



**Nadine Sales Sousa**

Licenciatura em ciências da Engenharia Química e Bioquímica

## **Estudo das vias degradativas de duas substâncias ativas presentes num medicamento**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em

Engenharia Química e Bioquímica

Orientador: Engenheira Clarisse Lourenço dos Santos Penedo,  
Diretora do Laboratório de Ensaios, Tecnimede S.A.

Coorientador: Doutor Mário Fernando José Eusébio, Professor  
Auxiliar, Faculdade de Ciências e Tecnologia -  
Universidade Nova de Lisboa

Júri:

Presidente: Doutora Isabel Maria de Figueiredo Ligeiro da Fonseca, Professora Associada,  
Faculdade de Ciências e Tecnologia - Universidade Nova de Lisboa

Arguente: Doutora Elvira Maria Mendes Sardão Monteiro Gaspar, Professora Auxiliar,  
Faculdade de Ciências e Tecnologia - Universidade Nova de Lisboa

Vogal: Eng.<sup>a</sup> Clarisse Lourenço dos Santos Penedo, Diretora do Laboratório de Ensaios,  
Tecnimede S.A.



**Novembro de 2020**

**Nadine Sales Sousa**

Licenciatura em ciências da Engenharia Química e Bioquímica

## **Estudo das vias degradativas de duas substâncias ativas presentes num medicamento**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em

Engenharia Química e Bioquímica

Orientador: Engenheira Clárisse Lourenço dos Santos Penedo,  
Diretora do Laboratório de Ensaios, Tecnimede S.A.

Coorientador: Doutor Mário Fernando José Eusébio, Professor  
Auxiliar, Faculdade de Ciências e Tecnologia -  
Universidade Nova de Lisboa

Júri:

Presidente: Doutora Isabel Maria de Figueiredo Ligeiro da Fonseca, Professora Associada,  
Faculdade de Ciências e Tecnologia - Universidade Nova de Lisboa

Arguente: Doutora Elvira Maria Mendes Sardão Monteiro Gaspar, Professora Auxiliar,  
Faculdade de Ciências e Tecnologia - Universidade Nova de Lisboa

Vogal: Eng.<sup>a</sup> Clárisse Lourenço dos Santos Penedo, Diretora do Laboratório de Ensaios,  
Tecnimede S.A.

**Novembro de 2020**

"Estudo das vias degradativas de duas substâncias ativas presentes num medicamento" *Copyright* ©, Nadine Sales Sousa, Faculdade de Ciências e Tecnologia e Universidade Nova de Lisboa.

#### **Indicação dos direitos de cópia**

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

#### ***Copyright* ©**

Faculdade de Ciências e Tecnologia and Universidade Nova de Lisboa have the perpetual right with no geographical boundaries, to archive and publish this dissertation through printed copies reproduced on paper or digital form or by any means known or to be invented, and to divulge through scientific repositories and admit your copy and distribution for educational purposes or research, not commercial, as long as the credit is given to the author and editor.

## **Agradecimentos**

Em primeiro lugar, gostaria de deixar o meu agradecimento ao Grupo Tecnimede, especialmente ao Dr. João Serra, pela oportunidade de realizar este estágio na empresa.

Em seguida, gostaria de agradecer à Eng.<sup>a</sup> Clárisse Penedo e ao Eng.<sup>o</sup> Ricardo Pereira, pela orientação e pelos conhecimentos transmitidos que me permitiram a realização deste trabalho, assim como por todo o apoio e disponibilidade durante o período de estágio.

Não poderia deixar de dar o meu agradecimento a todos os colaboradores do laboratório com quem me cruzei ao longo destes meses, pela simpatia, por me terem recebido tão bem e pela disponibilidade em ajudar.

Ao professor Mário Eusébio, agradeço o apoio e orientação na realização desta dissertação.

Por último, agradecer aos meus amigos e à minha família, em especial aos meus pais, Lúcia Sousa e Humberto Sousa, por todo o apoio, incentivo e ajuda na superação dos obstáculos que foram surgindo durante o meu percurso académico. Sem eles não teria sido possível.





## Resumo

O estudo de degradação forçada de duas substâncias ativas presentes num medicamento, o Ativo X e o Ativo Y, teve como objetivo a obtenção das principais vias de degradação, e a demonstração da adequabilidade dos métodos cromatográficos utilizados como indicadores de estabilidade dos ativos, através da análise por cromatografia líquida de alta eficiência.

As substâncias ativas foram submetidas a condições de degradação através da exposição à luz, temperatura, humidade, hidrólise ácida e básica e oxidação, de modo a promover a sua degradação.

Na exposição à luz, temperatura e humidade as substâncias ativas apresentaram estabilidade, não se verificando o aparecimento de impurezas de degradação superiores aos limites de quantificação.

Em condições de hidrólise básica foi detetado o aparecimento da Impureza F, após exposição ao hidróxido de sódio 1N, com teor de 3,5% depois de 24 horas. A Impureza A também foi detetada com teor na ordem dos 0,02%, assim como outras impurezas desconhecidas. No Ativo X não foi detetado o aparecimento de impurezas.

O Ativo X demonstrou maior suscetibilidade à hidrólise ácida do que o Ativo Y, com uma diminuição no teor de ativo mais significativa. No caso do Ativo Y, verificou-se o aparecimento de impurezas desconhecidas e da Impureza F com teor de 0,03% após 14 dias.

Nas condições de oxidação, em ambos os ativos, foi verificada a deteção de várias impurezas desconhecidas. No entanto, o Ativo Y demonstrou maior sensibilidade com diminuições significativas no seu teor, e com o aparecimento da Impureza F com teor de 2,3%, após 14 dias.

Em suma, a hidrólise básica e a oxidação demonstraram ser as principais vias de degradação do Ativo Y. O Ativo X tem como principais vias degradativas as hidrólises ácida e básica. Ficou também demonstrada a adequabilidade dos métodos utilizados na realização dos ensaios como indicadores de estabilidade dos ativos.

Palavras-chave: Degradação Forçada, Vias de Degradação, Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC), Estabilidade



## **Abstract**

The forced degradation study of two active substances present in a drug, Substance X and Substance Y, aimed to obtain the main degradation pathways and the demonstration of the suitability of the chromatographic methods used as stability indicators, through high performance liquid chromatography analysis.

The active substances were submitted to degradation conditions through exposure to light, temperature, humidity, acid and basic Hydrolysis and oxidation, to promote their degradation.

After light, temperature and humidity exposure, drug substances presented stability, without the presence of degradation impurities above quantification limits.

Under basic hydrolysis conditions, was detected the appearance of Impurity F with a content of 3,5%, after 24 hours of exposure to sodium hydroxide 1N. The Impurity A was also detected with a content around 0,02%, as well as other unspecified impurities. Impurities were not detected in Substance X.

Substance X showed greater susceptibility to acid hydrolysis than Substance Y, with a more significant decrease in active content. In Substance Y was verified the appearance of unspecified impurities and Impurity F with a content of 0,03% after 14 days.

Under oxidation condition, in both drug substances, was detected several unspecified impurities. However, Substance Y demonstrated more sensitivity with significant decrease in active content and the appearance of Impurity F with a content of 2,3% after 14 days.

In short, basic hydrolysis and oxidation demonstrated to be the main degradation pathways of Substance Y. Substance X has as main degradation pathways acidic and basic hydrolysis. The suitability of the methods used in the assays as active substances stability indicators was also demonstrated.

**Keywords:** Forced Degradations, Degradation pathways, High Performance Liquid Chromatography (HPLC), Stability



## Índice

|                                                                        |      |
|------------------------------------------------------------------------|------|
| <b>AGRADECIMENTOS</b> .....                                            | III  |
| <b>RESUMO</b> .....                                                    | V    |
| <b>ABSTRACT</b> .....                                                  | VII  |
| <b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....                                         | XI   |
| <b>ÍNDICE DE TABELAS</b> .....                                         | XVII |
| <b>LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E ACRÓNIMOS</b> .....                 | XIX  |
| <b>1. ENQUADRAMENTO E OBJETIVOS</b> .....                              | 1    |
| <b>1.1. Enquadramento</b> .....                                        | 1    |
| 1.1.1. Boas Práticas de Laboratório.....                               | 1    |
| 1.1.2. Acreditação de Laboratórios - Norma NP EN ISO/IEC 17025 .....   | 1    |
| <b>1.2. Objetivos da Dissertação</b> .....                             | 1    |
| <b>1.3. Estrutura da Dissertação</b> .....                             | 2    |
| <b>1.4. Grupo Tecnimede</b> .....                                      | 3    |
| <b>2. ESTADO DA ARTE</b> .....                                         | 5    |
| <b>2.1. Estudo de Degradação Forçada</b> .....                         | 5    |
| 2.1.1. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC).....            | 6    |
| 2.1.2. Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (UPLC).....           | 10   |
| 2.1.3. Validação de Métodos Analíticos.....                            | 10   |
| <b>2.2. Possíveis Vias Degradativas das Substâncias Ativas</b> .....   | 10   |
| <b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....                                    | 15   |
| <b>3.1. Método de Doseamento</b> .....                                 | 15   |
| <b>3.2. Método dos Compostos Relacionados do Ativo X</b> .....         | 16   |
| <b>3.3. Método dos Compostos Relacionados do Ativo Y</b> .....         | 17   |
| <b>3.4. Método da Impureza F do Ativo Y</b> .....                      | 18   |
| <b>3.5. Reagentes</b> .....                                            | 19   |
| <b>4. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DE RESULTADOS</b> .....                 | 21   |
| <b>4.1. Adequabilidade do sistema</b> .....                            | 22   |
| 4.1.1. Doseamento.....                                                 | 22   |
| 4.1.2. Compostos Relacionados do Ativo X .....                         | 23   |
| 4.1.3. Compostos relacionados do Ativo Y .....                         | 24   |
| 4.1.4. Impureza F do Ativo Y .....                                     | 25   |
| <b>4.2. Controlo</b> .....                                             | 26   |
| 4.2.1. Ativo X.....                                                    | 26   |
| 4.2.2. Ativo Y.....                                                    | 27   |
| 4.2.3. Cromatogramas do Ativo X e do Ativo Y – Controlo.....           | 27   |
| 4.2.4. Cromatogramas de diluentes e soluções em branco – Controlo..... | 29   |
| <b>4.3. Fotossensibilidade</b> .....                                   | 30   |
| 4.3.1. Ativo X.....                                                    | 30   |
| 4.3.2. Ativo Y.....                                                    | 31   |
| 4.3.3. Cromatogramas do Ativo X e do Ativo Y – Suntest.....            | 31   |
| 4.3.4. Cromatogramas de diluentes e soluções em branco – Suntest.....  | 35   |
| <b>4.4. Temperatura</b> .....                                          | 36   |
| 4.4.1. Ativo X.....                                                    | 37   |

|                     |                                                                          |     |
|---------------------|--------------------------------------------------------------------------|-----|
| 4.4.2.              | Ativo Y .....                                                            | 37  |
| 4.4.3.              | Cromatogramas do Ativo X e do Ativo Y – Temperatura .....                | 38  |
| 4.4.4.              | Cromatogramas de diluente e soluções em branco – Temperatura .....       | 41  |
| <b>4.5.</b>         | <b>Humidade</b> .....                                                    | 42  |
| 4.5.1.              | Ativo X .....                                                            | 43  |
| 4.5.2.              | Ativo Y .....                                                            | 43  |
| 4.5.3.              | Cromatogramas do Ativo X e do Ativo Y – Humidade .....                   | 44  |
| 4.5.4.              | Cromatogramas de diluente e soluções em branco – Humidade .....          | 47  |
| <b>4.6.</b>         | <b>Hidrólise Básica</b> .....                                            | 48  |
| 4.6.1.              | Ativo X .....                                                            | 49  |
| 4.6.2.              | Ativo Y .....                                                            | 50  |
| 4.6.3.              | Cromatogramas do Ativo X e do Ativo Y – Hidrólise Básica .....           | 51  |
| 4.6.4.              | Cromatogramas de diluentes e soluções em branco – Hidrólise Básica ..... | 60  |
| <b>4.7.</b>         | <b>Hidrólise Básica – Novas condições de degradação</b> .....            | 61  |
| 4.7.1.              | Ativo X .....                                                            | 62  |
| 4.7.2.              | Ativo Y .....                                                            | 62  |
| 4.7.3.              | Cromatogramas do Ativo X e do Ativo Y – Hidrólise Básica .....           | 64  |
| 4.7.4.              | Cromatogramas de diluente e soluções em branco – Hidrólise Básica .....  | 70  |
| <b>4.8.</b>         | <b>Hidrólise Ácida</b> .....                                             | 72  |
| 4.8.1.              | Ativo X .....                                                            | 72  |
| 4.8.2.              | Ativo Y .....                                                            | 73  |
| 4.8.3.              | Cromatogramas do Ativo X e do Ativo Y – Hidrólise Ácida .....            | 74  |
| 4.8.4.              | Cromatogramas de diluentes e soluções em branco – Hidrólise Ácida .....  | 83  |
| <b>4.9.</b>         | <b>Oxidação</b> .....                                                    | 85  |
| 4.9.1.              | Ativo X .....                                                            | 85  |
| 4.9.2.              | Ativo Y .....                                                            | 86  |
| 4.9.3.              | Cromatogramas do Ativo X e do Ativo Y – Oxidação .....                   | 89  |
| 4.9.4.              | Cromatogramas de diluente e soluções em branco – Oxidação .....          | 97  |
| <b>5.</b>           | <b>CONCLUSÃO E PROPOSTA DE TRABALHO FUTURO</b> .....                     | 101 |
| <b>5.1.</b>         | <b>Conclusão</b> .....                                                   | 101 |
| <b>5.2.</b>         | <b>Proposta de Trabalho Futuro</b> .....                                 | 103 |
| <b>BIBLIOGRAFIA</b> | .....                                                                    | 105 |

## Índice de Figuras

|                                                                                          |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| FIGURA 2.1 REPRESENTAÇÃO DE UM SISTEMA HPLC .....                                        | 8  |
| FIGURA 2.2 REPRESENTAÇÃO DO TEMPO DE RETENÇÃO .....                                      | 9  |
| FIGURA 2.3 ATIVO Y: MECANISMO DE FORMAÇÃO DA IMPUREZA A POR AÇÃO DA TEMPERATURA .....    | 11 |
| FIGURA 2.4 ATIVO Y: MECANISMO DE FORMAÇÃO DA IMPUREZA F POR HIDRÓLISE ÁCIDA.....         | 11 |
| FIGURA 2.5 ATIVO Y: MECANISMO DE FORMAÇÃO DAS IMPUREZAS E E F POR HIDRÓLISE BÁSICA ..... | 12 |
| FIGURA 2.6 ATIVO Y: MECANISMO DE FORMAÇÃO DA IMPUREZA A POR HIDRÓLISE BÁSICA.....        | 12 |
| FIGURA 2.7 POSSÍVEL DEGRADAÇÃO DO ATIVO X EM CONDIÇÕES DE HIDRÓLISE .....                | 12 |
| FIGURA 2.8 POSSÍVEL DEGRADAÇÃO DO ATIVO X EM CONDIÇÕES DE OXIDAÇÃO.....                  | 13 |
| FIGURA 2.9 ATIVO X: FORMAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS EM CONDIÇÕES DE OXIDAÇÃO.....        | 13 |
| FIGURA 2.10 DESALOGENAÇÃO DO ATIVO X .....                                               | 13 |
| FIGURA 4.1 CROMATOGRAMA DO ATIVO X - DOSEAMENTO - CONTROLO.....                          | 27 |
| FIGURA 4.2 CROMATOGRAMA DO ATIVO X - COMPOSTOS RELACIONADOS – CONTROLO.....              | 28 |
| FIGURA 4.3 CROMATOGRAMA DO ATIVO Y - DOSEAMENTO - CONTROLO.....                          | 28 |
| FIGURA 4.4 CROMATOGRAMA DO ATIVO Y - COMPOSTOS RELACIONADOS – CONTROLO.....              | 28 |
| FIGURA 4.5 CROMATOGRAMA DO ATIVO Y - IMPUREZA F DO ATIVO Y – CONTROLO .....              | 29 |
| FIGURA 4.6 CROMATOGRAMA DE DILUENTE - COMPOSTOS RELACIONADOS ATIVO X .....               | 29 |
| FIGURA 4.7 CROMATOGRAMA DE DILUENTE - COMPOSTOS RELACIONADOS ATIVO Y .....               | 29 |
| FIGURA 4.8 CROMATOGRAMA DE DILUENTE – IMPUREZA F DO ATIVO Y.....                         | 30 |
| FIGURA 4.9 CROMATOGRAMA DE SOLUÇÃO EM BRANCO – IMPUREZA F DO ATIVO Y .....               | 30 |
| FIGURA 4.10 CROMATOGRAMA DO ATIVO X - DOSEAMENTO – SUNTEST 24 HORAS.....                 | 32 |
| FIGURA 4.11 CROMATOGRAMA DO ATIVO X - COMPOSTOS RELACIONADOS – SUNTEST 24 HORAS.....     | 32 |
| FIGURA 4.12 CROMATOGRAMA DO ATIVO X - DOSEAMENTO – SUNTEST 48 HORAS.....                 | 32 |
| FIGURA 4.13 CROMATOGRAMA DO ATIVO X - COMPOSTOS RELACIONADOS – SUNTEST, 48 HORAS.....    | 33 |
| FIGURA 4.14 CROMATOGRAMA DO ATIVO Y - DOSEAMENTO – SUNTEST 24 HORAS.....                 | 33 |
| FIGURA 4.15 CROMATOGRAMA DO ATIVO Y - COMPOSTOS RELACIONADOS – SUNTEST 24 HORAS.....     | 34 |
| FIGURA 4.16 CROMATOGRAMA DO ATIVO Y - MÉTODO DE DOSEAMENTO – SUNTEST 48 HORAS .....      | 34 |
| FIGURA 4.17 CROMATOGRAMA DO ATIVO Y - COMPOSTOS RELACIONADOS – SUNTEST 48 HORAS.....     | 34 |
| FIGURA 4.18 CROMATOGRAMA DO ATIVO Y - IMPUREZA F DO ATIVO Y – SUNTEST 24 HORAS .....     | 35 |
| FIGURA 4.19 CROMATOGRAMA DO ATIVO Y - IMPUREZA F DO ATIVO Y – SUNTEST 48 HORAS .....     | 35 |
| FIGURA 4.20 CROMATOGRAMA DE DILUENTE - COMPOSTOS RELACIONADOS ATIVO X .....              | 36 |
| FIGURA 4.21 CROMATOGRAMA DE DILUENTE - COMPOSTOS RELACIONADOS ATIVO Y .....              | 36 |
| FIGURA 4.22 CROMATOGRAMA DE DILUENTE – IMPUREZA F DO ATIVO Y.....                        | 36 |
| FIGURA 4.23 CROMATOGRAMA DE SOLUÇÃO EM BRANCO – IMPUREZA F DO ATIVO Y .....              | 36 |
| FIGURA 4.24 CROMATOGRAMA DO ATIVO X - DOSEAMENTO – 60°C, 7 DIAS.....                     | 38 |
| FIGURA 4.25 CROMATOGRAMA DO ATIVO X - COMPOSTOS RELACIONADOS – 60°C, 7 DIAS.....         | 38 |
| FIGURA 4.26 CROMATOGRAMA DO ATIVO X - DOSEAMENTO – 60°C, 14 DIAS.....                    | 39 |
| FIGURA 4.27 CROMATOGRAMA DO ATIVO X - COMPOSTOS RELACIONADOS – 60°C, 14 DIAS.....        | 39 |
| FIGURA 4.28 CROMATOGRAMA DO ATIVO Y - DOSEAMENTO – 60°C, 7 DIAS.....                     | 39 |
| FIGURA 4.29 CROMATOGRAMA DO ATIVO Y - COMPOSTOS RELACIONADOS – 60°C, 7 DIAS.....         | 40 |
| FIGURA 4.30 CROMATOGRAMA DO ATIVO Y - DOSEAMENTO – 60°C, 14 DIAS.....                    | 40 |
| FIGURA 4.31 CROMATOGRAMA DO ATIVO Y - COMPOSTOS RELACIONADOS – 60°C, 14 DIAS.....        | 40 |
| FIGURA 4.32 CROMATOGRAMA DO ATIVO Y - IMPUREZA F DO ATIVO Y – 60°C, 7 DIAS .....         | 41 |
| FIGURA 4.33 CROMATOGRAMA DO ATIVO Y - IMPUREZA F DO ATIVO Y – 60°C, 14 DIAS .....        | 41 |



|                                                                                       |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------|----|
| FIGURA 4.34 CROMATOGRAMA DE DILUENTE - COMPOSTOS RELACIONADOS ATIVO X .....           | 42 |
| FIGURA 4.35 CROMATOGRAMA DE DILUENTE - COMPOSTOS RELACIONADOS ATIVO Y .....           | 42 |
| FIGURA 4.36 CROMATOGRAMA DE DILUENTE – IMPUREZA F DO ATIVO Y .....                    | 42 |
| FIGURA 4.37 CROMATOGRAMA DE SOLUÇÃO EM BRANCO – IMPUREZA F DO ATIVO Y .....           | 42 |
| FIGURA 4.38 CROMATOGRAMA DO ATIVO X - DOSEAMENTO – 85%HR, 7 DIAS .....                | 44 |
| FIGURA 4.39 CROMATOGRAMA DO ATIVO X - COMPOSTOS RELACIONADOS – 85%HR, 7 DIAS .....    | 44 |
| FIGURA 4.40 CROMATOGRAMA DO ATIVO X - DOSEAMENTO – 85%HR, 14 DIAS .....               | 44 |
| FIGURA 4.41 CROMATOGRAMA DO ATIVO X - COMPOSTOS RELACIONADOS – 85%HR, 14 DIAS .....   | 45 |
| FIGURA 4.42 CROMATOGRAMA DO ATIVO Y - DOSEAMENTO – 85%HR, 7 DIAS .....                | 45 |
| FIGURA 4.43 CROMATOGRAMA DO ATIVO Y - COMPOSTOS RELACIONADOS – 85%HR, 7 DIAS .....    | 46 |
| FIGURA 4.44 CROMATOGRAMA DO ATIVO Y - DOSEAMENTO – 85%HR, 14 DIAS .....               | 46 |
| FIGURA 4.45 CROMATOGRAMA DO ATIVO Y - COMPOSTOS RELACIONADOS – 85%HR, 14 DIAS .....   | 46 |
| FIGURA 4.46 CROMATOGRAMA DO ATIVO Y - IMPUREZA F DO ATIVO Y – 85%HR, 7 DIAS .....     | 47 |
| FIGURA 4.47 CROMATOGRAMA DO ATIVO Y - IMPUREZA F DO ATIVO Y – 85%HR, 14 DIAS .....    | 47 |
| FIGURA 4.48 CROMATOGRAMA DE DILUENTE - COMPOSTOS RELACIONADOS ATIVO X .....           | 48 |
| FIGURA 4.49 CROMATOGRAMA DE DILUENTE - COMPOSTOS RELACIONADOS ATIVO Y .....           | 48 |
| FIGURA 4.50 CROMATOGRAMA DE DILUENTE – IMPUREZA F DO ATIVO Y .....                    | 48 |
| FIGURA 4.51 CROMATOGRAMA DE SOLUÇÃO EM BRANCO – IMPUREZA F DO ATIVO Y .....           | 48 |
| FIGURA 4.52 CROMATOGRAMA DO ATIVO X - DOSEAMENTO – NaOH 1N, 7 DIAS .....              | 52 |
| FIGURA 4.53 CROMATOGRAMA DO ATIVO X - COMPOSTOS RELACIONADOS – NaOH 1N, 7 DIAS .....  | 52 |
| FIGURA 4.54 CROMATOGRAMA DO ATIVO X - DOSEAMENTO – NaOH 1N, 14 DIAS .....             | 52 |
| FIGURA 4.55 CROMATOGRAMA DO ATIVO X - COMPOSTOS RELACIONADOS – NaOH 1N, 14 DIAS ..... | 53 |
| FIGURA 4.56 CROMATOGRAMA DO ATIVO X - DOSEAMENTO – NaOH 2N, 7 DIAS .....              | 53 |
| FIGURA 4.57 CROMATOGRAMA DO ATIVO X - COMPOSTOS RELACIONADOS – NaOH 2N, 7 DIAS .....  | 53 |
| FIGURA 4.58 CROMATOGRAMA DO ATIVO X - DOSEAMENTO – NaOH 2N, 14 DIAS .....             | 54 |
| FIGURA 4.59 CROMATOGRAMA DO ATIVO X - COMPOSTOS RELACIONADOS – NaOH 2N, 14 DIAS ..... | 54 |
| FIGURA 4.60 CROMATOGRAMA DO ATIVO X - DOSEAMENTO – NaOH 3N, 7 DIAS .....              | 54 |
| FIGURA 4.61 CROMATOGRAMA DO ATIVO X - COMPOSTOS RELACIONADOS – NaOH 3N, 7 DIAS .....  | 55 |
| FIGURA 4.62 CROMATOGRAMA DO ATIVO X - DOSEAMENTO – NaOH 3N, 14 DIAS .....             | 55 |
| FIGURA 4.63 CROMATOGRAMA DO ATIVO X - COMPOSTOS RELACIONADOS – NaOH 3N, 14 DIAS ..... | 55 |
| FIGURA 4.64 CROMATOGRAMA DO ATIVO Y - DOSEAMENTO – NaOH 1N, 7 DIAS .....              | 56 |
| FIGURA 4.65 CROMATOGRAMA DO ATIVO Y - COMPOSTOS RELACIONADOS – NaOH 1N, 7 DIAS .....  | 56 |
| FIGURA 4.66 CROMATOGRAMA DO ATIVO Y - DOSEAMENTO – NaOH 1N, 14 DIAS .....             | 56 |
| FIGURA 4.67 CROMATOGRAMA DO ATIVO Y - COMPOSTOS RELACIONADOS – NaOH 1N, 14 DIAS ..... | 57 |
| FIGURA 4.68 CROMATOGRAMA DO ATIVO Y - DOSEAMENTO – NaOH 2N, 7 DIAS .....              | 57 |
| FIGURA 4.69 CROMATOGRAMA DO ATIVO Y - COMPOSTOS RELACIONADOS – NaOH 2N, 7 DIAS .....  | 57 |
| FIGURA 4.70 CROMATOGRAMA DO ATIVO Y - DOSEAMENTO – NaOH 2N, 14 DIAS .....             | 58 |
| FIGURA 4.71 CROMATOGRAMA DO ATIVO Y - COMPOSTOS RELACIONADOS – NaOH 2N, 14 DIAS ..... | 58 |
| FIGURA 4.72 CROMATOGRAMA DO ATIVO Y - DOSEAMENTO – NaOH 3N, 7 DIAS .....              | 58 |
| FIGURA 4.73 CROMATOGRAMA DO ATIVO Y - COMPOSTOS RELACIONADOS – NaOH 3N, 7 DIAS .....  | 59 |
| FIGURA 4.74 CROMATOGRAMA DO ATIVO Y - DOSEAMENTO – NaOH 3N, 14 DIAS .....             | 59 |
| FIGURA 4.75 CROMATOGRAMA DO ATIVO Y - COMPOSTOS RELACIONADOS – NaOH 3N, 14 DIAS ..... | 59 |
| FIGURA 4.76 CROMATOGRAMA DE DILUENTE - COMPOSTOS RELACIONADOS ATIVO X .....           | 60 |
| FIGURA 4.77 CROMATOGRAMA DE BRANCO - NaOH 1N - COMPOSTOS RELACIONADOS ATIVO X .....   | 60 |
| FIGURA 4.78 CROMATOGRAMA DE BRANCO - NaOH 2N - COMPOSTOS RELACIONADOS ATIVO X .....   | 60 |

|                                                                                          |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| FIGURA 4.79 CROMATOGRAMA DE BRANCO - NaOH 3N - COMPOSTOS RELACIONADOS ATIVO X .....      | 60 |
| FIGURA 4.80 CROMATOGRAMA DE DILUENTE - COMPOSTOS RELACIONADOS ATIVO Y .....              | 61 |
| FIGURA 4.81 CROMATOGRAMA DE BRANCO - NaOH 1N - COMPOSTOS RELACIONADOS ATIVO Y .....      | 61 |
| FIGURA 4.82 CROMATOGRAMA DE BRANCO - NaOH 2N - COMPOSTOS RELACIONADOS ATIVO Y .....      | 61 |
| FIGURA 4.83 CROMATOGRAMA DE BRANCO - NaOH 3N - COMPOSTOS RELACIONADOS ATIVO Y .....      | 61 |
| FIGURA 4.84 CROMATOGRAMA DO ATIVO X - DOSEAMENTO – NaOH 0,5N, 8 HORAS .....              | 64 |
| FIGURA 4.85 CROMATOGRAMA DO ATIVO X - COMPOSTOS RELACIONADOS – NaOH 0,5N, 8 HORAS .....  | 64 |
| FIGURA 4.86 CROMATOGRAMA DO ATIVO X - DOSEAMENTO – NaOH 0,5N, 24 HORAS .....             | 65 |
| FIGURA 4.87 CROMATOGRAMA DO ATIVO X - COMPOSTOS RELACIONADOS – NaOH 0,5N, 24 HORAS ..... | 65 |
| FIGURA 4.88 CROMATOGRAMA DO ATIVO X - DOSEAMENTO – NaOH 1N, 8 HORAS .....                | 65 |
| FIGURA 4.89 CROMATOGRAMA DO ATIVO X - COMPOSTOS RELACIONADOS – NaOH 1N, 8 HORAS .....    | 66 |
| FIGURA 4.90 CROMATOGRAMA DO ATIVO X - DOSEAMENTO – NaOH 1N, 24 HORAS .....               | 66 |
| FIGURA 4.91 CROMATOGRAMA DO ATIVO X - COMPOSTOS RELACIONADOS – NaOH 1N, 24 HORAS .....   | 66 |
| FIGURA 4.92 CROMATOGRAMA DO ATIVO Y - DOSEAMENTO – NaOH 0,5N, 8 HORAS .....              | 67 |
| FIGURA 4.93 CROMATOGRAMA DO ATIVO Y - COMPOSTOS RELACIONADOS – NaOH 0,5N, 8 HORAS .....  | 67 |
| FIGURA 4.94 CROMATOGRAMA DO ATIVO Y - DOSEAMENTO – NaOH 0,5N, 24 HORAS .....             | 67 |
| FIGURA 4.95 CROMATOGRAMA DO ATIVO Y - COMPOSTOS RELACIONADOS – NaOH 0,5N, 24 HORAS ..... | 68 |
| FIGURA 4.96 CROMATOGRAMA DO ATIVO Y - DOSEAMENTO – NaOH 1N, 8 HORAS .....                | 68 |
| FIGURA 4.97 CROMATOGRAMA DO ATIVO Y - COMPOSTOS RELACIONADOS – NaOH 1N, 8 HORAS .....    | 68 |
| FIGURA 4.98 CROMATOGRAMA DO ATIVO Y - DOSEAMENTO – NaOH 1N, 24 HORAS .....               | 69 |
| FIGURA 4.99 CROMATOGRAMA DO ATIVO Y - COMPOSTOS RELACIONADOS – NaOH 1N, 24 HORAS .....   | 69 |
| FIGURA 4.100 CROMATOGRAMA DO ATIVO Y - IMPUREZA F DO ATIVO Y – NaOH 1N, 8 HORAS .....    | 69 |
| FIGURA 4.101 CROMATOGRAMA DO ATIVO Y - IMPUREZA F DO ATIVO Y – NaOH 1N, 24 HORAS .....   | 70 |
| FIGURA 4.102 CROMATOGRAMA DE DILUENTE - COMPOSTOS RELACIONADOS ATIVO X .....             | 70 |
| FIGURA 4.103 CROMATOGRAMA DE BRANCO - NaOH 0,5N - COMPOSTOS RELACIONADOS ATIVO X .....   | 70 |
| FIGURA 4.104 CROMATOGRAMA DE BRANCO - NaOH 1N - COMPOSTOS RELACIONADOS ATIVO X .....     | 71 |
| FIGURA 4.105 CROMATOGRAMA DE DILUENTE - COMPOSTOS RELACIONADOS ATIVO Y .....             | 71 |
| FIGURA 4.106 CROMATOGRAMA DE BRANCO - NaOH 0,5N - COMPOSTOS RELACIONADOS ATIVO Y .....   | 71 |
| FIGURA 4.107 CROMATOGRAMA DE BRANCO - NaOH 1N - COMPOSTOS RELACIONADOS ATIVO Y .....     | 71 |
| FIGURA 4.108 CROMATOGRAMA DE DILUENTE – IMPUREZA F DO ATIVO Y .....                      | 71 |
| FIGURA 4.109 CROMATOGRAMA DE BRANCO – NaOH 1N – IMPUREZA F DO ATIVO Y .....              | 72 |
| FIGURA 4.110 CROMATOGRAMA DO ATIVO X - DOSEAMENTO – HCL 1N, 7 DIAS .....                 | 74 |
| FIGURA 4.111 CROMATOGRAMA DO ATIVO X - COMPOSTOS RELACIONADOS – HCL 1N, 7 DIAS .....     | 75 |
| FIGURA 4.112 CROMATOGRAMA DO ATIVO X - DOSEAMENTO – HCL 1N, 14 DIAS .....                | 75 |
| FIGURA 4.113 CROMATOGRAMA DO ATIVO X - COMPOSTOS RELACIONADOS – HCL 1N, 14 DIAS .....    | 75 |
| FIGURA 4.114 CROMATOGRAMA DO ATIVO X - DOSEAMENTO – HCL 2N, 7 DIAS .....                 | 76 |
| FIGURA 4.115 CROMATOGRAMA DO ATIVO X - COMPOSTOS RELACIONADOS – HCL 2N, 7 DIAS .....     | 76 |
| FIGURA 4.116 CROMATOGRAMA DO ATIVO X - DOSEAMENTO – HCL 2N, 14 DIAS .....                | 76 |
| FIGURA 4.117 CROMATOGRAMA DO ATIVO X - COMPOSTOS RELACIONADOS – HCL 2N, 14 DIAS .....    | 77 |
| FIGURA 4.118 CROMATOGRAMA DO ATIVO X - DOSEAMENTO – HCL 3N, 7 DIAS .....                 | 77 |
| FIGURA 4.119 CROMATOGRAMA DO ATIVO X - COMPOSTOS RELACIONADOS – HCL 3N, 7 DIAS .....     | 77 |
| FIGURA 4.120 CROMATOGRAMA DO ATIVO X - DOSEAMENTO – HCL 3N, 14 DIAS .....                | 78 |
| FIGURA 4.121 CROMATOGRAMA DO ATIVO X - COMPOSTOS RELACIONADOS – HCL 3N, 14 DIAS .....    | 78 |
| FIGURA 4.122 CROMATOGRAMA DO ATIVO Y - DOSEAMENTO – HCL 1N, 7 DIAS .....                 | 78 |
| FIGURA 4.123 CROMATOGRAMA DO ATIVO Y - COMPOSTOS RELACIONADOS – HCL 1N, 7 DIAS .....     | 79 |

|                                                                                                                  |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| FIGURA 4.124 CROMATOGRAMA DO ATIVO Y - DOSEAMENTO – HCL 1N, 14 DIAS .....                                        | 79 |
| FIGURA 4.125 CROMATOGRAMA DO ATIVO Y - COMPOSTOS RELACIONADOS – HCL 1N, 14 DIAS .....                            | 79 |
| FIGURA 4.126 CROMATOGRAMA DO ATIVO Y - DOSEAMENTO – HCL 2N, 7 DIAS .....                                         | 80 |
| FIGURA 4.127 CROMATOGRAMA DO ATIVO Y - COMPOSTOS RELACIONADOS – HCL 2N, 7 DIAS .....                             | 80 |
| FIGURA 4.128 CROMATOGRAMA DO ATIVO Y - DOSEAMENTO – HCL 2N, 14 DIAS .....                                        | 80 |
| FIGURA 4.129 CROMATOGRAMA DO ATIVO Y - COMPOSTOS RELACIONADOS – HCL 2N, 14 DIAS .....                            | 81 |
| FIGURA 4.130 CROMATOGRAMA DO ATIVO Y - DOSEAMENTO – HCL 3N, 7 DIAS .....                                         | 81 |
| FIGURA 4.131 CROMATOGRAMA DO ATIVO Y - COMPOSTOS RELACIONADOS – HCL 3N, 7 DIAS .....                             | 81 |
| FIGURA 4.132 CROMATOGRAMA DO ATIVO Y - DOSEAMENTO – HCL 3N, 14 DIAS .....                                        | 82 |
| FIGURA 4.133 CROMATOGRAMA DO ATIVO Y - COMPOSTOS RELACIONADOS – HCL 3N, 14 DIAS .....                            | 82 |
| FIGURA 4.134 CROMATOGRAMA DO ATIVO Y - IMPUREZA F DO ATIVO Y – HCL 1N, 14 DIAS.....                              | 82 |
| FIGURA 4.135 CROMATOGRAMA DE DILUENTE - COMPOSTOS RELACIONADOS ATIVO X .....                                     | 83 |
| FIGURA 4.136 CROMATOGRAMA DE BRANCO - HCL 1N - COMPOSTOS RELACIONADOS ATIVO X .....                              | 83 |
| FIGURA 4.137 CROMATOGRAMA DE BRANCO - HCL 2N - COMPOSTOS RELACIONADOS ATIVO X .....                              | 83 |
| FIGURA 4.138 CROMATOGRAMA DE BRANCO - HCL 3N - COMPOSTOS RELACIONADOS ATIVO X .....                              | 83 |
| FIGURA 4.139 CROMATOGRAMA DE DILUENTE - COMPOSTOS RELACIONADOS ATIVO Y .....                                     | 84 |
| FIGURA 4.140 CROMATOGRAMA DE BRANCO - HCL 1N - COMPOSTOS RELACIONADOS ATIVO Y .....                              | 84 |
| FIGURA 4.141 CROMATOGRAMA DE BRANCO - HCL 2N - COMPOSTOS RELACIONADOS ATIVO Y .....                              | 84 |
| FIGURA 4.142 CROMATOGRAMA DE BRANCO - HCL 3N - COMPOSTOS RELACIONADOS ATIVO Y .....                              | 84 |
| FIGURA 4.143 CROMATOGRAMA DE DILUENTE – IMPUREZA F DO ATIVO Y.....                                               | 84 |
| FIGURA 4.144 CROMATOGRAMA DE BRANCO – HCL 1N – IMPUREZA F DO ATIVO Y.....                                        | 85 |
| FIGURA 4.145 CROMATOGRAMA DO ATIVO X - DOSEAMENTO – 10% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , 7 DIAS .....             | 89 |
| FIGURA 4.146 CROMATOGRAMA DO ATIVO X - COMPOSTOS RELACIONADOS – 10%H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , 7 DIAS .....  | 89 |
| FIGURA 4.147 CROMATOGRAMA DO ATIVO X - DOSEAMENTO – 10% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , 14 DIAS .....            | 90 |
| FIGURA 4.148 CROMATOGRAMA DO ATIVO X - COMPOSTOS RELACIONADOS – 10%H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , 14 DIAS ....  | 90 |
| FIGURA 4.149 CROMATOGRAMA DO ATIVO X - DOSEAMENTO – 20% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , 7 DIAS .....             | 90 |
| FIGURA 4.150 CROMATOGRAMA DO ATIVO X - COMPOSTOS RELACIONADOS – 20%H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , 7 DIAS .....  | 91 |
| FIGURA 4.151 CROMATOGRAMA DO ATIVO X - DOSEAMENTO – 20% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , 14 DIAS .....            | 91 |
| FIGURA 4.152 CROMATOGRAMA DO ATIVO X - COMPOSTOS RELACIONADOS – 20%H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , 14 DIAS ....  | 91 |
| FIGURA 4.153 CROMATOGRAMA DO ATIVO X - DOSEAMENTO – 30% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , 7 DIAS .....             | 92 |
| FIGURA 4.154 CROMATOGRAMA DO ATIVO X - COMPOSTOS RELACIONADOS – 30%H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , 7 DIAS .....  | 92 |
| FIGURA 4.155 CROMATOGRAMA DO ATIVO X - DOSEAMENTO – 30% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , 14 DIAS .....            | 92 |
| FIGURA 4.156 CROMATOGRAMA DO ATIVO X - COMPOSTOS RELACIONADOS – 30%H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , 14 DIAS ....  | 93 |
| FIGURA 4.157 CROMATOGRAMA DO ATIVO Y - DOSEAMENTO – 10% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , 7 DIAS .....             | 93 |
| FIGURA 4.158 CROMATOGRAMA DO ATIVO Y - COMPOSTOS RELACIONADOS – 10% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , 7 DIAS ....  | 93 |
| FIGURA 4.159 CROMATOGRAMA DO ATIVO Y - DOSEAMENTO – 10% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , 14 DIAS .....            | 94 |
| FIGURA 4.160 CROMATOGRAMA DO ATIVO Y - COMPOSTOS RELACIONADOS – 10% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , 14 DIAS ...  | 94 |
| FIGURA 4.161 CROMATOGRAMA DO ATIVO Y - DOSEAMENTO – 20% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , 7 DIAS .....             | 94 |
| FIGURA 4.162 CROMATOGRAMA DO ATIVO Y - COMPOSTOS RELACIONADOS – 20% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , 7 DIAS ....  | 95 |
| FIGURA 4.163 CROMATOGRAMA DO ATIVO Y - DOSEAMENTO – 20% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , 14 DIAS .....            | 95 |
| FIGURA 4.164 CROMATOGRAMA DO ATIVO Y - COMPOSTOS RELACIONADOS – 20% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , 14 DIAS .... | 95 |
| FIGURA 4.165 CROMATOGRAMA DO ATIVO Y - DOSEAMENTO – 30% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , 7 DIAS .....             | 96 |
| FIGURA 4.166 CROMATOGRAMA DO ATIVO Y - COMPOSTOS RELACIONADOS – 30%H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , 7 DIAS .....  | 96 |
| FIGURA 4.167 CROMATOGRAMA DO ATIVO Y - DOSEAMENTO – 30% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , 14 DIAS .....            | 96 |
| FIGURA 4.168 CROMATOGRAMA DO ATIVO Y - COMPOSTOS RELACIONADOS – 30% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , 14 DIAS ...  | 97 |

|                                                                                                                 |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| FIGURA 4.169 CROMATOGRAMA DO ATIVO Y - IMPUREZA F DO ATIVO Y – 30% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , 14 DIAS..... | 97 |
| FIGURA 4.170 CROMATOGRAMA DE DILUENTE - COMPOSTOS RELACIONADOS ATIVO X .....                                    | 98 |
| FIGURA 4.171 CROMATOGRAMA DE BRANCO – 10% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> - COMPOSTOS RELACIONADOS ATIVO X....    | 98 |
| FIGURA 4.172 CROMATOGRAMA DE BRANCO - 20% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> - COMPOSTOS RELACIONADOS ATIVO X ....   | 98 |
| FIGURA 4.173 CROMATOGRAMA DE BRANCO - 30% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> - COMPOSTOS RELACIONADOS ATIVO X ....   | 98 |
| FIGURA 4.174 CROMATOGRAMA DE DILUENTE - COMPOSTOS RELACIONADOS ATIVO Y .....                                    | 98 |
| FIGURA 4.175 CROMATOGRAMA DE BRANCO - 10% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> - COMPOSTOS RELACIONADOS ATIVO Y ....   | 99 |
| FIGURA 4.176 CROMATOGRAMA DE BRANCO - 20% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> - COMPOSTOS RELACIONADOS ATIVO Y ....   | 99 |
| FIGURA 4.177 CROMATOGRAMA DE BRANCO - 30% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> - COMPOSTOS RELACIONADOS ATIVO Y ....   | 99 |
| FIGURA 4.178 CROMATOGRAMA DE DILUENTE – IMPUREZA F DO ATIVO Y .....                                             | 99 |
| FIGURA 4.179 CROMATOGRAMA DE BRANCO – 10% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> – IMPUREZA F DO ATIVO Y .....           | 99 |



