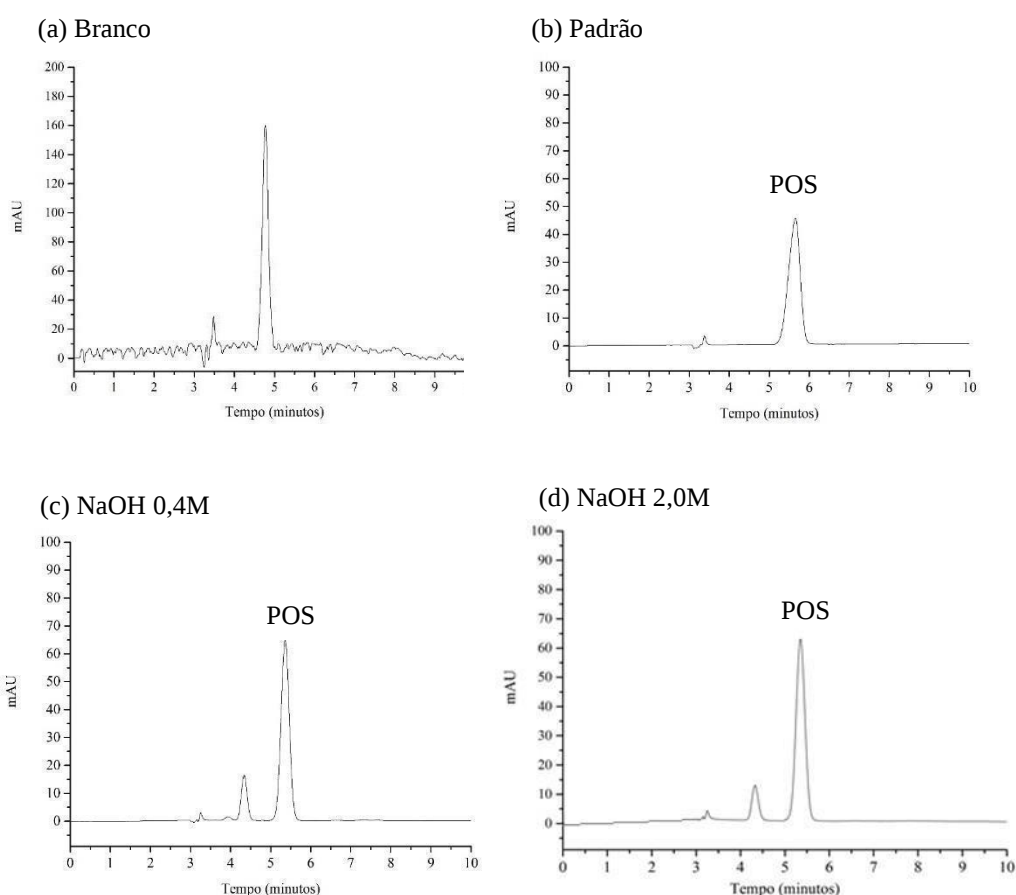


Fonte: Autoria própria

b) Hidrólise básica

As amostras de POS submetidas a hidrólise básica (NaOH) à 0,4M e posteriormente (NaOH) 2,0M, durante 120 horas mantiveram-se estáveis, com decaimento médio do teor de 1,2% (DPR=1,94) e 2,9% (DPR=1,78). Como no item anterior verificou-se que não houve a formação de produtos de degradação, após a sobreposição dos cromatogramas do branco e das amostras degradadas conforme Figura 4. A análise espectral da pureza de pico do POS com $TR = 5,2$ min foi equivalente a 1,00, confirmando que não houve coeluição dos picos.

Figura 4- Cromatogramas: (a) branco das amostras; (b) padrão; (c) amostras submetidas a NaOH 0,4M; (d) amostras submetidas à NaOH 2,0 M.



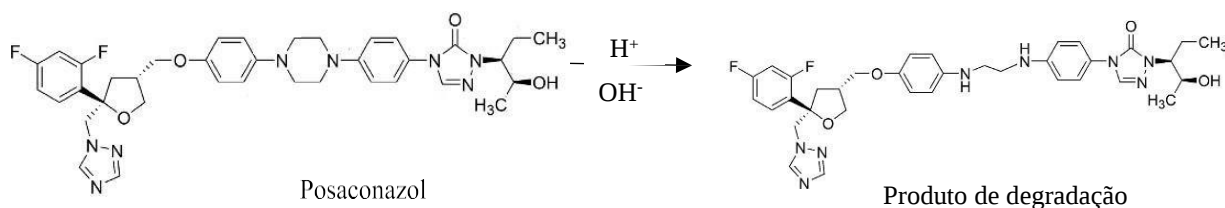
Fonte: Autoria própria

O POS demonstrou-se estável em relação a hidrólise ácida e básica nas condições mais brandas e drásticas, pois, no decorrer do tempo analisado, não houve decaimento significativo do teor das amostras. Contudo, em um estudo de estabilidade de POS realizado por Yang *et al.*, (2016) foi demonstrado que a degradação é passível de ocorrer, uma vez que foi efetuada a elucidação estrutural de um novo produto de degradação, após a submissão

do fármaco as concentrações de HCl 1,0M e NaOH 1,0M, por 48 horas.

Não há um mecanismo de ação detalhado proposto, entretanto, a partir do produto de degradação formado sugere-se que os ataques ácido (HCl) e básico (NaOH) promovem a ruptura do anel piperazina presente no centro da molécula, conforme Figura 5.

Figura 5- Proposta de rota de degradação do POS por hidrólise ácida e básica



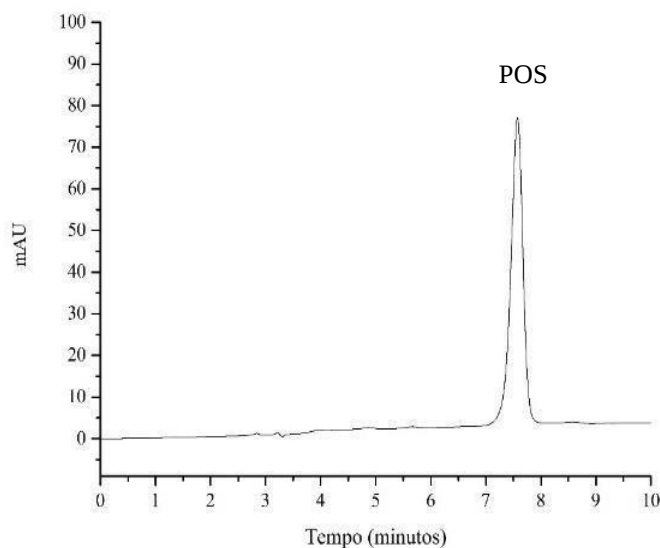
Fonte: Autoria própria baseado em Yang *et al.*, (2016).

A susceptibilidade do POS ao meio ácido e básico não é unânime na literatura, esta característica pode ser justificada não por má condução dos testes de degradação forçada ou incapacidade do método em detectar tais produtos de degradação, pois além da característica intrínseca da molécula, o perfil de degradação pode ser influenciado pela presença de impurezas e resíduos de catalisadores e solventes, bem como diferenças na rota de síntese podem ser de grande relevância, principalmente no caso de moléculas complexas, com alto peso molecular e grande número de grupos funcionais como o fármaco em questão, por isso é essencial no setor produtivo qualificar os fornecedores de matéria prima, pois caso sejam trocados há necessidade técnica e legal de conduzir novos estudos de estabilidade (BRASIL, 2016).

c) Degradação termolítica

O POS demonstrou-se estável quando submetido ao calor seco à 85°C, após a análise das alíquotas em triplicata após 120 h, com decaimento médio do teor de 2,8% (DPR=2,30). A partir do cromatograma representado pela Figura 6 é possível observar que não houve a formação de produtos de degradação após as 120 horas de reação. Portanto sob esta condição o POS com Tr= 7,2 min pode ser considerado estável.

Figura 6- Cromatograma do POS após exposição ao calor seco à 85°C durante 120 h.



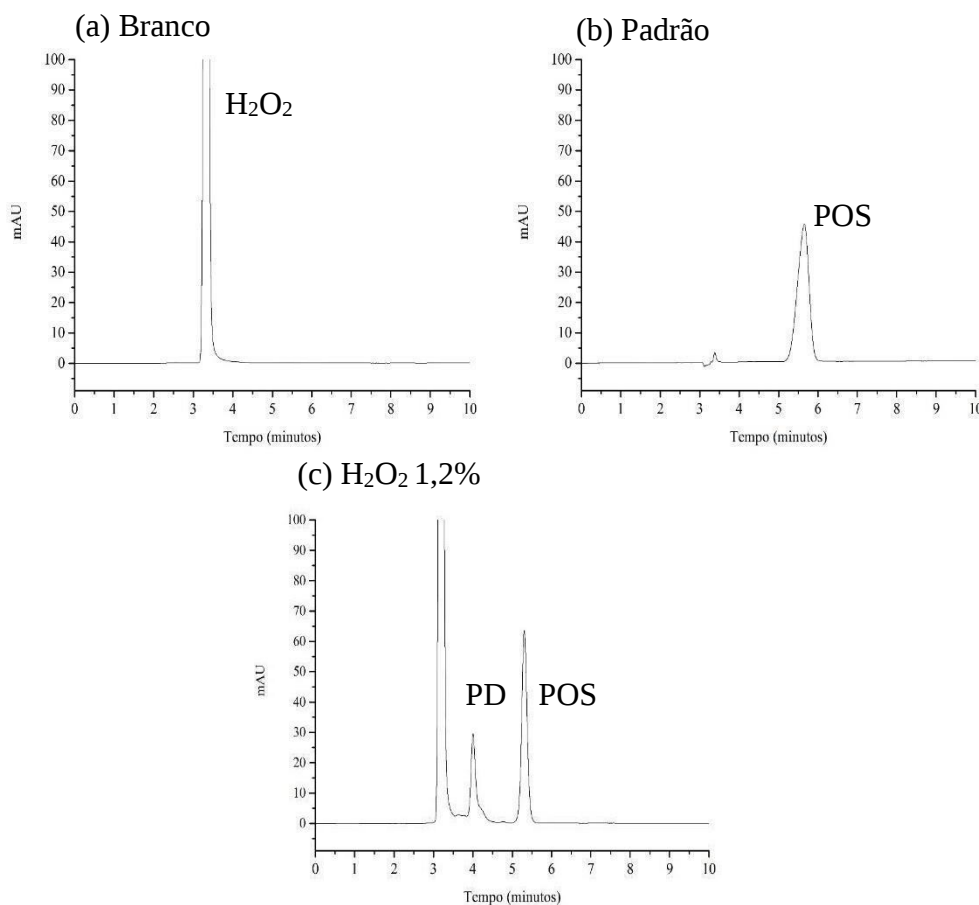
Fonte: Autoria própria

d) Degradação oxidativa

O POS possui sensibilidade ao meio oxidativo, ao reagir de maneira moderada nessa condição (YANG *et al.*, 2016). Em virtude dessa característica, o ensaio foi conduzido à uma baixa concentração de solução de peróxido de hidrogênio, sem a necessidade de exposição ao calor.

Conforme a Figura 7, referente aos cromatogramas do padrão e o branco, além das amostras degradadas em (H_2O_2 1,2%, 25°C), durante 81 horas foram comparados com a finalidade de eliminar os sinais de interferentes e permitir visualizar a separação entre o fármaco e os produtos de degradação advindos do mesmo, bem como a quantificação das áreas ao longo dos tempos de exposição. Foi possível observar a formação de outro pico representando um possível produto de degradação (PD) com $\text{Tr} = 4,2$ min, além do que representa o POS com $\text{Tr} = 6,0$ min, a análise espectral da pureza de pico registrada para o POS foi equivalente a 1,0; portanto não houve coeluição dos picos, já para o possível PD foi ligeiramente inferior, com resultado de 0,927484, o que pode indicar a presença de mais de um composto com grande similaridade estrutural.

Figura 7- Cromatogramas: (a) branco das amostras; (b) padrão; (c) amostras submetidas a H_2O_2 1,2%, 25°C.



Fonte: Autoria própria

5.2 PARÂMETROS CROMATOGRÁFICOS

Observou-se que todos os parâmetros cromatográficos analisados obtiveram valores satisfatórios conforme especificado na metodologia, os resultados estão presentes na Tabela 6.

Notou-se ao longo das análises, uma variação no tempo de retenção do POS entre 5,2 min e 7,2 min devido à variação de temperatura entre 24°C-30°C, à medida que a temperatura do equipamento aumentava a pressão do sistema reduzia e o Tr medido também reduzia.

Tabela 6- Resultados da adequação do sistema para POS e os PD's nas condições de estresse.

