



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS (PPGCF)

JOSÉ WELLITHOM VITURINO DA SILVA

**AVALIAÇÃO DO PERFIL DE ESTABILIDADE DO MISOPROSTOL,
CARACTERIZAÇÃO DE SEUS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO E AVALIAÇÃO
DE PERMEAÇÃO VAGINAL *IN VITRO***

Recife

2023

JOSÉ WELLITHOM VITURINO DA SILVA

**AVALIAÇÃO DO PERFIL DE ESTABILIDADE DO MISOPROSTOL,
CARACTERIZAÇÃO DE SEUS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO E AVALIAÇÃO
DE PERMEÇÃO VAGINAL *IN VITRO***

Exame de defesa de doutorado apresentado ao programa de pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco.

Área de Concentração: Produção e controle de medicamentos.

Orientador: Prof. Dr. Danilo César Galindo Bedor

Recife

2023

Catálogo na fonte:
Bibliotecário: Aécio Oberdam, CRB4: 1895

S586a Silva, José Wellithom Viturino da.
Avaliação do perfil de estabilidade do misoprostol, caracterização de seus produtos de degradação e avaliação de permeação vaginal in vitro / José Wellithom – Viturino da Silva - 2023.
156 p.

Orientador: Danilo César Galindo Bedor
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Recife, 2023.
Inclui referências.

1. Estabilidade. 2. Degradação forçada. 3. Misoprostol. 4. Produtos de degradação. 5. Espectrometria de massas. Bedor, Danilo César Galindo (orientadora). II. Título.

615 CDD (23.ed.)

UFPE (CCS 2023 - 276)

JOSÉ WELLITHOM VITURINO DA SILVA

**AVALIAÇÃO DO PERFIL DE ESTABILIDADE DO MISOPROSTOL,
CARACTERIZAÇÃO DE SEUS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO E AVALIAÇÃO
DE PERMEAÇÃO VAGINAL IN VITRO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde, como requisito para a obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Produção e Controle de Medicamentos.

Aprovado em: 05/06/2023.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Danilo César Galindo Bedor (Orientador)
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Prof. Dr. José Lamartine Soares sobrinho (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Prof. Dr^a. Juliana Kishishita (Examinadora Externa)
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

Prof. Dr^a. Rosana Casoti (Examinadora Externa)
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

Prof. Dr. Rodolfo Hideki Vicente Nishimura (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me fazer crer em um mundo melhor.

Aos meus pais, Antônio e Virgínia, por todo cuidado e ensinamentos acerca da vida e do mundo.

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

Aos meus irmãos e à minha irmã por ensinarem que as diferenças as vezes são difíceis, porém muitas vezes necessárias e edificadoras.

Ao meu professor e orientador Drº Danilo César Galindo Bedor pela companhia, confiança, ensinamentos e parcerias firmadas ao longo do meu mestrado e agora doutorado.

Ao professor Drº Davi Pereira de Santana e à professora Leila Leal por todo trabalho em conjunto e por todas as oportunidades apresentadas a mim e aos meus amigos do NUDFAC.

Aos meus amigos do NUDFAC que tornaram todos esses dias mais leves e por toda a contribuição neste trabalho. Sem vocês seria tudo mais difícil!

A Maira e Juliana por toda contribuição na execução deste trabalho.

A Izak por toda parceria desenvolvida desde o mestrado.

Ao meu professor do fundamental Cleiton Lucena que alfabetizou dezenas de crianças em uma escola sem água e energia e fez muitas crianças, entre elas eu, a conhecer o caminho transformador da educação. Muito obrigado!

Ao laboratório farmacêutico HEBRON pelas doações concedidas e pela parceria na realização deste projeto.

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

Ao CNPq pela bolsa concedida.

A todos que fazem o departamento de Ciências Farmacêuticas.

À universidade Federal de Pernambuco e ao contribuinte brasileiro.

RESUMO

O misoprostol (MSP) é um análogo sintético da prostaglandina E1 e foi inicialmente utilizado na prevenção de úlceras gástricas induzidas por anti-inflamatórios não esteroidais. No Brasil, o MSP está disponível na forma de comprimido vaginal e tem uso bem estabelecido, apesar de vários autores discutirem problemas biofarmacêuticos para a via de administração vaginal e também relacionados a estabilidade destas formulações. Assim, este trabalho teve como objetivo realizar estudo de degradação forçada do MSP IFA, comprimidos e seu respectivo placebo, seguindo diretrizes nacionais e internacionais para condução dos testes e validação da metodologia que utilizou como técnica de quantificação a CLAE. O método foi aplicado em estudos de cinética de degradação e de permeação vaginal *in vitro* utilizando mucosa vaginal suína. Além disso, foi desenvolvido método LC-MS/TOF que foi utilizado como ferramenta na identificação dos produtos de degradação gerados. As amostras de IFA apresentaram degradação em todas as condições de estresse avaliadas, especialmente nas condições de acidez e alcalinidade. As amostras de comprimido apresentaram degradação em todas as condições de estresse, exceto no calor úmido. O método indicativo de estabilidade apresentou seletividade, linearidade, precisão e exatidão de acordo com a RDC 166 de 2017. As cinéticas de degradação revelaram modelos cinéticos com valores de coeficiente de correlação pouco distintos. A permeação *in vitro* trouxe como principal achado a informação de que o MSP em sua forma esterificada não foi capaz de permear a mucosa e que passa por um prévio processo de degradação para que seja detectado algum componente no líquido receptor. O espectro de massas do MSP obtivo por ESI em modo positivo evidenciou a formação de aduto de sódio $[M+ Na]^+$ e sinal de m/z 405.2612 como pico base. Foram identificados também como produtos de degradação (PD) as formas A e B do MSP, bem como o 12 e o 8 EPI MSP. Além disso, foram encontrados PDs ainda não descritos na literatura. Dessa forma foi possível conhecer melhor os aspectos envolvidos na estabilidade e decaimento do teor do MSP, propor estruturas para os produtos de degradação gerados, além de aspectos relacionados ao processo de passagem deste fármaco em meio vaginal.

Palavras-Chave: estabilidade; degradação forçada; misoprostol; produtos de degradação; permeação vaginal; espectrometria de massas.

ABSTRACT

Misoprostol (MSP) is a synthetic analog of prostaglandin E1 initially used in the prevention of gastric ulcers induced by non-steroidal anti-inflammatory drugs. In Brazil, MSP is available in the form of vaginal tablets and has a well-established use, although several authors have discussed biopharmaceutical issues regarding vaginal administration and formulation stability. Therefore, this study aimed to perform a forced degradation study of MSP active pharmaceutical ingredient (API), tablets, and their respective placebos, according to national and international guidelines for testing and methodology validation, using high-performance liquid chromatography (HPLC) as the quantification technique. The method was applied in degradation kinetics and in vitro vaginal permeation studies using porcine vaginal mucosa. Additionally, an LC-MS/TOF method was developed and used as a tool for the identification of degradation products generated. The API samples showed degradation under all evaluated stress conditions, especially under acidic and alkaline conditions. The tablet samples showed degradation under all stress conditions except under humid heat. The stability-indicating method demonstrated selectivity, linearity, precision, and accuracy according to RDC 166/2017. The degradation kinetics revealed kinetic models with slightly distinct correlation coefficient values. The in vitro permeation study found that the esterified form of MSP was not able to permeate the mucosa and required prior degradation for any component to be detected in the receptor fluid. The mass spectrum of MSP obtained by electrospray ionization (ESI) in positive mode revealed the formation of a sodium adduct $[M+Na]^+$ and a base peak at m/z 405.2612. Degradation products identified included forms A and B of MSP, as well 12- and 8-EPI MSP. Furthermore, previously unreported degradation products were found. This study provided a better understanding of the stability and degradation of MSP, proposed structures for the generated degradation products, and shed light on aspects related to the drug's vaginal passage process.

Keywords: stability; forced degradation; misoprostol; degradation products; vaginal permeation; mass spectrometry.

Ao vencedor, as batatas!
ASSIS; MACHADO, 1891.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1-	Estrutura química do misoprostol	21
Figura 2-	Representação das estruturas químicas das impurezas do MSP	22
Figura 3-	Concentração plasmática de MSP ácido obtido através das vias oral, vaginal e sublingual	25
Figura 4-	Esquema da seleção de artigos	42
Figura 5-	Representação esquemática de uma célula de difusão side-bi-side	51
Figura 6-	Cromatograma do MSP e suas impurezas obtidos com a coluna Luna (Testes 1 e 2) e com a coluna Purospher STAR (Testes 3,4 e 5)	77
Figura 7-	Avaliação de balanço de massas utilizando diferentes comprimentos de onda da faixa UV	78
Figura 8-	Cromatogramas de branco NaOH. (b) Padrão MSP. (c) IFA submetido ao NaOH 5 mM. (d) Comprimidos submetidos ao NaOH 5 mM	80
Figura 9-	(a) Cromatogramas de branco HCl. (b) Padrão MSP. (c) IFA submetido ao HCl 0,2 M. (d) Comprimidos submetidos ao HCl 0,2M	83
Figura 10-	(a) Cromatogramas de branco fase móvel. (b) Padrão MSP. (c) IFA submetido ao aquecimento. (d) Comprimidos submetidos ao aquecimento.	87
Figura 11-	(a) Cromatogramas de branco fase móvel. (b) Padrão MSP. (c) IFA submetido a umidade. (d) Comprimidos submetida a umidade.	88
Figura 12-	(a) Cromatogramas de branco peróxido de hidrogênio. (b) Padrão MSP. (c) IFA exposto ao peróxido de hidrogênio. (d) Comprimidos expostos ao peróxido de hidrogênio	93
Figura 13-	(a) Cromatogramas de branco sulfato de cobre. (b) Padrão MSP. (c) IFA exposto ao sulfato de cobre. (d) Comprimidos expostos ao sulfato de cobre	95
Figura 14-	(a) Cromatogramas de branco fase móvel. (b) Padrão MSP. (c) IFA submetido a luz visível. (d) Comprimido submetida a luz visível	99
Figura 15-	(a) Cromatogramas de branco fase móvel. (b) Padrão MSP. (c) IFA submetida a luz ultravioleta. (d) Comprimidos submetidos a luz ultravioleta	101

Figura 16-	Avaliação do balanço de massas para degradação do MSP IFA nas de estresse básico, ácido, temperatura, umidade, peróxido de hidrogênio, íons metálicos, luz visível e luz ultravioleta, respectivamente	102
Figura 17-	Representação gráfica das cinéticas de ordem zero, primeira ordem e segunda ordem para a degradação de MSP submetido a hidrólise básica	104
Figura 18-	Representação gráfica das cinéticas de ordem zero, primeira ordem e segunda ordem para a degradação de MSP submetido a hidrólise ácida	108
Figura 19-	Gráfico de dispersão das retas obtidas (IFA)	111
Figura 20-	Análise dos resíduos do modelo (IFA)	112
Figura 21-	Gráfico de dispersão das retas obtidas (CP)	120
Figura 22-	Análise dos resíduos do modelo (CP)	121
Figura 23-	Espectro de massas de alta resolução ampliado do MSP obtido pelo sistema LC-MS-TOF no modo ESI +	127
Figura 24-	Mecanismo de hidrólise do misoprostol catalisada por ácido clorídrico	129
Figura 25-	Mecanismo de hidrólise do misoprostol catalisada por hidróxido de sódio	130
Figura 26-	Espectros de massas dos PDs observados na degradação básica	130
Figura 27-	Espectros de massas dos PDs observados na degradação ácida	131
Figura 28-	Mecanismo de formação de do MSP A e B em meio básico	132
Figura 29-	Mecanismo de formação de do MSP A e B em meio ácido	132
Figura 30-	Mecanismo de isomerização do MSP-A para MSP-B	133
Figura 31-	Espectros de massas dos PDs observados na degradação térmica	134
Figura 32-	Espectros de massas dos PDs observados na degradação por umidade	135
Figura 33-	Espectros de massas dos PDs observados na degradação por peróxido de hidrogênio	136
Figura 34-	Mecanismo de formação do PD1 gerado a partir do MSP exposto ao H ₂ O ₂	137
Figura 35-	Espectros de massas dos PDs observados na degradação por sulfato de cobre	138
Figura 36-	Cromatogramas obtidos pela análise da (a) matriz branco, (b) compartimento doador, (c) retenção na mucosa (d) compartimento receptor	141

Figura 37-	Representação gráfica da quantidade de produto de degradação cumulativa, permeada para o compartimento doador em função do tempo	142
Quadro 1-	Propriedades físico-químicas do MSP	22
Quadro 2-	Protocolo do Ministério da Saúde para uso do MSP	28
Quadro 3-	Limites de notificação, identificação e qualificação do (s) produtos (s)de degradação no decorrer do estudo de estabilidade	36
Quadro 4-	Quadro sinótico utilizado para sintetizar os dados obtidos dos artigos selecionados para o trabalho	44
Quadro 5-	Expressões matemáticas que definem as ordens de reação	62
Quadro 6-	Expressões matemáticas que definem os parâmetros cinéticos das reações.	62
Quadro 7-	Produtos de degradação encontrados para o insumo farmacêutico ativo.	79
Quadro 8-	Produtos de degradação encontrados para os comprimidos	79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Medicamentos referência a base de MSP com registros no Brasil e nos Estados Unidos da América	27
Tabela 2-	Principais condições usadas para estudos de degradação forçada	32
Tabela 3-	Lista de solventes e reagentes utilizados	52
Tabela 4-	Lista de equipamentos utilizados	53
Tabela 5-	Condições cromatográficas da farmacopeia americana para quantificação de impurezas orgânicas na dispersão de MSP	53
Tabela 6-	Resumo dos principais resultados obtidos no desenvolvimento do MIE	76
Tabela 7-	Resultados brutos para a degradação básica	81
Tabela 8-	Resultados brutos para a degradação ácida	84
Tabela 9-	Resultados brutos para a degradação térmica	86
Tabela 10-	Resultados brutos para a degradação por umidade	88
Tabela 11-	Resultados brutos para a degradação por peróxido de hidrogênio após 10 dias de exposição	92
Tabela 12-	Resultados brutos para a sulfato de cobre	96
Tabela 13-	Resultados brutos da degradação por luz visível	98
Tabela 14-	Resultados brutos da degradação por luz ultravioleta	100
Tabela 15-	Dados de C (concentração em $\mu\text{g/mL}$), Log C (logarítmo neperiano da concentração) e 1/C (inverso da concentração) adquiridos em análise da solução de do MSP IFA submetida a degradação básica	105
Tabela 16-	Parâmetros cinéticos calculados para o MSP na degradação básica	106
Tabela 17-	Dados de C (concentração em $\mu\text{g/mL}$), Log C (logarítmo neperiano da concentração) e 1/C (inverso da concentração) adquiridos em análise da solução de do MSP IFA submetida a degradação ácida	107
Tabela 18-	Parâmetros cinéticos calculados para o MSP na degradação ácida	108
Tabela 19-	Dados do estudo da seletividade (IFA)	109
Tabela 20-	Estatística descritiva para linearidade (IFA)	110
Tabela 21-	Dados brutos da linearidade e estatística descritiva (IFA)	110
Tabela 22-	Dados da ANOVA para avaliação do coeficiente angular (IFA)	111
Tabela 23-	Medida descritiva da qualidade do ajuste (IFA)	111
Tabela 24-	Teste de normalidade dos resíduos (IFA)	112

Tabela 25-	Teste de Homocedasticidade - Breusch Pagan (IFA)	112
Tabela 26-	Resultados da Repetibilidade (IFA)	113
Tabela 27-	Dados experimentais da precisão intermediária (IFA)	114
Tabela 28-	ANOVA da precisão intermediária do CB (IFA)	114
Tabela 29-	ANOVA da precisão intermediária do CM (IFA)	115
Tabela 30-	ANOVA da precisão intermediária do CA (IFA)	115
Tabela 31-	Dados experimentais da exatidão (IFA)	115
Tabela 32-	<i>Dados estatísticos da exatidão (IFA).</i>	116
Tabela 33-	Dados experimentais da robustez (IFA)	117
Tabela 34-	ANOVA do efeito do fluxo (IFA)	117
Tabela 35-	ANOVA de efeito de temperatura (IFA)	117
Tabela 36-	Dados do estudo da seletividade (CP)	118
Tabela 37-	Dados experimentais da linearidade e estatística descritiva	119
Tabela 38-	Dados brutos da linearidade e estatística descritiva (CP)	119
Tabela 39-	Dados da ANOVA para avaliação do coeficiente angular (CP)	120
Tabela 40-	Medida descritiva da qualidade do ajuste (CP)	120
Tabela 41-	Teste de normalidade dos resíduos (CP)	121
Tabela 42-	Teste de Homocedasticidade - Breusch Pagan (CP)	121
Tabela 43-	Resultados da Repetibilidade (CP)	123
Tabela 44-	Dados experimentais da precisão intermediária (CP)	124
Tabela 45-	ANOVA da precisão intermediária do CB (CP)	124
Tabela 46-	ANOVA da precisão intermediária do CM (CP)	125
Tabela 47-	ANOVA da precisão intermediária do CA (CP)	125
Tabela 48-	Dados experimentais da Exatidão (CP)	126
Tabela 49-	Dados estatísticos de exatidão (CP)	126
Tabela 50-	Quantificação do MSP e de seu PD no compartimento doador, mucosa e LR do experimento 1	141

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANSM- Agência Nacional de Segurança de Medicamentos e de Produtos de Saúde

AIBN- Radical Azobisisobutironitrila

AINES- Anti-inflamatórios não esteroidais

ANVISA- Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CLAE- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

DAD- Arranjo de diodos

DPR- Desvio Padrão Relativo

ESI- Ionização por Electrospray

eV- Eletrovolts

FDA- *Food and Drug Administration*

H₂O₂- Peróxido de hidrogênio

HCl- Ácido clorídrico

HPMC - Hidroxipropilmetilcelulose

ICH- *International Conference on Armonization*

IFA- Insumo Farmacêutico Ativo

L- Litros

LC-MS/MS-TOF- Cromatografia Líquida acoplado a espectrometria de massas em tandem com analisador por tempo de voo

Lux/h- Lux por hora

m/z- Relação massa/carga

MIE- Método Indicativo de Estabilidade

NaOH- Hidróxido de sódio

OMS- Organização Mundial de Saúde

PD- Produto de Degradação

PDs- Produtos de Degradação

PVC- Cloreto de polivinila

PVCD- Cloreto de polivinilideno

RDC- Resolução de Diretoria Colegiada

pKa – Constante de dissociação ácida

RE- Resolução

RMN- Ressonância Magnética Nuclear

T_{1/2}- Meia-vida de degradação

T_{90%}- Meia vida-útil

UR- Umidade Relativa

UV- Ultravioleta

W/hm²- Watts por hora por metro quadrado

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	REFERENCIAL TEÓRICO	21
2.1	O MISOPROSTOL	21
2.1.1	Propriedades físico-químicas do MSP	21
2.1.2	Farmacocinética e farmacodinâmica	23
2.1.3	Usos Clínicos	25
2.2	ESTUDOS DE DEGRADAÇÃO FORÇADA	28
2.3	AVALIAÇÃO DOS RESULTADOS OBTIDOS NOS TESTES DE DEGRADAÇÃO FORÇADA	34
2.4	IDENTIFICAÇÃO E QUALIFICAÇÃO DE PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO	35
2.4.1	Espectrometria de massas	39
2.5	ESTUDOS DE ESTABILIDADE DO MISOPROSTOL	41
2.6	ESTUDOS DE PERMEAÇÃO IN VITRO	48
3	OBJETIVOS	51
3.1	OBJETIVO GERAL	51
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	51
4	MATERIAL E MÉTODOS	52
4.1	SUBSTÂNCIAS E REAGENTES QUÍMICOS	52
4.2	EQUIPAMENTOS	52
4.3	DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO INDICATIVO DE ESTABILIDADE (MIE)	53
4.3.1	Preparo de fase móvel	54
4.4	ESTUDO DE DEGRADAÇÃO FORÇADA	54
4.4.1	Degradação forçada do insumo farmacêutico ativo e comprimido (PROSTOKOS® 200mcg)	54
4.4.1.1	Preparo da amostra padrão	54
4.4.1.2	Degradação básica	55
4.4.1.3	Degradação ácida	56
4.4.1.4	Degradação térmica seca (aquecimento)	56
4.4.1.5	Degradação térmica úmida (umidade)	57

4.4.1.6	Degradação oxidante (peróxido de hidrogênio)	58
4.4.1.7	Degradação sob influência de íons metálicos (sulfato de cobre)	58
4.4.1.8	Degradação fotolítica	59
4.4.2	Degradação forçada do placebo	60
4.5	AVALIAÇÃO DE BALANÇO DE MASSAS	61
4.6	ESTUDO DE CINÉTICA DE DEGRADAÇÃO	61
4.7	VALIDAÇÃO DO MÉTODO INDICATIVO DE ESTABILIDADE PARA O IFA MSP	62
4.7.1.	Preparo de soluções	62
4.7.1.1.	Preparo da solução diluente	62
4.7.1.2.	Preparo da solução padrão	62
4.7.1.3.	Preparo da solução de HPMC	63
4.7.1.4	Preparo da solução da Dispersão de MSP 1% em HPMC	63
4.7.1.5.	Preparo de amostra branco em solução degradativa de hidróxido de sódio	63
4.7.1.6.	Preparo de amostra branco em solução degradativa de ácido clorídrico	63
4.7.1.7.	Preparo de amostra branco em solução degradativa de peróxido de hidrogênio	64
4.7.1.8.	Preparo de amostra branco em solução degradativa de íons metálicos	64
4.7.2.	Execução dos testes de validação para o insumo farmacêutico ativo	64
4.7.2.1	Seletividade	64
4.7.2.1.1	Avaliação dos resultados	65
4.7.2.2.	Linearidade	65
4.7.2.2.1	Avaliação dos resultados	65
4.7.2.3.	Faixa de trabalho	66
4.7.2.4	Limites de detecção e quantificação	66
4.7.2.5	Precisão	66
4.7.2.5.1	Avaliação dos resultados	67
4.7.2.6	Exatidão	67
4.7.2.6.1	Avaliação dos resultados	68
4.7.2.7	Robustez	68
4.7.2.7.1	Avaliação dos resultados	68
4.7.3	Execução dos testes de validação para o produto acabado	68
4.7.3.1	Seletividade	69

4.7.3.2	Linearidade	69
4.7.3.3	Faixa de trabalho, limite de detecção e limite de quantificação	69
4.7.3.4	Precisão	70
4.7.3.5	Exatidão	71
4.7.3.6	Robustez	71
4.8	OTIMIZAÇÃO DA ESPECTROMETRIA DE MASSAS	72
4.8.1	Definição do modo de ionização e perfil de fragmentação	72
4.8.2	Otimização dos parâmetros da fonte e acoplamento LC-MS	72
4.9	ESTUDO DE PERMEAÇÃO IN VITRO	72
4.9.1	Avaliação de recuperação	72
4.9.2	Preparo das mucosas e montagem do sistema de difusão	73
5	RESULTADOS	74
5.1	DESENVOLVIMENTO DO MIE	74
5.2	DEGRADAÇÃO FORÇADA	78
5.2.1	Degradação básica e ácida	79
5.2.2	Degradação térmica seca (aquecimento)	84
5.2.3	Degradação térmica úmida (umidade)	87
5.2.4	Degradação oxidante (peróxido de hidrogênio)	90
5.2.5	Degradação sob influência de íons metálicos (sulfato de cobre)	94
5.2.6	Degradação fotolítica	97
5.2.6.1	Luz visível	97
5.2.6.2	Luz UV	99
5.3	DEGRADAÇÃO FORÇADA DO PLACEBO do comprimido PROSTOKOS® 200mcg	103
5.4	ESTUDO DE CINÉTICA DE DEGRADAÇÃO	103
5.4.1	Cinética de degradação forçada em condição básica	103
5.4.2	Cinética de degradação forçada em condição ácida	106
5.5	VALIDAÇÃO DO MÉTODO INDICATIVO DE ESTABILIDADE	109
5.5.1.	Validação de MIE – IFA	109
5.5.1.1	Seletividade	109
5.5.1.2	Linearidade	109
5.5.2	Faixa de trabalho, limite de detecção e limite de quantificação	112
5.5.3	Precisão	113

5.5.4	Exatidão	116
5.5.5	Robustez	117
5.5.6	Validação de MIE – comprimido	118
5.5.6.1	Seletividade	118
5.5.6.2	Linearidade	118
5.5.6.3	Faixa de trabalho, limite de detecção e limite de quantificação	122
5.5.6.4	Precisão	122
5.5.6.5	Exatidão	126
5.5.6.6	Robustez	126
5.6	ESPECTROMETRIA DE MASSAS DE ALTA RESOLUÇÃO	126
5.6.1	Otimização da espectrometria de massas	126
5.6.2	Identificação por espectrometria de massas de alta resolução	127
5.6.2.1	Degradação ácida e básica	128
5.6.2.2	Degradação térmica seca	133
5.6.2.3	Degradação por umidade	134
5.6.2.4	Degradação por peróxido de hidrogênio	135
5.6.2.5	Degradação por sulfato de cobre	137
5.7	ESTUDO DE PERMEAÇÃO	139
5.7.1	Avaliação da recuperação	139
5.7.2	Estudo de permeação em mucosa vaginal suína	140
6	CONCLUSÃO	144
	PERSPECTIVAS	145
	REFERÊNCIAS	146

1. INTRODUÇÃO

No Brasil, o misoprostol (MSP) está disponível na forma de comprimido vaginal e tem indicação clínica para indução do aborto, esvaziamento uterino por morte embrionária ou fetal e indução de trabalho de parto. Por esse motivo sua venda é restrita a estabelecimentos hospitalares devidamente cadastrados e credenciados junto a autoridade sanitária, tendo em vista as questões legais acerca de seu uso. Além disso, estudos brasileiros na área da saúde pública demonstram que o MSP é o principal meio para induzir aborto terapêutico no país (BRASIL, 1998; BRASIL, 2013).

A via de administração do MSP para obtenção de suas aplicações obstétricas tem sido discutida, porém ainda não há um consenso sobre qual via é a mais adequada. Além disso, não há uma discussão abrangente que avalie a influência das diferentes formulações comercialmente disponíveis na eficácia geral do medicamento, mesmo havendo relatos da falta de qualidade dessas formulações, principalmente os relacionados à estabilidade (WING et al., 1995; ELUL, et al, 1999; SHELDON, et al, 2012; WEEKS; NAVARATNAM; ALFIREVIC, 2017).

Naturalmente o insumo farmacêutico ativo (IFA) do MSP se apresenta como um líquido oleoso e formulado como uma dispersão 1:100 (m/m) em hidroxipropilmetilcelulose (HPMC). Sugere-se que o fármaco molecularmente disperso em HPMC apresenta maior estabilidade quando comparado a forma de óleo puro e apresenta mínima taxa de degradação quando exposto a baixos níveis de umidade (CARARLI; CATALANO, 1990).

No entanto, condições menos brandas de temperatura e umidade podem estar associadas aos processos de degradação da molécula do fármaco e eventualmente levar a formação de produtos de degradação (PD), mesmo durante o prazo de validade. Assim, métodos indicativos de estabilidade (MIE) devem ser desenvolvidos para que se possa quantificar o MSP, com seletividade, na presença de seus PDs (DAJANI et al., 1976; BRASIL, 2015).

Normalmente, o desenvolvimento destas metodologias é subsidiado pelos estudos de degradação forçada que têm a finalidade de acelerar os processos degradativos e evidenciar o perfil de degradação potencial de um determinado fármaco. Além disso, estudos de degradação forçada permitem uma profunda avaliação para aprimoramento da estabilidade em produtos farmacêuticos e dessa forma, atuam de forma complementar na investigação da qualidade, segurança e eficácia em medicamentos (SRIVASTAVA, KUMAR, 2017).

Na literatura são escassos os relatos de MIE com aplicação para o MSP e é notória a ausência de avaliação de algumas condições preconizadas nos estudos de degradação forçada,

como a exposição à luz (KAHSAY et al.,2015). Parâmetros específicos para avaliação da qualidade destas metodologias, a exemplo do balanço de massas, não são abordados. Investigações utilizando técnicas de caracterização, como a espectrometria de massas também estão ausentes (CARR et al, 2012).

Dessa forma este presente trabalho traz uma avaliação do perfil de estabilidade do MSP em diferentes condições de estresse com a finalidade de conhecer melhor o comportamento deste fármaco frente a estas condições, bem como a aplicação da espectrometria de massas na caracterização dos produtos de degradação gerados. Traz-se ainda uma investigação do seu perfil de permeação em estudo *in vitro*.

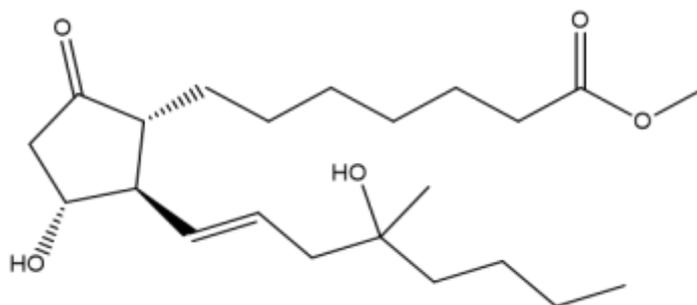
2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. O MISOPROSTOL

2.1.1. Propriedades físico-químicas do MSP

O MSP é um líquido viscoso de coloração amarelada, apresenta peso molecular de 382 g/mol e fórmula molecular representada por $C_{22}H_{38}O_5$. Em relação a sua estrutura (figura 1) química pode ser descrito como um éster metílico. Da região central da molécula, de onde partem as cadeias laterais, é constituída por um anel ciclopentano que apresenta um grupo cetona e hidroxila. A cadeia lateral superior, com grupamento éster metílico terminal, normalmente é referida como cadeia alfa, enquanto a cadeia lateral inferior é denominada de ômega, devido a presença de ligações duplas em C-13,14. Além disso, esta cadeia apresenta grupamento metil e hidroxila em sua estrutura no carbono 16 (COLLINS; PAPPO; DIJANE, 1985; PUBCHEN, 2021). No quadro 1 (um) temos a descrição de algumas características físico-químicas do MSP, que podem nortear a condução de diferentes ensaios com a molécula.

Figura 1. Estrutura química do Misoprostol.



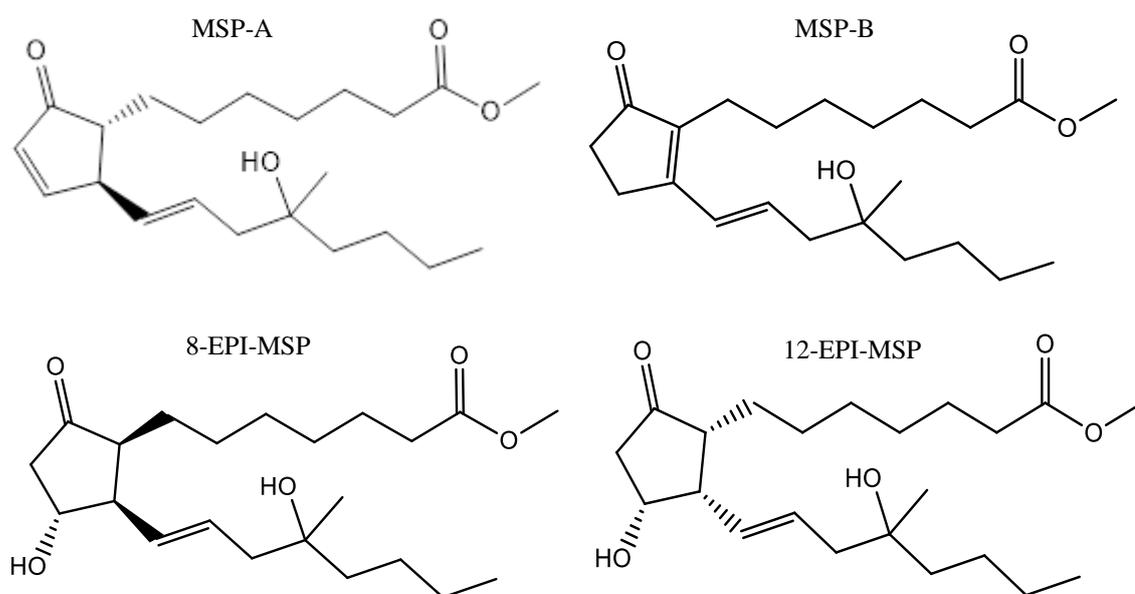
Fonte: Software ChenDraw Ultra.

Esta configuração estrutural é comum a todas as prostaglandinas, que possuem inclusive a mesma estereoquímica, exceto no caso da prostaglandina E2, que apresenta uma ligação dupla adicional na posição C-5,4. Além disso, o anel ciclopentano pode apresentar outros sistemas de distribuição chamados de “A” e “B” e estão descritas na farmacopeia americana como impurezas do MSP a serem monitoradas no teste de impurezas orgânicas (COLLINS; PAPPO; DIJANE, 1985; USP, 2019).

Quadro 1. Propriedades físico-químicas do MSP.

Propriedade físico-química	Valores correspondentes
Coefficiente de Lipofilicidade (Log de P)	3,84
Ponto de fusão	296°C
Massa exata	382,2719
Solubilidade em água	1.64e-02 g/L

Fonte: O autor a partir de dados disponíveis no Pubchen, 2021.

Figura 2. Representação das estruturas químicas das impurezas do MSP.

Fonte: Pubchen, 2021.

A formação da impureza A normalmente está associada a reações de eliminação do grupamento 11-hidroxil do anel ciclopentano e está susceptível a reações de isomerização que levam a formação da impureza B. Além das impurezas A e B, o MSP também apresenta como impureza o 8-epi-misoprostol (8-epi-MSP), formado por inversão da cadeia lateral superior e o 12-epi-misoprostol pela inversão da cadeia lateral inferior (12-epi-MSP) (Figura 2) (HAGEN et al.,2020).

Tais reações e a consequente formação de impurezas do MSP ocorrem naturalmente quando o fármaco está a temperatura ambiente e principalmente em áreas de maior umidade, tornando o fármaco muito instável as condições normais de armazenamento. Para sanar este

problema, um grupo de pesquisa da indústria farmacêutica Searle, desenvolveu uma dispersão de 1% em HPMC, que tornou possível a sua produção e armazenamento em temperatura ambiente (SANVORDEKER, 1981; KARARLI et al., 1990).

Porém, mesmo na forma de dispersão, o MSP tem apresentado relatos de falta de estabilidade. Kararli et al (1990) demonstraram que a degradação do MSP na dispersão aumenta de forma drástica quando o conteúdo de água da preparação excede 2%, recomendando uma proteção cuidadosa principalmente contra valores elevados de umidade. Isso tem limitado o desenvolvimento de formas farmacêuticas alternativas e, fisiologicamente, mais adequadas para administração do MSP pela via vaginal, como géis ou cremes (CARLAN, BOULDIN, O'BRIEN, 1997).

2.1.2. Farmacocinética e farmacodinâmica

O MSP é um análogo sintético da prostaglandina E1 e seus efeitos antiulcerogênicos estão relacionados a diminuição dos níveis de AMPc (monofosfato cíclico de adenosina) intracelular nas células parietais, o que diminui a atividade da bomba de prótons dependente de ATP (trifosfato de adenosina), promovendo prejuízo na troca de H^+ e K^+ e a consequente redução do pH estomacal. Além disso, o uso do MSP está associado a um estímulo da secreção de mucina, bicarbonato e aumento do fluxo sanguíneo de mucosa, aumentando seus efeitos citoprotetores. Já seus usos na obstetrícia têm se justificado por sua estimulação da contratilidade da mucosa uterina e pelo impacto no amolecimento do colo do útero, principalmente por meio de sua capacidade de degradar o colágeno no estroma do tecido conjuntivo (TANG, GEMZELL-DANIELSSON, 2007; BRUNTON; HILAL-DANDAN; KNOLLMANN, 2018).

Quando administrado por via oral, o MSP é quase completamente absorvido no trato gastrointestinal e atinge pico de concentração em cerca de 30 minutos. Além disso, o MSP sofre extenso efeito de primeira passagem, onde é possível observar a conversão para sua forma ácida, principal metabólito ativo. Metabólitos inativos dinor e tetranor formados a partir do metabólito ativo também são observados (KARIN, 1987).

A via vaginal tem sido extensivamente utilizada quando finalidades obstétricas são requeridas. Zieman et al. (1987), realizou o primeiro estudo de farmacocinética utilizando a via vaginal para o MSP e observou que a concentração plasmática aumenta gradualmente até atingir pico sérico entre 70 e 80 minutos.

El-Refaey et al. (1995), realizaram estudo clínico para comparar a taxa de abortamento do MSP e puderam observar que sua eficácia quando administrado pela via vaginal mostrou-se superior quando comparado com a administração pela via oral. Além disso, puderam constatar que os efeitos colaterais como náuseas, vômitos, diarreia, tonturas e dor de cabeça estiveram mais presentes quando houve o uso oral.

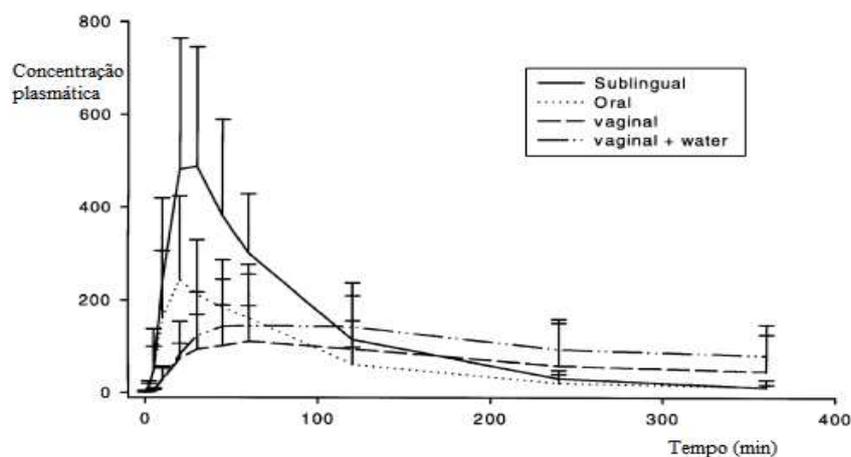
No entanto, a via vaginal pode apresentar diversos fatores que podem interferir diretamente na quantidade de fármaco permeada. Entre estes, a quantidade de sangramento durante o abortamento, variações individuais na quantidade e no pH do líquido vaginal são os que merecem maior destaque. Relatos clínicos demonstram a presença de porções dos comprimidos intactos, mesmo em muitas horas após a administração, demonstrando que absorção pode ser variável e incompleta. Além disso, a administração vaginal pode parecer inconveniente para muitas mulheres que podem preferir a via oral, como forma de garantia da privacidade (HO; NGAY, LIW, 1997; TANG; SCHWEER; SEYBERTH, 2002; TANG; GEMZELL-DANIELSSON; HO, 2007).

Alfirevic (2006) realizou revisão sistemática e pôde observar que a via vaginal parecer ser a mais adequada para indução de aborto. Apesar disso, o autor discute que a maior parte dos estudos clínicos que utilizam MSP por via oral fazem a administração de doses de 50 mcg e que doses superiores estariam diretamente ligadas a uma maior taxa de abortamentos ou nascimentos bem-sucedidos, a depender do objetivo de uso. O autor conclui o trabalho deixando claro que não foi possível obter resultados conclusivos sobre a segurança de uso do MSP pela via para indução de parto ou aborto e sugere que mais estudos sejam realizados.

Além destas, as vias sublingual e bucal são apresentadas como rotas alternativas para administração do MSP (BAKKER, PIERCE, MYERS, 2017). Tang et al. (2002), conseguiram mostrar que o pico plasmático e a biodisponibilidade de MSP administrado sublingual foi estatisticamente superior a via oral e vaginal. Tais achados poderiam ser explicados pela alta vascularização da língua, pH menos ácido da cavidade bucal, além da eliminação do efeito de primeira passagem observado pela administração oral. A comparação da concentração plasmática obtida através das vias oral, vaginal e sublingual podem ser observadas na figura 3.

Em estudos semelhante, Meckstroth et al. (2006), obtiveram pico de concentração plasmática em cerca de 60 minutos após administração bucal que apresentou biodisponibilidade inferior comparado a via oral e vaginal e superior quando comparado a via retal.

Figura 3. Concentração plasmática de MSP ácido obtido através das vias oral, vaginal e sublingual. Legenda: Concentração em pg/mL.



Fonte: adaptado de Tang et al., 2002.

A via retal também tem sido proposta com finalidades obstétricas (DIAB; RAMY; YEHIA, 1999; LOKUGAMAGE et al., 2001) principalmente nos casos de amniorrexe prematura, onde ocorre ruptura da membrana amnióticas antes do início de trabalho de parto e em casos de hemorragias associadas. No caso da amniorrexe prematura, a via vaginal parece não ser a mais adequada dados os riscos do desenvolvimento de infecções devido a aplicação do comprimido, o que poderia estar associado com uma maior taxa de corioamnionite e seps neonatal (ARCANJO et al., 2003).

Em avaliação farmacocinética realizada por Khan, El-Refaey (2003), foi observado que a quantidade total de MSP absorvido pela via retal foi superior a via oral. Além disso, o início da redução da concentração para aquela via aconteceu mais tardiamente comparado com a administração por via oral. O pico de concentração para via retal foi inferior e ocorreu cerca de 23 minutos após obtenção do Cmax para via oral. Tais achados foram correlacionados com menores taxas de efeitos adversos, como por exemplo a presença de tremores.

2.1.3. Usos clínicos

O MSP foi sintetizado pela primeira vez em 1976 pela empresa GD Searle onde recebeu a identificação CS-29333 e posteriormente foi registrado como cytotec® para prevenção de úlceras gástricas associadas ao uso de anti-inflamatórios não esteroidais (AINES) (DAJANI et al., 1976). O MSP é listado como medicamento essencial na lista da OMS devido a seus usos off-label na área obstetrícia onde é empregado no aborto médico eletivo, amadurecimento

cervical antes do aborto cirúrgico, evacuação do útero em casos de morte embrionária ou fetal e indução de trabalho de parto. Além disso, alguns estudos têm demonstrado a eficácia do MSP na prevenção e tratamento de hemorragia pós-parto (ELUL, et al, 1999; SHELDON, et al, 2012).

Estas duas últimas indicações apesar de serem relatadas na prática clínica e de terem sido observados resultados terapêuticos satisfatórios não possuem aprovação pelo FDA. A empresa detentora do registro do cytotec® publicou no ano 2000 um comunicado as autoridades médicas da área de obstetrícia para recomendar o não uso de MSP em mulheres grávidas, pois o seu uso nestas pacientes estaria associado ao surgimento de severos eventos adversos. Inclusive, a bula do medicamento traz um alerta sobre usos off-label em mulheres grávidas e descreve a possibilidade ocorrência de parto prematuro, ruptura de útero e possibilidade de malformação em fetos que tiveram aborto incompleto (GOLDBERG, GREENBERG, DARNEY, 2001).

Partindo do mesmo ponto de vista, a Agência Nacional de Segurança de Medicamentos e de Produtos de Saúde (ANSM) emitiu alertas sobre os riscos ginecológicos do Cytotec® em 2005 e 2013. Autoridade Nacional Francesa para a Saúde, um órgão consultivo independente sobre regulamentação de saúde, emitiu recomendações em linhas semelhantes em 2008 e 2015. Tais discussões levaram a Pfizer, atual detentora do registro do cytotec®, a descontinuar a venda deste medicamento na França desde 2018 (CASASSUS, 2017).

No Brasil, o cytotec começou a ser comercializado em 1984 e ganhou espaço por esses usos off-label. O medicamento esteve presente em farmácias e drogarias até 1991, onde era comercializado sem restrições, quando começou a ser aviado somente com retenção de receita médica. Em 1998, com o lançamento da portaria 344, o MSP passa a integrar a lista C1 (outras substâncias sujeitas a controle especial) deste regulamento técnico e tem uso restrito a estabelecimentos hospitalares devidamente cadastrados e credenciados junto a autoridade sanitária competente (BRASIL, 1998; MENGUE, DAL PIZZOL, 2008). A tabela 1 traz um resumo sobre medicamentos de referência registrados pela ANVISA e FDA a base de MSP.

Em 2005 o cytotec não teve seu registro renovado, foi retirado do mercado no Brasil e sua comercialização passou a ser considerada crime hediondo, apesar de relatos de vendas de forma ilegal em sites clandestinos. De forma paralela, em 2001, o INFAN INDUSTRIA QUIMICA FARMACEUTICA NACIONAL S/A recebe da ANVISA a aprovação de registro de novo medicamento com nome comercial Prostokos® cujos usos recomendados são a indução do aborto, esvaziamento uterino por morte embrionária ou fetal e indução de trabalho de parto (BRASIL, 2021).

Tabela 1. Medicamentos referência a base de MSP com registros no Brasil e nos Estados Unidos da América.