## Índice de Tabelas

|                                                                                  |    |
|----------------------------------------------------------------------------------|----|
| TABELA 3.1 CARACTERÍSTICAS DO MÉTODO DE DOSEAMENTO .....                         | 15 |
| TABELA 3.2 CARATERÍSTICAS DO MÉTODO DE COMPOSTOS RELACIONADOS DO ATIVO X .....   | 16 |
| TABELA 3.3 CARATERÍSTICAS DO MÉTODO DE COMPOSTOS RELACIONADOS DO ATIVO Y .....   | 17 |
| TABELA 3.4 CARATERÍSTICAS DO MÉTODO DA IMPUREZA F DO ATIVO Y .....               | 18 |
| TABELA 3.5 REAGENTES UTILIZADOS .....                                            | 19 |
| TABELA 4.1 CONDIÇÕES DE DEGRADAÇÃO .....                                         | 21 |
| TABELA 4.2 ADEQUABILIDADE DO SISTEMA - DOSEAMENTO ATIVO X.....                   | 22 |
| TABELA 4.3 ADEQUABILIDADE DO SISTEMA - DOSEAMENTO ATIVO Y.....                   | 23 |
| TABELA 4.4 ADEQUABILIDADE DO SISTEMA - COMPOSTOS RELACIONADOS ATIVO X.....       | 24 |
| TABELA 4.5 ADEQUABILIDADE DO SISTEMA - COMPOSTOS RELACIONADOS ATIVO Y.....       | 25 |
| TABELA 4.6 ADEQUABILIDADE DO SISTEMA - IMPUREZA F DO ATIVO Y .....               | 26 |
| TABELA 4.7 RESULTADOS DO ATIVO X SEM DEGRADAÇÃO .....                            | 26 |
| TABELA 4.8 RESULTADOS DO ATIVO Y SEM DEGRADAÇÃO .....                            | 27 |
| TABELA 4.9 RESULTADOS DO ATIVO X APÓS EXPOSIÇÃO À LUZ .....                      | 30 |
| TABELA 4.10 RESULTADOS DO ATIVO Y APÓS EXPOSIÇÃO À LUZ .....                     | 31 |
| TABELA 4.11 RESULTADOS DO ATIVO X APÓS EXPOSIÇÃO À TEMPERATURA.....              | 37 |
| TABELA 4.12 RESULTADOS DO ATIVO Y APÓS EXPOSIÇÃO À TEMPERATURA.....              | 37 |
| TABELA 4.13 RESULTADOS DO ATIVO X APÓS EXPOSIÇÃO À HUMIDADE .....                | 43 |
| TABELA 4.14 RESULTADOS DO ATIVO Y APÓS EXPOSIÇÃO À HUMIDADE .....                | 43 |
| TABELA 4.15 RESULTADOS DO ATIVO X APÓS EXPOSIÇÃO A HIDRÓLISE BÁSICA.....         | 49 |
| TABELA 4.16 RESULTADOS DO ATIVO Y APÓS EXPOSIÇÃO A HIDRÓLISE BÁSICA.....         | 51 |
| TABELA 4.17 RESULTADOS DO ATIVO X APÓS NOVAS CONDIÇÕES DE HIDRÓLISE BÁSICA ..... | 62 |
| TABELA 4.18 RESULTADOS DO ATIVO Y APÓS NOVAS CONDIÇÕES DE HIDRÓLISE BÁSICA ..... | 63 |
| TABELA 4.19 RESULTADOS DO ATIVO X APÓS EXPOSIÇÃO A HIDRÓLISE ÁCIDA .....         | 72 |
| TABELA 4.20 RESULTADOS DO ATIVO Y APÓS EXPOSIÇÃO A HIDRÓLISE ÁCIDA .....         | 73 |
| TABELA 4.21 RESULTADOS DO ATIVO X APÓS EXPOSIÇÃO A OXIDAÇÃO .....                | 85 |
| TABELA 4.22 RESULTADOS DO ATIVO Y APÓS EXPOSIÇÃO A OXIDAÇÃO .....                | 87 |



## Lista de abreviaturas, siglas e acrónimos

|                 |                                                                                                    |
|-----------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>BPL</b>      | Boas Práticas de Laboratório                                                                       |
| <b>DAD</b>      | <i>Diode Array Detector</i>                                                                        |
| <b>HPLC</b>     | <i>High Performance Liquid Chromatography</i> (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência)           |
| <b>ICH</b>      | <i>International Conference on Harmonization</i>                                                   |
| <b>WHO</b>      | <i>World Health Organization</i>                                                                   |
| <b>SD</b>       | <i>Standard Deviation</i> (Desvio Padrão)                                                          |
| <b>RSD</b>      | <i>Relative standard deviation</i> (Desvio padrão relativo)                                        |
| <b>TR</b>       | Tempo de Retenção                                                                                  |
| <b>TRR</b>      | Tempo de Retenção Relativo                                                                         |
| <b>UPLC</b>     | <i>Ultra Performance Liquid Chromatography</i> (Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência)         |
| <b>IPAC</b>     | Instituto Português de Acreditação                                                                 |
| <b>INFARMED</b> | Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos I.P.                                                 |
| <b>LC-MS</b>    | <i>Liquid Chromatography - Mass Spectrometry</i> (Cromatografia Líquida – Espectrometria de massa) |





## **1. Enquadramento e Objetivos**

### **1.1. Enquadramento**

A indústria farmacêutica tem revelado, ao longo dos anos, uma evolução constante no que diz respeito às regulamentações para a garantia de qualidade, com objetivo de assegurar que a produção de qualquer fármaco seja realizada com critério. A importância de obter produtos com elevada qualidade, eficácia e que possam garantir a segurança dos pacientes, levou ao aparecimento de diretrizes para um maior controlo no processo de fabrico. Sendo, assim, possível certificar que o fármaco é adequado para o uso pretendido e que a qualidade é mantida em todas as etapas de vida útil do produto [1].

No âmbito do controlo de qualidade, o estudo de degradação forçada é essencial para garantir a qualidade de um medicamento, uma vez que permite analisar as suas potenciais vias de degradação num curto espaço de tempo, através da exposição a determinadas condições de *stress*. Durante o estudo de degradação forçada devem ser cumpridos os requisitos técnicos e legais exigidos pelas autoridades reguladoras do setor farmacêutico.

#### **1.1.1. Boas Práticas de Laboratório**

As Boas Práticas de Laboratório (BPL) consistem num sistema de controlo de qualidade relacionado com o processo de organização e execução dos ensaios realizados no laboratório. Em Portugal, o INFARMED é a entidade responsável pela implementação das BPL [2].

Este sistema permite a obtenção de resultados com uma qualidade assegurada, assim como a possibilidade de troca de informações com entidades externas, o que facilita a comercialização e contribui para a segurança humana e ambiental [2].

#### **1.1.2. Acreditação de Laboratórios - Norma NP EN ISO/IEC 17025**

O Instituto Português de Acreditação (IPAC) é o organismo de acreditação que, em Portugal, reconhece as competências técnicas e de gestão aos laboratórios para realizar determinados ensaios e calibrações. Deste modo, foi criada a norma NP EN/ IEC ISO 17025 que apresenta os requisitos necessários que um laboratório deve cumprir para que seja acreditado, com o objetivo de garantir o rigor dos resultados obtidos nos ensaios e calibrações realizados pelo mesmo [3].

### **1.2. Objetivos da Dissertação**

O estágio curricular realizado no âmbito da Dissertação em Engenharia Química e Bioquímica tem como principal objetivo o estudo das principais vias de degradação de duas substâncias ativas presentes num medicamento, o Ativo X e o Ativo Y. Deste modo será realizado

um estudo de degradação forçada, em que as substâncias ativas serão expostas a várias condições para promover a sua degradação. Posteriormente, por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), serão realizados os ensaios de doseamento e compostos relacionados para obter as principais vias degradativas dos ativos e garantir a adequabilidade dos métodos como indicadores de estabilidade.

As condições definidas pela farmacopeia dos Estados Unidos e a farmacopeia europeia serão utilizadas como referência, assim como as diretrizes da *International Conference on Harmonization* (ICH).

No final, todos os resultados serão compilados num relatório de validação analítica que contem toda a informação referente aos ensaios realizados.

### **1.3. Estrutura da Dissertação**

#### **Capítulo 1 – Enquadramento e Objetivos**

O primeiro capítulo destina-se a fazer o enquadramento do trabalho realizado, apresentação da empresa e importância da garantia de qualidade na indústria farmacêutica.

#### **Capítulo 2 – Estado da Arte**

Neste capítulo apresentam-se conceitos teóricos que foram importantes na realização deste trabalho, nomeadamente conceitos e procedimentos necessários ao estudo de degradação forçada.

#### **Capítulo 3 – Materiais e Métodos**

No terceiro capítulo são apresentados os métodos e materiais necessários à realização dos vários ensaios.

#### **Capítulo 4 – Apresentação e Discussão de Resultados**

No capítulo quatro encontram-se os resultados obtidos nas diversas condições de degradação e para cada um dos ensaios realizados.

#### **Capítulo 5 – Conclusão e Proposta de Trabalho Futuro**

Neste último capítulo são apresentadas as principais conclusões referentes a este estudo, assim como uma proposta de um possível trabalho futuro.

#### **1.4. Grupo Tecnimede**

O Grupo Tecnimede é constituído por um conjunto de empresas privadas. A sua atividade engloba todas as etapas de vida de medicamentos indicados para uso humano, desde o seu desenvolvimento até à sua comercialização, com o objetivo de ajudar na melhoria dos cuidados de saúde por todo o mundo. O grupo iniciou a sua atividade em 1980 e a sua constante procura pela excelência no desempenho e na qualidade, levou à implementação de um programa de garantia da qualidade, de modo a certificar que em todos os estudos realizados estas premissas são respeitadas [4].

A Investigação e Desenvolvimento do grupo Tecnimede fica a cargo do Labor Qualitas, sendo este certificado pelo INFARMED para as Boas Práticas de Fabrico e pelo IPAC para a norma NP EN/ IEC ISO 17025 desde 2005 e 1994, respetivamente [4].



## 2. Estado da Arte

### 2.1. Estudo de Degradação Forçada

Na indústria farmacêutica, a estabilidade de um medicamento é um parâmetro importante devido à influência que tem na segurança e eficácia do mesmo. O estudo de degradação forçada é essencial para prever essa estabilidade através da obtenção das potenciais vias degradativas dos produtos. Neste estudo, as substâncias ativas e os medicamentos são sujeitos a condições de *stress* para promover a sua degradação e, se possível, obter vários produtos dessa degradação, num curto espaço de tempo [5].

A partir da análise dos resultados obtidos é possível desenvolver as potenciais vias de degradação, conhecer as propriedades químicas das moléculas existentes, estudar a estrutura dos produtos de degradação, assim como a sua origem e ainda determinar a estabilidade intrínseca da substância ativa na formulação. Outro dos grandes objetivos das degradações forçadas é estabelecer se o método desenvolvido é indicador de estabilidade, isto é, se é capaz de detetar perdas no conteúdo de substância ativa e o aumento do teor de impurezas [5].

Qualquer informação sobre a estabilidade das moléculas ajuda, ainda, a selecionar a formulação mais adequada, assim como as condições de armazenamento, embalagem e prazo de validade [6].

As condições de *stress* aplicadas variam consoante a estrutura química das substâncias ativas, o tipo de fármaco e, ainda, devem ser coerentes com as degradações dos produtos em condições normais de utilização e armazenamento. As *guidelines* existentes para as degradações forçadas, nomeadamente as ICH *guidelines*, são bastante genéricas, pelo que as condições a que devem ser realizadas não estão especificadas [5]. No entanto, os fatores de *stress* mais utilizados são os seguintes:

- Oxidação: Nestas condições, ocorre um mecanismo de transferência de eletrões que dá origem à oxidação, podendo haver remoção de eletrões da molécula ou a adição de oxigénio. O peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ) é o agente oxidante mais utilizado com concentrações entre 3% e 30%, no entanto a escolha de um determinado agente oxidante e sua concentração deve ser efetuada tendo em conta as propriedades químicas das substâncias em estudo [7, 8].

- Hidrólise: Durante a hidrólise existe reação das substâncias com a água, que pode ocorrer em pH alcalino ou ácido com hidróxido de sódio (NaOH) ou ácido clorídrico (HCl), respetivamente. A força do ácido ou base utilizado vai determinar a estabilidade das substâncias em condições de hidrólise. Normalmente, o tempo de exposição não deve ultrapassar os 7 dias e, caso não haja degradação à temperatura ambiente, podem ser utilizadas temperaturas entre 50°C e 70°C. Para evitar uma maior decomposição é necessário neutralizar as amostras após a exposição [6, 7].

- Temperatura: O aumento da temperatura faz aumentar a taxa de reação o que leva, normalmente, ao aparecimento de produtos de degradação. A degradação térmica pode ser realizada entre 40 – 80°C e o seu efeito pode ser estudado pela equação de Arrhenius:

$$k = Ae^{-\frac{E_a}{RT}} \quad (2.4)$$

Onde K é uma constante de velocidade, A é um fator de frequência, Ea é a energia de ativação, R e T correspondem à constante dos gases reais e à temperatura absoluta, respetivamente [5,7].

- Humidade: Geralmente, a humidade é uma excelente condição para obter potenciais produtos de degradação. Neste estudo, podem ser utilizadas humidades relativas iguais ou superiores a 75%, normalmente com a duração de 7 dias [7, 9].

- Luz: A criação de *stress* a partir da luz pode induzir fotoxidação através de um mecanismo de radicais livres. Este teste é realizado para gerar degradantes primários através da exposição a luz UV ou fluorescente. A exposição à luz deve ser, no mínimo, 200 W.h/m<sup>2</sup>, 1,2 milhões lux/h e a um comprimento de onda entre 300 - 800 nm [5, 10].

É de notar que estes fatores podem ser aplicados em amostras no estado sólido ou em solução, dependendo da natureza do teste.

As agências regulatórias definiram limites para os produtos de degradação obtidos, uma vez que o objetivo do estudo de degradação forçada não é a degradação completa da substância ativa, nem a obtenção de produtos de degradação secundários. Assim, de acordo com as WHO (*World Health Organization*) *guidelines*, é aceite um decréscimo no teor de ativo entre 10% e 30%, quando comparado com o teor do ativo sem degradação. De modo a cumprir com estes requisitos, as condições de *stress* podem ser ajustadas caso a substância ativa apresente elevada suscetibilidade a determinado fator. Caso não se verifique a presença de impurezas de degradação após 10 dias, é possível afirmar que a substância ativa apresenta estabilidade perante determinada condição [8].

Para estudar efetivamente a estabilidade de um medicamento são realizados estudos de estabilidade acelerada e de longa duração, em condições mais próximas das que o produto pode vir a ficar exposto durante o seu ciclo de vida. Nestes estudos, é avaliada a presença dos principais produtos de degradação formados durante a degradação forçada [11].

#### 2.1.1. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)

A cromatografia líquida de alta eficiência, mais conhecida como HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*), é uma técnica avançada de cromatografia líquida que permite não só a separação dos componentes de uma mistura, mas também a sua identificação e quantificação. Devido às suas características o HPLC tem sido bastante utilizado na obtenção de resultados analíticos em laboratórios, principalmente na indústria farmacêutica. Sendo uma técnica

cromatográfica, tem como principal função a separação, que acontece devido às diferentes interações entre os componentes da mistura, a fase móvel e a fase estacionária [12, 13].

Durante o processo de separação, a fase móvel transporta os componentes presentes na mistura através da fase estacionária. As distintas afinidades que apresentam com cada uma das fases, origina diferenças nas velocidades de migração, o que permite a sua separação à medida que avançam no sistema cromatográfico. Assim, se um componente apresentar uma maior afinidade com a fase móvel significa que será um dos primeiros a eluir. Caso contrário, ficará mais retido devido à sua interação com a fase estacionária [12, 13].

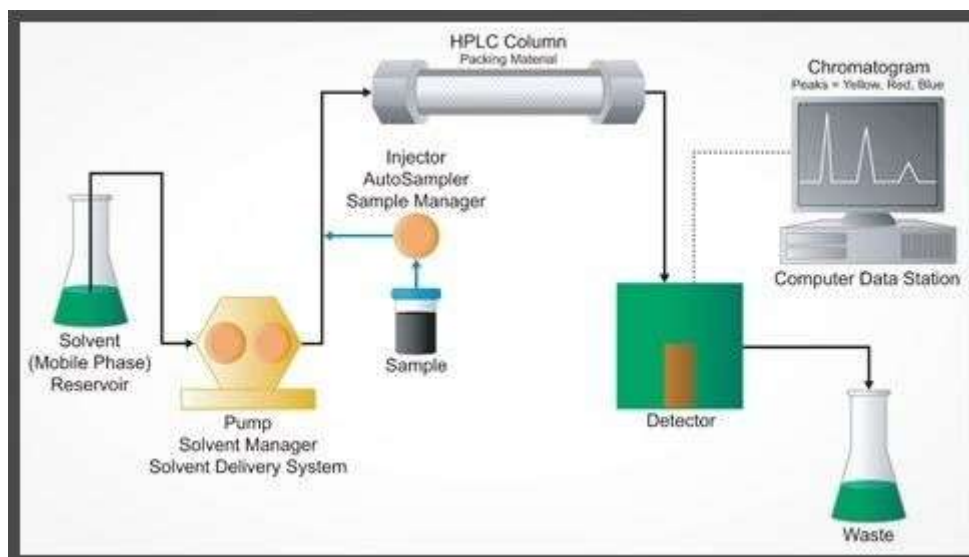
De acordo com o mecanismo em que se baseia a separação, a cromatografia pode ser classificada em: absorção, partição, exclusão de tamanhos ou troca de iões [14].

Atendendo à polaridade das suas fases, no HPLC a separação pode ser realizada em fase normal ou fase reversa. Normalmente quando a separação ocorre em fase normal, a fase estacionária é composta por sílica, o que a torna polar. No entanto, em fase reversa a fase estacionária é apolar, uma vez que a sílica é quimicamente modificada com cadeias de hidrocarbonetos (denominadas colunas C8 ou C18, consoante o número de hidrocarbonetos adicionados à estrutura da sílica). Isto significa que componentes polares e apolares eluem primeiro em fase reversa e fase normal, respetivamente. O HPLC de fase reversa é o método mais utilizado na análise de componentes farmacêuticos, principalmente, devido à sua compatibilidade com soluções orgânicas e aquosas [15].

O sistema pode, ainda, ser operado em isocrático se a composição da fase móvel permanecer constante, ou em gradiente se a composição variar ao longo da análise. A variação da composição permite alterar a retenção dos analitos, devido à mudança de polaridade da fase móvel [16, 17].

Relativamente à sua instrumentação, o sistema HPLC é constituído essencialmente por um sistema de bombas, um injetor de amostra, uma coluna cromatográfica, um detetor e um sistema de aquisição de dados. Existem ainda reservatórios para a fase móvel, que entra no equipamento, e para os resíduos, que saem do detetor. Na figura 2.1 está representado um esquema de um sistema HPLC.





**Figura 2.1 Representação de um sistema HPLC, adaptado de [18]**

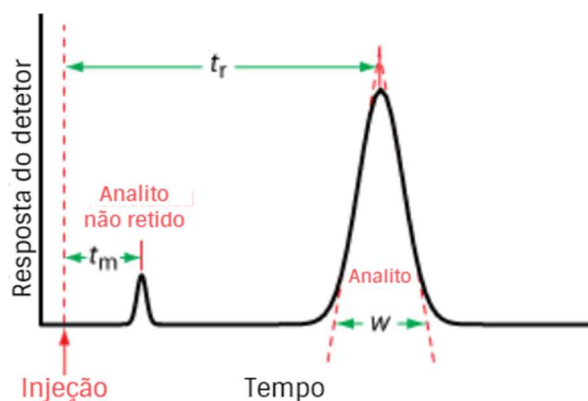
Os reservatórios que contêm a fase móvel estão ligados a um sistema de bombas de alta pressão que permitem a sua circulação, a determinado fluxo. Eventualmente, poderá existir um desgaseificador para remover ar que possa ser detetado como ruído. O sistema de bombas também pode ser utilizado para variar a composição da fase móvel ao longo do tempo. A amostra é inserida no fluxo contínuo de fase móvel através de um injetor e, conseqüentemente, transportada para a coluna cromatográfica, onde ocorre a separação dos seus constituintes. A separação ocorre devido ao enchimento (fase estacionária) presente no seu interior. Caso exista forno no equipamento, será possível alterar a temperatura da coluna [12, 18].

De modo a detetar cada componente, individualmente, após eluir da coluna, é necessário um detetor, através do qual é gerado um sinal que pode ser utilizado para monitorar e quantificar os componentes eluídos. A escolha do tipo de detetor vai depender das propriedades físicas e químicas dos componentes a detetar, assim como das suas concentrações. O detetor de HPLC ideal deverá possuir as seguintes características: elevada sensibilidade, resposta proporcional à quantidade de analito injetada e pouca suscetibilidade a variações na temperatura ou composição da fase móvel. Os detetores de fotodíodo, designados por DAD (*Diode Array Detector*), permitem a aquisição de espectros dos componentes, assim como a sua visualização em 3D e a análise da pureza dos picos, que pode ser importante em caso de sobreposição. Outra das vantagens, é a possibilidade de seleccionar o comprimento de onda mais adequado à análise, normalmente entre 200 e 400 nm. Por estas razões, os detetores DAD são os mais utilizados, atualmente [12,18].

Por último, o sinal gerado pelo detetor é enviado para um sistema de aquisição de dados, onde é convertido num cromatograma, através de um *software* apropriado [12, 18].

A partir de um cromatograma é possível obter vários parâmetros essenciais à caracterização de uma separação, tais como:

- Tempo de retenção ( $t_R$ ): Corresponde ao tempo necessário para a eluição de um analito, medido desde a sua injeção até à sua detecção no sistema [19], como é possível verificar na figura 2.2.



**Figura 2.2 Representação do tempo de retenção**

- Resolução ( $R_s$ ): Medida de separação entre dois picos adjacentes e o seu cálculo é demonstrado na equação 2.1 [19].

$$R_s = \frac{1,18 * (t_{R2} - t_{R1})}{w_1 + w_2} \quad (2.1)$$

$t_{R1}$  e  $t_{R2}$  – Tempos de retenção de dois picos adjacentes

$w_1$  e  $w_2$  – Largura dos picos, em unidades de tempo

- Fator de simetria ( $A_s$ ): Mede a simetria do pico e calcula-se a partir da equação 2.2 [19].

$$A_s = \frac{w_{0,05}}{2d} \quad (2.2)$$

$w_{0,05}$  – Largura do pico a 5% da sua altura

$d$  – Distância do máximo do pico até 5% da sua altura, em unidades de tempo

- Número de pratos teóricos ( $N$ ): Refere-se ao desempenho da coluna cromatográfica, nomeadamente a sua eficiência. Pode ser obtido utilizando a equação 2.3 [19].

$$N = 5,54 * \frac{t_R}{w_{h/2}} \quad (2.3)$$

$w_{h/2}$  – Largura do pico a metade da sua altura, em unidades de tempo

Numa separação cromatográfica, a pureza do pico de um analito é importante para garantir que não existe coeluição de impurezas no tempo de retenção do analito. Para tal, o valor de *purity angle* obtido no *software* tem de ser inferior ao valor de *purity threshold*, sendo o *purity angle* uma medida da heterogeneidade espectral de um pico, através da comparação de espectros por todo o pico, e o *purity threshold* uma medida dos efeitos não ideais [20].

Concluindo, o HPLC tem uma vasta área de aplicações, não só a nível farmacêutico, uma vez que, comparando com outras técnicas cromatográficas, as suas análises são extremamente rápidas, eficientes e precisas na quantificação e identificação de componentes químicos. No entanto, também apresenta algumas desvantagens, nomeadamente, o elevado

custo devido às grandes quantidades de solventes orgânicos necessárias e, ainda, a baixa sensibilidade para alguns componentes que não são detetados [21].

#### 2.1.2. Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (UPLC)

Com a necessidade de aumentar a resolução, sensibilidade e velocidade das análises cromatográficas foi desenvolvida a cromatografia líquida de ultra eficiência (UPLC). Esta técnica avançada permite trabalhar a pressões mais elevadas, assim como a utilização de colunas com um comprimento e tamanho de partículas menor. Uma das desvantagens poderá ser o elevado custo do equipamento, no entanto a diminuição do consumo de solventes orgânicos torna as análises mais económicas [22, 23].

#### 2.1.3. Validação de Métodos Analíticos

Um método analítico detalha todos os passos necessários para uma análise, desde a preparação de amostras, reagentes e utilização dos equipamentos, até às fórmulas de cálculo necessárias. Quando o método é utilizado na indústria farmacêutica, para obtenção de resultados relativos a um medicamento, é importante que os mesmos sejam credíveis, de modo a garantir a segurança do paciente. Assim para garantir um controlo dos resultados, o método analítico é sujeito a vários parâmetros de avaliação, que asseguram a sua validação [24, 25].

A validação permite assegurar a qualidade de um processo ou sistema durante o desenvolvimento e fabrico de um medicamento, através de várias metodologias de qualidade. O objetivo principal da validação é demonstrar que o método analítico é adequado para o seu propósito, sendo capaz de devolver resultados fiáveis e reprodutíveis, em qualquer análise realizada ao produto. É importante salientar que qualquer equipamento utilizado para o efeito deve estar devidamente calibrado e qualificado [24, 25].

Deste modo, para que um método analítico seja validado é necessário que o seu desempenho se encontre dentro das especificações previamente definidas. Em caso de modificações na síntese de matéria-prima, produto ou alterações no procedimento analítico, o método terá de ser revalidado [24, 26].

Existem diversos parâmetros de validação, no entanto um dos mais importantes é a adequabilidade do sistema. Isto é, a capacidade de o sistema analítico reportar um pico cromatográfico adequado aos parâmetros de avaliação de qualidade cromatográfica. A adequabilidade do sistema assegura o desempenho necessário para a realização de qualquer ensaio [26].

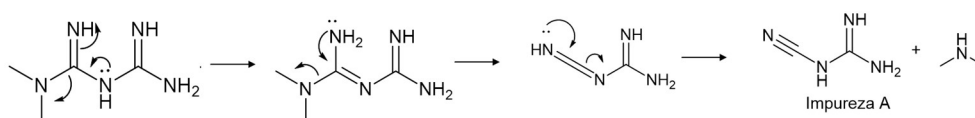
### **2.2. Possíveis Vias Degradativas das Substâncias Ativas**

O Ativo X e o Ativo Y são duas substâncias que se encontram no grupo farmacêutico dos antidiabéticos. Estas substâncias apresentam estruturas moleculares diferentes e, por essa

razão, é esperado que apresentem vias degradativas distintas quando expostas a determinadas condições que possam promover a sua degradação.

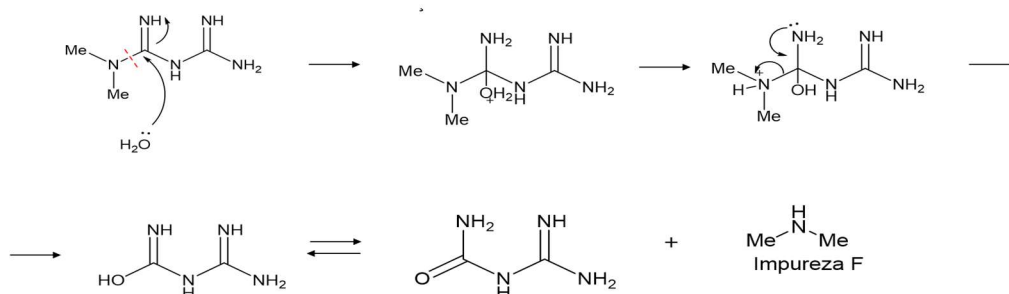
Pelas características da molécula de Ativo Y, as suas principais vias degradativas serão a temperatura, hidrólise básica e oxidação.

O Ativo Y pode ser suscetível à temperatura devido à existência de uma amina que é extremamente volátil, e conseqüentemente um bom grupo de saída. Ocorre migração térmica do hidrogênio com alteração da ligação dupla. Nestas condições é esperada a formação da Impureza A [27]. Na figura 2.3 está descrito o possível mecanismo de formação da Impureza A por ação da temperatura.



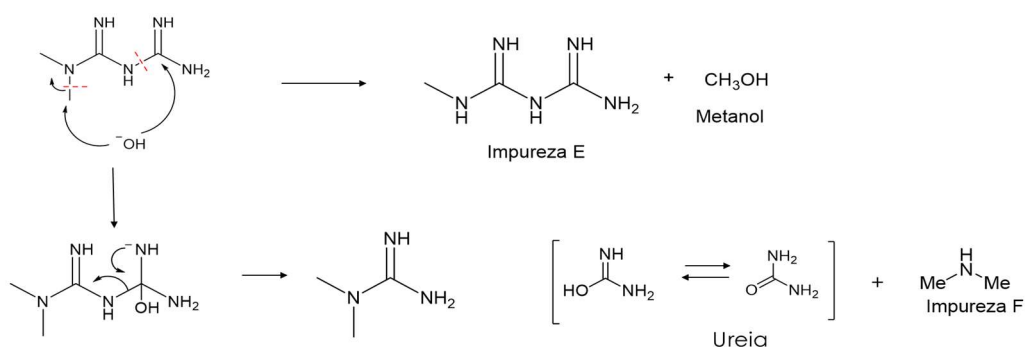
**Figura 2.3 Ativo Y: Mecanismo de formação da impureza A por ação da temperatura**

Em condições de hidrólise neutra/ácida a água pode atuar como nucleófilo, existindo protonação da amina, o que facilita a sua libertação. Não ocorre no lado oposto da molécula devido ao impedimento estérico do grupo  $\text{NH}_2$ . Assim, nestas condições é esperada a formação da Impureza F e de um tautômero [28], estando representado na figura 2.4 um possível mecanismo para essa formação.



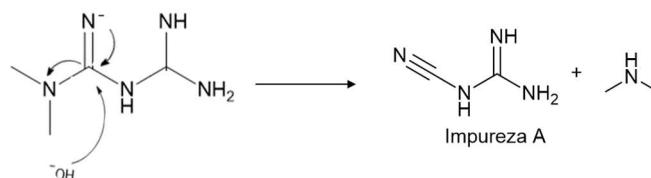
**Figura 2.4 Ativo Y: Mecanismo de formação da impureza F por hidrólise ácida**

Durante a hidrólise básica pode ocorrer abstração de um grupo metilo com libertação de um composto volátil como o metanol ou remoção de uma das moléculas de guanida e a conseqüente formação de Ureia, que é extremamente estável, e a Impureza F. Neste caso, é o grupo OH que funciona como nucleófilo [28]. Na figura 2.5 está representado o que poderia acontecer ao Ativo Y em condições de hidrólise básica.



**Figura 2.5 Ativo Y: Mecanismo de formação das impurezas E e F por hidrólise básica**

Existe, ainda, outro mecanismo proposto para a exposição do Ativo Y a condições de hidrólise, que está representado na figura 2.6, em que o grupo hidroxilo também funciona como nucleófilo. No entanto, este vai atuar na ligação com a amina provocando a sua libertação e a formação da Impureza A [29].

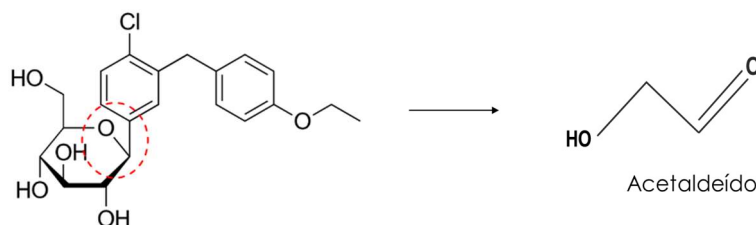


**Figura 2.6 Ativo Y: Mecanismo de formação da Impureza A por hidrólise básica**

Para a oxidação do Ativo Y estão propostos mecanismo de radicais livres de hidróxido que dependem do pH. A Impureza E é o principal produto de degradação expectável em pH alcalino [30, 31].

Relativamente ao Ativo X, é expectável que este possa sofrer degradação em condições de hidrólise, oxidação e quando exposta à luz.

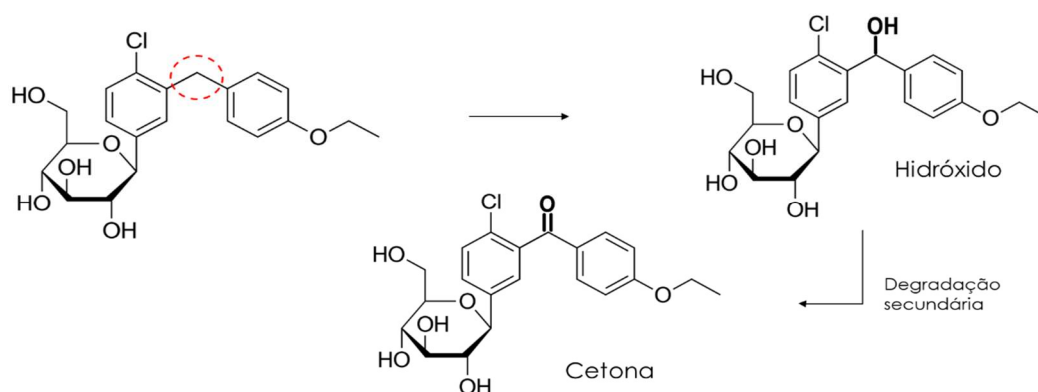
No Ativo X está presente uma ligação glicosídica com um açúcar que, tal como qualquer outra ligação desta natureza, é bastante suscetível a hidrólise. Em condições alcalinas pode haver formação de um acetaldeído, como está representado na figura 2.7 [32, 33].



**Figura 2.7 Possível degradação do Ativo X em condições de hidrólise**

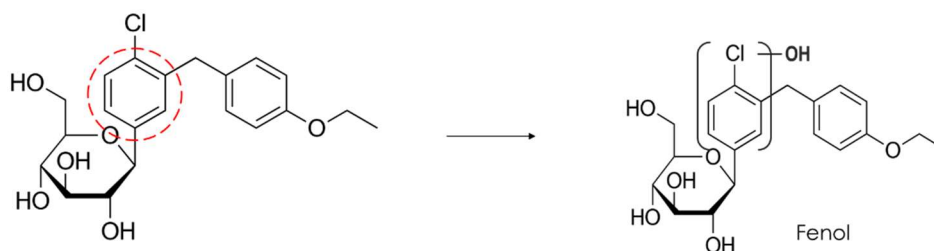
O carbono adjacente ao anel aromático, chamado carbono benzílico pode participar numa série de reações entre as quais a oxidação. No geral, neste tipo de reação existe a adição

de um grupo hidroxilo, que pode ser posteriormente oxidado a uma cetona [34, 35], tal como está representado na figura 2.8.



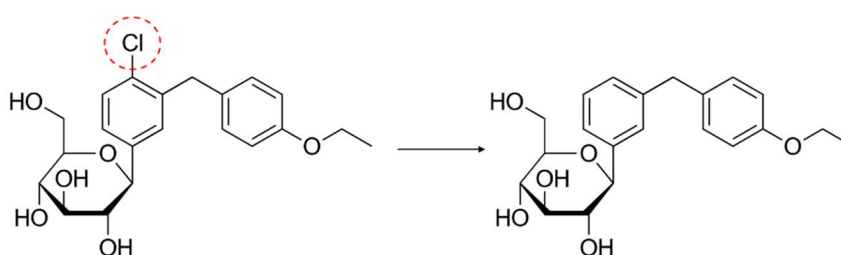
**Figura 2.8 Possível degradação do Ativo X em condições de oxidação**

Pela figura 2.9 é possível verificar que, em condições mais severas de oxidação os anéis aromáticos, nomeadamente o benzeno, podem ser oxidados a compostos fenólicos [36].