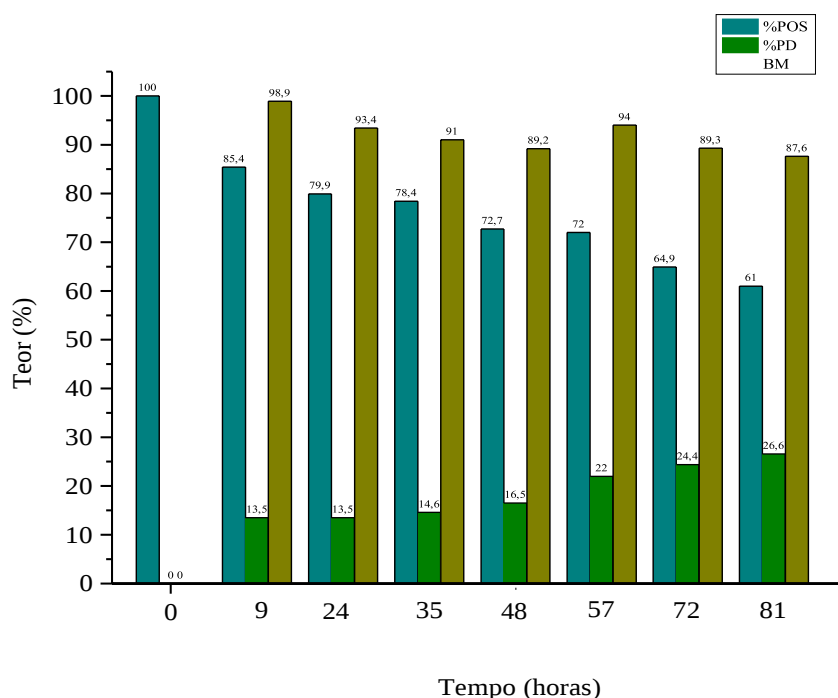
*Parâmetros cromatográficos	Condições de degradação					
	HCl 0,4M	HCl 2,0M	NaOH 0,4M	NaOH 2,0M	Térmica 85°C	H2O2 1,2%
Número de pratos (N)	2471	2498	2847	2957	2450	POS = 2591 PD = 2270
Fator de capacidade (k)	1,028	1,235	0,699	1,264	1,315	POS = 0,573 PD = 0,500
Fator de cauda (T)	1,373	1,419	1,024	1,036	1,046	POS = 1,226 PD = 1,396
Resolução (R)	1,652	2,128	2,97	3,00	2,343	POS = 3,885 PD = 1,500

*Valores correspondentes apenas ao POS em HCl (0,4M e 2,0M); NaOH (0,4M e 2,0M) e térmica (85°C).

Fonte: Autoria própria

5.3 AVALIAÇÃO DO BALANÇO DE MASSAS DA DEGRADAÇÃO OXIDATIVA

Os resultados do decaimento do teor do POS e consequentemente crescimento da área do produto de degradação, além do balanço de massas obtidos após exposição oxidativa com solução de H₂O₂ à 1,2% (25°C), encontra-se na Figura 8:

Figura 8- Avaliação dos teores do POS, produto de degradação e balanço de massas obtido após a oxidação em solução de H₂O₂ a 1,2% nos tempos de 0; 9; 24; 35; 48; 57; 72; 81 horas.

Legenda: BM (balanço de massas); %PD (percentual de produto de degradação); %POS (percentual de posaconazol).

Fonte: Autoria própria

Após analisar os dados da Figura 8 e comparar os resultados das amostras oxidadas com a amostra controle, pode-se constatar que houve uma degradação do POS de forma mais intensa, nas primeiras 9 horas de exposição, ao atingir um teor de 85,4% e um percentual de produtos de degradação de 13,5%. Efetuando-se o somatório dos teores do POS e dos produtos de degradação obteve-se um balanço de massas de 98,9%.

Ao final do tempo de estudo obteve-se um teor de POS equivalente a 61% e um percentual de produtos de degradação de 26,6%, com balanço de massas equivalente à 87,6%. O percentual restante 12,4%, pode ser atribuído a produtos de degradação não cromóforos ou que não puderam ser detectados com o método em questão (SINGH *et al.*, 2013).

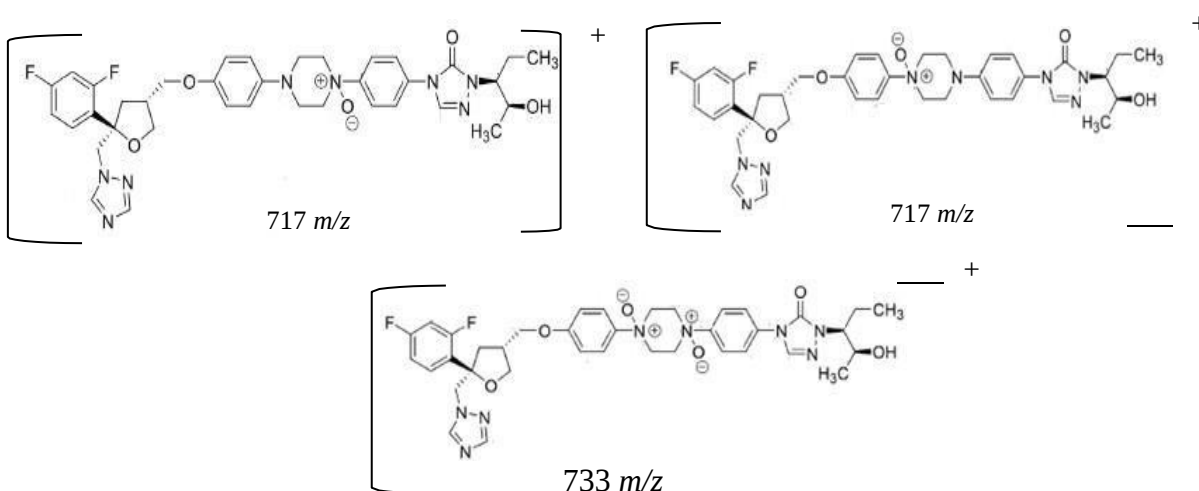
5.4 CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DOS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO

5.4.1 Espectrometria de massas

A partir da análise cromatográfica foi possível visualizar um pico referente ao produto de degradação oxidativa com $T_r = 4,2$ min, conforme a Figura 7, entretanto segundo Yang *et al.*, (2016), o meio oxidativo é a condição de degradação em que o POS é mais sensível e ocorre a formação de outros produtos de degradação.

Em análise espectral da pureza de pico do PD, obtiveram-se valores inferiores a 1,00 o que indicaria a coeluição de compostos. Conforme a literatura, os PD's formados em meio oxidativo possuem grande similaridade estrutural como mostrado na Figura 9.

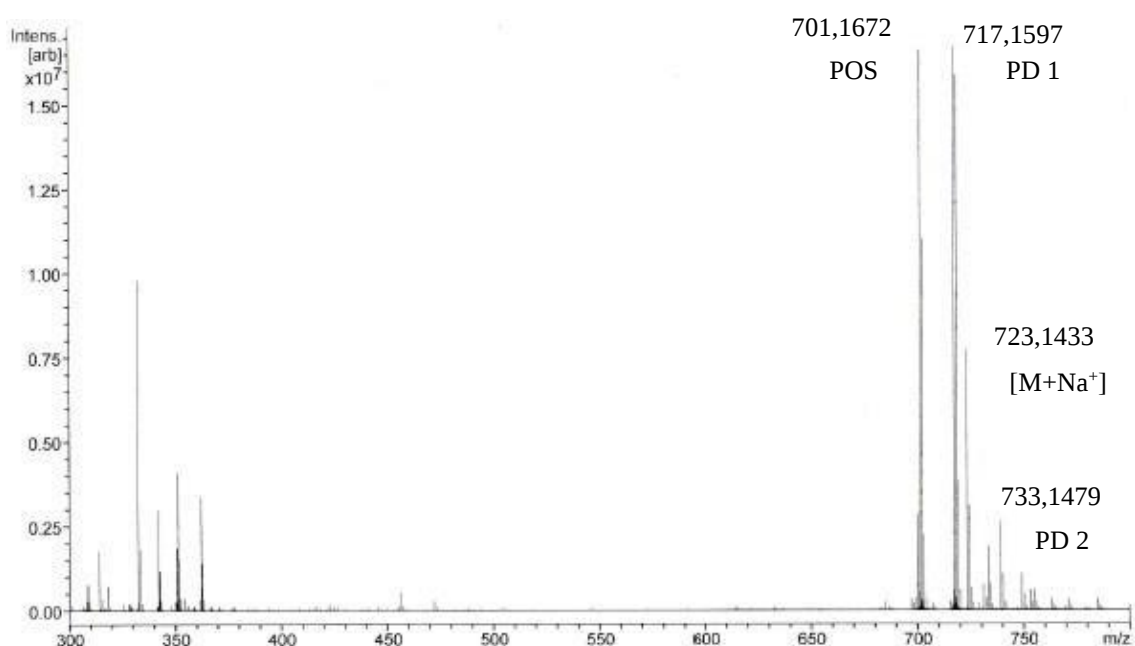
Figura 9- Produtos de degradação oxidativa do POS.



Fonte: Adaptado de Yang *et al.*, 2016

Os sistemas cromatográficos compostos por colunas C8 comuns (sem grupamentos especiais) e sistema de detecção por DAD, como os utilizados no desenvolvimento desse trabalho, possui limitações para separar e identificar de forma inequívoca os PD's com similaridade estrutural como isômeros e epímeros. Portanto, no intuito de elucidar estruturalmente o pico referente até então ao único PD do POS formado foi realizado a análise por espectrometria de massas. O espectro de massas forneceu dados referentes a uma amostra de POS submetida a degradação oxidativa H_2O_2 1,2%, 25°C, conforme Figura 10.

Figura 10- Espectro de massas em ESI+ da amostra de POS, após degradação em H_2O_2 1,2%, 25°C por 24 h.



Fonte: Autoria própria

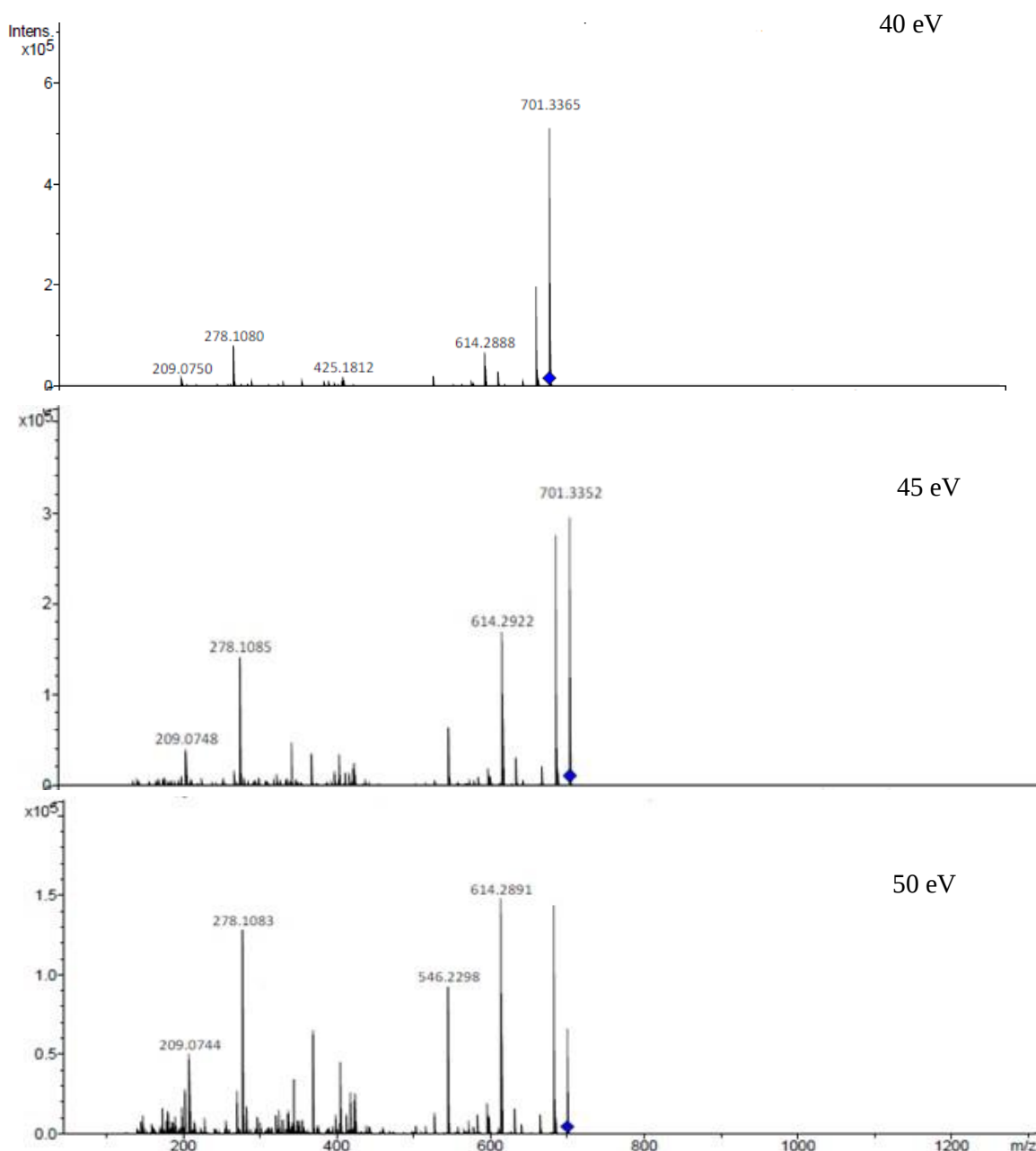
A partir da análise do espectro em ESI +, foi identificado a protonação molecular do íon do POS $[\text{M}+\text{H}]^+$ em 701,1672 m/z e dos PD's $[\text{M}+\text{H}]^+$ em 717,1597 m/z com alta intensidade, o que indica que o peso molecular do degradante é igual à 716 g/mol, ou seja é possível inferir que houve a adição de um átomo de oxigênio na estrutura molecular do POS, com menor intensidade foi possível visualizar um íon molecular $[\text{M}+\text{H}]^+$ em 733,147949 m/z indicando que houve o acréscimo de dois átomos de oxigênio na estrutura molecular e a massa molecular do PD seria igual a 732 g/mol.