Agência regulatória	Apresentação - dosagem	Indicações	Nome comercial
ANVISA	Comprimido vaginal - 25,100 e 200 mcg.	Interrupção da gravidez, em gestações a termo ou próximas ao termo e na indução de parto com feto morto antes das 30 semanas, em caso de aborto legal.	Prostokos®
FDA	Comprimido oral/100 e 200 mcg.	Redução do risco de úlceras gástricas induzidas por AINE em pacientes com alto risco de complicações de úlcera gástrica.	Cytotec®
FDA	Comprimido oral/ 200 mcg (associação com diclofenaco 50 e 75 mg de diclofenaco).	Tratamento de sinais e sintomas de osteoartrite ou artrite reumatóide em pacientes com alto risco de desenvolver úlceras gástricas e duodenais induzida por AINE.	Arthrotec®

Fonte: Adaptado de BRASIL, 2015.

Como pode ser observado na tabela 1 o Prostokos® é atualmente o único medicamento a base de MSP com registro válido no país, seus usos são estritos na obstetrícia e com via de administração vaginal indicada, diferentemente do cytotec® que apresentava via de administração oral. Entre os genéricos com aprovação pela FDA para o cytotec® temos apenas 1 (um) exemplar (NOVEL LABS INC) e para o Arthrotec® há 4 (quatro) medicamentos disponíveis (SANDOZ, ACTAVIS LABS FL INC, AMNEAL PHARMS e YUNG SHIN PHARM).

Apoiando os usos *off-label*, Goldberg et al. (2001), identificaram mais de 200 estudos envolvendo 16000 mulheres e traz em suas conclusões que o MSP é um dos medicamentos mais importantes na prática obstétrica. Além disso, como já citado anteriormente, a OMS e outras entidades importantes como a sociedade Canadense de Obstetras e Ginecologistas aprovam tais usos (LEDUC et al., 2013). No Brasil, o MSP está listado como medicamento do componente básico da assistência farmacêutica na Relação Nacional de Medicamentos Essenciais, nas dosagens de 25 e 200 mcg. Tendo estes usos recomendados no país, o Ministério da Saúde (MS) publicou protocolo clínico com indicações obstréticas, como é trazido no quadro 2 (BRASIL, 2012; BRASIL, 2020).

Quadro 2. Protocolo do Ministério da Saúde para uso do MSP.

Indicação	Idade gestacional	Posologia/Via de administração
Aborto legal ou óbito fetal	13 a 17 semanas	1 comprimido de 200mcg, via vaginal, cada 6 horas (4 doses).
Aborto legal ou óbito fetal	18 a 26 semanas	1 comprimido de 100mcg, via vaginal, a cada 6 horas (4 doses).
Esvaziamento uterino por óbito fetal	3º trimestre gestacional	1ª opção: 1 comprimido de 25 mcg, via vaginal, e repetir a dose, se necessário, após 6 horas.
	3º trimestre gestacional	2ª opção: 2 comprimidos de 25mcg, via vaginal, de 6/6 horas até 4 doses. Não usar mais de 50 mcg por vez.
Indução do parto com feto vivo	Gestação a termo ou pré-termo.	1 comprimido de 25mcg, via vaginal, a cada 6 horas. É recomendado utilizar as doses durante o dia (7, 13 e 19 horas). Se não houver resultado, repetir as doses no dia seguinte.
Amolecimento de colo uterino prévio a AMIU ou curetagem	N/A	2 comprimidos de 200mcg (400mcg), via vaginal, 3 a 4 horas antes do procedimento.

Fonte: Adaptado de BRASIL,2014.

Apesar de existir protocolos clínicos, inclusive de instituições como a OMS, na prática tem sido relatado a falta de padronização de uso do MSP em relação a dose a ser administrada, concentrações máximas, intervalos de administração, via de administração e até mesmo preparo do medicamento antes do uso. A ausência de comprimidos de baixa dosagem em alguns países contribui com o agravamento dos problemas de uso, pois tem levado alguns profissionais de saúde a buscar alternativas como a cisão de comprimidos, que têm aspecto notavelmente quebradiço, e preparo de soluções através da dissolução dos comprimidos, até mesmo, utilizando água de torneira. Estes desafios demonstram a necessidade de maiores esforços de autoridades sanitárias na discussão não apenas das questões legais de uso do MSP, mas também das recomendações de uso para os casos já resguardados (WEEKS, NAVARATNAM, ALFIREVIC, 2017).

2.2. ESTUDOS DE DEGRADAÇÃO FORÇADA

Os testes de degradação forçada ou teste de estresse são realizados essencialmente para o desenvolvimento de métodos indicativos de estabilidade, mas também para a obtenção de informações sobre rotas de degradação e produtos de degradação que podem ser formados durante o prazo de validade, para otimização de formulações, de embalagens e de etapas de produção onde o comportamento químico de moléculas possa ser utilizado para aprimoramento de medicamentos (REYNOLDS et al., 2002).

Na realização destes testes deve-se submeter o IFA, produto acabado e placebo a condições superiores aquelas na qual estariam submetidas nos testes de estabilidade acelerada. Assim, devem ser utilizadas condições de temperatura e umidade acima de $40^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}/75\%\text{UR}\pm 5\%\text{UR}$, respectivamente. Além disso, condições de oxidação, hidrólises com catálise ácida e básica e exposição a luminosidade, têm sido preconizadas (SINGH et al., 2013; BRASIL, 2015; BRASIL, 2019).

No Brasil, os estudos de degradação forçada têm sido requeridos e regulamentados pela RDC 53 de 2015 que trazem os parâmetros para a notificação, identificação e qualificação de produtos de degradação em medicamentos com substâncias ativas sintéticas e semissintéticas, classificados como novos, genéricos e similares e pelo guia número 4 de 2015, que tem como objetivo expor a opinião da ANISA e demonstrar o melhor entendimento para o cumprimento da RDC 53 de 2015 (BRASIL, 2015 a, BRASIL, 2015 b).

Desde que a Internacional Conference on Armonization (ICH), publicou o seu primeiro guia para degradação forçada em 1993, estes estudos passaram por uma ampla discussão no que se refere os objetivos dos testes, na montagem de protocolos e mais ainda para resolução de situações não prevista em guias oficiais (ICH, 1993; BLESSY et al., 2014).

Entre estas discussões está o percentual de degradação mais adequado a ser obtido nestas avaliações. A OMS em seu guia para realização dos testes de estresse recomenda que a degradação obtida nas condições experimentais esteja entre 10-30% em relação ao teor da amostra padrão. Blessy et al. (2014), publicou uma revisão da literatura que traz recomendações para realização de estudos de degradação forçada, desenvolvimento e validação de MIE, e considera que um percentual de degradação entre 10-20% parece ser mais adequado. Já a legislação brasileira determina que os testes devem levar a uma degradação do teor da amostra maior que 10% e inferior àquela que levaria a perda de 100% do sinal analítico do composto de interesse (OMS, 2009; BRASIL, 2015).

Embora possam ser encontradas pequenas variações no que se refere a estes percentuais, muitos autores têm recomendado uma degradação idealmente próxima a 10%, onde há maior segurança de não formação de produtos de degradação secundários. Pois, isso poderia

comprometer o entendimento do comportamento de decomposição dos diferentes fármacos, além de possibilitar interferências na qualidade final de um MIE, a exemplo da dificuldade na avaliação do balanço de massas (ROGE; 2013).

Algo importante para ser lembrado é que 10% de degradação será atingido em diferentes tempos de exposição, uma vez que o decaimento do teor está diretamente ligado a susceptibilidade de uma determinada molécula a uma dada condição de estresse. Nos casos onde o fármaco de interesse mostra-se altamente susceptível à condição de degradação, será necessário submeter as amostras por intervalos de tempo curtos e utilizar condições de estresse mais brandas (NGWA, 2010; RAVISANKAR, 2017).

Por outro lado, tem se admitido não ser obrigatório que a degradação forçada resulte em um produto de degradação. Para estes casos, faz-se necessário uma avaliação crítica para verificar se foi utilizado uma força de degradação superior à que estaria submetida a amostra nos estudos de estabilidade acelerada. Para isso, é essencialmente necessário que a elaboração do protocolo de estudo de degradação forçada e a determinação dos “*and points*” levem em consideração informações como as propriedades físico-químicas das moléculas analisadas, obtendo-se informações sobre grupos funcionais da molécula mais suscetíveis a degradação, além de produtos de degradação teoricamente possíveis, considerando as reações mais comuns dos grupos funcionais (GUPTA et al., 2003; OMS, 2009; SINGH et al., 2013).

Apesar de não haver um consenso, muitos autores e guias específicos consideram que a ausência total de produtos de degradação após 10 dias de uma exposição razoavelmente necessária a caracteriza como estável para uma dada condição (OMS, 2009; SINGH et al., 2014). Porém, alguns autores propõem a utilização de um período de exposição mais curto, como 5 dias. Para isso, trazem a recomendação de utilizar condições de armazenamento das amostras, ao decorrer do teste, diferentes das ambientais. Assim, condições de degradação ácida, básica e oxidativas estariam associadas a temperaturas de 60°C, como forma de acelerar o processo de degradação (BLESSY et al., 2014; RAWAT; PANDEY, 2015; IRAM et al., 2016; RAVISANKAR et al., 2017).

Já outros autores discutem que para algumas condições de estresse seria necessário um tempo de exposição superior a 10 dias. Neste caso, observa-se a degradação por calor seco, que carece de um período de 12 dias a 80°C para se obter uma quantidade total de energia calorífica equivalente a seis meses de exposição a 40°C (REYNOLDS et al., 2002). A tabela 2 traz as principais condições utilizadas nos estudos de degradação forçada e também os grupos químicos onde é mais provável de se observar estas reações.

Para as condições de estresse hidrolítico sob catálise ácida e básica, o ácido clorídrico (HCl) e o hidróxido de sódio (NaOH), respectivamente, têm bastante destaque para degradação da amostra na forma de solução ou suspensão. Alternativamente, o ácido sulfúrico e hidróxido de potássio também podem ser utilizados (BLESSY et al., 2013). Este tipo de exposição está associado a reações de hidrólise em ésteres e amidas, descarboxilação, hidroxilação, desidrogenação e dimerização (RAIJADA, 2010).

Concentrações molares destes agentes em uma faixa que varia entre 0,1 M e 1 M têm se mostrado alternativas mais racionais para condução dos testes, embora tenha sido observadas concentrações superiores que chegam até 5M. Estas variações podem ser justificadas pelas diferentes características da estabilidade intrínseca de cada composto (STOILJKOVIĆ et al., 2014; HASAN et al. 2016; HASIN, 2017).

A utilização de soluções de amostras de IFA e de produtos acabados parece ser uma abordagem usual na condução destes testes. Em casos onde as amostras se mostram estáveis após os períodos de exposição tem se recomendado utilizar o aquecimento, que têm variado de 50°C até temperaturas superiores a 85°C (BLESSY et al., 2013; HASSIB, 2017).

No entanto, pouco tem se discutido sobre a reatividade química ou estabilidade de fármacos no estado sólido. Raijada et al. (2010), realizou um estudo comparando a formação de produtos de degradação do clopidogrel em solução e seu estado sólido, onde autores puderam perceber que o perfil de degradação utilizando as duas abordagens foi distinto. Este tipo de avaliação tem sido discutido por outros autores (BYRN; XU; NEWMAN, 2001) e pode ser interessante, principalmente, quando se deseja investigar o perfil de decomposição de diferentes polimorfos de um mesmo sólido.

Dessa forma, o agente estressor também deve se apresentar na forma sólida para poder ser empregados na criação de microambientes com pH ácido e básico. O ácido oxálico, fumárico, cítrico, tartárico, ascórbico, benzoico poderiam ser utilizados na degradação ácida, assim como o bicarbonato de sódio, carbonato de sódio, fosfato de potássio, carbonato de cálcio, bicarbonato de potássio poderiam ser utilizados no estresse básico (ROWE; SHESKEY; OWEN, 2009; SINGH et al., 2013).

Nas reações de oxidação, o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) apresenta amplo destaque de uso frente a outros agentes oxidantes. A maioria dos estudos recomendam a utilização de soluções de H₂O₂ de até 3% em pH neutro mantidas em temperatura ambiente (SINGH et al., 2013). Porém não é difícil encontrar vários relatos na literatura de estudos que utilizam concentrações bem superiores as preconizadas, como por exemplo 20% e 30% (MALENOVIĆ et al., 2010; NAAZNEEN; SRIDEVI, 2017) ou o incremento de temperatura, como 80°C

(MOURAD et al., 2016). Segundo Sharma et al. (2017), o aquecimento de soluções de H_2O_2 promove a formação de radicais hidroxila o que levaria ao comprometimento das reações de oxidação que não poderiam ser avaliadas de forma eficiente.

Tabela 2. Principais condições usadas para estudos de degradação forçada.

Tipo de degradação	Condições experimentais	Condições de armazenamento	Amostragens	Compostos mais susceptíveis
Hidrólise	<ul style="list-style-type: none"> • 0,1- 1 M HCl e • 0,1-1 M NaOH 	<ul style="list-style-type: none"> • T.A ou • 40-60°C 	<ul style="list-style-type: none"> • 12 h; • 1 dia • 3 dias • 5 dias • 10 dias 	Ésteres; amidas; éteres; álcoois; alcenos.
Oxidação	<ul style="list-style-type: none"> • 1% - 3% H_2O_2 ou • AIBN 	<ul style="list-style-type: none"> • T.A. ou • 40-60°C 	<ul style="list-style-type: none"> • 12 h; • 1 dia • 3 dias • 5 dias • 10 dias 	Moléculas com H lábil; carbonos benzílicos; carbonos alílicos; aminas; sulfetos; fenóis.
Térmica	<ul style="list-style-type: none"> • Estufa • Câmara 	<ul style="list-style-type: none"> • 60-80°C • 60°C-80 /75% RH 	<ul style="list-style-type: none"> • 12 h; • 1 dia • 3 dias • 5 dias • 10 dias 	Moléculas com anéis beta lactâmicos; álcoois; ácidos carboxílicos;
Fotólise	<ul style="list-style-type: none"> • 1 x ICH • 2 x ICH • 3 x ICH 	<ul style="list-style-type: none"> • N/A 	<ul style="list-style-type: none"> • N/A 	Amidas; ésteres; ácidos carboxílicos; cetonas; alcenos; cloretos de fenila; sulfeto.

Fonte: Adaptado de Scypinski, 2001; Gupta et al., 2003; Ahuja; Rajjada, 2010; Mendez et al., 2008.

Além do H_2O_2 , iniciadores de radicais como o azobisisobutironitrila (AIBN) pode ser utilizada no estresse oxidativo. Esta substância tem como propriedade a capacidade de gerar diferentes tipos de radicais, entre eles o cianopropil, cianopropiloxil, peróxi e cianopropiloxila, que são responsáveis por promover a oxidação de compostos susceptíveis a este tipo de reação ZHANG; UANG, 2018; WEN et al, 2020).

Íons metálicos, como o Ferro III e Cobre II têm sido descritos como agentes oxidativos e figuram como uma avaliação obrigatória de acordo com a RDC 53 de 2015, apesar de terem sido pouco abordados na literatura. O guia 04 de 2015 descreve que a utilização de metais de transição nos testes de estresse não deve utilizar diferentes concentrações ou modificações na temperatura da amostra. O teste deve ser realizado e caso não haja degradação após 1 dia de exposição, o produto será considerado estável a esta condição (BRASIL, 2015 b).

De forma geral, reações de oxidação terão maior importância para moléculas com grupos funcionais com hidrogênio lábil, como o carbono benzílico, carbono alílico e carbono α em relação a heteroátomos são susceptíveis para formar hidroperóxidos, hidróxido ou cetona. Já os grupamentos amina, sulfetos e fenóis são suscetíveis à oxidação por transferência de elétrons para fornecer N-óxidos, hidroxilamina, sulfonas e sulfóxido (GUPTA et al., 2003; BOCCARDI, 2015).

A temperatura é um dos fatores mais importantes que podem afetar a estabilidade de um medicamento e para este tipo de estresse, grande parte dos autores recomendam a utilização de calor seco, ou seja, sem a associação com a umidade, para medicamentos e fármacos que se apresentam na forma líquida e calor úmido, ou seja, associado a umidade para aqueles no estado sólido. Nos casos de amostras no seu estado líquido, deve-se tomar cuidado para não evaporar seu solvente e modificar a sua concentração (BLESSY et al., 2014; SHARMA et al., 2017).

Normalmente, utiliza-se temperaturas superiores a 40°C e pode-se aumentá-las em uma gradação de 10°C, até que se atinja uma temperatura suficientemente alta para levar à degradação. Outras abordagens recomendam a utilização inicial de altas temperaturas por curtos períodos de exposição. Para que possa ter um controle mais efetivo da quantidade de calor aplicada na amostra, tem se recomendado a aplicação da equação de Arrhenius, que correlaciona a taxa de reação específica (k), o fator de frequência (A), a energia de ativação (A), a constante do gás (R = 1,987 cal / grau mol) e a temperatura absoluta (T) (BANKER, RHODES, 2002; RAGNO et al., 2006), como segue:

$$k = A e^{-\frac{Ea}{RT}}$$

O teste de fotoestabilidade é descrito pelo guia do ICH Q1B e deve ser utilizado para avaliar se a exposição a luz não promove mudanças na qualidade, segurança e eficácia de produtos farmacêuticos. Este teste é realizado em câmaras específicas que permitem a emissão controlada de padrões de luz semelhante ao padrão de emissão da luz solar (BAERTSCHI; ALSANTE; TONNESEN, 2010).

Atualmente, duas abordagens distintas têm sido utilizadas da sua realização e estão diretamente ligadas ao modelo de câmara que utilizam. Na primeira opção, descrita como opção 1 do guia Q1B, utilizam-se lâmpadas com padrão de emissão D65/ID65, para simular a luz visível e ultravioleta ao mesmo tempo, ou seja, o teste é realizado em um único compartimento da câmara. D65 é o padrão reconhecido para luz do dia em ambientes externos e ID65 representa o padrão de luz do dia para ambientes internos. Na segunda opção, a câmara é dividida em dois

compartimentos onde em cada um deles é gerado, separadamente, os padrões de emissão de luz D65 e ID65 (ICH, 1998).

As diretrizes da ICH recomendam uma exposição total não inferior a 200 W/hm^2 na faixa de UV (320-400nm) e 1,2 milhões lux/h na faixa visível (400-800nm). Além disso, se recomenda a utilização concomitante de controles, que são preparados a partir da utilização da mesma amostra submetida ao teste, porém protegida contra a luz. Esta abordagem é recomendada para verificar a influência da temperatura gerada na parte interna da câmara nos resultados obtidos (ICH, 1996; BAERTSCHI, 2010).

Os testes de degradação forçada utilizando exposição a luz têm utilizado padrões de emissão que variam de 6 vezes os valores preconizados pelo ICH até os mesmos valores utilizados no teste de fotoestabilidade. Diferenças de exposição podem ser necessárias devido a fatores como presença de grupos funcionais susceptíveis a este tipo de estresse ou pelo estado físico da amostra utilizada. A exposição a luz está associada a diferentes tipos de mecanismos de degradação que envolvem foto-oxidação por mecanismos que envolvem a formação de radicais livres, principalmente em moléculas que possuem em suas estruturas grupos carbonílicos, nitro-aromáticos, N-óxidos, alcenos, cloretos de arila, ligações fracas C-H e O-H, sulfetos e polienos (AHUJA; SCYPINSKI, 2001; SINGH et al., 2013).

2.3. AVALIAÇÃO DOS RESULTADOS OBTIDOS NOS TESTES DE DEGRADAÇÃO FORÇADA

Uma vez que as amostras de degradação forçada são preparadas, deve-se realizar as análises, de forma individual, para detecção dos produtos de degradação gerados sob todas as condições de estresse. A cromatografia líquida tem se mostrado a principal técnica de análise deste tipo de amostra, com destaque para cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e cromatografia líquida de ultra eficiência (UPLC), uma vez que todas estas abordagens permitem separar e quantificar, de forma bem-sucedida, diferentes componentes de uma mesma amostra mesmo quando estão presentes em baixas concentrações (BAKSHI; SINGH, 2002; SHARMA et al., 2017).

Neste tipo de análise, espera-se a separação de todos os produtos de degradação do fármaco e idealmente uma separação entre os diferentes PDs, demonstrando a seletividade da metodologia que deve ser indicativa de estabilidade. A presença de sobreposição de sinais cromatográficos, ou seja, de co-eluição, é uma característica que não se espera de um MIE e

pode ser avaliada a partir da pureza de pico, parâmetro analítico obtido em diferentes tipos de sistemas de detecção cromatográfica (BAKSHI; SINGH, 2002).

Entre os sistemas de detecção mais populares está o PDA, que deriva do inglês “*photodiode array detectors*” e pode ser traduzido como “arranjo de fotodiodos”. Normalmente este tipo de análise verifica a similaridade do espectro de absorção em regiões da base e do pico do cromatograma. Se esta comparação não trouxer correspondência, então o cromatograma não é homogêneo e pressupõe-se que esteja ocorrendo co-eluição. No entanto, existem situações que a análise de pureza de picos através do PDA pode estar comprometida, principalmente nos casos onde os picos co-eluídos apresentam o mesmo espectro de absorção no UV ou nos casos em que o pico de co-eluição não tem grupo funcional cromóforo. Nestes casos, para uma investigação mais aprofundada, técnicas como a cromatografia acoplada ao detector de massas podem ser utilizada (GROVER; GULATI; SINGH, 1998; ERMER; VOGEL, 2000).

Além da pureza cromatográfica, o balanço de massas tem ganhado um destaque muito importante e tem se mostrado um requisito obrigatório para comprovar a seletividade e a capacidade de um MIE em quantificar todos os produtos de degradação, embora não esteja presente em todas as publicações científicas e nem seja alcançável em todas as circunstâncias (JAIN; BASNIWAL, 2013; HONG; PHOEBE; JONES, 2017).

A falta de balanço de massa leva a uma suspeita sobre a capacidade do método para quantificar com precisão todos os produtos de degradação. O desequilíbrio de massa, além de respostas analíticas variáveis do analito e picos de produto de degradação, também pode acontecer devido à perda potencial de produtos de degradação voláteis ou pela formação de precipitados, formação de compostos não cromóforos, formação de eluentes iniciais e retenção de compostos na coluna (SHARMA et al., 2017).

2.4. IDENTIFICAÇÃO E QUALIFICAÇÃO DE PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO

A RDC 53 de 2015 determina que a empresa detentora do registro de um medicamento carece notificar, identificar ou qualificar os produtos de degradação para obtenção ou renovação de registro (BRASIL, 2015). Estes limites foram publicados de acordo com as especificações trazidas pelo ICH Q3B R2 (2006), que funciona como guia para avaliação de impurezas em produtos acabados, e levam em consideração não somente a concentração de produtos de degradação encontrados nos estudos de estabilidade formais, mas também a dose diária administrada, descrita na RDC como administração total diária (ATD). O quadro 3 aborda estes diferentes limites.

A identificação de produtos de degradação deve ser realizada sempre que as concentrações observadas estiverem acima daquelas para qual se exige a notificação e nem sempre é uma avaliação simples de ser realizada, principalmente quando não existem relatos na literatura. No entanto, a informação trazida a partir do conhecimento destas estruturas é extremamente importante para o aprimoramento dos limites e podem contribuir para o conhecimento de possíveis alertas estruturais de genotoxicidade (ALI et al, 2012; BLESSY et al., 2014).

Para isso, a utilização de uma ou mais técnicas de caracterização estrutural pode ser demandada para obtenção de resultados consistentes. Entre elas, a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS) ou à ressonância magnética nuclear (LC-RMN) são uma das mais utilizadas. A análise de espectros de massas tem possibilitado a obtenção de pesos moleculares, perfil isotópico, massa exata, fórmulas químicas, além do comportamento de fragmentação molecular, ferramenta muito empregada na elucidação estrutural. Já os dados de RMN de hidrogênio e carbono, são essenciais para localização de ligações simples, duplas e triplas, na avaliação de isômeros e epímeros (PELLECCHIA et al., 2008, RAKIBE, et al. 2018). Nas situações onde não estão disponíveis instrumentos mais sofisticados, como os sistemas LC-RMN, o isolamento dos produtos de degradação utilizando sistemas preparativos e semipreparativos mostram-se uma alternativa viável (KÖHLER; WRAY; WINTERHALTER, 2008).

Quadro 3. Limites de notificação, identificação e qualificação do (s) produtos (s) de degradação no decorrer do estudo de estabilidade. **Legenda:** ATD= Administração total diária de um determinado produto de degradação.

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

Fonte: Adaptado de Brasil, 2015.

Apesar não permitir a obtenção de informações no mesmo grau de detalhamento dos sistemas LC-MS e LC-RMN, a CLAE-DAD pode fornecer dados valiosos para identificação de diferentes compostos. Nas situações onde a degradação não leva a mudanças extremas na estrutura do IFA é fácil comparar semelhanças estruturais entre a molécula de origem e seus degradados. Esta afirmação parte do pressuposto de que se o espectro de UV-VÍS de um produto de degradação é idêntico ao do IFA, é provável que aquele tenha os mesmos, ou pelo menos preserve algum dos grupos cromóforos da molécula de origem. Da mesma forma, podemos inferir que, se pelo contrário do exposto, o produto de degradação apresentar um espectro de UV-VÍS diferente do IFA, isto implicaria em dizer que aquela molécula sofreu mudanças estruturais inclusive na porção dos grupos cromóforos (GÖRÖG, et al 1995; QIU; NORWOOD, 2013).

Além disso, nos casos onde há produtos de degradação comercialmente disponíveis, é possível fazer a comparação espectral entre os cromatogramas obtidos nas amostras de degradação forçada com aqueles obtidos através da análise de padrões analíticos. Existe ainda situações onde os produtos de degradação gerados são na verdade são impurezas já relatadas em compêndios oficiais ou na literatura e esta comparação serve de confirmação para este tipo de investigação. Somado a tudo isso, a obtenção de resultados, o custo por amostra, a disponibilidade de equipamentos e a facilidade na interpretação dos achados fazem da CLAE-DAD um importante aliado na caracterização de produtos de degradação (SINGH, et al, 2012; QIU; NORWOOD, 2013).

Outras tecnologias analíticas vêm sendo continuamente desenvolvidas e aprimoradas e também podem ser usadas quando for apropriado para caracterização destas moléculas. Entre estas técnicas pode-se citar a cromatografia em camada delgada (CCD), cromatografia gasosa (CG), eletroforese capilar, eletrocromatografia capilar (CEC), fluído supercrítico (FS) e infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) (QIU; NORWOOD, 2013; PANDEY et al., 2016).

Já a qualificação dos produtos de degradação deve ser realizada sempre que as concentrações observadas estiverem acima daquelas para qual se exige a identificação. Este tipo de investigação tem como principal objetivo caracterizar uma substância quanto a seu perfil de segurança para também garantir a segurança de uso de um medicamento que contenha um produto de degradação qualificável. Dentro das perspectivas da RDC 53 de 2015, os produtos de degradação podem ser qualificados a partir da investigação de metabólitos, de revisão bibliográfica ou a partir de estudos de toxicidade (BRASIL, 2015).

Nas situações em que produtos de degradação são igualmente metabólitos do fármaco ou estas impurezas já eram conhecidas durante as fases de desenvolvimento de um medicamento eles serão considerados qualificados. Assim, o nível de qualquer impureza presente em um medicamento que foi adequadamente avaliado quanto a segurança em estudos clínicos não necessitaria passar por novas avaliações de segurança. O problema com esta abordagem é que a qualificação estabelece a segurança biológica de uma substância ou medicamento com um determinado perfil de impureza, que não é o mesmo que caracteriza o perfil de segurança de uma impureza isoladamente. Logo, quando a toxicidade é observada, geralmente não é possível discriminar entre a toxicidade atribuível ao insumo farmacêutico ativo e a toxicidade atribuível às impurezas presentes no medicamento (HARVEY et al., 2017; EMA, 2018).

Além disso, nas situações onde haja mudanças na rota de síntese de um fármaco que resulte na mudança do perfil de impurezas; mudanças na formulação que gerem novos produtos de degradação; ou em mudanças na indicação ou regime de dose que possam afetar significativamente a segurança do medicamento, testes de segurança adicionais devem ser considerados (ICH, 2014; BRASIL, 2015).

Dentro deste contexto, o guia ICH M7 foi publicado em 2014 e tem como objetivo principal fornecer informações para avaliação de mutagenicidade de impurezas presentes em novos medicamentos. Estes estudos buscam avaliar substâncias com potencial para causar danos no DNA podendo levar a mudanças do material genético e possível câncer (ICH, 2014).

O teste preconizado para este tipo de investigação é o Ensaio da Mutação Reversa Microbiana, mais conhecido como teste de AMES. O teste utiliza a bactéria *Salmonella typhimurium* TA98 e TA100 que apresentam mutações que as impedem de produzir aminoácidos, como a histidina, provocam perda parcial da capacidade de barreira promovida pelo lipopolissacarídeo, o que aumenta a permeabilidade à moléculas de grande peso molecular, além da perda da capacidade de excisão de DNA no sistema de reparo. Todas estas mudanças acabam amentando muito a possibilidade do surgimento de mutações por exposição de diferentes agentes mesmo em baixas dosagens (MARON; AMES, 1983).

De forma complementar ao teste de AMES, os estudos *in silico* têm se mostrado importantes ferramentas na identificação de compostos mutagênicos. Este tipo de avaliação toma como base a publicação de Ashby e Tennant (1991) que é considerado o primeiro estudo que faz uma correlação entre estruturas químicas com a capacidade de gerar mutações de diferentes compostos. Os autores fizeram essa avaliação baseada em informações mecanísticas disponíveis para carcinógenos de roedores conhecidos e que também são positivos no teste de

AMES e estes critérios serviriam de base na montagem dos métodos *in silico* preditivos de mutagenicidade, quem vêm sendo continuamente aprimorados (TLUCZKIEWICZ et al., 2011).

Estas análises computacionais se baseiam na verificação de alertas estruturais presentes nas moléculas que podem estar correlacionados a uma reação química específica com o DNA, levando a possíveis mutações. No entanto, nem todos os produtos químicos com esses alertas e pertencentes a uma dessas classes químicas reagem com o DNA, uma vez que outros fatores como sua ativação por enzimas e o impedimento estérico na interação com o DNA pode desempenhar papel determinante no surgimento de mutações. Por isso, muitas vezes estudos complementares, como os de carcinogênese “*in vivo*”, podem ser requeridos (SUTTER et al., 2013).

Tendo em vista todas as questões éticas envolvidas no uso de animais em pesquisa, as agências regulatórias têm recomendado que nos casos onde haja necessidade de qualificação de produtos de degradação que se dê preferência as revisões bibliográficas na prospecção de dados relevantes, que se leve em consideração a via, a frequência e duração da exposição e sempre que necessário, que sejam feitas avaliações “*in silico*” com a finalidade de investigar as propriedades farmacológicas e toxicológicas destes produtos (KROES et al., 2004; MYATT et al., 2018).

No Brasil, ainda não existe nenhuma regulamentação específica que trate da qualificação de impurezas. No entanto, a ANVISA publicou em 2019 um documento de perguntas e respostas que trata do fluxo de análise de qualificação de impurezas e produtos de degradação de medicamentos classificados como sintéticos e semissintético. Este documento também traz recomendações bem alinhadas com o guia para qualificação de impurezas da agência de medicamentos europeia: “*Reflection paper on the qualification of non-genotoxic impurities*”. Ambos documentos recomendam que nos casos onde não for possível dispensar os testes *in vivo* para qualificação de produtos de degradação levem em consideração o “princípio dos 3 R’s”, que a via de administração, a dose máxima utilizada, o tempo do estudo e a espécie animal mais sensível sejam levados em consideração (EMA, 2018; BRASIL, 2019).

2.4.1. Espectrometria de massas

A espectrometria de massas engloba um conjunto de técnicas cujo funcionamento se baseia na formação de íons positivamente ou negativamente carregados que podem ser isolados com base em sua relação massa/carga (m/z) (BANOUB et al, 2005). O princípio desta técnica foi descrito no final da década de 1880 de forma pioneira por Wil Helm Wien. Ele foi o primeiro

a demonstrar que os campos elétricos ou magnéticos podem desviar a trajetória de íons carregados.

Embasados nesta descoberta, Joseph John Thomson inventou a primeira instrumentação de espectrometria de massa e, em 1913, ilustrou o valor de sua nova descoberta no campo da química analítica. De lá, até os dias de hoje a espectrometria de massas tem ganhado espaço em todos os ramos das ciências, inclusive nas áreas correlacionadas com a saúde (ASTON, 1942; DE HOFFMANN; STROOBANT, 2007).

A modernização da técnica fez com que os espectrômetros de massas quase nunca sejam utilizados isoladamente e têm sido extensivamente acoplados com a cromatografia gasosa e líquida. A hifenação com os sistemas cromatográficos substituiu as injeções diretas, que ainda tem seu uso resguardado principalmente no desenvolvimento de métodos (LANÇAS, 2009). No entanto, independentemente do método pelo qual a amostra é introduzida no equipamento, a fonte de íons é o primeiro compartimento que permite a formação de espécies iônicas carregadas (MUNSON; FIELD, 1966).

Uma das primeiras fontes de ionização, ainda bastante utilizada quando acoplada a cromatografia gasosa, é a de impacto de elétrons. Nessas fontes um filamento metálico aquecido serve como fonte de elétrons que são acelerados e direcionados para uma colisão com a amostra vaporizada. Este impacto causa a remoção de elétrons das camadas de valência dos analitos presentes na amostra e a consequente formação de cátions (EL-ANEED; COHEN; BANOUB, 2009).

Entretanto, ao se tratar do acoplamento de cromatógrafos líquidos, a fonte de ionização que melhor se estabeleceu foi a Electrospray (ESI, “Electrospray Ionization”), graças a sua robustez e maior sensibilidade quando comparada àquelas de impacto de elétrons. Este tipo de fonte ao mesmo tempo que ioniza os analitos, facilita a transformação da amostra que sai da coluna no estado líquido para sua forma gasosa através da combinação dos processos de formação de um aerossol, dessolvatação e aplicação de uma voltagem capilar (CAI; SHORT; SYAGE, 2008).

Após passar pela fonte do espectrômetro de massas, os íons gerados poderão ser separados com base em sua m/z no (s) analisador (res) de massas. Normalmente, este filtro e separação é possível graças a aplicação de campos elétricos ou magnéticos que permitem a alteração da trajetória destes íons, que ao final são registrados nos detectores. Assim como as fontes, os analisadores de massas podem apresentar diferentes princípios para o seu funcionamento (PAŠA-TOLIĆ et al., 2004).

Entre aqueles mais usuais podemos citar os quadrupolos, *ion trap*, ressonância de ciclotrona de íons com transformação de Fourier e por tempo de voo. Esses analisadores variam em termos de tamanho, preço, resolução, faixa de massa e capacidade de realizar experimentos de espectrometria de massa em tandem, ou seja, a fragmentação da massa dos analitos. Além disso é bem comum a combinação de dois desses analisadores, onde o primeiro atua como filtro e o segundo como analisador (NAKAMURA et al., 1997; STOBIECKI, 2000; SLENO, 2012).

Entre as inúmeras aplicações da técnica, a identificação de compostos é uma que tem sido extensivamente explorada (SCHYMANSKI et al., 2014). No entanto, para que isso seja possível é de grande importância que os espectros de massas obtidos permitam a distinção de analitos, mesmo quando forem compostos isobáricos com composição elementar distinta. Para tanto, podemos contar com a espectrometria de massas de alta resolução (XIAN; HENDRICKSON; MARSHALL, 2012).

Os analisadores de massas por tempo de voo podem ser classificados como equipamentos de alta resolução, cujo princípio de análise baseia-se na separação de íons pela diferença de velocidade que desenvolvem no “tempo de voo” dentro do equipamento. Via de regra, íons de menor massa são acelerados com maior velocidade que aqueles de maior massa e isso é utilizado para determinação de sua m/z (STAFFORD et al., 1984; DJIDJA, 2010).

Como vantagens destes tipos de equipamentos podemos citar a possibilidade de varredura em uma ampla faixa de massas, alta velocidade de aquisição dos espectros, alta precisão das massas obtidas, alta resolução e sensibilidade de moderada a alta. Além disso, a capacidade de medição da massa exata dos compostos, permite com que os softwares de processamento de dados sugiram ou confirmem a fórmula molecular de um dado composto (ARREBOLA-LIÉBANAS; ROMERO-GONZÁLEZ; FRENICH, 2017; DE VIJLDER, 2018).

2.5. ESTUDOS DE ESTABILIDADE DO MISOPROSTOL

A construção da revisão de literatura foi realizada através de pesquisas nas bases de dados: Science Direct, Scopus, SciELO e PubMed, em busca de artigos publicados no período de 2000 a 2023. O termo “misoprostol” foi fixado e combinado com “degradation”, “impurity”, “stability”, “stress testing”, e “forced degradation”. O operador booleano “AND” foi utilizado para limitar os artigos encontrados aos que continham todos os termos pesquisados concomitantemente.

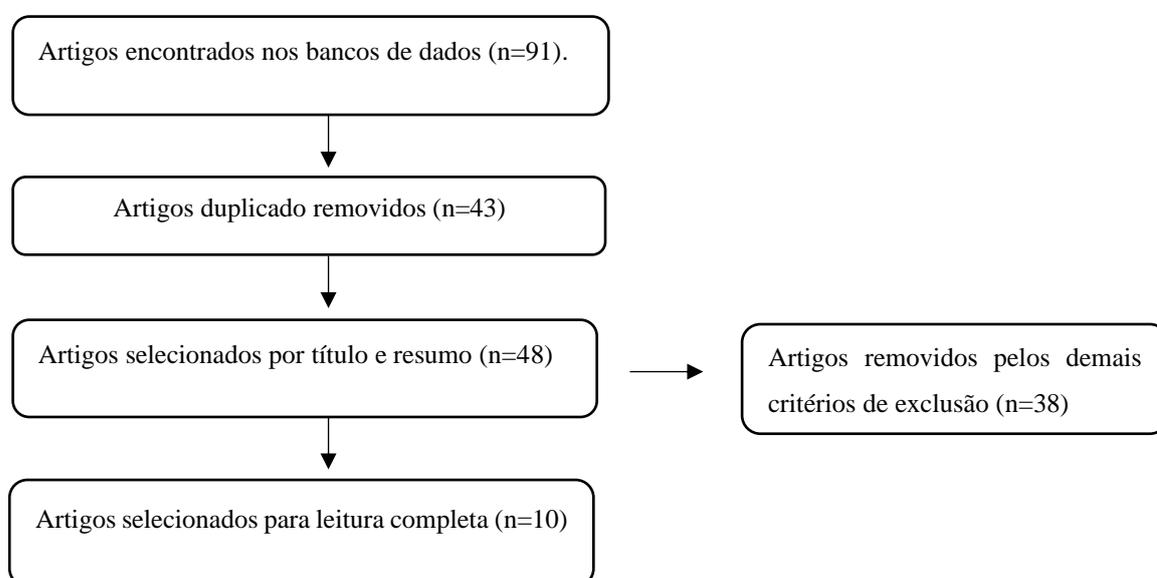
Em seguida foi realizada uma leitura exploratória de títulos e resumos, desta forma, os estudos em potencial foram selecionados através de critérios de inclusão e exclusão. Foram

consideradas elegíveis as publicações que tratavam de estudos de degradação forçada, avaliação de estabilidade, métodos analíticos, investigação de produtos de degradação e impurezas. Foram incluídos apenas artigos em inglês ou português. Primeiramente foram excluídos artigos repetidos, e posteriormente aqueles que não estavam disponíveis na íntegra, bem como cartas, capítulo de livro e comentários.

Após a leitura dos títulos e resumos, foram selecionados os artigos que preencheram os critérios de inclusão propostos para essa revisão de literatura e foram excluídos artigos que se enquadravam nos demais critérios de exclusão, tais com tratavam de indução de trabalho de parto, tratamento de hemorragia pós-parto, métodos para doseamento no sangue ou plasma, estudos de farmacocinética ou eficácia clínica.e outros assuntos não relacionados aos critérios de inclusão revisões bibliográficas sobre

Na próxima etapa, as publicações selecionadas foram lidas e analisadas na íntegra e extraídas as seguintes informações: ano da publicação; condições para degradação forçada, técnica utilizada, aplicação da metodologia, identificação de produtos de degradação. A busca nas bases de dados resultou em um total de 91 artigos, dos quais 43 se repetiram, restando 48 artigos. Após a leitura dos títulos e resumos, foram excluídos 26 artigos por não apresentarem correlação com o objetivo da pesquisa, 1 capítulo de livro, 6 artigos por tratarem de métodos de quantificação em sangue e plasma e 5 artigos por estarem parcialmente disponíveis. Desta forma, 10 artigos foram selecionados para leitura na íntegra, como ilustrado da figura 4.

Figura 4. Esquema da seleção de artigos.



Fonte: O autor.

Dos 10 artigos selecionados 3 (três) trouxeram propostas de métodos indicativos de estabilidade; 1 (um) tratou do desenvolvimento de metodologia amperométrica e colorimétrica para doseamento de MSP em comprimidos; 3 (três) trataram de avaliação de estabilidade em comprimidos Cytotec®; 1 propôs o desenvolvimento de uma nova forma farmacêutica (supositório) e avaliação de estabilidade; 1 abordou o preparo de solução extemporânea a partir de comprimidos para administração intraumbilical; e 1 (um) trouxe uma proposta de estabilização do misoprostol com metacrilato para incremento de estabilidade. O quadro 4 um resumo dos dados extraídos dos artigos selecionados.

Quadro 4. Quadro sinótico utilizado para sintetizar os dados obtidos dos artigos selecionados para revisão.

Técnica	Objetivos	Condições cromatográficas	Degradação Forçada	Achados	Autor
CLAE-UV	Estabilização do MSP em sistema de liberação.	<ul style="list-style-type: none"> • Coluna: COSMOSIL C18-AR, 150×4.6 mm. • Fase móvel: ACN/tampão fosfato pH 2,81 (40/60). • Fluxo: 1 mL/min. • Detecção: 210 nm. 	Temperatura: 37°C e 43 °C por 6 meses (teste de estabilidade).	Incremento de estabilidade proporcionado pelo sistema em metacrilato.	Chen et al., 2000.
CLAE-UV	Estabilidade de MSP em supositórios	<ul style="list-style-type: none"> • Coluna: nucleosil C18, 25 x 4,6 mm, 5 µm. • Fase móvel: ACH/H₂O (60/40). • Fluxo: 1,5 ml/min. Detecção: 202 nm.	Temperatura: 60° C (teste de estabilidade).	Supositórios foram estáveis por 180 dias em temperatura de 3-5°C. O aumento de temperatura incrementou a taxa de decaimento do teor.	Hafirassou et al., 2005
CLAE-MS	Estabilidade do MSP em infusão.	<ul style="list-style-type: none"> • Coluna: Suplex PKB 250 x 2.1 mm, 5 µm. Fase móvel: MeOH/ACN/H ₂ O/ácido trifluoracético (50:15:35:0.05).	Temperatura ambiente por 6 dias (teste de estabilidade).	A recuperação do MSP foi de 50%, que manteve-se estável em solução salina e em água a temperatura ambiente e a 4°C.	Chu et al., 2007.
CLAE-UV	MIE	<ul style="list-style-type: none"> • Coluna: C18, 250 x 4.6 mm, 5 µm • Fase móvel: ACN/H₂O/MeOH (45:55:1 v/v/v). • Fluxo: 1 mL/min. Detecção em 200 nm.	<ul style="list-style-type: none"> • Ácida: HCl 0,1 e 1 M por 2 h. • Básica: NaOH 0,001 e 0,01 M por 2 h. • Oxidação: H₂O₂ 0,24 e 2,4% por 2 h. • Temperatura: 105° por 6 h. • UV por 20 h. 	Formação de 3 produtos de degradação nas condições de hidrólise, oxidação e aquecimento. Sem discussão de balanço de massas ou identificação.	Carr et al., 2012

Fonte: o autor.

Quadro 4. Quadro sinótico utilizado para sintetizar os dados obtidos dos artigos selecionados para revisão.

Técnica	Objetivos	Condições cromatográficas	Degradação Forçada	Achados	Autor
CLAE-UV	Avaliação da qualidade de comprimidos fora do blister	Monografia da farmacopeia europeia: <ul style="list-style-type: none"> • Fase móvel: H₂O/ACN (48/52 v/v). • Fluxo: 1 mL/min. • Detecção: 200 nm. 	Não avaliada.	Comprimidos apresentaram decaimento acima de 5% após 48 h e incremento de impurezas farmacopeicas.	Berard et al., 2014
CLAE-UV	MIE	<ul style="list-style-type: none"> • Coluna: Ascentis Express C18, 150 mm x 4.6 mm, 5 µm. • Fase móvel: Fase móvel A (ACN/H₂O/MeOH 28:69:3 v/v/v) e B (ACN-H₂O-MeOH 47:50:3 v/v/v). • Fluxo: 1,5 mL/min. • Detecção: 200 nm. 	<ul style="list-style-type: none"> • Ácida: HCl 0.025 M por 1 h. • Básica: NaOH 0.005 M por 1 h. • Oxidação: H₂O₂ 30% por 1 h. • Temperatura: Solução a 70°C por 1 h. 	Formação de 17 produtos de degradação nas condições de hidrólise, oxidação e aquecimento. Nenhuma discussão de balanço de massas e identificação.	Kahsay et al., 2015.
CLAE-UV	MIE	<ul style="list-style-type: none"> • Luna C18, 250 x 4.6 mm, 5µ. • Fase móvel: ACN/Tampão trietilamina 0,01 M pH 2.5 (30:70 v/v). • Fluxo de 1 mL/min. • Detecção em 226 nm. 	<ul style="list-style-type: none"> • Ácida: 5 M a 70° C por 10 min. • Básica: 5 M a 70° C por 10 min. • Oxidação: H₂O₂ 3% a 70° C por 10 min. • Térmica: solução a 70°C por 20 min. • UV: solução a luz do sol por 3 h. 	Formação de produtos de degradação do misoprostol ou aceclofenaco sem distinção de ambos fármacos. Nenhuma discussão de balanço de massas e identificação.	Pravallika; Jagadeesh; Ravi, 2016.