**Figura 2.9 Ativo X: Formação de compostos fenólicos em condições de oxidação**

Têm sido descritos exemplos de desalogenação por ação da radiação UV. A desalogenação do Ativo X pode ocorrer por fotodegradação através da abstração do átomo de halogénio [37], neste caso o cloro, como está representado na figura 2.10.



**Figura 2.10 Desalogenação do Ativo X**



### 3. Materiais e Métodos

Durante a realização deste trabalho foi utilizada a cromatografia líquida de partição em sistema de fase reversa. O detetor utilizado foi o detetor de fotodíodo com comprimento de onda adequado à resposta dos analitos.

As substâncias ativas sujeitas ao estudo de degradações forçadas, denominadas Ativo X e Ativo Y, fazem parte de um medicamento de associação dupla em desenvolvimento galênico, na forma de comprimidos revestidos. Foram aplicados o método de doseamento, o método dos compostos relacionados do Ativo X e o método dos compostos relacionados do Ativo Y. Enquanto o doseamento permite quantificar os ativos nas amostras, o método dos compostos relacionados quantifica as impurezas ou produtos de degradação presentes. Foi ainda utilizado o método para quantificar a Impureza F do Ativo Y.

#### 3.1. Método de Doseamento

Na tabela 3.1 estão descritas as características do método de doseamento utilizado para quantificar ambas as substâncias ativas, uma vez que este é o método utilizado para o produto acabado.

**Tabela 3.1 Características do método de doseamento**

|                           |                                                          |
|---------------------------|----------------------------------------------------------|
| <b>Equipamento</b>        | Sistema HPLC com detetor DAD                             |
| <b>Coluna</b>             | Zorbax Eclipse XDB-C8, 150 x 4,6 mm, 5 µm ou equivalente |
| <b>Fluxo</b>              | 1,0 mL/min                                               |
| <b>Tempo corrida</b>      | 6 min                                                    |
| <b>Temperatura coluna</b> | 30 °C                                                    |
| <b>Volume injeção</b>     | 10 µL                                                    |
| <b>Detetor (λ)</b>        | 225 nm                                                   |

#### Preparação de soluções:

##### **Fase móvel:**

Preparação de um tampão com 1,42 g/L de hidrogenofosfato de sódio ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) a 10 mM e 1,44 g/L de dodecil sulfato de sódio (SDS) a 5mM. É necessário ajustar o pH a 6,0 com Ácido ortofosfórico a 85% e filtrar com um filtro de 0,45 µm.

A fase móvel é constituída pelo tampão, acetonitrilo e metanol na proporção 55:39:6, (v/v).

##### **Diluyente:**

Constituído por acetonitrilo e água (25:75, v/v).

##### **Solução padrão:**

Pesar 10,0 mg do padrão de Ativo X para balão volumétrico de 10 mL, dissolver e perfazer o volume com diluyente. (solução 1)



Pesar 10,0 mg do padrão de Ativo Y para balão volumétrico de 10 mL e dissolver com diluente. Adicionar 5,0 mL da solução 1 e perfazer o volume com diluente.

### 3.2. Método dos Compostos Relacionados do Ativo X

Na tabela 3.2 estão descritas as características do método de compostos relacionados utilizado para quantificar as impurezas e produtos de degradação do Ativo X.

**Tabela 3.2 Características do método de compostos relacionados do Ativo X**

|                                      |                                                                  |                  |                  |
|--------------------------------------|------------------------------------------------------------------|------------------|------------------|
| <b>Equipamento</b>                   | Sistema UPLC com capacidade para eluição gradiente e detetor DAD |                  |                  |
| <b>Coluna</b>                        | Acquity UPLC BEH Shield RP-18, 2,1 X 100 mm, 1,7µm               |                  |                  |
| <b>Gradiente</b>                     | Tempo (min)                                                      | Fase móvel A (%) | Fase móvel B (%) |
|                                      | 0                                                                | 80               | 20               |
|                                      | 1                                                                | 80               | 20               |
|                                      | 31                                                               | 0                | 100              |
|                                      | 47                                                               | 0                | 100              |
|                                      | 50                                                               | 80               | 20               |
|                                      | 55                                                               | 80               | 20               |
| <b>Fluxo</b>                         | 0,30 mL/min                                                      |                  |                  |
| <b>Tempo corrida</b>                 | 55 min                                                           |                  |                  |
| <b>Temperatura coluna</b>            | 27 °C                                                            |                  |                  |
| <b>Volume injeção</b>                | 2 µL                                                             |                  |                  |
| <b>Detetor (λ)</b>                   | 225 nm                                                           |                  |                  |
| <b>Taxa de amostragem do detetor</b> | 20 pontos/seg                                                    |                  |                  |

Preparação de soluções:

#### Fase móvel:

O eluente A é composto por água Milli-Q, metanol e ácido ortofosfórico a 85% na proporção 600:400:6, (v/v/v).

O eluente B é composto por metanol e água na proporção 800:200, (v/v).

#### Diluente:

Constituído por acetonitrilo e água (800:200, v/v).

#### Solução padrão:

Pesar 10,0 mg do padrão de Ativo X para balão volumétrico de 50 mL, dissolver e perfazer o volume com diluente. Diluir 1mL desta solução para 100 mL com diluente.

### 3.3. Método dos Compostos Relacionados do Ativo Y

Na tabela 3.3 estão descritas as características do método de compostos relacionados utilizado para quantificar as impurezas e produtos de degradação do Ativo Y.

**Tabela 3.3 Características do método de compostos relacionados do Ativo Y**

|                           |                                                                 |                  |                  |
|---------------------------|-----------------------------------------------------------------|------------------|------------------|
| <b>Equipamento</b>        | Sistema HPLC com capacidade para eluição gradiente, detetor DAD |                  |                  |
| <b>Coluna</b>             | Partisil 10 SCX, 250 x 4,5 nm, 10 µm                            |                  |                  |
| <b>Gradiente</b>          | Tempo (min)                                                     | Fase móvel A (%) | Fase móvel B (%) |
|                           | 0                                                               | 100              | 0                |
|                           | 30                                                              | 100              | 0                |
| <b>Após corrida</b>       | 40                                                              | 0                | 100              |
|                           | 50                                                              | 0                | 100              |
|                           | 52                                                              | 100              | 0                |
|                           | 60                                                              | 100              | 0                |
| <b>Fluxo</b>              | 1,0 mL/min                                                      |                  |                  |
| <b>Tempo corrida</b>      | 30 min                                                          |                  |                  |
| <b>Temperatura coluna</b> | Temperatura ambiente                                            |                  |                  |
| <b>Volume injeção</b>     | 20 µL                                                           |                  |                  |
| <b>Detetor (λ)</b>        | 218 nm                                                          |                  |                  |

Preparação de soluções:

#### **Fase móvel:**

O eluente A é composto por um tampão com 17 g/L de di-hidrogenofosfato de amónia  $[(\text{NH}_4)\text{H}_2\text{PO}_4]$ . É necessário ajustar o pH a 3,0 com Ácido ortofosfórico a 85% e filtrar com um filtro de 0,45 µm.

O eluente B é composto pelo tampão acima descrito e acetonitrilo (700:300, v/v).

#### **Diluyente:**

Composto por um tampão com 17 g/L de hidrogenofosfato de amónia  $[(\text{NH}_4)\text{H}_2\text{PO}_4]$ . É necessário ajustar o pH a 3,0 com Ácido ortofosfórico a 85%.

#### **Solução padrão:**

Pesar 10,0 mg do padrão de Ativo Y para balão volumétrico de 100 mL, dissolver e perfazer o volume com diluyente. Diluir 1mL desta solução para 20 mL com diluyente.

### 3.4. Método da Impureza F do Ativo Y

Na tabela 3.4 estão descritas as características do método da Impureza F utilizado para quantificar a presença desta impureza no Ativo Y.

**Tabela 3.4 Características do método da Impureza F do Ativo Y**

|                           |                                                                 |                  |                  |
|---------------------------|-----------------------------------------------------------------|------------------|------------------|
| <b>Equipamento</b>        | Sistema HPLC com capacidade para eluição gradiente, detetor DAD |                  |                  |
| <b>Coluna</b>             | Purospher Rp-18 endcapped, 125 x 3,0 mm, 5 µm                   |                  |                  |
| <b>Gradiente</b>          | Tempo (min)                                                     | Fase móvel A (%) | Fase móvel B (%) |
|                           | 0                                                               | 60               | 40               |
|                           | 10                                                              | 45               | 55               |
|                           | 11                                                              | 25               | 75               |
|                           | 15                                                              | 25               | 75               |
| <b>Após corrida</b>       | 18                                                              | 60               | 40               |
|                           | 23                                                              | 60               | 40               |
| <b>Fluxo</b>              | 0,7 mL/min                                                      |                  |                  |
| <b>Tempo corrida</b>      | 23 min                                                          |                  |                  |
| <b>Temperatura coluna</b> | 30 °C                                                           |                  |                  |
| <b>Volume injeção</b>     | 5 µL                                                            |                  |                  |
| <b>Detetor (λ)</b>        | 380 nm                                                          |                  |                  |

#### Preparação de soluções:

##### Fase móvel:

O eluente A é composto ácido ortofosfórico a 85% e água na proporção 0,1:99,9 (v/v/v).

O eluente B é composto por acetonitrilo.

##### Diluyente:

Tal como o eluente B, o diluyente é acetonitrilo.

##### Solução derivatização:

Solução de fluorodinitrobenzeno e diluyente na proporção de 1:100 (v/v).

##### Solução padrão:

Transferir 0,1mL do padrão de impureza F para balão volumétrico de 20 mL e perfazer o volume com diluyente. (solução 1)

Transferir 1,0 mL da solução 1 para balão de 100mL, adicionar 50mL de diluyente, 1 mL de trietilamina e 10 mL de solução derivatização. Agitar bem e aquecer durante 30 minutos a 60°C. Depois de arrefecer, perfazer o volume com diluyente.

### 3.5. Reagentes

Na tabela 3.5 estão descritos os reagentes utilizados na realização deste estudo de degradação forçada.

**Tabela 3.5 Reagentes utilizados**

| Reagente                      | Fórmula química                                              | Artigo       | CAS       | Fornecedor    |
|-------------------------------|--------------------------------------------------------------|--------------|-----------|---------------|
| Metanol                       | CH <sub>3</sub> OH                                           | 1 06007 9030 | 67-56-1   | Merck         |
| Acetonitrilo                  | CH <sub>3</sub> CN                                           | P41237658N   | 75-05-8   | Carlo Erba    |
| Ácido ortofosfórico 85%       | H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>                               | 131032       | 7664-38-2 | Panreac       |
| Di-hidrogenofosfato de amónia | (NH <sub>4</sub> )H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>             | 131126       | 7722-76-1 | Panreac       |
| Hidrogenofosfato de sódio     | Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>                             | 131679       | 7558-79-4 | Panreac       |
| Dodecil sulfato de sódio      | NaC <sub>12</sub> H <sub>25</sub> SO <sub>4</sub>            | A1112        | 151-21-3  | Panreac       |
| Fluorodinitrobenzeno          | C <sub>6</sub> H <sub>3</sub> FN <sub>2</sub> O <sub>4</sub> | D1529        | 70-34-8   | Sigma-Aldrich |
| Trietilamina                  | C <sub>6</sub> H <sub>15</sub> N                             | 489556       | 121-44-8  | Carlo Erba    |
| Ácido clorídrico 37%          | HCl                                                          | 30721        | 7647-01-0 | Honeywell     |
| Hidróxido de sódio            | NaOH                                                         | 30014-1000   | 1310-73-2 | Labchem       |
| Peróxido de hidrogénio 30%    | H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>                                | 121076       | 7722-84-1 | Panreac       |
| Água purificada               | H <sub>2</sub> O                                             | ---          | ---       | ---           |



#### 4. Apresentação e Discussão de Resultados

De modo a obter as principais vias degradativas do Ativo X e do Ativo Y, e a avaliar a adequabilidade dos métodos de doseamento e compostos relacionados, descritos no capítulo anterior, como indicadores de estabilidade, submeteram-se várias amostras de matéria prima, a diferentes tipos de degradação, que posteriormente foram quantificadas pelos referidos métodos.

Os fatores de degradação utilizados foram: temperatura, luz, humidade, hidrólise básica, hidrólise ácida e oxidação. Na tabela 4.1 é possível ver as várias condições utilizadas com mais detalhe.

**Tabela 4.1 Condições de degradação**

| Tipo degradação           | Equipamento                         | Condições experimentais                                                                                     | Tempo exposição |
|---------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|
| <b>Fotossensibilidade</b> | <i>Suntest</i> 500 w/m <sup>2</sup> | ---                                                                                                         | 24 e 48 horas   |
| <b>Temperatura</b>        | Estufa                              | 60 °C                                                                                                       | 7 e 14 dias     |
| <b>Humidade</b>           | Exsicador                           | 85% HR                                                                                                      | 7 e 14 dias     |
| <b>Hidrólise ácida</b>    | ---                                 | HCl 1N<br>HCl 2N<br>HCl 3N                                                                                  | 7 e 14 dias     |
| <b>Hidrólise básica</b>   | ---                                 | NaOH 1N<br>NaOH 2N<br>NaOH 3N                                                                               | 7 e 14 dias     |
|                           |                                     | NaOH 0,5N<br>NaOH 1N                                                                                        | 8 e 24 horas    |
| <b>Oxidação</b>           | ---                                 | 10% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub><br>20% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub><br>30% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | 7 e 14 dias     |

Para este estudo de degradação forçada foram aceites degradações entre 10 e 30%. O balanço mássico calculado para cada condição de degradação, idealmente, deveria ser próximo de zero. No entanto, devido a alguma variabilidade dos métodos utilizados, foram considerados valores até 10%, sendo estes obtidos pela equação 4.1:

$$\text{Balanço mássico (\%)} = (C_{\text{controlo}} - C_{\text{stress}}) - (\text{Soma compostos}_{\text{controlo}} - \text{Soma compostos}_{\text{stress}}) \quad (4.1)$$

Sendo  $C_{\text{controlo}}$  e  $C_{\text{stress}}$  o teor da amostra sem degradação e o teor da amostra na condição de degradação, respetivamente. Assim como, a  $\text{Soma compostos}_{\text{controlo}}$  e a soma dos compostos<sub>stress</sub> são as impurezas na amostra sem degradação e na amostra com degradação, respetivamente.

Foi, ainda, importante garantir a pureza dos picos das substâncias ativas e, para isso, os valores obtidos através dos cromatogramas para o *purity angle* têm de ser inferiores aos de *purity threshold*.

De seguida serão demonstrados os resultados obtidos, nos vários métodos, para cada condição de degradação.

#### 4.1. Adequabilidade do sistema

A adequabilidade do sistema foi determinada através da injeção em sextuplicado de uma solução padrão preparada à concentração de trabalho estabelecida, calculando-se os parâmetros cromatográficos para os seis cromatogramas obtidos para cada substância ativa.

##### 4.1.1. Doseamento

Num método de doseamento a adequabilidade do sistema tem de obedecer aos seguintes critérios:

- Desvio padrão relativo (RSD) inferior ou igual a 2,0%;
- Pratos teóricos (N) igual ou superior a 1000;
- Fator de simetria ( $A_s$ ) entre 0,8 e 1,8.

Na tabela 4.2 estão representados os resultados obtidos para a adequabilidade do sistema no método de doseamento para o Ativo X.

**Tabela 4.2 Adequabilidade do sistema - Doseamento Ativo X**

| Injeção           | Solução padrão          |              |
|-------------------|-------------------------|--------------|
|                   | Tempo de retenção (min) | Área do pico |
| 1                 | 4,37                    | 1452924      |
| 2                 | 4,37                    | 1428158      |
| 3                 | 4,37                    | 1431427      |
| 4                 | 4,37                    | 1433860      |
| 5                 | 4,37                    | 1435117      |
| 6                 | 4,37                    | 1440099      |
| Média             | 4,37                    | 1436931      |
| SD (%)            | 0,0                     | 8784         |
| RSD (%)           | 0,03                    | 0,61         |
| Pratos teóricos   | 6520                    |              |
| Fator de simetria | 1,2                     |              |

Na tabela 4.3 estão representados os resultados obtidos para a adequabilidade do sistema no método de doseamento para o Ativo Y.

**Tabela 4.3 Adequabilidade do sistema - Doseamento Ativo Y**

| Injeção                  | Solução padrão          |              |
|--------------------------|-------------------------|--------------|
|                          | Tempo de retenção (min) | Área do pico |
| <b>1</b>                 | 2,36                    | 3773104      |
| <b>2</b>                 | 2,36                    | 3704800      |
| <b>3</b>                 | 2,36                    | 3715568      |
| <b>4</b>                 | 2,36                    | 3723792      |
| <b>5</b>                 | 2,36                    | 3726454      |
| <b>6</b>                 | 2,36                    | 3739592      |
| <b>Média</b>             | 2,36                    | 3730552      |
| <b>SD (%)</b>            | 0,0                     | 23844        |
| <b>RSD (%)</b>           | 0,04                    | 0,64         |
| <b>Pratos teóricos</b>   | 5077                    |              |
| <b>Fator de simetria</b> | 1,4                     |              |

O sistema cromatográfico demonstra cumprir com os critérios que caracterizam a adequabilidade do sistema.

#### 4.1.2. Compostos Relacionados do Ativo X

Num método de compostos relacionados a adequabilidade do sistema tem de obdecer aos seguintes critérios:

- Desvio padrão relativo (RSD) inferior ou igual a 5,0%;
- Pratos teóricos (N) igual ou superior a 1000;
- Fator de simetria ( $A_s$ ) entre 0,8 e 1,8;
- Fator de resolução superior ou igual a 1,2.

Na tabela 4.4 estão representados os resultados obtidos para a adequabilidade do sistema no método de compostos relacionados do Ativo X. E o sistema cromatográfico demonstra cumprir com os critérios que caracterizam a adequabilidade do sistema.



**Tabela 4.4 Adequabilidade do sistema - Compostos relacionados Ativo X**

| Injeção                  | Solução padrão          |              |
|--------------------------|-------------------------|--------------|
|                          | Tempo de retenção (min) | Área do pico |
| <b>1</b>                 | 9,21                    | 40994        |
| <b>2</b>                 | 9,22                    | 41496        |
| <b>3</b>                 | 9,22                    | 40961        |
| <b>4</b>                 | 9,25                    | 41230        |
| <b>5</b>                 | 9,21                    | 41271        |
| <b>6</b>                 | 9,20                    | 41333        |
| <b>Média</b>             | 9,22                    | 41214        |
| <b>SD (%)</b>            | 0,02                    | 204,74       |
| <b>RSD (%)</b>           | 0,17                    | 0,50         |
| <b>Pratos teóricos</b>   | 30587                   |              |
| <b>Fator de simetria</b> | 1,02                    |              |
| <b>Resolução</b>         | 1,79                    |              |

#### 4.1.3. Compostos relacionados do Ativo Y

Num método de compostos relacionados a adequabilidade do sistema tem de obedecer aos seguintes critérios:

- Desvio padrão relativo (RSD) inferior ou igual a 5,0%;
- Pratos teóricos (N) igual ou superior a 1000;
- Fator de simetria ( $A_s$ ) entre 0,8 e 1,8;
- Fator de resolução superior ou igual a 10.

Na tabela 4.5 estão representados os resultados obtidos para a adequabilidade do sistema no método de compostos relacionados do Ativo Y. E o sistema cromatográfico demonstra cumprir com os critérios que caracterizam a adequabilidade do sistema.

**Tabela 4.5 Adequabilidade do sistema - Compostos relacionados Ativo Y**

| Injeção                  | Solução padrão          |              |
|--------------------------|-------------------------|--------------|
|                          | Tempo de retenção (min) | Área do pico |
| <b>1</b>                 | 13,9                    | 365143       |
| <b>2</b>                 | 13,9                    | 364754       |
| <b>3</b>                 | 13,9                    | 368207       |
| <b>4</b>                 | 13,9                    | 367394       |
| <b>5</b>                 | 13,9                    | 369674       |
| <b>6</b>                 | 13,9                    | 370509       |
| <b>Média</b>             | 13,9                    | 367614       |
| <b>SD (%)</b>            | 0,02                    | 2337,1       |
| <b>RSD (%)</b>           | 0,11                    | 0,64         |
| <b>Pratos teóricos</b>   | 5312                    |              |
| <b>Fator de simetria</b> | 1,6                     |              |
| <b>Resolução</b>         | 17,9                    |              |

#### 4.1.4. Impureza F do Ativo Y

Para o método da Impureza F os critérios para a adequabilidade do sistema são iguais aos utilizados para um método de compostos relacionados:

- Desvio padrão relativo (RSD) inferior ou igual a 5,0%;
- Pratos teóricos (N) igual ou superior a 1000;
- Fator de simetria ( $A_s$ ) entre 0,8 e 1,8;

Na tabela 4.6 estão representados os resultados obtidos para a adequabilidade do sistema no método da Impureza F. E o sistema cromatográfico demonstra cumprir com os critérios que caracterizam a adequabilidade do sistema.

Tabela 4.6 Adequabilidade do sistema - Impureza F do Ativo Y

| Injeção           | Solução padrão          |              |
|-------------------|-------------------------|--------------|
|                   | Tempo de retenção (min) | Área do pico |
| 1                 | 5,22                    | 121296       |
| 2                 | 5,22                    | 122455       |
| 3                 | 5,22                    | 121227       |
| 4                 | 5,22                    | 121108       |
| 5                 | 5,22                    | 121038       |
| 6                 | 5,22                    | 120012       |
| Média             | 5,22                    | 121189       |
| SD (%)            | 0,0                     | 778,5        |
| RSD (%)           | 0,05                    | 0,64         |
| Pratos teóricos   | 8136                    |              |
| Fator de simetria | 1,03                    |              |
| Resolução         | 5,2                     |              |

#### 4.2. Controlo

Amostras de Ativo X e Ativo Y, sem qualquer tipo de degradação, foram quantificadas pelos métodos de doseamento e compostos relacionados. Foi, ainda, realizada a quantificação de Impureza F nas amostras de Ativo Y.

##### 4.2.1. Ativo X

Na tabela 4.7 estão representados os resultados obtidos para a amostra de Ativo X sem degradação.

Tabela 4.7 Resultados do Ativo X sem degradação

| Condição / Duração | Doseamento |              |                  | Compostos Relacionados |           |          |              |                  | Balanço mássico (%) |
|--------------------|------------|--------------|------------------|------------------------|-----------|----------|--------------|------------------|---------------------|
|                    | Teor (%)   | Purity angle | Purity threshold | TRR                    | Impurezas | Teor (%) | Purity angle | Purity threshold |                     |
| Sem degradação     | 99,9       | 0,096        | 0,273            | ---                    | ---       | ---      | 0,531        | 2,05             | ---                 |

A amostra de Ativo X, que não foi exposta a condições de degradação, apresentou um teor de ativo na ordem dos 100% como era de esperar, sem a presença de impurezas a reportar no método de compostos relacionados.

Relativamente à pureza do pico do ativo, temos que o valor de *purity angle* é inferior ao de *purity threshold*, o que evidencia essa pureza.

#### 4.2.2. Ativo Y

Na tabela 4.8 estão representados os resultados obtidos para a amostra de Ativo Y sem degradação.

**Tabela 4.8 Resultados do Ativo Y sem degradação**

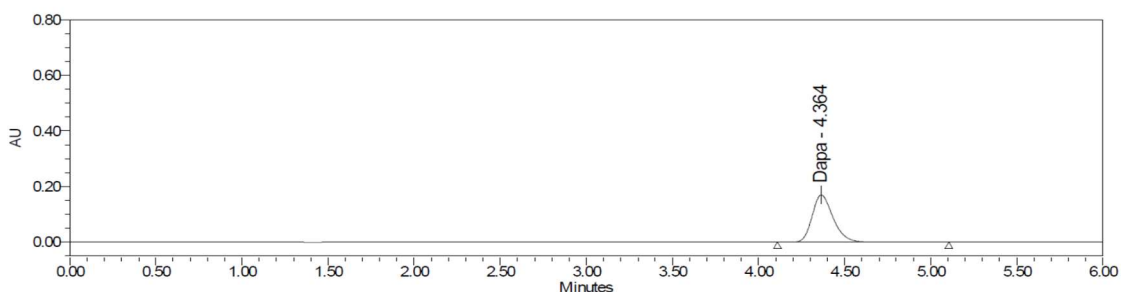
| Condição / Duração    | Doseamento |              |                  | Compostos Relacionados |           |          |              |                  | Balanço mássico (%) |
|-----------------------|------------|--------------|------------------|------------------------|-----------|----------|--------------|------------------|---------------------|
|                       | Teor (%)   | Purity angle | Purity threshold | TRR                    | Impurezas | Teor (%) | Purity angle | Purity threshold |                     |
| <b>Sem degradação</b> | 100,3      | 0,076        | 0,279            | ---                    | ---       | ---      | 6,49         | 4,33             | ---                 |

A amostra de Ativo Y, que não foi exposta a condições de degradação, apresentou um teor de ativo na ordem dos 100% como era de esperar, sem a presença de impurezas a reportar.

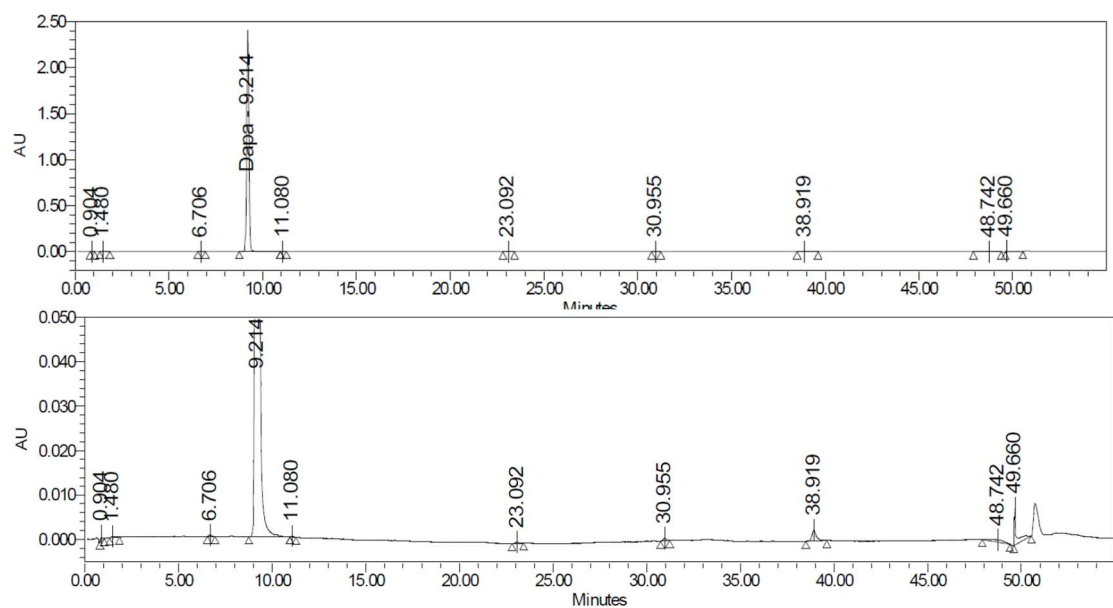
Relativamente à pureza do pico de Ativo Y, o valor de *purity angle* é inferior ao de *purity threshold*, o que evidencia a pureza do pico no método de doseamento. O mesmo não acontece no método de compostos relacionados devido à elevada concentração do ativo, e que leva à saturação do pico cromatográfico. No entanto, o facto de no método de doseamento se obter pureza do pico e de o método dos compostos relacionados utilizado estar descrito na farmacopeia europeia, é possível afirmar que o pico de Ativo Y é puro.

#### 4.2.3. Cromatogramas do Ativo X e do Ativo Y – Controlo

Nas figuras 4.1 e 4.2 estão representados os cromatogramas obtidos para a Ativo X no método de doseamento e compostos relacionados, respetivamente.

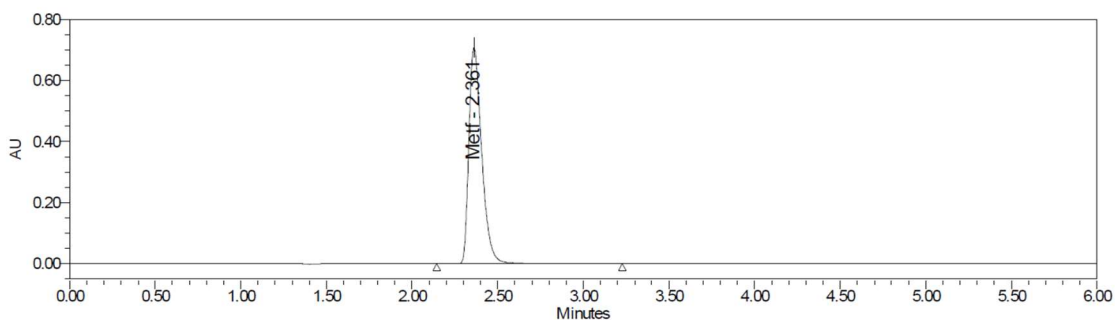


**Figura 4.1 Cromatograma do Ativo X - Doseamento - Controlo**

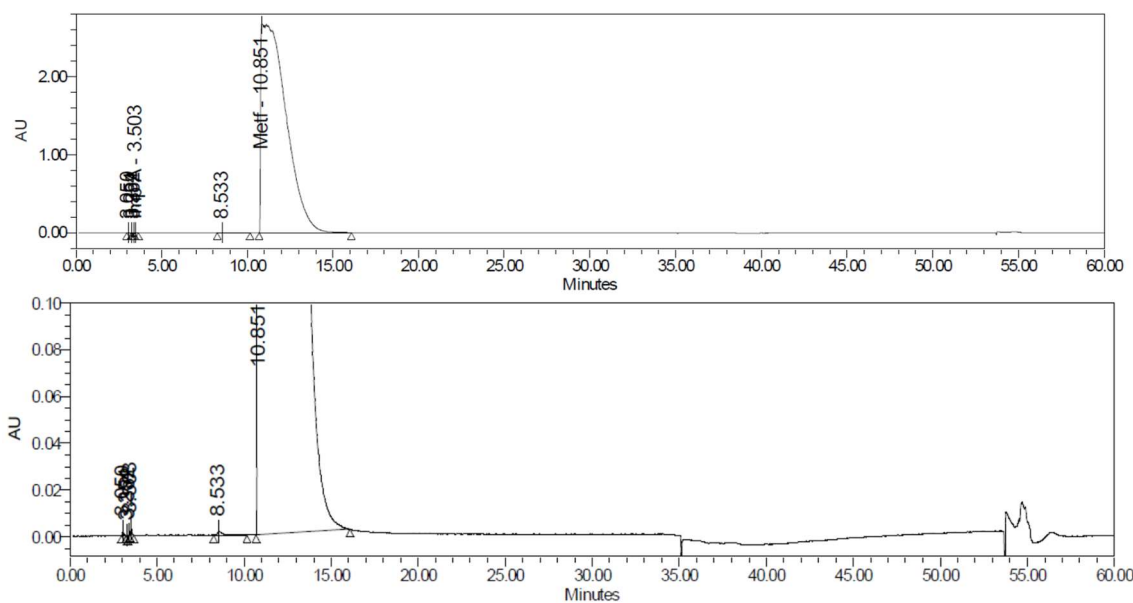


**Figura 4.2 Cromatograma do Ativo X - Compostos relacionados – Controle**

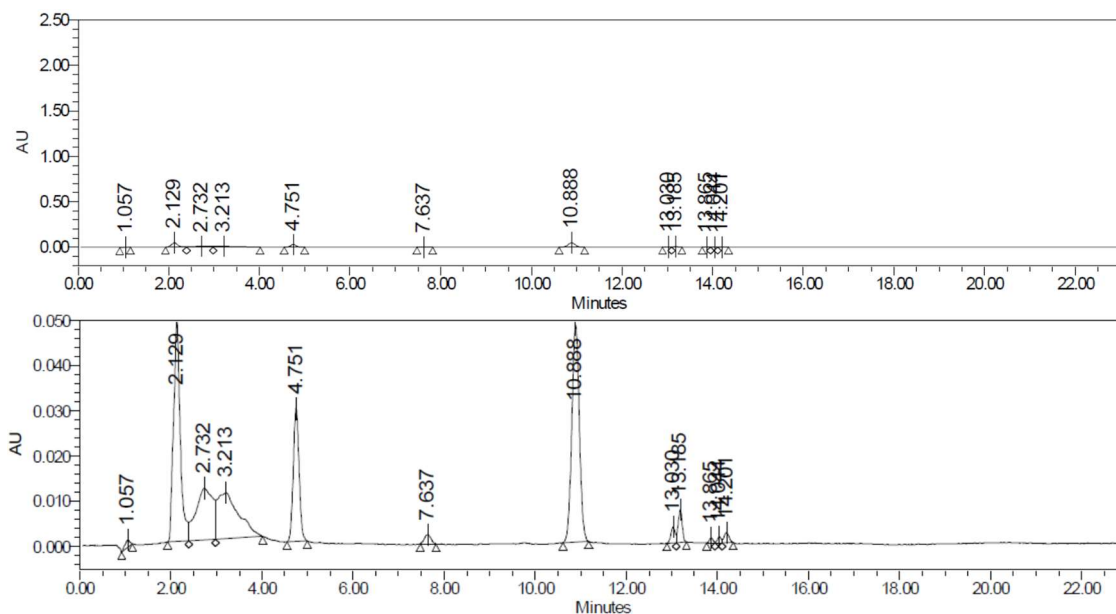
Nas figuras 4.3 a 4.5 estão representados os cromatogramas obtidos para o Ativo Y no método de doseamento, compostos relacionados e impureza F.



**Figura 4.3 Cromatograma do Ativo Y - Doseamento - Controle**



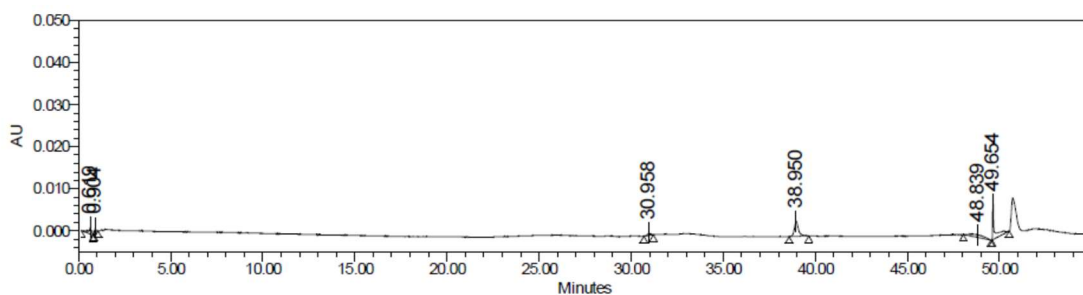
**Figura 4.4 Cromatograma do Ativo Y - Compostos relacionados – Controle**



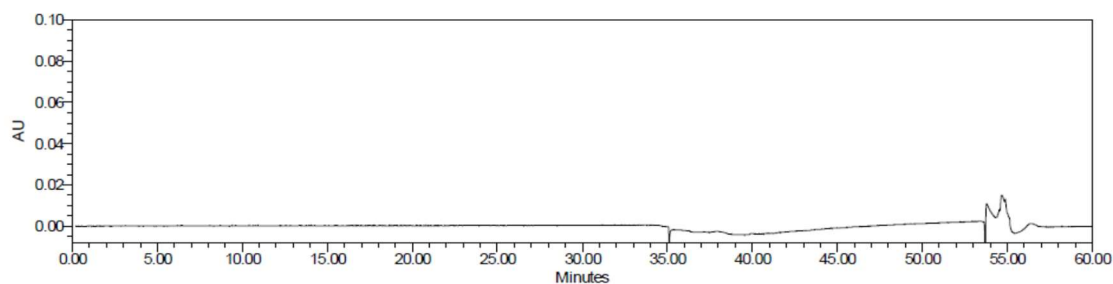
**Figura 4.5 Cromatograma do Ativo Y - Impureza F do Ativo Y – Controle**

#### 4.2.4. Cromatogramas de diluentes e soluções em branco – Controle

Nas figuras 4.6 a 4.9 estão representados os cromatogramas dos diluentes e das soluções em branco. Estes foram comparados com os cromatogramas das substâncias ativas para que os picos referentes a diluentes e reagentes não fossem quantificados.



**Figura 4.6 Cromatograma de diluente - Compostos relacionados Ativo X**



**Figura 4.7 Cromatograma de diluente - Compostos relacionados Ativo Y**

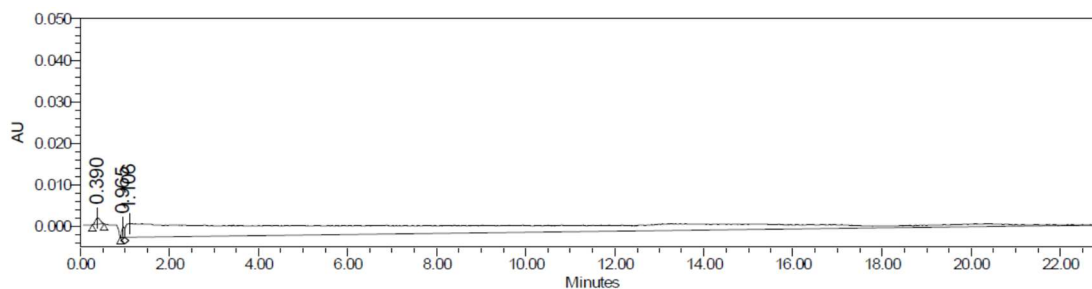


Figura 4.8 Cromatograma de diluente – Impureza F do Ativo Y

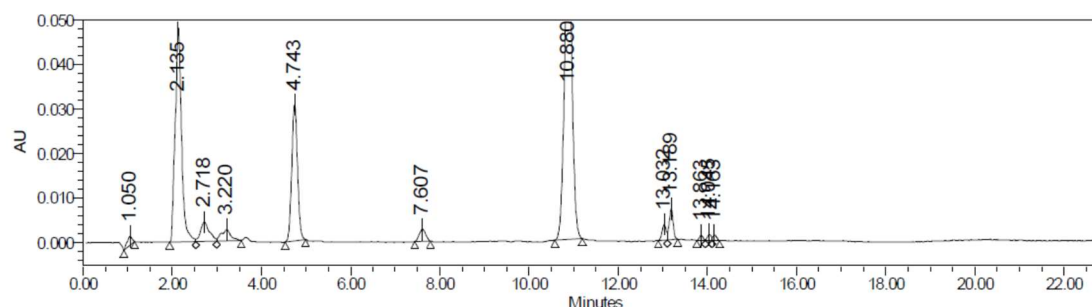


Figura 4.9 Cromatograma de solução em branco – Impureza F do Ativo Y

### 4.3. Fotossensibilidade

De modo a estudar a sensibilidade à luz, o Ativo X e o Ativo Y foram expostos, no estado sólido, a um *suntest* de 500 W/m<sup>2</sup> durante 24 e 48 horas. Após a exposição as amostras foram analisadas de acordo com os métodos de doseamento e compostos relacionados. Foi, ainda, realizada a quantificação de Impureza F nas amostras de Ativo Y.

#### 4.3.1. Ativo X

Na tabela 4.9 estão representados os resultados obtidos para o estudo de fotossensibilidade do Ativo X.