Segundo Lanças, (2009) apesar da ionização química ser mais comum através da transferência de prótons pode-se ionizar a molécula através de íons sódio (Na^+) ou potássio (K^+), dentre outros como observado na formação de aduto com sódio $[\text{M}+\text{H}]^+$ em 723,1433 m/z .

Os valores obtidos das massas desses íons moleculares corroboram com os encontrados por Yang *et al.*, (2016) em análise de elucidação estrutural dos PD's.

Outros valores de massas foram obtidos, provavelmente provenientes da fragmentação estrutural do POS após ionização. A partir da análise do EM foi possível inferir que o pico referente ao PD com (Tr = 4,2 min), seria de produtos de degradação com alta similaridade estrutural. A partir da análise do padrão foi realizada a fragmentação estrutural do POS via técnica de massas em sequencial (EM/EM), utilizada principalmente para caracterizar moléculas grandes como o POS, conforme a Figura 11.

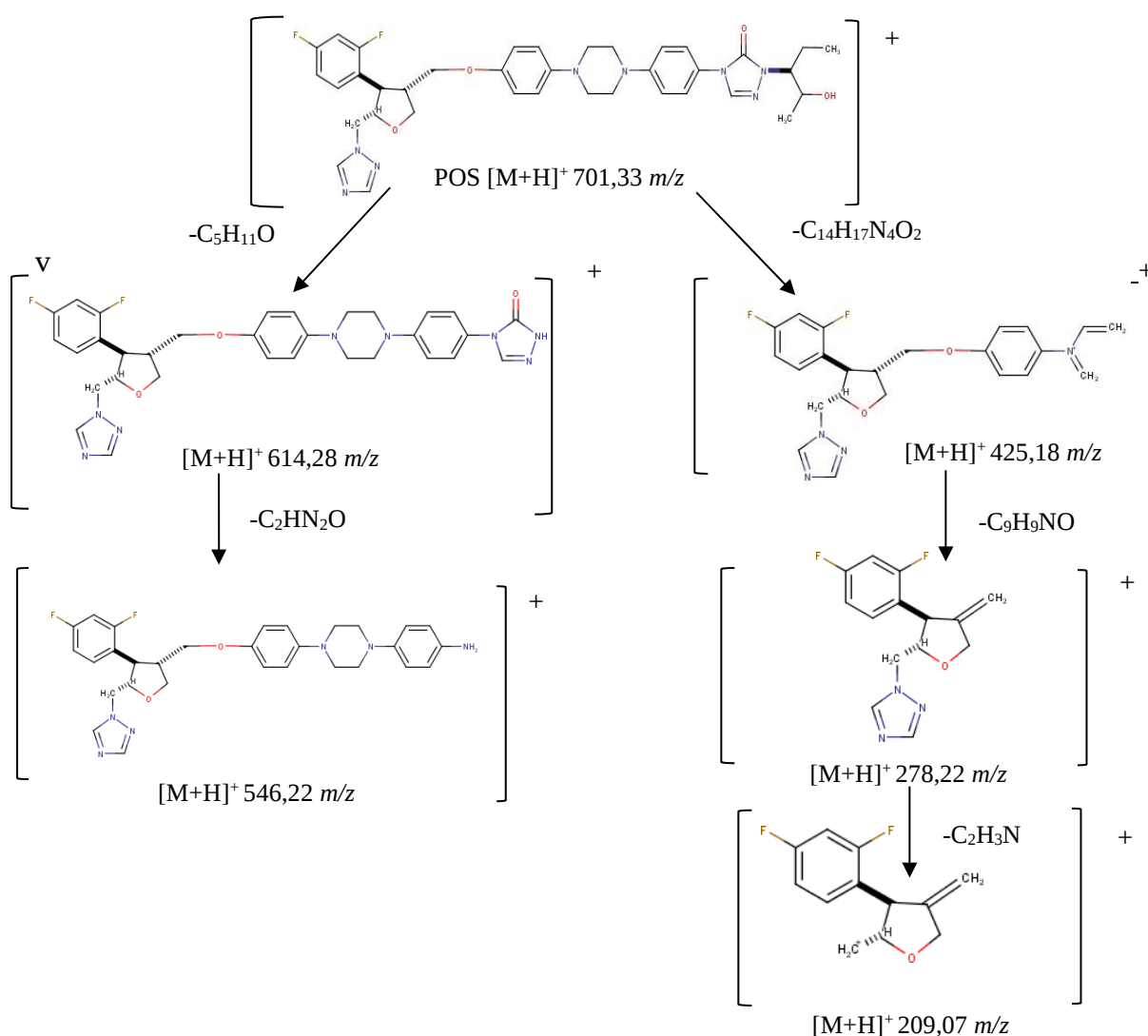
Figura 11- Espectros de massas em sequencial (EM/EM), modo ESI+, da amostra padrão de POS submetida a diferentes energias de colisão: 40 eV, 45 eV e 50 eV, respectivamente.



Fonte: Imagem cedida pelo Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais e Sintéticos.

A partir da fragmentação do íon molecular do POS $[M+H]^+$ em 701,33 m/z é possível notar a presença de um íon $[M+H]^+$ em 614,28 m/z , originado a partir da perda do grupamento $(-C_5H_{11}O)$, a partir deste ocorre a formação de um íon $[M+H]^+$ em 546,22 m/z em virtude da perda de $(-C_2HN_2O)$. O fragmento de íon $[M+H]^+$ em 425,18 m/z é formado em razão da perda de $(-C_{14}H_{17}N_4O_2)$, a partir dele foi formado o íon $[M+H]^+$ em 278,10 m/z , resultado da clivagem entre a ligação do C-O que liga o anel de tetrahydrofurano e o anel fenil. O último fragmento de íon $[M+H]^+$ visualizado com maior intensidade em 209,07 m/z formou-se devido a clivagem da ligação entre o anel triazólico e o tetrahydrofurano. Observou-se que ao aumentar a energia de colisão de 40 eV para 50 eV, houve maior fragmentação molecular. Em Zhong *et al.*, (2012), os íons em 425 m/z , 278 m/z , 209 m/z também foram citados como característicos da fragmentação do POS. A Figura 12 demonstra o esquema de fragmentação:

Figura 12- Fragmentação estrutural do POS via EM/EM.

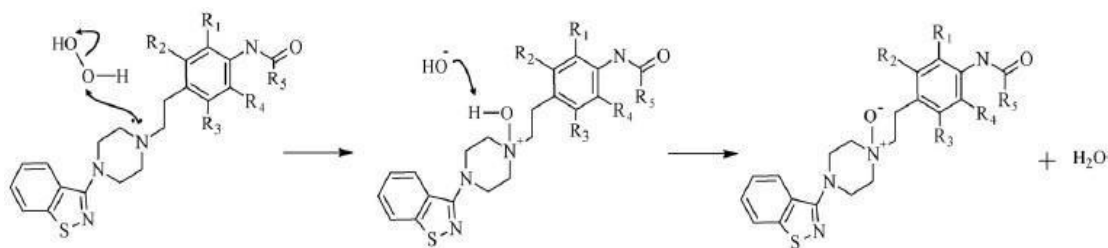


Fonte: Autoria própria

5.5 AVALIAÇÃO DO MECANISMO DE REAÇÃO OXIDATIVO

Inicialmente em análise sobre a susceptibilidade a oxidação de compostos com similaridade estrutural ao POS em faixas diferentes de pH, Freed *et al.*, (2008) demonstraram que compostos contendo anel piperazina conforme Figura 13, mostram alta constante de velocidade de degradação (k), quando ambos estão desprotonados, mas as taxas de reação caem quando um deles é protonado, este fenômeno acontece devido um dos átomos de nitrogênio, influenciar a densidade eletrônica do outro, reduzindo assim a sua reatividade frente aos grupos eletrófilos, tal como o radical ($\text{OH}^\cdot$), advindo do H_2O_2 .

Figura 13- Reação de oxidação por peróxido de hidrogênio do composto nitrogenado A.



Fonte: Adaptado de Freed *et al.*, (2008).

Esses compostos nitrogenados, após exposição ao H_2O_2 e posterior caracterização dos produtos de degradação, constatou-se a formação majoritária de PD's com acréscimo de uma molécula de oxigênio ao nitrogênio, chamados de N-óxidos. A depender dos grupamentos que formam a cadeia lateral de ambos nitrogênios, há susceptibilidade maior para a oxidação de um dos nitrogênios do anel.

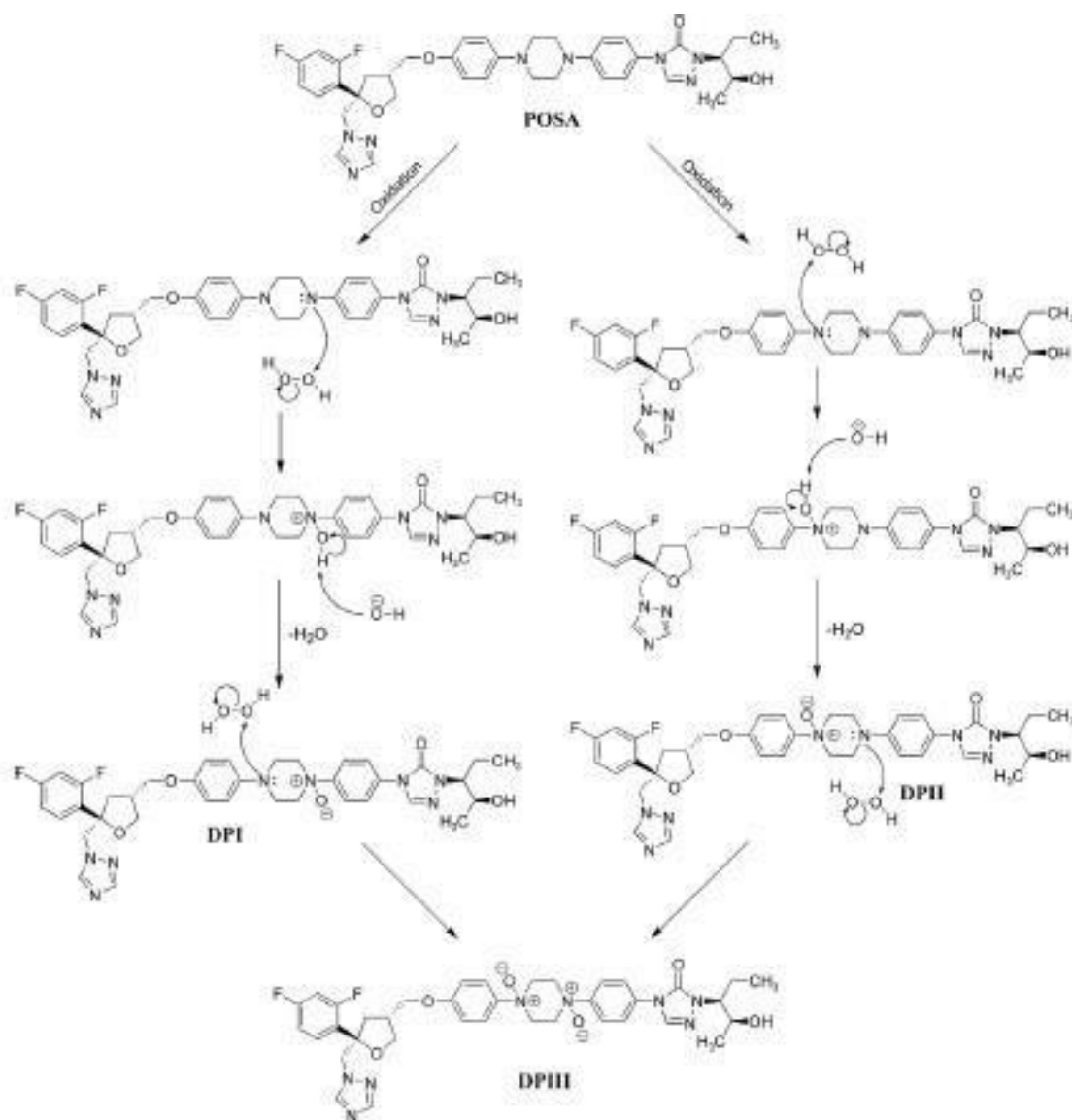
Como exposto na Figura 13, o composto nitrogenado A, possui um par de elétrons livres no nitrogênio distal ao grupo benzoisotiazol, que atua como nucleófilo atacando a molécula de H_2O_2 , que se dissocia, formando um radical hidroxila ($\text{OH}^\cdot$), posteriormente esse radical captura o átomo de hidrogênio ligado ao oxigênio do anel, levando a formação de um composto N-óxido e água.