Fonte: o autor.

Quadro 4. Quadro sinótico utilizado para sintetizar os dados obtidos dos artigos selecionados para revisão.

Técnica	Objetivos	Condições cromatográficas	Degradação Forçada	Achados	Autor
Método enzimático x CLAE	Desenvolvimento de método enzimático para doseamento do MSP.	<ul style="list-style-type: none"> • Coluna: Waters Spherisorb S5 C8 4,6 × 150 mm, 5 µm. • Fase móvel: MeOH/H₂O/ACN (40;35:25 v/v/v). • Fluxo de 1 mL/min. • Detecção em 200 nm. 	Calor úmido: 37°C/75% umidade	Foi observada degradação, porém não há discussão de seletividade, balanço de massas ou identificação.	Wu et al, 2016.
CLAE-UV	Estudo de estabilidade. Importância da embalagem primária.	<ul style="list-style-type: none"> • Coluna: ReproSil-XR 120 C18, 150 x 4,6 mm, 5 µm. • Fase móvel: ACN/H₂O (45:55). • Fluxo 1,5 mL. • Detecção: 200 nm. 	Não avaliada.	Algumas das amostras de comprimido continham apenas 42,5 - 48,7% da quantidade declarada.	Bizimana et al, 2020.
CLAE-UV	Avaliação da qualidade de comprimidos distribuídos no sistema de saúde.	<ul style="list-style-type: none"> • Coluna: ReproSil-XR 120 C18, 150 x 4,6 mm, 5 µm. • Fase móvel: Fase A (ACN/H₂O/MeOH 28:69:3) e fase B (ACN/H₂O/MeOH 47:50:3). • Fluxo 1,5 mL. • Detecção: 200 nm. • 	Não avaliada.	A 40°C / 75% UR todas as amostras analisadas apresentaram diminuição do teor de MSP. Danos ao envelhecimento da embalagem primária diminuiram muito a estabilidade, resultando em um conteúdo final de apenas 48,2% do declarado.	Hagen et al, 2020.

Fonte: o autor.

Carr et al. (2012) ao desenvolver um MIE observaram que o MSP apresentou rápido decaimento nas condições de hidrólise ácida (HCl 1 M) e básica (NaOH 0,1 M) e em estresse oxidativo (H₂O₂ 2,4%), sendo evidenciado a formação de 3 (três) PDs. O aquecimento das amostras a temperatura de 105°C por 6 horas gerou um decaimento de apenas 4,7 % do teor e a luz UV não levou ao decaimento das áreas das amostras expostas. O método desenvolvido foi validado, o MSP apresentou tempo de retenção de 22 minutos e o tempo total de análise foi de 80 minutos. A resolução entre os picos do MSP e do 8-epi-MSP foi de 1,4 na melhor condição obtida. Os autores não trazem nenhum tipo de discussão sobre avaliação de balanço de massas ou qual ferramenta foi utilizada para avaliar a coeluição de picos, apenas descrevem que todos os picos observados ficaram adequadamente resolvidos.

Kahsay et al. (2015) relataram a presença de 17 PDs, entre eles o MSP A e B e o 8-epi-MSP, que foram identificados por padrão de absorção no espectro de UV-VIS. Para degradação térmica, os autores utilizaram soluções de 5mg/mL de MSP aquecidas a 70°C e na oxidação soluções de peróxido de hidrogênio 30%. As reações com ácido ou base 0,1 M levaram à degradação completa do ativo. O MSP apresentou tempo de retenção de 22 minutos e o tempo total de análise foi de 35 minutos, porém o fluxo de fase móvel utilizado foi de 1,5 mL/min. Apesar de ter sido descrito a presença de produtos de degradação inéditos, para a ocasião, nenhuma avaliação complementar foi realizada para identificação destes compostos e nenhuma avaliação de balanço de massas foi realizada.

Pravallika et al. (2016) propuseram um novo MIE e para isso utilizaram amostras de MSP na presença de NaOH 5 M, HCl 5 M e peróxido de hidrogênio 3% com aquecimento a 70°C em todas as condições. A fotodegradação foi realizada utilizando luz solar. As mesmas condições foram utilizadas para o aceclofenaco. O MSP teve tempo de retenção de 3,81 minutos e o tempo total de corrida foi de 5 minutos. Os autores não deixam claro os resultados obtidos para cada um dos fármacos e os cromatogramas apresentados não trazem a identificação dos PDs. O trabalho é concluído com a informação de que os PDs gerados não interferiram na quantificação dos analitos de interesse.

Estudos realizados por Hagen et al (2020) demonstraram que todos os lotes de comprimidos testados por eles apresentaram redução do teor de MSP e um destes apresentou redução de teor superior a variação permitida pelas especificações das farmacopeias americana e europeia. Além disso, ficou evidente que pequenos danos e o próprio envelhecimento do material de embalagem primária aumentaram a redução do teor de MSP. Temperaturas e umidades superiores a 25 °C e 60%, respectivamente, também estiveram associadas com uma maior taxa de degradação do MSP e modificação do perfil de dissolução dos comprimidos

testados. Berard et al (2014), realizaram estudo para avaliar a qualidade de comprimidos de MSP fora do seu material de embalagem e foi observado que em 48 horas, os comprimidos expostos a condições ambiente demonstraram aumento de peso (+ 4,5%), do conteúdo de água (+ 80%) e redução de 25,1% do teor em comparação aos controles. Tais achados demonstram a influência negativa da umidade inclusive no produto acabado.

De forma semelhante, Anyakora et al (2018) ao analisar a qualidade de comprimidos de MSP utilizados na Nigéria, demonstraram que cerca de 33% das amostras analisadas não atenderam as especificações do teste de doseamento. As amostras que apresentaram os melhores resultados em relação ao teor haviam sido importadas da Korea do Sul e Reino Unido e os piores resultados foram daqueles produzidos na própria Nigéria e na Índia, o que mostrou que as técnicas produtivas e os processos de produção podem influenciar diretamente a estabilidade do MSP. Bizimana et al (2021) através de resultados obtidos em estudo no Malawi recomendou à Organização Mundial da Saúde (OMS) o *recall* de comprimidos de MSP por apresentarem desvios de qualidade extremos, onde foi evidenciado valores que variaram entre 12,7–30,2% do teor declarado, o que compromete de forma significativa a eficácia clínica de seus usos.

A OMS publicou em 2016 recomendações para as agências regulatórias referente a avaliação da qualidade de produtos à base de MSP comercializados no mundo. Neste estudo, diferentes tipos de materiais de embalagem primária foram testados a fim de determinar os mais adequados para serem utilizados. O estudo teve duração de um ano e os comprimidos foram armazenadas a 30° C. Nas amostras cujo material de embalagem primária utilizado foi o plástico/alumínio, todos os resultados se mostraram fora das especificações recomendadas para o teste de teor. Já quando o material utilizado foi o alumínio/alumínio, 28% das amostras analisadas mostraram resultados fora das especificações, demonstrando ser um tipo de material de embalagem mais adequado. Como recomendações finais trazidas no documento, OMS sugere evitar a utilização de blísteres de PVC (cloreto de polivinila) ou PVCD (cloreto de polivinilideno) /alumínio, tendo em vista maiores probabilidades de aumento de umidade no interior da embalagem. Além disso, traz um alerta sobre a necessidade de controle das condições ambientais das áreas produtivas, bem como a necessidade de estudos de pré-formulação para determinação dos excipientes mais adequados (OMS, 2016).

2.6. ESTUDOS DE PERMEAÇÃO *IN VITRO*

Guias oficiais como a farmacopeia dos Estados Unidos definem que os teste de desempenho para medicamentos de uso tópico, incluindo a administração vaginal, devem ser focados nos estudos de liberação *in vitro*. Embora as recomendações da USP indiquem o uso de membranas sintéticas e inertes nos estudos de liberação, a utilização de membranas biológicas nos estudos de permeação tem se mostrado de grande relevância, pois estes tecidos podem nos aproximar das condições *in vivo* e podem fornecer informações sobre a biodisponibilidade de fármacos (MACHADO et al., 2015; ENGGI et al., 2022).

Uma das formas mais usuais para avaliação da liberação e permeação de fármacos é a utilização de células de difusão. Este tipo de aparato tem demonstrado uma boa empregabilidade, pois traz como características resultados reprodutíveis, possibilidade de automação e tempo de análise otimizado (SQUIER et al., 1997; MACHADO et al., 2015). Entre os modelos de células de difusão mais empregas, as células de Franz têm grande destaque (LEAL et al.; 2017).

Estas células são constituídas de um compartimento doador, onde normalmente se aplica a amostra, e um compartimento receptor, onde são realizadas as amostragens para quantificação do analito em investigação. Nos estudos de permeação, o espaço compreendido entre estes dois compartimentos é ocupado pela biomembrana de interesse (KUMAR, 1993; GÓMEZ-SEGURA et al., 2020).

Quando do uso da célula de difusão vertical, o produto a ser testado é colocado na parte superior da membrana, sob a condição de oclusão ou não. Já o compartimento receptor é preenchido normalmente com um tampão associado ou não a tensoativos (a depender das características físico-química dos fármacos) que busca mimetizar o pH fisiológico e que além disso garante a capacidade de solubilização do analito, mantendo uma condição de não-saturação, ou seja, uma condição *sink*. Envolto ao compartimento receptor, há circulação de água aquecida usualmente a 37°C, que também tem o objetivo de mimetizar as condições fisiológicas de temperatura corporal (SILVA et al., 2010; RAVANI et al, 2013; MACHADO et al., 2015).

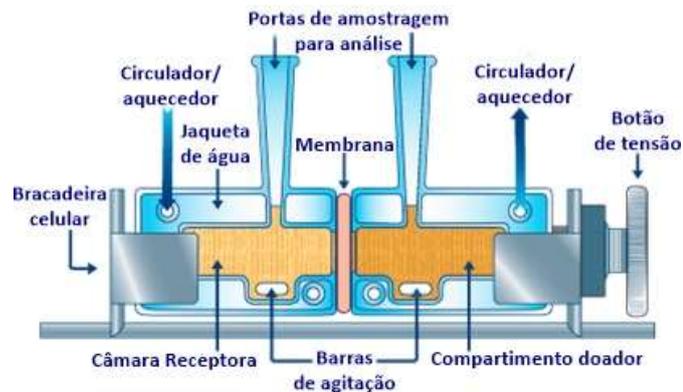
Ainda no compartimento receptor, uma barra magnética garante que a amostra passará por constante homogeneização e evita o acúmulo do analito próxima a área de passagem da membrana. A amostragem neste compartimento pode ser realizada de forma manual ou automatizada e normalmente há reposição de conteúdo com líquido de mesma constituição (EL-KATTAN et al., 2000; SIMON et al., 2016).

Já as células de difusão horizontais (figura 5) utilizada neste trabalho, também chamadas de células lateral-bi-lateral ou *side-bi-side*, apesar de preservar os princípios básicos de

constituição e funcionamento dos sistemas verticais de Franz, apresentam algumas diferenças pontuais. A mais evidente das mudanças entre os dois sistemas é orientação da passagem do fluxo, pois como o próprio nome sugere, o fluxo se dá entre dois compartimentos que se posicionam de forma horizontal de um em relação ao outro (TRBOJEVICH, 2016; GIESZINGER et al., 2021).

A segunda diferença mais marcante é a necessidade de dois compartimentos de dimensões idênticas que permitam o seu adequado preenchimento. Neste caso, ambos os compartimentos devem ser mantidos sob constante agitação com auxílio de pequenas barras magnéticas. As demais características como uso de manutenção de condições *Sink*, acesso para coleta, uso de membranas ou biomembrana, controle de temperatura, entre outras, funcionam de forma análoga (TRBOJEVICH, 2016; EL-KATTAN et al., 2000).

Figura 5. Representação esquemática de uma célula de difusão side-bi-side.



Fonte: adaptado de <https://permegear.com/side-bi-side-cells/>.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste trabalho é avaliar o perfil de estabilidade do misoprostol, caracterizar seus produtos de degradação e investigar sua permeação vaginal *in vitro*.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar estudo de degradação forçada do insumo farmacêutico ativo (IFA) MSP;
- Realizar estudo de degradação forçada do produto acabado (comprimidos MSP 200 mcg) bem como de seu placebo;
- Desenvolver método indicativo de estabilidade para quantificação do MSP IFA e produto acabado por CLAE-DAD;
- Validar método indicativo de estabilidade para quantificação de MSP IFA e produto acabado por CLAE-DAD;
- Investigar as cinéticas de degradação forçada para o MSP;
- Desenvolver método LC-MS/MS (Q-TOF) para o MSP;
- Elucidar a estrutura dos produtos de degradação com o auxílio de análise por LC-MS/MS-QTOF;
- Propor mecanismos de reação para formação dos produtos de degradação;
- Realizar estudo de permeação *in vitro* em mucosa vaginal suína.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. SUBSTÂNCIAS E REAGENTES QUÍMICOS

O IFA MSP 1% (lote: 0000090619) e os comprimidos Prostokos (lote:2009042) foram doados pela Indústria farmacêutica Hebron e as substâncias químicas de referência do MSP (lote: R091B0) MSP tipo A (lote: C03D9501), MSP tipo B (lote: C03E9501), 8-epi-MSP (lote: C03F9501) e 12-epi-MSP (lote: IM00079501) foram adquiridos da farmacopeia americana (USP). A água ultrapura foi obtida pelo sistema de purificação de água da Elga Purelab Ultra da Elga Labwater (Lane End, Reino Unido). Dados dos demais reagentes utilizados são trazidos na tabela 3.

Tabela 3. Lista de solventes e reagentes utilizados.

Solvente/reagente	Fornecedor	Lote
Ácido clorídrico	Sigma-Aldrich	8TBH8811
Ácido fosfórico	Química moderna	9038
Fosfato de potássio monobásico anidro	Neon	38047
Hidróxido de sódio	Neon	49173
Isopropanol	Riedel-de-Haen	DS423-BR
Metanol grau HPLC	Supelco	11069907 004
Peróxido de hidrogênio	Alphatec	24192
Sulfato de cobre	Química moderna	7111
TuneMix®	Agilente	Lc13956

Fonte: o autor.

4.2. EQUIPAMENTOS

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

Tabela 4. Lista de equipamentos utilizados.

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

Fonte: o autor.

4.3. DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO INDICATIVO DE ESTABILIDADE (MIE)

O desenvolvimento do MIE tomou como base a monografia trazido na farmacopeia americana para dispersão de MSP no teste de quantificação de impurezas orgânicas (USP, 2019), como descrito na tabela 5.

Tabela 5. Condições cromatográficas da farmacopeia americana para quantificação de impurezas orgânicas na dispersão de MSP.

Condição cromatográfica	Descrição
Coluna	4,6 x 15 mm; 5 µm L7
Fase móvel (A)	Tampão fosfato (73%)
Fase móvel (B)	Isopropanol (27%)
Fluxo	1,5 mL/min
Volume de injeção	100 µL
Detecção UV	205 nm

Fonte: o autor.

As amostras providas dos estudos de degradação forçada e amostra padrão de MSP fortificada com o padrão de suas impurezas foram analisadas por CLAE-DAD e os dados tratados pelo software Shimadzu LC solutions 1.0®. Como fase estacionária, foram testadas as colunas Kinetex C18 de 150 x 2.1 (Phenomenex, Torrance, USA), Kinetex fenil-hexil de 50 x 4.6 (Phenomenex, Torrance, USA), Purospher® Star C8 de 150 x 4,6mm, 5 µm (Merck,

Darmstadt, Alemanha) e Luna C8 de 30 x 2.0 mm. Para o sistema de eluição, foram testadas diferentes combinações de solventes como metanol, acetonitrila, isopropanol e água. O fluxo de fase móvel foi testado em 1 e 1,5 mL/min em diferentes modos de eluição e o volume de injeção foi fixado em 50 µL. Já para o forno foi utilizada a temperatura de 50°C. Foi considerado como resultado mais adequado aqueles que apresentaram o menor tempo de análise e pureza de pico.

4.3.1. Preparo de fase móvel

Para o preparo do tampão foram pesados 1,36 g de fosfato de potássio monobásico que foi dissolvido em 1 (um) litro de água (1,36 g/L). Em seguida, o pH da solução foi ajustado para 3 ± 1 com ácido fosfórico.

4.4. ESTUDO DE DEGRADAÇÃO FORÇADA

Os estudos de degradação forçadas foram realizadas seguindo as recomendações da Resolução-RDC nº 53, de 4, de dezembro de 2015, onde o insumo farmacêutico ativo MSP (dispersão 1%), produto acabado (Prostokos® 200mcg) e seu placebo foram expostos a condições forçadas de degradação por aquecimento, umidade, solução ácida, solução básica, solução oxidante, exposição fotolítica e íons metálicos. O tempo de exposição, bem como a concentração ou magnitude do agente degradante foram adotadas para que se atinja uma redução na área do pico principal de pelo menos 10%, idealmente sem ocorrer geração de produtos de degradação secundários. Nos casos em que no final do tempo de exposição não houve decaimento significativo a amostra em questão foi considerada não suscetível a esse tipo de degradação.

4.4.1. Degradação forçada do insumo farmacêutico ativo e comprimido (PROSTOKOS® 200mcg)

4.4.1.1. Preparo da amostra padrão

Para o preparo da amostra padrão de dispersão de MSP pesou-se, em triplicata, 100 mg de dispersão, e em seguida foi adicionado 2,5 mL de isopropanol. Em um banho de gelo, a amostra foi agitada por 10 minutos e em seguida adicionou-se 7,5 mL de água resfriada. A

amostra foi retirada do banho de gelo e agitada em vórtex. Em seguida, sonicou-se por 5 minutos até completa dissolução da dispersão. Por fim, foi transferida para um vial e analisada de acordo com a descrição da metodologia analítica.

(Concentração do MSP na amostra = 100 µg/mL)

Para o preparo da amostra padrão de comprimidos foram pesados individualmente 20 unidades cujos pesos foram anotados para o cálculo do peso médio. Posteriormente, os comprimidos foram triturados para obtenção de uma mistura de pós que foi utilizada no preparo das amostras de degradação forçada. Pesou-se, em triplicata, quantidade de pó referente ao peso médio, que foi transferida para balão de 10 mL e em seguida foi adicionado 7,5 mL de água. A amostra foi agitada e sonicada por 30 minutos. Em seguida, completou-se o volume com 2,5 mL de isopropanol e agitou-se em vórtex. Por fim, a amostra foi filtrada em membrana 0,45 µm (Millex®) e transferida para um vial e analisada de acordo com a descrição da metodologia analítica.

(Concentração do MSP na amostra = 20 µg/mL)

Concentrações superiores a 20 µg/mL foram testadas durante o preparo de amostra, porém devido à baixa relação quantitativa fármaco/excipiente dos comprimidos (aproximadamente 0,02% de fármaco), não foi possível solubilizá-la, impossibilitando a utilização nas demais etapas do estudo de degradação forçada.

4.4.1.2. Degradação básica

Para que fosse possível a realização do teste de degradação forçada, foi necessário realizar algumas alterações na descrição da metodologia descrita anteriormente, como segue:

Foram pesados 100 mg de dispersão em triplicata e em seguida adicionou-se 7,5 mL da solução degradativa de hidróxido de sódio 5 mM. A amostra foi agitada em vórtex e em seguida sonicada por 5 minutos, até completa dissolução da dispersão e houve um repouso de 5 minutos em temperatura ambiente. Posteriormente, em banho de gelo, fez-se a adição de 2,5 mL de isopropanol. Fez-se a homogeneização em vórtex e transferência da amostra para vial para posterior análise como descrito em metodologia analítica.

Para a amostra de comprimidos, pesou-se, em triplicata, quantidade de pó referente ao peso médio, que foi transferida para balão de 10 mL e em seguida foi adicionado 7,5 mL de

hidróxido de sódio 5 mM. A amostra foi agitada e sonicada por 30 minutos. Em seguida, completou-se o volume com 2,5 mL de isopropanol e agitou-se em vórtex. Retirou-se uma alíquota das amostras nos tempos de exposição de 5 h e 18 h que estavam em temperatura ambiente. Antes da análise, a amostra foi filtrada em membrana 0,45 µm (Millex®) e transferida para um vial e analisada de acordo com a descrição da metodologia analítica.

4.4.1.3. Degradação ácida

Foram pesados 100 mg de dispersão em triplicata e em seguida adicionou-se 7,5 mL da solução degradativa de ácido clorídrico 0,2 M. A amostra foi agitada em vórtex e em seguida sonicada por 5 minutos e permaneceu nessas condições por 8 horas em temperatura ambiente. Posteriormente, em banho de gelo, fez-se a adição de 2,5 mL de isopropanol. Fez-se a homogeneização em vórtex e transferência da amostra para vial para posterior análise como descrito em metodologia analítica.

Pesou-se, em triplicata, quantidade de pó referente ao peso médio dos comprimidos, que foi transferida para balão de 10 mL e em seguida foi adicionado 7,5 mL de ácido clorídrico 0,2 M. A amostra foi agitada em e sonicada por 30 minutos. Em seguida, completou-se o volume com 2,5 mL de isopropanol e agitou-se. Retirou-se uma alíquota das amostras nos tempos de exposição de 5 h e 24 h que estavam em temperatura ambiente. Antes da análise, a amostra foi filtrada em membrana 0,45 µm (Millex®) e transferida para um vial e analisada de acordo com a descrição da metodologia analítica.

Para a amostra de comprimidos pesou-se, em triplicata, quantidade de pó referente ao peso médio, que foi transferida para balão de 10 mL e em seguida foi adicionado 7,5 mL de ácido clorídrico 0,2 M. A amostra foi agitada em e sonicada por 30 minutos. Em seguida, completou-se o volume com 2,5 mL de isopropanol e agitou-se. Retirou-se uma alíquota das amostras nos tempos de exposição de 5 h e 24 h que estavam em temperatura ambiente. Antes da análise, a amostra foi filtrada em membrana 0,45 µm (Millex®) e transferida para um vial e analisada de acordo com a descrição da metodologia analítica.

4.4.1.4. Degradação térmica seca (aquecimento)

Foram pesados 200 mg de dispersão em triplicata e dispostos em uma fina camada em placa de Petri. Posteriormente, as amostras foram levadas à estufa com temperatura controlada a 90°C, onde permaneceram por 7 dias. Após decorrido esse tempo, as placas foram retiradas

da estufa, resfriadas até temperatura ambiente e posteriormente pesou-se 100 mg de dispersão de cada uma das placas. Foi adicionado 2,5 mL de isopropanol e em banho de gelo a amostra foi agitada por 10 minutos para posterior adição de 7,5 mL de água resfriada. A amostra foi retirada do banho de gelo e agitada em vórtex. Em seguida, sonicou-se por 5 minutos até completa dissolução da dispersão. Por fim, foi transferida para um vial e analisada de acordo com a descrição da metodologia analítica.

Em placa de Petri, foi distribuído homogeneamente um quantitativo de pó equivalente ao cálculo de peso médio com um excesso de 200mg (necessários para compensar possíveis perdas). Posteriormente, as amostras foram levadas à estufa com temperatura controlada a 90°C, onde permaneceram por 7 dias. Após decorrido esse tempo, as placas foram retiradas da estufa, resfriadas até temperatura ambiente e posteriormente pesou-se quantidade de pó referente ao peso médio dos comprimidos, que foi transferida para balão de 10 mL e em seguida foi adicionado 7,5 mL de água. A amostra foi agitada e sonicada por 30 minutos. Em seguida, completou-se o volume com 2,5 mL de isopropanol e agitou-se. Antes da análise, a amostra foi filtrada em membrana 0,45 µm (Millex®) e transferida para um vial e analisada de acordo com a descrição da metodologia analítica.

4.4.1.5. Degradação térmica úmida (umidade)

Foram pesados 200 mg de dispersão MSP em triplicata e dispostos em uma fina camada em placa de Petri. Posteriormente, as amostras foram levadas à câmara de estabilidade com temperatura e umidade controladas a 40°C ± 2°C / 75% UR ± 5% UR, respectivamente, onde permaneceram por 7 dias. Após decorrido esse tempo, as placas foram retiradas da estufa, resfriadas até temperatura ambiente e posteriormente pesou-se 100 mg de dispersão de cada uma das placas. Foi adicionado 2,5 mL de isopropanol e em banho de gelo a amostra foi agitada por 10 minutos para posterior adição de 7,5 mL de água. A amostra foi retirada do banho de gelo e agitada em vórtex. Em seguida, sonicou-se por 5 minutos até completa dissolução da dispersão. Por fim, foi transferida para um vial e analisada de acordo com a descrição da metodologia analítica.

Em placa de Petri, foi distribuído homogeneamente um quantitativo de pó equivalente ao cálculo de peso médio com um excesso de 200mg (necessários para compensar possíveis perdas). Posteriormente, as amostras foram levadas à câmara de estabilidade com temperatura e umidade controladas a 40°C ± 2°C / 75% UR ± 5% UR, respectivamente, onde permaneceram por 10 dias. Após decorrido esse tempo, as placas foram retiradas da estufa, resfriadas até

temperatura ambiente e posteriormente pesou-se quantidade de pó referente ao peso médio dos comprimidos, que foi transferida para balão de 10 mL e em seguida foi adicionado 7,5 mL de água. A amostra foi agitada em vórtex e sonicada por 30 minutos. Em seguida, completou-se o volume com 2,5 mL de isopropanol e agitou-se em vórtex.

Antes da análise, a amostra foi filtrada em membrana 0,45 μm (Millex®) e transferida para um vial e analisada de acordo com a descrição da metodologia analítica.

4.4.1.6. Degradação oxidante (peróxido de hidrogênio)

Foram pesados 100 mg de dispersão MSP em triplicata e em seguida adicionou-se 7,5 mL da solução de peróxido de hidrogênio 3%. A amostra foi agitada em vórtex e em seguida sonicada com 5 minutos, até completa dissolução da dispersão. A amostra ficou em contato com a solução degradativa por período de 5 e 10 dias em temperatura ambiente. Posteriormente, em banho de gelo, fez-se a adição de 2,5 mL de isopropanol. Fez-se a homogeneização em vórtex e transferência da amostra para vial para posterior análise como descrito em metodologia analítica.

Pesou-se, em triplicata, quantidade de pó referente ao peso médio dos comprimidos, que foi transferida para balão de 10 mL e em seguida foi adicionado 7,5 mL de peróxido de hidrogênio 3%. A amostra foi agitada e sonicada por 30 minutos. Em seguida, completou-se o volume com 2,5 mL de isopropanol e agitou-se. Retirou-se uma alíquota das amostras no tempo de exposição de 7 dias em temperatura ambiente. Antes da análise, a amostra foi filtrada em membrana 0,45 μm (Millex®) e transferida para um vial e analisada de acordo com a descrição da metodologia analítica.

4.4.1.7. Degradação sob influência de íons metálicos (sulfato de cobre)

Foram pesados 100 mg de dispersão em triplicata e em seguida adicionou-se 7,5 mL da solução de sulfato de cobre 0,25 M. A amostra foi agitada em vórtex e em seguida sonicada com 5 minutos, até completa dissolução da dispersão. A amostra ficou em contato com a solução degradativa por 1 dia em temperatura ambiente. Posteriormente, em banho de gelo, fez-se a adição de 2,5 mL de isopropanol. Fez-se a homogeneização em vórtex e transferência da amostra para vial para posterior análise como descrito em metodologia analítica.

Pesou-se, em triplicata, quantidade de pó referente ao peso médio dos comprimidos, que foi transferida para balão de 10 mL e em seguida foi adicionado 7,5 mL de sulfato de cobre

0,25 M. A amostra foi agitada e sonicada por 30 minutos. Em seguida, completou-se o volume com 2,5 mL de isopropanol e agitou-se. Retirou-se uma alíquota das amostras no tempo de exposição de 24 h que estavam em temperatura ambiente. Antes da análise, a amostra foi filtrada em membrana 0,45 μm (Millex®) e transferida para um vial e analisada de acordo com a descrição da metodologia analítica.

4.4.1.8. Degradação fotolítica

As amostras de fotodegradação foram preparadas de acordo com a opção 2 do guia Q1B do ICH (ICH, 1996).

Foram pesados 200 mg de dispersão em triplicata e dispostos em uma fina camada em placa de Petri. Posteriormente, as amostras foram levadas à câmara de fotoestabilidade seguindo a distribuição em dois grupos de amostras:

- Grupo 1 (luz visível): triplicata das amostras dispostas no compartimento do padrão de emissão de luz fluorescente branca fria, projetado para produzir uma emissão semelhante à especificada na ISO 10977 (1993).
- Grupo 2 (luz ultravioleta): triplicata das amostras dispostas no compartimento do padrão de emissão de luz fluorescente de UV próximo, com uma distribuição espectral de 320 nm a 400 nm com uma emissão de energia máxima entre 350 nm e 370 nm.

As amostras foram expostas a iluminação não inferior a 1,2 milhões de horas de lux e uma energia ultravioleta próxima integrada de não menos do que 200 watt-hora/metro quadrado. O mesmo procedimento foi realizado no preparo das amostras controle, que tiveram a placa de Petri envolvida com papel alumínio para impedir a exposição à luz.

Em placa de Petri, foi distribuído homogeneamente um quantitativo de pó equivalente ao cálculo de peso médio com um excesso de 200mg (necessários para compensar possíveis perdas). Posteriormente, as amostras foram levadas à câmara de fotoestabilidade de acordo com o descrito para degradação fotolítica para o IFA.

Após exposição, as placas foram retiradas câmara, resfriadas até temperatura ambiente e posteriormente pesou-se quantidade de pó referente ao peso médio dos comprimidos, que foi transferida para balão de 10 mL e em seguida foi adicionado 7,5 mL de água. A amostra foi agitada e sonicada por 30 minutos. Em seguida, completou-se o volume com 2,5 mL de isopropanol e agitou-se. Antes da análise, a amostra foi filtrada em membrana 0,45 μm

(Millex®) e transferida para um vial e analisada de acordo com a descrição da metodologia analítica.

O mesmo procedimento foi realizado no preparo das amostras controle, que tiveram a placa de Petri envolvida com papel alumínio para impedir a exposição à luz.

4.4.2. Degradação forçada do placebo

O placebo do medicamento Prostokos® foi submetido às seguintes condições de degradação forçada:

- Hidrólise ácida;
- Hidrólise alcalina;
- Temperatura;
- Umidade;
- Oxidação Peróxido de Hidrogênio;
- Íons metálicos sulfato de cobre;
- Fotodegradação;

O preparo das amostras de placebo, concentração do agente degradante e temperatura do teste seguiram metodologia descrita para “Degradação forçada dos comprimidos (PROSTOKOS® 200mcg)” no item 4.5.2. O tempo de exposição máximo das amostras do placebo as condições forçadas de degradação foi de 10 dias, tempo suficiente para avaliar a susceptibilidade da amostra nas diferentes condições de degradação (BHASKAR, R., OLA, M., AGNIHOTRI, et al., 2020), exceto para fotodegradação onde a amostra as condições descritas no item 6.3.1.7. (Degradação fotolítica) e para a amostra de íons metálicos que ficou exposta por 24 horas.

Os picos presentes no cromatograma do placebo e presentes no cromatograma do produto foram desconsiderados, exceto em eventuais situações onde fossem observados picos no mesmo tempo de retenção no cromatograma do IFA e que fossem mais que 20% maiores no cromatograma do produto, seguindo as recomendações do GUIA nº 4, versão 1, de 04 de dezembro de 2015.

4.5. AVALIAÇÃO DE BALANÇO DE MASSAS

A avaliação do balanço de massas será realizada através da soma das áreas dos picos cromatográficos referentes aos produtos de degradação com a área remanescente referente ao sinal analítico do MSP, sendo a análise percentual feita com base nas áreas do MSP na amostra de solução padrão, de acordo com a equação a seguir:

A avaliação do balanço de massas será realizada através da soma das áreas dos picos cromatográficos referentes aos produtos de degradação com a área remanescente referente ao sinal analítico do MSP, sendo a análise percentual feita com base nas áreas do MSP na amostra de solução padrão, de acordo com a equação a seguir:

$$\%BM = (\text{Área}_{\text{MSP degradado}} + \text{áreas}_{\text{PDS}} / \text{Área}_{\text{MSP antes do estresse}}) * 100$$

4.6. ESTUDO DE CINÉTICA DE DEGRADAÇÃO

As cinéticas de degradação forçada no MSP IFA foram realizadas apenas para as condições ácida e básica, por possuírem decaimento rápido e pelo fato de o método analítico apresentado ter tempo de análise longo. No estudo, foram utilizados os agentes degradantes nas concentrações de 0,2M e 0,1 M para o HCl; 5mM e 2,5mM para o NaOH; assim como também foi variada a concentração do ativo entre 100 µg e 200 µg.

As coletas da amostra na degradação básica foram realizadas nos tempos de 5, 20, 35, 50 e 65 minutos e de 5, 20, 60, 120, 180, 240 e 300 minutos para a degradação ácida. Estes tempos foram ajustados a fim de se obter pelo menos 10% de degradação em todas as condições avaliadas. As amostras foram preparadas de acordo com os procedimentos descritos nos itens 4.4.1.2 e 4.4.1.3.

Os gráficos de regressão linear foram plotados levando-se em consideração a concentração no tempo para a ordem zero; o logaritmo neperiano da concentração no tempo para a primeira ordem e de 1/concentração no tempo para a segunda ordem. O valor do coeficiente de correlação foi calculado e o melhor modelo de predição foi aquele que apresentou este coeficiente com valor mais próximo de 1 (um). A partir dos dados obtidos, foram calculados a constante de velocidade de degradação (k), seguindo as fórmulas trazidas no quadro 5, e os parâmetros cinéticos de meia-vida de degradação (T1/2) e meia vida-útil (T90%) foram realizados baseados nas fórmulas trazidas no quadro 6 (SINKO, 2008).

Quadro 5. Expressões matemáticas que definem as ordens de reação.

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

Fonte: Adaptado de SINKO, 2008.

Quadro 6. Expressões matemáticas que definem os parâmetros cinéticos das reações.

Ordem de reação	T_{1/2}	T_{90%}
Ordem zero	$C_0/2k$	$(0,1 \times C_0) / k$
Primeira ordem	$0,693/k$	$0,105 / k$
Segunda ordem	$1 / C_0 \times k$	$1 / (9k \times C_0)$

Fonte: Adaptado de SINKO, 2008.

4.7. VALIDAÇÃO DO MÉTODO INDICATIVO DE ESTABILIDADE PARA O IFA MSP

4.7.1. Preparo de soluções

4.7.1.1. Preparo da solução diluente

A solução diluente consiste em uma mistura composta de água ultrapurificada e isopropanol na proporção 75:25 v/v. Com o auxílio de uma proveta de 500 mL, transferiu-se 375 mL de água para um balão volumétrico de 500 mL e o volume foi completado com isopropanol, seguido de homogeneização.

4.7.1.2. Preparo da solução padrão

Pesou-se em balança analítica 10,11 mg do padrão primário MSP e transferiu-se para tubo de vidro. Em seguida, foram adicionados 10 mL de solução diluente. Por fim, agitou-se levemente.

(Concentração do MSP na amostra = 1 mg/mL)

4.7.1.3. Preparo da solução de HPMC

Pesou-se 100,0 mg da matéria-prima HPMC e em seguida foram adicionados 2,5 mL de isopropanol. Em um banho de gelo, agitou-se por 10 minutos e adicionou-se 7,5 mL de água ultrapurificada resfriada. Após isso a mistura foi retirada do banho de gelo, e agitada em vórtex, em seguida foi transferida para banho de ultrassom por 5 minutos até completa dissolução do HPMC. Filtrou-se para um vial usando filtro Millex HN (nylon), 0,45 µm x 13,00 mm de diâmetro.

4.7.1.4. Preparo da solução da Dispersão de MSP 1% em HPMC

Pesou-se 100,0 mg de MSP Dispersão 1% e em seguida foram adicionados 2,5 mL de isopropanol. Em um banho de gelo, agitou-se por 10 minutos e adicionou-se 7,5 mL de água ultrapurificada resfriada. Após isso a mistura foi retirada do banho de gelo e agitada em vórtex e em seguida foi transferida para banho de ultrassom por 5 minutos até completa dissolução do HPMC. Filtrou-se para um vial usando filtro Millex HN (nylon), 0,45 µm x 13,00 mm de diâmetro.

(Concentração do MSP = 0,10mg/mL)

4.7.1.5. Preparo de amostra branco em solução degradativa de hidróxido de sódio

Pesou-se 100 mg de HPMC, foram adicionados 7,5 mL da solução degradativa de hidróxido de sódio 5 mM. Agitou-se em vórtex e em seguida foi levada ao banho de ultrassom por 5 minutos, até completa dissolução. Em banho de gelo, adicionou-se 2,5 mL de isopropanol, homogeneizou-se em vórtex e em seguida foram filtradas e transferidas para vial.

4.7.1.6. Preparo de amostra branco em solução degradativa de ácido clorídrico

Pesou-se 100 mg de HPMC, foram adicionados 7,5 mL da solução degradativa de ácido clorídrico 0,2 M. Agitou-se em vórtex e em seguida foi levada ao banho de ultrassom por 5 minutos, até completa dissolução. Em banho de gelo, adicionou-se 2,5 mL de isopropanol, homogeneizou-se em vórtex e em seguida foram filtradas e transferidas para vial.

4.7.1.7. Preparo de amostra branco em solução degradativa de peróxido de hidrogênio

Pesou-se 100mg de HPMC, foram adicionados 7,5 mL da solução degradativa de peróxido de hidrogênio 3%. Agitou-se em vórtex e em seguida foi levada ao banho de ultrassom por 5 minutos, até completa dissolução. Em banho de gelo, adicionou-se 2,5 mL de isopropanol, homogeneizou-se em vórtex e em seguida foram filtradas e transferidas para vial.

4.7.1.8. Preparo de amostra branco em solução degradativa de íons metálicos

Pesou-se 100 mg de HPMC, foram adicionados 7,5 mL da solução degradativa de sulfato de cobre 0,25 M. Agitou-se em vórtex e em seguida foi levada ao banho de ultrassom por 5 minutos, até completa dissolução. Em banho de gelo, adicionou-se 2,5 mL de isopropanol, homogeneizou-se em vórtex e em seguida foram filtradas e transferidas para vial.

4.7.2. Execução dos testes de validação para o insumo farmacêutico ativo

4.7.2.1. Seletividade

Este parâmetro foi avaliado por meio da análise das seguintes amostras, preparadas conforme descrito nos subitens da seção 4.3.

- Solução SQR MSP;
- Solução MSP 1% dispersão em HPMC;
- Solução SQR MSP tipo A;
- Solução SQR MSP tipo B;
- Solução SQR MSP tipo 8-EPI;
- Solução SQR MSP tipo 12-EPI;
- Fase móvel;
- Solução HPMC;
- Branco em solução degradativa de hidróxido de sódio;
- Branco em solução degradativa de ácido clorídrico;

- Branco em solução degradativa de peróxido de hidrogênio;
- Branco em solução degradativa íons metálicos;

4.7.2.1.1. Avaliação dos resultados

Os resultados obtidos foram avaliados quanto ao aparecimento de picos cromatográficos no tempo de retenção do MSP, bem como através da avaliação da pureza do pico do MSP. O critério utilizado foi a ausência de pico no tempo de retenção do MSP e pureza pico acima de 0,99 calculada pelo programa de aquisição e processamento de dados LabSolution® (Shimadzu®).

4.7.2.2. Linearidade

A avaliação deste parâmetro foi realizada por meio da análise de 5 preparações do padrão primário MSP nas seguintes concentrações: 80, 90, 100, 110 e 120 µg/mL. Tais concentrações foram obtidas, por meio de diluições, em triplicata, a partir de uma solução padrão estoque (1 mg/mL), resultando em 15 soluções padrões para análise. Os pontos da curva de calibração foram preparados da seguinte forma:

- **80 µg/mL:** pipetou-se volumetricamente 80 µL da solução padrão mãe, foi transferida para tubo de vidro e diluída com 920 µL de solução diluente.
- **90 µg/mL:** pipetou-se volumetricamente 90 µL da solução padrão mãe, foi transferida para tubo de vidro e diluída com 910 µL de solução diluente.
- **100 µg/mL:** pipetou-se volumetricamente 100 µL da solução padrão mãe, foi transferida para tubo de vidro e diluída com 900 µL de solução diluente.
- **110 µg/mL:** pipetou-se volumetricamente 110 µL da solução padrão mãe, foi transferida para tubo de vidro e diluída com 890 µL de solução diluente.
- **120 µg/mL:** pipetou-se volumetricamente 120 µL da solução padrão mãe, foi transferida para tubo de vidro e diluída com 880 µL de solução diluente.

Após o preparo das amostras para análise, foram filtradas para os vials, usando filtro Millex HN (nylon), 0,45 µm x 13,00 mm de diâmetro e analisadas por CLAE-DAD.

4.7.2.2.1. Avaliação dos resultados

Foi utilizado o método dos Mínimos Quadrados Ordinários com aplicação do teste F da ANOVA para avaliação do coeficiente angular com nível de significância de 5%, onde a hipótese nula (H0) foi de coeficiente angular igual a zero e a hipótese alternativa (H1) foi de coeficiente angular diferente de zero. A análise gráfica da dispersão foi realizada pela plotagem do diagrama de dispersão com aplicação do teste Shapiro-Wilk para avaliação da distribuição dos resíduos.

A avaliação da homoscedasticidade foi realizada pelo teste de Breusch Pagan onde a hipótese nula (H0) foi de que a distribuição dos resíduos é Normal e a hipótese alternativa (H1) foi de que a distribuição dos resíduos não é normal.

4.7.2.3. Faixa de trabalho

A faixa de trabalho foi estabelecida a partir dos estudos de linearidade, juntamente com os resultados de precisão e exatidão, de acordo com a aplicação pretendida.

4.7.2.4. Limites de detecção e quantificação

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram calculados baseado na extrapolação da faixa de trabalho estudada, foram utilizadas as seguintes equações matemáticas, respectivamente:

$$LD = (3,3 * \text{Desvio_padrão_resíduos}) / (\text{coeficiente angular})$$

$$LQ = (10 * \text{Desvio_padrão_resíduos}) / (\text{coeficiente angular})$$

4.7.2.5. Precisão

A precisão avaliou a proximidade entre os resultados obtidos por meio de ensaios com amostras preparadas conforme descrito no método analítico validado e foi realizada em dois níveis:

Repetibilidade - As amostras foram avaliadas sob as mesmas condições de operação, mesmo analista e mesma instrumentação, em uma única sequência analítica.

A repetibilidade foi avaliada através de 9 (nove) determinações, contemplando o intervalo linear do método analítico, ou seja, 3 (três) concentrações: baixa, média e alta, com 3 (três) réplicas em cada nível.

Para o preparo das soluções de concentrações: baixa, média e alta (CB, CM, CA), procedeu-se da seguinte forma:

- CB: pipetou-se volumetricamente 80 μL da solução padrão mãe, foi transferida para tubo de vidro e diluída com 920 μL de solução diluente. Concentração final da solução: 80 $\mu\text{g/mL}$;
- CM: pipetou-se volumetricamente 100 μL da solução padrão mãe, foi transferida para tubo de vidro e diluir com 900 μL de solução diluente. Concentração final da solução: 100 $\mu\text{g/mL}$;
- CA: pipetou-se volumetricamente 120 μL da solução padrão mãe, foi transferida para tubo de vidro e diluir com 880 μL de solução diluente. Concentração final da solução: 120 $\mu\text{g/mL}$.

Após o preparo das amostras para análise, foram filtradas para os vials, usando filtro Millex HN (nylon), 0,45 μm x 13,00 mm de diâmetro e analisadas por CLAE-DAD.

Precisão intermediária - Deve expressar a proximidade entre os resultados obtidos da análise de uma mesma amostra, no mesmo laboratório, em pelo menos dois dias diferentes, realizada por operadores distintos. As análises contemplaram as mesmas concentrações e o mesmo número de determinações descritas na avaliação da repetibilidade.