Tabela 4.9 Resultados do Ativo X após exposição à luz

| Condição / Duração | Doseamento |              |                  | Compostos Relacionados |           |          |              |                  | Balanço mássico (%) |
|--------------------|------------|--------------|------------------|------------------------|-----------|----------|--------------|------------------|---------------------|
|                    | Teor (%)   | Purity angle | Purity threshold | TRR                    | Impurezas | Teor (%) | Purity angle | Purity threshold |                     |
| 24h                | 101,4      | 0,106        | 0,285            | ---                    | ---       | ---      | 0,632        | 2,28             | 1,5                 |
| 48h                | 101,1      | 0,107        | 0,292            | ---                    | ---       | ---      | 0,570        | 2,24             | 1,2                 |

Após 24 e 48 horas de exposição à luz, o Ativo X não apresentou impurezas de degradação significativas, o que indica que a sua estabilidade não foi afetada. Quando exposta a radiação UV era esperado que o Ativo X apresentasse suscetibilidade, devido à presença do átomo de halogénio no anel aromático [37], no entanto neste estudo não se verificou.

Os balanços mássicos para esta condição são inferiores a 10%.

Relativamente à pureza do pico do ativo, temos que o valor de *purity angle* é inferior ao de *purity threshold*, o que evidencia essa pureza.

De acordo com as recomendações da ICH para o estudo de fotoestabilidade, a substância pode ser considerada estável, caso não ocorra degradação quando exposta a 1,2 klux/h e, no mínimo, 200 W/m<sup>2</sup> [10]. Durante o estudo, estas condições foram ultrapassadas e, mesmo assim, não foi possível obter uma degradação do ativo superior a 10%, pelo que é possível afirmar que a exposição à luz não tem influência na estabilidade do Ativo X.

#### 4.3.2. Ativo Y

Na tabela 4.10 estão representados os resultados obtidos para o estudo de fotossensibilidade do Ativo Y.

**Tabela 4.10 Resultados do Ativo Y após exposição à luz**

| Condição / Duração | Doseamento |                     |                         | Compostos Relacionados |           |          |                     |                         | Balanço mássico (%) |
|--------------------|------------|---------------------|-------------------------|------------------------|-----------|----------|---------------------|-------------------------|---------------------|
|                    | Teor (%)   | <i>Purity angle</i> | <i>Purity threshold</i> | TRR                    | Impurezas | Teor (%) | <i>Purity angle</i> | <i>Purity threshold</i> |                     |
| <b>24h</b>         | 100,7      | 0,075               | 0,278                   | ---                    | ---       | ---      | 7,80                | 4,28                    | 0,4                 |
| <b>48h</b>         | 100,9      | 0,076               | 0,279                   | ---                    | ---       | ---      | 7,69                | 4,53                    | 0,5                 |

Pelos resultados obtidos é possível perceber que, tal como o Ativo X, o Ativo Y não apresentou alterações significativas no seu teor, relativamente à amostra sem degradação, o que indica que as suas estabilidades não foram afetadas durante a exposição. O método de compostos relacionados não detetou picos de impurezas de degradação.

Os balanços de massa são inferiores a 10%.

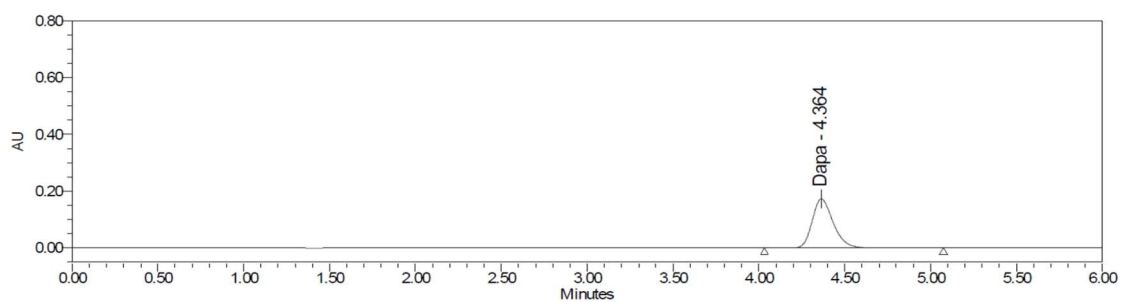
Relativamente à pureza do pico do Ativo Y, o valor de *purity angle* é inferior ao de *purity threshold*, o que evidencia a pureza do pico no método de doseamento. O mesmo não acontece no método de compostos relacionados devido à elevada concentração do ativo, e que leva à saturação do pico cromatográfico. No entanto, o facto de no método de doseamento se obter pureza do pico e de o método dos compostos relacionados utilizado estar descrito na farmacopeia europeia, é possível afirmar que o pico do Ativo Y é puro.

De acordo com as recomendações da ICH para o estudo de fotoestabilidade, descritas no ponto acima para o Ativo X, também é possível afirmar que o Ativo Y apresenta fotoestabilidade, uma vez que não foi possível obter uma degradação do ativo superior a 10%.

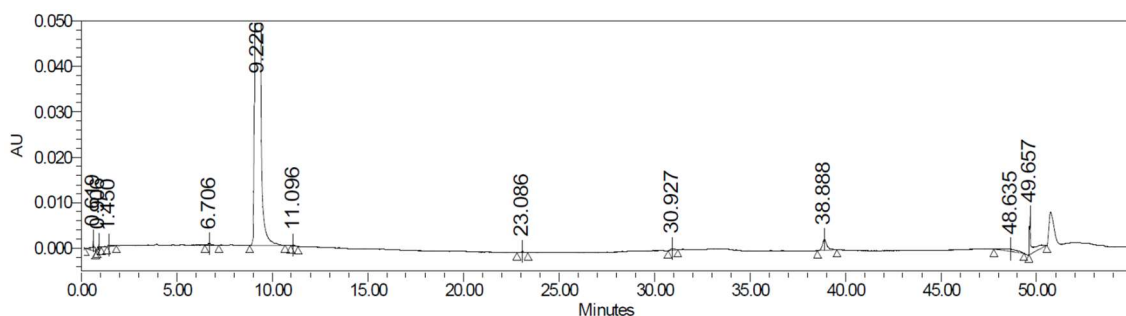
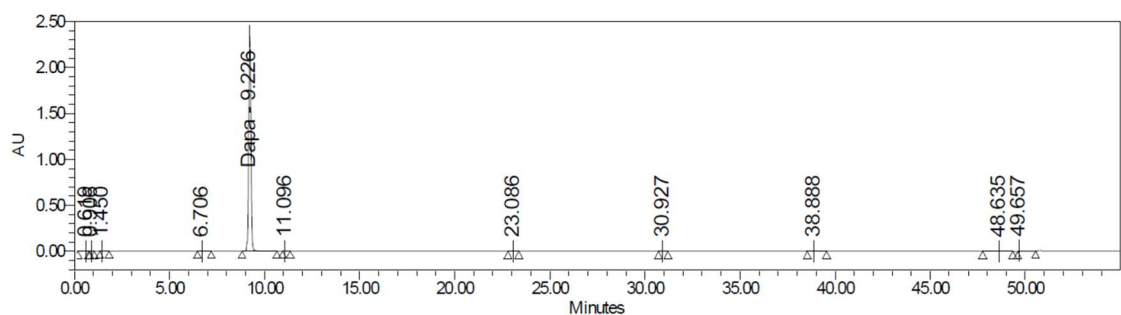
#### 4.3.3. Cromatogramas do Ativo X e do Ativo Y – Suntest

Nas figuras 4.10 a 4.13 estão representados os cromatogramas obtidos para o Ativo X no método de doseamento e compostos relacionados, respetivamente.

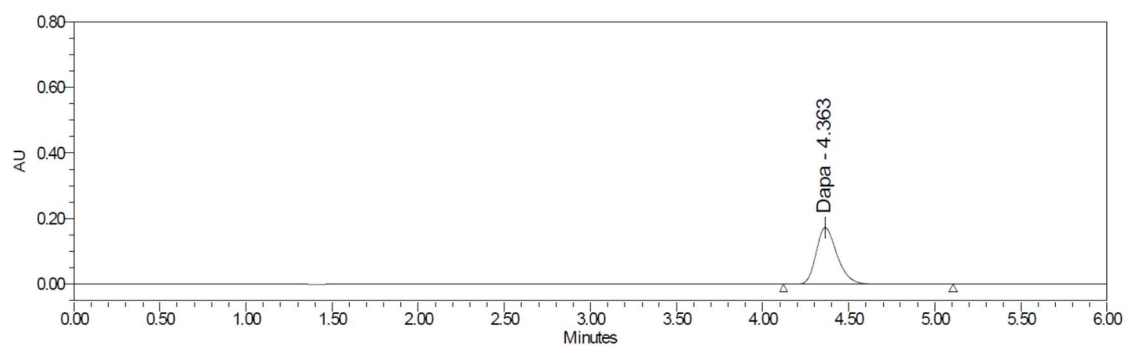




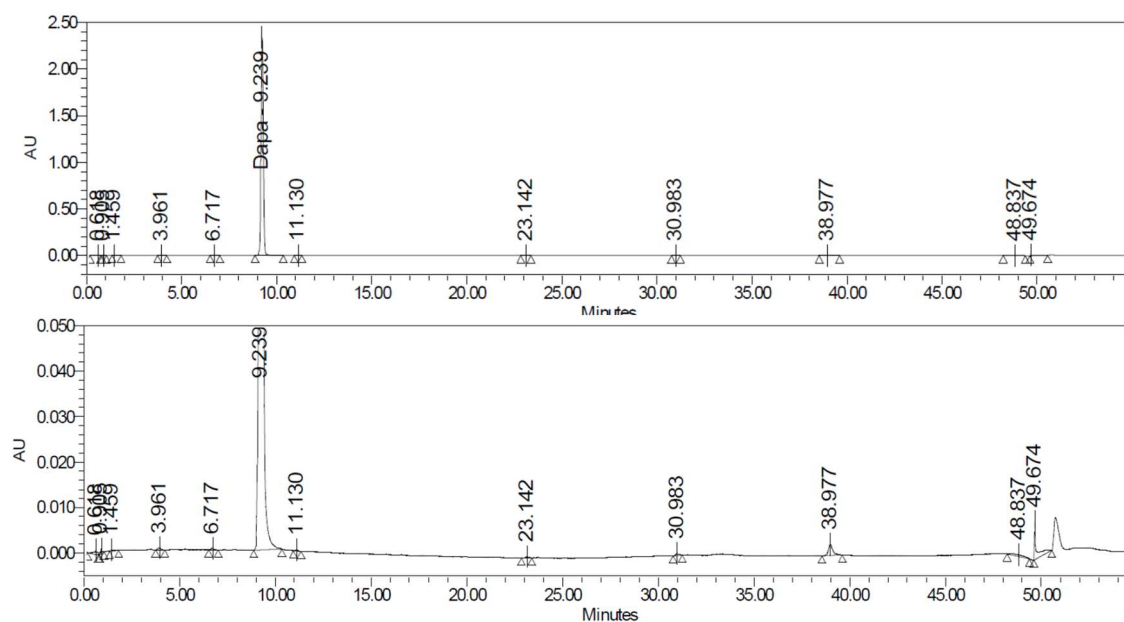
**Figura 4.10 Cromatograma do Ativo X - Doseamento – Suntest 24 horas**



**Figura 4.11 Cromatograma do Ativo X - Compostos relacionados – Suntest 24 horas**

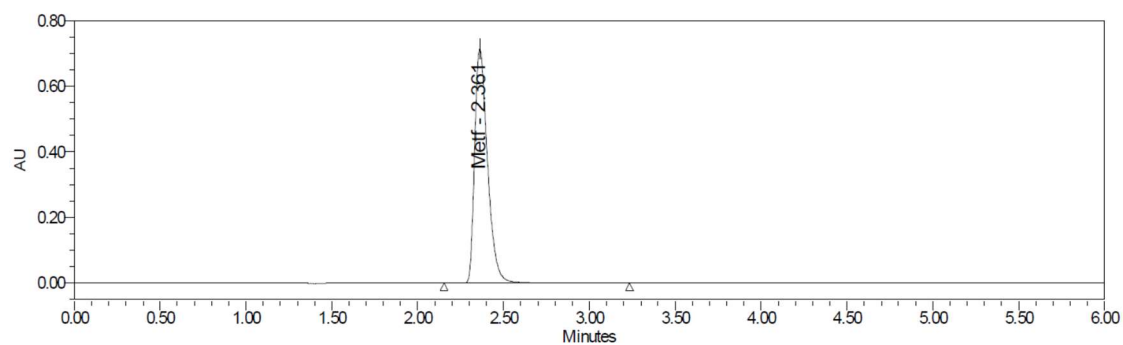


**Figura 4.12 Cromatograma do Ativo X - Doseamento – Suntest 48 horas**

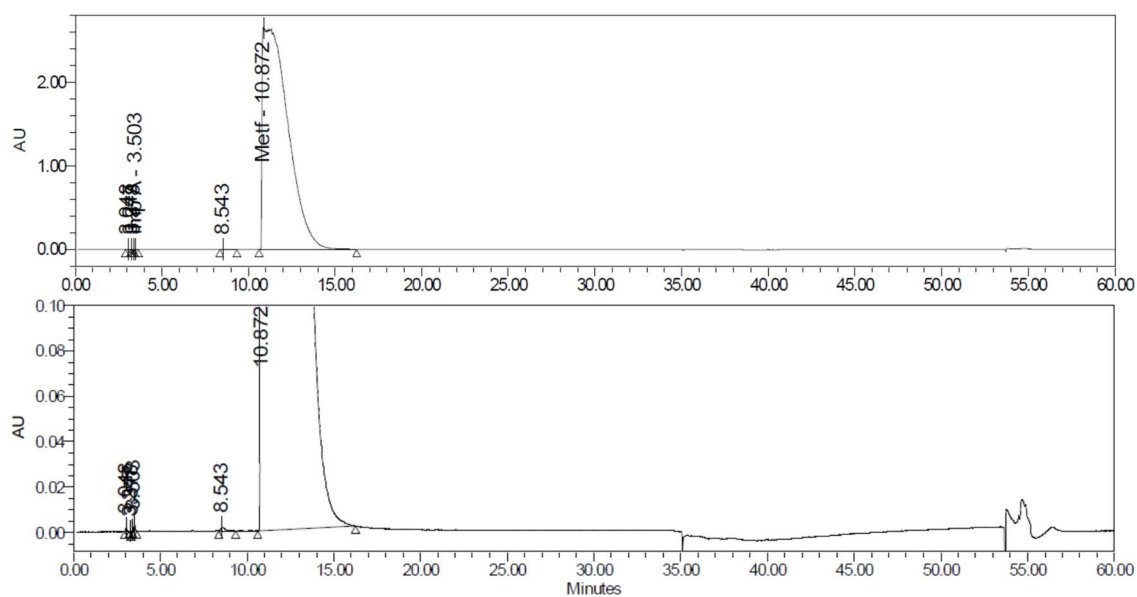


**Figura 4.13 Cromatograma do Ativo X - Compostos relacionados – Suntest, 48 horas**

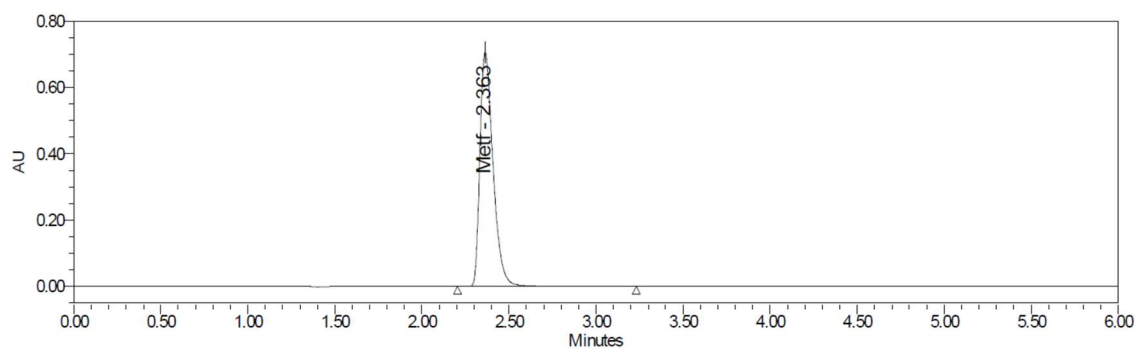
Nas figuras 4.14 a 4.19 estão representados os cromatogramas obtidos para o Ativo Y no método de doseamento, compostos relacionados e impureza F.



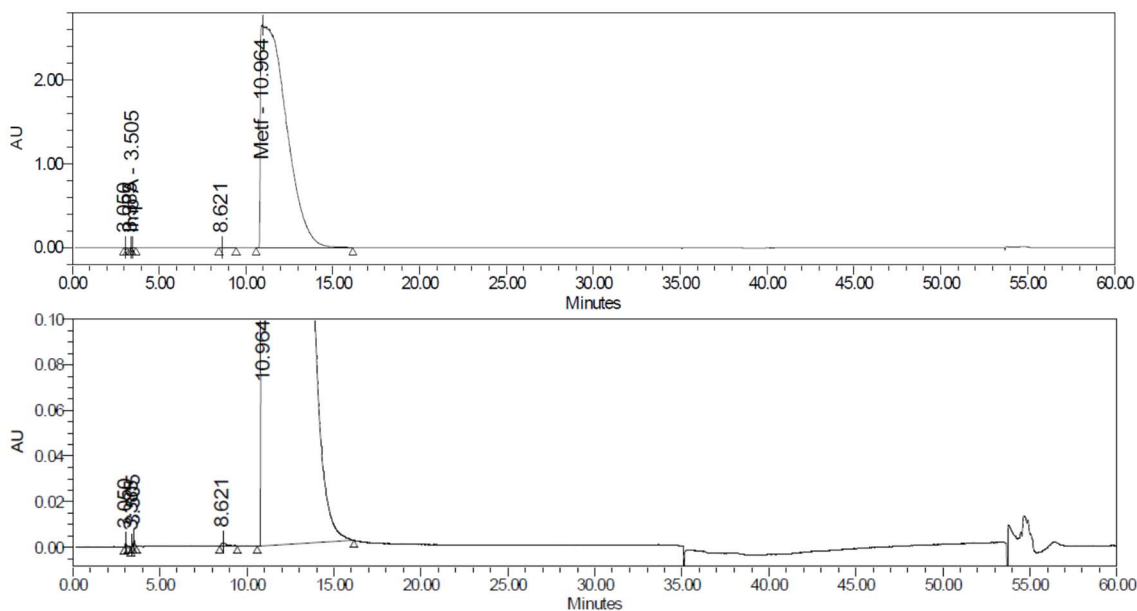
**Figura 4.14 Cromatograma do Ativo Y - Doseamento – Suntest 24 horas**



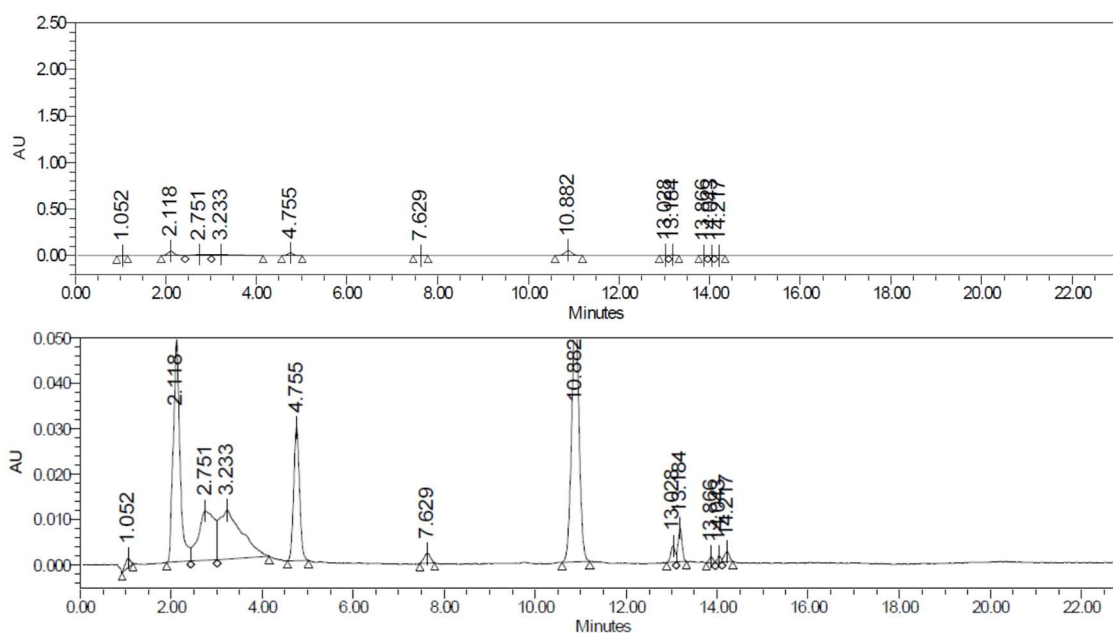
**Figura 4.15 Cromatograma do Ativo Y - Compostos relacionados – Suntest 24 horas**



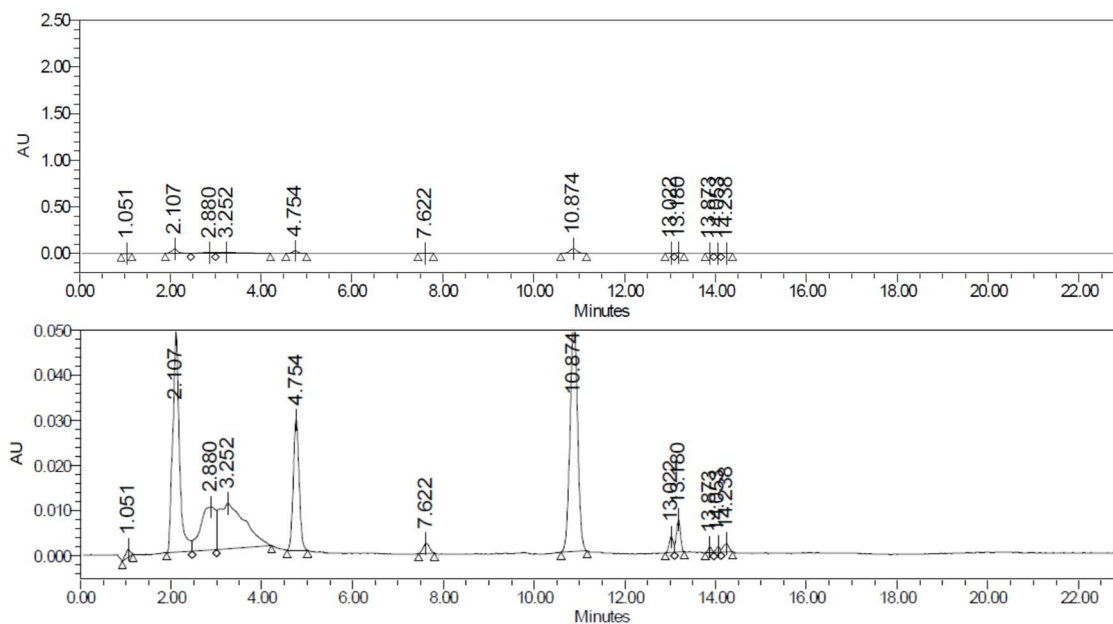
**Figura 4.16 Cromatograma do Ativo Y - Método de doseamento – Suntest 48 horas**



**Figura 4.17 Cromatograma do Ativo Y - Compostos relacionados – Suntest 48 horas**



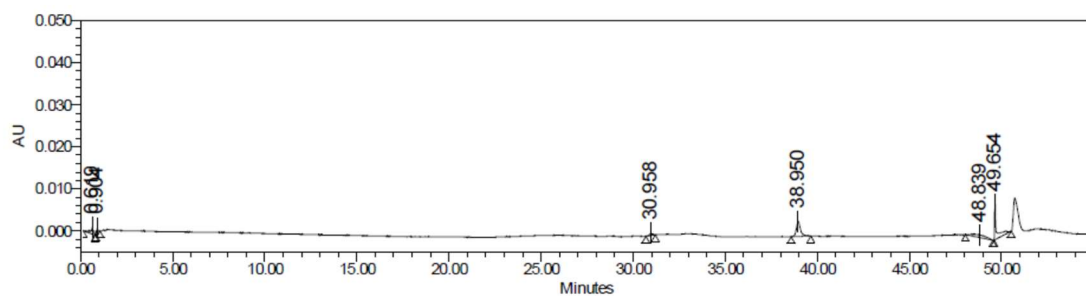
**Figura 4.18 Cromatograma do Ativo Y - Impureza F do Ativo Y – Suntest 24 horas**



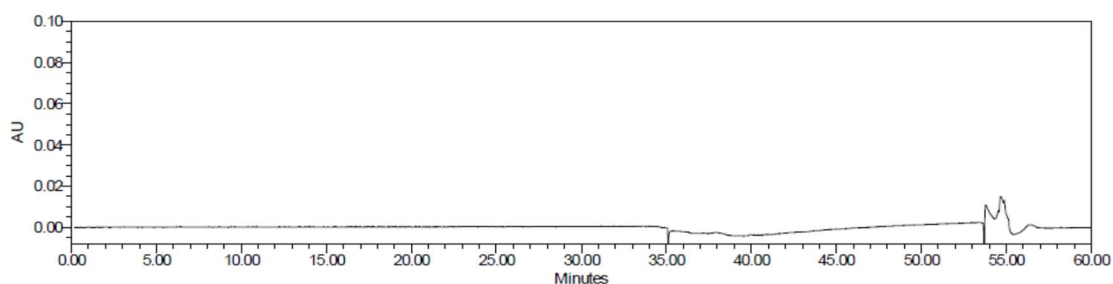
**Figura 4.19 Cromatograma do Ativo Y - Impureza F do Ativo Y – Suntest 48 horas**

#### 4.3.4. Cromatogramas de diluentes e soluções em branco – Suntest

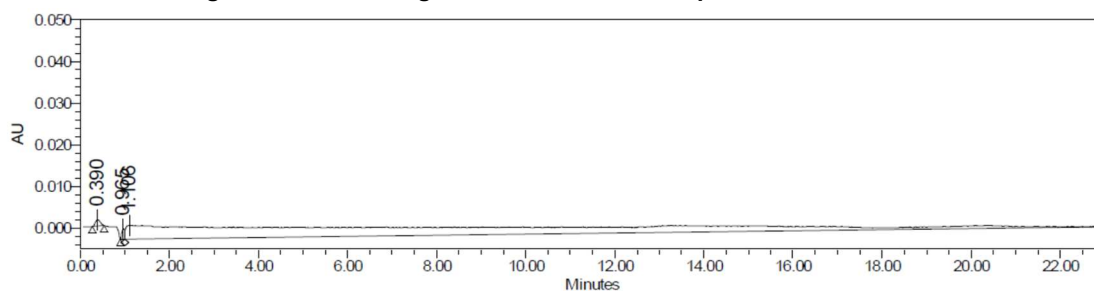
Nas figuras 4.20 a 4.23 estão representados os cromatogramas dos diluentes e das soluções em branco. Estes foram comparados com os cromatogramas das substâncias ativas para que os picos referentes a diluentes e reagentes não fossem quantificados erradamente como impurezas de degradação.



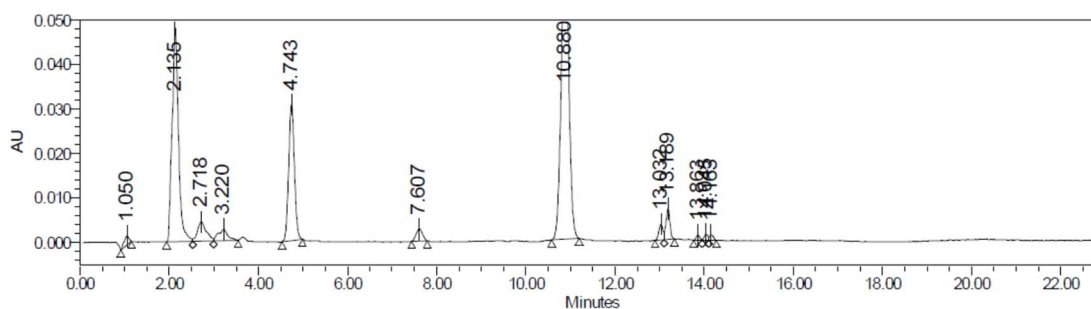
**Figura 4.20 Cromatograma de diluente - Compostos relacionados Ativo X**



**Figura 4.21 Cromatograma de diluente - Compostos relacionados Ativo Y**



**Figura 4.22 Cromatograma de diluente – Impureza F do Ativo Y**



**Figura 4.23 Cromatograma de solução em branco – Impureza F do Ativo Y**

#### 4.4. Temperatura

Nesta condição, os ativos foram expostos, no estado sólido, a uma temperatura de 60°C durante 7 e 14 dias. Após a exposição as amostras foram analisadas de acordo com os métodos de doseamento e compostos relacionados. Foi, ainda, realizada a quantificação de Impureza F nas amostras de Ativo Y.

#### 4.4.1. Ativo X

Na tabela 4.11 estão representados os resultados obtidos após exposição do Ativo X a uma temperatura de 60°C.

**Tabela 4.11 Resultados do Ativo X após exposição à temperatura**

| Condição / Duração | Doseamento |              |                  | Compostos Relacionados |           |          |              |                  | Balanço mássico (%) |
|--------------------|------------|--------------|------------------|------------------------|-----------|----------|--------------|------------------|---------------------|
|                    | Teor (%)   | Purity angle | Purity threshold | TRR                    | Impurezas | Teor (%) | Purity angle | Purity threshold |                     |
| 7 dias             | 98,11      | 0,121        | 0,304            | ---                    | ---       | ---      | 0,696        | 2,54             | 1,8                 |
| 14 dias            | 98,62      | 0,088        | 0,267            | ---                    | ---       | ---      | 0,572        | 2,17             | 1,3                 |

O Ativo X foi exposto a condições extremas de temperatura durante 7 e 14 dias. Verificou-se um ligeiro decréscimo do seu teor após a exposição, no entanto não foi detetado o aparecimento de impurezas superiores ao limite de quantificação (0,05%).

Os balanços de massa são inferiores a 10%.

Relativamente à pureza do pico do ativo, temos que o valor de *purity angle* é inferior ao de *purity threshold*, o que evidencia essa pureza.

Uma vez que, apesar das condições severas de temperatura aplicadas, não houve degradação significativa, é possível afirmar que o Ativo X apresenta estabilidade perante temperaturas elevadas.

#### 4.4.2. Ativo Y

Na tabela 4.12 estão representados os resultados obtidos após exposição do Ativo Y a uma temperatura de 60°C.

**Tabela 4.12 Resultados do Ativo Y após exposição à temperatura**

| Condição / Duração | Doseamento |              |                  | Compostos Relacionados |           |          |              |                  | Balanço mássico (%) |
|--------------------|------------|--------------|------------------|------------------------|-----------|----------|--------------|------------------|---------------------|
|                    | Teor (%)   | Purity angle | Purity threshold | TRR                    | Impurezas | Teor (%) | Purity angle | Purity threshold |                     |
| 7 dias             | 100,0      | 0,078        | 0,281            | ---                    | ---       | ---      | 6,530        | 4,72             | 0,3                 |
| 14 dias            | 103,7      | 0,068        | 0,266            | ---                    | ---       | ---      | 7,440        | 4,67             | 3,4                 |

Após 7 e 14 dias de exposição a temperaturas elevadas, o Ativo Y também não apresentou degradação significativa, não havendo formação de impurezas acima do limite de quantificação (0,02%). Na estrutura molecular do Ativo Y está presente um grupo amina que pela sua volatilidade seria um bom grupo de saída, em condições de temperatura elevada, dando origem à Impureza A [27], o que não foi verificado nos resultados obtidos.

Os balanços de massa são inferiores a 10%.

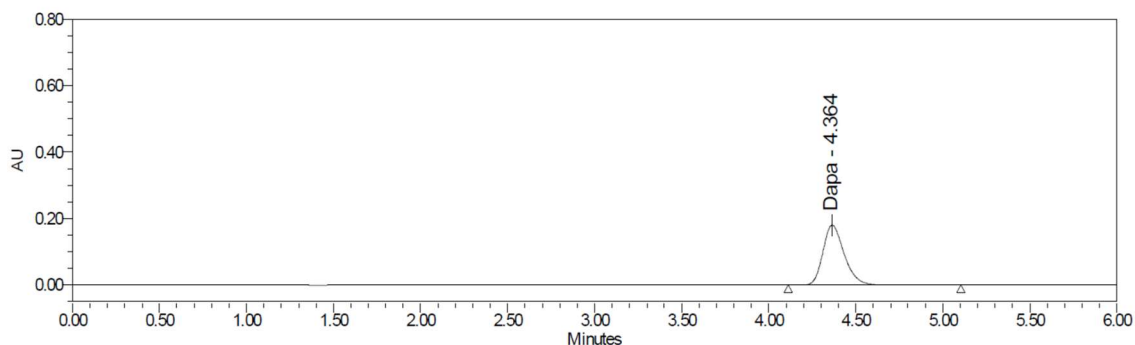
Relativamente à pureza do pico do Ativo Y, o valor de *purity angle* é inferior ao de *purity threshold*, o que evidencia a pureza do pico no método de doseamento. O mesmo não acontece no método de compostos relacionados devido à elevada concentração do ativo, e que leva à saturação do pico cromatográfico. No entanto, o facto de no método de doseamento se obter

pureza do pico e de o método dos compostos relacionados utilizado estar descrito na farmacopeia europeia, é possível afirmar que o pico do Ativo Y é puro.

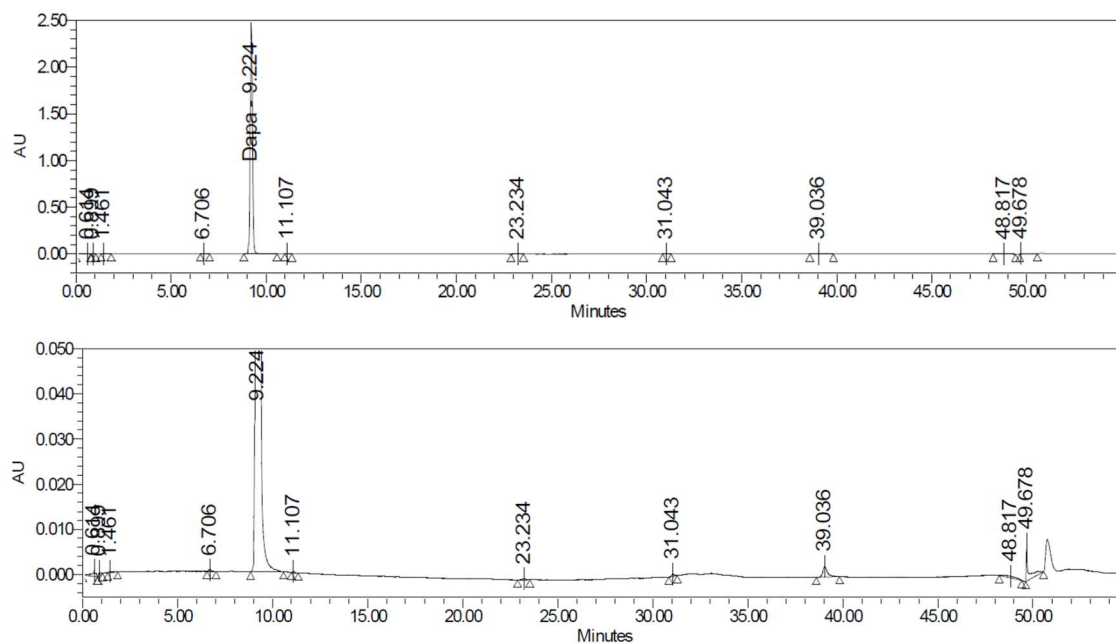
Assim, com degradações inferiores a 10% em condições severas de temperatura, pode-se concluir que a temperatura não é uma via de degradação importante para este ativo.

#### 4.4.3. Cromatogramas do Ativo X e do Ativo Y – Temperatura

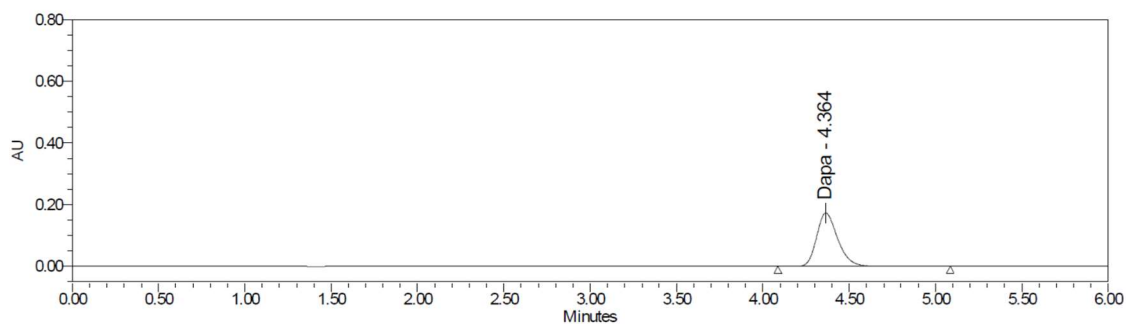
Nas figuras 4.24 a 4.27 estão representados os cromatogramas obtidos para o Ativo X no método de doseamento e compostos relacionados, respetivamente.



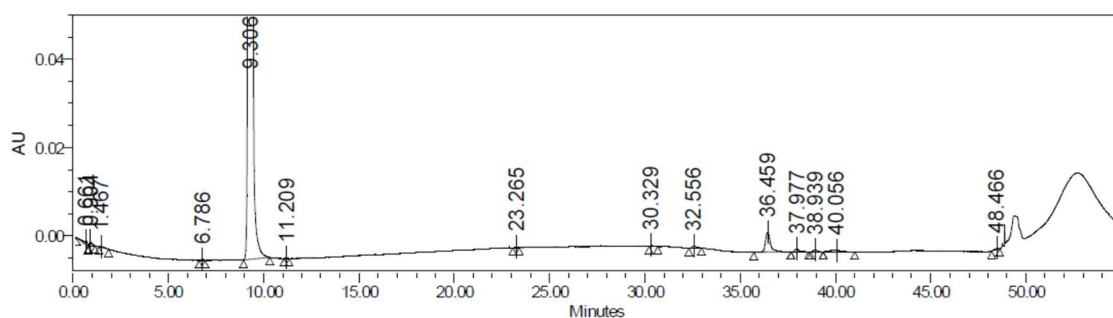
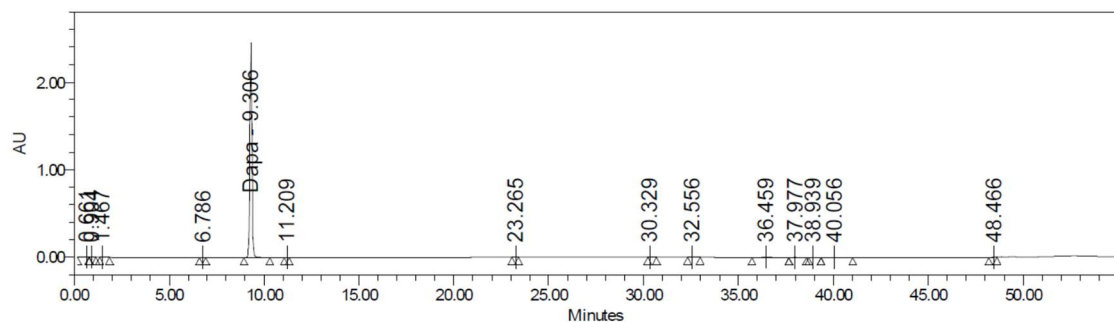
**Figura 4.24 Cromatograma do Ativo X - Doseamento – 60°C, 7 dias**



**Figura 4.25 Cromatograma do Ativo X - Compostos relacionados – 60°C, 7 dias**

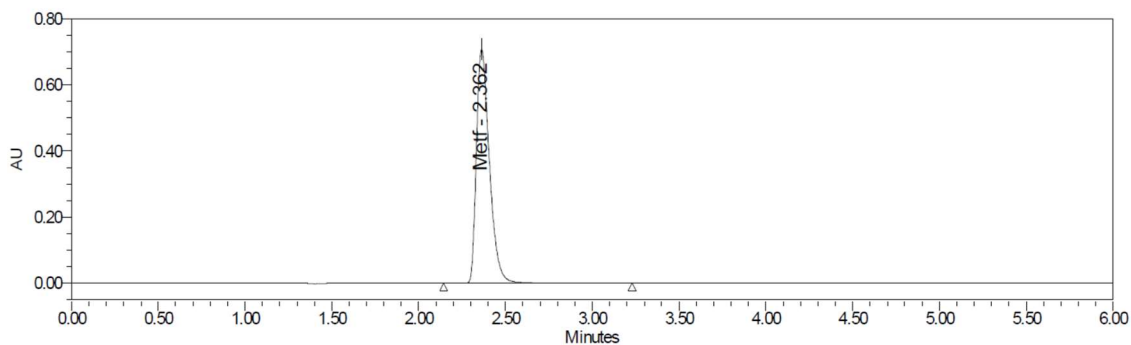


**Figura 4.26 Cromatograma do Ativo X - Doseamento – 60°C, 14 dias**



**Figura 4.27 Cromatograma do Ativo X - Compostos relacionados – 60°C, 14 dias**

Nas figuras 4.28 a 4.33 estão representados os cromatogramas obtidos para o Ativo Y no método de doseamento, compostos relacionados e impureza F.