Com base nessas informações e da análise de EM é possível reafirmar o mecanismo de reação proposto por Yang *et al.*, (2016). O POS possui molecularmente dois grupamentos de aminas secundárias que ocupam a posição 1 e 4 do anel piperazina, caracterizado como o local de maior eletrodensidade e por isso com maior probabilidade de ocorrer reação através do ataque nucleofílico dos nitrogênios que compõem o anel piperazina ao H_2O_2 , formando

compostos N-óxidos como os registrados pelo EM demonstrado na Figura 14.

Sendo que o composto registrado no espectro com maior intensidade de massa m/z 717,1597 seria o PD majoritário e o sinal de menor intensidade de massa referente a m/z 733,1479 seria o minoritário, pois o seu mecanismo de formação é mais lento em virtude da maior eletrodensidade marcada pela presença prévia de um átomo de oxigênio em um dos nitrogênios do anel, conforme a Figura 14.

Figura 14- Provável mecanismo de ação de formação dos produtos de degradação



Fonte: Adaptado de Yang *et al.*, 2016

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

5.6.1 Análise da variação da concentração de H_2O_2

Até então a discussão sobre a velocidade de reação ocorreu com base na comparação do decaimento do teor do POS com os tempos de exposição ao H_2O_2 . Nesta seção avaliou-se de fato, com base na determinação da ordem de reação e obtenção do valor da constante de velocidade (k), o comportamento cinético do POS, frente à uma série de condições variadas de degradação em meio oxidativo, no intuito de avaliar quais parâmetros influenciam o processo oxidativo e qual a melhor forma de determinar os parâmetros cinéticos de $T_{90\%}$ (vida útil) e $T_{1/2}$ (meia-vida de degradação).

Na avaliação da cinética de degradação utilizando o MIE desenvolvido para POS, foi possível efetuar a quantificação do fármaco e dos produtos de degradação formados, posteriormente a exposição oxidativa (H_2O_2 , 1,2%) à 25 °C. Os dados exibidos na Tabela 7 servem como base para determinar a ordem de reação, a partir da construção de gráficos representados na Figura 15 para a ordem zero (Figura 15 a), primeira ordem (Figura 15b), segunda ordem (Figura 15c) a partir da análise do coeficiente de correlação mais próximo da unidade indicadora.

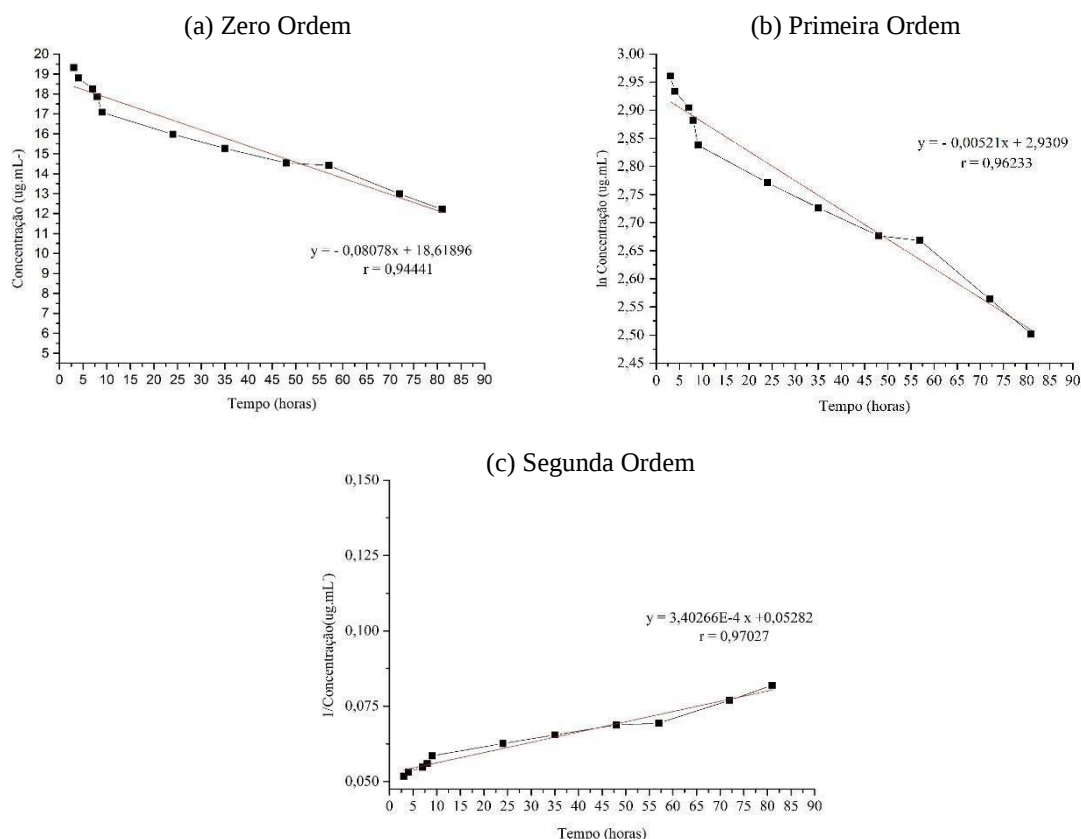
Tabela 7- Dados das áreas médias, valores de C, Log C e 1/C adquiridos em análise da solução de POS submetida a estresse oxidativo (H_2O_2 1,2%, 25°C), para a construção de gráficos e definição de ordem de reação.

Tempo (horas)	Área média (mAU)	Desvio Padrão Relativo	C ($\mu\text{g/mL}$)	Log C ($\mu\text{g/mL}$)	1/C ($\mu\text{g/mL}$)
0	998.375	1,37	20,0000	2,9957	0,05000
3	963.960	0,56	19,3105	2,9606	0,05178
4	938.446	0,83	18,7994	2,9338	0,05319
7	911.277	1,24	18,2552	2,9044	0,05477
8	891.275	1,15	17,8545	2,8822	0,05600
9	852.583	0,14	17,0794	2,8378	0,05855
24	797.424	2,37	15,9744	2,7709	0,06260
35	762.617	5,59	15,2771	2,7263	0,06545
48	725.739	1,06	14,5384	2,6767	0,06878
57	719.477	1,43	14,4129	2,6681	0,06938
72	648.267	0,87	12,9864	2,5639	0,07700
81	609.488	2,74	12,2096	2,5022	0,08190

Legenda: mAU= área média do fármaco nos respectivos tempos de reação; DPR= desvio padrão relativo; C ($\mu\text{g/mL}$) = concentração do POS; Log C ($\mu\text{g/mL}$) = logaritmo da concentração; 1/C ($\mu\text{g/mL}$) = inverso da concentração.

Fonte: Autoria própria.

Figura 15- Representação gráfica das cinéticas de ordem zero (a), primeira ordem (b) e segunda ordem (c) para a degradação de POS submetido a estresse oxidativo (H_2O_2 1,2%, 25°C).



Fonte: Autoria própria

Foi observado que para a segunda ordem de reação, foi obtido $r = 0,97027$, superior as demais ordens analisadas, possibilitando inferir que a degradação do POS, em condição (oxidativa 1,2%/25°C), enquadra-se nessa ordem. Portanto, conforme Sinko, (2008) para esta reação a velocidade de degradação depende da concentração dos dois reagentes ou da concentração ao quadrado de um deles.

No intuito de estabelecer as premissas que determinaram essa ordem de reação foram efetuados outros estudos cinéticos, descritos nas Tabelas 8 e 9, onde manteve-se inicialmente a concentração do POS (20 $\mu\text{g/mL}$) e a temperatura constante (25°C) e alterou-se a concentração de peróxido de hidrogênio, a fim de determinar se o mesmo influenciava na velocidade de degradação.

Igualmente a condição inicial, a partir dos dados das Tabelas 8 e 9 foram plotados gráficos de forma a verificar se a ordem de reação seria alterada à partir da mudança das condições reacionais. A avaliação dos resultados, ilustrados nas Figuras 16 e 17, à partir dos gráficos a, b e c, demonstrou que a reação de segunda ordem apresentou os melhores

coeficientes de correlação (0,96795 e 0,94478 para as condições de H_2O_2 com concentração de 0,6% e 2,4%, respectivamente), corroborando que a degradação das soluções de matéria-prima de POS sob esses parâmetros obedece a cinética de segunda ordem.

Tabela 8- Dados das áreas médias obtidas no tempo zero e após exposição, concentração, Log C e 1/C adquiridos em análise da solução de matéria-prima do POS submetida a estresse oxidativo (H_2O_2 0,6%, 25°C).

Tempo (horas)	Área média (mAU)	Desvio Padrão Relativo	C ($\mu\text{g/mL}$ -)	Log C ($\mu\text{g/mL}$ -)	1/C ($\mu\text{g/mL}$ -)
0	1.093.320	2,15	20	2,9957	0,05
1	1.057.568	0,49	19,3459	2,9624	0,0517
2	1.002.946	0,91	18,3467	2,9094	0,0545
3	921.224	1,28	16,8518	2,8244	0,0593
24	910.513	1,31	16,6559	2,8127	0,0600
48	855.787	0,70	15,6548	2,7507	0,0638
57	845.621	0,99	15,4688	2,7388	0,0646
72	799.361	1,18	14,6226	2,6825	0,0683
81	761.572	6,12	13,9313	2,6341	0,0717

Legenda: mAU= área média do fármaco nos respectivos tempos de reação; DPR= desvio padrão relativo; C ($\mu\text{g/mL}$) = concentração do POS; Log C ($\mu\text{g/mL}$) = logaritmo da concentração; 1/C ($\mu\text{g/mL}$) = inverso da concentração.

Fonte: Autoria própria

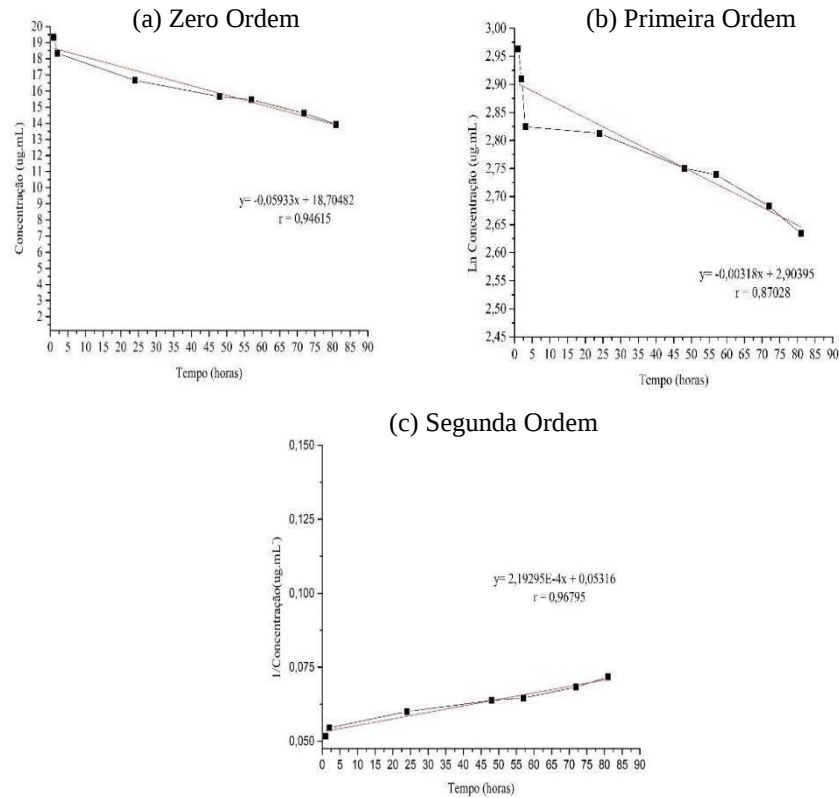
Tabela 9- Dados das áreas médias obtidas no tempo zero e após exposição, concentração, Log C e 1/C adquiridos em análise da solução de matéria-prima do POS submetida a estresse oxidativo (H_2O_2 2,4%, 25°C).