4.7.2.5.1. *Avaliação dos resultados*

Para repetibilidade, foi feita uma análise descritiva através do cálculo da média, desvio padrão e desvio padrão relativo, onde este último foi fixado em 5%. Para a precisão intermediária, foi feita uma análise descritiva através do cálculo da média, desvio padrão e desvio padrão relativo, onde este último foi fixado em 5%. Para a comparação dos resultados entre dias e analistas foi aplicada uma análise de variância (ANOVA) com nível de significância de 5%.

4.7.2.6. *Exatidão*

A exatidão foi avaliada através de 9 (nove) determinações, contemplando o intervalo linear do método analítico, ou seja, 3 (três) concentrações: baixa, média e alta, com 3 (três) réplicas em cada nível.

Para o preparo das soluções de concentrações: baixa, média e alta (CB, CM, CA), procedeu-se da mesma forma descrita para a repetibilidade:

Após o preparo das amostras para análise, foram filtradas para os vials, usando filtro Millex HN (nylon), 0,45 μm x 13,00 mm de diâmetro por CLAE-DAD.

4.7.2.6.1. *Avaliação dos resultados*

Aplicamos o teste t-student para avaliarmos uma recuperação de 100% dado uma margem de equivalência delta. Assim, temos a hipótese nula ($H_0 - |\text{Rec}-100\%| \geq \text{delta}$) e a hipótese alternativa ($H_1 - |\text{Rec}-100\%| < \text{delta}$). Foi estabelecido um limite inferior de 95% e um limite superior de 105%, os dados foram analisados com um nível de significância de 5%.

4.7.2.7. Robustez

A robustez é um parâmetro tipicamente realizado no desenvolvimento do método analítico que indica a sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações das condições analíticas.

A robustez do método foi avaliada através da análise em triplicata da concentração média (100%), combinada com variações de:

- Fluxo de fase móvel (0,9, 1,0 e 1,1 mL/min);
- Temperatura do forno (49; 50 e 51 °C);
- Coluna cromatográfica.

4.7.2.7.1. *Avaliação dos resultados*

Para a comparação dos resultados entre os diferentes níveis dos parâmetros testados foi aplicada uma análise de variância (ANOVA) com nível de significância de 5%.

4.7.3. Execução dos testes de validação para o produto acabado

4.7.3.1. Seletividade

A avaliação da seletividade do método para o produto acabado foi avaliada conforme descrito para o parâmetro de seletividade do método para o IFA, acrescentadas amostras de mucosa vaginal suína, tampão fosfato e placebo.

4.7.3.2. Linearidade

A avaliação deste parâmetro foi realizada por meio da análise de 5 preparações do padrão primário MSP nas seguintes concentrações: 8, 16, 18, 20, 22 e 24 µg/mL. Tais concentrações foram obtidas, por meio de diluições, em triplicata, a partir de uma solução padrão estoque (1 mg/mL), resultando em 18 soluções padrões para análise. Os pontos da curva de calibração foram preparados da seguinte forma:

- **8 µg/mL:** pipetou-se volumetricamente 8 µL da solução padrão mãe, foi transferida para tubo de vidro e diluída com 992 µL de solução diluente.
- **16 µg/mL:** pipetou-se volumetricamente 16 µL da solução padrão mãe, foi transferida para tubo de vidro e diluída com 984 µL de solução diluente.
- **18 µg/mL:** pipetou-se volumetricamente 18 µL da solução padrão mãe, foi transferida para tubo de vidro e diluída com 982 µL de solução diluente.
- **20 µg/mL:** pipetou-se volumetricamente 20 µL da solução padrão mãe, foi transferida para tubo de vidro e diluída com 980 µL de solução diluente.
- **22 µg/mL:** pipetou-se volumetricamente 22 µL da solução padrão mãe, foi transferida para tubo de vidro e diluída com 976 µL de solução diluente.

Após o preparo das amostras para análise, foram filtradas para os vials, usando filtro Millex HN (nylon), 0,45 µm x 13,00 mm de diâmetro e analisadas por CLAE-DAD.

A avaliação dos resultados dos resultados obtidos foi realizada conforme descrito para avaliação de linearidade para o método do IFA.

4.7.3.3. Faixa de trabalho, limite de detecção e limite de quantificação

Os parâmetros descritos nesta seção foram avaliados conforme método para IFA.

4.7.3.4. Precisão

A precisão avaliou a proximidade entre os resultados obtidos por meio de ensaios com amostras preparadas conforme descrito no método analítico validado e foi realizada em dois níveis:

Repetibilidade - As amostras foram avaliadas sob as mesmas condições de operação, mesmo analista e mesma instrumentação, em uma única sequência analítica.

A repetibilidade foi avaliada através de 9 (nove) determinações, contemplando o intervalo linear do método analítico, ou seja, 3 (três) concentrações: baixa, média e alta, com 3 (três) réplicas em cada nível. Para o preparo das soluções de concentrações: baixa, média e alta (CB, CM, CA), procedeu-se da seguinte forma:

Amostras do placebo foram fortificadas para obtenção de mistura de pós com concentração de 160, 200 e 240 microgramas de misoprostol por grama de placebo.

Para as amostras de 160 mcg foram pesados 1,6 mg do IFA e adicionados a 19600 mg de placebo, obtendo assim um total equivalente a 20 comprimidos (peso médio do comprimido 980,2).

Para as amostras de 200 mcg foram pesados 3,0 mg do IFA e adicionados a 19604 mg de placebo, obtendo assim um total equivalente a 20 comprimidos (peso médio do comprimido 980,2).

Para as amostras de 240 mcg foram pesados 3 mg do IFA e adicionados a 19605 mg de placebo, obtendo assim um total equivalente a 20 comprimidos (peso médio do comprimido 980,2).

Para o preparo das soluções de concentrações: baixa, média e alta (CB, CM, CA), procedeu-se da seguinte forma:

CB: Pesou-se o equivalente a 1 comprimido (980,2 mg) de Prostokos® de 160 mcg e em seguida foram adicionados 7,5 mL de água ultrapurificada. Agitou-se em vórtex e foi transferida para banho de ultrassom por 30 minutos. Adicionou-se 2,5 mL de isopropanol e seguiu com agitação em vórtex. Por fim, foram filtradas e transferidas para um vial usando filtro Millex HN (nylon), 0,45 µm x 13,00 mm de diâmetro, ou equivalente. Concentração final da solução: 8 µg/mL;

CM: Pesou-se o equivalente a 1 comprimido (980,2 mg) de Prostokos® de 200 mcg e em seguida foram adicionados 7,5 mL de água ultrapurificada. Agitou-se em vórtex e foi transferida para banho de ultrassom por 30 minutos. Adicionou-se 2,5 mL de isopropanol e seguiu com agitação em vórtex. Por fim, foram filtradas e transferidas para um vial usando filtro

Millex HN (nylon), 0,45 µm x 13,00 mm de diâmetro, ou equivalente. Concentração final da solução: 15 µg/mL;

CA: Pesou-se o equivalente a 1 comprimido (980,2 mg) de Prostokos® de 240 mcg e em seguida foram adicionados 7,5 mL de água ultrapurificada. Agitou-se em vórtex e foi transferida para banho de ultrassom por 30 minutos. Adicionou-se 2,5 mL de isopropanol e seguiu com agitação em vórtex. Por fim, foram filtradas e transferidas para um vial usando filtro Millex HN (nylon), 0,45 µm x 13,00 mm de diâmetro, ou equivalente. Concentração final da solução: 24 µg/mL.

Após o preparo das amostras para análise, foram filtradas para os vials, usando filtro Millex HN (nylon), 0,45 µm x 13,00 mm de diâmetro. As amostras foram injetadas de acordo com condições cromatográficas constantes no item 8.

Precisão intermediária - Deve expressar a proximidade entre os resultados obtidos da análise de uma mesma amostra, no mesmo laboratório, em pelo menos dois dias diferentes, realizada por operadores distintos. As análises contemplaram as mesmas concentrações e o mesmo número de determinações descritas na avaliação da repetibilidade.

A avaliação dos resultados foi realizada de acordo com o descrito para precisão no método para o IFA.

4.7.3.5. Exatidão

A exatidão foi avaliada através de 9 (nove) determinações, contemplando o intervalo linear do método analítico, ou seja, 3 (três) concentrações: baixa, média e alta, com 3 (três) réplicas em cada nível. Para o preparo das soluções de concentrações: baixa, média e alta (CB, CM, CA), procedeu-se da mesma forma descrita para a repetibilidade.

Após o preparo das amostras para análise, foram filtradas para os vials, usando filtro Millex HN (nylon), 0,45 µm x 13,00 mm de diâmetro. As amostras foram injetadas de acordo com condições cromatográficas constantes no item 8.

A avaliação dos resultados foi realizada de acordo com o descrito para exatidão no método para o IFA.

4.7.3.6. Robustez

A avaliação dos resultados foi realizada de acordo com o descrito o ensaio de robustez no método para o IFA.

4.8. OTIMIZAÇÃO DA ESPECTROMETRIA DE MASSAS

4.8.1. Definição do modo de ionização e perfil de fragmentação

O modo de ionização por eletronebulização (ESI) do MSP foi testado na polaridade positiva no espectrômetro de massas Q-TOF, através de infusão direta de uma solução padrão de com concentração de 250 ng. mL⁻¹. Foi utilizado um sistema de bomba de infusão acoplada a seringa com fluxo constante de 20 µL. min⁻¹. O modo de varredura foi executado programando uma janela de análise entre m/z 50 e m/z 500. O nitrogênio foi utilizado como gás de secagem em uma vazão de 3 L/h e temperatura da fonte foi fixada em 150°C, seguindo recomendações do fabricante de acordo com o fluxo de infusão utilizado. Foi testada energia capilar entre 1500 e 4500 eV, com intervalo de 500 eV entre as avaliações. Para fragmentação do MSP foram testados diferentes valores de energias de colisão, com a finalidade de obtenção do perfil de fragmentação mais adequado. A calibração da fonte foi realizada com a solução calibrante constituída por água, álcool isopropílico, ácido fórmico e hidróxido de sódio.

4.8.2. Otimização dos parâmetros da fonte e acoplamento LC-MS

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

4.9. ESTUDO DE PERMEÇÃO IN VITRO

4.9.1. Avaliação de recuperação

Para determinação do procedimento de extração uma área de mucosa referente à área de difusão da célula syde-bi-syde foi contaminada, em 3 réplicas, com 20 µL de uma solução a 1000 µg/mL de MSP e seca a temperatura ambiente por um tempo de 6 horas. Em seguida, a mucosa foi cortada em pequenos pedaços, acondicionada em tubo de polipropileno onde foi

adicionado 1 mL das quatro soluções extratoras testadas que se consistiram de metanol, isopropanol, água e acetonitrila. Cada amostra foi agitada por 10 min (300 rpm) em mesa agitadora e sonicadas por mais 20 minutos. Então, elas foram filtradas com filtro de seringa 0.45µm (Millipore®) e analisadas com o método indicativo de estabilidade.

4.9.2. Preparo das mucosas e montagem do sistema de difusão

Tecidos vaginais suínos frescos de quatro animais foram coletados em um abatedouro local (Paulista, Pernambuco - Brasil) e transferidos imediatamente para frasco contendo meio mínimo essencial Eagle mantido a $(20 \pm 1^\circ \text{C})$. Os tecidos foram lavados com soro fisiológico e excisados com auxílio de pinças, bisturis e tesouras cirúrgicas em até 1 hora após a coleta.

Após inspeção visual e medição da espessura as membranas mucosas foram fixadas entre os dois compartimentos das células de difusão que consistiam em um sistema horizontal *side-by-side* com 3,4 mL de volume interno e área de difusão de 0,64 cm² (PermeGear®, Hellertown, EUA).

O desenho experimental foi dividido de duas formas. No primeiro experimento, no compartimento doador foi colocado 1 comprimido de misoprostol 200 µg a cada 6 horas e completado o volume com PBS (pH $5 \pm 0,1$) para 3,4mL (volume do compartimento doador). Antes da colocação do próximo comprimido, foi removido todo o conteúdo do compartimento doador e uma alíquota de 1mL foi filtrada e diluída para análise. O compartimento receptor (3,4mL) foi preenchido com água (pH= 7,4) no início do experimento, e apenas uma coleta do líquido receptor (LR) foi realizada neste compartimento, ao final do estudo (24hs).

Já para o segundo experimento a modificação realizada em relação ao primeiro foi o número de coletas de LR. Onde, 1mL foi coletado a cada 6h e repostado com o mesmo volume, imediatamente antes da colocação de um novo comprimido no compartimento doador, perfazendo tempo total de 24h de experimento.

Para ambas condições experimentais, as células foram mantidas sob constante agitação magnética (600 rpm) e temperatura (37 °C) através de um banho de água circulante. Todas as amostras foram filtradas através de um filtro de seringa de 0,45 µm de tamanho de poro (Millex®, MerckMillipore®, Burlington, EUA) e devidamente diluídas antes da análise. O procedimento foi realizado em quadruplicata.

5. RESULTADOS

5.1. DESENVOLVIMENTO DO MIE

O objetivo principal do MIE desenvolvido foi separar o MSP de seus PDs gerados no estudo de degradação forçada, bem como de suas impurezas. Como a fase estacionária descrita na monografia da farmacopeia americana não estava disponível, optou-se pela escolha de colunas semelhantes à preconizada. Diversos testes foram realizados para estabelecimento das melhores condições cromatográficas.

Inicialmente, utilizou-se as condições cromatográficas descritas no item 4.4 (Desenvolvimento do método indicativo de estabilidade). Quanto as colunas testadas, àquelas que apresentaram melhor retenção e separação cromatográfica entre o MSP, impurezas e PDs foram as Purospher Star C8 (150 x 4,6mm, 5 μ m) e a Luna C8 de 30 x 2.0 mm. A coluna Kinetex fenil-hexil (50 x 4.6 mm) e a Kinetex C18 (150 x 2.1) não proporcionaram retenção adequada ao MSP, que apresentou tempo de retenção (TR) ainda no volume morto das colunas e por isso não foram selecionadas para os refinamentos do método.

As fases móveis constituídas da mistura de diferentes proporções de água e metanol, água e acetonitrila e água e isopropanol não eluíram o MSP ou este não pôde ser evidenciado nos cromatogramas, mesmo após longos períodos de análise. A acidificação das fases também não solucionou o problema descrito. A incorporação de tampão fosfato na fase aquosa proporcionou ganho de retenção ao MSP, mas apenas quando a fase orgânica foi constituída de isopropanol. As misturas de tampão fosfato com acetonitrila ou metanol não levaram a resultados onde fosse possível observar a presença do sinal analítico do MSP. Dessa forma, a mistura de tampão fosfato e isopropanol, que inclusive é a descrita na USP, foi selecionada para ajustes de proporção e fluxo.

O modo de eluição gradiente, onde foi possível obter pureza de pico, proporcionou tempos de retenção para o MSP em cerca de 66 minutos e tempo total de análise de duas horas, por isso esses resultados não foram considerados. No modo isocrático, as proporções 50:50, 60:40 e 70:30 (fase aquosa: fase orgânica), não proporcionaram separação da impureza 8-epi-MSP e MSP que não apresentou pureza de pico. Esta separação só foi observada quando se utilizou as proporções 75:25 e 73:27 (fase aquosa: fase orgânica) e fluxo de 1 mL.min⁻¹.

O menor tempo de retenção para o MSP (24,9 minutos) e todas as impurezas, o que proporcionaria um menor tempo de análise, foi obtido utilizando a coluna Luna na proporção 73:27, porém a resolução entre o MSP e o 8-epi-MSP foi de 1,38, mesmo valor para quando se

utilizou esta coluna e proporção de fase móvel 75:25. A coluna Purospher Star, por sua vez, demonstrou valores de resolução superior, fator determinante para sua seleção. Apesar da proporção de fase móvel 75:25 ter proporcionado uma resolução superior, os tempos de retenção de todos os analitos foram superiores à quando se utilizou a proporção 73:27, que por isso foi elegida para uso.

Além disso, a proporção 73:27, nas condições anteriormente descritas, foi testada com um fluxo de $1,5 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$. Para a coluna Luna, não foi possível a obtenção de resultados, pois a pressão obtida foi superior a pressão máxima do sistema. Para coluna Purospher Star, apesar da redução dos tempos de retenção, houve deformação dos picos e um considerável aumento no gasto de solventes. Dessa forma, o método teve como fase estacionária a coluna Purospher Star e fluxo de $1,0 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$. O volume de injeção foi fixado em $50 \mu\text{L}$, a temperatura do auto injetor em $5 \text{ }^\circ\text{C}$, e a temperatura do forno em 50°C . O resumo dos resultados mais promissores é descrito na tabela e figura 6, bem como nos cromatogramas trazidos nos resultados de degradação forçada apresentados nos itens 5.2.

A seleção do comprimento de onda para as análises foi realizada através da avaliação do balanço de massas observado nas amostras de degradação forçada. Foi dada preferência às amostras que apresentaram uma maior taxa de degradação e geração de produtos de degradação, como na degradação básica. Foram testados comprimentos de onda entre 200 e 205 nm, como base a monografia da USP.

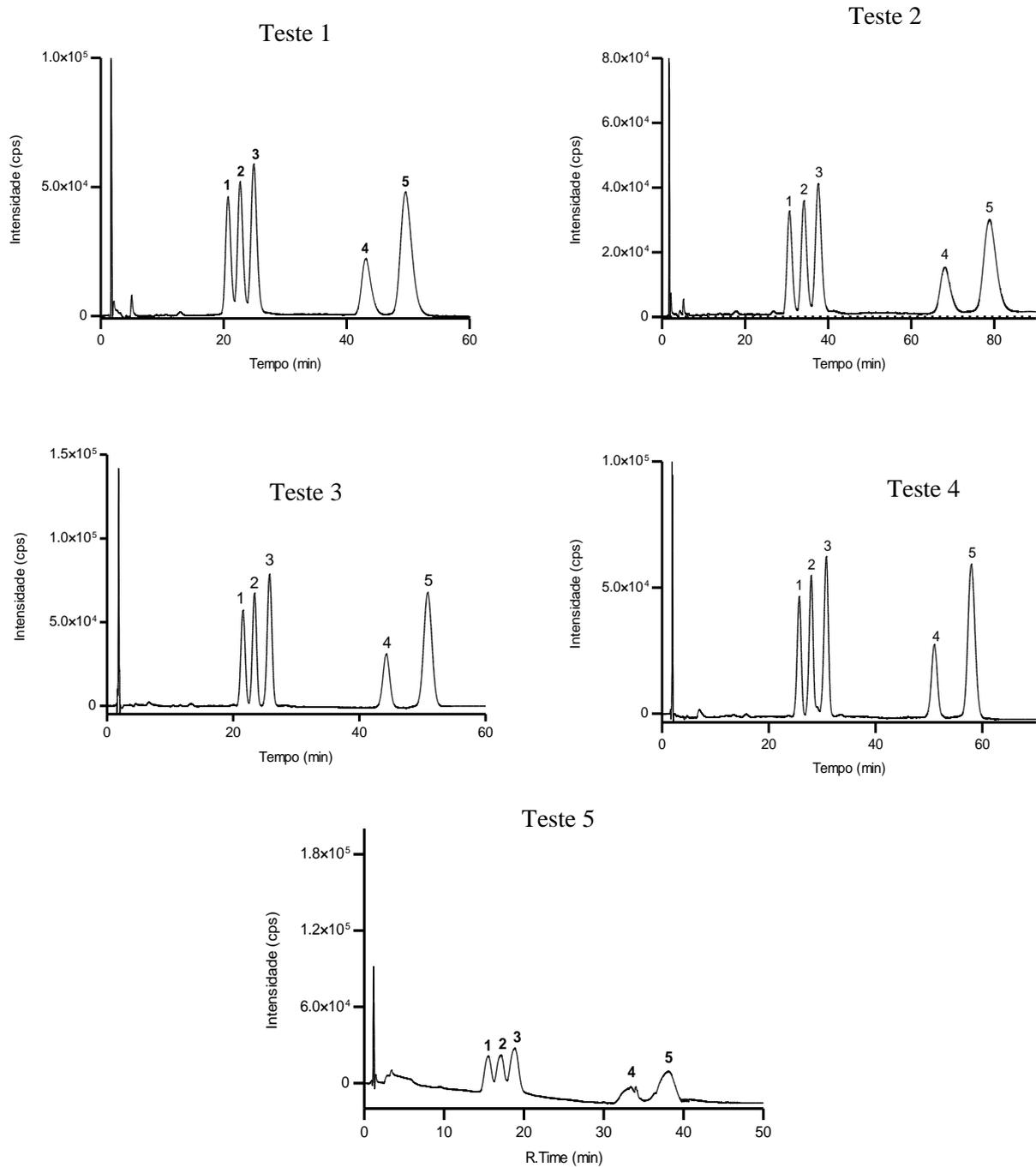
Como podemos observar na figura 7, o comprimento de onda em 205 nm, valor preconizado pela farmacopeia americana para quantificação de impurezas orgânicas, apresentou um balanço de massas de 118,63%, enquanto 200 nm apresentou valor de 108,63%. Neste tipo de avaliação, quanto maior a proximidade de 100%, maior a capacidade do método em detectar e quantificar os PDs gerados com precisão e tem sido preconizado por agências regulatórias como FDA e ANVISA. A obtenção do balanço de massas, pode se mostrar um desafio em algumas situações, principalmente naquelas onde o analito e seus PDs apresentam absorvidade molar distintas, pela perda de PDs potencialmente voláteis, formação de compostos com ausência de grupos cromóforos ou ainda a formação de compostos com eluição no volume morto ou de alta retenção na coluna.

Tabela 6. Resumo dos principais resultados obtidos no desenvolvimento do MIE.

Fonte: O autor.

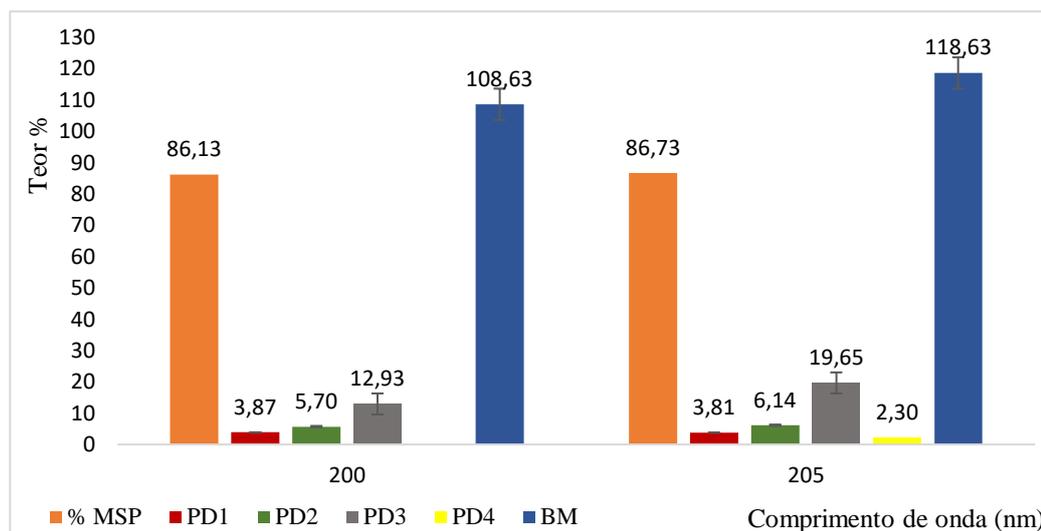
Parâmetros	Condições testadas				
	Teste 1	Teste 2	Teste 3	Teste 4	Teste 5
Modo de Eluição	Isocrático	Isocrático	Isocrático	Isocrático	Isocrático
Fase Móvel	Tampão pH 3 73% Isopropanol 27%	Tampão pH 3 75% Isopropanol 25%	Tampão pH 3 73% Isopropanol 27%	Tampão pH 3 75% Isopropanol 25%	Tampão pH 3 75% Isopropanol 25%
Fluxo	1 mL/min	1 mL/min	1 mL/min	1 mL/min	1,5 mL/min
Coluna	Luna C8 150 x 4,6mm	Luna C8 150 x 4,6mm	Purospher STAR, C8 150 x 4,6mm	Purospher STAR, C8 150 x 4,6mm	Purospher STAR, C8 150 x 4,6mm
Temperatura do forno	50°C	50°C	50°C	50°C	50°C
Comprimento de onda	200 nm				
Volume de Injeção	50 µL				
RESULTADOS					
Tr do MSP	24,90 min	37,59 min	25,75 min	30,75 min	Perda da eficiência da Coluna - Picos deformados – ↓ vida útil ↑ Gasto de solvente Ganho de Tr muito discreto
Tr do 12-EPI-MSP	20,70 min	30,70 min	21,41 min	25,70 min	
Tr do 8-EPI-MSP	22,70 min	34,17 min	23,29 min	27,93 min	
Tr do MSP Tipo A	43,10 min	68,07 min	45,42 min	50,98 min	
Tr do MSP Tipo B	44,60 min.	78,80 min	52,19 min	57,91 min	
R 12-EPI-MSP e 8-EPI-MSP	1,30	1,51	1,39	1,63	
R 8-EPI-MSP e MSP	1,38	1,38	1,75	1,99	
R 12-EPI-MSP e MSP	2,58	2,84	3,06	3,45	
R MSP tipo A e MSP tipo B	2,06	2,16	2,86	3,08	

Figura 6. Cromatograma do MSP e suas impurezas obtidos com a coluna Luna (Testes 1 e 2) e com a coluna Purospher STAR (Testes 3,4 e 5). Legenda: 1 (12-EPI-MSP), 2 (8-EPI-MSP), 3 (MSP), 4 (MSP A) e 5 (MSP B).



Fonte: o autor.

Figura 7. Avaliação de balanço de massas utilizando diferentes comprimentos de onda da faixa UV.



Fonte: o autor.

5.2. DEGRADAÇÃO FORÇADA

Os resultados a seguir estão descritos como percentual de degradação e pureza de pico cromatográfico relativo ao MSP. Nos casos onde produtos de degradação foram observados, os tempos de retenção foram registrados, o balanço de massas foi calculado e sua representação gráfica pode ser encontrada na figura 16.

A baixa relação quantitativa fármaco/excipientes nos comprimidos mostrou-se um empecilho na avaliação do balanço de massas para o produto acabado, tendo em vista a baixa intensidade dos picos formados na maioria das condições de estresse, como discutido nas seções seguintes. Em trabalho publicado por Carr et al (2012), os autores descrevem o desenvolvimento de um método analítico para quantificação de MSP e seus produtos de degradação em comprimidos e evidenciaram esta mesma dificuldade, cujo método não apresentou sensibilidade satisfatória para determinação de todos os produtos de degradação observados.

Os quadros 7 e 8 trazem um resumo dos PDs encontrados tanto para o IFA, quanto para os comprimidos.

Quadro 7. Produtos de degradação encontrados para o insumo farmacêutico ativo.

	Tr do MSP (min)	Tr PD1 (min)	Tr PD2 (min)	Tr PD 3(min)	Tr PD 4 (min)
Hidrólise Ácida	25,83	11,00	-	51,89	N/A
Hidrólise Alcalina	26,60	11,65	24,27	52,65	N/A
Teperatura	27,85	25,11	55,32	N/A	N/A
Umidade	27,69	21,41	24,01	45,42	53,00
Peróxido de hidrogênio	27,85	19,23	24,68	54,59	N/A
Íons metálicos	26,21	11,60	24,78	54,04	N/A
Fotodegradação Visível	27,69	24,44	N/A	N/A	N/A
Fotodegradação UV	27,69	N/A	N/A	N/A	N/A

Fonte: o autor.

Quadro 8. Produtos de degradação encontrados para os comprimidos.

	Tr do MSP (min)	Tr PD1 (min)	Tr PD2 (min)	Tr PD 3(min)
Hidrólise Ácida	27,32	11,92	24,85	54,10
Hidrólise Alcalina	27,35	11,92	24,85	54,1
Teperatura	27,41	24,94	54,62	N/A
Umidade	25,01	N/A	N/A	N/A
Peróxido de hidrogênio	27,41	N/A	24,97	N/A
Íons metálicos	27,41	N/A	N/A	N/A
Fotodegradação Visível	25,01	N/A	N/A	N/A
Fotodegradação UV	25,01	N/A	N/A	N/A

Fonte: o autor.

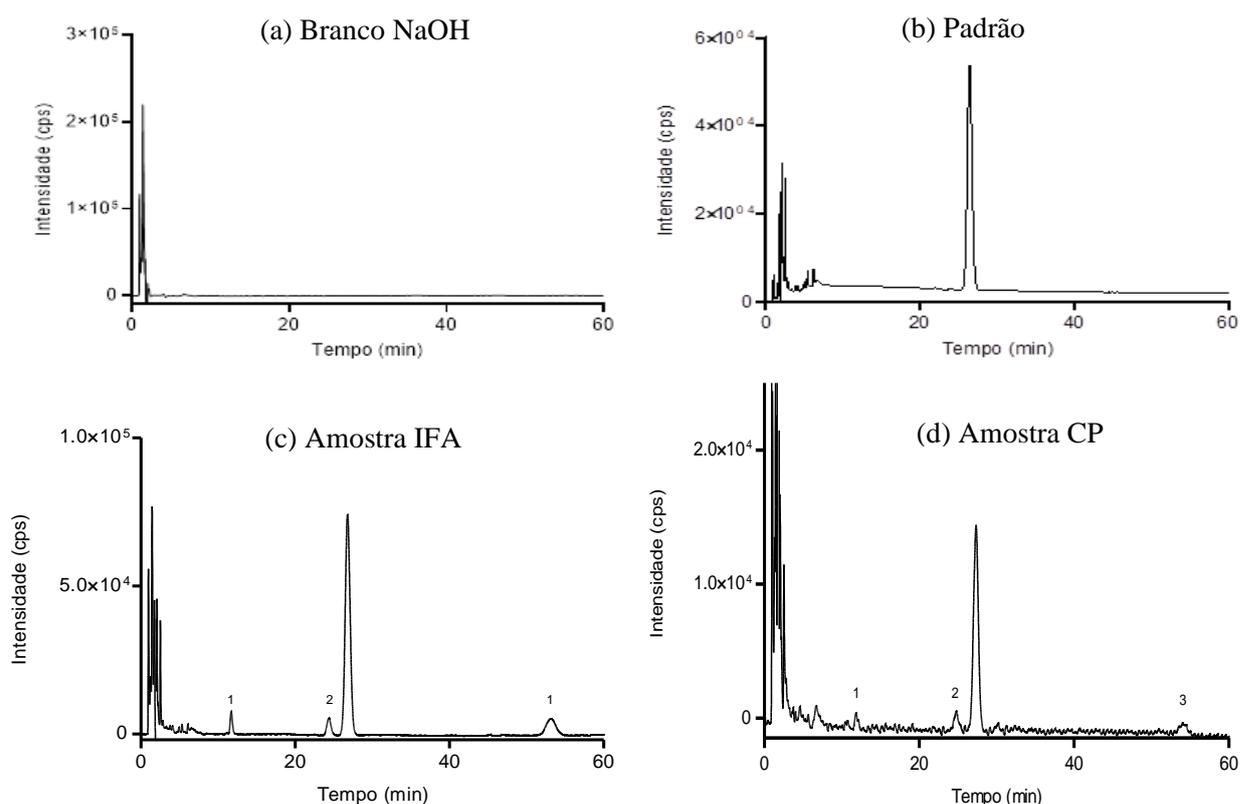
5.2.1. Degradação básica e ácida

De acordo com a tabela 7 que descreve o resumo dos resultados obtidos na degradação básica, observa-se que o teor remanescente de MSP IFA foi de 86,13% após 5 minutos de exposição, ou seja, produziu-se um decaimento de 13,87% em relação a área do MSP que não foi exposto ao estresse. Foi observado a formação de 3 (três) produtos de degradação (figura 8), com um balanço de massas de 108,62% e o sinal analítico do MSP apresentou pureza de pico, demonstrando que não houve sobreposição de sinal do MSP e nenhum de seus PDs.

Já o MSP comprimidos que ficaram expostos a solução de hidróxido de sódio durante 5h apresentaram degradação de 4,53% e por isso as amostras foram reanalisadas após 18 h de

exposição. O contato levou a uma degradação de 20,17% e o teor remanescente do MSP foi de 79,83%, além disso, houve a formação de 3 (três) PDs. O balanço de massas nesta condição foi de 99,45% e a pureza de pico do MSP não evidenciou coeluição. Estes resultados são trazidos na tabela 7 e figura 8.

Figura 8. (a) Cromatogramas de branco NaOH. (b) Padrão MSP. (c) IFA submetido ao NaOH 5 mM. (d) Comprimidos submetidos ao NaOH 5 mM.



Fonte: o autor.

Os PDs gerados nos comprimidos apresentam tempos de retenção correlacionados com aqueles observados na degradação da dispersão, o que nos traz evidências de que sejam as mesmas entidades químicas. Os PD 2 e 3 em ambos casos, que representam possivelmente, o 8-epi-MSP e o MSP B, respectivamente, foram formados em maior quantidade quando comparados ao PD1.

Como esperado, a matriz do comprimido, mesmo estando parcialmente dissolvida, retardou o processo de degradação do MSP. Para termos uma melhor dimensão disto, 5 horas

de exposição do comprimido levou a degradação equivalente a 32,66% da degradação que ocorreu na dispersão, exposta apenas 5 minutos.

Tabela 7. Resultados brutos para a degradação básica.

	MSP_Ref. IFA	MSP_Teste IFA	PD1	PD2	PD3
	MSP Ref. CP	MSP Teste CP			
Parâmetros Cromatográficos Quantitativos					
Réplica_1	3916114	3345435	157635	226355	482861
	880837	723015	32322	56333	90284
Réplica_2	3890642	3363992	149601	222846	497361
	850789	689488	29887	53358	85011
Réplica_3	3846297	3327101	143184	215080	525938
	922631	706468	32765	62232	78568
Média	3884351	3345509	150140	221427	502053
	884752	706324	57308	57308	84621
DP	35331	18446	7241	5770	21918
	36081	16764	1550	4517	5868
DPR	0,91%	0,55%	4,82%	2,61%	4,37%
	4,08%	2,37%	4,89%	7,88%	6,93%
% Degradado	N/A	13,87	N/A	N/A	N/A
		20,17			
BM	N/A	108,62%	N/A	N/A	N/A
		99,45%			
Parâmetros Cromatográficos Qualitativos Média: (± DP)					
Pureza	Atende	Atende	Atende	Atende	Atende
Tr	26,08±0,28	26,60±0,29	11,65±00	24,27±0,12	52,89±02
	27,32±0,2	27,35±0,2	11,92±03	24,85±0,4	54,1±0,2

Fonte: o autor.

A tabela 8 e a figura 9 descrevem o resumo dos resultados obtidos na degradação ácida, onde observa-se que o teor remanescente de MSP IFA foi de 78,35% após 8 horas de exposição, gerando um decaimento de 21,65% em relação a amostra padrão e levando a formação de 2 (dois) PDs. O balanço de massas observado foi de 95,72 e a pureza de pico do sinal analítico do MSP não evidenciou coeluição.

Já os comprimidos que ficaram expostos por 24 h apresentaram uma degradação de 60,38% (teor remanescente de 39,62%). Na tentativa de obtenção de uma degradação mais branca, outras amostras foram preparadas e analisadas após 5 h de exposição. Apesar de ter se obtido uma degradação satisfatória (31,9%), houve dificuldade de integração dos picos dos PDs gerados, levando a obtenção de um alto coeficiente de variação. Dessa forma, optou-se por apresentar os resultados de degradação ácida de 24 h, onde foi observado a formação de 3 (três) produtos de degradação, um balanço de massas de 101,23% e pureza de pico para o sinal analítico do MSP. Os dados completos são trazidos na tabela 8 e representados graficamente na figura 9.

Quando comparamos os PDs 1 e 2 gerados na degradação ácida da dispersão, observamos que eles apresentam tempo de retenção correlacionados com os PD 1 e 3 gerados na amostra de produto acabado. Nos comprimidos também foi possível observar a presença de um terceiro degradado (PD2) que não estava presente na dispersão. Já quando observamos os PDs 1, 2 e 3 gerados nos comprimidos nas condições ácida e básica, percebemos que eles apresentam tempos de retenção correlacionados e provavelmente representam os mesmos compostos.

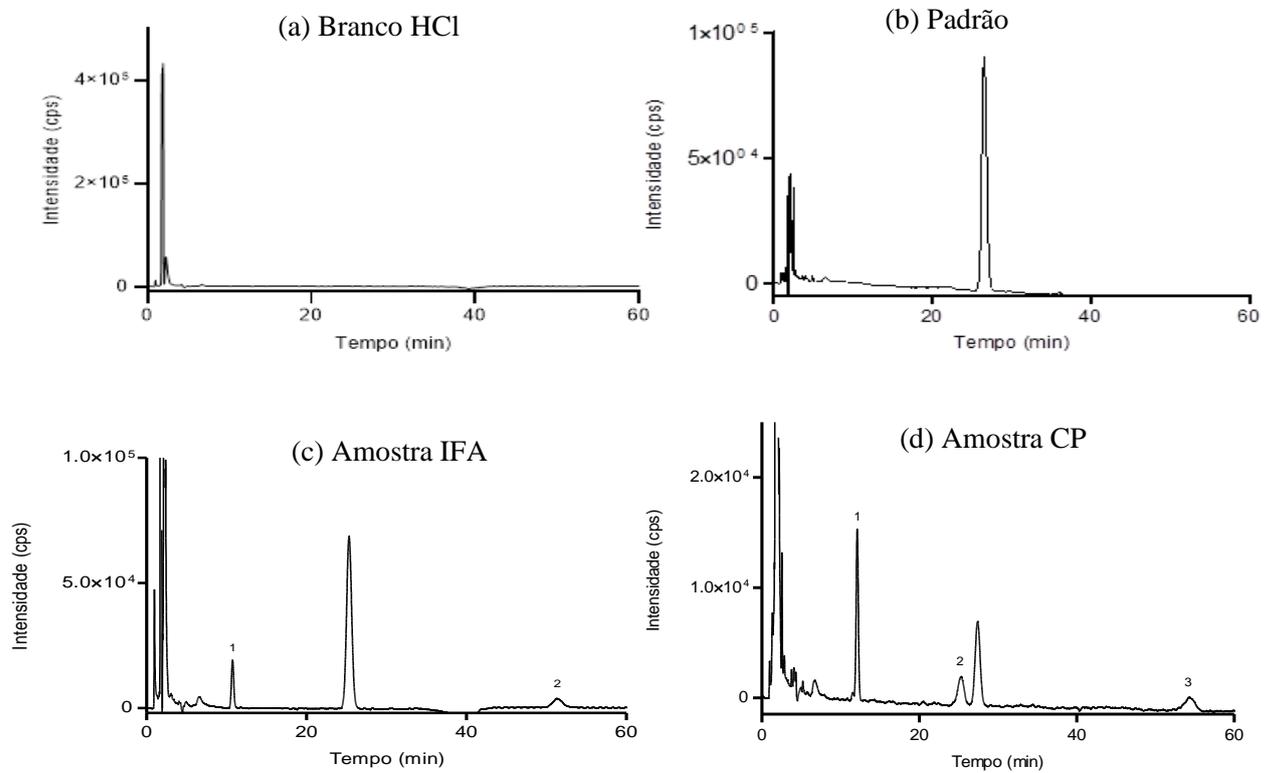
Ao comparar o tempo de retenção do MSP B, trazido na tabela 6, com os tempos de retenção do PD3 da hidrólise básica, o PD2 da hidrólise ácida do IFA e o PD3 da degradação ácida do comprimido, é possível observar que são valores semelhantes (DPR 1,55). Da mesma forma, o PD2 da degradação básica IFA e comprimido apresentaram tempo de retenção semelhante ao 8-epi-MSP (DPR 2,9). Tais achados nos trazem fortes indícios de que estes PDs citados são o MSP B e 8-epi-MSP, respectivamente. Porém, a comparação dos espectros de absorção (190-800 nm) dos resultados obtidos não evidenciou similaridade entre os PDs encontrados e as impurezas relatadas, provavelmente pela baixa intensidade dos sinais analíticos.

Kahsay et al. (2015) observaram que a exposição da dispersão de MSP em soluções de HCl 0,025 M e NaOH 0,005 M levou a uma extensa degradação do fármaco e a formação de sete produtos de degradação. Apesar do método ter se mostrado seletivo, os autores não trouxeram nenhuma discussão da avaliação de balanço de massas. Da mesma forma, Carr et al. (2012) desenvolveram metodologia para quantificação de MSP em comprimidos e relataram uma degradação de 49,1% do MSP submetido a HCl 1 M por duas horas.

Neste trabalho os autores não deixam claro quantos PDs foram formados em cada condição de estresse, mas relatam que todas condições testadas, ao todo, levaram a formação de 3 (três) PDs. Além disso, os autores fizeram uma comparação entre os espectros de absorção

de UV dos cromatogramas obtidos com dados trazidos na literatura e chegaram à conclusão que os PDs observados foram o 8-epi-MSP, bem como a forma A e B do fármaco.

Figura 9. (a) Cromatogramas de branco HCl. (b) Padrão MSP. (c) IFA submetido ao HCl 0,2 M. (d) Comprimidos submetidos ao HCl 0,2M.



Fonte: o autor.

Tabela 8. Resultados brutos para a degradação ácida.

	MSP_Ref. IFA	MSP Teste IFA	PD1	PD2	PD3
	MSP Ref. CP	MSP Teste CP			
Parâmetros Cromatográficos Quantitativos					
Réplica_1	4050340	3138362	399821	294370	N/A
	880837	723015	32322	56333	90284
Réplica_2	3997205	3131877	418273	268600	N/A
	850789	689488	29887	53358	85011
Réplica_3	3878382	3073528	423282	271085	N/A
	922631	706468	32765	62232	78568
Média	3975309	3114589	413792	278018	N/A
	884752	706324	31658	57308	84621
DP	88045	35707	12356	14215	N/A
	36081	16764	1550	4517	5868
DPR	2,21%	1,15%	2,99%	5,11%	N/A
	4,08%	2,37%	4,89%	7,88%	6,93%
% Degradado	N/A	21,65	N/A	N/A	N/A
		20,17			
BM	N/A	95,75%	N/A	N/A	N/A
		99,45%			
Parâmetros Cromatográficos Qualitativos Média: (± DP)					
Pureza	Atende	Atende	Atende	Atende	Atende
			NC	NC	
Tr	25,83±0,71	25,58±0,57	11,00±0,29	NA	51,27±06
	27,32±0,2	27,35±0,2	11,92±0,3	24,85±0,4	54,1±0,1

Fonte: o autor.

5.2.2. Degradação térmica seca (aquecimento)

A tabela 9 e a figura 10 descrevem o resumo dos resultados obtidos na degradação forçada do IFA. Observa-se que o teor remanescente de MSP foi de 85,17% após 7 dias de estresse, ou seja, produziu um decaimento de 14,83% em relação a amostra padrão, levando a formação de 2 (dois) produtos de degradação. O balanço de massas para esta condição foi de 91,17%.

Já os comprimidos que foram aquecidos por 7 dias apresentaram uma degradação de 41,48%, restando um teor remanescente de 58,58% de MSP em relação a amostra padrão. Foi evidenciado a formação de 2 (dois) PDs e o balanço de massas obtido foi de 77,71. Os dados brutos são trazidos e esquematizados na tabela 9 e figura 10, respectivamente.

O baixo balanço de massas encontrado pode ter ocorrido devido a formação de produtos de degradação, que com a alta temperatura sofreram volatilização ou mudança de grupos cromóforos. Dessa forma, não puderam ser detectados tendo em vista a instabilidade do MSP em temperatura ambiente ou neste caso em uma temperatura fora dos padrões reais de armazenamento (WU, et al., 2016). Além disso, o sinal analítico do MSP apresentou pureza de pico adequada, demonstrando que não houve coeluição.

O PD1, evidenciado em baixa intensidade, e o PD2 gerados no aquecimento do IFA apresentam tempos de retenção correspondentes com os 2 (dois) PDs observados no aquecimento da dispersão e devem representar o 8-epi-MSP e o MSP-B, respectivamente. Tais achados são corroborados por Collins et al. (1985) que descreveram que o aumento da temperatura em amostras de MSP leva a formação do 8-epi-MSP e de MSP-B.

Resultados semelhantes foram obtidos por Kahsay et al. (2015) que prepararam soluções de MSP e a aqueceram a 75°C por uma hora, onde foi possível observar a formação de 2 (dois) PDs. A avaliação do estresse térmico utilizando soluções de IFAs que naturalmente se apresentam no estado sólido não tem sido recomendada, já que outros tipos de reações que se desenvolvem em meio aquoso podem estar presentes (BLESSY et al., 2014). Dessa forma, deve-se, preferencialmente, submeter o IFA e produto acabado ao calor seco ou associado com a umidade. Wu et al. (2016) ao desenvolver métodos para quantificação do MSP baseado em ensaio enzimático relataram a formação de 1 (um) PD após submeter o MSP por 12 h a uma temperatura de 37°C. Para este estudo não houve aplicação de técnicas para identificação deste PD.