**Figura 4.28 Cromatograma do Ativo Y - Doseamento – 60°C, 7 dias**



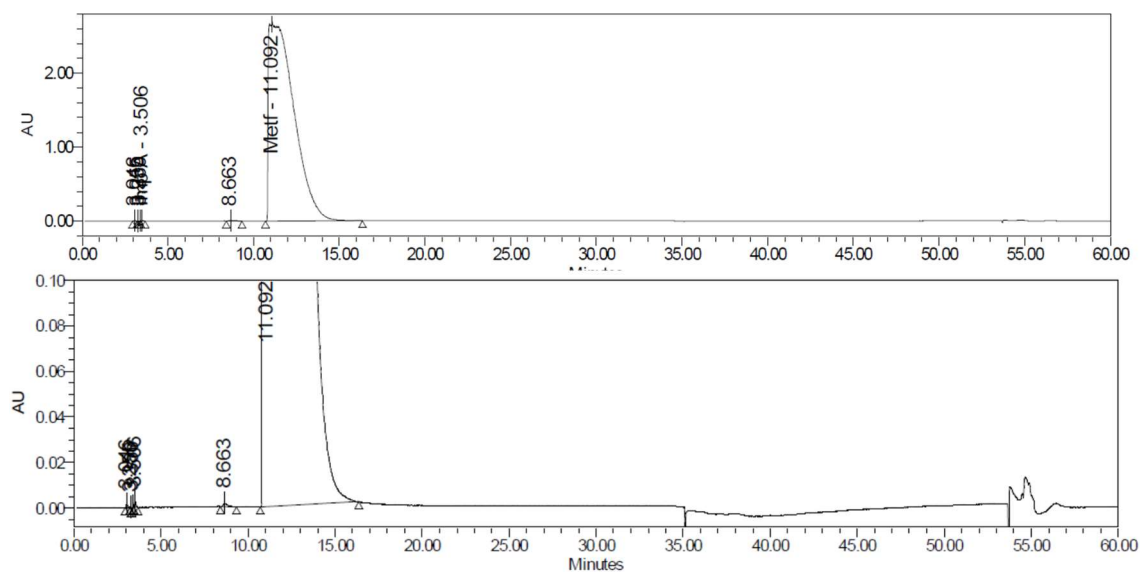


Figura 4.29 Cromatograma do Ativo Y - Compostos relacionados – 60°C, 7 dias

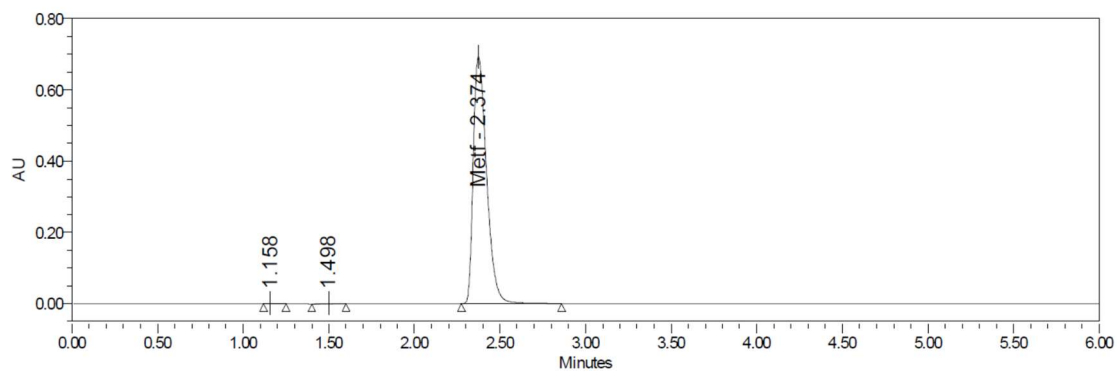


Figura 4.30 Cromatograma do Ativo Y - Doseamento – 60°C, 14 dias

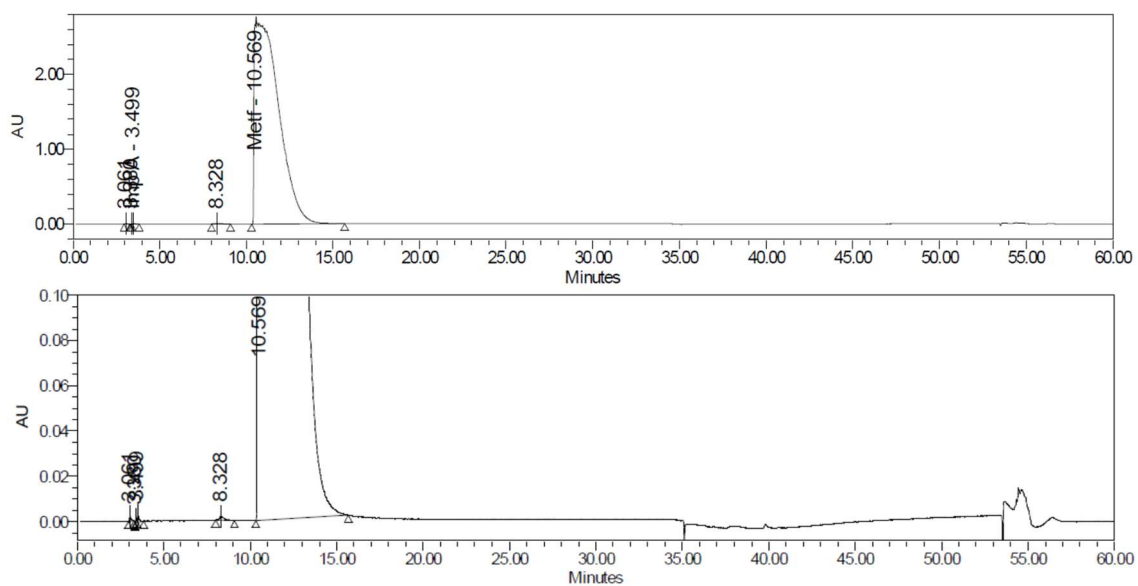
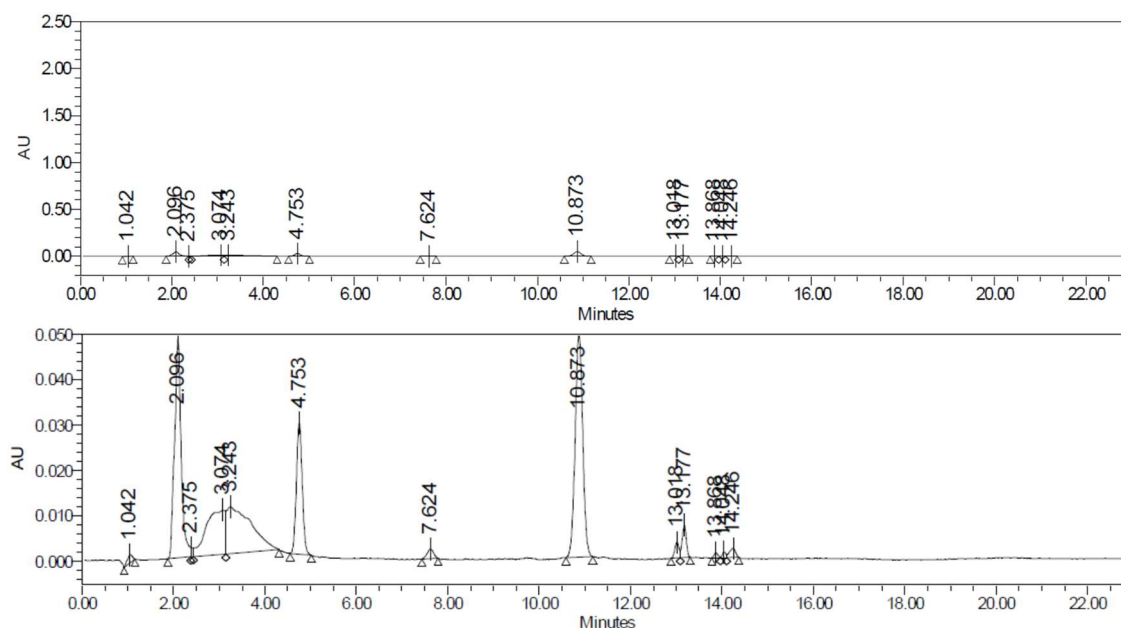
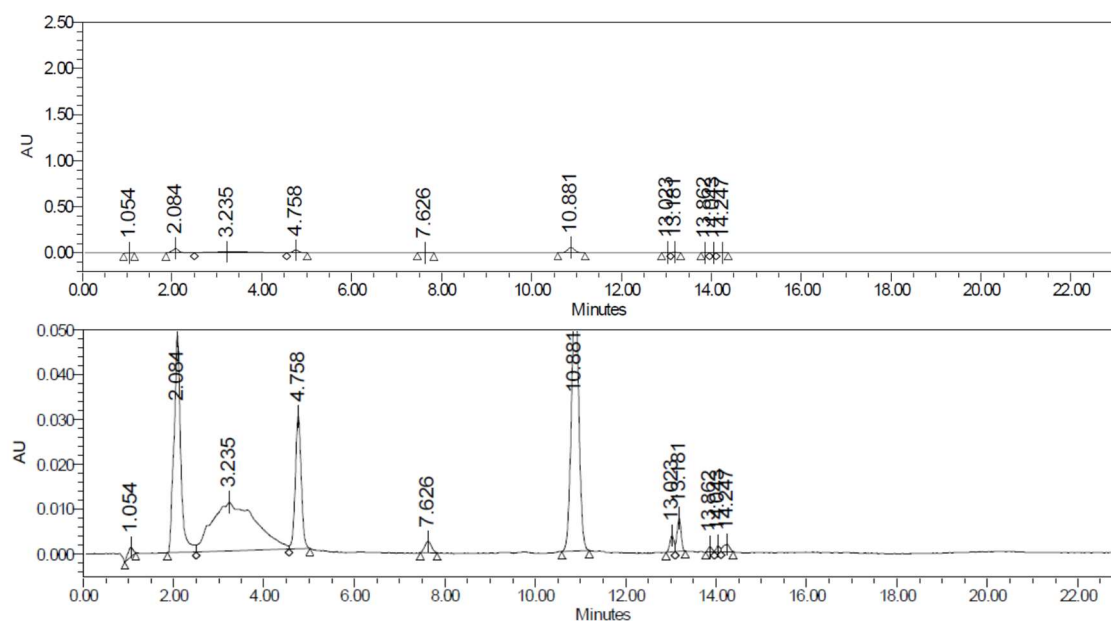


Figura 4.31 Cromatograma do Ativo Y - Compostos relacionados – 60°C, 14 dias



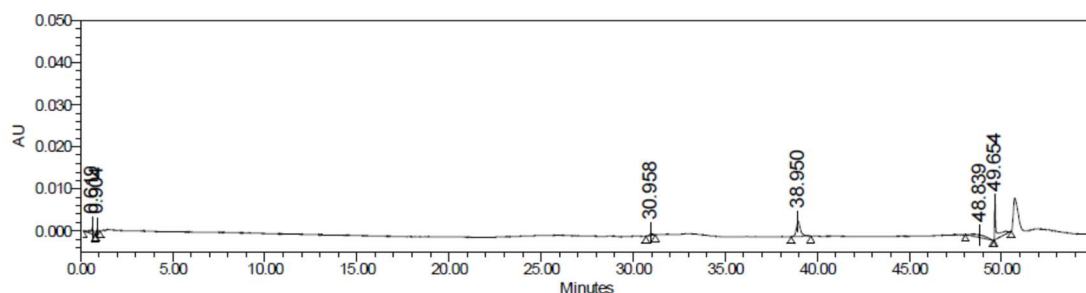
**Figura 4.32 Cromatograma do Ativo Y - Impureza F do Ativo Y – 60°C, 7 dias**



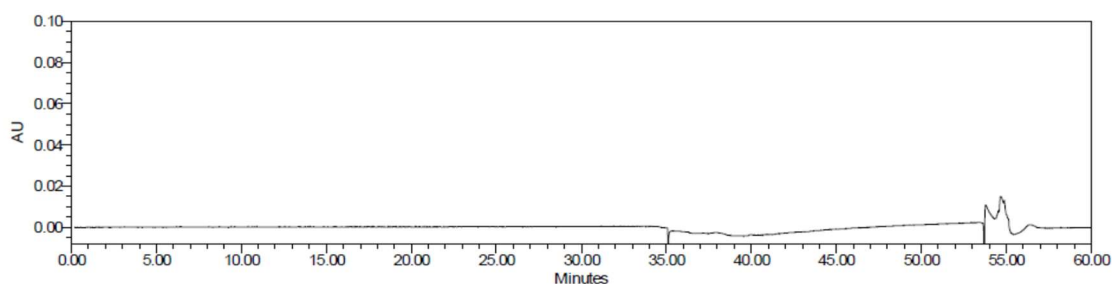
**Figura 4.33 Cromatograma do Ativo Y - Impureza F do Ativo Y – 60°C, 14 dias**

#### 4.4.4. Cromatogramas de diluente e soluções em branco – Temperatura

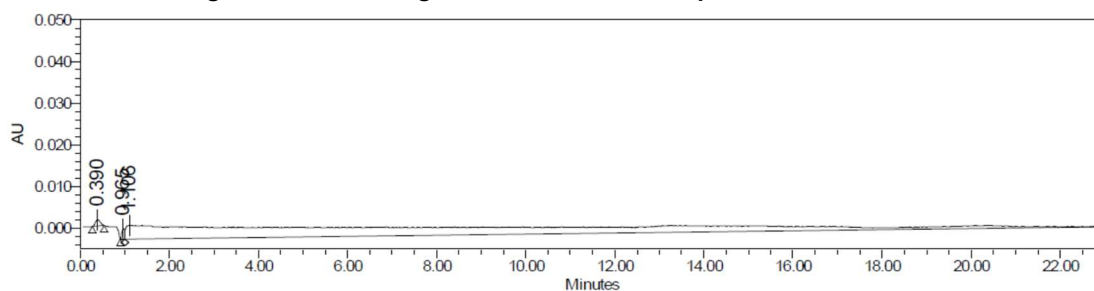
Nas figuras 4.34 a 4.37 estão representados os cromatogramas dos diluentes e das soluções em branco. Estes foram comparados com os cromatogramas das substâncias ativas para que os picos referentes a diluentes e reagentes não fossem quantificados erradamente como impurezas de degradação.



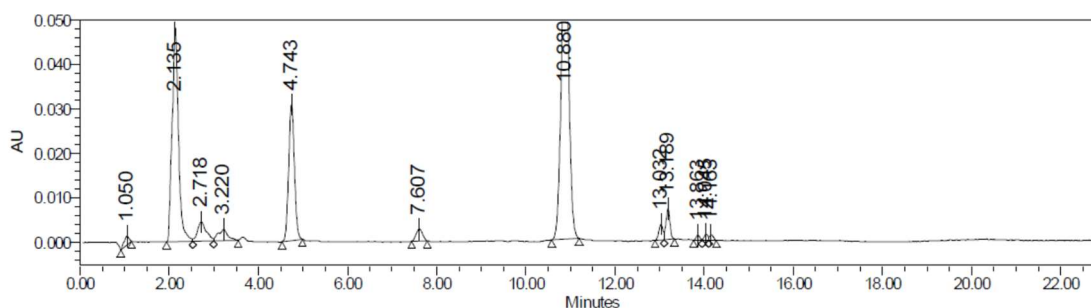
**Figura 4.34 Cromatograma de diluente - Compostos relacionados Ativo X**



**Figura 4.35 Cromatograma de diluente - Compostos relacionados Ativo Y**



**Figura 4.36 Cromatograma de diluente – Impureza F do Ativo Y**



**Figura 4.37 Cromatograma de solução em branco – Impureza F do Ativo Y**

#### 4.5. Humidade

Amostras de Ativo X e Ativo Y foram submetidos, no estado sólido, a 85% de humidade relativa durante 7 e 14 dias, num exsiccador. Após a exposição as amostras foram analisadas de acordo com os métodos de doseamento e compostos relacionados. Foi, ainda, realizada a quantificação de Impureza F nas amostras de Ativo Y.

#### 4.5.1. Ativo X

Na tabela 4.13 estão representados os resultados obtidos após exposição do Ativo X a 85% de humidade relativa.

**Tabela 4.13 Resultados do Ativo X após exposição à humidade**

| Condição / Duração | Doseamento |              |                  | Compostos Relacionados |           |          |              |                  | Balanço mássico (%) |
|--------------------|------------|--------------|------------------|------------------------|-----------|----------|--------------|------------------|---------------------|
|                    | Teor (%)   | Purity angle | Purity threshold | TRR                    | Impurezas | Teor (%) | Purity angle | Purity threshold |                     |
| <b>7 dias</b>      | 101,3      | 0,139        | 0,323            | ---                    | ---       | ---      | 0,582        | 2,22             | 1,3                 |
| <b>14 dias</b>     | 103,2      | 0,088        | 0,268            | ---                    | ---       | ---      | 0,650        | 2,25             | 3,3                 |

Após exposição à uma humidade durante 7 e 14 dias, houve um ligeiro aumento no doseamento de Ativo X, mais significativo depois de 14 dias. Não se verificou a formação de impurezas de degradação no método.

Os balanços de massa são inferiores a 10%.

Relativamente à pureza do pico do ativo, temos que o valor de *purity angle* é inferior ao de *purity threshold*, o que evidencia essa pureza.

Com os resultados obtidos após a exposição a condições de humidade tão severas, é possível concluir que esta não é uma via de degradação significativa para o Ativo X.

#### 4.5.2. Ativo Y

Na tabela 4.14 estão representados os resultados obtidos após exposição do Ativo Y a 85% de humidade relativa.

**Tabela 4.14 Resultados do Ativo Y após exposição à humidade**

| Condição / Duração | Doseamento |              |                  | Compostos Relacionados |           |          |              |                  | Balanço mássico (%) |
|--------------------|------------|--------------|------------------|------------------------|-----------|----------|--------------|------------------|---------------------|
|                    | Teor (%)   | Purity angle | Purity threshold | TRR                    | Impurezas | Teor (%) | Purity angle | Purity threshold |                     |
| <b>7 dias</b>      | 101,0      | 0,077        | 0,282            | ---                    | ---       | ---      | 6,690        | 4,35             | 0,7                 |
| <b>14 dias</b>     | 106,1      | 0,069        | 0,266            | ---                    | ---       | ---      | 6,350        | 4,55             | 5,7                 |

Após exposição a uma humidade relativa de 85% durante 7 e 14 dias, houve um ligeiro aumento no doseamento do Ativo Y, mais significativo depois de 14 dias. Não se verificou a formação de impurezas de degradação no método.

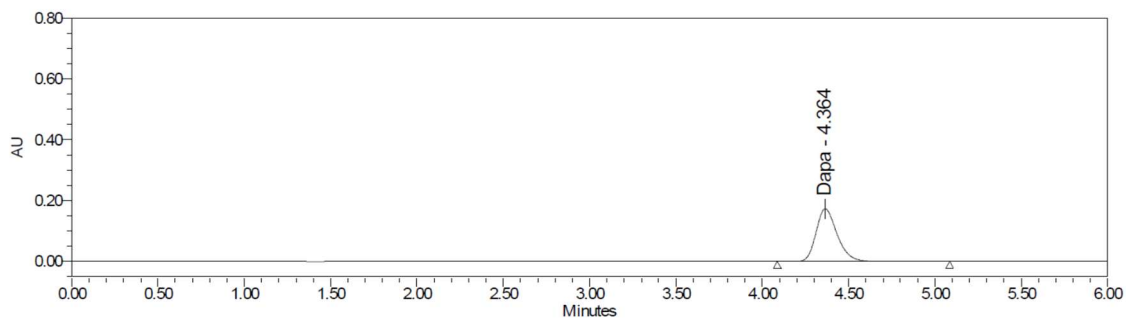
Os balanços de massa são inferiores a 10%.

Relativamente à pureza do pico do Ativo Y, o valor de *purity angle* é inferior ao de *purity threshold*, o que evidencia a pureza do pico no método de doseamento. O mesmo não acontece no método de compostos relacionados devido à elevada concentração do ativo, e que leva à saturação do pico cromatográfico. No entanto, o facto de no método de doseamento se obter pureza do pico e de o método dos compostos relacionados utilizado estar descrito na farmacopeia europeia, é possível afirmar que o pico do Ativo Y é puro.

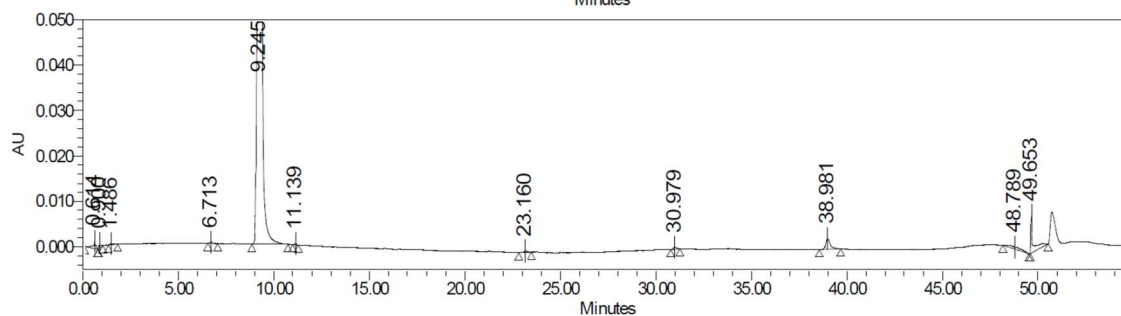
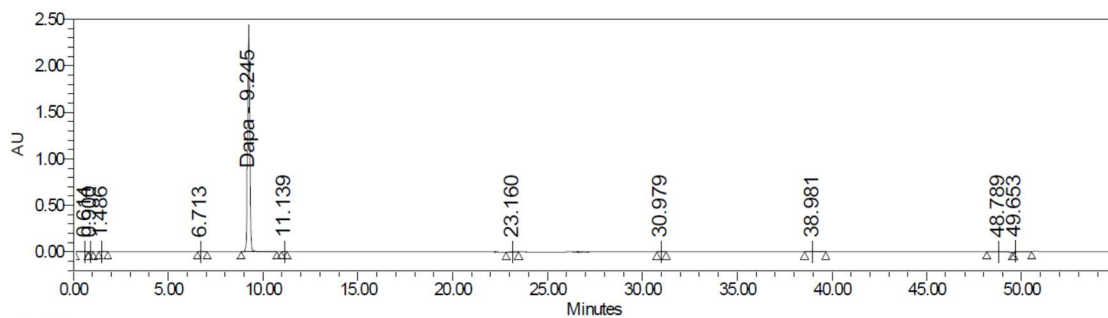
Com os resultados obtidos após a exposição a condições de humidade tão severas, é possível concluir que esta, também, não é uma via de degradação significativa para o ativo.

#### 4.5.3. Cromatogramas do Ativo X e do Ativo Y – Humidade

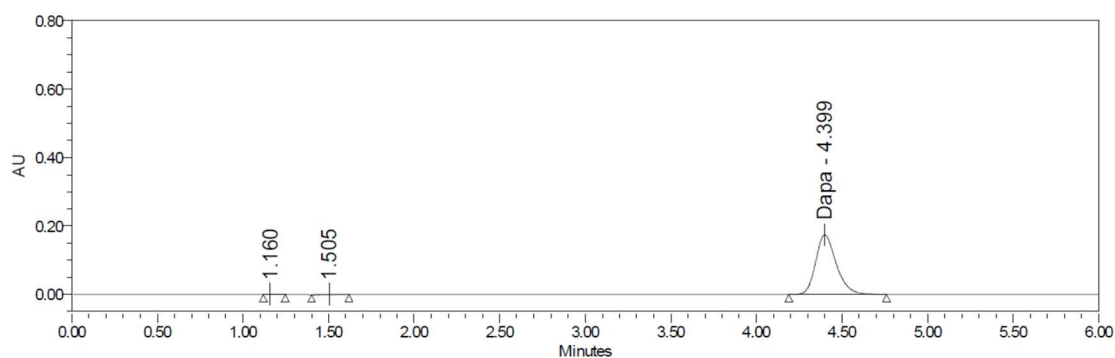
Nas figuras 4.38 a 4.41 estão representados os cromatogramas obtidos para o Ativo X no método de doseamento e compostos relacionados, respetivamente.



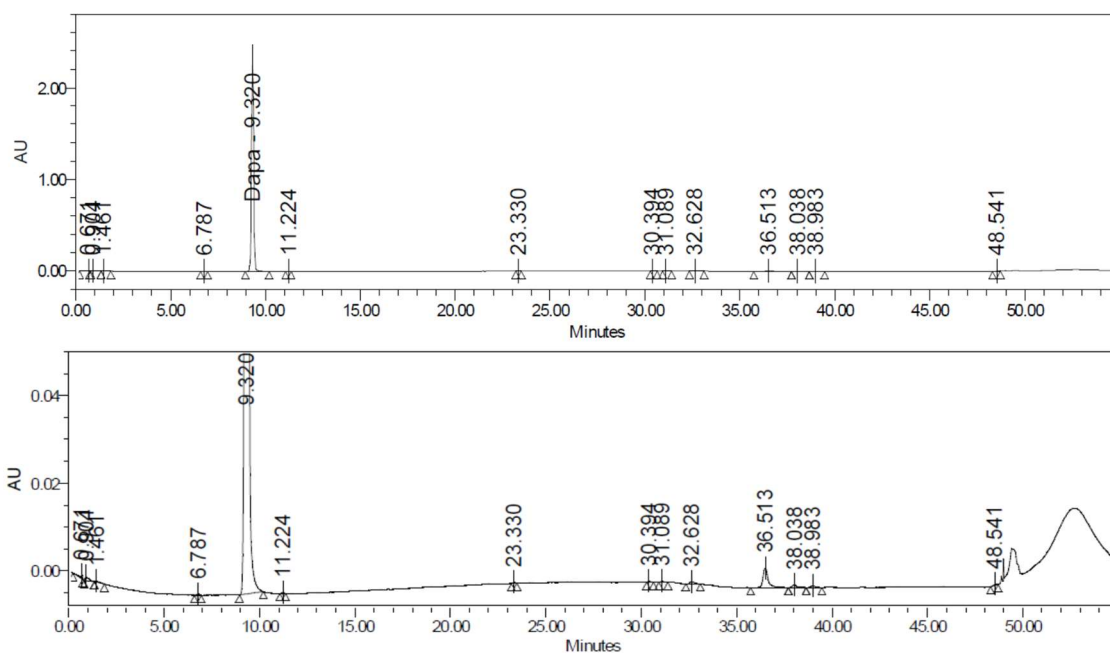
**Figura 4.38 Cromatograma do Ativo X - Doseamento – 85%HR, 7 dias**



**Figura 4.39 Cromatograma do Ativo X - Compostos relacionados – 85%HR, 7 dias**

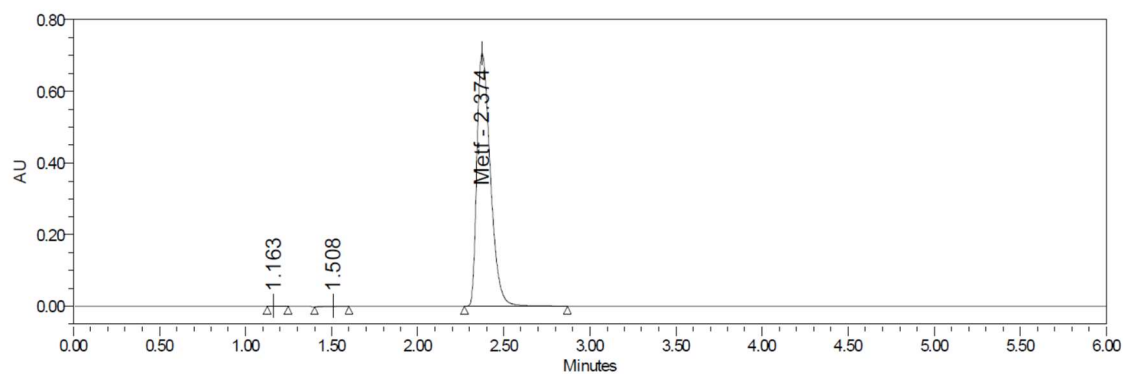


**Figura 4.40 Cromatograma do Ativo X - Doseamento – 85%HR, 14 dias**

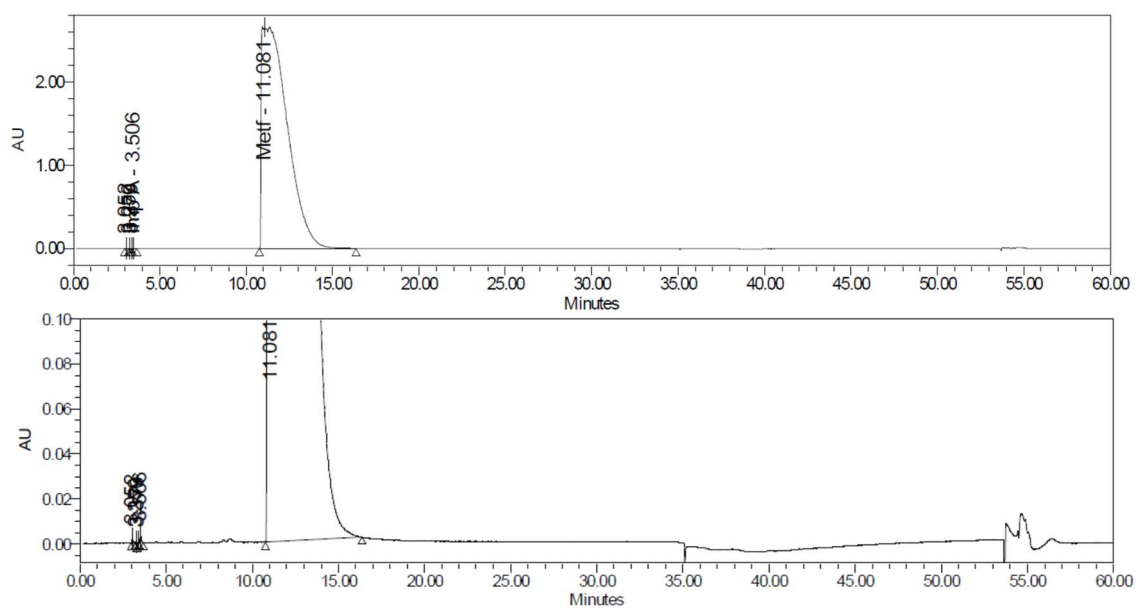


**Figura 4.41 Cromatograma do Ativo X - Compostos relacionados – 85%HR, 14 dias**

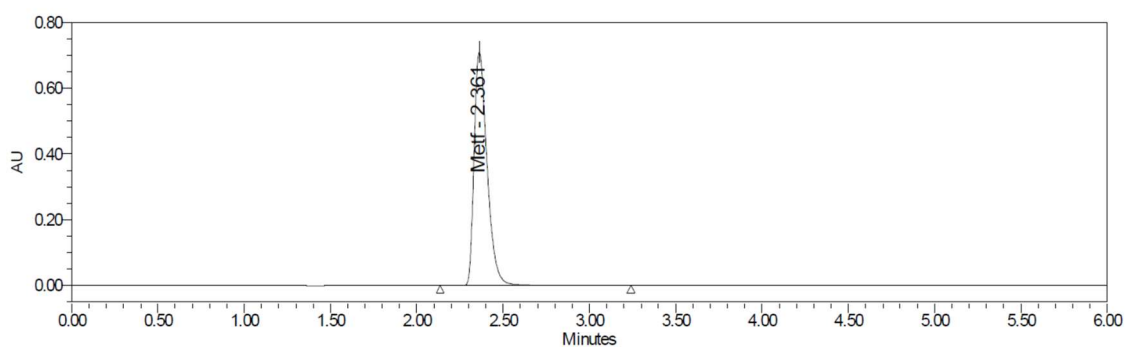
Nas figuras 4.42 a 4.47 estão representados os cromatogramas obtidos para o Ativo Y no método de doseamento, compostos relacionados e impureza F.



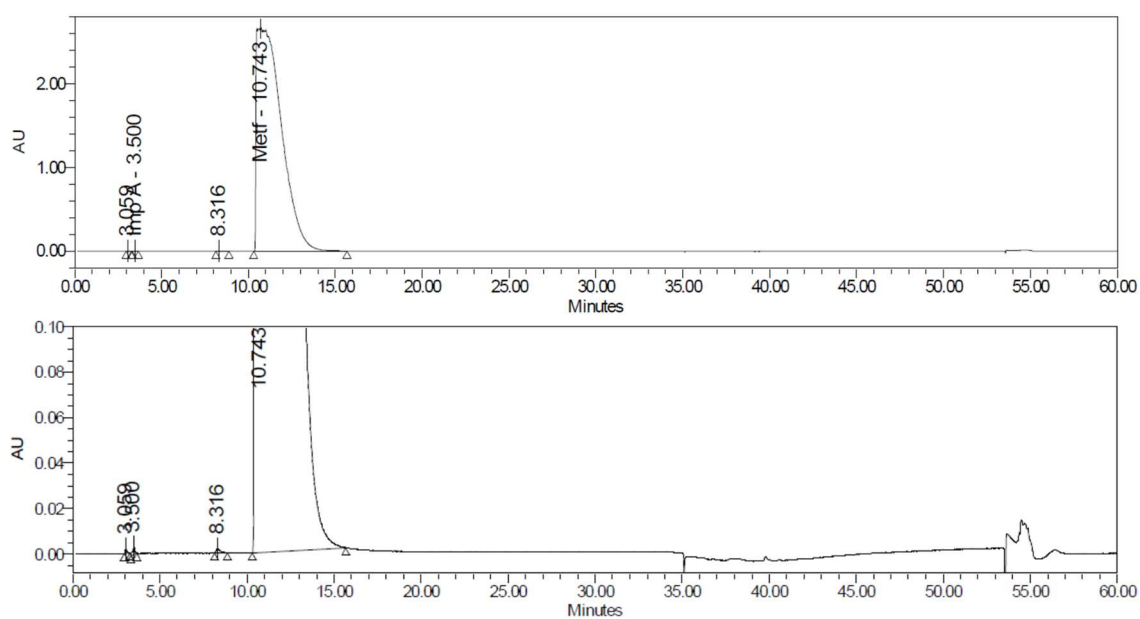
**Figura 4.42 Cromatograma do Ativo Y - Doseamento – 85%HR, 7 dias**



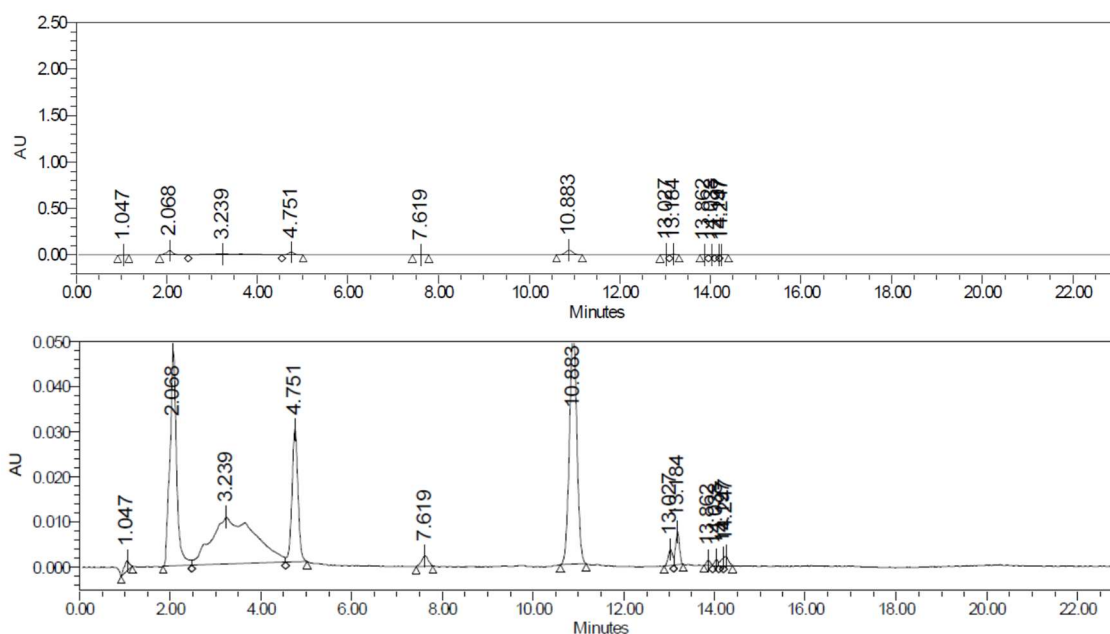
**Figura 4.43 Cromatograma do Ativo Y - Compostos relacionados – 85%HR, 7 dias**



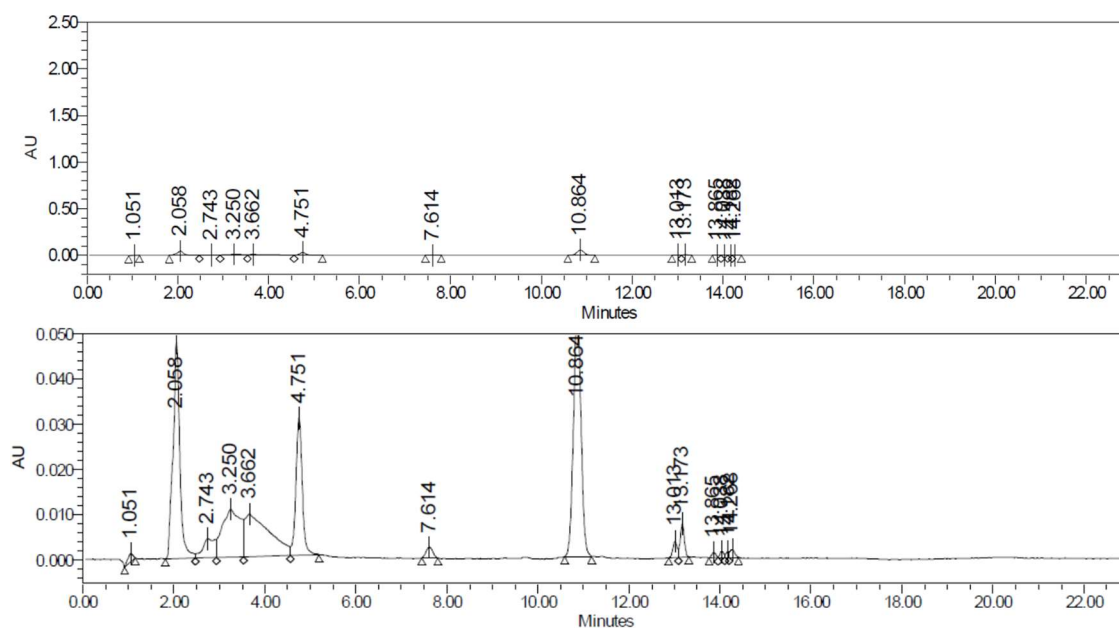
**Figura 4.44 Cromatograma do Ativo Y - Doseamento – 85%HR, 14 dias**



**Figura 4.45 Cromatograma do Ativo Y - Compostos relacionados – 85%HR, 14 dias**



**Figura 4.46 Cromatograma do Ativo Y - Impureza F do Ativo Y – 85%HR, 7 dias**

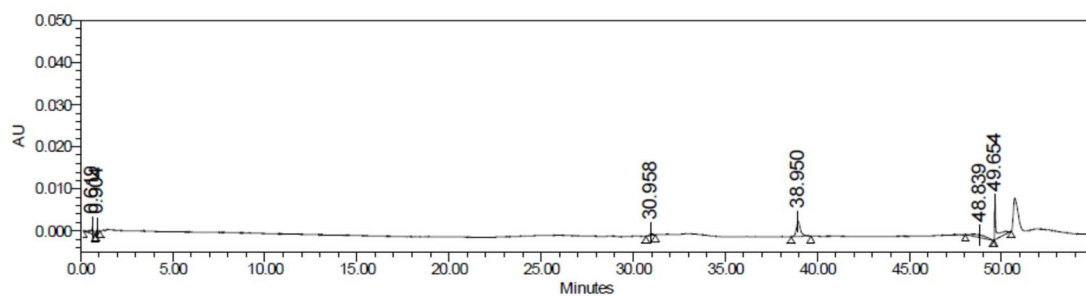


**Figura 4.47 Cromatograma do Ativo Y - Impureza F do Ativo Y– 85%HR, 14 dias**

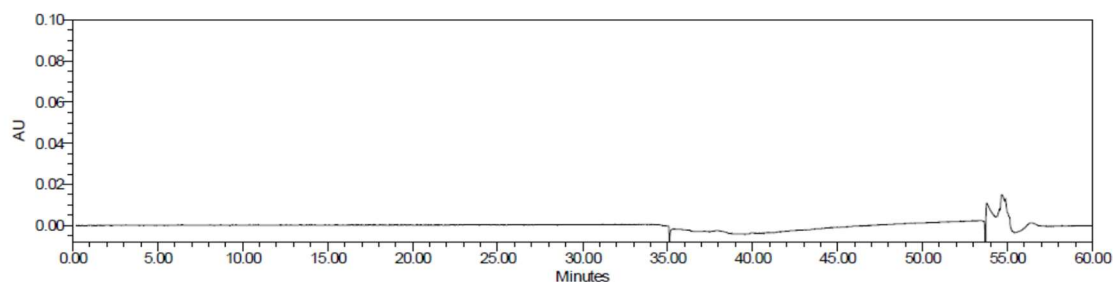
#### 4.5.4. Cromatogramas de diluente e soluções em branco – Humidade

Nas figuras 4.48 a 4.51 estão representados os cromatogramas dos diluentes e das soluções em branco. Estes foram comparados com os cromatogramas das substâncias ativas para que os picos referentes a diluentes e reagentes não fossem quantificados erradamente como impurezas de degradação.