Tempo (horas)	Área média (mAU)	Desvio Padrão Relativo	C ($\mu\text{g/mL}$ -)	Log C ($\mu\text{g/mL}$ -)	1/C ($\mu\text{g/mL}$ -)
0	1.038.648	1,41	20,0000	2,9957	0,05
1	962.689	1,44	18,5373	2,9191	0,0539
3	879.007	0,79	16,9259	2,8288	0,0590
5	675.385	1,18	13,0050	2,5653	0,0768
7	667.181	2,34	12,8471	2,5531	0,0778
24	597.137	2,70	11,4983	2,4421	0,0869
35	482.379	0,78	9,2885	2,2287	0,1076
48	445.134	10,4	8,5714	2,1484	0,1166
57	400.035	1,79	7,7029	2,0415	0,1298
72	313.401	1,31	6,0347	1,7975	0,1657
81	255.769	2,46	4,9250	1,5943	0,2030

Legenda: mAU= área média do fármaco nos respectivos tempos de reação; DPR= desvio padrão relativo; C ($\mu\text{g/mL}$) = concentração do POS; Log C ($\mu\text{g/mL}$) = logaritmo da concentração; 1/C ($\mu\text{g/mL}$) = inverso da concentração.

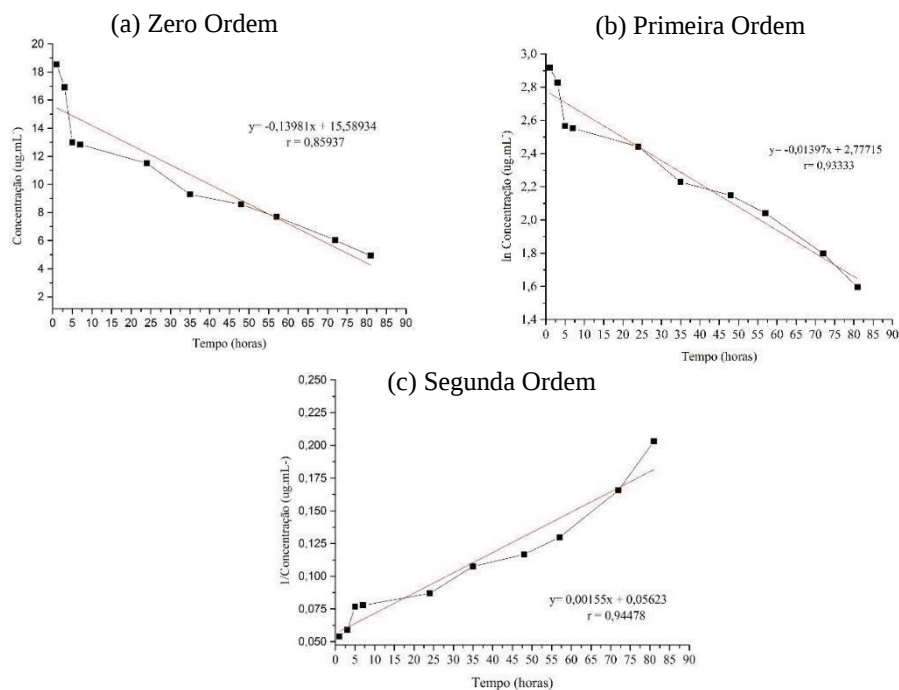
Fonte: Autoria própria

Figura 16- Representação gráfica das cinéticas de ordem zero (a), primeira ordem (b) e segunda ordem (c) para a degradação de POS submetido a estresse oxidativo (H_2O_2 0,6%, 25°C).



Fonte: Autoria própria

Figura 17- Representação gráfica das cinéticas de ordem zero (a), primeira ordem (b) e segunda ordem (c) para a degradação de POS submetido a estresse oxidativo (H_2O_2 2,4%, 25°C).



Fonte: Autoria própria

Conforme os dados, descritos na Tabela 10, ao término das 81 horas de acompanhamento da reação nas três concentrações analisadas à 25°C, obteve-se diferentes percentuais de degradação do POS, sendo progressivo conforme aumento da concentração de peróxido de hidrogênio de 0,6%, 1,2% e 2,4%, obteve-se um teor final de POS correspondente a 69,7%; 61% e 24,6%, respectivamente. Portanto, evidenciou-se que a concentração de H₂O₂ afeta de forma significativa a velocidade da reação.

Tabela 10- Teor de POS após degradações oxidativas

Degradação Oxidativa (H₂O₂)				
Concentração	0,6%	1,2%	1,2%	2,4%
Temperatura (°C)	25°C	25°C	45°C	25°C
Tempo (h)	81 h	81 h	51 h	81 h
Teor final (%)	69,7 %	61 %	35,6 %	24,6 %

Fonte: Autoria própria

A partir da definição da ordem da reação, calculou-se a constante da velocidade de degradação (k), período de vida útil (T_{90%}) e tempo de meia-vida (T_{1/2}) para cada condição analisada. Os valores dos parâmetros cinéticos estão representados na Tabela 11.

Tabela 11-Parâmetros cinéticos calculados para POS.

Parâmetros cinéticos	H₂O₂ 0,6%	H₂O₂ 1,2%	H₂O₂ 2,4%
K inicial (µg.h)	3,11 x 10 ⁻³	7,50 x 10 ⁻⁴	3,94 x 10 ⁻³
K final (µg.h)	1,68 x 10 ⁻⁴	3,94 x 10 ⁻⁴	1,89 x 10 ⁻³
T_{90%} (h)	2,45	7,40	1,41
T_{1/2} (h)	297,60	126,94	26,45

Fonte: Autoria própria

Para a determinação desses parâmetros é necessário inicialmente calcular o valor da constante de velocidade de degradação (k). Na literatura é utilizado apenas um valor de k, que se justifica quando a reação exibe apenas uma velocidade ao longo do tempo de análise, ou quando o intervalo de tempo analisado tenha sido insuficiente para verificar alterações na mudança da velocidade da reação de forma mais evidente, o que não foi o caso deste trabalho, em que, o tempo de exposição do POS às condições oxidativas mencionadas foi planejado de forma que as horas iniciais de reação fossem analisadas num intervalo de tempo menor, visto que o decaimento do teor do POS é mais pronunciado nessa fase, tornando-se mais lento após algumas horas de reação, o que justifica posteriormente a coleta de pontos para amostragem

com intervalos de tempo maiores.

Para o cálculo do tempo de meia-vida $T_{1/2}$ (h), foi utilizado K_f (final) que abrange todo o intervalo da reação e para o cálculo de tempo de $T_{90\%}$ (h), foi utilizado um valor denominado K_i (inicial). Essa diferenciação é fundamental para que não haja sobrestimativa do $T_{90\%}$ (h), caso este seja avaliado com o valor de K_f (final), o inverso também é válido para o cálculo de $T_{1/2}$ (h), caso seja avaliado com o valor de K_i (inicial), pois haveriam dados subestimados.

Os resultados dos cálculos dos parâmetros cinéticos estão apresentados na Tabela 11. Constatou-se valores diferenciados, em relação as constantes de velocidades de degradação K_i (inicial) e K_f (final), sendo que esses fatores foram comparados entre as três condições analisadas e em todas a relação K_i maior do que K_f foi atestada.

O tempo de meia vida $T_{1/2}$ (h) de POS, foi progressivamente reduzido a medida que à concentração de peróxido de hidrogênio aumentou sendo de 297,60 h, 126,94 h e 26,45 h respectivamente, uma vez que a velocidade de degradação aumentava. O $T_{90\%}$ (h), como esperado, foi menor para a condição mais drástica de degradação com valor de 1,41 h e um pouco mais elevado para a exposição mais branda 2,45 h.

5.6.2 Variação da temperatura

Foi avaliado o efeito da temperatura na determinação da ordem de reação e consequentemente na variação da constante de velocidade (k), que é a base para definição dos parâmetros cinéticos. A Tabela 12 apresenta o resultado obtido na análise da amostra submetida à degradação oxidativa (H_2O_2 , 1,2% à 45°C)

Tabela 12-Dados das áreas médias obtidas no tempo zero e após exposição, concentração, Log C e 1/C adquiridos em análise da solução de matéria-prima do POS submetida a estresse oxidativo (H_2O_2 1,2%, 45°C).

Tempo (Horas)	Área média (mAU)	Desvio Padrão Relativo	C ($\mu\text{g/mL}$ -)	Log C ($\mu\text{g/mL}$ -)	1/C ($\mu\text{g/mL}$ -)
0	1.076.711	1,80	20	2,9957	0,05
1	956.938	1,25	17,7752	2,8778	0,0562
2	933.201	1,45	17,3342	2,8526	0,0576
3	907.094	1,43	16,8493	2,8237	0,0593
4	899.655	3,59	16,0219	2,7739	0,0624
5	840.629	1,09	15,6147	2,7482	0,0640
6	824.800	1,83	15,3207	2,7292	0,0652
9	787.322	1,49	14,6245	2,6826	0,0683
15	715.233	0,96	13,2855	2,5866	0,0752
21	626.317	0,70	11,6338	2,4539	0,0859

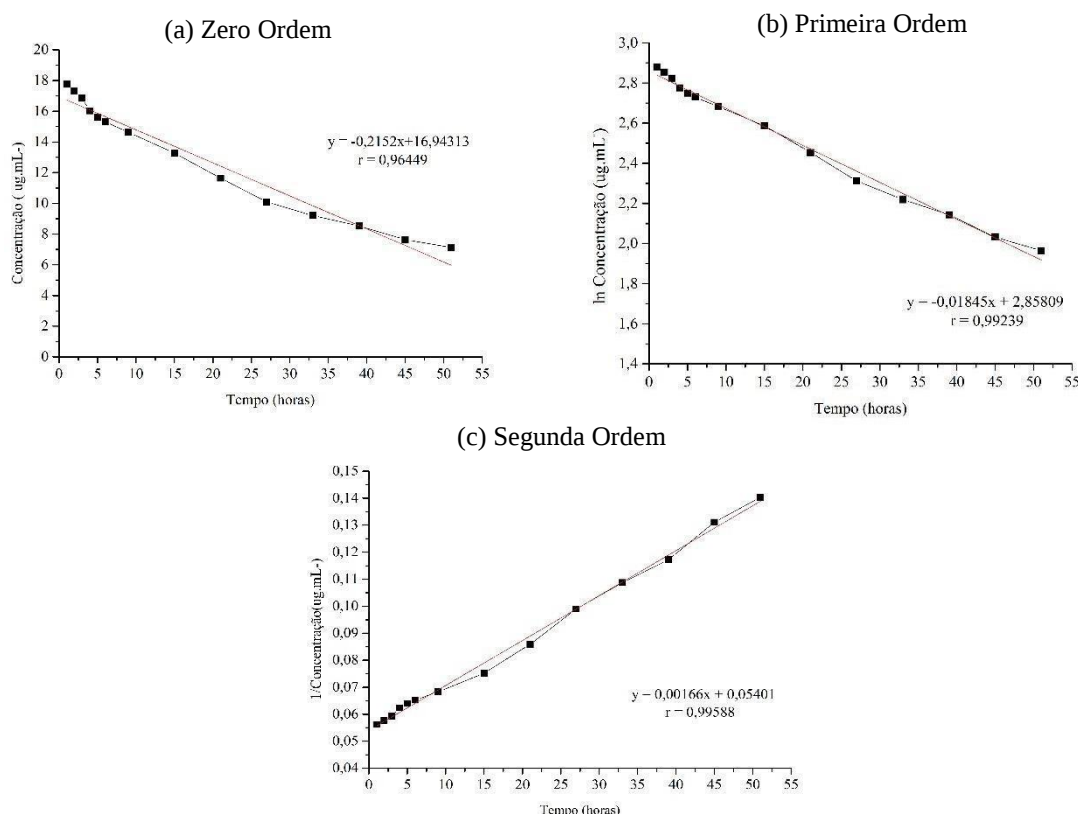
Tempo (Horas)	Área média (mAU)	Desvio Padrão Relativo	C (µg/mL-)	Log C (µg/mL-)	1/C (µg/mL-)
27	543.443	0,52	10,0945	2,3119	0,0990
33	495.193	2,74	9,1982	2,2190	0,1087
39	459.193	1,22	8,5295	2,1435	0,1172
45	410.624	0,14	7,6273	2,0317	0,1311
51	383.700	4,69	7,1272	1,9639	0,1403

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

Fonte: Autoria própria

Após a plotagem dos gráficos, observou-se na Figura 18, a partir dos gráficos (a, b e c) que para a segunda ordem de reação, foi obtido um valor de $r = 0,99588$, superior as demais analisadas, possibilitando inferir que a degradação do POS, nessa condição (oxidativa 1,2%/45°C), enquadra-se nessa ordem.

Figura 18- Representação gráfica das cinéticas de ordem zero (a), primeira ordem (b) e segunda ordem (c) para a degradação de POS submetido a estresse oxidativo (H₂O₂ 1,2%, 45°C).



Fonte: Autoria própria

Foram calculados os parâmetros cinéticos e evidenciou-se o aumento de K_i ($6,20 \times 10^{-3} \mu\text{g.h}$) e K_f ($1,77 \times 10^{-3} \mu\text{g.h}$), presentes na Tabela 13, quando comparados com os valores obtidos à 25°C, na mesma concentração de H₂O₂ (1,2%), em consequência os valores de $T_{90\%}$ (h) e $T_{1/2}$ (h) caíram para 0,9 hora e 28,2 horas, respectivamente.

Tabela 13-Parâmetros cinéticos calculados para a solução de POS.