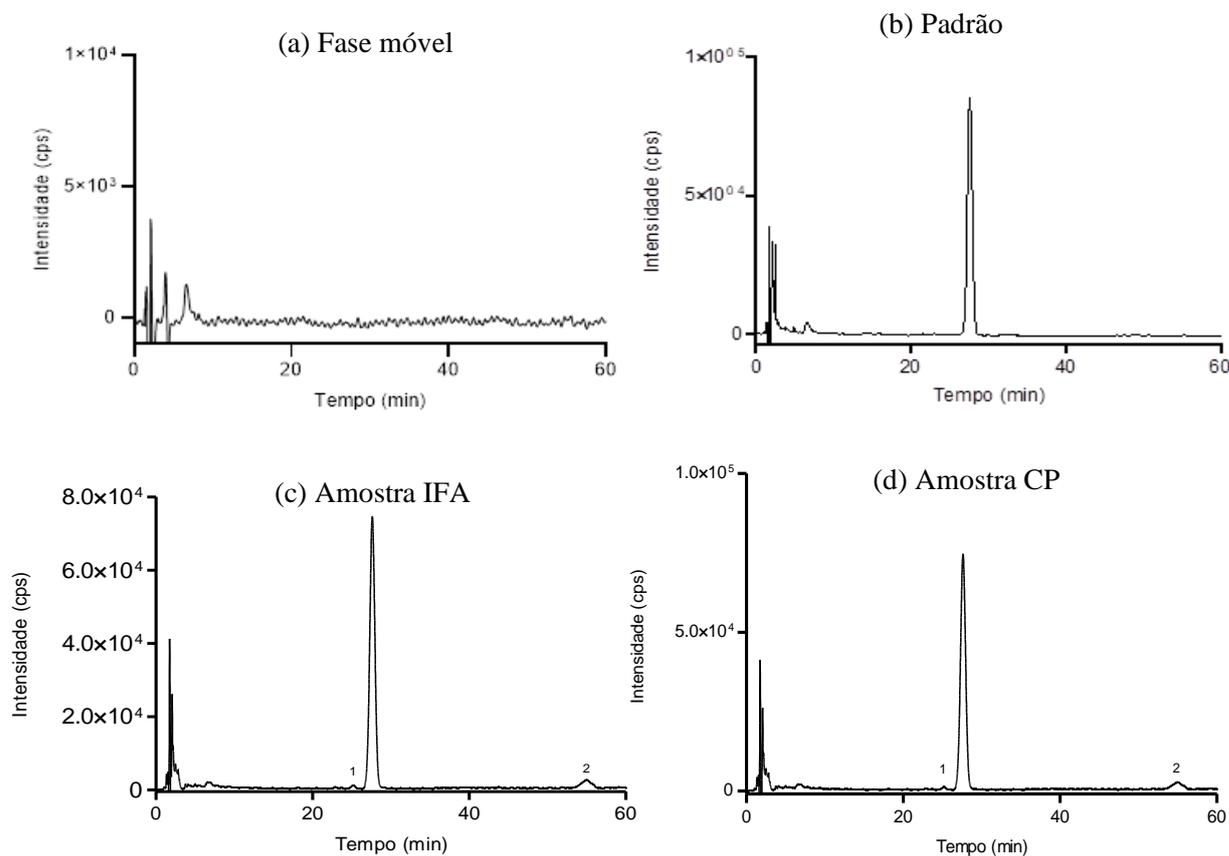
Apesar de não haver relatos de estudos de degradação forçada utilizando comprimidos a base de MSP, alguns autores têm relatado que temperaturas superiores a 25°C apresentam a capacidade de modificar o perfil de dissolução dos comprimidos e potencializar a degradação do IFA (HAGEN et al., 2020). Tais dados demonstram a importância do controle de temperatura durante todo o ciclo de vida do produto com o intuito de preservar a dosagem dos comprimidos, bem como evitar a formação de compostos secundários.

Tabela 9. Resultados brutos para a degradação térmica.

	MSP_Ref. IFA	MSP_Teste IFA	PD1	PD2
	MSP Ref. CP	MSP Teste CP		
Parâmetros Cromatográficos Quantitativos				
Réplica_1	4058155	3310477	40951	197926
	848586	493790	39773	112188
Réplica_2	4061440	3469213	42391	199156
	856585	494636	26937	135398
Réplica_3	3896738	3454596	40405	193517
	830816	495582	30673	127840
Média	4005444	3411429	41249	196866
	845329	494669	32461	125142
DP	94157	87732	1026	2965
	13190	896	6602	11838
DPR	2,35%	2,57%	2,49%	1,51%
	1,56%	0,18%	20,34%	9,46%
% Degradado	N/A	14,83	N/A	N/A
		41,48		
BM	N/A	91,11%	N/A	N/A
Parâmetros Cromatográficos Qualitativos: média (+/- DP)				
Pureza	Atende	Atende	N/C	Atende
Tr	27,85 ±0,31	27,66±0,06	25,11±0,10	55,32±0,45
	27,41±0,15	27,53±0,03	24,94±0,14	54,62±0,06

Fonte: o autor.

Figura 10. (a) Cromatogramas de branco fase móvel. (b) Padrão MSP. (c) IFA submetido ao aquecimento. (d) Comprimidos submetidos ao aquecimento.



Fonte: O autor.

5.2.3. Degradação térmica úmida (umidade)

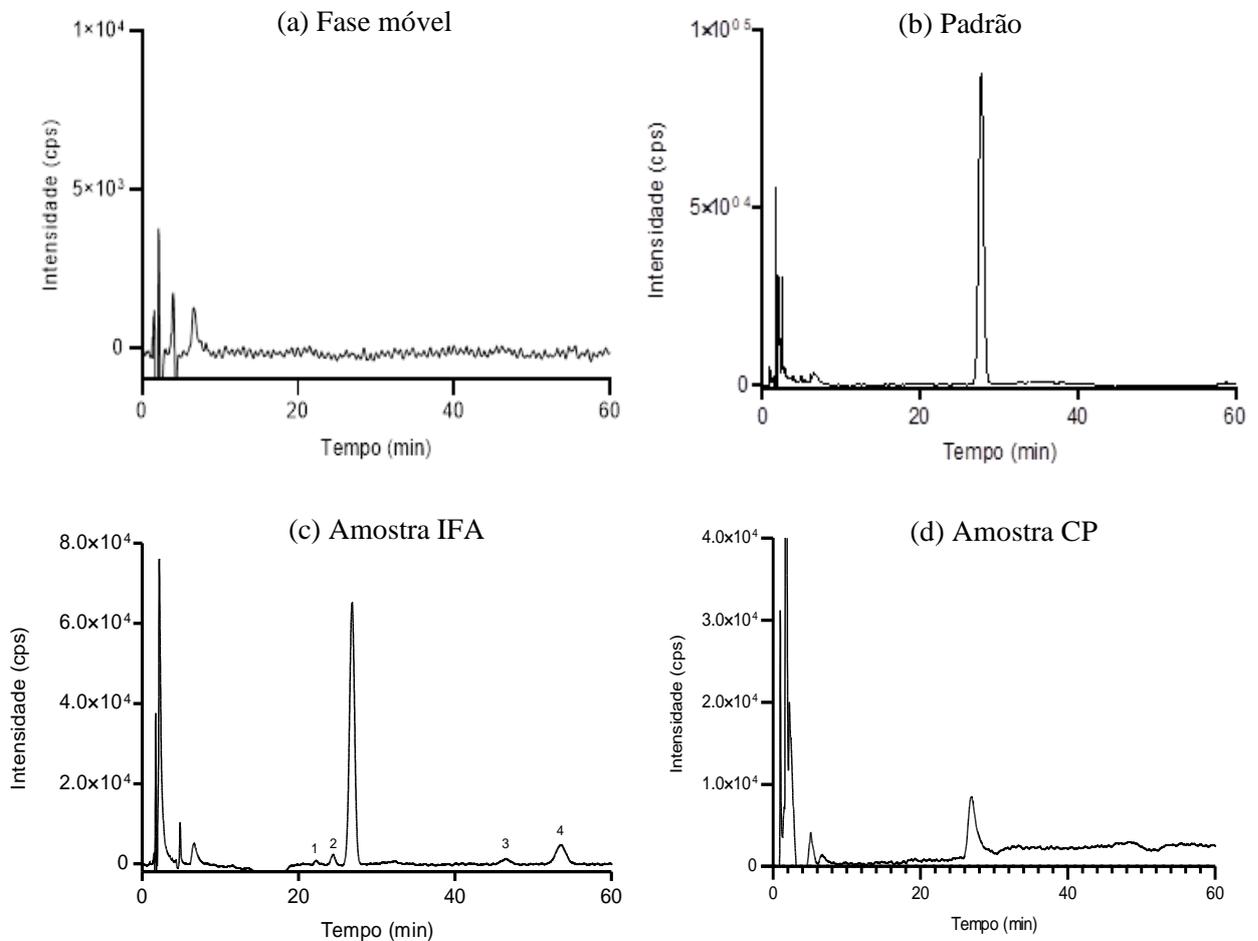
A tabela 10 descreve o resumo dos resultados obtidos na degradação forçada para esta condição, onde se observa que o teor remanescente de MSP IFA foi de 80,56% após 5 dias de estresse, ou seja, produziu um decaimento de 19,44% em relação a área do MSP que não foi exposto à condição de estresse, levando a formação de 4 (quatro) produtos de degradação, como pode ser observado na figura 11. O balanço de massas para esta condição foi de 98,49% e o sinal analítico do MSP apresentou pureza de pico adequada, demonstrando que não houve coeluição.

Os comprimidos que ficaram expostos a esta condição durante 10 dias apresentaram degradação de 3,09%, onde, de acordo com a tabela 10, observa-se que o teor remanescente de MSP foi de 96,91%, ou seja, produziu um decaimento de 3,09% em relação a área do MSP que não foi exposto à condição de estresse e não foi evidenciado a presença de produtos de

degradação (figura 11). O balanço de massas nesta condição foi de 96,91% e o sinal analítico do MSP apresentou pureza de pico, demonstrando que não houve coeluição.

Os resultados obtidos por Wu et al. (2016) evidenciaram a formação de 1 (um) PD quando avaliaram esta condição. No trabalho dos referidos autores, o estudo foi conduzido utilizando uma câmara de estabilidade qualificada em 75% de umidade relativa e 37°C. No entanto, não são trazidas discussões sobre percentuais de degradação, nem de balanço de massas. Outros resultados não foram encontrados para comparação do MSP dispersão na presença da umidade.

Figura 11. (a) Cromatogramas de branco fase móvel. (b) Padrão MSP. (c) IFA submetido a umidade. (d) Comprimidos submetida a umidade.



Fonte: o autor.

Tabela 10. Resultados brutos para a degradação por umidade.

	MSP_Ref. IFA	MSP_Teste IFA	PD1	PD2	PD3	PD4
	MSP Ref. CP	MSP Teste CP				
Parâmetros Cromatográficos Quantitativos						
Réplica_1	3965821	3030420	106149	435620	120305	461560
	601563	601058	N/A	N/A	NA	NA
Réplica_2	3970358	3280948	116302	461561	120769	463638
	608636	551776	N/A	N/A	NA	NA
Réplica_3	3966811	3277701	105943	462879	120274	468461
	566577	569082	N/A	N/A	NA	NA
Média	3967663	3196356	109465	453353	120449	464553
	592259	573972	N/A	N/A	NA	NA
DP	2386	143714	5922	15372	277	3440
	22520	25002	N/A	N/A	NA	NA
DPR	0,06%	4,50%	5,41%	3,39%	0,23	0,76
	3,80	4,36	N/A	N/A	NA	NA
% Degradação	N/A	19,44	N/A	N/A	N/A	N/A
		3,09				
BM	N/A	94,75%	N/A	N/A	N/A	N/A
		96,91%				
Parâmetros Cromatográficos Qualitativos: média (+/- DP)						
Pureza	Atende	Atende	N/C	Atende		
Tr	27,69±0,03	26,88±0,03	21,41±	24,01±	45,42±	53,00±
			0	0	0	0
			,	,	,	,
			0	0	0	0
			4	1	5	2
	25,01±0,39	25,03±0,37	N/A	N/A		

Fonte: o autor.

No entanto, apesar de não ter sido observada degradação nos comprimidos submetidos a umidade de 75% nestes 10 dias, há vários relatos na literatura de que o aumento da umidade em comprimidos esteja associado a reduções, por vezes drásticas, do teor de MSP. A

degradação do MSP em comprimidos foi observada mesmo quando estes estavam expostos a baixos valores de umidade (BERARD et al., 2014; ANYAKORA et al, 2018; HAGEN et al., 2020; BIZIMANA et al., 2021).

Berard et al., 2014, descreveu que a umidade associada a temperaturas de armazenamento de 25°C, aceleram o processo de transformação do IFA em produtos de degradação. Segundo o autor, a única maneira de evitar este tipo de reação é a utilização de blísteres de ALU-ALU selados e destaca que isso deve ser uma recomendação principalmente para países onde os índices de umidade são mais elevados.

Os mecanismos que estão envolvidos em reações de degradação na presença de umidade são usualmente similares àqueles encontrados nas reações presentes em meios ácidos e básicos. Porém, estes desenvolvem velocidades de reação superiores, devidos a presença dos catalisadores e também pelo fato do meio reacional ser essencialmente aquoso (KARARLI et al., 1990; PLUTH; BERGMAN; RAYMOND, 2017). Uma comparação dos espectros de absorção do PD 3 com as impurezas analisadas evidenciou uma similaridade de 0,96 com o MSP tipo A, além disso há uma similaridade alta entre os tempos de retenção deste com aquele. Já o PD4 apresentou uma similaridade de 0,94 com o MSP tipo B. Tais dados nos trazem fortes indícios que o PD3 representa o MSP-A, enquanto o PD4 o MSP-B. Esta foi a única condição de estresse que levou a formação de 4 produtos de degradação.

5.2.4. Degradação oxidante (peróxido de hidrogênio)

O MSP que ficou exposto a solução de peróxido de hidrogênio por 5 (cinco) dias apresentou um incremento de área de 4,94% em relação a amostra padrão e não houve a observação de formação de produtos de degradação. Como observado, houve um acréscimo de sinal que pode ser atribuído a variação analítica. Por não ter ocorrido uma degradação suficiente, a amostra foi analisada novamente no décimo dia e este resultado é trazido na tabela 11.

Após 10 (dez) dias, o teor remanescente de MSP foi de 89,52 %, logo, o decaimento foi de 10,48% em relação a área do MSP padrão e houve a formação de 3 (três) produtos de degradação (figura 12). O balanço de massas para esta condição foi de 98,13% e o sinal analítico do MSP não apresentou coeluição.

Já para os comprimidos que ficaram expostos a esta condição durante 7 dias em temperatura ambiente, observa-se que o teor remanescente de MSP foi de 74,19, ou seja, produziu um decaimento de 25,81 % em relação a área do MSP que não foi exposto à condição

de estresse, levando a formação de 1 (um) PD no tempo de 24,97 min. Estes dados são trazidos e ilustrados na tabela 11 e figura 12, respectivamente. O balanço de massas nesta condição foi de 78,35% e o sinal analítico do MSP apresentou pureza de pico, demonstrando que não houve coeluição.

O balanço de massas obtido pode estar relacionado a formação de produtos de degradação cujo método apresentado não foi capaz ao menos de detectar. Como descrito no início da seção 5.2, a baixa relação quantitativa fármaco/excipientes presente no comprimido prostokos inviabilizou o preparo de amostras mais concentradas e conseqüentemente o valor de MSP na amostra (20 mcg/mL) pode ser inadequado para permitir a detecção destes degradados. O excesso de excipientes presentes na amostra não teve a solubilidade aumentada com maiores tempos de agitação e o uso de aquecimento ou modificadores de pH não foram cogitados, dada a possibilidade de degradação. A concentração da amostra poderia ser uma alternativa, mas pode aumentar consideravelmente o número de etapas de preparo da amostra e precisa ser melhor avaliada.

Já em relação a quantidade de peróxido de hidrogênio utilizada como agente estressor em alguns trabalhos descritos na literatura, temos relatado que sua concentração elevada está associada a uma maior interferência no sinal analítico, principalmente para métodos onde há presença de compostos com baixa retenção. Trabalhos relatam a utilização de catalizadores ou mesmo o simples aquecimento das amostras para remoção do excesso de peróxido, porém estas abordagens podem interferir na taxa de degradação do ativo e até levar a formação de compostos que naturalmente não estariam associados a este tipo de reação (WASYLASCHUK et al., 2006).

Kahsay et al. (2015) investigaram a degradação do MSP na presença de peróxido de hidrogênio 30% por 1 (uma) hora de exposição. Os autores puderam constatar a presença de 5 produtos de degradação e entre eles o 8-epi-MSP, cuja presença foi confirmada pela comparação dos sinais obtidos na degradação forçada com aquele obtido de uma amostra padrão da impureza. Tais resultados, corroboram com os achados neste presente trabalho, uma vez que podemos encontrar uma correlação, entre os tempos de retenção, do PD2 (IFA) e PD1 (Comprimido) obtido nesta condição com o do 8-epi-MSP. A comparação espectral não foi possível de ser realizada neste caso, dada a baixa intensidade de sinal. Mas esta mesma análise foi capaz de evidenciar uma correlação de 0,99 entre o PD3 e o MSP tipo B.

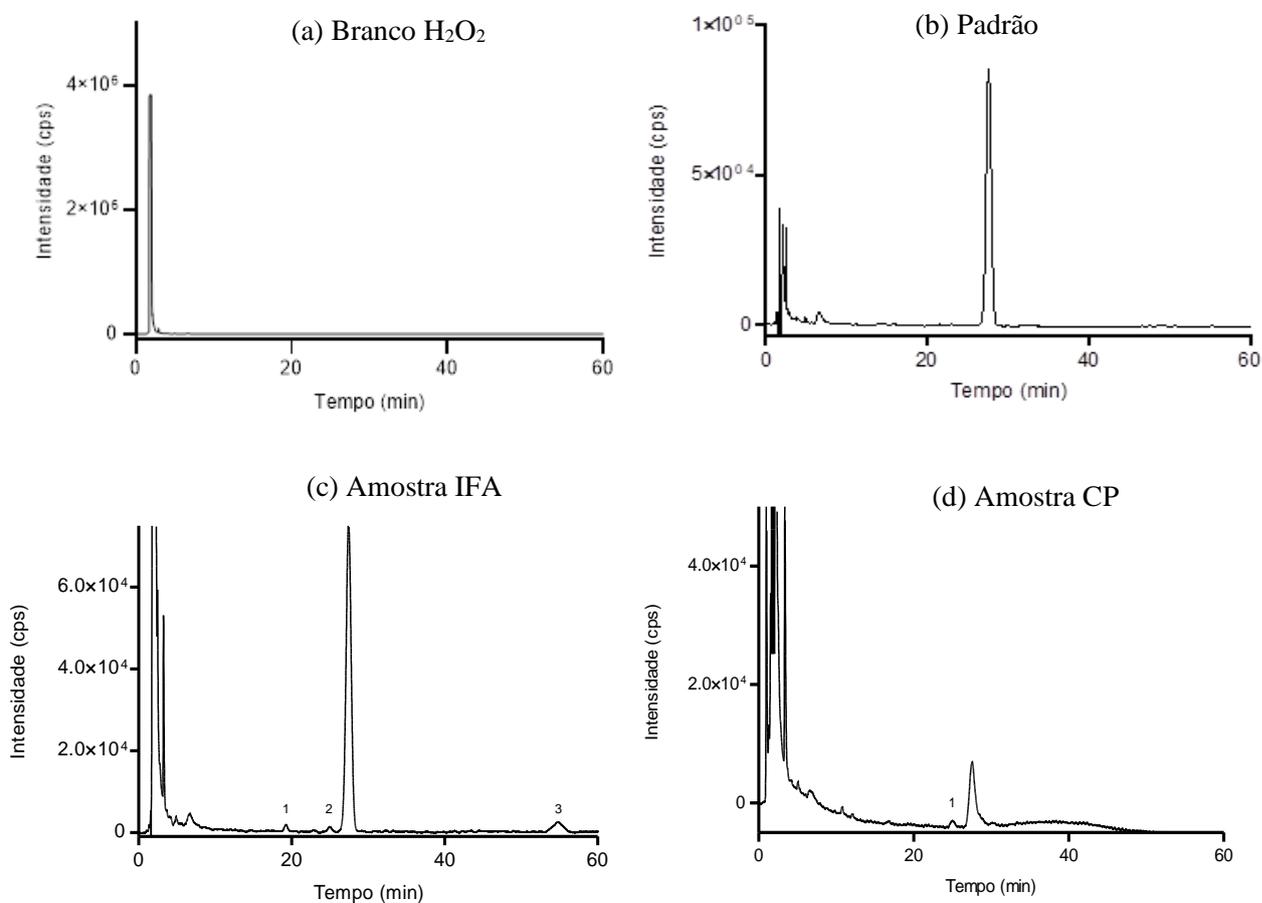
Tabela 11. Resultados brutos para a degradação por peróxido de hidrogênio após 10 dias de exposição.

	MSP_Ref. IFA	MSP_Teste IFA	PD1	PD2	PD3
	MSP Ref. CP	MSP Teste CP			
Parâmetros Cromatográficos Quantitativos					
Réplica_1	4050142	3632382	47542	46973	247512
	848586	605247	38319	N/A	N/A
Réplica_2	4060157	3658288	50320	46654	267097
	856585	634867	34509	N/A	N/A
Réplica_3	4072394	3615639	45350	47513	249962
	830816	641245	32665	N/A	N/A
Média	4060898	3635436	47737	47047	254857
	845329	627120	35164	N/A	N/A
DP	11144	21488	2491	434	10671
	13190	19209	2883	N/A	N/A
DPR	0,27%	0,59%	5,22%	0,92%	4,19%
	1,56%	3,06%	8,20%	N/A	N/A
% Degradado	N/A	10,48	N/A	N/A	N/A
		25,81			
BM	N/A	98,13%	N/A	N/A	N/A
		81,25%			
Parâmetros Cromatográficos Qualitativos Média: (\pm DP)					
Pureza	Atende	Atende	N/C	N/C	Atende
Tr	27,85 \pm 0,32	27,2 \pm 0,23	19 \pm 0,23	24,68 \pm 0,22	54,59 \pm 0,4
	27,41 \pm 0,15	27,49 \pm 0,03	24,97 \pm 0,02	N/A	N/A

Fonte: o autor.

Já o PD1 (IFA) encontrado para esta condição não apresentou correlação com os tempos de retenção das impurezas já descritas para o MSP, nem foram achados dados na literatura para fins de comparação. Uma proposta de mecanismo de reação para formação desta entidade química, bem como os resultados de espectrometria de massas encontram-se descritos na seção 5.6.2.4.

Figura 12. (a) Cromatogramas de branco peróxido de hidrogênio. (b) Padrão MSP. (c) IFA exposto ao peróxido de hidrogênio. (d) Comprimidos expostos ao peróxido de hidrogênio.



Fonte: O autor.

Apesar de ser um assunto ainda pouco discutido, vários relatos da literatura têm demonstrado que a presença de peróxidos, entre eles o peróxido de hidrogênio, está associada a mudança do perfil de estabilidade de fármacos, excipientes e até mesmo de impurezas naturalmente presentes em produtos farmacêuticos (Hartauer et al., 2000; Huang; Garceau; Gao; 2003; Yue et al., 2009). Ainda neste sentido, Wasylaschuk et al. (2007) descreve que a presença de peróxidos em insumos farmacêuticos tem sido responsável por problemas relacionados ao desenvolvimento de novas formulações e por diminuição de tempo de vida útil de muitos produtos. Tais achados reforçam a premissa de que há necessidade de monitoramento da presença dessas substâncias em medicamentos, mesmo que estejam em baixas concentrações.

5.2.5. Degradação sob influência de íons metálicos (sulfato de cobre)

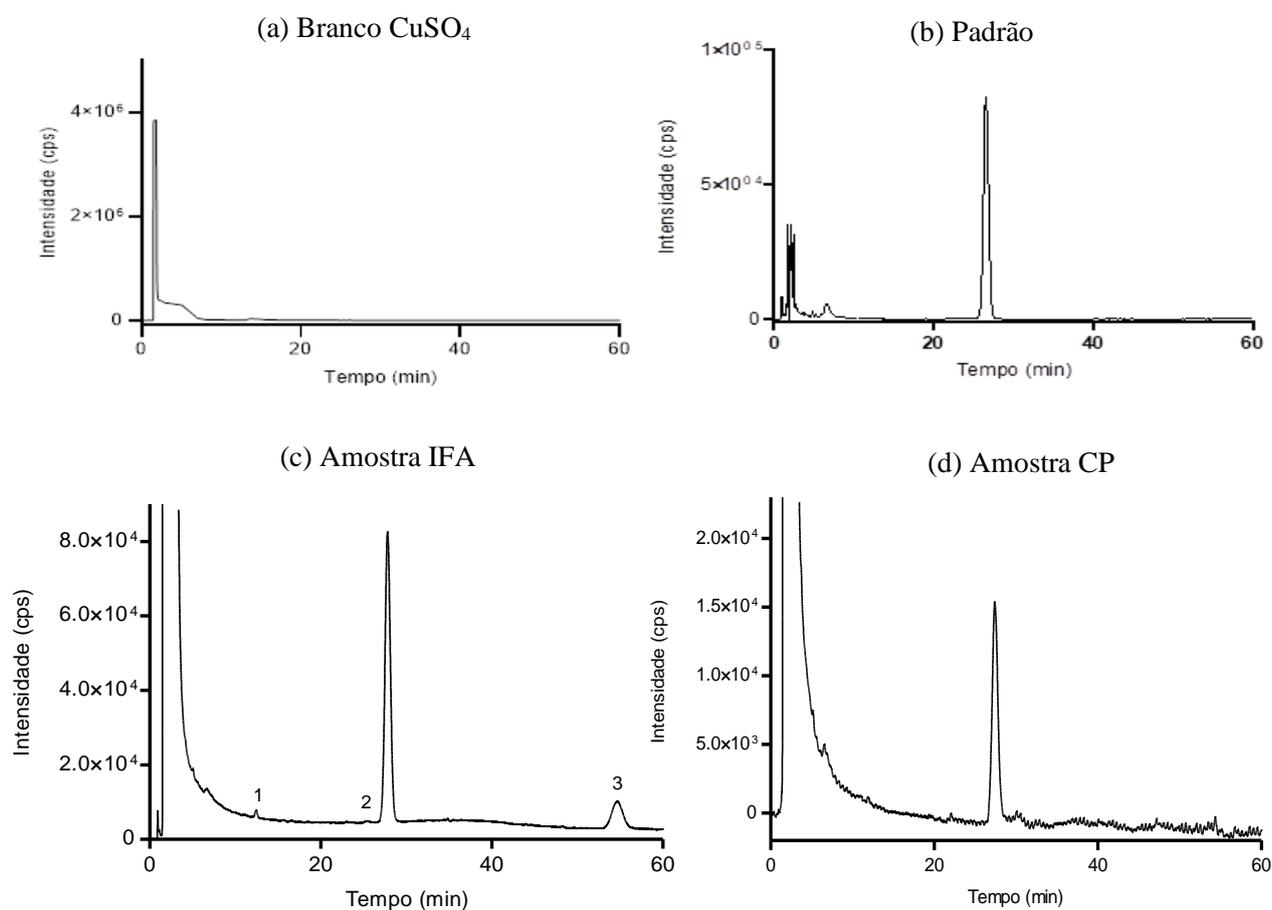
A tabela 12 descreve o resumo dos resultados de degradação obtidos na presença de sulfato de cobre. Observa-se que o teor remanescente de MSP IFA foi de 89,9% após 1 dia de estresse, ou seja, produziu um decaimento de 10,1% em relação a área do MSP que não foi exposto à condição de estresse e levou a formação de 3 (três) produtos de degradação (figura 13). O balanço de massas para esta condição foi de 107,5% e o sinal analítico do MSP apresentou pureza de pico adequada, demonstrando que não houve coeluição.

Já para os comprimidos que ficaram expostos a esta condição durante 7 (sete) dias em temperatura ambiente, de acordo com a tabela 12, observa-se que o teor remanescente de MSP foi de 88,88%, ou seja, produziu um decaimento de 11,12% em relação a área do MSP que não foi exposto à condição de estresse. Porém não foi observada a formação de nenhum produto de degradação, como evidenciado na figura 13. O sinal analítico do MSP apresentou pureza de pico, demonstrando que não houve coeluição e balanço de massas foi de 88,88%, que pode ter ocorrido devido a formação de PDs com baixa intensidade de sinal.

Na literatura não foram encontrados dados relacionados a degradação do MSP na presença do sulfato de cobre. Os íons metálicos, a exemplo do cobre, funcionam como catalizadores de reações, principalmente daquelas que envolvem processos de oxidação. Apesar de ser uma avaliação recomendada na RDC 53 de 2015, pouca tem sido aplicação deste agente nos testes de estresse. O guia ICH Q3B ao recomendar as diferentes condições que devem ser avaliadas inclui apenas reações de oxidação e para isso a grande maioria das abordagens utilizam o peróxido de hidrogênio (ICH, 2006; BRASIL, 2015; HUANG et al., 2015).

Se fizermos uma comparação entre os PDs gerados do IFA na presença do sulfato de cobre com aqueles gerados na presença do peróxido de hidrogênio, podemos perceber que os PDs 2 e 3, em ambos casos, se equivalem em relação ao tempo de retenção. Por isso, possivelmente representam as mesmas entidades químicas (8-epi-MSP e MSP-B, respectivamente) e devem ter sido formados pela presença da água na amostra e não por ação direta do agente de estresse.

Figura 13. (a) Cromatogramas de branco sulfato de cobre. (b) Padrão MSP. (c) IFA exposto ao sulfato de cobre. (d) Comprimidos expostos ao sulfato de cobre.



Fonte: O autor.

Já o PD1 de cada condição apresenta tempos de retenção distintos e não correlacionados com os tempos de retenção das impurezas monitoradas. Porém, o PD1 gerado pela exposição ao sulfato de cobre apresenta o mesmo tempo de retenção do PD1 gerado nas hidrólises ácida e básica. Dessa forma, acredita-se que neste caso estejamos diante de PDs formados por uma ação direta do sulfato de cobre e peróxido de hidrogênio, o que evidencia que se pode esperar resultados diferentes mesmo utilizando agentes estressores que, em teoria, se equivalem.

Tabela 12. Resultados brutos para a sulfato de cobre.

	MSP_Ref. IFA	MSP_Teste IFA	PD1 IFA	PD2 IFA	PD3 IFA
	MSP_Ref. CP	MSP_Teste CP	PD1 CP	PD2 CP	PD3 CP
Parâmetros Cromatográficos Quantitativos					
Réplica_1	4024301	3449641	36897	16580	612965
	867974	777390	N/A	N/A	N/A
Réplica_2	3767009	3465750	38275	17225	668258
	904098	797862	797862	N/A	N/A
Réplica_3	3767650	3475796	35515	18884	634530
	890844	791463	N/A	N/A	N/A
Média	3852987	3463729	36896	17563	638584
	887639	788905	N/A	N/A	N/A
DP	148363	13194	1380	1189	27869
	18274	10473	N/A	N/A	N/A
DPR	3,85%	0,38%	3,74%	6,77	4,36%
	2,06%	1,33%	N/A	N/A	N/A
% Degradado	N/A	10,10	N/A		N/A
		11,12		N/A	
BM	N/A	107,88%	N/A		N/A
		88,88%		N/A	
Parâmetros Cromatográficos Qualitativos média: (+/- DP)					
Pureza	Atende	Atende	N/C	N/C	Atende
Tr	26,21 ± 0,64	27,36 ± 0,40	11,60 ±0,33	24,78 ±0,12	54,04 ±0,57
	27,41±0,15	27,49±0,03	N/A	N/A	N/A

Fonte: o autor.

5.2.6. Degradação fotolítica

5.2.6.1. Luz visível

A tabela 13 e a figura 14 trazem o resumo dos resultados obtidos na degradação forçada para esta condição. Pode-se observar que o teor remanescente de MSP (IFA) foi de 85,37 %, ou seja, produziu um decaimento de 14,63% em relação a área do MSP que não foi exposto à condição de estresse, levando a formação de 1 (um) produto de degradação (figura 14). Para os comprimidos obteve-se um teor remanescente de 90,98%, ou seja, houve decaimento de 9,02% em relação a área do MSP que não foi exposto à condição de estresse.

O balanço de massas para o IFA foi de 87,38% e para os comprimidos foi de 90,98%. Tais achados possivelmente podem ser explicados pela formação de produtos de degradação sem a presença de grupos cromóforos ou de produtos de degradação voláteis o que impossibilita sua detecção pela técnica de análise utilizada (JAMRÓGIEWICZ; WIELGOMAS, 2013; NARAYANAM; SINGH, 2014).

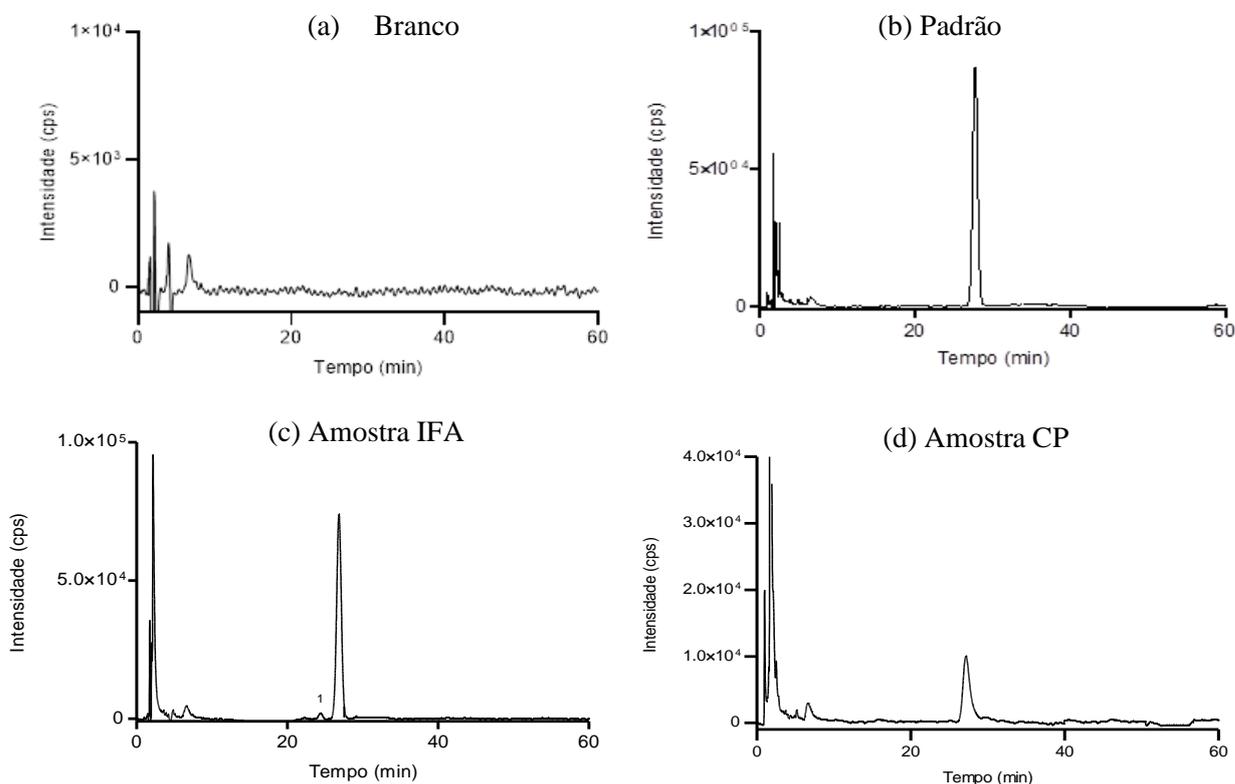
Já as amostras controle do IFA e comprimidos, submetidas a essa mesma condição, apresentaram um teor remanescente e balanço de massas de 100,7%, 98,44% com um decaimento de -0,7%, 1,56%, respectivamente. Isso demonstra que a degradação gerada na amostra exposta a condição de estresse apresentou diminuição de seu teor devido a presença da luz e não por outro fator como a temperatura da câmara.

Tabela 13. Resultados brutos da degradação por luz visível.

	MSP_Ref. IFA	MSP_Teste IFA	MSP_Controlo IFA	PD1 IFA
	MSP_Ref. CP	MSP_Teste CP	MSP_Controlo CP	PD1 CP
Parâmetros Cromatográficos Quantitativos				
Réplica_1	3965821	3474312	4049137	87644
	601563	528902	597307	N/A
Réplica_2	3970358	3300305	3962954	79458
	608636	525112	552124	N/A
Réplica_3	3966811	3376766	3973883	82688
	566577	562544	599693	N/A
Média	3967663	3383794	3995325	83263
	592259	538853	583041	N/A
DP	2386	87216	46922	4123
	22520	20605	26802	N/A
DPR	0,06%	2,58%	0,10%	4,95%
	3,80	3,82	4,60	N/A
%Degradado	N/A	14,72	-0,7	N/A
		9,02	1,56	
BM	N/A	87,38%	100,70	N/A
		90,98	98,44	
Parâmetros Cromatográficos Qualitativos: Média (\pm DP)				
Pureza	Atende	Atende	Atende	Atende
Tr	27,69 \pm 0,03	26,89 \pm 0,04	26,93 \pm 0,07	24,44 \pm 0,05
	25,01 \pm 0,39	25,24 \pm 0,33	24,87 \pm 0,42	N/A

Fonte: o autor.

Figura 14. (a) Cromatogramas de branco fase móvel. (b) Padrão MSP. (c) IFA submetido a luz visível. (d) Comprimido submetida a luz visível.



Fonte: o autor.

5.2.6.2. Luz UV

A tabela 14 descreve o resumo dos resultados obtidos na degradação forçada para esta condição. Pode-se observar que o teor remanescente de MSP (IFA) foi 87,75%, ou seja, produziu um decaimento de 12,25% em relação a área do MSP que não foi exposto à condição de estresse. Já para os comprimidos obteve-se um teor remanescente de MSP 86,92%, ou seja, produziu um decaimento de 13,08% em relação a área do MSP que não foi exposto à condição de estresse. Não foi detectada a presença de produtos de degradação para ambos tipos de amostra (figura 15). O balanço de massas para o IFA foi de 87,6 % e para os comprimidos foi de 86,92% e não foi observada coeluição. A discussão para caso semelhante já foi trazida na seção anterior.

Já as amostras controle do IFA e comprimidos, submetidas a essa mesma condição, apresentaram um teor remanescente e balanço de massas de 99,83 %, 104,64 % com um decaimento de 0,17%, -4,64%, respectivamente. Isso demonstra que a degradação gerada na

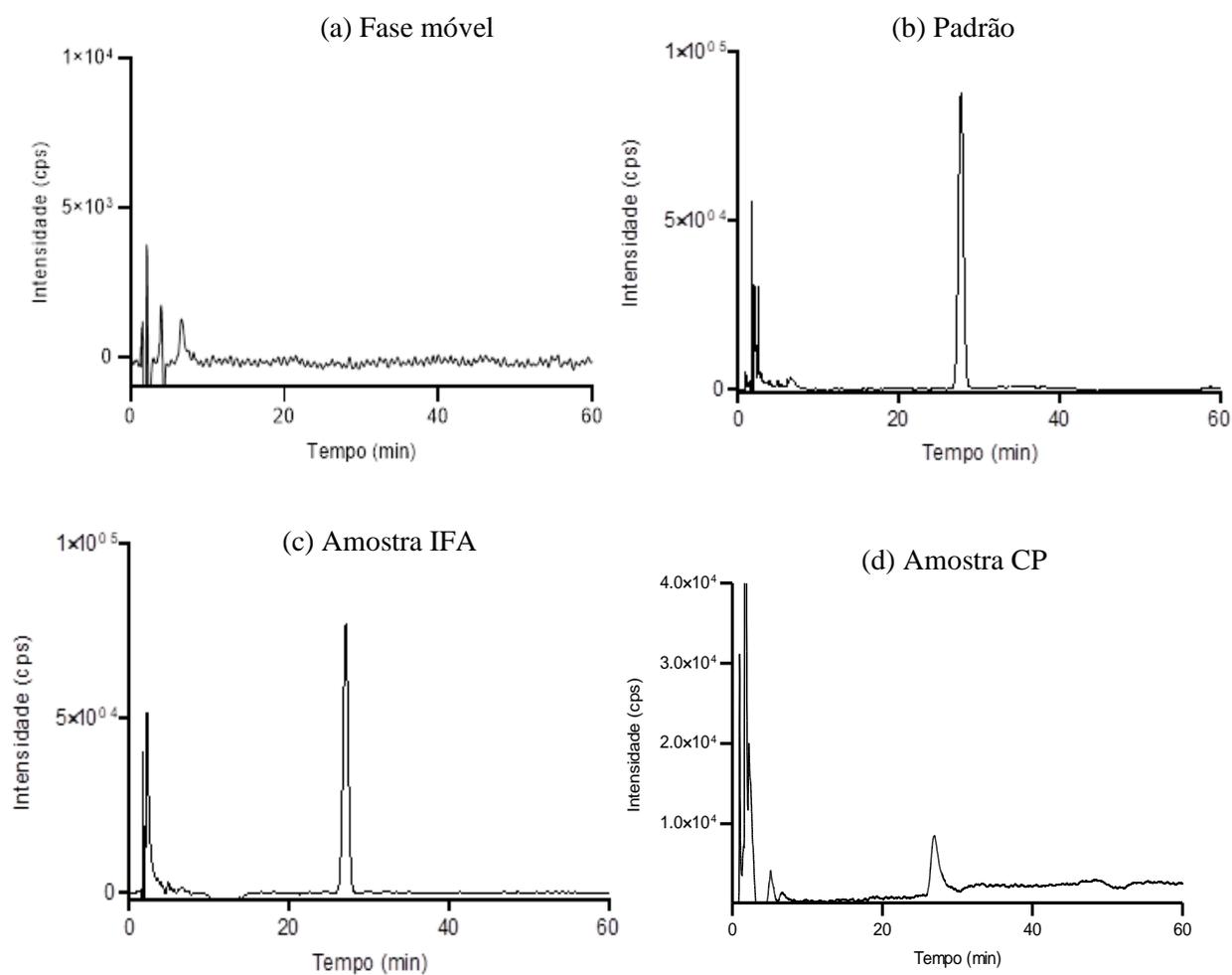
amostra exposta a condição de estresse apresentou diminuição de seu teor devido a presença da luz visível e não por outro fator como a temperatura da câmara.

Tabela 14. Resultados brutos da degradação por luz ultravioleta.

	MSP_Ref. IFA	MSP_Teste IFA	MSP_Controlo IFA
	MSP_Ref. CP	MSP_Teste CP	MSP_Controlo CP
Parâmetros Cromatográficos Quantitativos			
Réplica_1	3965821	3560328	3876945
	601563	497645	619730
Réplica_2	3970358	3391306	4016148
	608636	521690	608470
Réplica_3	3966811	3561907	3989544
	566577	525052	631698
Média	3967663	3504514	3960879
	592259	514796	619730
DP	2386	98044	73896
	22520	14948	11630
DPR	0,06%	2,80%	1,87%
	3,80	2,90	1,88
%Degradado	N/A	11,67	0,17
		13,08	4,64
BM	N/A	88,83	99,933
		86,92	104,64
Parâmetros Cromatográficos Qualitativos: Média (± DP)			
Pureza	Atende	Atende	Atende
Tr	27,69	27,05	27,62
	±0,03	±0,07	±0,10
	25,01	25,15	25,12
	±0,39	±0,01	±0,15

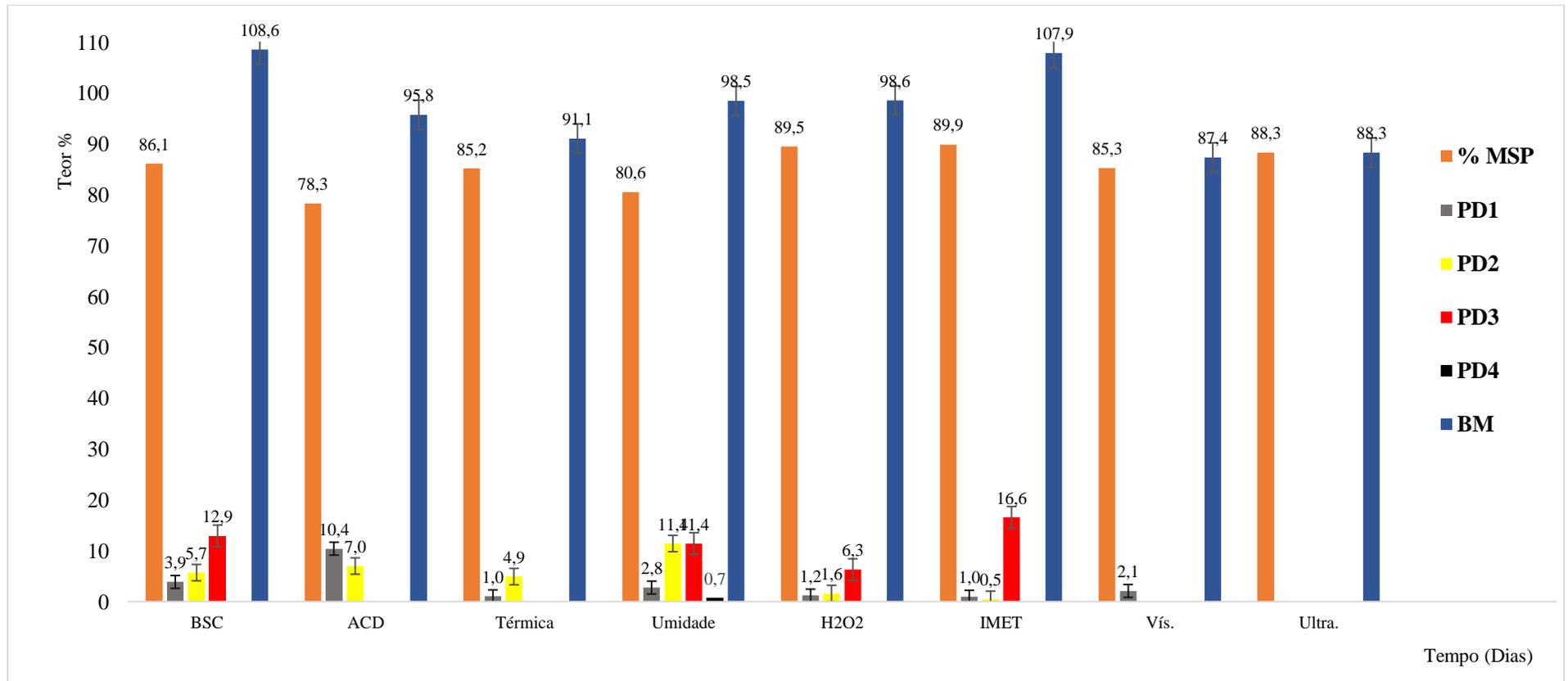
Fonte: o autor.