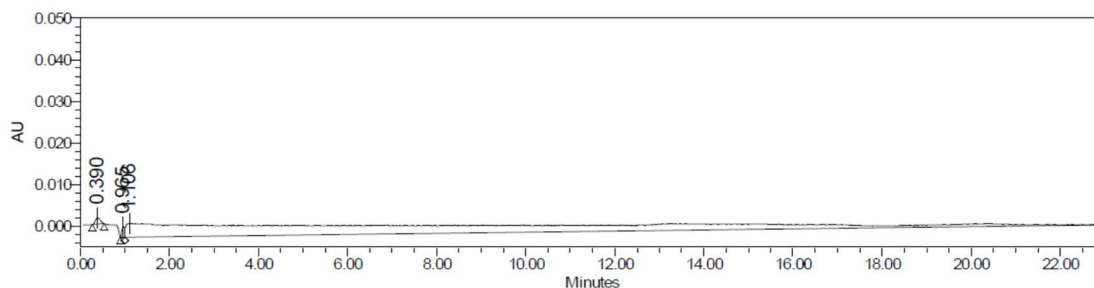




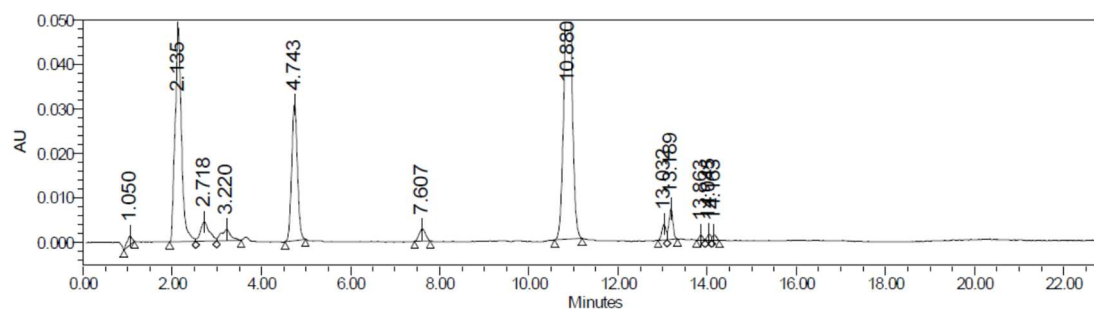
**Figura 4.48 Cromatograma de diluente - Compostos relacionados Ativo X**



**Figura 4.49 Cromatograma de diluente - Compostos relacionados Ativo Y**



**Figura 4.50 Cromatograma de diluente – Impureza F do Ativo Y**



**Figura 4.51 Cromatograma de solução em branco – Impureza F do Ativo Y**

#### 4.6. Hidrólise Básica

De modo a perceber os comportamentos dos dois ativos perante condições de hidrólise básica, estes foram expostos durante 7 e 14 dias a várias concentrações de hidróxido de sódio (NaOH). Após a exposição as amostras foram analisadas de acordo com os métodos de doseamento e compostos relacionados.

#### 4.6.1. Ativo X

Na tabela 4.15 estão representados os resultados obtidos após exposição do Ativo X a várias concentrações de hidróxido de sódio.

**Tabela 4.15 Resultados do Ativo X após exposição a hidrólise básica**

| Condição /<br>Duração | Doseamento  |                 |                     | Compostos Relacionados |              |             |                 |                     | Balanço<br>mássico<br>(%) |
|-----------------------|-------------|-----------------|---------------------|------------------------|--------------|-------------|-----------------|---------------------|---------------------------|
|                       | Teor<br>(%) | Purity<br>angle | Purity<br>threshold | TRR                    | Impurezas    | Teor<br>(%) | Purity<br>angle | Purity<br>threshold |                           |
| NaOH 1N<br>7 dias     | 98,74       | 0,092           | 0,263               | 0,33                   | Desconhecida | <b>0,09</b> | 1,27            | 3,32                | 1,1                       |
| NaOH 1N<br>14 dias    | 102,0       | 0,087           | 0,267               | ---                    | ---          | ---         | 1,30            | 3,24                | 2,1                       |
| NaOH 2N<br>7 dias     | 81,90       | 0,115           | 0,294               | ---                    | ---          | ---         | 0,50            | 1,94                | 18                        |
| NaOH 2N<br>14 dias    | 87,23       | 0,107           | 0,289               | ---                    | ---          | ---         | 0,628           | 2,07                | 13                        |
| NaOH 3N<br>7 dias     | 48,20       | 0,158           | 0,354               | ---                    | ---          | ---         | 0,353           | 1,10                | 52                        |
| NaOH 3N<br>14 dias    | 47,70       | 0,140           | 0,323               | ---                    | ---          | ---         | 0,629           | 1,02                | 52                        |

O Ativo X foi exposto a condições de hidrólise básica durante 7 e 14 dias. Pelos resultados obtidos, é possível verificar que houve uma diminuição do teor de ativo no método de doseamento, à medida que aumentava a concentração de hidróxido de sódio (NaOH). No entanto, apenas se detetou a presença de uma impureza desconhecida com um tempo de retenção relativo de 0,33 e um teor de 0,09%, na exposição ao hidróxido de sódio 1N durante 7 dias.

O tempo de exposição não parece ter influência na degradação, uma vez que para cada concentração, entre os 7 e 14 dias, não existiram grandes diferenças nos resultados.

Relativamente à pureza do pico do ativo, temos que o valor de *purity angle* é inferior ao de *purity threshold*, o que evidencia essa pureza.

Os balanços de massa apenas são inferiores a 10% para a concentração de NaOH mais baixa e com o aumento dessa concentração as degradações chegam a ultrapassar os 30%, valor máximo para este tipo de estudo.

Após verificação dos resultados, não é possível afirmar que o Ativo X é, efetivamente, suscetível a condições de hidrólise alcalina devido à ausência de impurezas de degradação. Isto é, apesar de haver um decréscimo significativo do teor de ativo, não significa que haja degradação, o ativo pode ter apenas precipitado impossibilitando a sua correta quantificação. Por outro lado, pode ter ocorrido degradação, mas as volatilidades dos compostos formados levaram a que se perdessem. Existe ainda, a possibilidade de a degradação ter sido tão agressiva que levou à destruição do grupo cromóforo, e consequente formação de produtos secundários que nada têm a ver com o ativo, impossibilitando a sua deteção ao comprimento de onda utilizado no método [11].

#### 4.6.2. Ativo Y

Na tabela 4.16 estão representados os resultados obtidos após exposição do Ativo Y a várias concentrações de hidróxido de sódio.

O Ativo Y foi exposto a condições de hidrólise básica durante 7 e 14 dias. Pelos resultados obtidos, é possível verificar a sua elevada suscetibilidade a estas condições com os baixos teores de ativo obtidos no método de doseamento. À medida que aumenta a concentração de hidróxido de sódio (NaOH), o teor de ativo vai diminuindo e, ao contrário do que acontece no Ativo X, o tempo de exposição tem influência na degradação.

As principais impurezas encontradas são impurezas desconhecidas, no entanto, também, foi detetada a Impureza A com um tempo de retenção relativo a oscilar entre 0,27 e 0,30, consoante a condição, e um teor na ordem dos 0,2%.

Relativamente à pureza do pico do Ativo Y, o valor de *purity angle* é inferior ao de *purity threshold*, o que evidencia a pureza do pico no método de doseamento. O mesmo não acontece no método de compostos relacionados devido à elevada concentração do ativo, e que leva à saturação do pico cromatográfico. No entanto, o facto de no método de doseamento se obter pureza do pico e de o método dos compostos relacionados utilizado estar descrito na farmacopeia europeia, é possível afirmar que o pico do Ativo Y é puro.

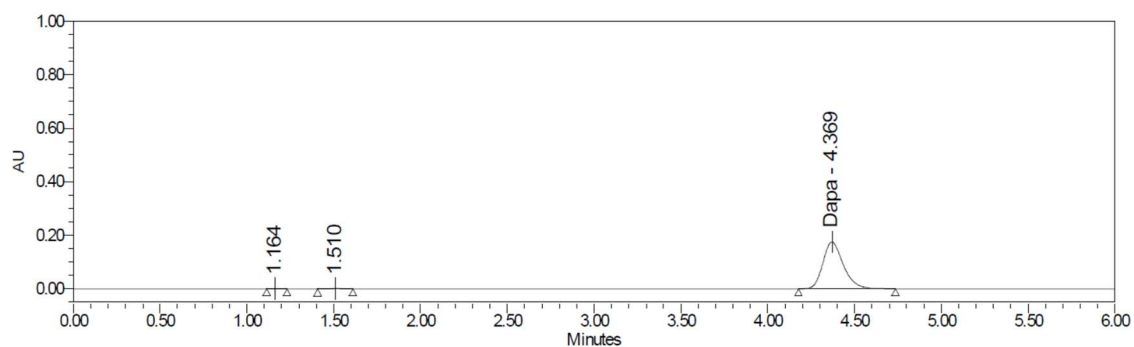
Os balanços de massa não são inferiores a 10% e as degradações obtidas superiores a 30%, superando os valores máximos para estes estudos. Estes resultados indicam que o Ativo Y poderá ser sensível a condições de hidrólise básica, no entanto não foi possível quantificar a totalidade das impurezas formadas, talvez, devido à sua volatilidade, ou à possibilidade de a degradação ter sido tão agressiva que levou à destruição do grupo cromóforo, e consequente formação de produtos secundários que nada têm a ver com o Ativo Y, impossibilitando a sua deteção ao comprimento de onda utilizado no método [11]. É de notar que, nestas amostras, não foi quantificada a Impureza F, mas pelos resultados apresentados em seguida para o Ativo Y, é possível verificar que esta é a principal impureza que se forma em condições de hidrólise alcalina.

Tabela 4.16 Resultados do Ativo Y após exposição a hidrólise básica

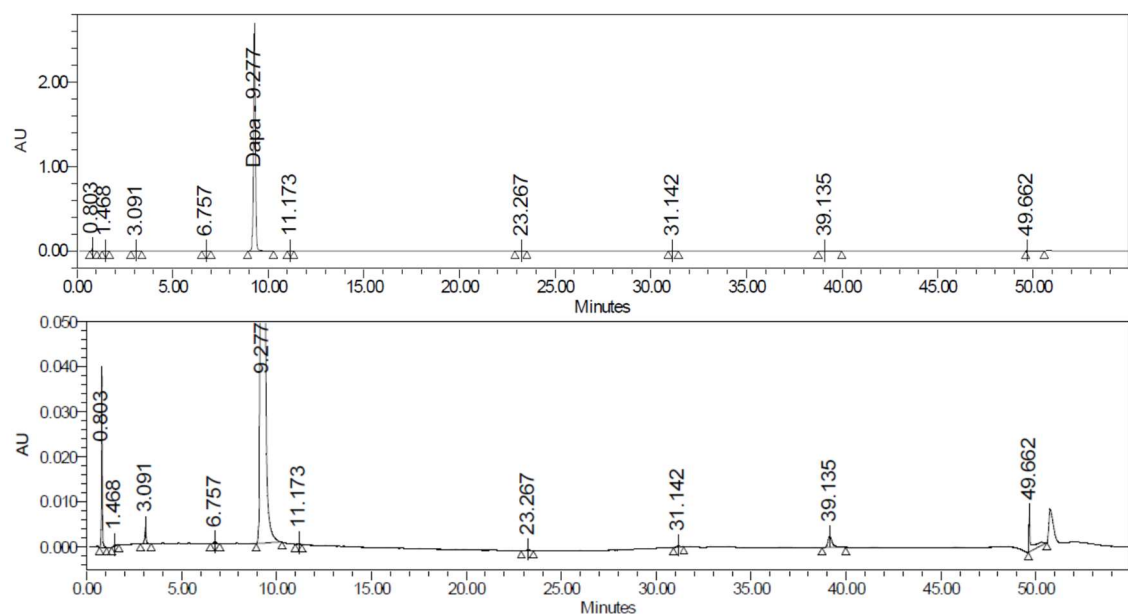
| Condição /<br>Duração | Doseamento  |                 |                     | Compostos Relacionados                                              |                                                                                                                                             |                                                                                     |                 |                     | Balanço<br>mássico<br>(%) |
|-----------------------|-------------|-----------------|---------------------|---------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|---------------------|---------------------------|
|                       | Teor<br>(%) | Purity<br>angle | Purity<br>threshold | TRR                                                                 | Impurezas                                                                                                                                   | Teor<br>(%)                                                                         | Purity<br>angle | Purity<br>threshold |                           |
| NaOH 1N<br>7 dias     | 26,02       | 0,311           | 0,253               | 0,30<br>0,39<br>0,51<br>0,71<br>---                                 | Impureza A<br>Desconhecida<br>Desconhecida<br>Desconhecida<br><b>Total:</b>                                                                 | 0,166<br>0,609<br>0,410<br>0,031<br><b>1,22</b>                                     | 0,973           | 1,196               | 73                        |
| NaOH 1N<br>14 dias    | 7,75        | 0,715           | 0,308               | 0,29<br>0,37<br>0,49<br>0,68<br>0,95<br>1,14<br>---                 | Impureza A<br>Desconhecida<br>Desconhecida<br>Desconhecida<br>Desconhecida<br>Desconhecida<br><b>Total:</b>                                 | 0,173<br>0,714<br>0,490<br>0,033<br>0,131<br>0,067<br><b>1,61</b>                   | 0,251           | 0,271               | 91                        |
| NaOH 2N<br>7 dias     | 13,89       | 0,527           | 0,278               | 0,26<br>0,27<br>0,37<br>0,49<br>0,69<br>0,95<br>---                 | Desconhecida<br>Impureza A<br>Desconhecida<br>Desconhecida<br>Desconhecida<br>Desconhecida<br><b>Total:</b>                                 | 0,019<br>0,204<br>0,724<br>0,355<br>0,031<br>0,130<br><b>1,46</b>                   | 0,739           | 0,348               | 85                        |
| NaOH 2N<br>14 dias    | 2,21        | 1,57            | 0,70                | 0,28<br>0,37<br>0,49<br>0,68<br>0,95<br>1,14<br>---                 | Impureza A<br>Desconhecida<br>Desconhecida<br>Desconhecida<br>Desconhecida<br>Desconhecida<br><b>Total:</b>                                 | 0,169<br>0,763<br>0,388<br>0,030<br>0,175<br>0,057<br><b>1,58</b>                   | 0,648           | 0,265               | 96                        |
| NaOH 3N<br>7 dias     | 9,87        | 0,666           | 0,297               | 0,25<br>0,27<br>0,28<br>0,37<br>0,49<br>0,68<br>0,95<br>---         | Desconhecida<br>Desconhecida<br>Impureza A<br>Desconhecida<br>Desconhecida<br>Desconhecida<br>Desconhecida<br><b>Total:</b>                 | 0,022<br>0,018<br>0,234<br>0,760<br>0,310<br>0,031<br>0,165<br><b>1,54</b>          | 0,703           | 0,280               | 89                        |
| NaOH 3N<br>14 dias    | 1,16        | 2,34            | 1,03                | 0,25<br>0,26<br>0,27<br>0,35<br>0,47<br>0,65<br>0,91<br>1,13<br>--- | Desconhecida<br>Desconhecida<br>Impureza A<br>Desconhecida<br>Desconhecida<br>Desconhecida<br>Desconhecida<br>Desconhecida<br><b>Total:</b> | 0,024<br>0,031<br>0,179<br>0,751<br>0,324<br>0,028<br>0,190<br>0,038<br><b>1,57</b> | 1,34            | 0,310               | 97                        |

4.6.3. Cromatogramas do Ativo X e do Ativo Y – Hidrólise Básica

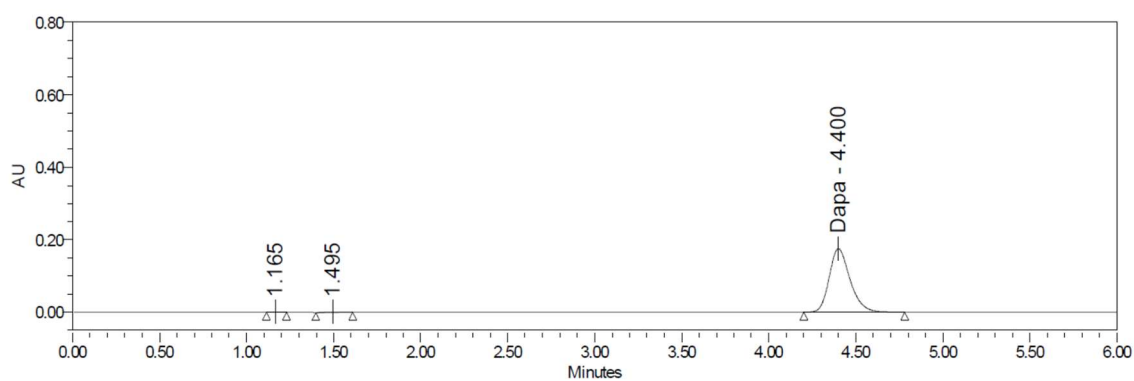
Nas figuras 4.52 a 4.63 estão representados os cromatogramas obtidos para o Ativo X no método de doseamento e compostos relacionados.



**Figura 4.52 Cromatograma do Ativo X - Doseamento – NaOH 1N, 7 dias**



**Figura 4.53 Cromatograma do Ativo X - Compostos relacionados – NaOH 1N, 7 dias**



**Figura 4.54 Cromatograma do Ativo X - Doseamento – NaOH 1N, 14 dias**

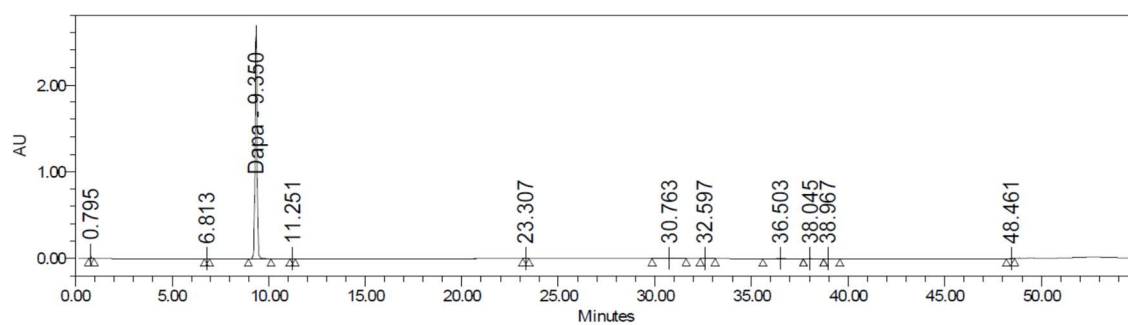


Figura 4.55 Cromatograma do Ativo X - Compostos relacionados – NaOH1N, 14 dias

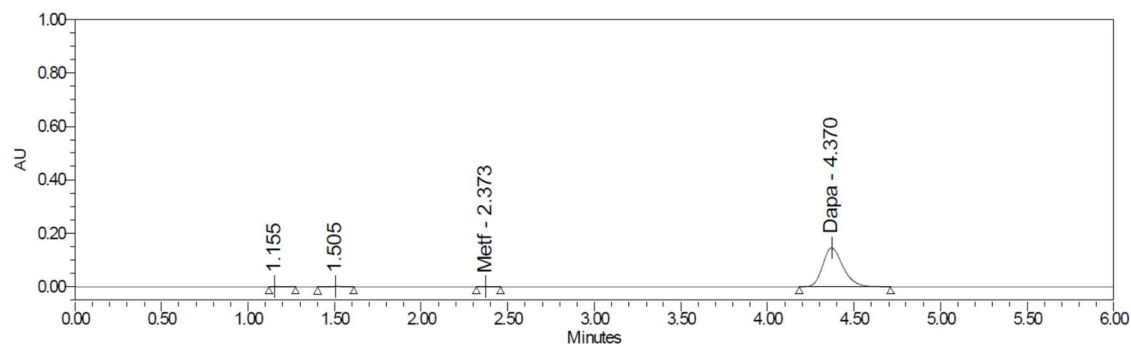
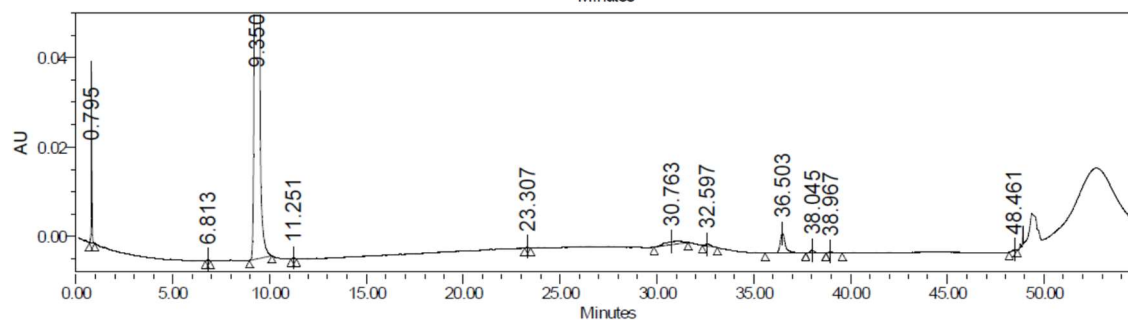


Figura 4.56 Cromatograma do Ativo X - Doseamento – NaOH 2N, 7 dias

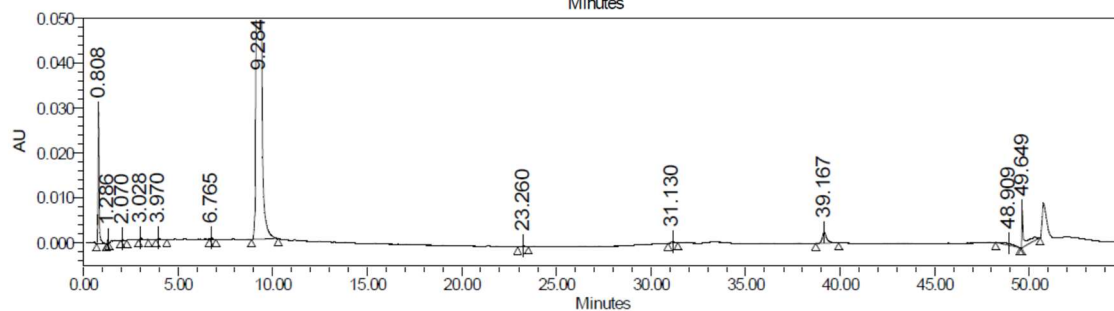
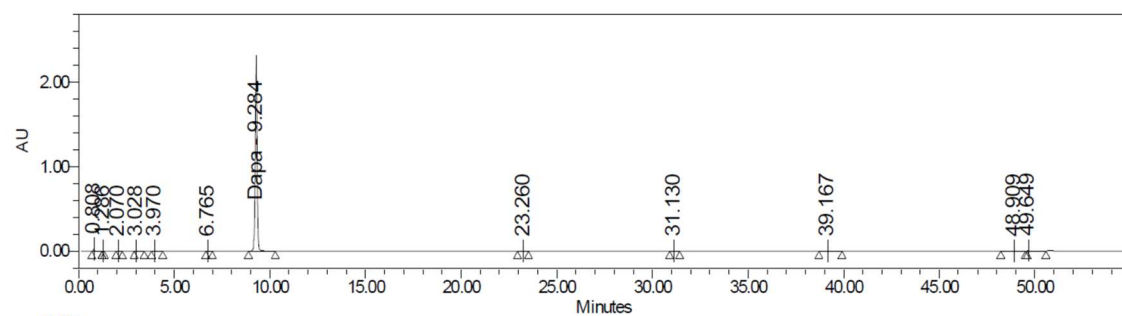
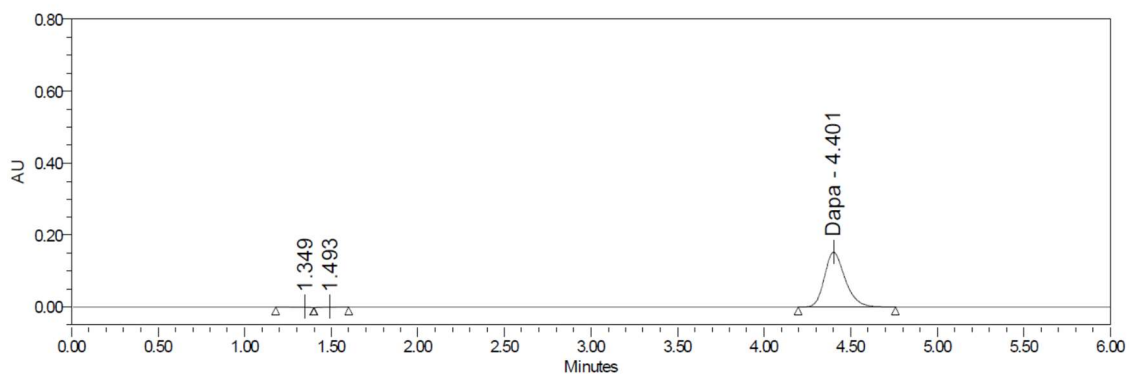
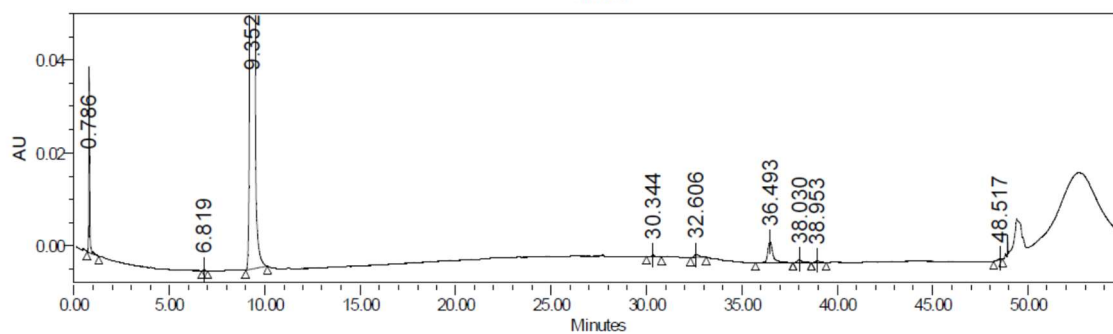
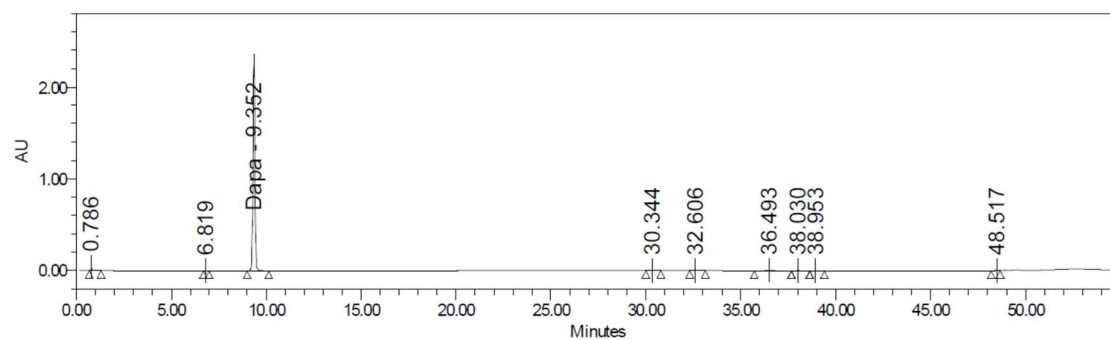


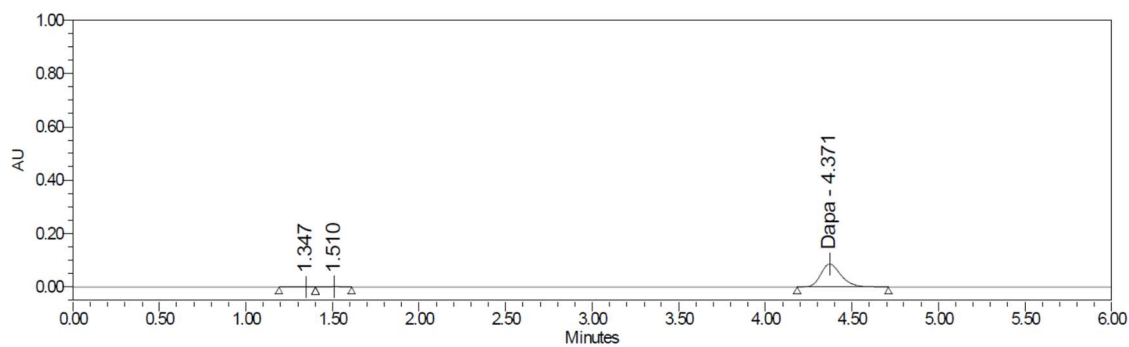
Figura 4.57 Cromatograma do Ativo X - Compostos relacionados – NaOH 2N, 7 dias



**Figura 4.58 Cromatograma do Ativo X - Doseamento – NaOH 2N, 14 dias**



**Figura 4.59 Cromatograma do Ativo X - Compostos relacionados – NaOH 2N, 14 dias**



**Figura 4.60 Cromatograma do Ativo X - Doseamento – NaOH 3N, 7 dias**

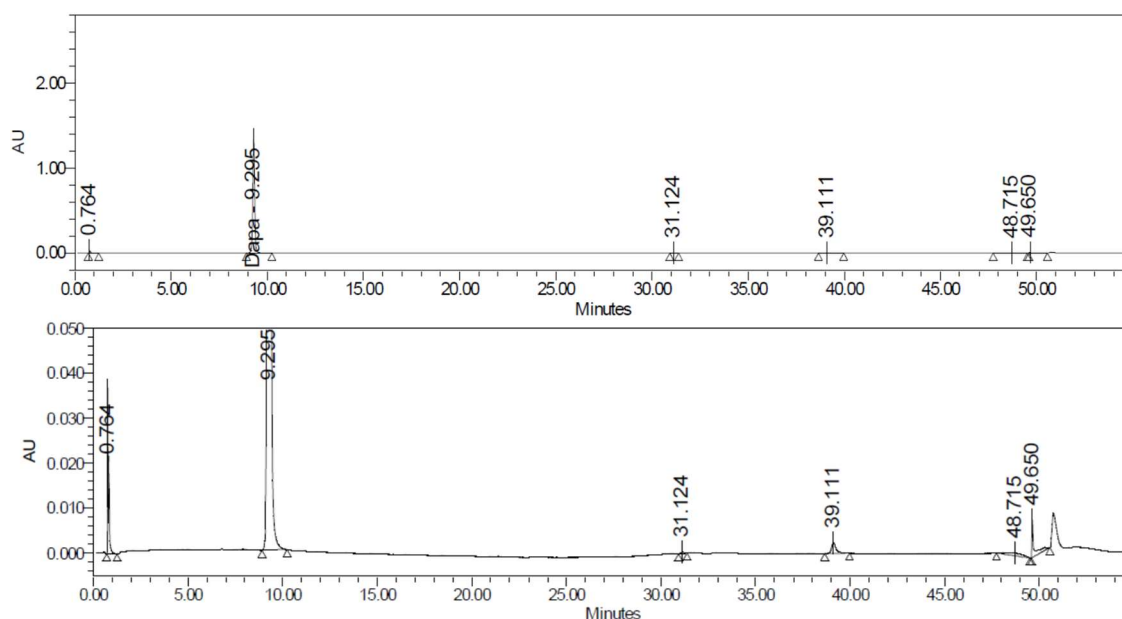


Figura 4.61 Cromatograma do Ativo X - Compostos relacionados – NaOH 3N, 7 dias

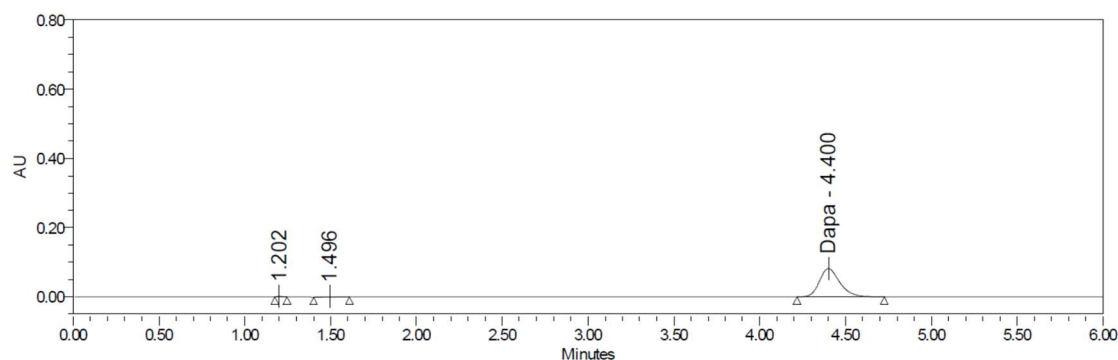


Figura 4.62 Cromatograma do Ativo X - Doseamento – NaOH 3N, 14 dias

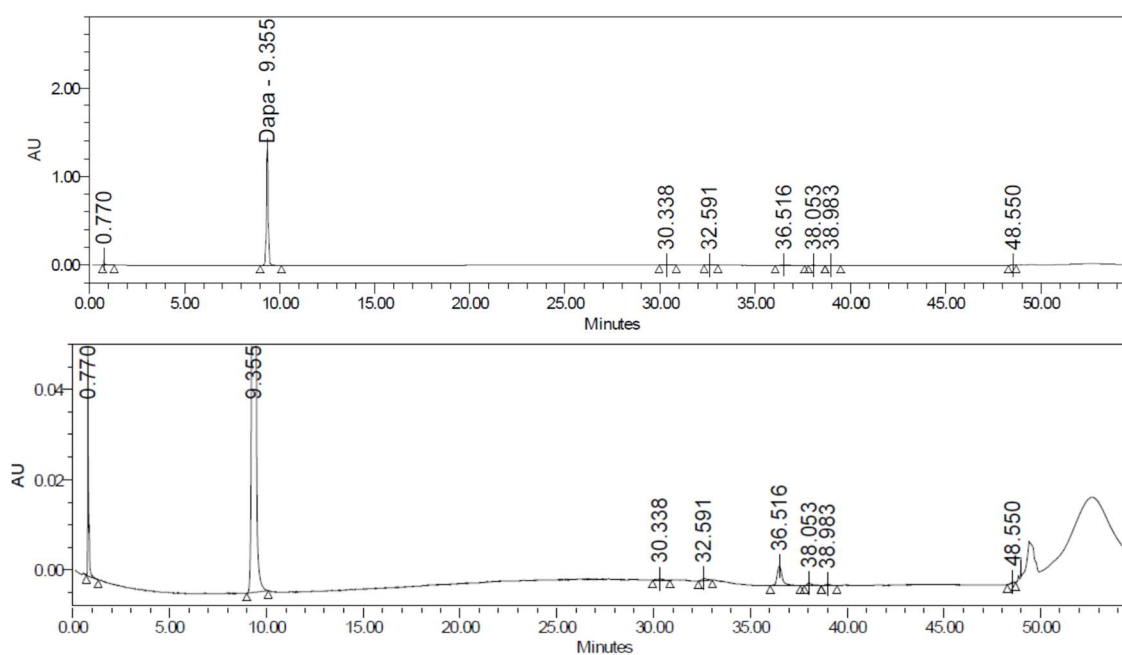
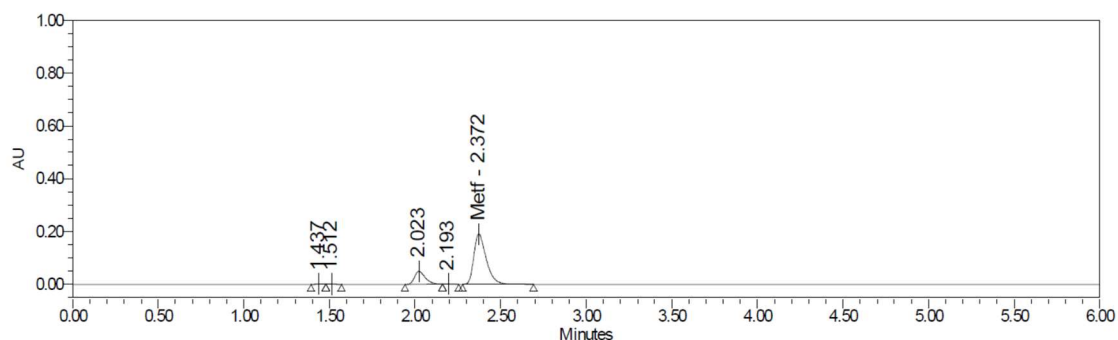


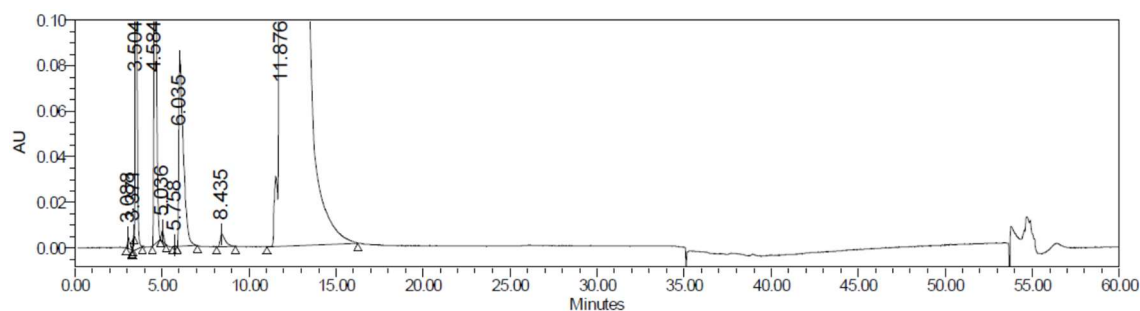
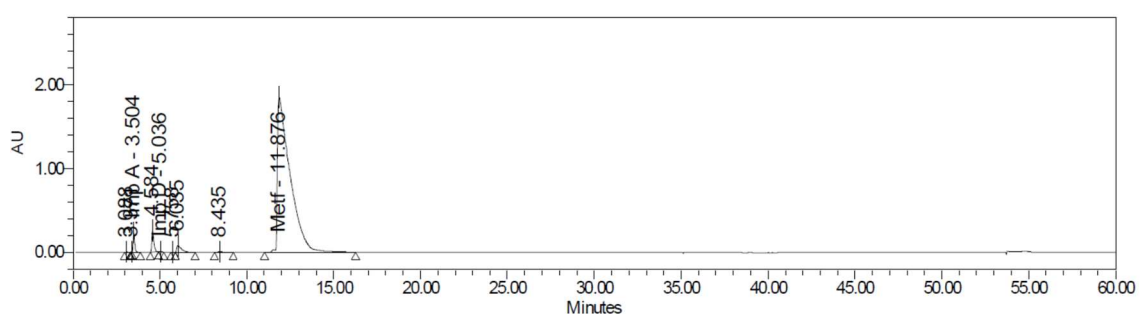
Figura 4.63 Cromatograma do Ativo X - Compostos relacionados – NaOH 3N, 14 dias



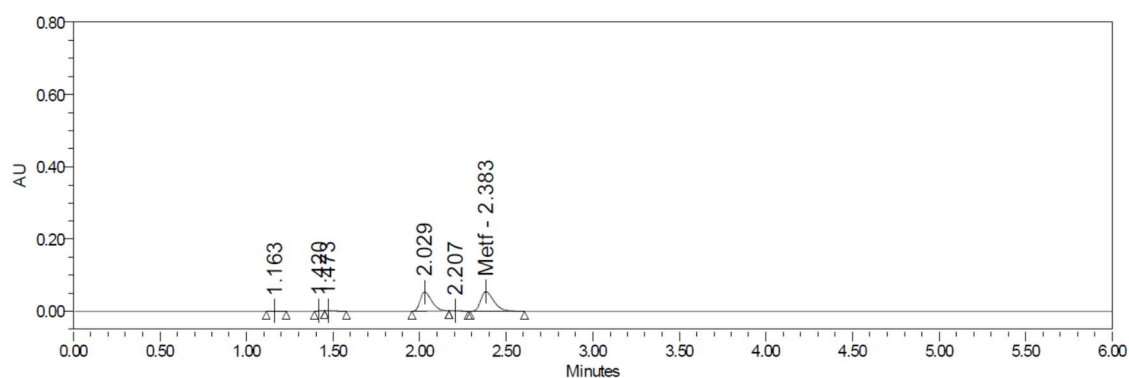
Nas figuras 4.64 a 4.75 estão representados os cromatogramas obtidos para o Ativo Y no método de doseamento e compostos relacionados.