Parâmetros cinéticos	H2O2 1,2% (25°C)	H2O2 1,2% (45°C)
K inicial (µg.h)	$7,50 \times 10^{-4}$	$6,20 \times 10^{-3}$
K final (µg.h)	$3,94 \times 10^{-4}$	$1,77 \times 10^{-3}$
T 90% (h)	7,40	0,9
T ½ (h)	126,94	28,2

Fonte: Autoria própria

Segundo Sinko, (2008) um mesmo fármaco pode apresentar diferentes ordens de reação, sob condições diferentes de degradação, como foi verificado em Reis *et al.*,(2016), no estudo da cinética de degradação do fármaco nevirapina, à temperatura de 50°C, em meio oxidativo (H₂O₂) a reação foi definida como de segunda ordem, porém em meio ácido (HCl) o comportamento foi de primeira ordem, neste caso além da ordem o mecanismo de reação foi alterado, pois entre os cinco produtos de degradação formados, apenas um foi proveniente da hidrólise ácida e os outros foram decorrentes da exposição oxidativa.

No caso do POS, como não houve acréscimo de compostos reativos diferentes em cada condição da degradação oxidativa, o meio reacional permaneceu o mesmo, não havendo mudança do mecanismo de reação e da ordem de reação (segunda ordem).

5.6.3 Efeito do Ph sobre a oxidação

Em relação à definição da ordem de reação e consequentemente variação da constante de velocidade (k) e dos parâmetros cinéticos: período de vida útil (T_{90%}) e meia-vida (T_{1/2}), conforme as condições anteriores. As Tabelas 14, 15 e 16 apresentam os resultados obtidos na análise da amostra submetida à degradação oxidativa (H₂O₂ 1,2% à 25°C) em pH 2,5 (tampão citrato), pH 5,0 (tampão acetato) e pH 7,5 (tampão fosfato), respectivamente.

Tabela 14- Dados das áreas médias obtidas no tempo zero e após exposição, concentração, Log C e 1/C adquiridos em análise da solução de matéria-prima de POS submetida à estresse oxidativo (H₂O₂ 1,2%; 25°C; pH 2,5).

Tempo (horas)	Área média (mAU)	Desvio Padrão Relativo	C (µg/mL)	Log C (µg/mL)	1/C (µg/mL)
0	2.068.736	1,48	40	3,6888	0,0250
3	2.045.022	1,27	39,5414	3,6773	0,0252
6	2.026.612	1,53	39,1855	3,6683	0,0255
9	1.964.732	0,87	37,9890	3,6372	0,0263
12	1.938.822	0,70	37,4880	3,6240	0,0266
15	1.921.090	1,13	37,1451	3,6148	0,0269

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

Fonte: Autoria própria.

Tabela 15- Dados das áreas médias obtidas no tempo zero e após exposição, concentração, Log C e 1/C adquiridos em análise da solução de matéria-prima de POS submetida à estresse oxidativo (H₂O₂ 1,2%; 25°C; pH 5,0).

Tempo (horas)	Área média (mAU)	Desvio Padrão Relativo	C (µg/mL)	Log C (µg/mL)	1/C (µg/mL)
0	2.068.736	1,23	40	3,6888	0,0250
3	1.945.151	1,87	37,6104	3,6272	0,0265
6	1.905.186	0,92	36,8376	3,6065	0,0271
9	1.880.761	1,34	36,3654	3,5936	0,0274
12	1.870.399	0,97	36,1650	3,5880	0,0276
15	1.844.250	1,08	35,6594	3,5740	0,0280

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

Fonte: Autoria própria.

Tabela 16- Dados das áreas médias obtidas no tempo zero e após exposição, concentração, Log C e 1/C adquiridos em análise da solução de matéria-prima de POS submetida à estresse oxidativo (H₂O₂ 1,2%; 25°C; pH 7,5).

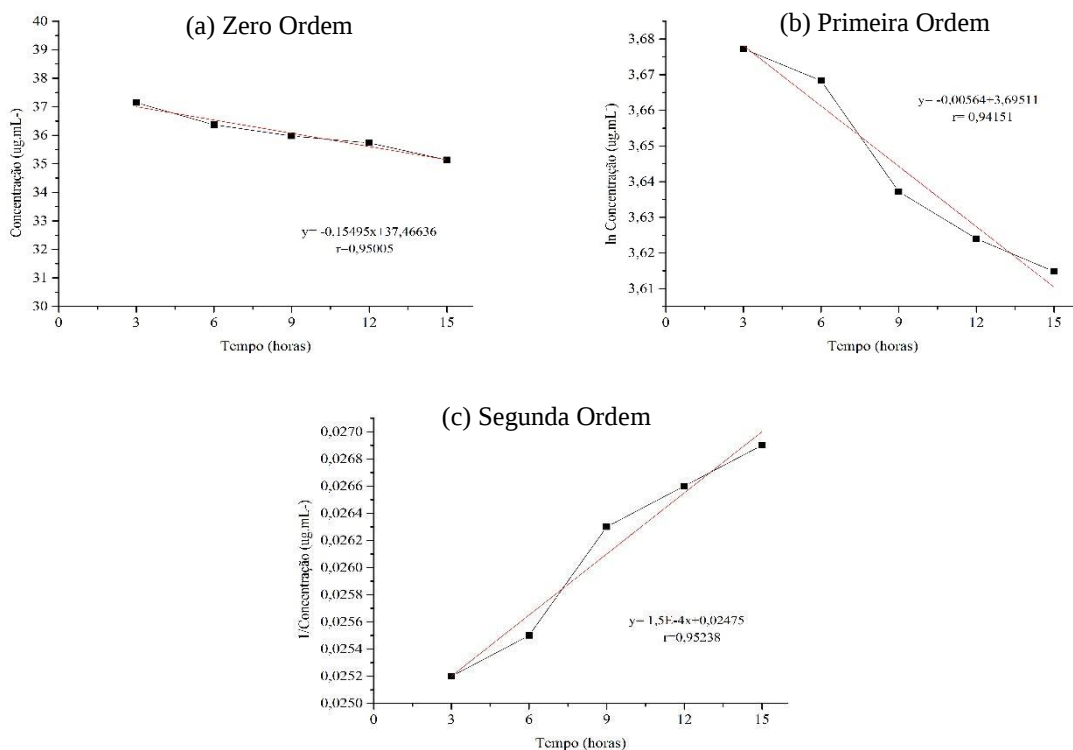
Tempo (horas)	Área média (mAU)	Desvio Padrão Relativo	C (µg/mL)	Log C (µg/mL)	1/C (µg/mL)
0	2.068.736	2,32	40	3,6888	0,0250
3	1.920.945	1,87	37,1423	3,6147	0,0269
6	1.881.119	2,15	36,3723	3,5938	0,0274
9	1.860.535	1,15	35,9743	3,5828	0,0277
12	1.847.990	1,74	35,7317	3,5760	0,0279
15	1.817.298	1,96	35,1383	3,5592	0,0284

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

Fonte: Autoria própria

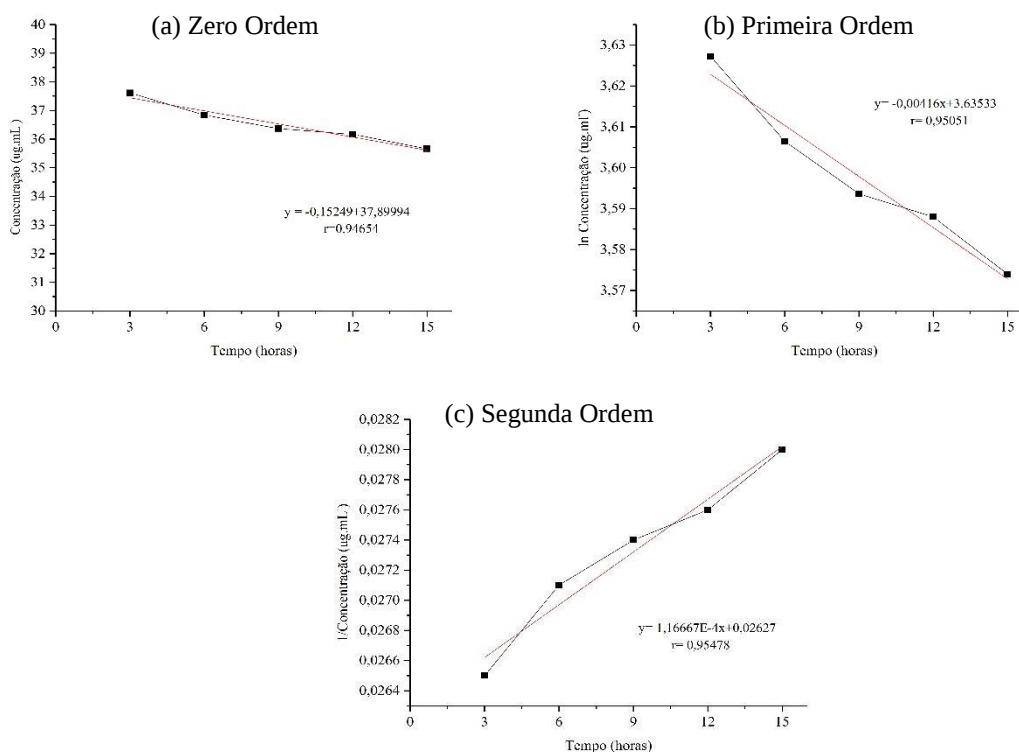
A partir dos dados das tabelas foram plotados os gráficos de forma a verificar se a ordem de reação seria alterada em virtude da modificação do pH do meio. A avaliação dos resultados ilustrados nas Figuras 19; 20 e 21, diante dos gráficos a,b e c, demonstrou que assim como na avaliação dos parâmetros de variação da concentração de peróxido e temperatura, a reação manteve-se de segunda ordem, tendo em vista a obtenção dos melhores coeficientes de correlação para a mesma (0,95238; 0,95478 e 0,97127), em relação às condições reacionais em pH 2,5; pH 5,0 e pH 7,5; respectivamente.

Figura 19- Representação gráfica das cinéticas de ordem zero (a), primeira ordem (b) e segunda ordem (c) para a degradação de POS submetido a estresse oxidativo (H_2O_2 1,2%, 25°C, pH 2,5).



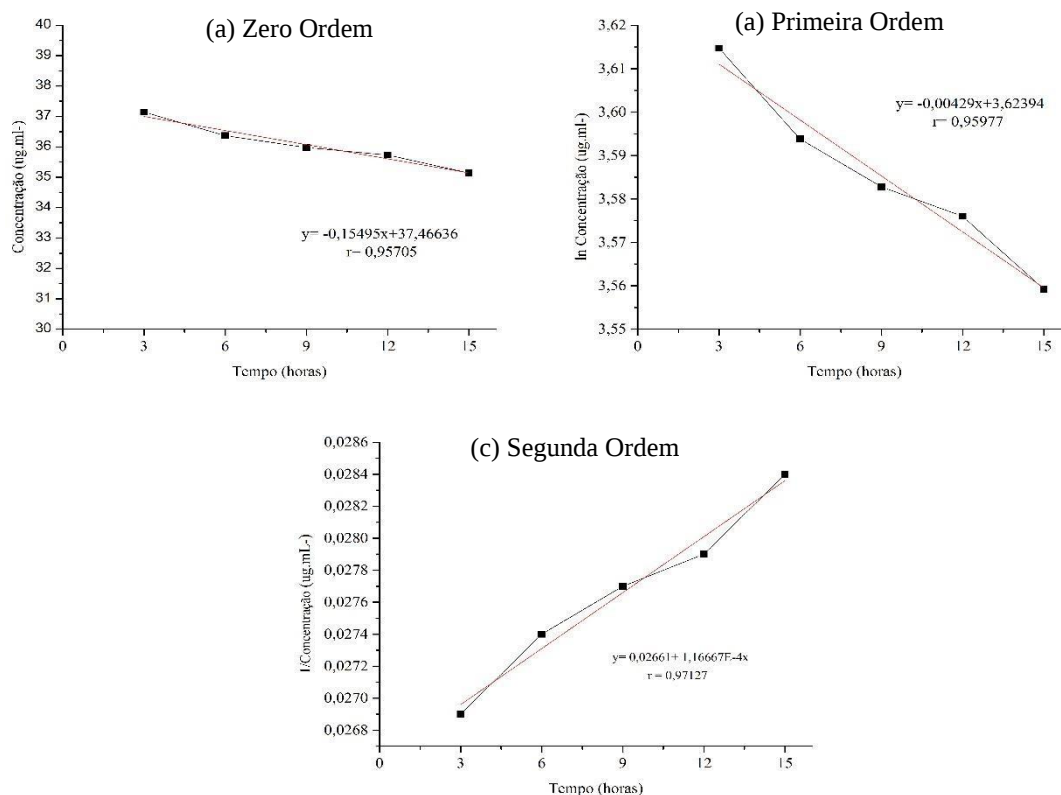
Fonte: Autoria própria

Figura 20- Representação gráfica das cinéticas de ordem zero (a), primeira ordem (b) e segunda ordem (c) para a degradação de POS submetido a estresse oxidativo (H_2O_2 1,2%, 25°C, pH 5,0).