Figura 15. (a) Cromatogramas de branco fase móvel. (b) Padrão MSP. (c) IFA submetida a luz ultravioleta. (d) Comprimidos submetidos a luz ultravioleta.



Fonte: O autor.

Figura 16. Avaliação do balanço de massas para degradação do MSP IFA nas de estresse básico, ácido, temperatura, umidade, peróxido de hidrogênio, íons metálicos, luz visível e luz ultravioleta, respectivamente.



Fonte: o autor

Os números dos PDs trazidos na figura 16 não representam, necessariamente, o tipo de PD gerado e sim a ordem em que cada um deles aparecem nas amostras de degradação forçada.

5.3. DEGRADAÇÃO FORÇADA DO PLACEBO do comprimido PROSTOKOS® 200mcg

Os resultados obtidos para o placebo do comprimido PROSTOKOS® 200mcg nas diferentes condições de degradação não evidenciaram a formação de nenhum interferente no tempo de retenção do MSP e nem gerou PDs que pudessem ser evidenciados nos cromatogramas analisados.

5.4. ESTUDO DE CINÉTICA DE DEGRADAÇÃO

5.4.1. Cinética de degradação forçada em condição básica

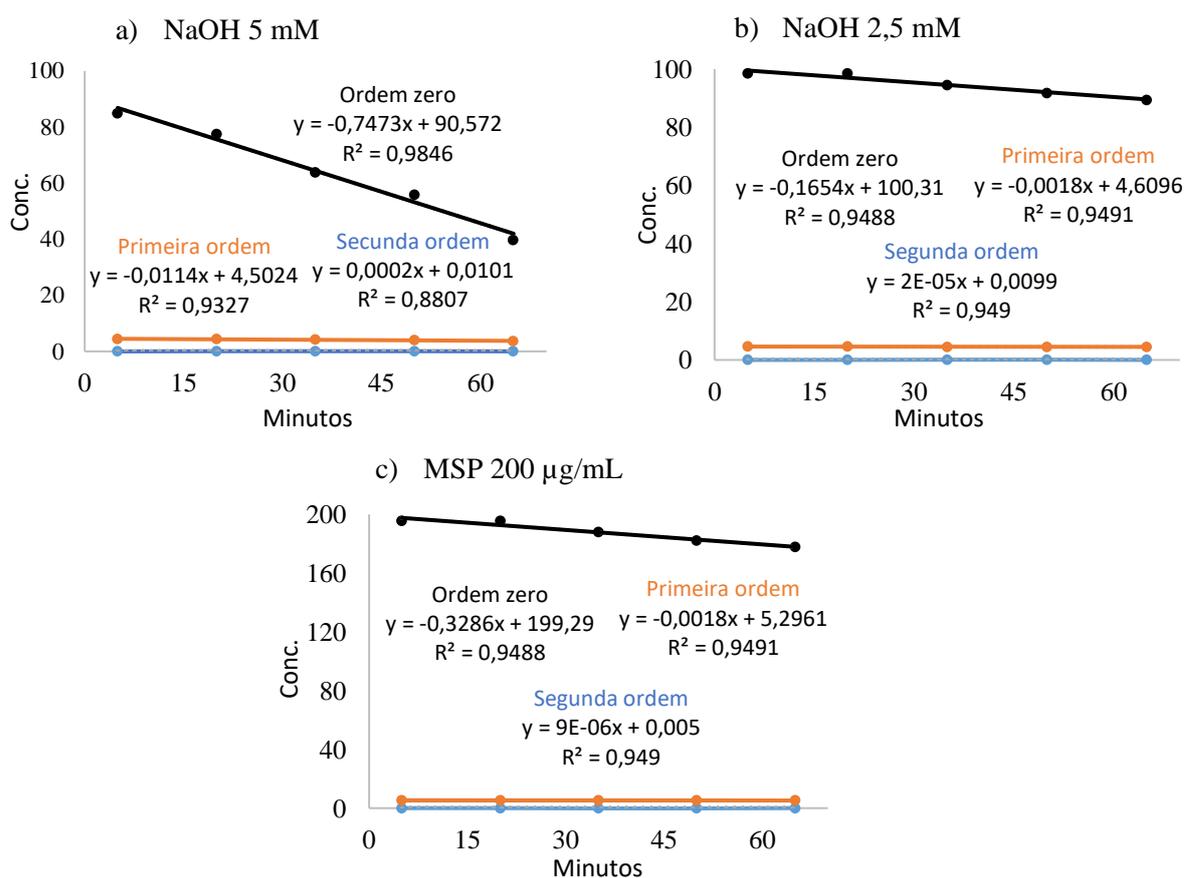
O estudo de cinética de degradação forçada por hidróxido de sódio foi realizado através da observação do decaimento da concentração do MSP 100 µg/mL exposto ao NaOH 2,5 e 5 mM. Além disso, foi investigado o perfil de decaimento do MSP 200 µg/mL exposto o NaOH 5 mM. A partir destes resultados foram construídos os gráficos de regressão linear para definição do perfil cinético que melhor descreve o decaimento da concentração do MSP. Os dados são trazidos na tabela 15.

Ao analisar a figura 17 é possível observar que o decaimento do MSP exposto ao NaOH 5 mM apresentou valor de coeficiente de correlação superior para o modelo de ordem zero (r^2 : 0,9846) quando comparado aos resultados de primeira (r^2 : 0,9327) e segunda ordem (r^2 : 0,8807), respectivamente. Tal resultado demonstra que a degradação do MSP nesta condição experimental parece não depender da concentração do ativo nem da concentração do agente degradante. À primeira vista, tal achado parece não ser condizente com experiências e práticas vivenciadas pelo autor deste trabalho. Uma vez que outras concentrações de NaOH foram utilizadas na fase de desenvolvimento do MIE e a degradação do MSP chegou a ser completa em alguns minutos utilizando NaOH 0,1 M (dados não apresentados).

No entanto, alguns autores demonstraram cinética de ordem zero para o diclofenaco quando na utilização de hidróxido de sódio como agente estressor. Além disso, algo relevante de ser descrito é que os autores evidenciaram que a cinética de ordem zero esteve presente apenas quando a faixa de concentração do diclofenaco foi de 40-80 mg/mL e mudou esse perfil para cinética de primeira ordem quando houve diminuição da concentração do ativo para faixa de 2,5-5 mg/mL (NADDEO et al., 2010). Tais achados demonstram que a exemplo do diclofenaco, o MSP também possa apresentar este duplo perfil a depender da concentração do ativo.

Por outro lado, quando foi utilizado NaOH 2,5 mM e aumentada a concentração de MSP (200 µg/mL) observou-se que para ambos os testes os valores de r^2 foram próximos dentro da mesma condição e iguais quando comparado o mesmo tipo de perfil cinético entre as duas condições. O maior valor obtido foi para o modelo de primeira ordem (r^2 : 0,9491), porém praticamente igual ao de segunda ordem (r^2 : 0,949) e de ordem zero (r^2 : 0,9488).

Figura 17. Representação gráfica das cinéticas de ordem zero, primeira ordem e segunda ordem para a degradação de MSP submetido a hidrólise básica.



Fonte: o autor.

Dessa forma, os parâmetros cinéticos de constante da velocidade de degradação (k), meia-vida de degradação ($T_{1/2}$) e meia vida-útil ($T_{90\%}$) foram calculados levando em consideração o modelo de ordem zero como o mais adequado para o teste com NaOH 5 mM; para os demais testes calculou-se os parâmetros para todos os modelos cinéticos a fim de determinar aquele que apresentara a melhor predizibilidade. Os dados são trazidos na tabela 16.

Tabela 15. Dados de C (concentração em $\mu\text{g/mL}$), Log C (logaritmo neperiano da concentração) e 1/C (inverso da concentração) adquiridos em análise da solução de do MSP IFA submetida a degradação básica.

Tempo (min)	Condição	C	Ln C	1/C
5	NaOH 2,5 mM	98,45	4,590	0,01016
	NaOH 5 mM	84,98	4,442	0,0118
	MSP 200 $\mu\text{g/mL}$	19,56	2,973	0,0511
20	NaOH 2,5 mM	98,45	4,590	0,01016
	NaOH 5 mM	77,56	4,213	0,0148
	MSP 200 $\mu\text{g/mL}$	19,56	2,974	0,0511
35	NaOH 2,5 mM	94,54	4,549	0,01058
	NaOH 5 mM	63,89	4,157	0,0157
	MSP 200 $\mu\text{g/mL}$	18,78	2,933	0,0532
50	NaOH 2,5 mM	91,73	4,519	0,01090
	NaOH 5 mM	55,88	4,023	0,0179
	MSP 200 $\mu\text{g/mL}$	18,22	2,903	0,0549
65	NaOH 2,5 mM	89,41	4,493	0,01118
	NaOH 5 mM	39,77	3,683	0,0251
	MSP 200 $\mu\text{g/mL}$	17,76	2,877	0,0563

Fonte: o autor.

Ao fazer uma comparação entre os dados obtidos para as cinéticas de ordem zero, a constante de degradação para a amostra em NaOH 5 mM foi de 3,005 $\mu\text{g/min}$, o que representa um valor em cerca de 18,43 vezes maior que quando foi utilizado NaOH 2,5 mM e 8,46 vezes maior que quando utilizado NaOH na mesma concentração e o dobro da concentração do ativo. Os resultados mostram não haver relação diretamente proporcional entre as concentrações dos agentes degradantes ou a concentração do ativo e a variação desses parâmetros promoveu um aumento considerável nos tempos de T90% e T1/2.

Tabela 16. Parâmetros cinéticos calculados para o MSP na degradação básica.

NaOH 5 mM			
Parâmetro	Ordem zero	Primeira ordem	Segunda ordem
k	3,005	NA	
T1/2	16,64		
T90	3,33		
NaOH 2,5 mM			
Parâmetro	Ordem zero	Primeira ordem	Segunda ordem
k	0,163	0,002	1,822E-05
T1/2	306,97	402,513	548,93
T90	61,39	60,99	60,993
MSP 200 µg/mL			
Parâmetro	Ordem zero	Primeira ordem	Segunda ordem
k	0,355	0,002	9,73964E-06
T1/2	281,68	372,819	1.026,73
T90	56,34	56,49	57,041

Fonte: o autor.

5.4.2. Cinética de degradação forçada em condição ácida

O estudo de cinética de degradação forçada por ácido clorídrico foi realizado através da observação do decaimento da concentração do MSP 100 µg/mL exposto ao HCl 0,1 M e HCl 0,2 M. Além disso, foi investigado o perfil de decaimento do MSP 200 µg/mL exposto o HCl 0,2 M. A partir destes resultados foram construídos os gráficos de regressão linear para definição do perfil cinético que melhor descreve o decaimento da concentração do MSP. Os dados são trazidos na tabela 17.

Com base na análise da figura 18 foi possível observar que o decaimento do MSP exposto ao HCl 0,2 M apresentou valor de coeficiente de correlação próximo entre os diferentes modelos cinéticos. Porém, ligeiramente superior para o modelo de segunda ordem ($r^2:0,9959$), quando o comparamos aos resultados de primeira ordem ($r^2: 0,9904$) e ordem zero ($r^2: 0,9943$). Dessa forma, podemos inferir que a velocidade de degradação do MSP em meio ácido depende prioritariamente da concentração do ativo e do HCl ou do quadrado das concentrações de um desses (BHANGARE et al., 2022). Fotodegradação de formametilflavina em solução ácida, termólise de formametilflavina, hidrólise de ésteres em solução alcalina já foram relatadas seguindo reação de degradação de segunda ordem (AHMAD et al. 2006; AHMAD; VAID, 2011).

Tabela 17. Dados de C (concentração em $\mu\text{g/mL}$), Log C (logaritmo neperiano da concentração) e 1/C (inverso da concentração) adquiridos em análise da solução de do MSP IFA submetida a degradação ácida.

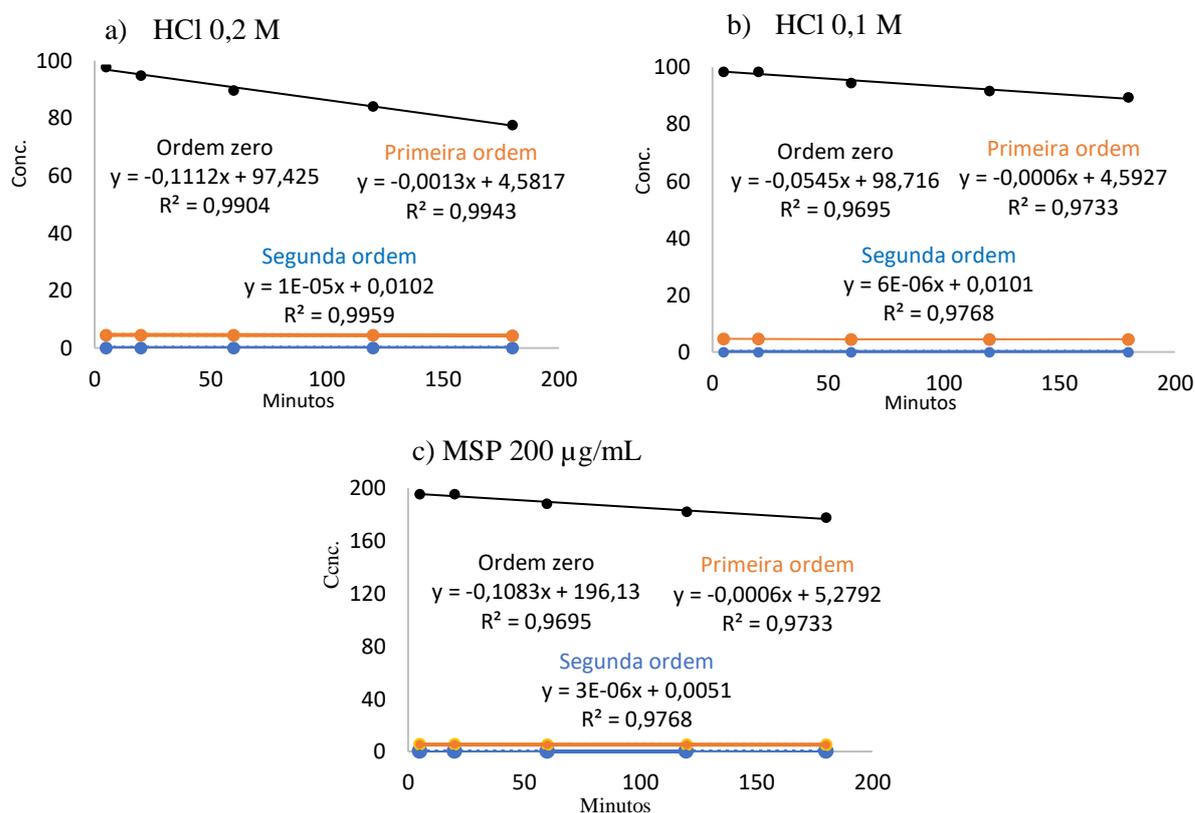
Tempo (min)	Condição	C	Ln C	1/C
5	HCl 0,1 M	98,45	4,590	0,01016
	HCl 0,2 M	97,93	4,584	0,0102
	MSP 200 $\mu\text{g/mL}$	195,60	5,276	0,0051
20	HCl 0,1 M	195,63	5,276	0,0051
	HCl 0,2 M	98,46	4,590	0,01016
	MSP 200 $\mu\text{g/mL}$	195,63	5,276	0,0051
60	HCl 0,1 M	94,54	4,549	0,01058
	HCl 0,2 M	89,69	0,0111	4,496
	MSP 200 $\mu\text{g/mL}$	187,83	0,0053	5,236
120	HCl 0,1 M	91,73	0,01090	4,519
	HCl 0,2 M	84,16	0,0119	4,433
	MSP 200 $\mu\text{g/mL}$	182,25	0,0055	5,205
180	HCl 0,1 M	89,41	0,01118	4,493
	HCl 0,2 M	77,72	4,353	0,0129
	MSP 200 $\mu\text{g/mL}$	177,64	0,0056	5,180

Fonte: o autor.

Quando houve diminuição da concentração do agente degradante (0,1 M) ou aumento da concentração do MSP (200 $\mu\text{g/mL}$) notou-se uma diminuição do coeficiente de correlação com valor máximo de 0,9768 em ambos os casos, revelando a manutenção do perfil cinético de degradação em segunda ordem. Dentro da comparação desses dois parâmetros observou-se também que para todos os modelos cinéticos calculados, o valor de R^2 foi igual.

Considerando o modelo de segunda ordem o mais adequado em todos os cenários avaliados, foram calculados a constante de velocidade de degradação (k) e os parâmetros cinéticos de meia-vida de degradação ($T_{1/2}$) e meia vida-útil ($T_{90\%}$), como trazido na tabela 18.

Figura 18. Representação gráfica das cinéticas de ordem zero, primeira ordem e segunda ordem para a degradação de MSP submetido a hidrólise ácida.



Fonte: o autor.

Tabela 18. Parâmetros cinéticos calculados para o MSP na degradação ácida.

Parâmetros	HCl 0,2 M	HCl 0,1 M	MSP 200 $\mu\text{g/mL}$
k ($\mu\text{g/min}$)	0,0018	0,0006	0,0008
T_{90%} (min)	381,99	1114,652	894,767
T_{1/2} (min)	57,88	168,887	135,571

Fonte: o autor.

A constante de degradação para a amostra em HCl 0,2 M foi de 0,0018 $\mu\text{g/min}$, o que representa um valor 3 (três) vezes maior que quando foi utilizado HCl 0,1 M e 2,25 vezes maior que quando utilizada a amostra de MSP na concentração 200 $\mu\text{g/mL}$. De forma esperada, os valores de T_{90%} e T_{1/2} para o HCl 0,1 M foram de 2,92 vezes maior que quando foi utilizado o HCl 0,2 M. Já quando utilizado o MSP 200 $\mu\text{g/mL}$, os valores de T_{90%} e T_{1/2} foram de 2,34 vezes maior que quando foi utilizado o HCl 0,2 M.

5.5. VALIDAÇÃO DO MÉTODO INDICATIVO DE ESTABILIDADE

5.5.1. Validação de MIE - IFA

5.5.1.1. Seletividade

A análise das amostras de fase móvel, HPMC, NaOH, HCl e H₂O₂ não evidenciaram presença de sinal interferente no tempo de retenção do MSP, demonstrando que os constituintes do eluente, bem como as soluções de degradação não interferem na quantificação do MSP. Logo, a metodologia se apresenta seletiva para estas condições. Os resultados do estudo da seletividade estão descritos na tabela 19.

Tabela 19. Dados do estudo da seletividade (IFA).

Nome da amostra	Tempo de retenção (min)	Área	Pratos teóricos	Índice de pureza
MSP_Padrão	25,2	2291314	1929	1.0
MSP_Dispersão	25,0	2974525	1184	1.0
Branco_Fase_movel	-	-	-	-
Branco_HPMC	-	-	-	-
Branco_NaOH	-	-	-	-
Branco_HCl	-	-	-	-
Branco H ₂ O ₂	-	-	-	-
Branco_IMET	-	-	-	-

Fonte: o autor.

5.5.1.2. Linearidade

Os resultados do estudo de linearidade estão descritos nesta seção e a tabela 21 mostra os dados experimentais obtidos e a estatística descritiva com o Desvio Padrão Relativo (DPR) abaixo de 3% para todos os níveis de concentração. A tabela 20 traz um resumo das avaliações realizadas para comprovação da linearidade de acordo com a RDC 166 de 2017.

Tabela 20. Estatística descritiva para linearidade (IFA).

Teste	Conclusão
Teste F da ANOVA	Não rejeitamos a significância do modelo linear
Teste do coeficiente angular	Coeficiente angular é diferente de zero
Coeficiente de Correlação de Pearson	$R = 0,994 > 0,99$
Teste de Normalidade dos Resíduos	Não rejeitamos a hipótese de normalidade dos resíduos
Teste de Homocedasticidade	Não rejeitamos a homocedasticidade da variância

Fonte: o autor.

Tabela 21. Dados brutos da linearidade e estatística descritiva (IFA)

#	Nível	Concentração teórica (µg/mL)	Resposta (área)	Média	DP	DPR(%)
1	CC1	80	1992376			
2	CC1	80	1905598	1933320	51175	2,65%
3	CC1	80	1901987			
4	CC2	90	2190198			
5	CC2	90	2129498	2168720	34019	1,57%
6	CC2	90	2186464			
7	CC3	100	2472134			
8	CC3	100	2440206	2440321	31756	1,30%
9	CC3	100	2408622			
10	CC4	110	2713948			
11	CC4	110	2703006	2674974	58286	2,18%
12	CC4	110	2607968			
13	CC5	120	2957381			
14	CC5	120	2926658	2914871	49469	1,70%
15	CC5	120	2860573			

Fonte: o autor.

O resultado da análise do coeficiente angular mostrou que como P-valor (0) do teste F da ANOVA é menor que 0,05 (conforme especificado), logo rejeitamos a hipótese nula

(coeficiente angular zero) ao nível de significância de 5%. Os dados da ANOVA estão na tabela 22.

Tabela 22. Dados da ANOVA para avaliação do coeficiente angular (IFA).

	G.L.	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	Estat. F	P-valor
Concentração	1	1829314284194,6	1829314284194,6	1067,2174	0
Resíduos	13	22283262092,5369	1714097084,0413		

Fonte: Action Stat output.

A tabela 23 mostra os dados da avaliação do coeficiente de correlação (0.994) que é maior que 0.990 (conforme especificado), então concluímos que existe uma relação linear adequada.

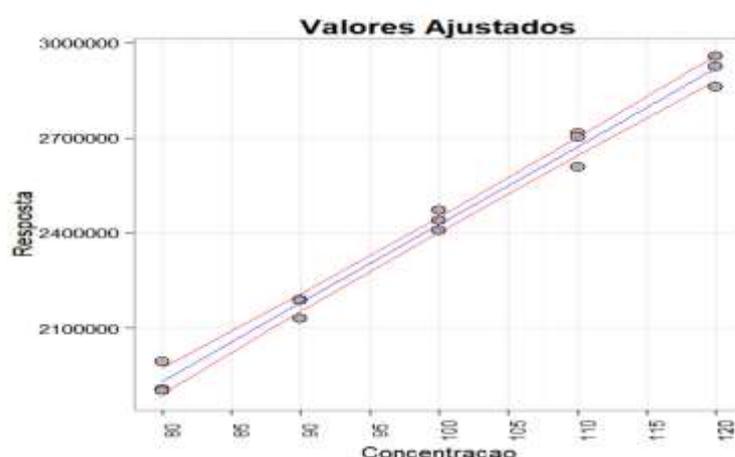
Tabela 23. Medida descritiva da qualidade do ajuste (IFA)

Desvio Padrão dos Resíduos	Graus de Liberdade	R ²	Coefficiente de Correlação
41401,6556	13	0,988	0,994

Fonte: Action Stat output.

O diagrama de dispersão mostrado na figura 19 é um gráfico que permite a visualização de uma possível associação entre variáveis quantitativas. A equação da reta obtida pelo modelo é $y = 24694 (23061 - 26327) x - 42914 (-207838 - 122011)$.

Figura 19. Gráfico de dispersão das retas obtidas (IFA)



Fonte: Action Stat output.

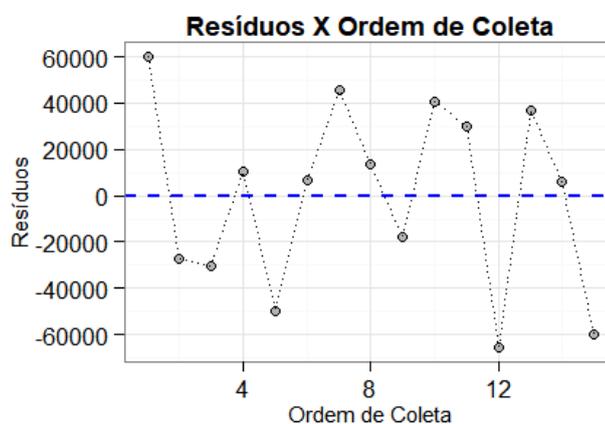
Os dados da avaliação estatística da distribuição dos resíduos são mostrados na tabela 24. Como P-valor (0,4802) do teste de Shapiro-Wilk é maior que 0,05, logo não rejeitamos a hipótese de normalidade dos resíduos ao nível de significância de 5%. A Figura 20 traz o diagnóstico dos resíduos do modelo.

Tabela 24. Teste de normalidade dos resíduos (IFA).

	Estatística	P-valor
Shapiro-Wilk	0,9471	0,4802

Fonte: Action Stat output.

Figura 20. Análise dos resíduos do modelo (IFA)



Fonte: Action Stat output.

Os dados da avaliação estatística da homoscedasticidade são mostrados na tabela 25.

Tabela 25. Teste de Homocedasticidade - Breusch Pagan (IFA).

Estatística	GL	P-valor
0,2325	1	0,6296

Fonte: Action Stat output.

Como P-valor (0,6296) do Teste de Breusch Pagan é maior que 0,05 (conforme proposto), não rejeitamos a hipótese de igualdade das variâncias ao nível de significância de 5%. Logo, temos um modelo homocedástico.

5.5.2. Faixa de trabalho, limite de detecção e limite de quantificação

A faixa de trabalho estabelecida foi de 80 $\mu\text{g/mL}$ a 120 $\mu\text{g/mL}$. Os cálculos realizados mostraram um desvio padrão de resíduos de 41402 um coeficiente angular de 24694, com isso o LD foi estabelecido como 5,53 $\mu\text{g/mL}$ e o limite de quantificação como 16,77 $\mu\text{g/mL}$.

5.5.3. Precisão

Os resultados da precisão ao nível da repetibilidade estão descritos na tabela 26. Os resultados encontram-se abaixo do especificado no método, que foi o valor de 5% para o DPR, logo o método apresenta repetibilidade adequada.

Tabela 26. Resultados da Repetibilidade (IFA).

Concentração teórica ($\mu\text{g/mL}$)	Concentração experimental ($\mu\text{g/mL}$)	Média	DP	DPR(%)
80	83,12			
80	77,33	81,56	3,38	4,14%
80	83,24			
100	102,06			
100	96,45	101,03	3,33	3,29%
100	96,15			
120	122,65			
120	117,72	121,33	2,47	2,03%
120	120,19			

Fonte: o autor.

Os resultados experimentais e a estatística descritiva da precisão intermediária estão descritos na tabela 27. O resultado da comparação estatística entre diferentes dias e diferentes analistas para o CB, o CM e o CA estão nas tabelas 28,29 e 30, respectivamente.

Os dados descritivos mostram que o maior DPR foi de 4,16%. A análise estatística mostra que todos os P valores foram maiores que 0,05 indicando que não tem efeito de dia e analista nos níveis de concentração estudados, logo o método apresentou precisão intermediária adequada.

Tabela 27. Dados experimentais da precisão intermediária (IFA)

	Analista 1						Analista 2					
	Dia 1			Dia 2			Dia 1			Dia 2		
	CB	CM	CA	CB	CM	CA	CB	CM	CA	CB	CM	CA
Réplica 1	83,12	102,06	122,65	81,37	99,40	117,18	78,82	99,57	119,37	79,67	99,03	120,36
Réplica 2	77,33	96,45	117,72	81,05	100,03	119,49	80,75	101,81	121,92	80,18	100,7	119,26
Réplica 3	83,24	96,15	120,19	83,20	97,43	116,85	79,97	101,08	121,23	79,85	100,01	122,55
Media	81,23	98,22	120,19	81,87	98,95	117,84	79,85	100,82	120,84	79,9	99,913	120,72
DP	3,38	3,33	2,47	1,16	1,36	1,44	0,97	1,14	1,32	0,26	0,84	1,67
DPR(%)	4,16%	3,39%	2,05%	1,42%	1,37%	1,22%	1,22%	1,13%	1,09%	0,32%	0,84%	1,39%

Fonte: o autor.

Tabela 28. ANOVA da precisão intermediária do CB (IFA).

	G.L.	Soma dos quadrados	Quadrados Médios	Estatística F	P-Valor
Dia	1	0,364	0,364	0,1179	0,7392
Analista	1	8,4504	8,4504	2,7364	0,1325
Repetitividade	9	27,7936	3,0882		

Fonte: o autor.

Tabela 29. ANOVA da precisão intermediária do CM (IFA).

	G.L.	Soma dos quadrados	Quadrados Médios	Estatística F	P-Valor
Dia	1	0,0225	0,0225	0,0064	0,9382
Analista	1	9,5052	9,5052	2,6835	0,1358
Repetitividade	9	31,8785	3,5421		

Fonte: o autor.

Tabela 30. ANOVA da precisão intermediária do CA (IFA).

	G.L.	Soma dos quadrados	Quadrados Médios	Estatística F	P-Valor
Dia	1	4,551	4,551	1,4071	0,2659
Analista	1	9,381	9,381	2,9004	0,1228
Repetitividade	9	29,1098	3,2344		

Fonte: o autor.

5.5.4. Exatidão

Os resultados experimentais e a estatística descritiva da exatidão estão descritos na tabela 31. A análise estatística mostrada na tabela 32. Como o intervalo de confiança para a média está contido dentro da margem de equivalência, concluímos que existe equivalência ao nível de significância de 5%. Logo, a recuperação atende ao critério de aceitação.

Tabela 31. Dados experimentais da exatidão (IFA).

Concentração teórica (µg/mL)	Concentração experimental (µg/mL)	Recuperação (%)
80	83,12	103,90
80	77,33	96,66
80	83,24	104,05
100	102,06	102,06
100	96,45	96,45
100	96,15	96,15
120	122,65	102,21
120	117,72	98,10
120	120,19	100,16

Fonte: o autor.

Tabela 32. Dados estatísticos da exatidão (IFA).

Item	Valores
Recuperação	99,97
Desvio Padrão	3,22
Graus de Liberdade	8
Limite Inferior	97,98
Limite Superior	101,97
Limite Inferior (Especificação)	95
Limite Superior (Especificação)	105

Fonte: o autor.

5.5.5. Robustez

Os resultados experimentais e a estatística descritiva do teste de robustez estão descritos na tabela 33. As análises estatísticas estão descritas nas Tabelas 34 e 35 para fluxo e temperatura, respectivamente. Os resultados mostram que o efeito do fluxo foi significativo na resposta analítica, visto que o p valor (0,029340517) foi menor que 0,05. Já para a temperatura não houve efeito significativo, pois o p valor (0,872490329) foi maior que 0,05.

Tabela 33. Dados experimentais da Robustez (IFA).

	Fluxo (mL/min)			Temperatura (°C)		
	0,9	1,0	1,1	49	50	51
Réplica 1	102,46	102,06	96,23	98,29	102,06	101,28
Réplica 2	101,3	96,45	95,17	98,01	96,45	100,75
Réplica 3	102,64	96,15	96,98	99	96,15	95,82
Média	102,13	98,22	96,13	98,43	98,22	99,28
DP	0,73	3,33	0,91	0,51	3,33	3,01
DPR (%)	0,71%	3,39%	0,95%	0,52%	3,39%	3,03%

Fonte: o autor.

Tabela 34. ANOVA do efeito do fluxo (IFA).

	G.L.	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	Estat. F	P-valor
Fluxo	2	55,77626667	27,88813333	6,72669579	0,029340517
Resíduos	6	24,87533333	4,145888889		

Fonte: o autor.

Tabela 35. Anova do efeito da temperatura (IFA).

	G.L.	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	Estat. F	P-valor
Temperatura	2	1,898688889	0,949344444	0,139552242	0,872490329
Resíduos	6	40,81673333	6,802788889		

Fonte: o autor.

5.5.6. Validação de MIE – comprimido

5.5.6.1. Seletividade

A análise das amostras de fase móvel, HPMC, NaOH, HCl e H₂O₂, mucosa vaginal, tampão fosfato e placebo não evidenciaram presença de sinal interferente no tempo de retenção do MSP, demonstrando que os constituintes do eluente, bem como as soluções de degradação não interferem na quantificação do MSP. Logo, a metodologia se apresenta seletiva para estas condições. Os resultados do estudo da seletividade estão descritos na tabela 36.

Tabela 36. Dados do estudo da seletividade (CP).

Nome da amostra	Tempo de retenção (min)	Área	Pratos teóricos	Índice de pureza
MSP_Padrão	27,41	1352649	1835	1.0
MSP_CP	27,49	1378358	1752	1.0
Branco_Fase_móvel	-	-	-	-
Branco_HPMC	-	-	-	-
Branco_NaOH	-	-	-	-
Branco_HCl	-	-	-	-
Branco H ₂ O ₂	-	-	-	-
Branco_IMET	-	-	-	-
Mucosa vaginal	-	-	-	-
Tampão fosfato	-	-	-	-
Placebo	-	-	-	-

Fonte: o autor.

5.5.6.2. Linearidade

A tabela 37 traz um resumo das avaliações realizadas para comprovação da linearidade de acordo com a RDC 166 de 2017. Os resultados do estudo de linearidade estão descritos nesta seção e a tabela 38 mostra os dados experimentais obtidos e a estatística descritiva com o Desvio Padrão Relativo (DPR) abaixo de 1,5% para todos os níveis de concentração.

Tabela 37. Dados experimentais da linearidade e estatística descritiva (CP).

Teste	Conclusão
Teste F da ANOVA	Não rejeitamos a significância do modelo linear
Teste do coeficiente angular	Coefficiente angular é diferente de zero
Coefficiente de Correlação de Pearson	$R = 0.9976 > 0,99$
Teste de Homocedasticidade	Não rejeitamos a homocedasticidade da variância

Fonte: o autor.

Tabela 38. Dados brutos da linearidade e estatística descritiva (CP).

Nível	Concentração teórica ($\mu\text{g/mL}$)	Resposta (área)	Média	DP	DPR (%)	
1	CC1	8	397351			
2	CC1	8	395348	396015,7	1156,433	0,29
3	CC1	8	395348			
4	CC2	16	1098892			
5	CC2	16	1115612	1104465	9653,297	0,87
6	CC2	16	1098892			
7	CC3	18	1254422			
8	CC3	18	1253487	1253799	539,8225	0,04
9	CC3	18	1253487			
10	CC4	20	1352649			
11	CC4	20	1378358	1361219	14843,1	1,09
12	CC4	20	1352649			
13	CC5	22	1517022			
14	CC5	22	1523162	1519069	3544,931	0,23
15	CC5	22	1517022			
16	CC6	24	1685602			
17	CC6	24	1697429	1689544	6828,322	0,40
18	CC6	24	1685602			

Fonte: o autor.

O resultado da análise do coeficiente angular mostrou que como P-valor (0) do teste F da ANOVA é menor que 0,05 (conforme especificado) rejeitamos a hipótese nula (coeficiente angular zero) e aceitamos a hipótese alternativa (coeficiente angular diferente de zero) ao nível de significância de 5%. Os dados da ANOVA estão na Tabela 39.

Tabela 39. Dados da ANOVA para avaliação do coeficiente angular (CP).

	G.L.	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	Estat. F	P-valor
Concentração	1	3056128074274.13	3056128074274.13	3371.2385	0
Resíduos	16	14504476524.9778	906529782.8111		

Fonte: o autor.

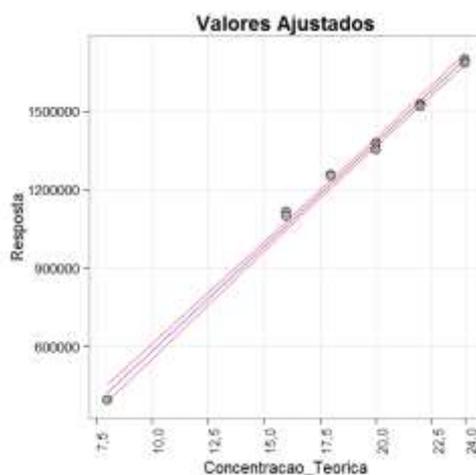
A tabela 40 mostra os dados da avaliação do coeficiente de correlação (0.9976) que é maior que 0.990 (conforme especificado), então concluímos que existe uma relação linear adequada.

Tabela 40. Medida descritiva da qualidade do ajuste (CP).

Desvio Padrão dos Resíduos	Graus de Liberdade	R²	Coefficiente de Correlação
30108.633	16	0.9953	0.9976

Fonte: Action Stat output.

O diagrama de dispersão mostrado na figura 21 é um gráfico que permite a visualização de uma possível associação entre variáveis quantitativas. A equação da reta obtida pelo modelo é $y = 24694 (23061 - 26327) x - 42914 (-207838 - 122011)$.

Figura 21. Gráfico de dispersão das retas obtidas (CP).

Fonte: Action Stat output.

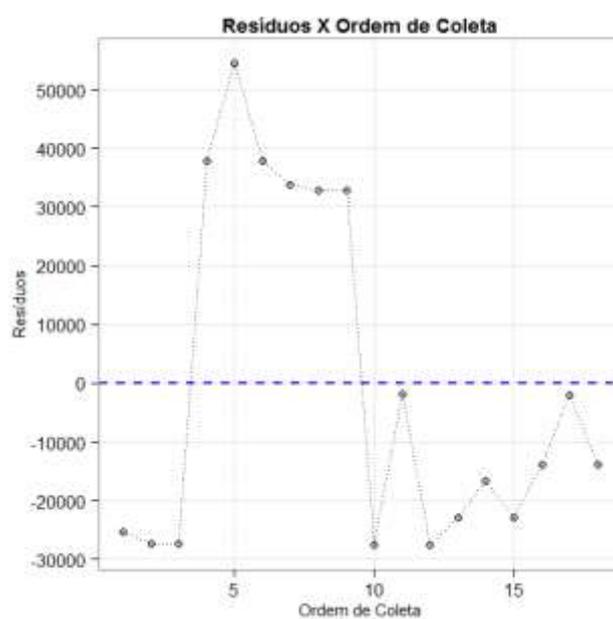
Os dados da avaliação estatística da distribuição dos resíduos são mostrados na tabela 41. Como P-valor (0,2609) do teste de Shapiro-Wilk é maior que 0,05, aceitamos a hipótese nula (distribuição normal dos resíduos) e rejeitamos a hipótese alternativa ao nível de significância de 5%. A Figura 22 traz o diagnóstico dos resíduos do modelo.

Tabela 41. Teste de normalidade dos resíduos (CP).

	Estatística	P-valor
Shapiro-Wilk	0,9287	0,2609

Fonte: Action Stat output.

Figura 22. Análise dos resíduos do modelo (CP).



Fonte: Action Stat output.

Os dados da avaliação estatística da homoscedasticidade são mostrados na tabela 42.

Tabela 42. Teste de Homocedasticidade - Breusch Pagan (CP).

Estatística	GL	P-valor
0.5886	3	0.0707

Fonte: Action Stat output.

Como P-valor (0.0707) do Teste de Cochran é maior que 0,05 (conforme proposto), não rejeitamos a hipótese de igualdade das variâncias ao nível de significância de 5%. Logo, temos um modelo homocedástico.

Além disso, os testes de linearidade revelaram existência de proporcionalidade entre a resposta do sinal e os níveis de concentração. O intervalo linear do método foi de 8– 24 µg/mL, com uma equação linear típica para a curva de calibração de $y = 78597,62604 x - 281308,0475$ e coeficiente de correlação (r) de 0.9976. O teste de paralelismo entre as curvas de calibração demonstrou valores de 0,3936 para água, 0,4087 para o tampão PBS e 0,2397 para acetonitrila. Para os três solventes os resultados obtidos demonstraram a existência de paralelismo, com um nível de significância de 5%, entre os coeficientes angulares das curvas de calibração. Tal resultado evidencia ausência de interferência da variação dos solventes na quantificação do MSP (PARADINA,2014).

5.5.6.3. Faixa de trabalho, limite de detecção e limite de quantificação

A faixa de trabalho estabelecida foi de 8 µg/mL a 24 µg/mL. Os cálculos realizados mostraram um desvio padrão de resíduos de 7459 e um coeficiente angular de 78597, dessa forma, os cálculos realizados mostraram que o LD foi estabelecido como 0,31 µg/mL e o limite de quantificação como 0,95 µg/mL.

5.5.6.4. Precisão

Os resultados da precisão ao nível da repetibilidade estão descritos na tabela 43. Os resultados encontram-se abaixo do especificado no método, que foi o valor de 5% para o DPR, logo o método apresenta repetibilidade adequada.

Os resultados experimentais e a estatística descritiva da precisão intermediária estão descritos na tabela 44. O resultado da comparação estatística entre diferentes dias e diferentes analistas para o CB, o CM e o CA estão nas tabelas 45, 46 e 47, respectivamente.

Os dados descritivos mostram que o maior DPR foi de 2,67%. A análise estatística mostra que todos os P valores foram maiores que 0,05 indicando que não tem efeito de dia e analista nos níveis de concentração estudados.

Tabela 43. Resultados da Repetibilidade (CP).

Concentração teórica ($\mu\text{g/mL}$)	Concentração experimental ($\mu\text{g/mL}$)	Média	DP	DPR(%)
8	7,66			
8	7,825			
8	7,865	7,78	0,11	1,40
15	14,49			
15	14,63			
15	14,55	14,56	0,07	0,49
24	23,95			
24	23,92			
24	24,36	24,08	0,25	1,02

Fonte: o autor.

Tabela 44. Dados experimentais da Precisão intermediária (CP).

	Analista 1						Analista 2					
	Dia 1			Dia 2			Dia 1			Dia 2		
	CB	CM	CA	CB	CM	CA	CB	CM	CA	CB	CM	CA
Replica 1	7,66	14,49	23,95	8,24	14,97	24,45	8,18	15,26	24,32	7,79	14,45	23,48
Replica 2	7,83	14,63	23,92	8,12	15,19	24,10	8,15	14,70	24,29	7,88	14,50	24,19
Replica 3	7,87	14,55	24,36	8,19	14,71	24,07	7,98	15,49	24,81	7,67	14,70	23,71
Media	7,78	14,56	24,08	8,18	14,96	24,21	8,10	15,15	24,47	7,778	14,55	23,79
DP	0,11	0,07	0,25	0,06	0,24	0,21	0,11	0,40	0,29	0,11	0,13	0,36
DPR(%)	1,40	0,49	1,02	0,74	1,61	0,87	1,35	2,67	1,19	1,36	0,93	1,52

Fonte: o autor.

Tabela 45. ANOVA da Precisão intermediária do CB.

	G.L.	Soma dos quadrados	Quadrados Médios	Estatística F	P-Valor
Dia	1	0,0161	0,0161	0,0104	0,9354
Analista	1	0,0225	0,0225	0,0145	0,9237
Repetitividade	8	0,3093	0,0387		

Fonte: o autor.

Tabela 46. ANOVA da Precisão intermediária do CM.

	G.L.	Soma dos quadrados	Quadrados Médios	Estatística F	P-Valor
Dia	1	0,0547	0,0547	0,0412	0,8725
Analista	1	0,0444	0,0444	0,0335	0,8848
Repetitividade	8	0,8701	0,1088		

Fonte: o autor.

Tabela 47. ANOVA da Precisão intermediária do CA.

	G.L.	Soma dos quadrados	Quadrados Médios	Estatística F	P-Valor
Dia	1	0,2269	0,2269	0,4611	0,6203
Analista	1	0,0002	0,0002	0,0004	0,9869
Repetitividade	8	0,6431	0,0804		

Fonte: o autor.