**Figura 4.64 Cromatograma do Ativo Y - Doseamento – NaOH 1N, 7 dias**



**Figura 4.65 Cromatograma do Ativo Y - Compostos relacionados – NaOH 1N, 7 dias**



**Figura 4.66 Cromatograma do Ativo Y - Doseamento – NaOH 1N, 14 dias**

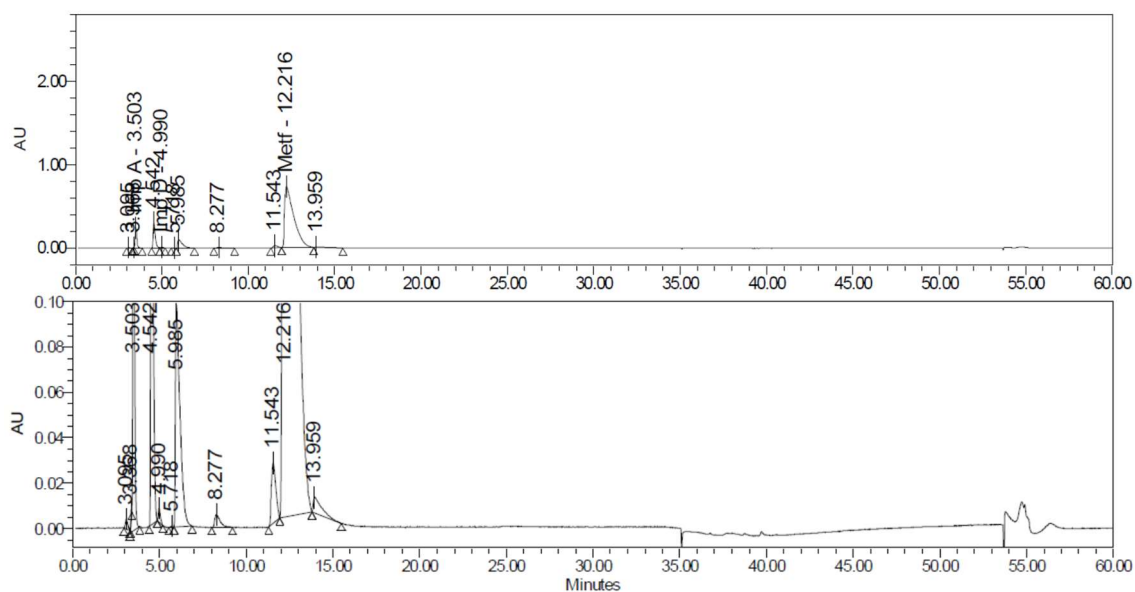


Figura 4.67 Cromatograma do Ativo Y - Compostos relacionados – NaOH 1N, 14 dias

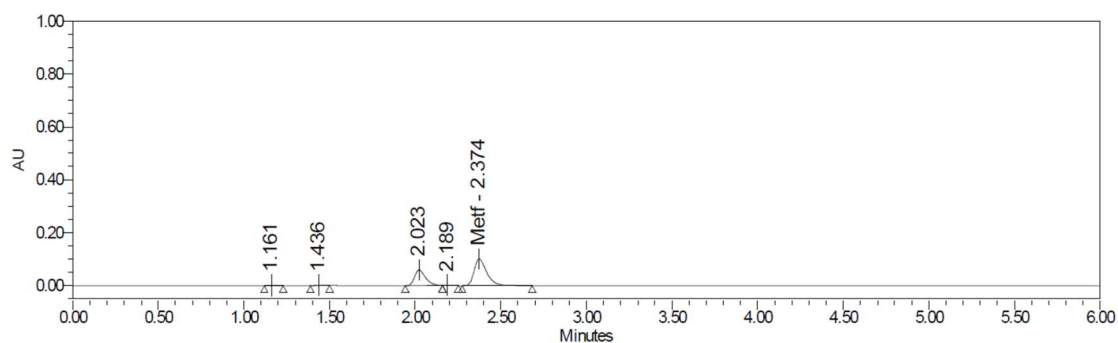


Figura 4.68 Cromatograma do Ativo Y - Doseamento – NaOH 2N, 7 dias

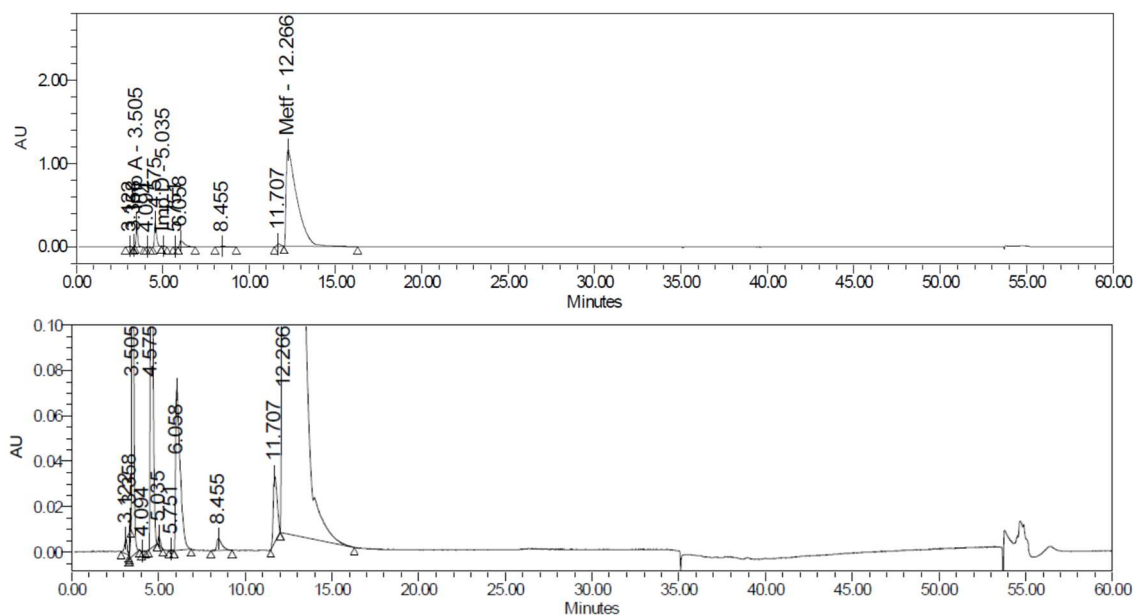
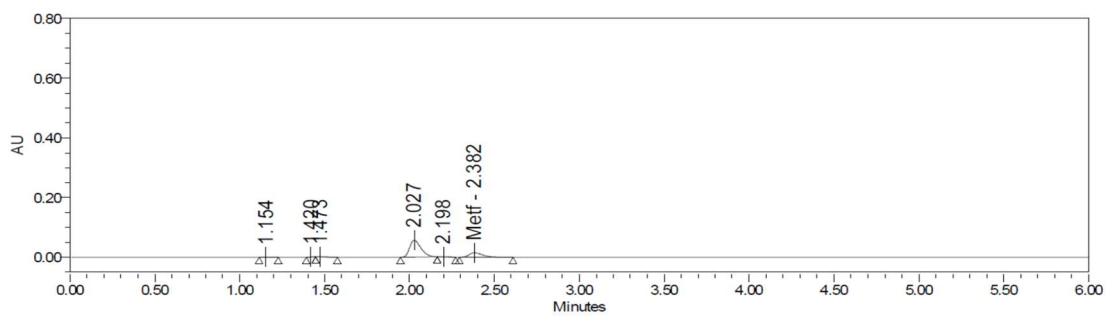
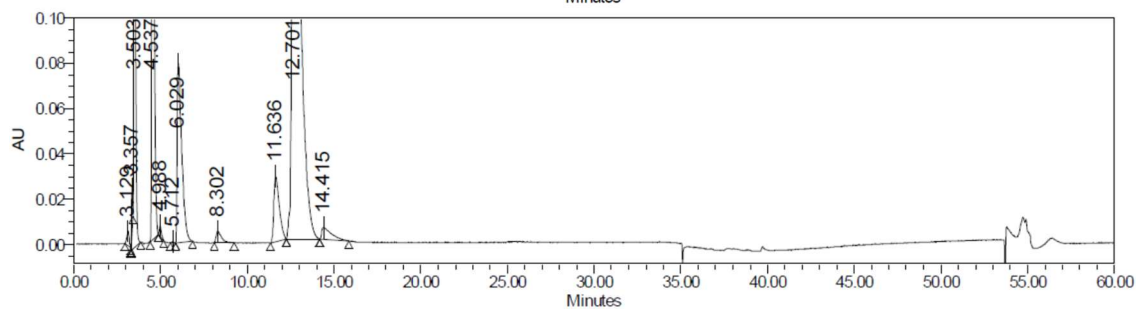
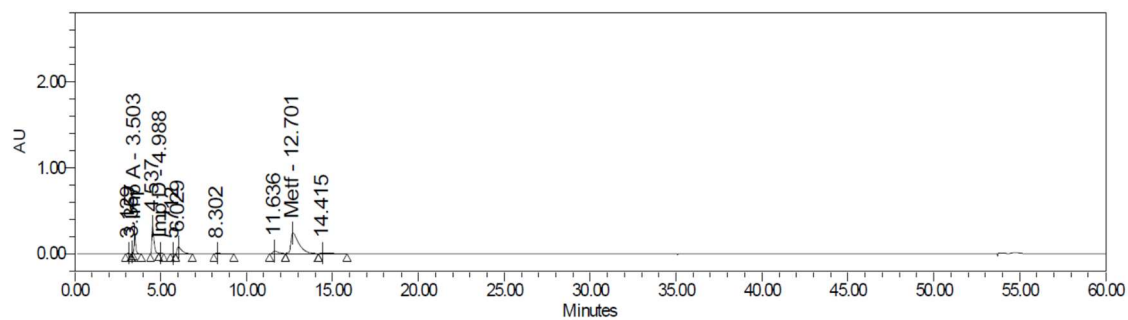


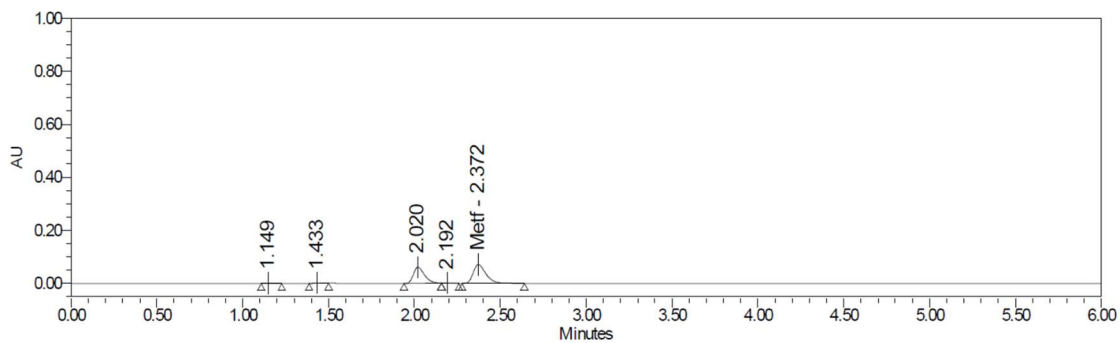
Figura 4.69 Cromatograma do Ativo Y - Compostos relacionados – NaOH 2N, 7 dias



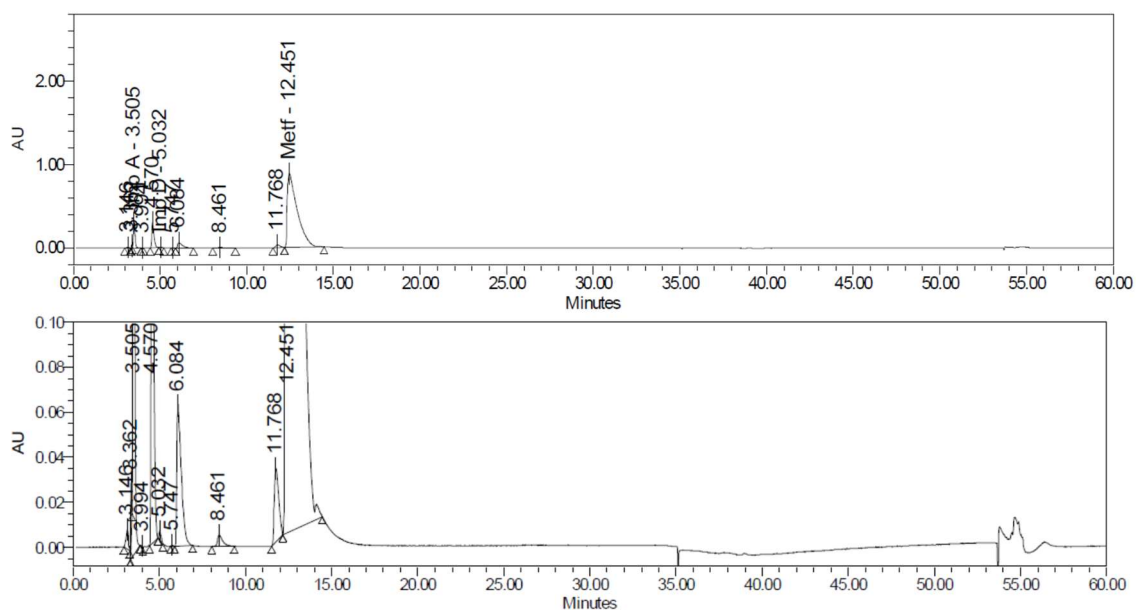
**Figura 4.70 Cromatograma do Ativo Y - Doseamento – NaOH 2N, 14 dias**



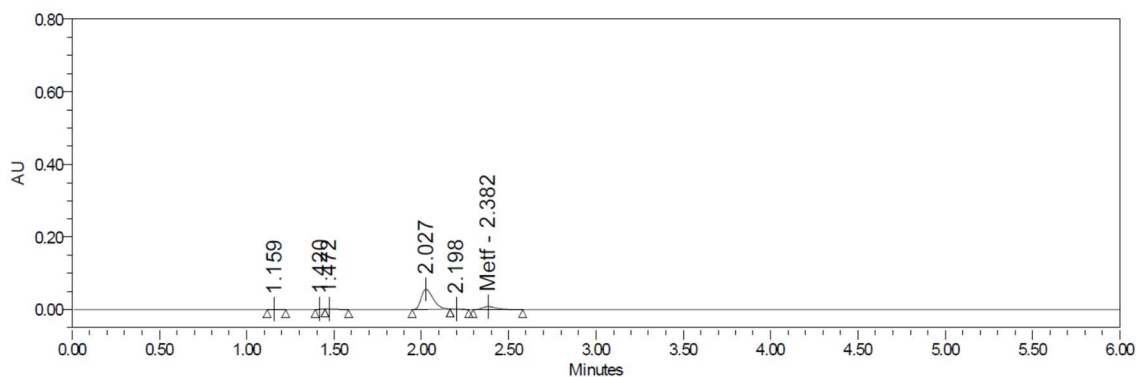
**Figura 4.71 Cromatograma do Ativo Y - Compostos relacionados – NaOH 2N, 14 dias**



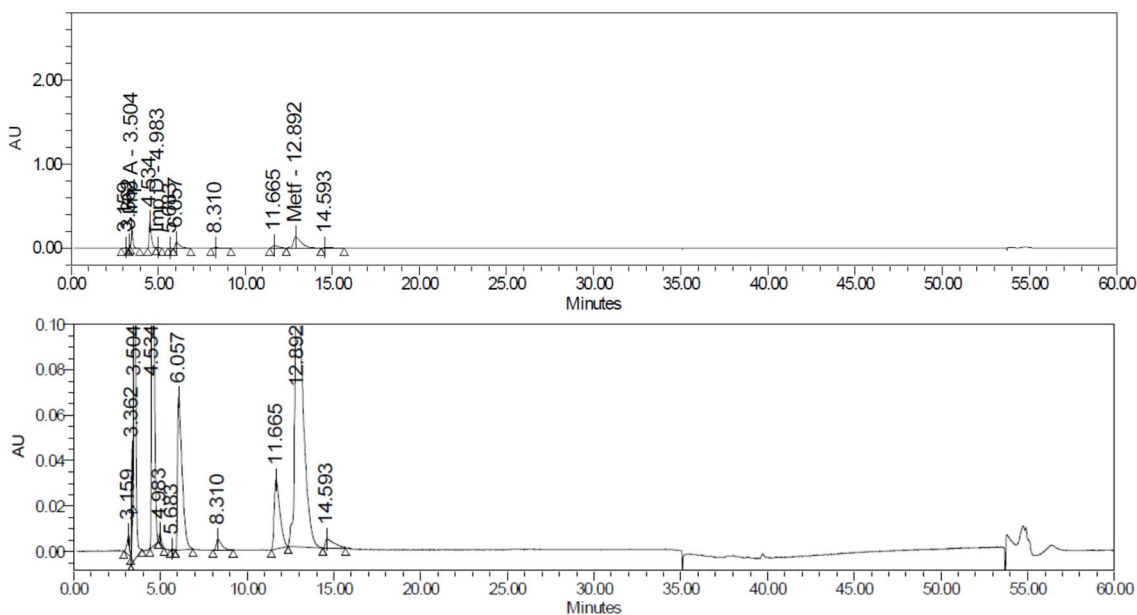
**Figura 4.72 Cromatograma do Ativo Y - Doseamento – NaOH 3N, 7 dias**



**Figura 4.73 Cromatograma do Ativo Y - Compostos relacionados – NaOH 3N, 7 dias**



**Figura 4.74 Cromatograma do Ativo Y - Doseamento – NaOH 3N, 14 dias**



**Figura 4.75 Cromatograma do Ativo Y - Compostos relacionados – NaOH 3N, 14 dias**

#### 4.6.4. Cromatogramas de diluentes e soluções em branco – Hidrólise Básica

Nas figuras 4.76 a 4.83 estão representados os cromatogramas dos diluentes e das soluções em branco. Estes foram comparados com os cromatogramas das substâncias ativas para que os picos referentes a diluentes e reagentes não fossem quantificados erradamente como impurezas de degradação.

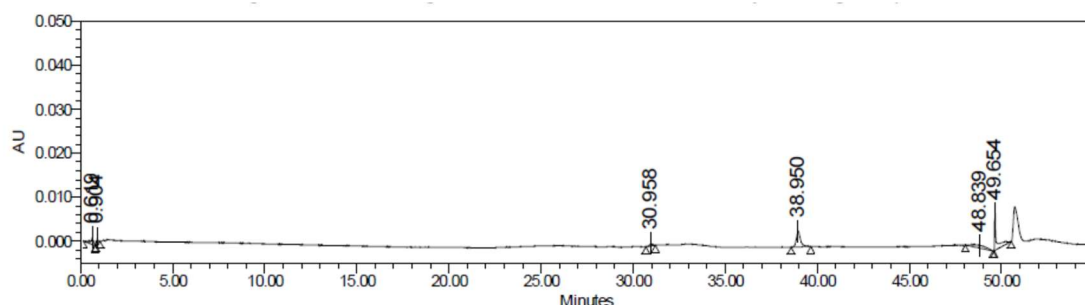


Figura 4.76 Cromatograma de diluente - Compostos relacionados Ativo X

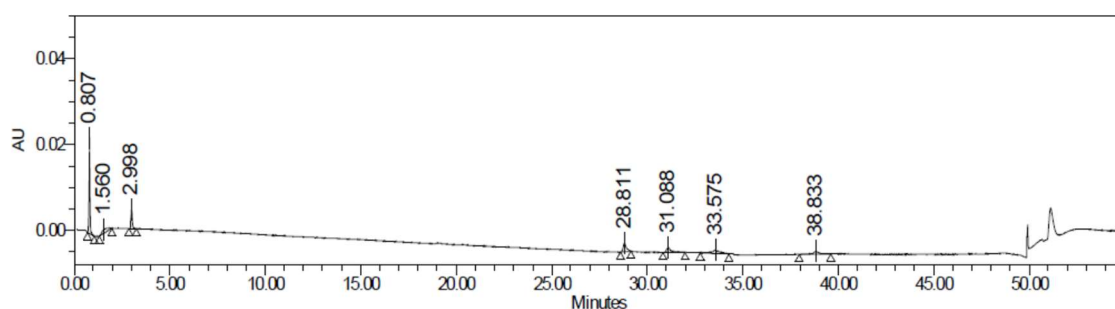


Figura 4.77 Cromatograma de branco - NaOH 1N - Compostos relacionados Ativo X

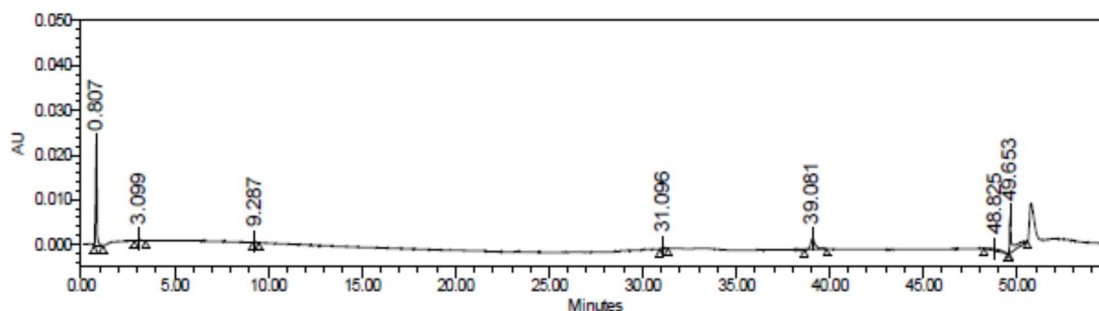


Figura 4.78 Cromatograma de branco - NaOH 2N - Compostos relacionados Ativo X

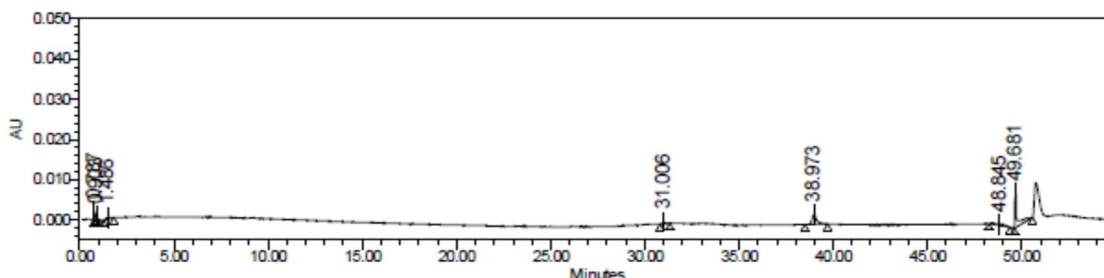
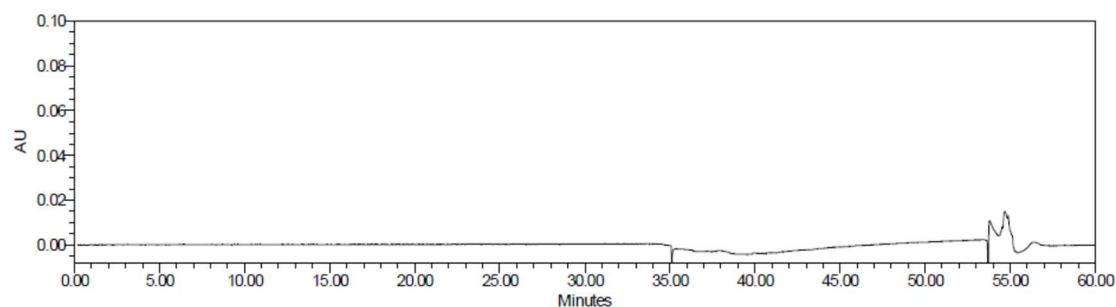
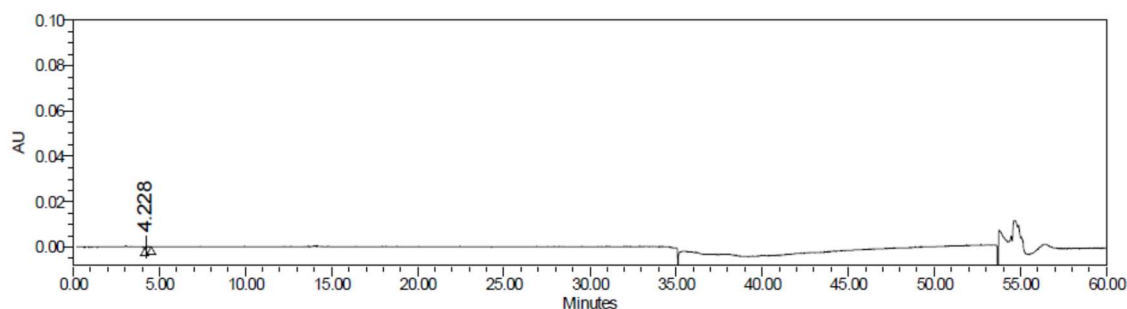


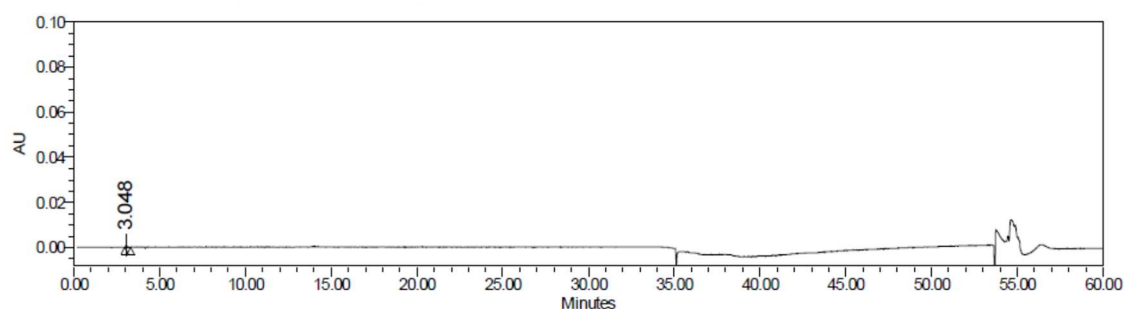
Figura 4.79 Cromatograma de branco - NaOH 3N - Compostos relacionados Ativo X



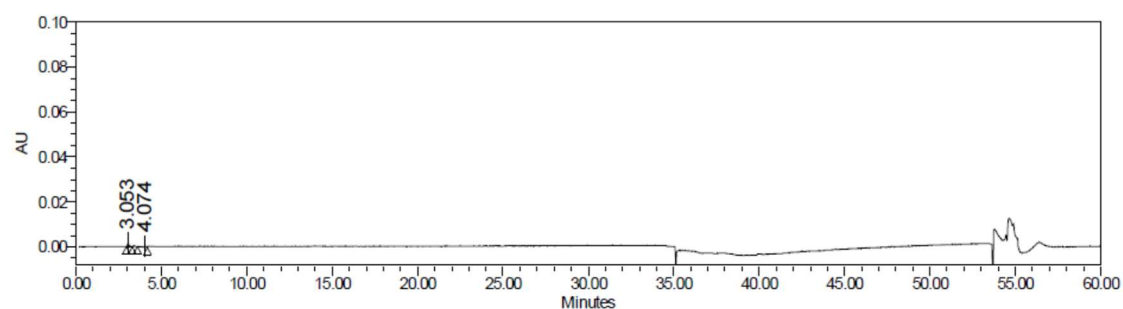
**Figura 4.80 Cromatograma de diluente - Compostos relacionados Ativo Y**



**Figura 4.81 Cromatograma de branco - NaOH 1N - Compostos relacionados Ativo Y**



**Figura 4.82 Cromatograma de branco - NaOH 2N - Compostos relacionados Ativo Y**



**Figura 4.83 Cromatograma de branco - NaOH 3N - Compostos relacionados Ativo Y**

#### **4.7. Hidrólise Básica – Novas condições de degradação**

As condições utilizadas inicialmente para a degradação por hidrólise básica dos ativos apresentaram resultados fora das especificações para este tipo de estudos. Assim, amostras de Ativo X e Ativo Y foram expostas a novas concentrações de hidróxido de sódio (0,5 N e 1 N), reduzindo o tempo de exposição (8 e 24 horas).

Após a exposição, as amostras foram analisadas de acordo com os métodos de doseamento e compostos relacionados. Foi, ainda, realizada a quantificação de Impureza F nas amostras de Ativo Y para a condição NaOH 1N.

#### 4.7.1. Ativo X

Na tabela 4.17 estão representados os resultados obtidos após exposição de Ativo X a novas condições de hidrólise básica.

**Tabela 4.17 Resultados do Ativo X após novas condições de hidrólise básica**

| Condição / Duração | Doseamento |              |                  | Compostos Relacionados |           |          |              |                  | Balanço mássico (%) |
|--------------------|------------|--------------|------------------|------------------------|-----------|----------|--------------|------------------|---------------------|
|                    | Teor (%)   | Purity angle | Purity threshold | TRR                    | Impurezas | Teor (%) | Purity angle | Purity threshold |                     |
| NaOH 0,5N 8h       | 101,6      | 0,143        | 0,237            | ---                    | ---       | ---      | 1,95         | 2,06             | 1,7                 |
| NaOH 0,5N 24h      | 102,5      | 0,135        | 0,238            | ---                    | ---       | ---      | 1,79         | 2,05             | 2,6                 |
| NaOH 1N 8h         | 101,9      | 0,162        | 0,250            | ---                    | ---       | ---      | 1,82         | 2,04             | 2,0                 |
| NaOH 1N 24h        | 102,0      | 0,146        | 0,239            | ---                    | ---       | ---      | 1,770        | 2,05             | 2,1                 |

Com a diminuição da concentração do reagente e do tempo de exposição, o Ativo X demonstrou ser mais estável em meios menos alcalinos, não havendo diminuições no teor de ativo no método de doseamento como ocorreu anteriormente. No método de compostos relacionados não se verificou a formação de picos de impurezas com um teor superior a 0,05%.

O Ativo X apresenta uma ligação glicosídica na sua molécula, o que a torna suscetível à hidrólise [33]. Mais concretamente, em condições de hidrólise alcalina poderia haver a formação de um acetaldeído [32], no entanto o método de compostos relacionados utilizado não detetou a presença de impurezas de degradação.

Os balanços de massa são inferiores a 10%.

Relativamente à pureza do pico do ativo, temos que o valor de *purity angle* é inferior ao de *purity threshold*, o que evidencia essa pureza.

Apesar de a severidade das condições de hidrólise básica ter sido diminuída, estas continuam a não ser esperadas em condições normais de utilização e armazenamento. No entanto, seria importante proteger o ativo de situações desta natureza, devido aos resultados apresentados anteriormente.

#### 4.7.2. Ativo Y

Na tabela 4.18 estão representados os resultados obtidos após exposição do Ativo Y a novas condições de hidrólise básica.

Tabela 4.18 Resultados do Ativo Y após novas condições de hidrólise básica

| Condição / Duração   | Doseamento |              |                  | Compostos Relacionados                             |                                                                                                           |                                                                   |              |                  | Balanço mássico (%) |
|----------------------|------------|--------------|------------------|----------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|--------------|------------------|---------------------|
|                      | Teor (%)   | Purity angle | Purity threshold | TRR                                                | Impurezas                                                                                                 | Teor (%)                                                          | Purity angle | Purity threshold |                     |
| <b>NaOH 0,5N 8h</b>  | 99,05      | 0,215        | 0,260            | 0,34<br>0,44<br>0,59<br>---                        | Impureza A<br>Desconhecida<br>Desconhecida<br><b>Total:</b>                                               | 0,015<br>0,048<br>0,028<br><b>0,09</b>                            | 5,74         | 4,38             | 1,2                 |
| <b>NaOH 0,5N 24h</b> | 91,47      | 0,184        | 0,256            | 0,34<br>0,44<br>0,60<br>0,77<br>---                | Impureza A<br>Desconhecida<br>Desconhecida<br>Desconhecida<br><b>Total:</b>                               | 0,031<br>0,105<br>0,075<br>0,018<br><b>0,23</b>                   | 7,37         | 4,39             | 8,6                 |
| <b>NaOH 1N 8h</b>    | 95,83      | 0,187        | 0,258            | 0,35<br>0,45<br>0,61<br>---<br>---                 | Impureza A<br>Desconhecida<br>Desconhecida<br>Impureza F<br><b>Total:</b>                                 | 0,026<br>0,070<br>0,034<br>1,225<br><b>1,36</b>                   | 7,66         | 4,16             | 3,1                 |
| <b>NaOH 1N 24h</b>   | 86,15      | 0,172        | 0,257            | 0,31<br>0,34<br>0,44<br>0,60<br>0,77<br>---<br>--- | Desconhecida<br>Impureza A<br>Desconhecida<br>Desconhecida<br>Desconhecida<br>Impureza F<br><b>Total:</b> | 0,017<br>0,051<br>0,160<br>0,092<br>0,017<br>3,538<br><b>3,88</b> | 7,51         | 4,34             | 10                  |

Com a diminuição da concentração do reagente e do tempo de exposição, o Ativo Y continuou a demonstrar a sua sensibilidade em meios alcalinos, com a diminuição do teor de ativo, no método de doseamento, a superar os 10% em apenas 24 horas com NaOH 1N. Foi detetada a Impureza A com um tempo de retenção relativo entre 0,34 e 0,35 e teores de 0,02% e 0,03% para uma concentração de 0,5N e de 0,03% e 0,05% para uma concentração de 1N. Nestas condições, houve a formação da Impureza A e apesar de não ser a principal impureza prevista, existe um mecanismo proposto para a sua formação em que o grupo hidroxilo funciona como nucleófilo [29].

A Impureza F foi quantificada para as amostras expostas ao hidróxido de sódio 1N e detetada nas mesmas, com valores bastante significativos. Verificou-se um aumento do seu teor de 1,2% para 3,5% após 24 horas, o que indica que o tempo de exposição teve influência na degradação da amostra. A presença desta Impureza era esperada devido à protonação da dimetilamina (Impureza F) pela água que facilita a sua libertação e, consequentemente, a sua deteção nestas condições [28].

Foram detetados picos de impurezas desconhecidas. Duas dessas impurezas aparentam ser comuns às quatro condições, devido aos tempos de retenção relativos que apresentam, 0,44 e 0,60.

Os balanços de massa são inferiores a 10%.

Relativamente à pureza do pico do Ativo Y, o valor de *purity angle* é inferior ao de *purity threshold*, o que evidencia a pureza do pico no método de doseamento. O mesmo não acontece

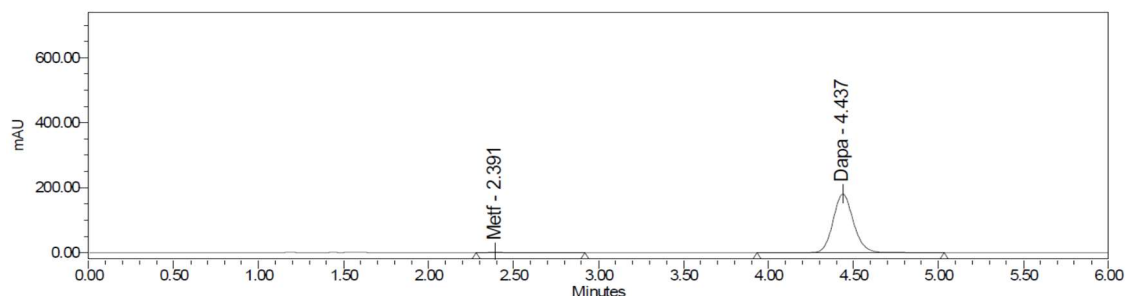


no método de compostos relacionados devido à elevada concentração do ativo, e que leva à saturação do pico cromatográfico. No entanto, o facto de no método de doseamento se obter pureza do pico e de o método dos compostos relacionados utilizado estar descrito na farmacopeia europeia, é possível afirmar que o pico do Ativo Y é puro.