Fonte: Autoria própria

Figura 21- Representação gráfica das cinéticas de ordem zero (a), primeira ordem (b) e segunda ordem (c) para a degradação de POS submetido a estresse oxidativo (H_2O_2 1,2%, 25°C, pH 7,5).



Fonte: Autoria própria

Como nos itens anteriores, conforme definição da ordem de reação, calculou-se a constante de velocidade de degradação (k), período de vida útil ($T_{90\%}$) e meia-vida ($T_{1/2}$) para cada condição analisada. Os valores dos parâmetros cinéticos estão representados na Tabela 17.

Tabela 17- Parâmetros cinéticos calculados para a solução de POS.

Parâmetros cinéticos	H_2O_2 (1,2%) pH 2,5	H_2O_2 (1,2%) pH 5,0	H_2O_2 (1,2%) pH 7,5
K ($\mu\text{g.h}$)	$1,26 \times 10^{-4}$	$2,00 \times 10^{-4}$	$3,77 \times 10^{-4}$
T 90% (h)	22	13,9	7,4
T $\frac{1}{2}$ (h)	198	125	66,3

Fonte: Autoria própria.

A partir dos dados da Tabela 17, podemos inferir à partir do valor da constante de velocidade (k), que houve influência significativa na velocidade de degradação à medida que a reação se processou em meio menos ácido, o que corrobora com a afirmação de Hartauer *et al.*, (2000) ao demonstrar que compostos que possuem aminas primárias com locus de oxidação, podem ser à princípio protegidos, através do controle de pH, portanto um controle físico-

químico adequado pode evitar inicialmente a adição de agentes redutores empregados na tecnologia farmacêutica como antioxidantes (ácido ascórbico, vitamina E) ou quelantes (ácido cítrico, EDTA), que podem ser até ineficazes dependendo do mecanismo de oxidação.

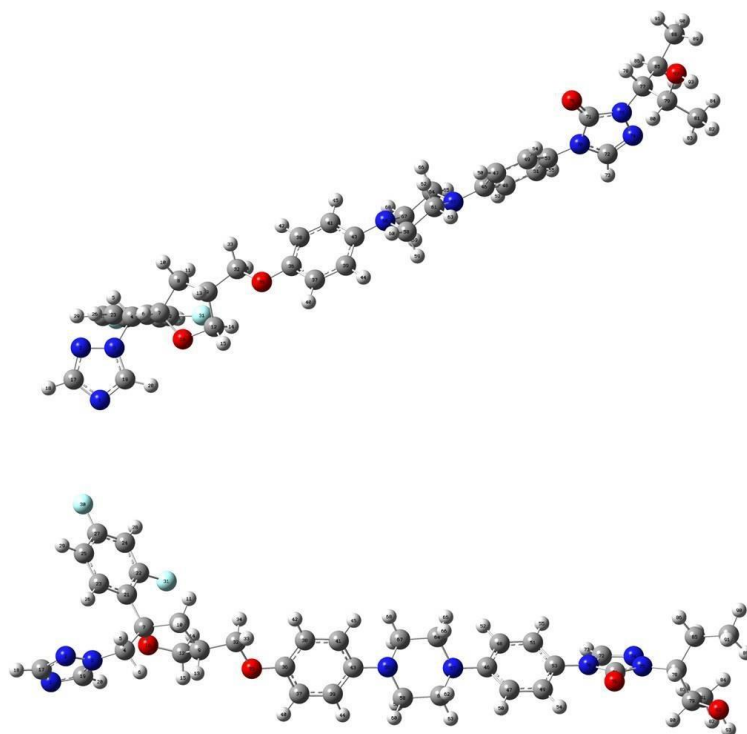
A relação do mecanismo de ação que justifica essa maior estabilidade do POS em meio ácido pode ser inferida a partir do trabalho desenvolvido por Freed *et al.*, (2008), em estudo de compostos com locus de degradação semelhante ao POS, em baixo valor de pH, o nitrogênio pode ser protonado, prevenindo a formação dos compostos N-óxidos. Essa afirmação pode ser corroborada com os dados da Tabela 17, referente aos parâmetros cinéticos de período de vida útil ($T_{90\%}$) de 22h; 13,9 h e 7,4 h e meia-vida ($T_{1/2}$) de 198h; 125h e 66,3 h; para os valores de pH 2,5; pH 5,0 e pH 7,5, respectivamente.

Neste experimento, não foi utilizado uma faixa de pH mais básica em virtude da coluna cromatográfica ser susceptível a perda de eficácia pela dissolução da sílica, em valores de pH superiores à 8,0; entretanto a partir dos dados expostos e a compreensão do mecanismo de reação infere-se que futuras formulações devem evitar o uso de excipientes que possam ter traços de peróxido, bem como de forma mais crítica esse processamento deve ser evitado em meio básico, uma vez que este pode ser fator promotor de instabilidade da formulação.

5.7 DELINEAMENTO DE ESTUDOS COMPUTACIONAIS

Uma característica da molécula do posaconazol está no fato dos anéis mais externos de sua estrutura possuírem ressonância eletrônica, devido principalmente a presença dos átomos de flúor, que propiciam o deslocamento de elétrons no anel aromático em uma das extremidades e a presença de átomos de oxigênio próximo ao anel triazólico na outra, enquanto que o anel central não possui este atributo. Esta ideia pode ser mais bem compreendida observando-se as características descritas através da observação em diferentes perspectivas da molécula do posaconazol. A Figura 22 mostra de forma clara a presença de regiões com e sem deslocalização eletrônica presentes no composto.

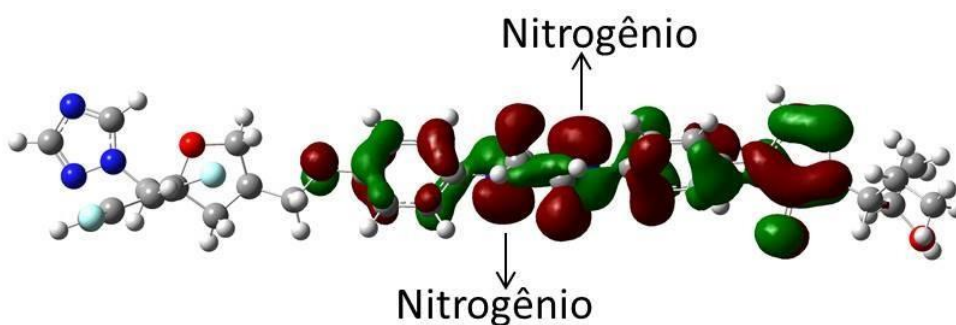
Figura 22- Estrutura molecular do POS em diferentes perspectivas



Fonte: Autoria própria.

Desta forma, estes sítios aromáticos do composto possuem maior estabilidade. Ainda, devido a este fato, os pares de elétrons dos nitrogênios do anel piperazina estão mais disponíveis em relação aos demais. Este comportamento sugere fortemente que estes nitrogênios atuem como o agente nucleofílico do mecanismo de degradação oxidativa em presença de peróxido de hidrogênio. Outro método que ratifica esta teoria é a análise do orbital de fronteira HOMO (*Highest Occupied Molecular Orbital*), conforme Figura 23.

Figura 23- Análise do orbital de fronteira HOMO do POS.



Fonte: Autoria própria.

Os orbitais moleculares de fronteira têm sido muito utilizados em estudos de reatividade química, pois indicam os possíveis sítios mais reativos, conforme estudo eletroquímico e químico-quântico da oxidação do antidepressivo tricíclico amitriptilina de Toledo *et al.*, (2005). Essa teoria pode ser ratificada, através da visualização dos locais de maior eletrodensidade da molécula, destacados em vermelho, indicando potenciais sítios de reação. Apesar de outras regiões na molécula, diferentes ao anel piperazina terem sido destacadas, essas possuem menor probabilidade de atuarem inicialmente como agente nucleófilo, devido maior deslocalização eletrônica promovida por grupos que atraem elétrons resultando em uma maior blindagem. A análise do orbital HOMO é um potencial elucidador do mecanismo de reação, pois é deste orbital que um elétron é retirado em uma reação de oxidação.

CONCLUSÃO

6 CONCLUSÃO

- A partir dos testes de degradação forçada foi possível estabelecer através da análise dos parâmetros cromatográficos que o método analítico adaptado se demonstrou indicativo de estabilidade ao permitir delinear um perfil de estabilidade para o posaconazol.
- O POS manteve-se inalterado após submissão as hidrólises ácidas (HCl) e básica (NaOH), ambas nas concentrações de 0,4 M e 2,0 M por 120 horas, comportamento semelhante foi demonstrado na termólise por calor seco à 85°C com a mesma faixa de tempo.
- O POS mostrou-se instável em meio oxidativo (H₂O₂) à temperatura de 25°C, onde após 81 horas de reação obteve-se um teor de 61%. No cromatograma foi observado a presença de um pico referente ao produto de degradação, com teor final de 26,6%. Na avaliação final do balanço de massas foi obtido um índice de recuperação de 87,6%, o que denota a qualidade do método para quantificação dos PD's do fármaco.
- A utilização da técnica de espectrometria de massas possibilitou elucidar as estruturas químicas dos produtos de degradação do POS obtendo-se a massas de 717 *m/z* e 733 *m/z*, bem como a proposição de sua rota de degradação, corroborando com os dados descritos na literatura, entretanto é necessário o uso de técnicas complementares para confirmar a presença de isômeros com massa em 717 *m/z*.
- A susceptibilidade do POS ao meio oxidativo permitiu de forma pioneira a análise da cinética de degradação sob a variação dos fatores: concentração de peróxido de hidrogênio (H₂O₂), temperatura e pH, com isso foi possível definir a ordem de reação para cada condição proposta sendo classificada de segunda ordem para todas as condições analisadas.
- A definição da ordem de reação permitiu estabelecer as constantes de velocidade inicial (*k_i*) e final (*k_f*) para cada condição, viabilizando a determinação dos parâmetros cinéticos de meia-vida (*T*_{1/2}) e período de vida útil (*T*_{90%}) que são importantes no controle de processos, na revisão de formulação, bem como no estabelecimento do período de utilização.
- Foi verificado a redução dos valores obtidos para esses parâmetros de forma não proporcional à medida que se aumentava a concentração de H₂O₂, a temperatura e o pH.
- Os estudos computacionais corroboraram as informações disponíveis na literatura sobre a susceptibilidade do *locus* de degradação do POS no centro do anel piperazina.

PERSPECTIVAS

7 PERSPECTIVAS

- Isolar o produto de degradação por cromatografia preparativa.
- Concentrar o produto de degradação por técnicas de secagem para posterior caracterização estrutural por ressonância magnética nuclear (RMN), infravermelho (IV).
- Delinear estudos de citotoxicidade para o PD isolado.
- Avaliar a influência de excipientes antioxidantes na cinética de degradação.
- Comparar estudo de termólise do POS versus degradação térmica no estado sólido através da termogravimetria.
- Caracterizar os PD's por termogravimetria acoplada a espectrofotometria de infravermelho e pirólise.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

ALCÂNTARA, F.C. *et al.* Testes de degradação forçada para fármacos e medicamentos. **Revista de Pesquisa e Inovação Farmacêutica**, v.5, n.1, p.38-48, 2013.

ALSANTE, K. M. *et al.* The role of degradant profiling in active pharmaceutical ingredients and drug products. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, n. 1, p. 29–37, 2007.

ANDRADE, A. L. S. S. *et al.* Short report: Benznidazole efficacy among Trypanosoma cruzi-infected adolescents after a six-year follow-up. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 71, n. 5, p. 594–597, 2004.

ANSEL H.C.; POPOVICH N.G.; ALLEN L.V. **Formas Farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos**. 8ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2007

APT, W. Current and developing therapeutic agents in the treatment of Chagas disease. **Drug Design, Development and Therapy**, v.4, p.243-253, 2010.

ATKINS ,P.W.; JONES, L. **Princípios de química: questionando a vida moderna e o meio ambiente**.3ªed. Porto Alegre. Bookman, 2006

BAIETTO, L. *et al.* Development, validation, and routine application of a high-performance liquid chromatography method coupled with a single mass detector for quantification of itraconazole, voriconazole, and posaconazole in human plasma. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 8, p. 3408–3413, 2010.

BAKSHI, M.; SINGH, S. Development of validated stability- indicating assay methods: Critical review. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 28, p. 1011–1040, 2002.

BENNETT, F. *et al.* Hydroxylated analogues of the orally active broad spectrum antifungal, Sch 51048 (1), and the discovery of posaconazole [Sch 56592; 2 or (S,S)-5]. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 16, n. 1, p. 186–190, 2006.

BLESSY, M. *et al.* Development of forced degradation and stability indicating studies of drugs - A review. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 4, n. 3, p. 159–165, 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução- RE nº 01, 29 de julho de 2005: Guia para a realização de estudos de estabilidade. Brasília, DF. **Diário**

Oficial da União, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução- RE nº 899, 29 de maio de 2003: Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Brasília, DF. **Diário Oficial da União**, 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Farmacopéia Brasileira**, volume 1. 5ª ed. Brasília, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em saúde. Boletim Epidemiológico: Doença de Chagas Aguda no Brasil: série histórica 2000 à 2013, v. 46, n. 21, p. 1–9, 2015 (a).