5.5.6.5. Exatidão

Os resultados experimentais e a estatística descritiva da exatidão estão descritos na tabela 48. A análise estatística mostrada na tabela 49. Como o intervalo de confiança para a média está contido dentro da margem de equivalência, concluímos que existe equivalência ao nível de significância de 5%. Logo, a recuperação atende ao critério de aceitação.

Tabela 48. Dados experimentais da Exatidão (CP).

Concentração teórica ($\mu\text{g/mL}$)	Concentração experimental ($\mu\text{g/mL}$)	Recuperação (%)
8	7,66	95,75
8	7,83	97,81
8	7,87	98,31
15	14,49	96,60
15	14,63	97,55
15	14,55	97,00
24	23,95	99,79
24	23,92	99,67
24	24,36	101,50

Fonte: o autor.

Tabela 49. Dados estatísticos da exatidão.

Item	Valores
Recuperação	98,22
Desvio Padrão	1,81
Graus de Liberdade	8
Limite Inferior	97,10
Limite Superior	99,34
Limite Inferior (Especificação)	95
Limite Superior (Especificação)	105

Fonte: o autor.

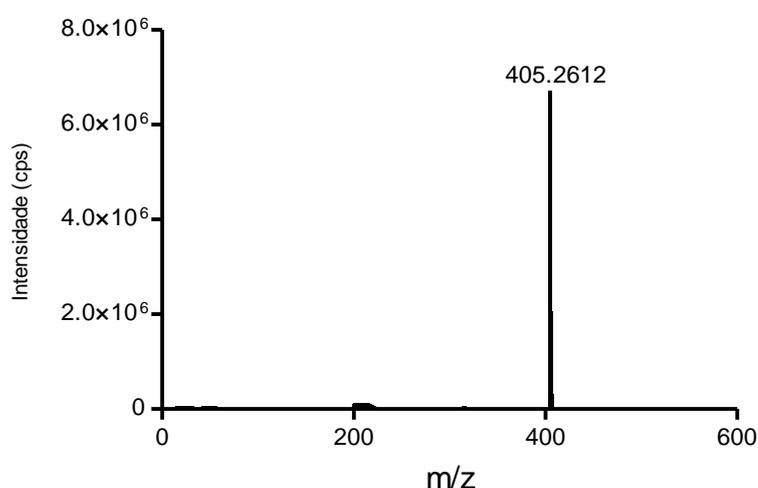
5.5.6.6. Robustez

5.6. ESPECTROMETRIA DE MASSAS DE ALTA RESOLUÇÃO

5.6.1. Otimização da espectrometria de massas

A ionização por eletronebulização (ESI) do MSP foi testada nos modos positivo no espectrômetro de massas QTOF, com o objetivo de determinar o melhor modo para ser utilizado no método. A temperatura da fonte foi otimizada de acordo com a vazão da fase móvel, para 180°C, seguindo as recomendações do fabricante. A vazão do gás de secagem foi especificada em 4 L.h-1, a voltagem do capilar foi fixada em 4500 eV e a da EndPlate Offset em 50 V. A figura 23 mostra o espectro de massas obtido por ESI em modo positivo, onde é possível observar a formação de aduto de sódio do MSP $[M+Na]^+$, característica comum em análises com LC-MS (LANÇAS, 2009). Assim, o MSP que possui massa exata de 382.2719 g/mol, evidenciou um sinal de m/z 405.2612 como pico base.

Figura 23. Espectro de massas de alta resolução ampliado do MSP obtido pelo sistema LC-MS-TOF no modo ESI +.



Fonte: o autor.

Chu et al. (2007) encontraram o mesmo perfil de massas para o MSP em método utilizado para avaliar a estabilidade de soluções salinas, porém não é descrito de forma integral os parâmetros de massas utilizados no método.

5.6.2. Identificação por espectrometria de massas de alta resolução

O método desenvolvido por LC-MS foi utilizado para análise das amostras de degradação forçada provenientes do estresse ácido, básico, oxidante, por umidade e temperatura. Não foi possível avaliar as amostras submetidas ao estresse fotolítico por

indisponibilidade de câmara de fotoestabilidade para refazer o teste de fotodegradação. Todas as condições avaliadas já haviam demonstrado que sofriam degradação e levavam ou não a formação de produtos de degradação detectáveis na análise por UV/VIS. O principal objetivo da análise foi a obtenção de informações relacionadas a massa desses compostos com a finalidade de auxiliar nas suas identificações.

5.6.2.1. Degradação ácida e básica

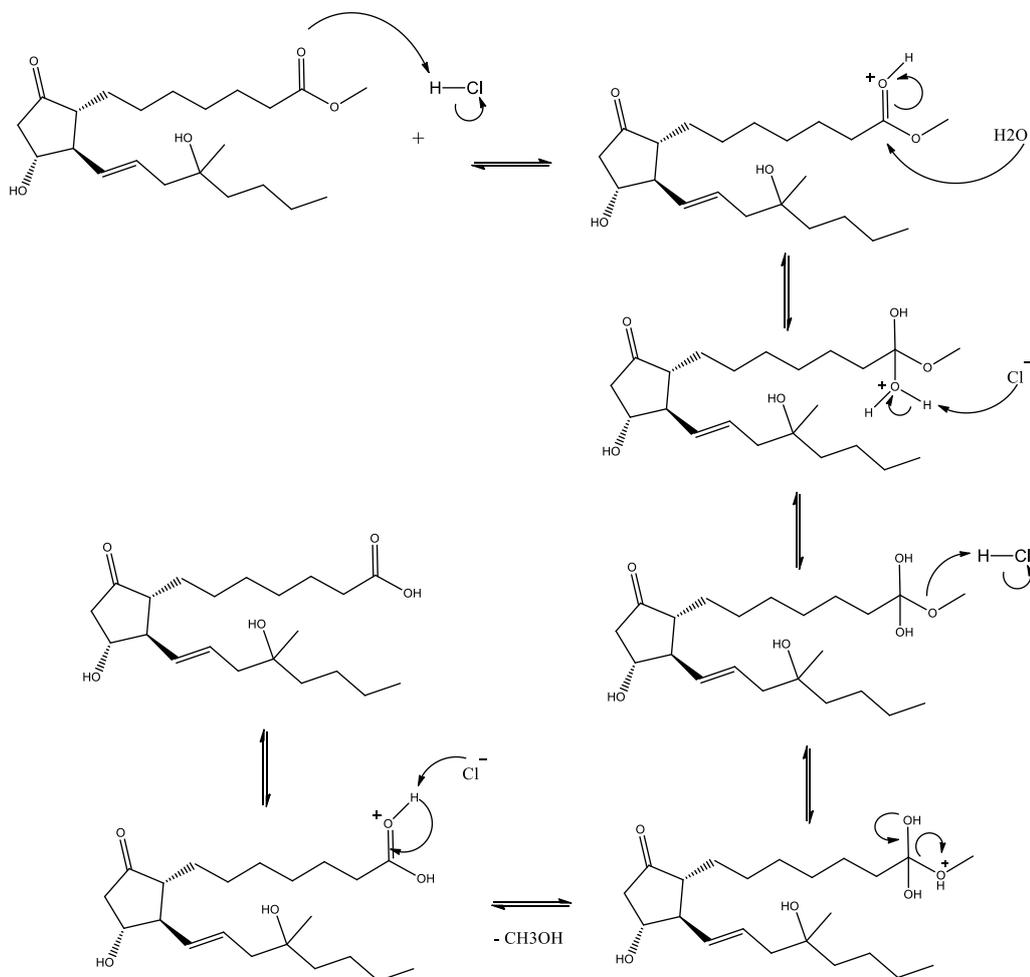
Como já discutido na 5.6.2.1 o PD1 (Tr médio: 11,62 min) da degradação ácida e básica se equivalem em tempos de retenção, mas não equivale a nenhum dos tempos das impurezas descritas para o MSP. Ao observamos o espectro de massas deste PD, trazido nas figuras 26 e 27, podemos observar a presença do pico base de m/z 391.2508, o que representa uma diferença de 14 Da em relação a molécula sodiada do MSP.

Pelo fato de termos o éster de MSP como molécula original em meios que proporcionam uma catálise hidrolítica, provavelmente estamos diante de uma reação de hidrólise do grupamento éster do MSP, o que resulta na forma ácida da molécula e possivelmente na preservação do aduto de sódio.

Dentro da perspectiva das reações de hidrólise, Galan-Rodriguez et. al (2015) demonstraram que o nifedipino, que apresenta em sua estrutura um éster dimetílico, é passível de sofrer hidrólise deste grupamento químico em meios ácidos e básicos, o que levaria a formação de seu ácido correspondente. Já o ácido acetilsalicílico, éster de ácido salicílico, apresentou-se susceptível à degradação em condições ácidas, básicas e neutras (SHERIKAR; MEHTA, 2013). Embasado nestes argumentos, um mecanismo para formação deste PD foi proposto e é corroborado com os resultados obtidos nas análises de espectrometria de massas. A proposta mecanística é apresentada nas figuras 24 e 25.

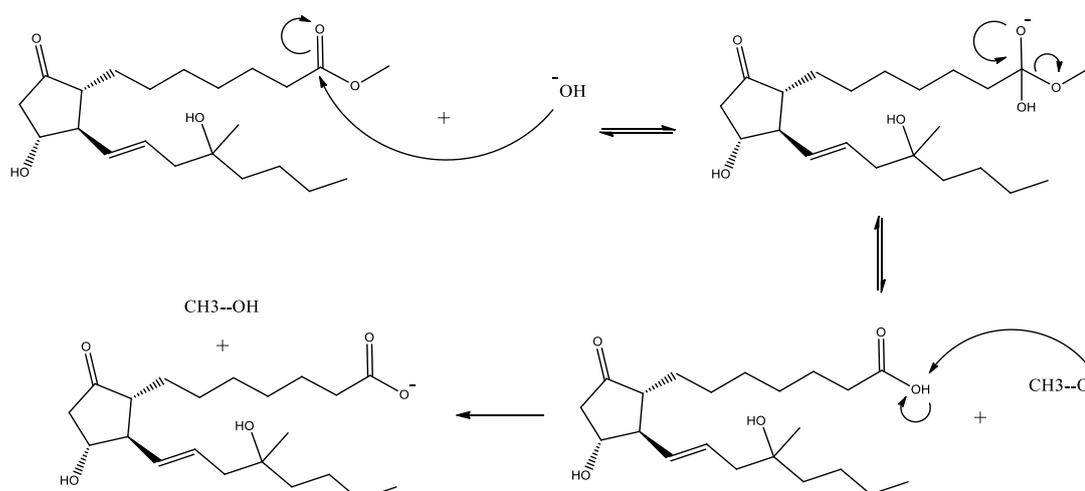
Por sua vez, os PD2 da degradação básica (Tr: médio: 24,62 min) apresenta valores de tempo de retenção semelhante ao 8-EPI MSP, como já discutido na seção 5.2. O espectro de massas desse PD apresenta valor de m/z 405.2612, no entanto a massa exata do 8-EPI MSP é de 382,2719 g/mol, o que nos leva a inferir que a o aduto de sódio (Na: 22,9897 g/mol) também esteve preservado. Já o PD 3 (Tr médio de 53,09 min), que como já discutido representa possivelmente o MS-B (364,2614 g/mol), apresentou massa de m/z 387.2559, onde mais uma vez esteve presente o aduto de sódio.

Figura 24. Mecanismo de hidrólise do misoprostol catalisada por ácido clorídrico.



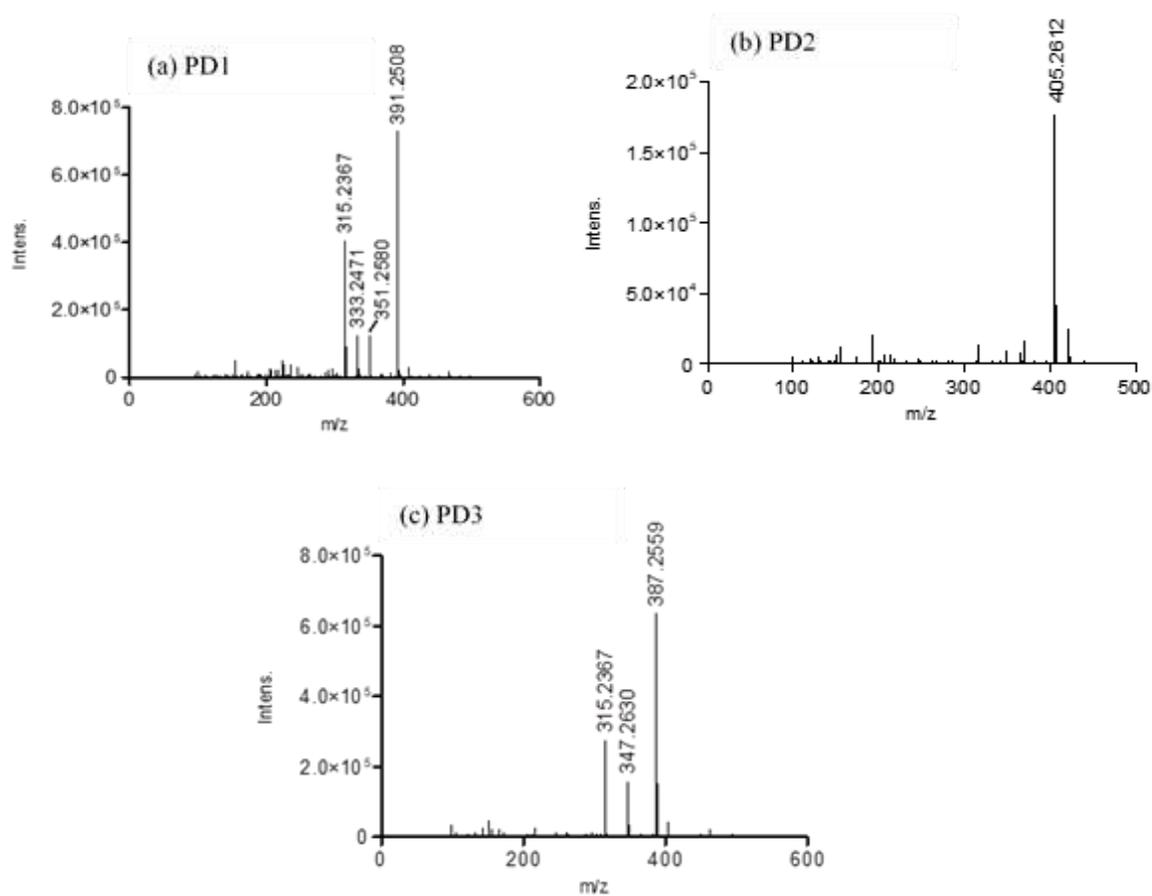
Fonte: O autor.

Figura 25. Mecanismo de hidrólise do misoprostol catalisada por hidróxido de sódio.



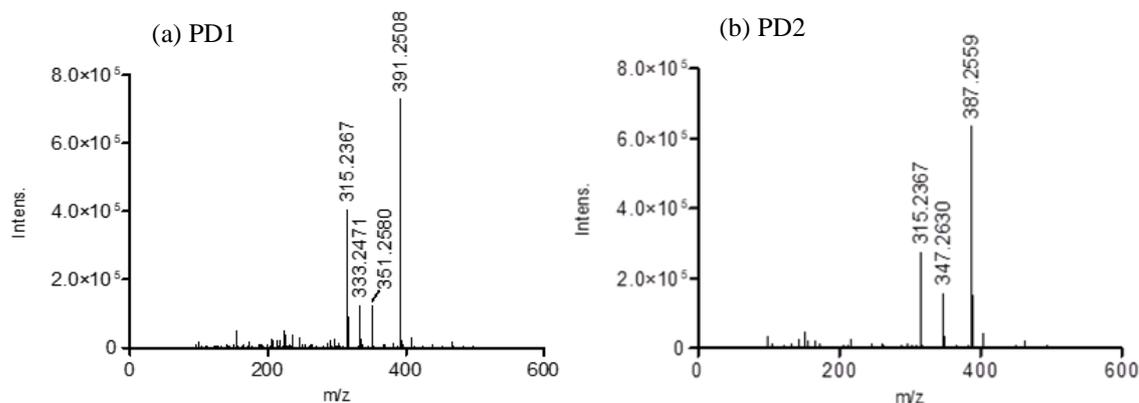
Fonte: o autor.

Figura 26. Espectros de massas dos PDs observados na degradação básica.



Fonte: o autor.

Figura 27. Espectros de massas dos PDs observados na degradação ácida.



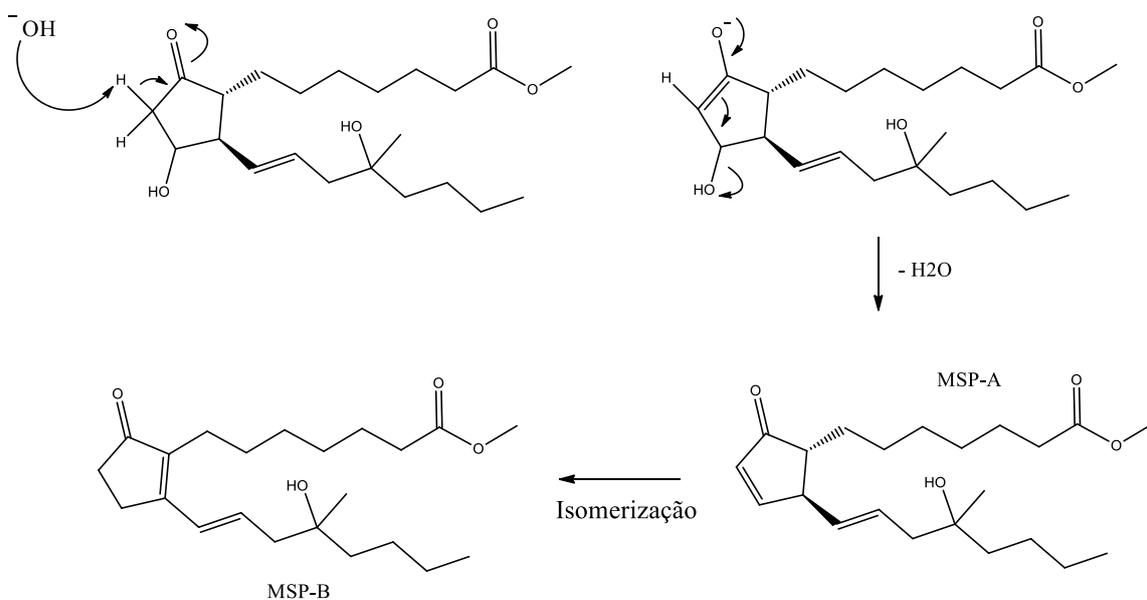
Fonte: o autor.

A presença constante do átomo de sódio nos espectros de massas na forma de aduto neste presente trabalho mostrou-se um desafio. O software utilizado não foi capaz de prever assertivamente as fórmulas moleculares dos compostos gerados. Além disso, a fragmentação do MSP da amostra padrão não foi eficaz, mesmo aumentando a energia de colisão para níveis mais elevados (CHU et al, 2007). A estratégia como aumento da energia capilar para diminuição da formação de aduto não foi satisfatória.

Apesar de ter se mostrado um inconveniente, a formação de adutos de sódio em espectrometria de massas é comum quando se utiliza fonte de ionização por eletrospray. Krueve e Kaupmees (2017), descrevem que a formação deste tipo de achado é complexa e de difícil controle. Mas, estaria ligado principalmente à composição da fase móvel e das amostras. Além disso, os adutos não são considerados fáceis de trabalhar, podem atrapalhar a reprodutibilidade de métodos quantitativos e gerar espectros mais difíceis de serem interpretados (KRUEVE et al., 2013). Apesar das dificuldades, os espectros de massas obtidos foram essenciais na proposição das estruturas de todos os PDs apresentados.

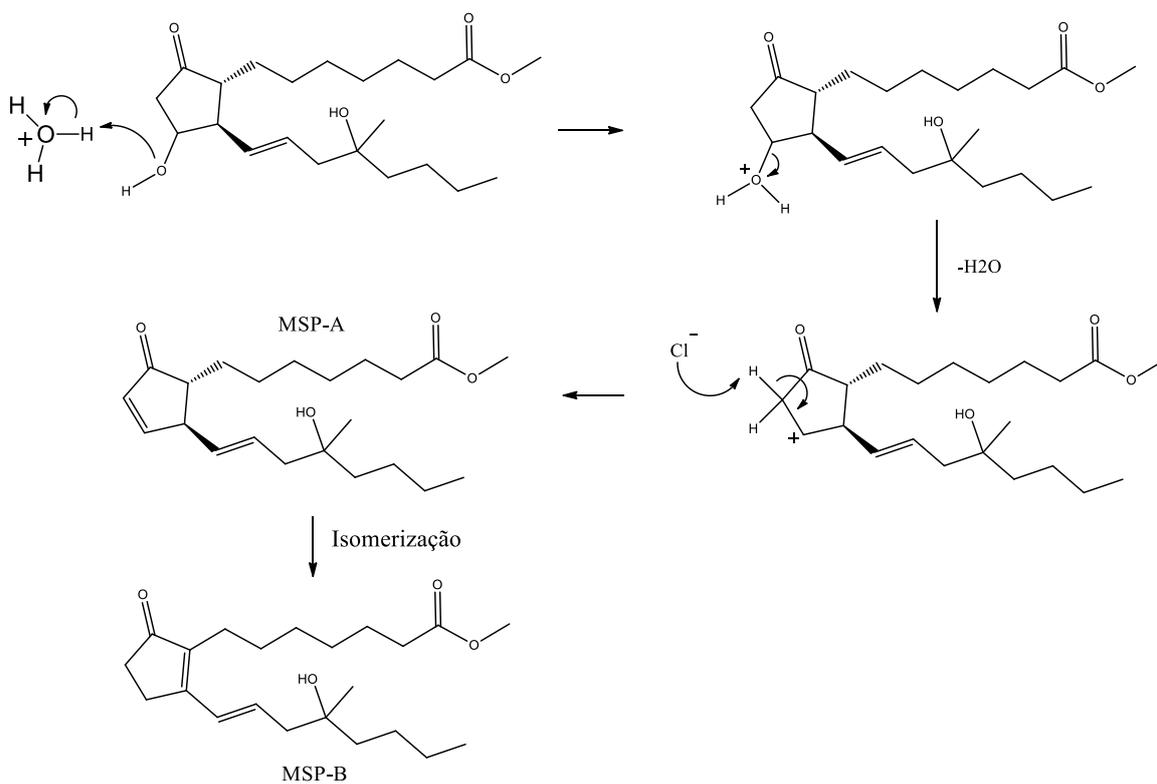
Ainda sobre os PDs discutidos anteriormente, Collins et al. (1985) descreveram que condições ácidas e básicas promovem a desidratação do grupo 11-hidroxi do MSP levando a formação do MSP-A e posterior isomerização deste em MSP-B. No presente trabalho, apenas a degradação por umidade levou a formação da forma A do misoprostol, como discutido na seção 5.2.3. Uma proposta de mecanismo de degradação para formação do MSP A e B em meio básico e ácido é trazida nas figuras 28 e 29, respectivamente, e para isomerização na figura 30.

Figura 28. Mecanismo de formação de do MSP A e B em meio básico.



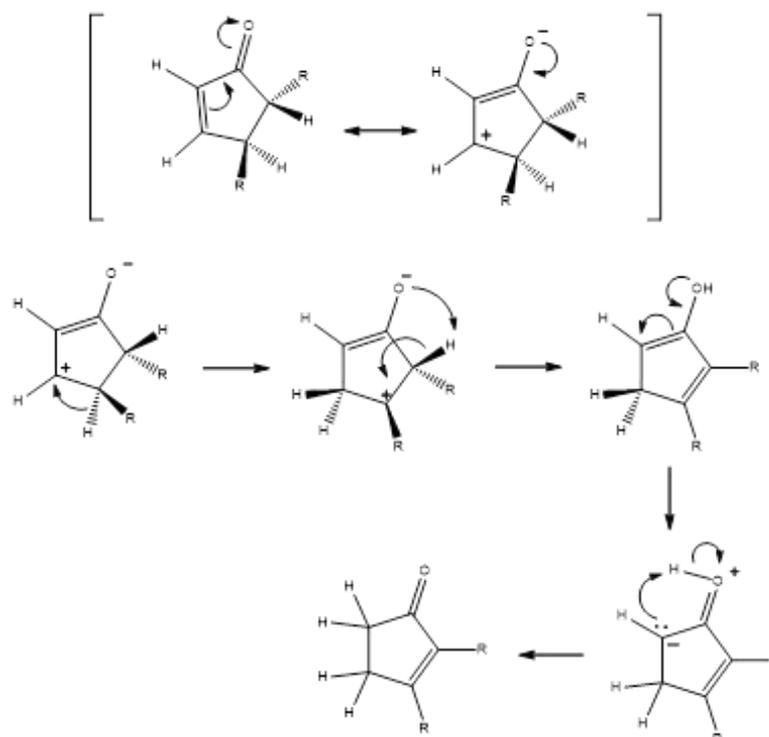
Fonte: O autor.

Figura 29. Mecanismo de formação de do MSP A e B em meio ácido.



Fonte: O autor.

Figura 30. Mecanismo de isomerização do MSP-A para MSP-B.



Fonte: o autor.

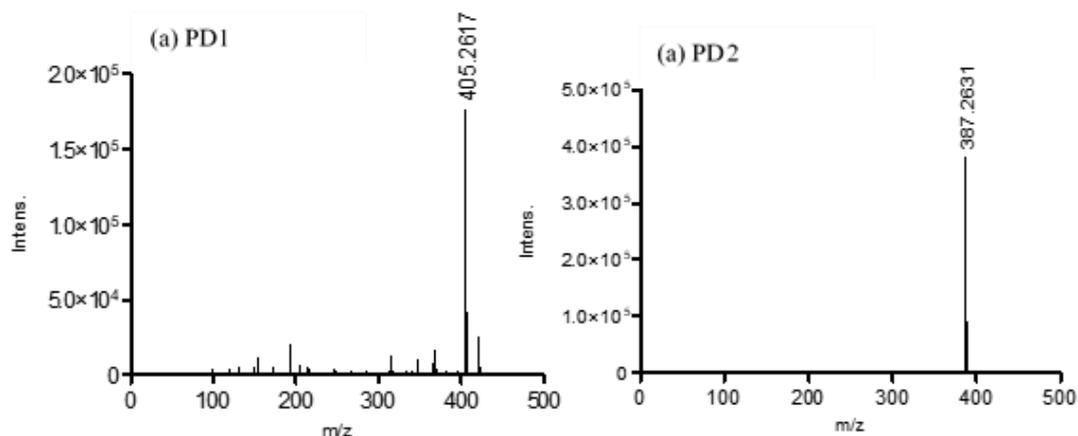
5.6.2.2. Degradação térmica seca

Os PDs 1 e 2 da degradação térmica (Tr: médio: 25,03 min e 54,97 min, respectivamente) apresentaram massa de m/z 405.2617 e m/z 387.2531, respectivamente. Os valores de massas obtidos assemelham-se aos observados nas degradações ácida e básica e podemos assumir que os compostos correspondem ao 8-epi MSP e MSP B.

Collins et al. (1985) descreveram que o aquecimento é o principal fator responsável pela formação do 8-epi MSP através da reação de epimerização. Este tipo de reação, por sua vez, representa uma reação química onde há mudança na configuração de apenas um centro quiral, tendo como resultado a formação de um diastereoisômero e pode estar presente em outros fármacos a exemplo da tetraciclina (ROY, 2011).

Apesar do meio reacional em questão não contar com a presença da água, a formação do MSP B foi cerca de 4,3 vezes maior do que a o 8-Epi MSP. Tal fato demonstra que a reação de desidratação do MSP e a consequente formação de MSP B pode ocorrer independentemente da presença de meio reacional aquoso. Os espectros de massas dos PDs gerados na degradação térmica são trazidos na figura 31.

Figura 31. Espectros de massas dos PDs observados na degradação térmica.



Fonte: o autor.

5.6.2.3. Degradação por umidade

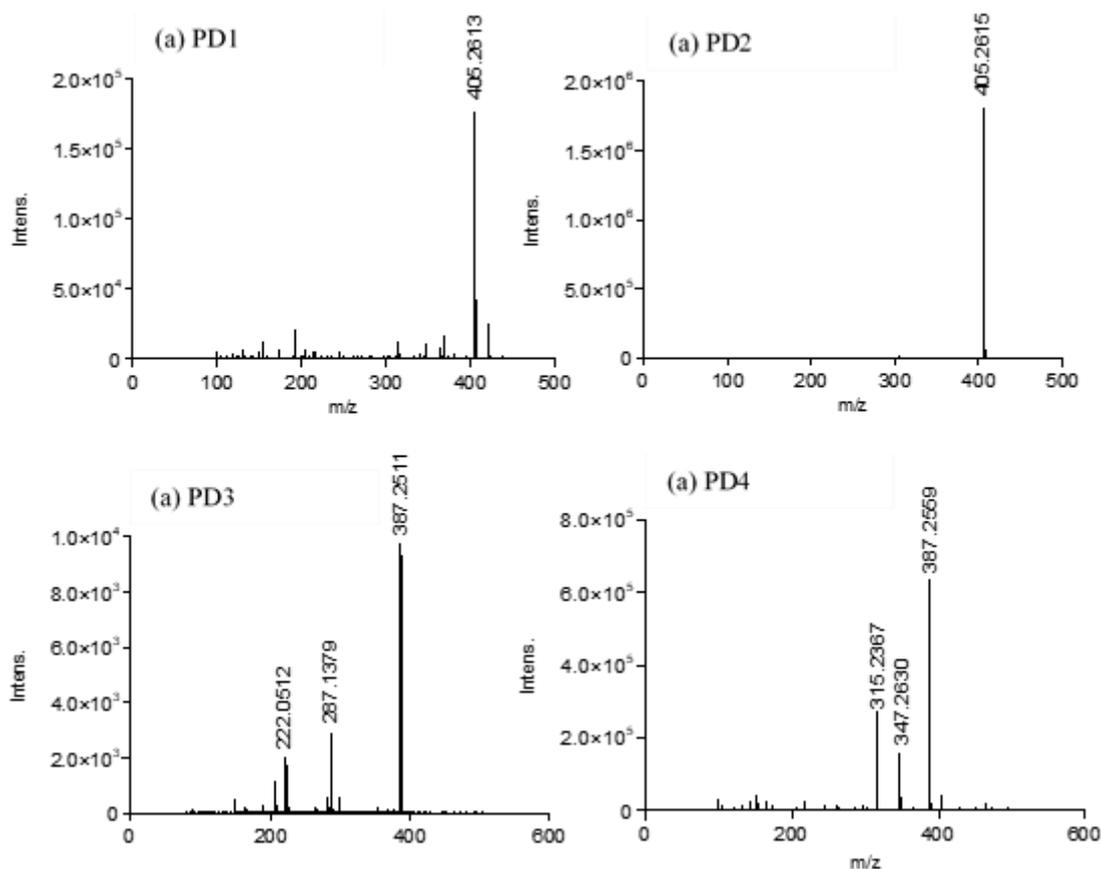
As análises dos espectros de massas correspondentes aos picos dos PDs gerados para esta condição demonstraram que o aumento da quantidade de água sem a presença de um catalizador leva a formação de PDs que não foram descritos em nenhuma outra situação de estresse. O PD1 (Tr: 21,34 min) apresentou um sinal de m/z 405.2613 como pico base, ou seja, praticamente a mesma massa encontrada para o padrão de MSP $[M+Na]^+$. Além disso, o tempo de retenção do 12-EPI MSP foi de 21,41 min, valor praticamente igual ao do PD1. Já o PD3 (Tr: 45,67 min) apresentou pico base de m/z 387.2511 e tempo de retenção correlacionado com a forma com a impureza A do MSP (Tr: 45,42) (figura 32).

Diante disso, podemos afirmar que o PD1 e PD3 representam, respectivamente, o 12-EPI MSP e o MSP A. A presença destes compostos nas amostras de calor úmido nos revela que o processo de isomerização descrito por Collins et al. (1985) da forma A para a B parece também acontecer na conversão do 12-EPI MSP para a o 8-EPI MSP, uma vez que os epímeros são um caso particular de diastereoisômeros (TESTA; CARRUPT; GAL., 1993).

Podemos sugerir também que a presença de um catalizador acelera o processo de interconversão a um ponto de não ser possível detectar a presença do composto precursor. Reist et al. (1995), descreve que o processo de interconversão de diastereoisômeros está presente em diversos fármacos a exemplo da pilocarpina, angiotensina e tetraciclina. Por sua vez, os PDs 2

e 4 apresentaram pico base de m/z 405.2611 e m/z 387.2559, respectivamente e representam o 8-EPI MSP e MSP B, como também foi descrito para maioria das condições investigadas.

Figura 32. Espectros de massas dos PDs observados na degradação por umidade.



Fonte: o autor.

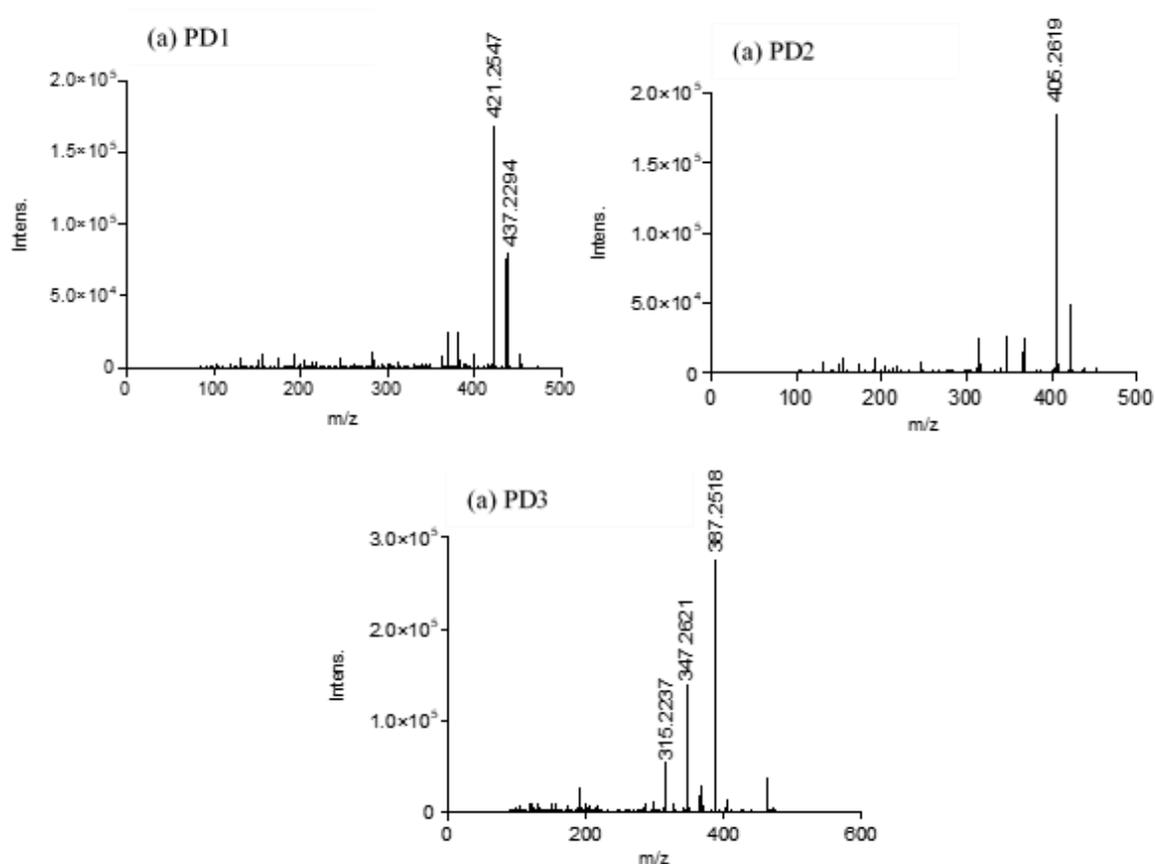
5.6.2.4. Degradação por peróxido de hidrogênio

Na degradação forçada com peróxido de hidrogênio, o PD2 gerado no IFA e o PD1 gerado nos comprimidos (TR médio: 24,83 min) apresentou massa de m/z 405.2619; o PD3 (Tr 54,59 min) apresentou massa de 387.2518 m/z e representam o 8-epi MSP e o MSP B, respectivamente, como também discutido nas seções anteriores.

Por sua vez, o PD1 apresentou massa de m/z 421.2547, como pico base e ao mesmo tempo um pico de massa de m/z 437.2294 (figura 33) como o segundo sinal mais intenso. Isso representa uma diferença de 16 e 32 unidades de massas, respectivamente, entre o MSP sodiado

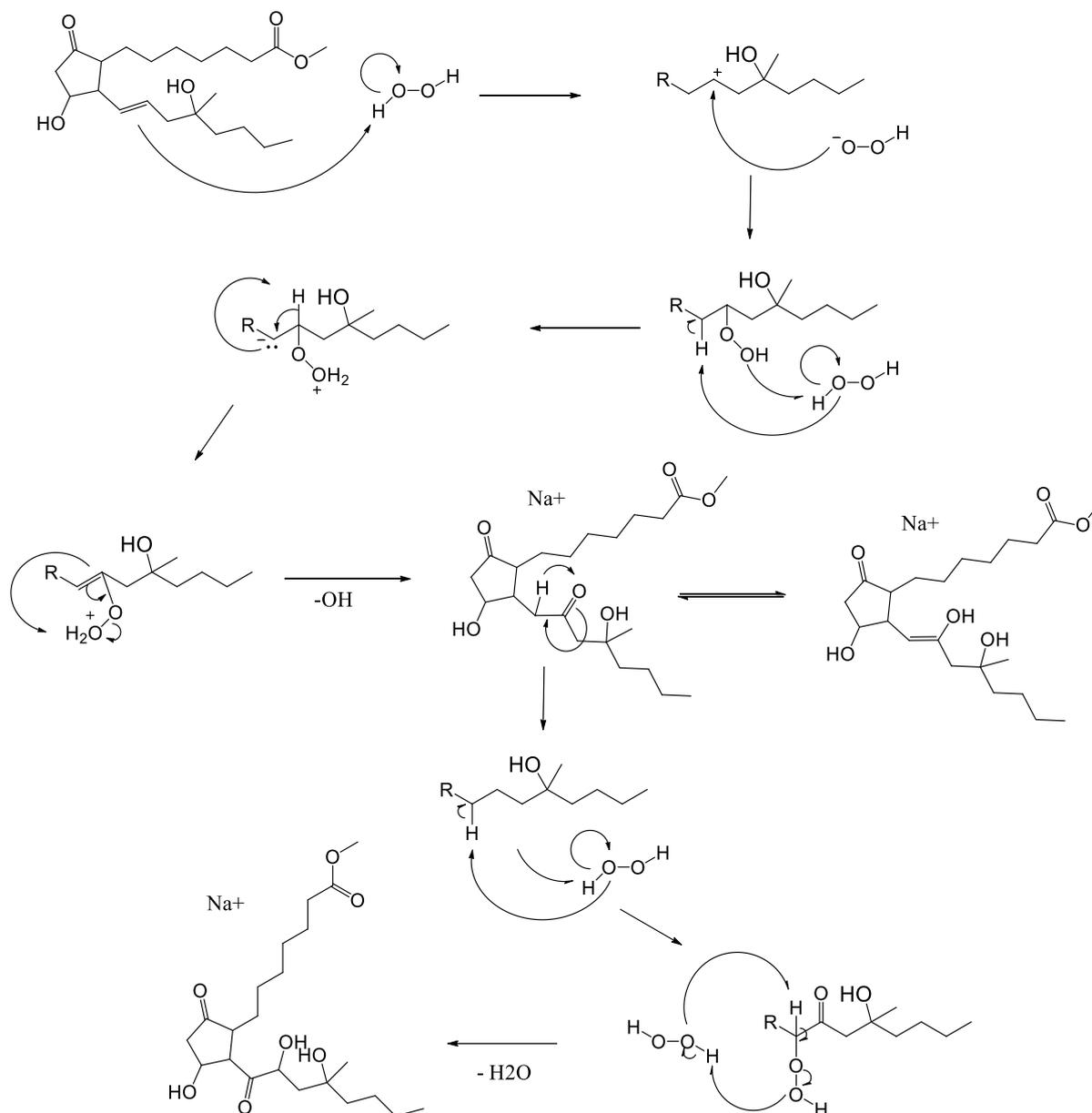
e o PD. Dessa forma, podemos inferir que o mecanismo de formação desses compostos passa pela adição de átomos de oxigênio na molécula original do fármaco, caracterizando uma reação de oxidação (SILVA et al., 2022). Uma proposta de mecanismo da reação de oxidação é trazida na figura 34. Uma hipótese alternativa é a formação de um grupamento epóxido, porém o mecanismo de formação não é apresentado.

Figura 33. Espectros de massas dos PDs observados na degradação por peróxido de hidrogênio.



Fonte: o autor.

Figura 34. Mecanismo de formação do PD1 gerado a partir do MSP exposto ao H_2O_2 .



Fonte: o autor.

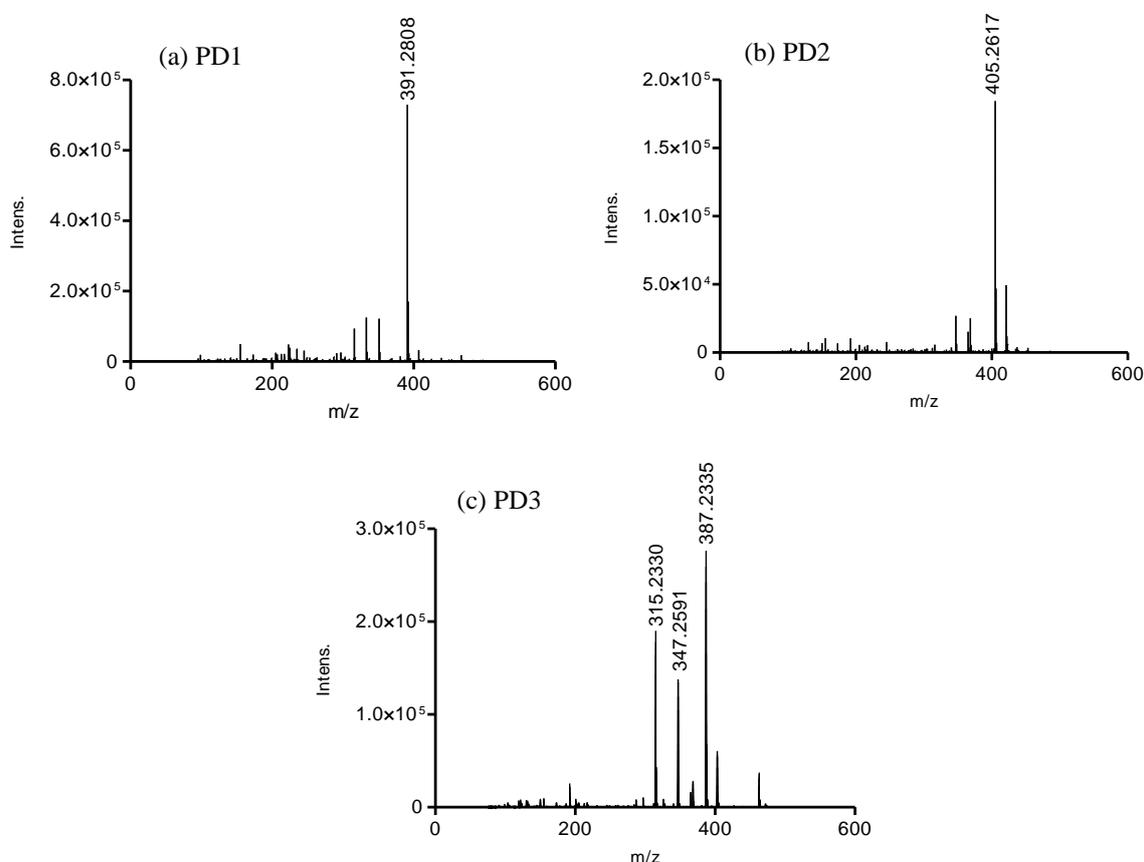
5.6.2.5. Degradação por sulfato de cobre

PD1 (TR médio: 11,60 min) gerado pela exposição ao sulfato de cobre apresenta o mesmo tempo de retenção do PD1 gerado nas hidrolises ácida e básica. A análise do espectro

de massas deste PD (figura 35), demonstra a presença do pico base m/z 391.2808, assim como encontrado nas catálises por HCl e NaOH. Dessa forma, podemos inferir que se trata da forma ácida do MSP.

Não foram encontrados dados na literatura referentes a caracterização de produtos de degradação gerados a partir do estresse oxidativo pelo cobre. No entanto, alguns autores discutem a capacidade catalítica em reações de hidrólise dos complexos metálicos, entre os quais aqueles formados pelo cobre (HAY, EDMONDS, 1967; DUERR, CZARNIK, 1989). Dessa forma, talvez o cobre esteja favorecendo o processo de hidrólise do éster de misoprostol, mesmo estando a amostra em pH neutro.

Figura 35. Espectros de massas dos PDs observados na degradação por sulfato de cobre.



Fonte: O autor.