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução- RE nº53, 4 de dezembro de 2015. Brasília, DF. **Diário Oficial da União**, 2015 (b).

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Perguntas e Respostas: Insumos Farmacêuticos Ativos. Brasília, DF, 2016.

CHAE, H. *et al.* Determination of posaconazole concentration with LC-MS/MS in adult patients with hematologic malignancy. **Clinica Chimica Acta**, v. 450, p. 220–226, 2015.

CORNELY, O. A. *et al.* Posaconazole vs. Fluconazole or Itraconazole Prophylaxis in Patients with Neutropenia. **New England Journal of Medicine**, v. 356, n. 4, p. 348–359, 2007.

COURA, J. R.; BORGES-PEREIRA, J. Chagas disease: 100 years after its discovery. A systemic review. **Acta Tropica**, v. 115, n. 1–2, p. 5–13, 2010.

COURA, J. R.; CASTRO, S. L. A critical review on chagas disease chemotherapy. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 1, p. 3–24, 2002.

COURTNEY, R. *et al.* Effect of food on the relative bioavailability of two oral formulations of posaconazole in healthy adults. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 57, n. 2, p. 218–222, 2004.

DIAS, L.C. *et al.* 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.

DINIZ, L.F. *et al.* Benznidazole and Posaconazole in Experimental Chagas Disease: Positive

Interaction in Concomitant and Sequential Treatments. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 8, 2013.

DNDi (Drugs for Neglected Diseases Initiative). Novo tratamento para crianças com a Doença de Chagas aprovado pela ANVISA, 2011. Disponível em: < <http://www.dndi.org/>>. Acessado em 12 de janeiro de 2017.

DOCAMPO, R. *et al.* Biochemical and ultrastructural alterations produced by miconazole and econazole in *Trypanosoma cruzi*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 3, n. 3, p. 169–180, 1981.

EL-SERAFI, I. Quantitative Method for the Determination of Posaconazole in Mouse Tissues using Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. **Journal of Analytical & Bioanalytical Techniques**, v. 5, n. 3, 2014.

FERRAZ, M. L. *et al.* The anti-*Trypanosoma cruzi* activity of posaconazole in a murine model of acute Chagas' disease is less dependent on gamma interferon than that of benznidazole. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.51, n. 4, p. 1359–1364, 2007.

FENG *et al.* Structural characterization of the oxidative degradation products of the antifungal agent SCH 56592 by LC-NMR and LC-MS. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.25, p.545-557, 2001.

FENG *et al.* Characterization of an unusual ring-contraction degradant of the antifungal agent posaconazole. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v.50, p.576-579, 2012.

FLORENCE, A.T.; ATTWOOD, D. **Princípios Físico-Químicos em Farmácia**. 2ªed. São Paulo: Pharmabooks, 2011

FRANÇA, R. R. F. *et al.* Potent Inhibitors of the Enzyme Sterol 14 α -demethylase Against *Trypanosoma cruzi*. **Revista Virtual de Química**, v. 6, n. 5, p. 1483–1516, 2014.

FREED, A. L. *et al.* pH control of nucleophilic/electrophilic oxidation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 357, n. 1–2, p. 180–188, 2008.

GARCIA, C. V. *et al.* Stability-indicating HPLC method for posaconazole bulk assay. **Scientia Pharmaceutica**, v. 80, n. 2, p. 317–327, 2012.

GHOSAL, A. *et al.* Identification of Human Udp-Glucuronosyltransferase Enzyme (S)

Responsible for the Glucuronidation of posaconazole (Noxafil). **Drug Metabolism and Disposition**, v. 32, n. 3, p. 267–271, 2004.

GIL, E.S. **Controle físico-químico de qualidade de medicamentos**. 3ªed. São Paulo. Pharmabooks, 2010

GOVIND, S. K. R. *et al.* Stability indicating HPLC method for the quantification of bepotastine besilate and its related substances. **Der Pharma Chemica**, v. 6, n. 2, p. 343–351, 2014.

HAMDY, D. A.; BELAL, T. S. A comparative study of newly developed HPLC-DAD and UHPLC-UV assays for the determination of posaconazole in bulk powder and suspension dosage form. **Journal of Analytical Methods in Chemistry**, v. 2014, 2014.

HARRIS, D.C. **Análise Química Quantitativa**. 7ªed. São Paulo: LTC, 2011

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

ICH-Q1A(R2). The International Conference on Harmonisation. **ICH Q1A (R2) stability testing of new drug substances and products**, 2003.

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

ICH-Q1F. The International Conference on Harmonisation. **ICH Q1F Guideline stability data package for registration in climatic zones III and IV**, 2003.

ICH-Q2(R1). The International Conference on Harmonisation. **ICH Q2(R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology**, 1996.

ICH-Q3B(R2). The International Conference on Harmonisation. **ICH Q3B(R2) Impurities in New Drug Products**, 2006.

KATHIRVEL, S. *et al.* Stability Indicating RP-HPLC Method for the Determination of Process Related Impurities in Posaconazole API. **Asian Pharma Press**, v. 4, n. 4, p. 167–178, 2014.

KHALIL, H. A. *et al.* High performance liquid chromatographic assay for the simultaneous determination of posaconazole and vincristine in rat plasma. **International Journal of**

Analytical Chemistry, v. 2015, 2015.

KRIETER, P. *et al.* Disposition of posaconazole following single-dose oral administration in healthy subjects. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 9, p. 3543–3551, 2004.

LANÇAS, F. A cromatografia líquida moderna e a espectrometria de massas. **Scientia Chromatographica**, v.5, n.2, p.27-46, 2009.

LEPESHEVA, G. I. *et al.* Sterol 14 α -Demethylase as a Potential Target for Antitrypanosomal Therapy: Enzyme Inhibition and Parasite Cell Growth. **Chemistry and Biology**, v. 14, n. 11, p. 1283–1293, 2007.

LUQUETTI, A. *et al.* The National Survey of seroprevalence for evaluation of the control of Chagas disease in Brazil (2001-2008). **Rev.Soc.Bras.Med.Trop**, v. 44, n. 2, p. 108–121, 2011.

MAHESWARAN, R. FDA Perspectives: Scientific Considerations of forced degradation studies in ANDA submissions. **Pharmaceutical Technology**, 2012.

MARIN-NETO, J. A. *et al.* Pathogenesis of chronic Chagas heart disease. **Journal of American Heart Association**, v. 115, n. 9, p. 1109–1123, 2007.

MARTINS-MELO, F. R. *et al.* Prevalence of Chagas disease in Brazil: A systematic review and meta-analysis. **Acta Tropica**, v. 130, n. 1, p. 167–174, 2014.

MARTINS-MELO, F. R. *et al.* Trends and spatial patterns of mortality related to neglected tropical diseases in Brazil. **Parasite Epidemiology and Control**, v. 1, n. 2, p. 56–65, 2016.

MINÉ, T.; MORAIS, D. Revisão das Legislações que vigoram sobre a Estabilidade dos Medicamentos na Indústria Farmacêutica Brasileira. **Foco**, p. 21–38, 2013.

MONCAYO, A. Chagas Disease: Current Epidemiological Trends after the Interruption of Vectorial and Transfusional Transmission in the Southern Cone Countries. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 5, p. 577–591, 2003.

NEVES.D.P. **Parasitologia Humana**. 11^a ed. São Paulo: Atheneu, 2009.

OLIVIERI, B. P. *et al.* A comparative study of posaconazole and benznidazole in the prevention

of heart damage and promotion of trypanocidal immune response in a murine model of Chagas disease. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 36, n. 1, p. 79–83, 2010.

OLIVIERI, B.P; ALMEIDA, V.C; JORGE, T. A. Benznidazole treatment following acute *Trypanosoma cruzi* infection triggers CD8⁺ T-cell expansion and promotes resistance to reinfection. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 12, p. 3790–3796, 2002.

OPAS. Doença de Chagas: Guia para vigilância, prevenção, controle e manejo clínico da doença de chagas aguda transmitida por alimentos. **Journal of Chemical Information and Modeling**, p. 160, 2009.

PONTES, V. M. O. *et al.* Reações adversas em pacientes com doença de Chagas tratados com benzonidazol, no Estado do Ceará. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 2, p. 182–187, 2010.

PRASAD, V. D.; REDDY, V. R.; APARNA, P. Validated Gradient Stability Indicating UPLC Method for the Determination of Related Substances of Posaconazole in Bulk Drug. **American Journal Analytical Chemistry**, p. 965–976, 2015.

PUBCHEM. Open Chemistry Database. Compound Posaconazole.2017. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/468595> >. Acessado em: 21 de fevereiro de 2017.

RAAD, I. I. *et al.* Posaconazole as salvage treatment for invasive fusariosis in patients with underlying hematologic malignancy and other conditions. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 42, p. 1398–1403, 2006.

RAO, B. V. *et al.* A Review on Stability Indicating Hplc Method Development. **World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical sciences**, v. 4, n. 8, p. 405–423, 2015.

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

REYNOLDS, D. W. *et al.* Available Guidance and Best Practices for conducting forced degradation studies. **Pharmaceutical Technology**, 2002.

REIS, N. F. A *et al.* Stability-indicating UHPLC method for determination of nevirapine in its bulk form and tablets: identification of impurities and degradation kinetic study. **Journal Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.126, p. 103-108, 2016.

RIDDHIBEN, P. *et al.* Stability indicating HPLC method development- a review. **International Research Journal of Pharmacy**, v. 2, n. 25, p. 79–87, 2011.

RUBERTO, I. *et al.* Investigating mammalian tyrosine phosphatase inhibitors as potential “piggyback” leads to target trypanosoma brucei transmission. **Chemical Biology and Drug Design**, v. 81, n. 2, p. 291–301, 2013.

SCHILLER, D. S.; FUNG, H. B. Posaconazole: An extended-spectrum triazole antifungal agent. **Clinical Therapeutics**, v. 29, n. 9, p. 1862–1886, 2007.

SCHMUNIS, G. A. Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: The role of international migration. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, n. SUPPL. 1, p. 75–85, 2007.

SEHRAWAT, R.; MAITHANI, M.; SINGH, R. Regulatory Aspects in Development of Stability-Indicating Methods: A Review. **Chromatographia**, v. 72, n. 1, p. 1–6, 2010.

SHEN, J. X.; KRISHNA, G.; HAYES, R. N. A sensitive liquid chromatography and mass spectrometry method for the determination of posaconazole in human plasma. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 43, n. 1, p. 228–236, 2007.

SILVA, K. E. R. *et al.* Modelos de avaliação da estabilidade de fármacos e medicamentos para a indústria farmacêutica. **Revista de Ciencias Farmaceuticas Basica e Aplicada**, v. 30, n. 2, p. 129–135, 2009.

SILVEIRA, C. A. N.; CASTILLO, E.; CASTRO, C. Avaliação do tratamento específico para o Trypanosoma cruzi em crianças, na evolução da fase indeterminada. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 33, n. 2, p. 191–196, 2000.

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

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

SOLARI, A. *et al.* Treatment of Trypanosoma cruzi-infected children with nifurtimox: a 3 year follow-up by PCR. **J Antimicrob Chemother**, v. 48, n. 4, p. 515–519, 2001.

TANOWITZ, H. B.; WEISS, L. M.; MONTGOMERY, S. P. Chagas disease has now gone

global. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 4, p. 4–5, 2011.

URBINA, J. A. Ergosterol biosynthesis and drug development for Chagas disease. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. SUPPL. 1, p. 311–318, 2009.

TOLEDO, R.A et al. Estudo eletroquímico e químico quântico da oxidação do antidepressivo tricíclico amitriptilina. **Química Nova**, v.28, n.3, p.456, 2005.

WHO (World Health Organization). Chagas disease (American trypanosomiasis). 2016 Disponível em: < <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en///> >, Acessado em: 25 de dezembro de 2016.

WILKINSON, S. R. *et al.* A mechanism for cross-resistance to nifurtimox and benznidazole in trypanosomes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 13, p. 5022–7, 2008.

XU, H. R. *et al.* Liquid chromatography-mass spectrometry method for the quantification of posaconazole in human plasma: Application to pharmacokinetics following single-dose administration in the fasted state and with a high-fat meal. **Pharmazie**, v. 68, n. 3, p.173–177, 2013.

YANG, Y. *et al.* Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis Stability-indicating reversed-phase HPLC method development and characterization of impurities in vortioxetine utilizing LC – MS, IR and NMR. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 117, p. 325–332, 2016.

ZELEDÓN, R; RABINOVICH, J.E. Chagas Disease: An Ecological Appraisal with special emphasis on its Insect Vectors. **Ann.Ver.Entomol**,v.26, n. 51, p.101-133, 1981.

ZHONG, W. *et al.* Structural characterization of a novel degradant of the antifungal agent posaconazole. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 66, p. 40–49, 2012.