Como discutido na seção 5.2.5, apesar dos íons metálicos e o peróxido de hidrogênio terem primariamente a função de agente oxidante, eles levaram a formação de um PD distinto

entre si (PD1). Em recente estudo Żuromska-Witek et al., (2020), demonstraram a formação de diferentes produtos de degradação quando utilizaram diferentes agentes oxidantes. Tais achados corroboram com a importância da utilização de íons metálicos em estudos de degradação forçada, pois sua presença em IFAs é descrita com frequência (REYNOLDS et al., 2002).

Já os PDs 2 e 3 (Tr médio: 24,78 min e 54,04 min, respectivamente) apresentaram massa de m/z 405.2617 e m/z 387.2535 e assim como nas demais condições analisadas representam o 8-epi MSP e MSP B, respectivamente. Estes compostos foram formados em todas as condições de degradação forçada e representam majoritariamente os PDs gerados no estudo de degradação forçada.

5.7. ESTUDO DE PERMEACÃO

O estudo de permeação foi realizado seguindo metodologia descrita no item 4.9. Uma das maiores dificuldades na execução do teste foi o fato de que o comprimido não sofreu o processo de dissolução completa, no decorrer de cada 6 horas de experimento. Ao mesmo tempo, por outro lado, talvez isso nos aproxime daquilo que naturalmente pode acontecer com a via de administração vaginal, uma vez que, como já discutido na revisão da literatura, são descritos comprimidos intactos após horas da administração (TANG; GEMZELL-DANIELSSON; HO, 2007), tornando um dos pontos importantes da avaliação realizada.

Para avaliação da quantidade máxima de MSP possível de ser recuperada (%), foi realizada um teste mimetizando as mesmas condições experimentais do estudo de permeação (volume e constituição de líquido de compartimento doador, temperatura, agitação e duração). A soma da quantidade de fármaco e produto de degradação foi de 23,90 µg/mL ou 81,27 µg, massa que representa cerca de 41% da quantidade total de ativo presente no comprimido, considerando o teor de 100%. Dito isto, este valor encontrado experimentalmente, foi utilizado como sendo o 100% nos cálculos do estudo de permeação. Observação: A quantificação do PD foi realizada de forma indireta, levando-se em consideração as áreas de uma amostra padrão de MSP a 20 µg/mL.

5.7.1. Avaliação da recuperação

Os testes de extração demonstraram uma recuperação de 97% (DPR 1,88) para acetonitrila com manutenção do formato do pico cromatográfico. Para a água, metanol e isopropanol, foram obtidas recuperações de 82,09% (DPR 6,06), 86,01% (DPR 8,2) e 97,02% (DPR 7,4), respectivamente, e foi observada uma mudança no formato do pico e por isso a acetonitrila foi escolhida como solvente para extração das mucosas utilizadas no teste de permeação.

5.7.2. Estudo de permeação em mucosa vaginal suína

Os resultados dos estudos de permeação do experimento 1 (um) demonstraram que o misoprostol, assim como esperado, passa por um processo de degradação já no compartimento doador (presença de tampão pH 5). Porém, diferentemente do observado no estudo de degradação forçada, onde foram encontrados 3 PDs, apenas um PD com tempo de retenção de 12,17 min foi observado. Uma avaliação comparativa entre os tempos de retenção combinada com a análise do perfil de massa desse PD, demonstraram que se trata do mesmo PD 1 observado no estudo de degradação forçada com HCl, ou seja, a forma ácida do MSP.

A análise quantitativa do compartimento doador demonstrou que a concentração média do MSP na sua forma esterificada, ou seja, sem sofrer degradação, foi de 14,42 $\mu\text{g/mL}$. A conversão desta concentração em quantidade de fármaco leva a um valor de 49,17 μg do ativo. Já a concentração do MSP ácido foi de 4,28 $\mu\text{g/mL}$ ou 14,55 μg . As quantidades de massa encontradas para o MSP e para o PD representam 60,5% e 19,9%, respectivamente, da quantidade total de MSP inalterado/degradado possível de ser recuperado no volume de 3,4mL de solução tampão PBS. Ou seja, um total de $63,82 \pm 3,96 \mu\text{g}$.

Da análise quantitativa de ativo retido nas mucosas (espessura média de $0,218 \text{ mm} \pm 0,01$ (RSD: 4,63), não foi detectada a presença do MSP, mas foi possível o PD1 ($0,66 \pm 0,1 \mu\text{g}$). Da mesma forma, o MSP não foi detectado no compartimento receptor e $4,44 \mu\text{g/mL}$ ou $15,09 \pm 1,70 \mu\text{g}$ do PD 1 foi quantificado neste compartimento.

As quantidades de massa encontradas para PD na mucosa e compartimento receptor representam 0,81% e 19,11%, respectivamente, da quantidade total de MSP inalterado/degradado recuperado no compartimento doador (tabela 50). Dentro desta perspectiva, a soma da concentração do MSP ou de seu PD recuperados no estudo de permeação correspondem a 99,71% e representa o valor do balanço de massas. A figura 36 traz os

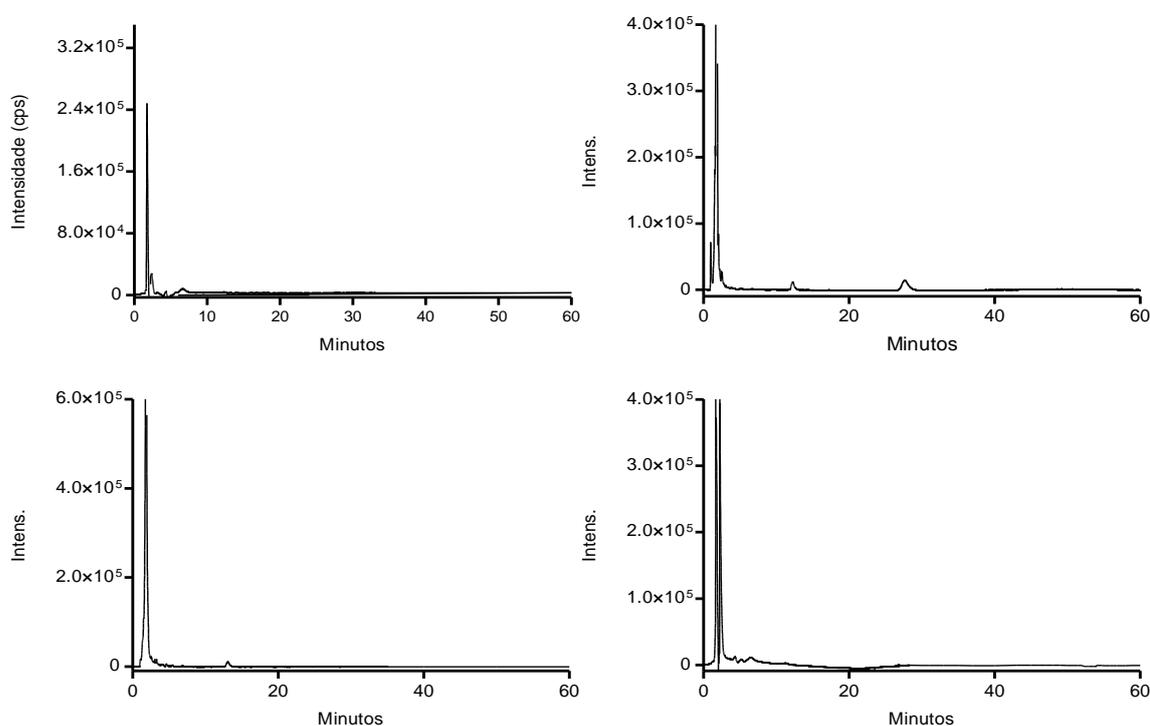
cromatogramas das análises cromatográficas realizadas nos compartimentos doador, receptor e mucosa.

Tabela 50. Quantificação do MSP e de seu PD no compartimento doador, mucosa e LR do experimento 1.

Célula	MSP doador (μg)	PD doador (μg)	PD mucosa (μg)	PD LR (μg)	MSP + PD (μg)
C1_T1	45,24 \pm 3,35	13,71 \pm 0,92	0,71	12,86	72,53
C1_T2	48,85 \pm 5,84	15,48 \pm 3,02	0,69	16,67	81,69
C1_T3	53,40 \pm 1,67	14,44 \pm 1,30	0,50	10,66	79,01
C1_T4	49,53 \pm 4,63	14,71 \pm 1,03	0,70	16,13	81,07
Média					78,58
DP					4,19
DPR					5,33

Fonte: o autor.

Figura 36. Cromatogramas obtidos pela análise da (a) matriz branco, (b) compartimento doador, (c) compartimento receptor (d) retenção na mucosa.

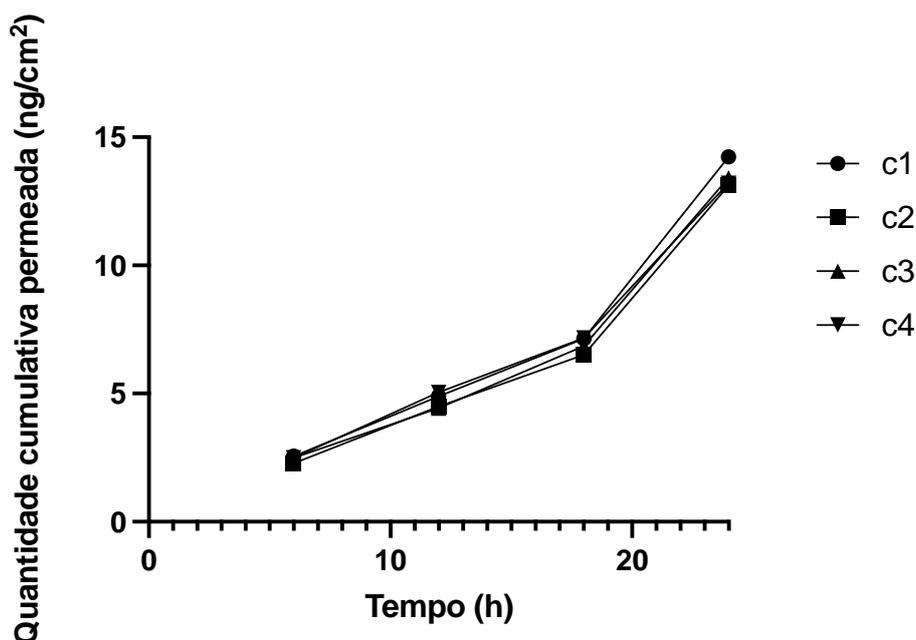


Fonte: o autor.

Em acordo com o experimento 1 (um), no segundo experimento, o PD 1 foi encontrado apenas no compartimento receptor e retido na mucosa. A representação gráfica deste dado é apresentada na figura 37. A quantidade total de PD1 retina na mucosa foi $0,7 \pm 0,1 \mu\text{g}$.

Estudos farmacocinéticos em humanos e animais demonstraram que quando administrado pela via oral o MSP é extensivamente metabolizado e que o metabolismo de primeira passagem estaria envolvido em seu processo de biotransformação (KARIM, 1987; ARONSSON et al., 2007; TANG; GEMZELL-DANIELSSON; HO, 2007). No entanto, outros estudos evidenciaram que não foi possível detectar a presença de MSP em sua forma esterificada em amostras de plasma e que apenas sua forma ácida seria absorvida (FOOT, et al., 1995). Tais achados demonstram uma falta de consenso sobre a etapa farmacocinética da absorção deste fármaco.

Figura 37. Representação gráfica da quantidade de produto de degradação cumulativa, permeada para o compartimento receptor em função do tempo.



Fonte: o autor.

Da mesma forma, se parece não haver concordância sobre a existência de uma metabolização prévia ou não do MSP em sua absorção vaginal. No entanto, o fato de apenas a forma ácida do ativo ter sido encontrada no líquido receptor no desenho de estudo executado,

nos leva a crer que o processo de desesterificação do fármaco antecede sua permeação e representa uma etapa limitante deste processo. Talvez o fato de termos a formação do principal metabólito ativo do MSP no próprio local de ação nos forneça indícios que possam explicar os melhores resultados em taxa de abortamento quando comparada a via de administração oral, por exemplo.

De um modo geral, os estudos de permeação *ex vivo* utilizando mucosa vaginal suína se mostra um bom modelo para extrapolação em tecido vaginal humano, pois apresentam grande semelhança histológica na constituição e organização do epitélio escamoso estratificado e a sustentação de tecido conjuntivo (SQUIER et al., 2008). Por isso, vários autores têm utilizado este tipo de tecido em estudos de permeação para avaliações farmacocinética e de tolerabilidade (DAVIS et al., 2003; GÓMEZ-SEGURA et al., 2020), além do desenvolvimento de novas formulações (ENGGI et al., 2022).

No presente estudo não foi possível realizar a avaliação de solubilidade, pois o IFA comercialmente disponível se apresenta na forma de dispersão em HPMC, como discutido em seções anteriores. Isso impossibilitou a determinação da condição *sink* no líquido receptor. No entanto, o resultado comparativo das quantidades de PD 1 permeadas entre os dois diferentes experimentos, dá um indício que os experimentos foram realizados em condições *sink*.

Apesar de não ter sido avaliado no presente estudo, o pH do líquido do compartimento doador pode ser um fator determinante na quantidade de PD permeada. O misoprostol ácido tem valor de pKa de 4,35 (DRUGBANK, 2023) e em meios com baixos valores de pH têm o seu estado não ionizado favorecido. Por sua vez, a forma molecular do IFA beneficia o processo de passagens através das mucosas (KAY, 2018). Falavigna et al. (2020) em estudo de permeação vaginal *in vitro* usando o ibuprofeno, fármaco ácido (pKa: 4,45), evidenciou que a quantidade de fármaco permeada sofre brusca variação à medida que se aproxima da faixa de pH básico. Uma investigação utilizando diferentes valores de pH, para o líquido do compartimento doador, poderia nos fornecer importantes informações acerca do impacto da variação de pH no processo de permeação vaginal do misoprostol.

6. CONCLUSÃO

A realização deste trabalho permitiu o desenvolvimento de um método analítico capaz de quantificar o MSP frente a seus produtos de degradação gerados nas diferentes condições de estresse testadas e também na presença de suas impurezas já relatadas. Porém, o método para quantificação do MSP no produto acabado não apresentou capacidade para detecção dos produtos de degradação em todas as condições avaliadas.

O fármaco na dispersão apresentou degradação em todas as condições de estresse, enquanto o comprimido apresentou estabilidade apenas na condição de calor úmido. A validação do método evidenciou que este se apresenta adequado para finalidade pretendida tendo como características a seletividade, linearidade, precisão e exatidão requeridas. Por outro lado, podemos citar como desvantagem do método o longo tempo de análise, o que pode dificultar sua aplicação prática.

As cinéticas de degradação forçada apesar de não terem apresentado modelo cinético bem definido para todas as condições avaliadas, foram úteis na demonstração da alta sensibilidade do MSP às condições catalisadas por ácidos e bases. Por sua vez, o estudo de permeação trouxe informações que podem ser possivelmente correlacionadas com os processos *in vivo* envolvidos na passagem do MSP na mucosa vaginal. Investigações complementares podem auxiliar no esclarecimento da absorção do MSP por esta via e talvez sirva até para repensar sobre a utilização do MSP esterificado nas diferentes formas farmacêuticas.

A utilização da espectrometria de massas de alta resolução foi primordial na proposição estrutural dos produtos de degradação gerados. A comparação de tempos de retenção das impurezas conhecidas e dos PDs já haviam permitido supor suas identidades, porém a avaliação complementar de suas massas proporcionou uma investigação mais acurada, principalmente daqueles PDs cuja caracterização não é descrita na literatura. Por fim, pode-se afirmar que a realização dos diferentes estudos e utilização das diferentes técnicas trouxeram dados que se complementam e permitiram a obtenção de diversas informações sobre os aspectos biofarmacêuticos do MSP.

PERSPECTIVAS

- Realizar estudos de permeação utilizando mucosa vaginal suína em célula de difusão vertical em diferentes condições de pH.
- Analisar as amostras de fotodegradação por LC-MS/TOF.

REFERÊNCIAS

- AHMAD, I.; AHMED, S.; ANWAR, Z.; et al. Photostability and photostabilization of drugs and drug products. **International Journal of Photoenergy**, v.2016, n. 1, 2016.
- AHMAD, I.; FASIHULLAH, Q; VAID, F.H. Photolysis of formylmethylfavin in aqueous and organic solvents. **Photochem Photobiol Sci.** v. 2006, n. 5, p. 680-685, 2006.
- AHMAD, I; VAID F.H. Thermal degradation of 7, 8-dimethyl-10-formylmethylisoal loxazine in acid solution: a kinetic study. **J Chem Soc Pak.**; v.30, p. 688, 2011.
- AHUJA, A.; SCYPINSKI S. **Handbook of Modern Pharmaceutical Analysis**, 1. ed., New York: Academic Press, 2001.
- ALI, N. W.; ABBAS, S. S.; ZAAZAA, H. E. S., et al. Validated stability indicating methods for determination of nitazoxanide in presence of its degradation products. **Journal of pharmaceutical analysis**, v. 2, n. 2, p. 105-116, 2012.
- ANDELIJA, M; BILJANA, J-S.; DARKO, I. et al. Forced degradation studies of simvastatin using microemulsion liquid chromatography. **Journal of liquid chromatography & related technologies**, v. 33, n. 4, p. 536–547, 2010.
- ANYAKORA, C.; ONI, Y.; EZEDINACHI, U. et al. Quality medicines in maternal health: results of oxytocin, misoprostol, magnesium sulfate and calcium gluconate quality audits. **BMC pregnancy and childbirth**, v. 18, n. 1, p. 1-11, 2018.
- ARCANJO, F. C. N. et al. Uso de misoprostol retal para indução do parto em gestantes com amniorrexe prematura: ensaio clínico fase II. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 25, n.7, p. 491-499, 2003.
- ARREBOLA-LIÉBANAS, Franciso Javier; ROMERO-GONZÁLEZ, Roberto; FRENICH, Antonia Garrido. HRMS: fundamentals and basic concepts. In: **Applications in High Resolution Mass Spectrometry**. Elsevier, 2017. p. 1-14.
- ARONSSON, A. et al. Pharmacokinetic profiles up to 12 h after administration of vaginal, sublingual and slow-release oral misoprostol. **Human reproduction**, v. 22, n. 7, p. 1912-1918, 2007.
- ASHBY, J.; TENNANT, R. W. Definitive relationships among chemical structure, carcinogenicity and mutagenicity for 301 chemicals tested by the US NTP. **Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology**, v. 257, n. 3, p. 229-306, 1991.
- ASTON, F. W. **Mass spectra and isotopes**. London: Editora Edward Arnold, 1942. p. 167.
- BAERTSCHI, S. W.; ALSANTE, K. M.; TONNESEN, H. H. A critical assessment of the ICH guideline on photostability testing of new drug substances and products (Q1B):

Recommendation for revision. **Journal of pharmaceutical sciences**, vol. 99, p. 2934- 2940, 2010.

BAKKER, R; PIERCE, S; MYERS, D. The role of prostaglandins E1 and E2, dinoprostone, and misoprostol in cervical ripening and the induction of labor: a mechanistic approach. **Archives of gynecology and obstetrics**, v. 296, n. 2, p. 167-179, 2017.

BAKSHI, M.; SINGH, S. Development of validated stability-indicating assay methods-critical review. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 28, n. 6, p.1011-1040, 2002.

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

BANOUB, Joseph H. et al. Recent developments in mass spectrometry for the characterization of nucleosides, nucleotides, oligonucleotides, and nucleic acids. *Chemical reviews*, v. 105, n. 5, p. 1869-1916, 2005.

BERARD, V. et al. Instability of misoprostol tablets stored outside the blister: a potential serious concern for clinical outcome in medical abortion. **PLoS One**, v. 9, n. 12, e112401, 2014.

BHANGARE, D. et al. Systematic strategies for degradation kinetic study of pharmaceuticals: an issue of utmost importance concerning current stability analysis practices. **Journal of Analytical Science and Technology**, v. 13, n. 1, p. 7, 2022.

BHASKAR, R. et al. Current Trend in Performance of Forced Degradation Studies for Drug Substance and Drug Product's. **Journal of Drug Delivery and Therapeutics**, vol. 10, p. 149-155, 2020.

BIZIMANA, T. et al. Quality of oxytocin and misoprostol in health facilities of Rwanda. **Plos one**, v. 16, n. 1, e0245054, 2021.

BLESSY, M. R. D. P. 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.

BOCCARDI, G. **Oxidative susceptibility testing. In: Pharmaceutical Stress Testing**. 1. Ed. New York: Taylor and Francis, 2005.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Consultas. Acesso em: 07/04/2021. Disponível em: <https://consultas.anvisa.gov.br/#/medicamentos/250000139349919/>.

BRASIL. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Consultas. Acesso em 07/04/2021. Disponível em [:https://consultas.anvisa.gov.br/#/medicamentos/250000139349919/?substancia=6378&situacaoRegistro=C](https://consultas.anvisa.gov.br/#/medicamentos/250000139349919/?substancia=6378&situacaoRegistro=C).

BRASIL. Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. *Relação Nacional de Medicamentos Essenciais: RENAME 2*. Brasília: Ministério da Saúde, 2020.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução - RDC Nº 53, de 4 de dezembro de 2015. Estabelece parâmetros para a notificação, identificação e qualificação de produtos de degradação em medicamentos com substâncias ativas sintéticas e semissintéticas, classificados como novos, genéricos e similares, e dá outras providências, 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução - RDC Nº 318, de 6 de novembro de 2019. Estabelece os critérios para a realização de Estudos de Estabilidade de insumos farmacêuticos ativos e medicamentos, exceto biológicos, e dá outras providências, 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Portaria n.º 344, de 12 de maio de 1998. Aprova o Regulamento Técnico sobre substâncias e medicamentos sujeitos a controle especial, 1998.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Nota Técnica Nº338/2013. Disponível em: <<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2014/setembro/11/Misoprostol.pdf>>. Acesso em: 04 de outubro de 2020.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Ações Programáticas Estratégicas. Área Técnica de Saúde da Mulher. **Protocolo para utilização de misoprostol em obstetrícia**. 1ª ed. Brasília, 2012.

BYRN, S. R.; XU, W.; NEWMAN, A. W. Chemical reactivity in solid-state pharmaceuticals: formulation implications. **Advanced drug delivery reviews**, v. 48, n.1, p. 115-136, 2001.

CAI, S.-S.; SHORT, L. C.; SYAGE, Jack A. Atmospheric pressure photoionization—The second source for LC-MS?. **LCGC North America**, v. 26, n. 3, p. 286–296, 2008.

CARLAN, S. J.; BOULDIN, S; O'BRIEN, W. F. Extemporaneous preparation of misoprostol gel for cervical ripening: a randomized trial. **Obstetrics & Gynecology**, v. 90, n. 6: p. 911-915, 1997.

CARR, S. A. et al. Analytical methodology to determine the potency and quality of misoprostol tablets. **7th International Conference on Appropriate Healthcare Technologies for Developing Countries**, p. 1-5, 2012.

CASASSUS, B. Misoprostol drug to be withdrawn from French market. **Lancet**, Retraction. vol. 390, p. e37, 2017.

CAVALCANTE, P. M. M.; DA SILVA, R. L.; DE FREITAS, J. J. R.; et al. Proposta de preparação e caracterização de ésteres: um experimento de análise orgânica na graduação. **Educación química**, vol. 26, n. 4, p. 319-329, 2015.

CHEN, D. et al. Stabilization and sustained-release effect of Misoprostol with Methacrylate copolymer. **International journal of pharmaceutics**, v. 203, n. 2, p. 141-148, 2020.

COLLINS, P. W.; PAPPO, R.; DAJANI, E. Z. Chemistry and synthetic development of misoprostol. **Digestive diseases and sciences**, vol.30, n.11, p. 114S-117, 1985.

CHU, K. O. et al. Method to determine stability and recovery of carboprost and misoprostol in infusion preparations. **Journal of Chromatography B**, v. 857, n. 1, p. 83-91, 2007.

DAJANI, E. Z. et al. SC-29333: A potent inhibitor of canine gastric secretion. **The American journal of digestive diseases**, v. 21, n. 12; p. 1049-1057, 1976.

DAVIS, C. C. et al. Penetration of toxic shock syndrome toxin-1 across porcine vaginal mucosa ex vivo: permeability characteristics, toxin distribution, and tissue damage. **American journal of obstetrics and gynecology**, v.189, n. 6, p. 1785-1791, 2003.

DE HOFFMANN, E.; STROOBANT, V. **Mass spectrometry: principles and applications**. 3rd Ed. Inglaterra: Editora John Wiley & Sons, 2007. p.488.

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

DJIDJA, M.C. et al. Novel molecular tumour classification using MALDI–mass spectrometry imaging of tissue micro-array. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 397, p. 587-601, 2010.

DIAB, K. M.; RAMY, A. R.; YEHA, M. A. The use of rectal misoprostol as active pharmacological management of the third stage of labor. **Journal of Obstetrics and Gynaecology Research**, v. 25, n. 5, p. 327-332, 1999.

DUERR, B. F.; CZARNIK, A. W. Cu (II) catalyzed hydrolysis of an unactivated ester based on reversible conjugate addition. **Tetrahedron letters**, v. 30, n. 50, p. 6951-6954, 1989.

EL-ANEED, Anas; COHEN, Aljandro; BANOUB, Joseph. Mass spectrometry, review of the basics: electrospray, MALDI, and commonly used mass analyzers. **Applied spectroscopy reviews**, v. 44, n. 3, p. 210-230, 2009.

EL-KATTAN, A.; ASBILL, C. S.; HAIDAR, S. Transdermal testing: practical aspects and methods. **Pharmaceutical science & technology today**, v. 3, n. 12, p. 426-430, 2000.

EL-REFAEY, H. et al. Induction of abortion with mifepristone (RU 486) and oral or vaginal misoprostol. **New England Journal of Medicine**, v. 332, n.15, p. 983-987, 1995.

ELUL, B. et al. Side effects of mifepristone-misoprostol abortion versus surgical abortion: data from a trial in China, Cuba, and India. **Contraception**, v. 59, n. 2, 107-114, 1999.

EMA. EUROPEAN MEDICINE AGENCY. Reflection paper on the qualification of non-genotoxic impurities, 2018.

- ENGGI, C. K. et al. Validation of spectrophotometric method to quantify cabotegravir in simulated vaginal fluid and porcine vaginal tissue in ex vivo permeation and retention studies from thermosensitive and mucoadhesive gels. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 267, p. 120600, 2022.
- ERMER, J; VOGEL, M. Applications of hyphenated LC-MS techniques in pharmaceutical analysis. **Biomedical chromatography**, v. 14, n. 6, p. 373-383, 2000.
- FALAVIGNA, Margherita et al. The vaginal-PVPA: a vaginal mucosa-mimicking in vitro permeation tool for evaluation of mucoadhesive formulations. **Pharmaceutics**, v. 12, n. 6, p. 568, 2020.
- GALAN-RODRIGUEZ, C.; GONZÁLEZ-ÁLVAREZ, J.; VALLS-REMOLÍ, M. Method development and validation study for quantitative determination of nifedipine and related substances by ultra-high-performance liquid chromatography. **Biomedical Chromatography**, vol. 29, n.2, p. 233-239, 2015.
- GIESZINGER, P. et al. The Development of an In Vitro Horizontal Diffusion Cell to Monitor Nasal Powder Penetration Inline. **Pharmaceutics**, n. 13, v. 6, p. 809, 2021.
- GILMAN, A. G.; HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E. **Goodman & Gilman: As bases farmacológicas da terapêutica**. 10.ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2005.
- GOLDBERG, A. B.; GREENBERG, M. B.; DARNEY, P. D. Misoprostol and pregnancy. **New England Journal of Medicine**, v. 344, n. 1, p. 38-47, 2001.
- GÓMEZ-SEGURA, L. Carprofen permeation test through porcine ex vivo mucous membranes and ophthalmic tissues for tolerability assessments: Validation and histological study. **Veterinary Sciences**, v. 7, v. 4, p. 152, 2020.
- GÖRÖG, S. et al. Estimation of impurity profiles of drugs and related materials part 14: The role of HPLC/diode-array UV spectroscopy in the identification of minor components (impurities, degradation products, metabolites) in various matrices. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, n. 14, v. 1-2, p. 85-92, 1995.
- GROVER, M.; GULATI, M.; SINGH, S. Stability-indicating analysis of isoxazolyl penicillins using dual wavelength high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 708, v. 1-2, p. 153-159, 1998.
- GUPTA, A. et al. Method development and hydrolytic degradation study of Doxofylline by RP-HPLC and LC-MS/MS. **JournalSeek entry for Asian Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 1, p. 14-18, 2011.
- HAFIRASSOU, H. et al. Stability of misoprostol in suppositories. **American journal of health-system pharmacy**, v. 62, n. 11, p. 1192-1194, 2005.
- HAGEN, N. et al. Stability of misoprostol tablets collected in Malawi and Rwanda: Importance of intact primary packaging. **PloS one**, n. 15, v. 9, p. e0238628, 2020.

HAGEN, N.; KHULUZA, Felix; HEIDE, Lutz. Quality, availability and storage conditions of oxytocin and misoprostol in Malawi. **BMC pregnancy and childbirth**, v. 20, p. 1-18, 2020.

HALL, P.E.; TAGONTONG, N. Quality of misoprostol products. Quality of Medicines, **WHO Drug Information**, v.30, n. 1, p. 35-39, 2016.

HARTAUER, K.J. et al. Influence of peroxide impurities in povidone and crospovidone on the stability of raloxifene hydrochloride in tablets: identification and control of an oxidative degradation product. **Pharma. Dev. Technol.** v. 5, p. 303–310, 2000.

HARVEY, J. et al. Management of organic impurities in small molecule medicinal products: Deriving safe limits for use in early development. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 84, p. 116-123, 2017.

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

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

HAY, R. W.; EDMONDS, J. A. G. The copper (II)-catalysed hydrolysis of 8-hydroxyquinoline sulphate. **Chemical Communications (London)**, n. 19, p. 969-970, 1967.

HO, P. C. et al. Vaginal misoprostol compared with oral misoprostol in termination of second-trimester pregnancy. **Obstetrics & gynecology**, v. 90. n.5, p. 735-738, 1997.

HONG, P; PHOEBE, A. D.; JONES, M. D. Study of relative response factors and mass balance in forced degradation studies with liquid chromatography/photo-diode array detector/evaporative light scattering detector/mass spectrometry system. **Journal of Chromatography A**, v. 1512, p. 61-70, 2017.

HUANG, K. et al. Copper hydroxyl sulfate as a heterogeneous catalyst for the catalytic wet peroxide oxidation of phenol. **RSC Advances**, v. 5, n. 11, p. 8455-8462, 2015.

HUANG, T.; GARCEAU, M.E.; GAO, P. Liquid chromatographic determination of residual hydrogen peroxide in pharmaceutical excipients using platinum and wired enzyme electrodes. **J. Pharma. Biomed. Anal.** v. 31, p. 1203–1210, 2003.

ICH. International Conference on Harmonisation. Stability Testing: Photostability testing of new drug substances and product, 1996.

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

IRAM, F. et al. Forced degradation studies. **Journal of Analytical & Pharmaceutical Research**, v. 3, n. 6, 2016.

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

JAMRÓGIEWICZ, M.; WIELGOMAS, B. Detection of some volatile degradation products released during photoexposure of ranitidine in a solid state. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 76, p. 177-182, 2013.

KAHSAY, G. et al. Development and validation of LC methods for the separation of misoprostol related substances and diastereoisomers. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 111, p. 91-99, 2015.

KARARLI, T. T.; CATALANO, T. Stabilization of misoprostol with hydroxypropyl methylcellulose (HPMC) against degradation by water. **Pharmaceutical research**, vol. 7, n. 11, p.1186-1189, 1990.

KARIM, A. Antiulcer prostaglandin misoprostol: single and multiple dose pharmacokinetic profile. **Prostaglandins**, v. 33, p. 40-50, 1987.

KAY, K. Physiologically-based pharmacokinetic model of vaginally administered dapivirine ring and film formulations. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 84, n. 9, p. 1950-1969, 2018.

KHAN, R. U.; EL-REFAEY, H. Pharmacokinetics and adverse-effect profile of rectally administered misoprostol in the third stage of labor. **Obstetrics & Gynecology**, v. 101, n. 5, p. 968-974, 2003.

KÖHLER, N.; WRAY, V.; WINTERHALTER, P. Preparative isolation of procyanidins from grape seed extracts by high-speed counter-current chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1177, p. 114-125, 2008.

KROES, R.; RENWICK, A.; CHEESMAN, M., et al. Structured-based thresholds of 269 toxicological concern (TTC): Guidance for application to substances present at low levels in the 270 diet. **Food and Chemical Toxicology**, v. 42, p. 65–83, 2004.

KRUVE, A. et al. Sodium adduct formation efficiency in ESI source. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 48, n. 6, 695-702, 2013.

KRUVE, A.; KAUPMEES, K. Adduct formation in ESI/MS by mobile phase additives. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 28, n. 5, p. 887-894, 2017.

KUMAR, P.; SANGHVI, P.; COLLINS, C. C. Comparison of diffusion studies of hydrocortisone between the Franz cell and the enhancer cell. **Drug development and industrial pharmacy**, v. 19, n. 13, p. 1573-1585, 1993.

LEAL, L. B. Bioequivalence methodologies for topical drug products: in vitro and ex vivo studies with a corticosteroid and an anti-fungal drug. **Pharmaceutical research**, v. 34, p. 730-737, 2017.

LEDUC, D.; BIRINGER, A.; LEE, L. et al. Induction of labour. **Journal of Obstetrics and Gynaecology Canada**, v. 35, n. 9, p. 840-857, 2013.

LOKUGAMAGE, A. U. et al. A randomized study comparing rectally administered misoprostol versus Syntometrine combined with an oxytocin infusion for the cessation of primary post partum hemorrhage. **Acta obstetricia et gynecologica Scandinavica**, v. 80, n. 9, p. 835-839, 2001.

MACHADO, R. M. et al. Studies and methodologies on vaginal drug permeation. *Advanced drug delivery reviews*, v. 92, p. 14-26, 2015.

MARON, D. M., & AMES, B. N. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. **Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects**, v. 113, n. 3-4, p. 173-215, 1983.

MENGUE, S. S.; DAL PIZZOL, T. S. Misoprostol, aborto e malformações congênitas. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, vol. 30, n. 6, p. 271-273, 2008.

MOURAD, S. S. et al. Stability-indicating HPLC-DAD method for the determination of linagliptin in tablet dosage form: application to degradation kinetics. **Journal of chromatographic science**, v. 54, n. 9, p.1560-1566, 2016.

MYATT, G. J. et al. In silico toxicology protocols. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 96, p. 1-17, 2018.

MUNSON, Milam SB; FIELD, F.-H_. Chemical ionization mass spectrometry. I. General introduction. **Journal of the American Chemical Society**, v. 88, n. 12, p. 2621-2630, 1966.

NADDEO, V. et al. Ultrasonic degradation, mineralization and detoxification of diclofenac in water: optimization of operating parameters. **Ultrasonics sonochemistry**, v. 17, n.1, p. 179-185, 2010.

NAKAMURA, N. et al. An overview of the Tokyo electron beam ion trap. **Physica Scripta**, v. 1997, n. T73, p. 362, 1997.

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

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

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Abortamento seguro: orientação técnica e de políticas para os sistemas de saúde**. 2 ed. Genebra, 2013.

PANDEY, A. K. et al. The novel acid degradation products of losartan: Isolation and characterization using Q-TOF, 2D-NMR and FTIR. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 120, n. 65-71, 2016.

PARADINA L. F; CALVO, L; VIÑA, L. Development and validation of an affinity chromatography-protein G method for igg quantification, **Int. sch. res. Notices**, v. 2014, 2014.

PAŠA-TOLIĆ, L. et al. Proteomic analyses using an accurate mass and time tag strategy. **Biotechniques**, v. 37, n. 4, p. 621-639, 2004.

PELLECCHIA, M. et al. Perspectives on NMR in drug discovery: a technique comes of age. *Nature reviews Drug discovery*, v. 7, n. 9, p. 738-745, 2008.

PLUTH, M D.; BERGMAN, R. G.; RAYMOND, K. N. Acid catalysis in basic solution: a supramolecular host promotes orthoformate hydrolysis. **Science**, v. 316, p. 85-88, 2007

PRAVALLIKA, K. E.; JAGADEESH, N. B.; RAVI, P. Development and validation of a novel stability indicating RP-HPLC method for simultaneous determination of aceclofenac and misoprostol in bulk and from their combined dosage form. **Scholars Research Library**, v. 8 n. 19, p. 92-99, 2016.

PUBCHEM. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; 2004-. PubChem Compound Summary for CID 5282381, Misoprostol. Acesso em: 21/03/2021. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Misoprostol>.

QIU, F.; NORWOOD, D. L. Identification of pharmaceutical impurities. **Journal of liquid chromatography & related technologies**, v. 30, p. 877-935, 2007.

RAGNO, G. et al. Photo-and thermal-stability studies on benzimidazole anthelmintics by HPLC and GC-MS. **Chemical and pharmaceutical bulletin**, v. 54, n.6, p. 802-806, 2006.

RAIJADA, D. K. et al. Characterization of degradation products of amorphous and polymorphic forms of clopidogrel bisulphate under solid state stress conditions. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, vol. 52, n. 3, p. 332-344, 2010.

RAKIBE, U. et al. LC and LC–MS/MS studies for the identification and characterization of degradation products of acebutolol. **Journal of pharmaceutical analysis**, v. 8, n. 6, p. 357-365, 2018.

RAVANI, L. et al. Clotrimazole-loaded nanostructured lipid carrier hydrogels: Thermal analysis and in vitro studies. **International journal of pharmaceutics**, v. 454, n. 2, p. 695-702, 2013.

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

REIST, M. et al. Racemization, enantiomerization, diastereomerization, and epimerization: their meaning and pharmacological significance. **Chirality**, v. 7, n. 6, p. 396-400, 1995.

REYNOLDS, D. W. et al. Available guidance and best practices for conducting forced degradation studies. **Pharmaceutical Technology**, vol. 26, n. 2, p. 48-56, 2002.

ROGE, A. B. et al. Forced degradation study: an important tool in drug development. **Asian Journal of Pharmaceutical Research**, vol. 3, n. 4, p. 198-201, 2013.

ROWE, R. C; SHESKEY, P.J.; Owen, S.C. **Handbook of Pharmaceutical Excipients**. 6 ed., London: Pharmaceutical Press, 2009.

ROY, J. **An introduction to pharmaceutical sciences: Production, chemistry, techniques and technology**. Elsevier, 2011.

SANVORDEKER, D. Stabilization of 16-oxygenated prostanoid acid derivatives. U.S. Patent n. 4 (301), p. 146, 1981.

SCHYMANSKI, E. L. et al. Identifying small molecules via high resolution mass spectrometry: communicating confidence. **Environ. Sci. Technol**, v. 48, n. 4, p. 2097–2098 2014.

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

SHELDON, W. R. et al. Misoprostol for the prevention and treatment of postpartum hemorrhage. **Expert opinion on investigational drugs**, v. 21, n. 2, p. 235-250, 2012.

SHERIKAR, O; MEHTA, P. Comprehensive assessment of degradation behavior of aspirin and atorvastatin singly and in combination by using a validated RP-HPLC method. **Scientia pharmaceutica**, vol. 81, n.1, p. 195-210, 2013.

SHERIKAR, O; MEHTA, P. Comprehensive assessment of degradation behavior of aspirin and atorvastatin singly and in combination by using a validated RP-HPLC method. **Scientia pharmaceutica**, vol. 81, n.1, p. 195-210, 2013.

SILVA, J. A. D. Administração cutânea de fármacos: desafios e estratégias para o desenvolvimento de formulações transdérmicas. **Revista de Ciências Farmacêuticas básica e aplicada**, v. 31, n. 3, 2010.

SIMON, A. et al. Comparative evaluation of rivastigmine permeation from a transdermal system in the Franz cell using synthetic membranes and pig ear skin with in vivo-in vitro correlation. **International journal of pharmaceuticals**, v. 512, n. 1, p. 234-241, 2016.

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

SLENO, L. The use of mass defect in modern mass spectrometry. **Journal of mass spectrometry**, v. 47, n. 2, p. 226-236, 2012.

SQUIER, C. A. et al. Porcine vagina ex vivo as a model for studying permeability and pathogenesis in mucosa. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 97, n. 1, p. 9-21, 2008.

SQUIER, C. A.; KREMER, M; WERTZ, P. W. Continuous flow mucosal cells for measuring the in-vitro permeability of small tissue samples. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 86, n. 1, p. 82-84, 1997.

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

STOBIECKI, M. Application of mass spectrometry for identification and structural studies of flavonoid glycosides. **Phytochemistry**, v. 54, n. 3, p. 237-256, 2000.

STOILJKOVIĆ, Z. et al. Investigation of forced and total degradation products of amlodipine besylate by liquid chromatography and liquid chromatography-mass spectrometry. **Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly**, vol. 20, n. 2, p. 295-304, 2014.

SUTTER, A. et al. Use of in silico systems and expert knowledge for structure-based assessment of potentially mutagenic impurities. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 67, n. 1, p. 39-52, 2013.

TANG, O. S.; GEMZELL-DANIELSSON, K.; HO, P. C. Misoprostol: pharmacokinetic profiles, effects on the uterus and side-effects. **International Journal of Gynecology & Obstetrics**, v. 99, p. 160-167, 2007.

TANG, O. S. et al. Pharmacokinetics of different routes of administration of misoprostol. **Human reproduction**, v. 17, n. 2, p. 332-336, 2002.

TEASDALE, A. ICH M7: Assessment and Control of DNA Reactive (Mutagenic) Impurities in Pharmaceuticals to Limit Potential Carcinogenic Risk. ICH quality guidelines: an implementation guide, 667-699, 2017.

TESTA, B.; CARRUPT, P-A.; GAL, J. The so-called “interconversion” of stereoisomeric drugs: an attempt at clarification. **Chirality**, v. 5, n. 3, p. 105-111, 1993.

TLUCZKIEWICZ, I. et al. Improvement of the Cramer classification for oral exposure using the database TTC Rep Dose - a strategy description. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 61, n. 3, p. 340-350, 2011.

TRBOJEVICH, R. A. et al. Comparative study of silver nanoparticle permeation using Side-Bi-Side and Franz diffusion cells. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 18, p. 1-12, 2016.

USP UNITED STATES PHARMACOPEIAL CONVENTION. 42 ed.; ISBN: 9783420005; ISBN 10: 3420009; 2019.

SILVA, J. W. V. et al. Development of the stability-indicating method, structural elucidation of new photodegradation products from terconazole by LC-MS TOF, and in vitro toxicity. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 216, p. 114794, 2022.

WASYLASCHUK, W. R. et al. Evaluation of hydroperoxides in common pharmaceutical excipients. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 96, n. 1, p. 106-116, 2007.

WEEKS, A. D.; NAVARATNAM, K.; ALFIREVIC, Z. Simplifying oral misoprostol protocols for the induction of labour. **International Journal of Gynecology & Obstetrics**, v. 124, n.11, p. 1642, 2017.

WEN, C. et al. Regioselective remote C5 cyanoalkoxylation and cyanoalkylation of 8-aminoquinolines with azobisisobutyronitrile. **Chemical Communications**, v. 56, n. 66, p. 9529-9532, 2020.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Expert Committee on Specification for Pharmaceutical Preparations, WHO Technical Report Series 953, Annex 2, Stability Testing of Active Pharmaceutical Ingredients and Finished Pharmaceutical Products, Geneva, Switzerland, 2009.

WING, D. A. et al. Misoprostol: an effective agent for cervical ripening and labor induction. **American journal of obstetrics and gynecology**, v. 172, n. 6, p. 1811-1816, 1995.

WU, G. et al. Development of a novel method of misoprostol detection on filter paper: Proof-of-concept. **Biomedical Engineering Letters**, v. 6, n. 2, p. 94-99, 2016.

XIAN, F.; HENDRICKSON, C. L.; MARSHALL, A. G. High resolution mass spectrometry. **Analytical chemistry**, v. 84, n. 2, p. 708-719, 2012.

YUE, H. et al. Quantitative determination of trace levels of hydrogen peroxide in crospovidone and a pharmaceutical product using high performance liquid chromatography with coulometric detection. **International journal of pharmaceutics**, v. 375, n. 1-2, p. 33-40, 2009.

ZHANG, X.; HUANG, H. Copper-Catalyzed Oxidative Coupling of AIBN and Ketone-Derived Enoxysilanes to γ -Ketonitriles. **Organic letters**, v. 20, n. 16, p. 4998-5001, 2018.

ZIEMAN, M. et al. Absorption kinetics of misoprostol with oral or vaginal administration. **Obstetrics & Gynecology**, v. 90, n. 1, 88-92, 1997.

ŻUROMSKA-WITEK, B. Development and validation of Stability-indicating HPLC methods for the estimation of lomefloxacin and balofloxacin oxidation process under ACVA, H₂O₂, or KMnO₄ treatment. Kinetic evaluation and identification of degradation products by mass spectrometry. **Molecules**, v. 25, n. 22, p. 5251, 2020.