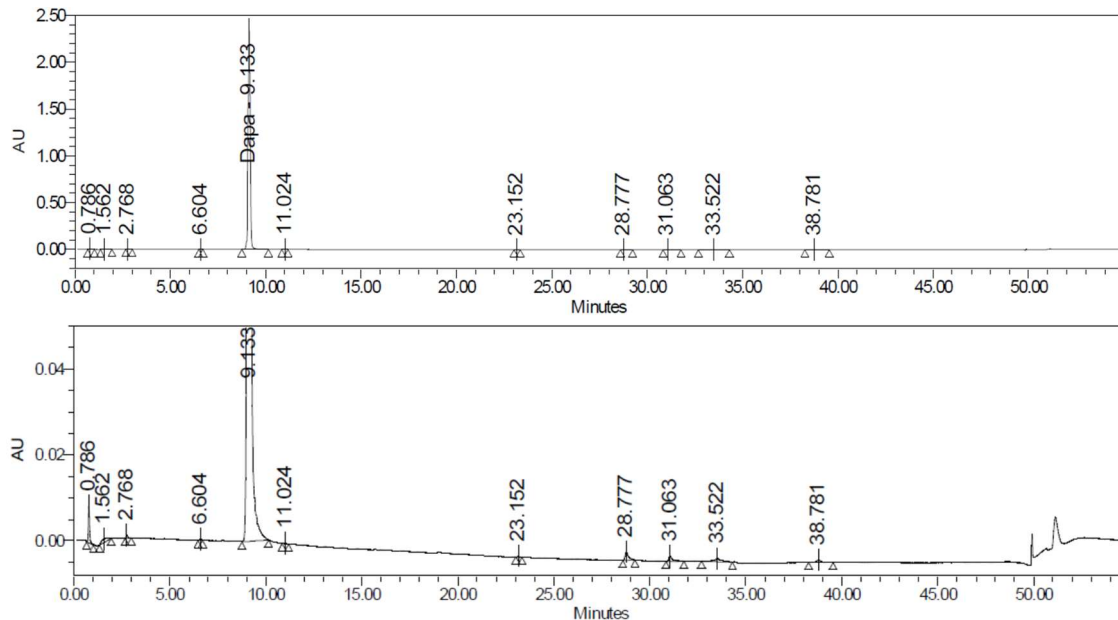
Devido à elevada sensibilidade que este ativo apresenta perante condições alcalinas, é importante a sua proteção relativamente a estas situações. No entanto, não é de esperar o aparecimento destas impurezas em condições normais de utilização e armazenamento uma vez que, neste estudo, foram utilizadas condições de hidrólise alcalina severas.

#### 4.7.3. Cromatogramas do Ativo X e do Ativo Y – Hidrólise Básica

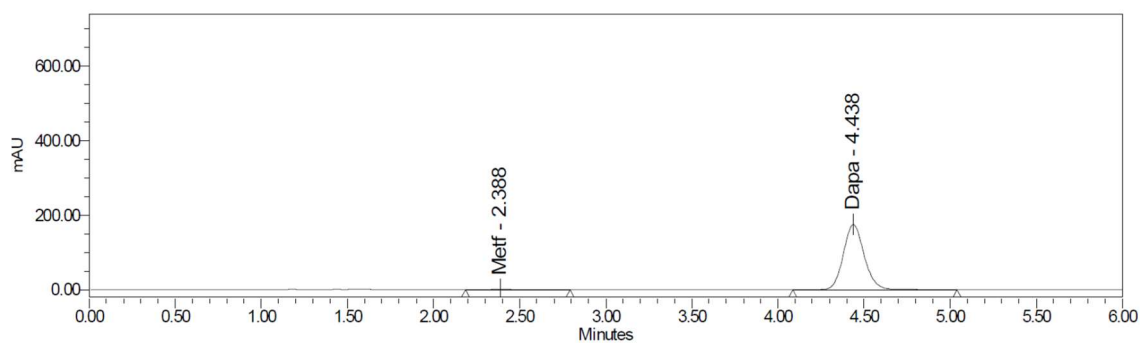
Nas figuras 4.84 a 4.91 estão representados os cromatogramas obtidos para o Ativo X no método de doseamento e compostos relacionados, respetivamente.



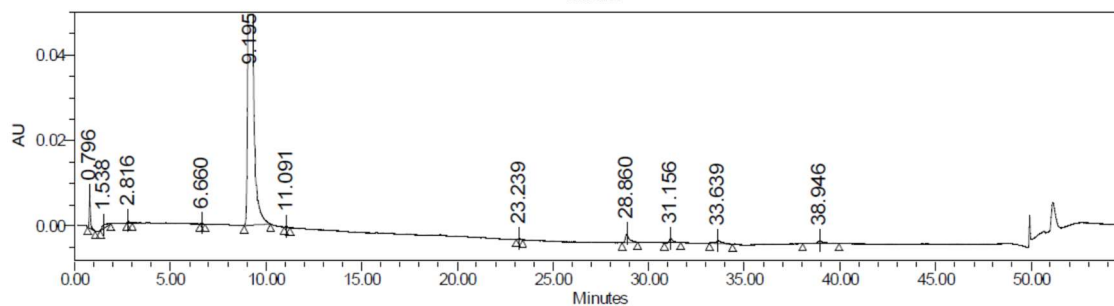
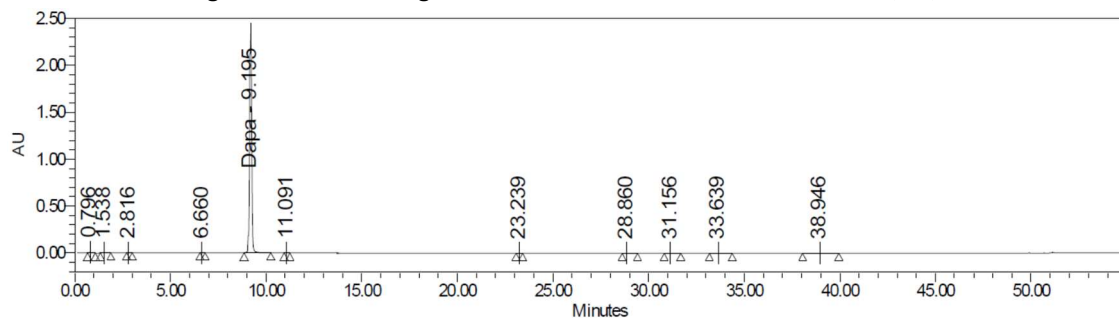
**Figura 4.84 Cromatograma do Ativo X - Doseamento – NaOH 0,5N, 8 horas**



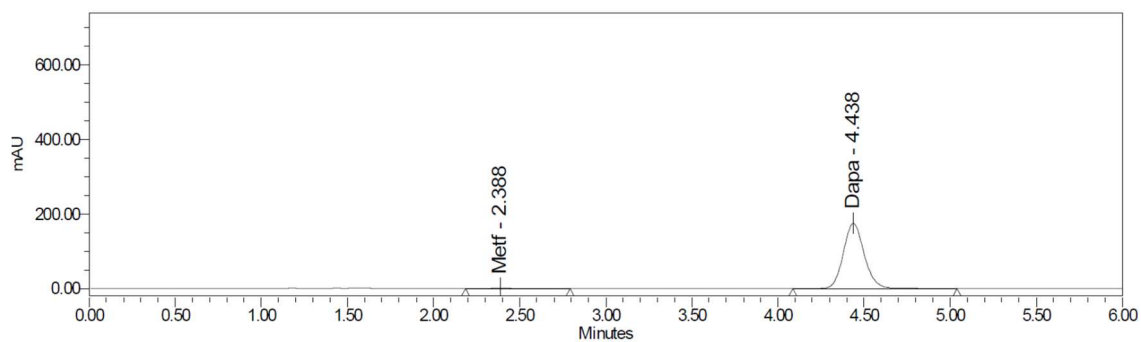
**Figura 4.85 Cromatograma do Ativo X - Compostos relacionados – NaOH 0,5N, 8 horas**



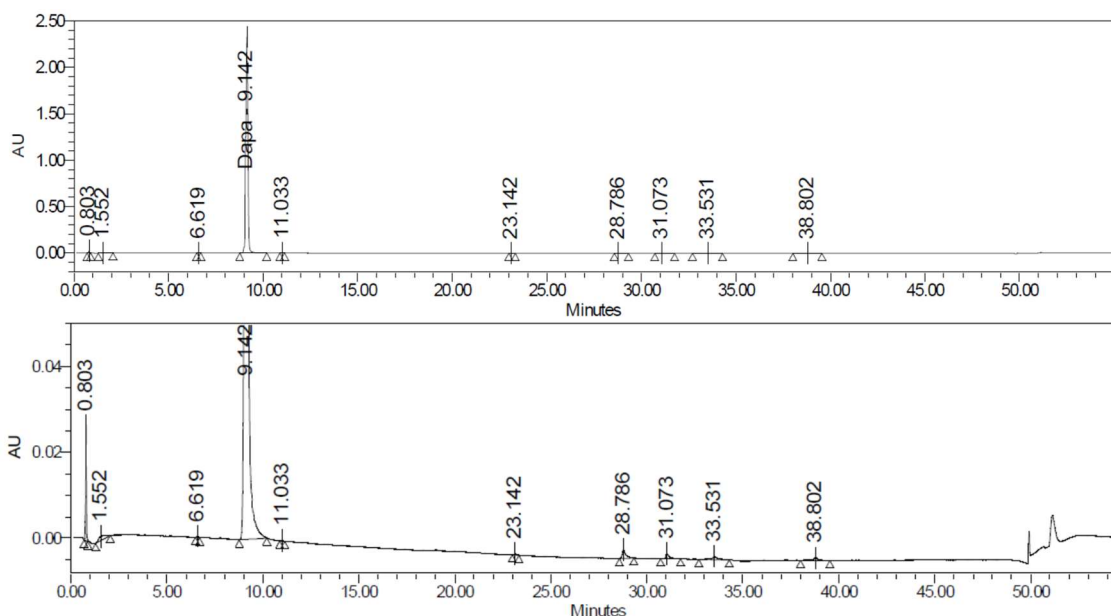
**Figura 4.86 Cromatograma do Ativo X - Doseamento – NaOH 0,5N, 24 horas**



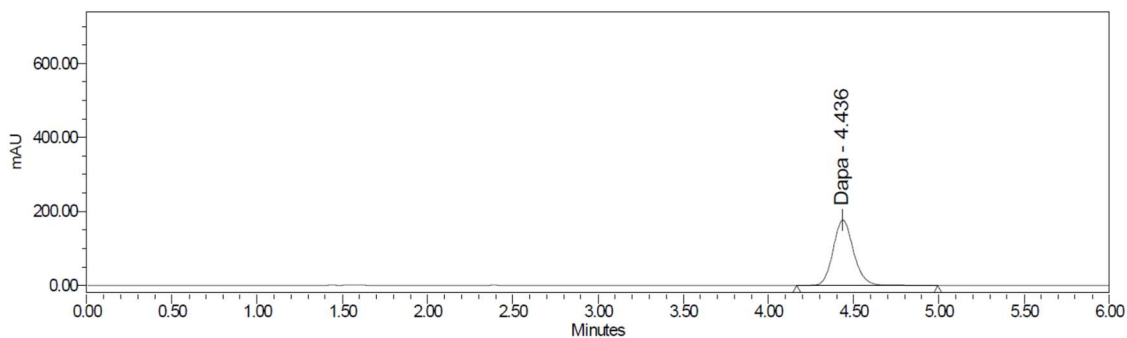
**Figura 4.87 Cromatograma do Ativo X - Compostos relacionados – NaOH 0,5N, 24 horas**



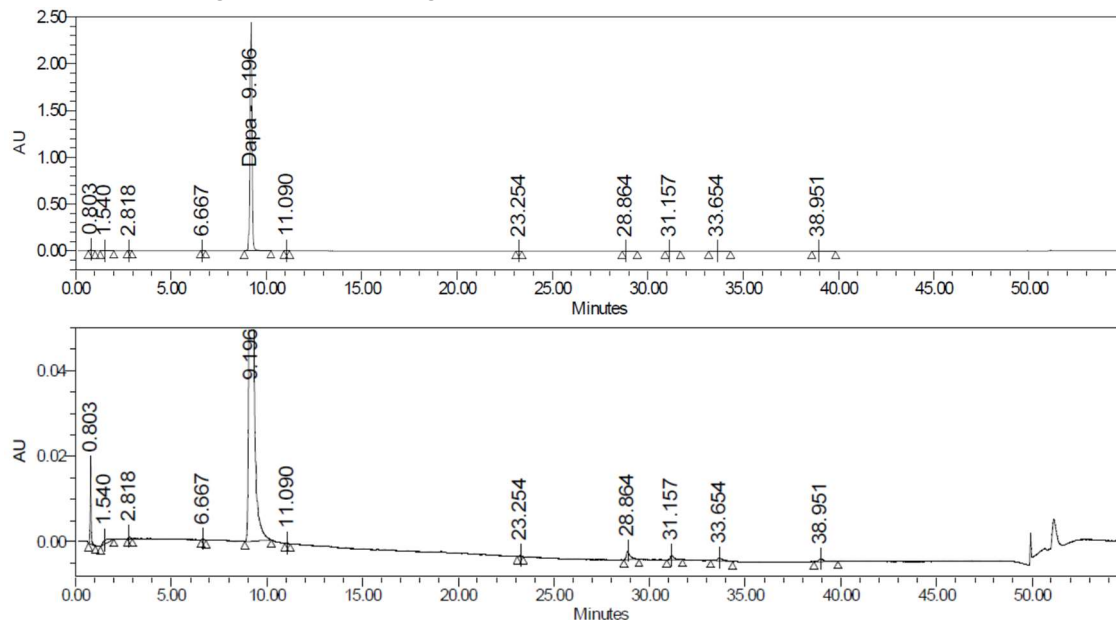
**Figura 4.88 Cromatograma do Ativo X - Doseamento – NaOH 1N, 8 horas**



**Figura 4.89 Cromatograma do Ativo X - Compostos relacionados – NaOH 1N, 8 horas**

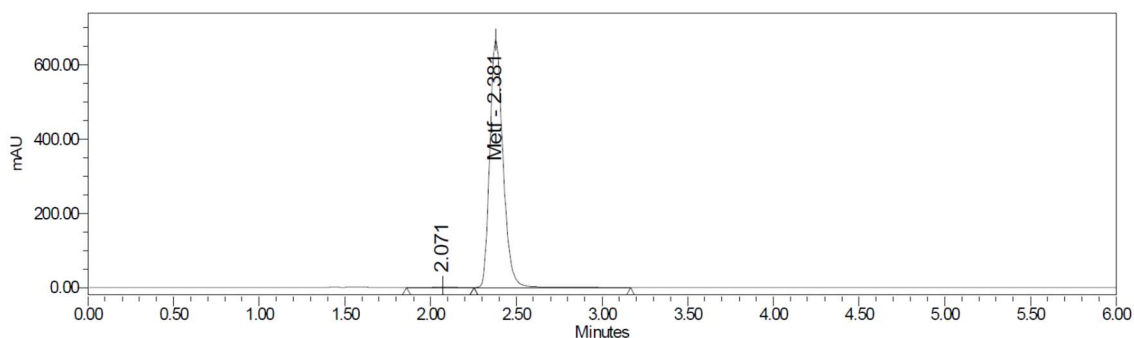


**Figura 4.90 Cromatograma do Ativo X - Doseamento – NaOH 1N, 24 horas**

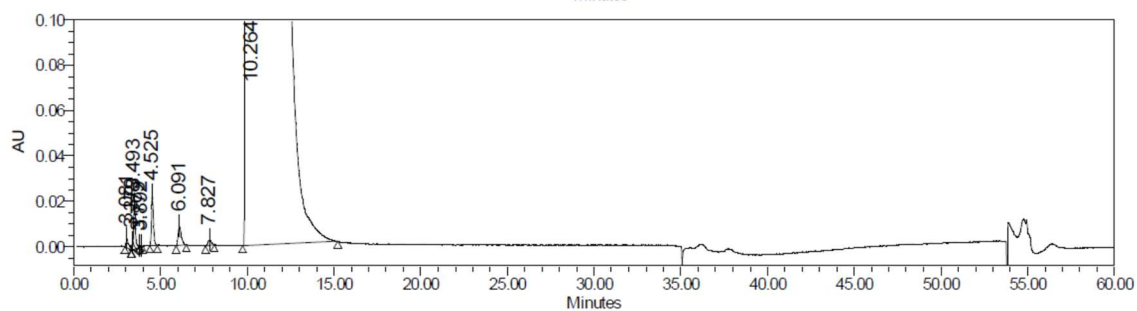
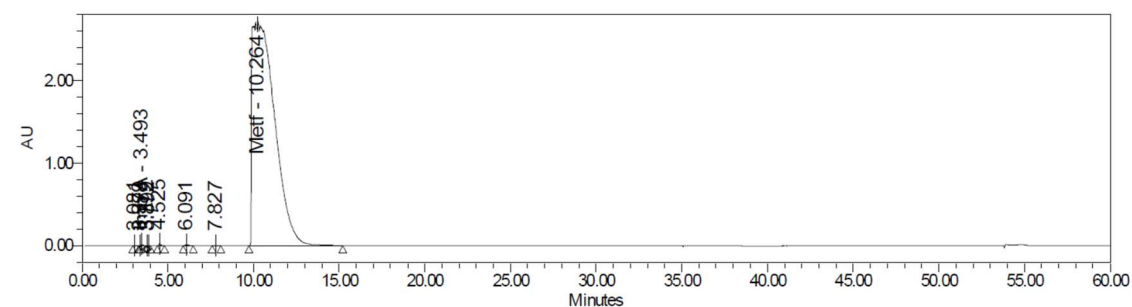


**Figura 4.91 Cromatograma do Ativo X - Compostos relacionados – NaOH 1N, 24 horas**

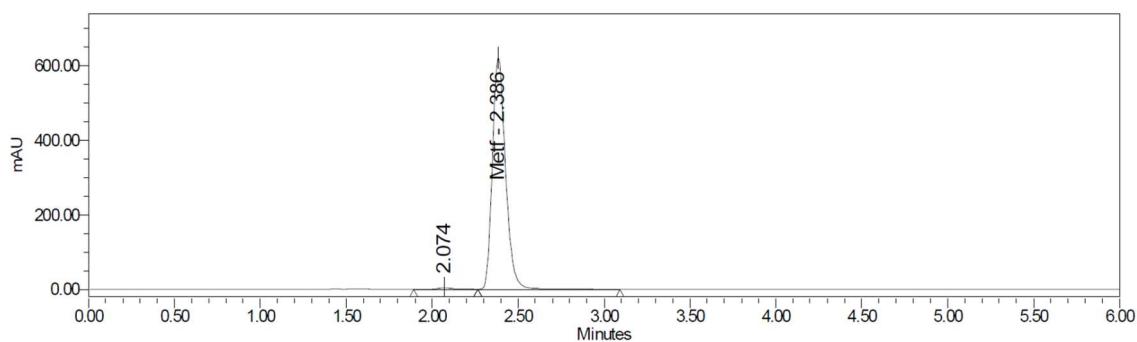
Nas figuras 4.92 a 4.101 estão representados os cromatogramas obtidos para o Ativo Y no método de doseamento, compostos relacionados e impureza F.



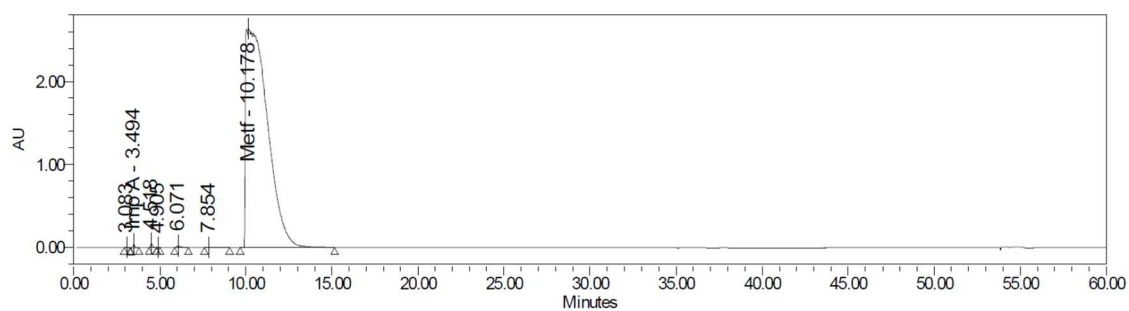
**Figura 4.92 Cromatograma do Ativo Y - Doseamento – NaOH 0,5N, 8 horas**



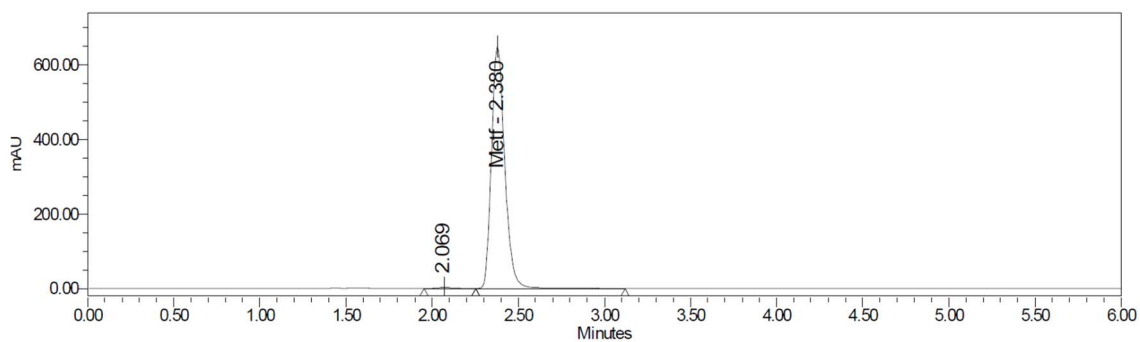
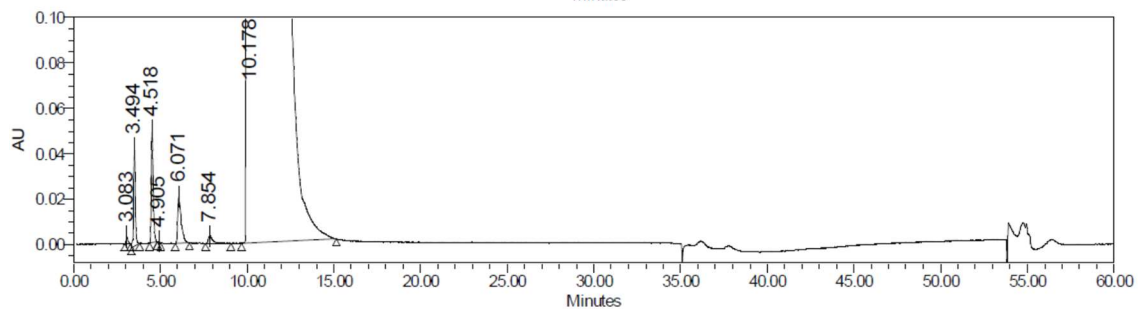
**Figura 4.93 Cromatograma do Ativo Y - Compostos relacionados – NaOH 0,5N, 8 horas**



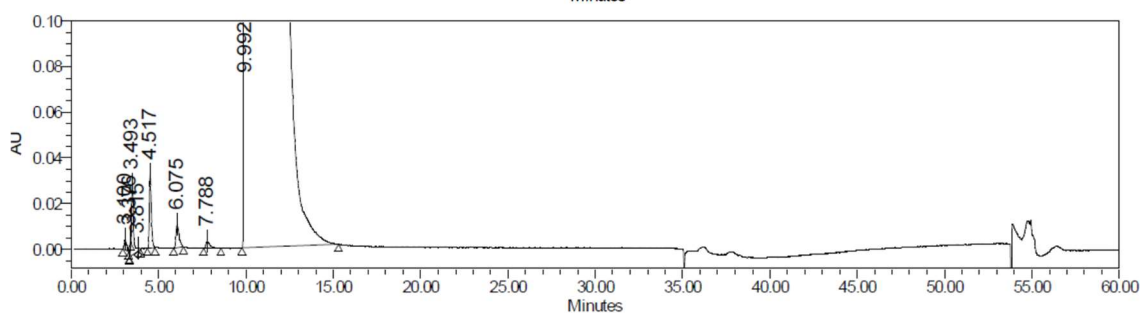
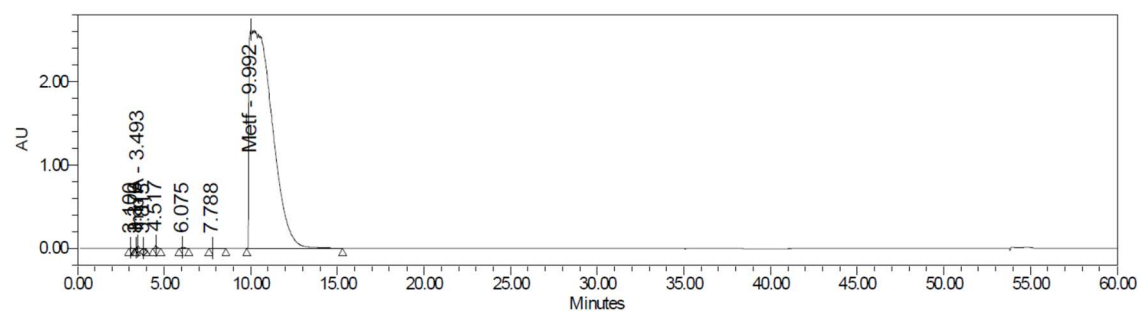
**Figura 4.94 Cromatograma do Ativo Y - Doseamento – NaOH 0,5N, 24 horas**



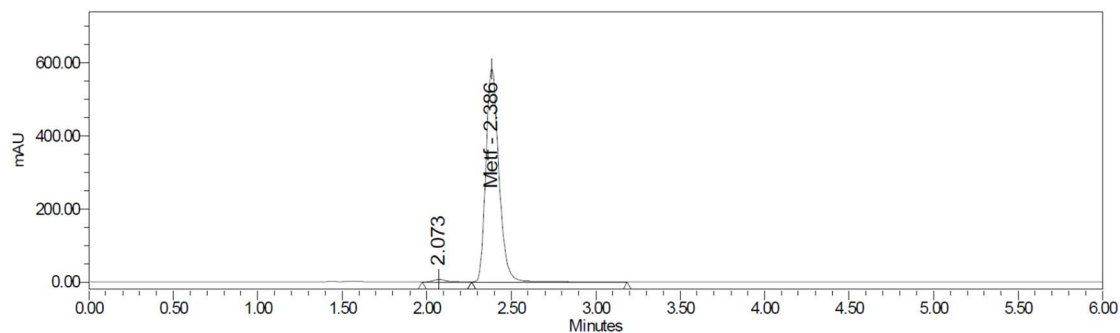
**Figura 4.95 Cromatograma do Ativo Y - Compostos relacionados – NaOH 0,5N, 24 horas**



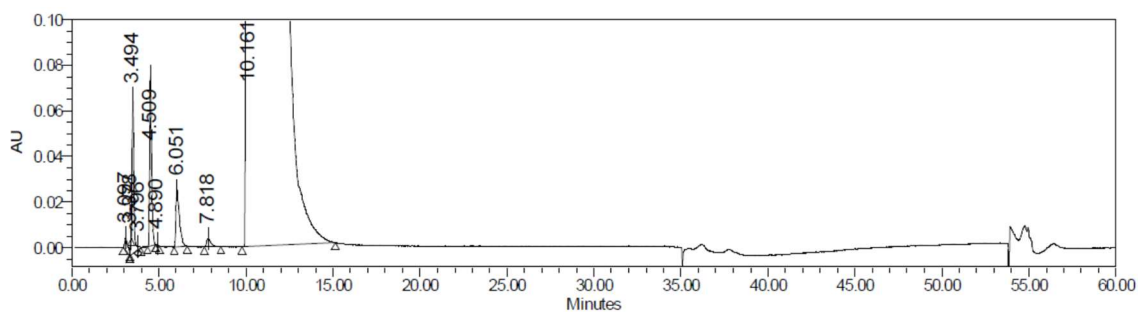
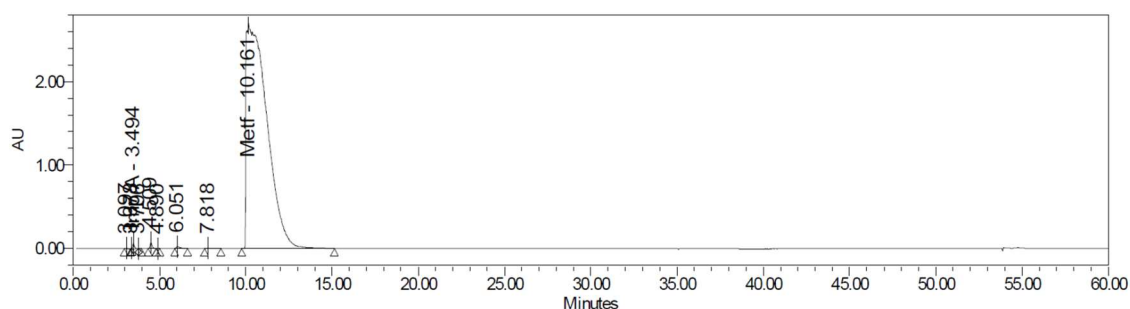
**Figura 4.96 Cromatograma do Ativo Y - Doseamento – NaOH 1N, 8 horas**



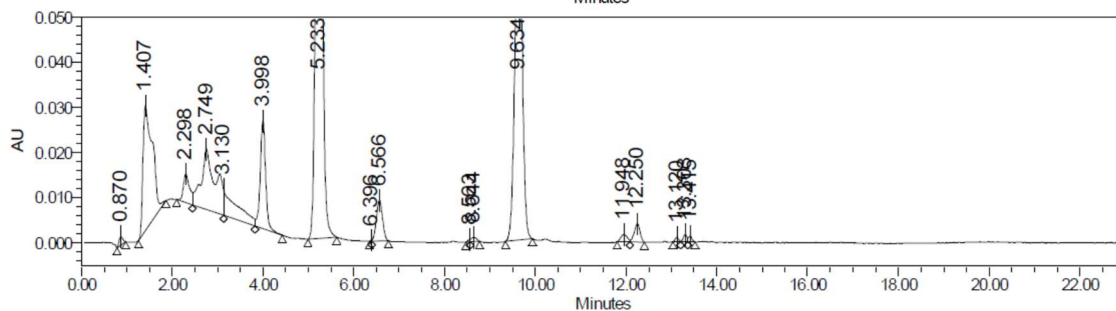
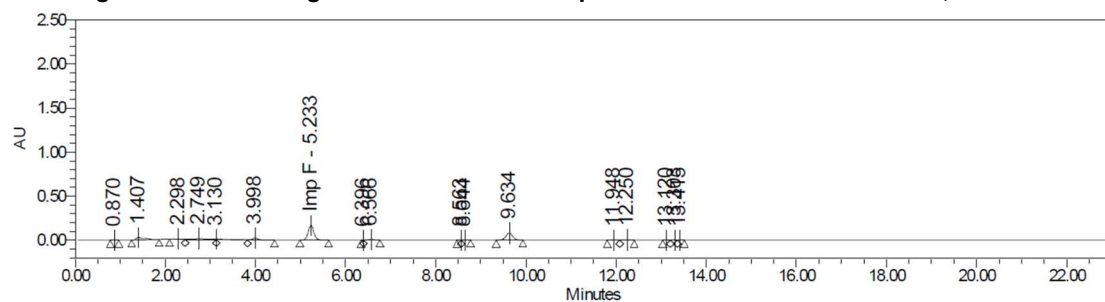
**Figura 4.97 Cromatograma do Ativo Y - Compostos relacionados – NaOH1N, 8 horas**



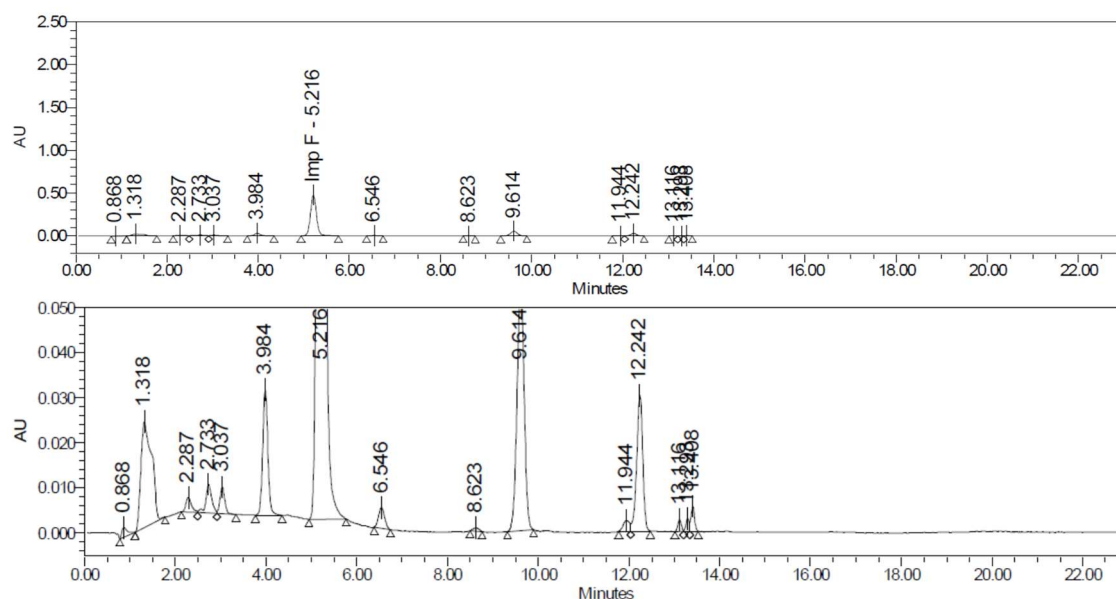
**Figura 4.98 Cromatograma do Ativo Y - Doseamento – NaOH 1N, 24 horas**



**Figura 4.99 Cromatograma do Ativo Y - Compostos relacionados – NaOH 1N, 24 horas**



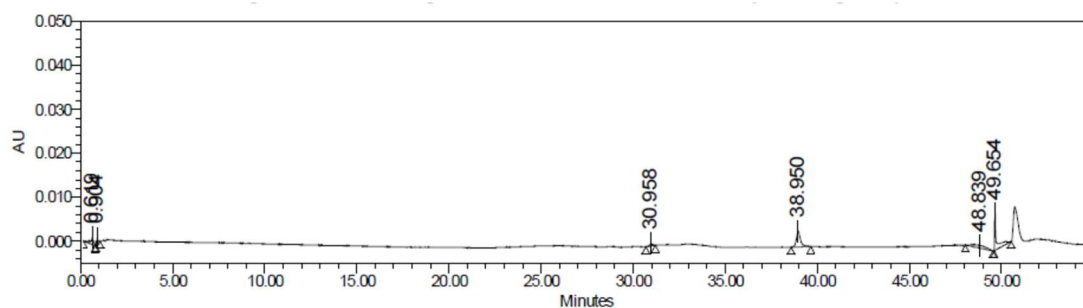
**Figura 4.100 Cromatograma do Ativo Y - Impureza F do Ativo Y – NaOH 1N, 8 horas**



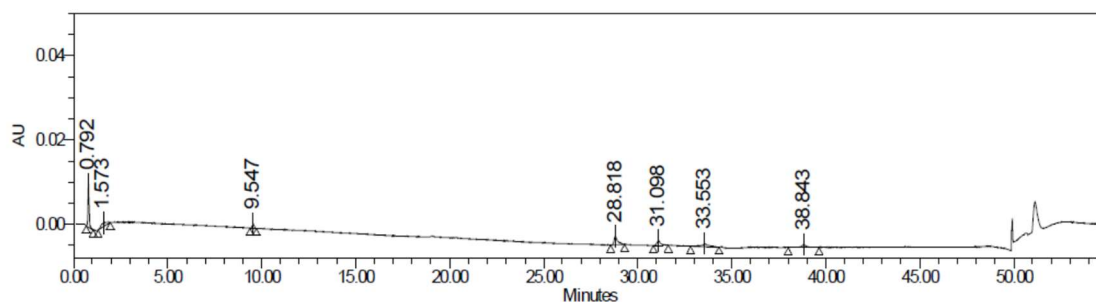
**Figura 4.101 Cromatograma do Ativo Y - Impureza F do Ativo Y – NaOH 1N, 24 horas**

#### 4.7.4. Cromatogramas de diluente e soluções em branco – Hidrólise Básica

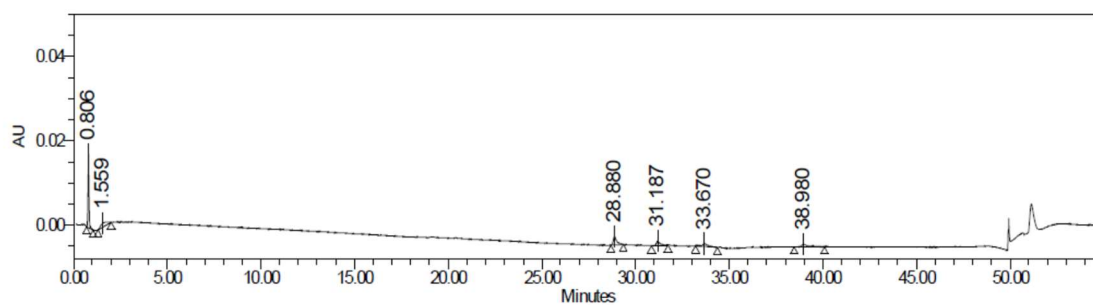
Nas figuras 4.102 a 4.109 estão representados os cromatogramas dos diluentes e das soluções em branco. Estes foram comparados com os cromatogramas das substâncias ativas para que os picos referentes a diluentes e reagentes não fossem quantificados erradamente como impurezas de degradação.



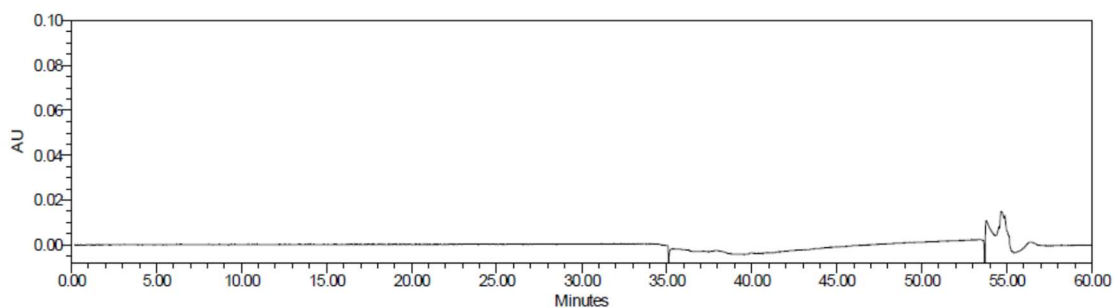
**Figura 4.102 Cromatograma de diluente - Compostos relacionados Ativo X**



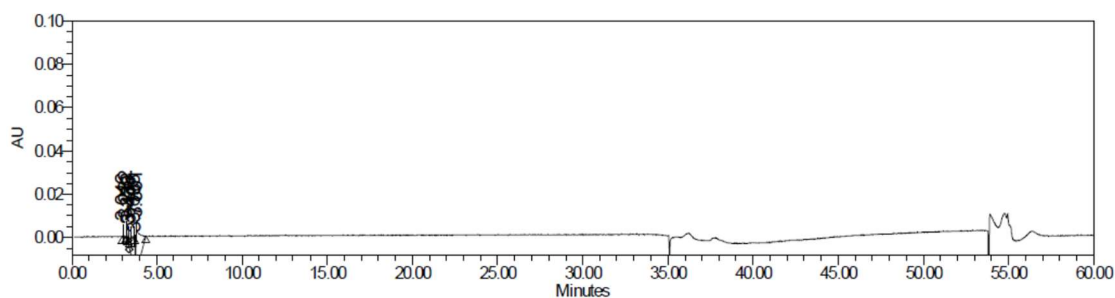
**Figura 4.103 Cromatograma de branco - NaOH 0,5N - Compostos relacionados Ativo X**



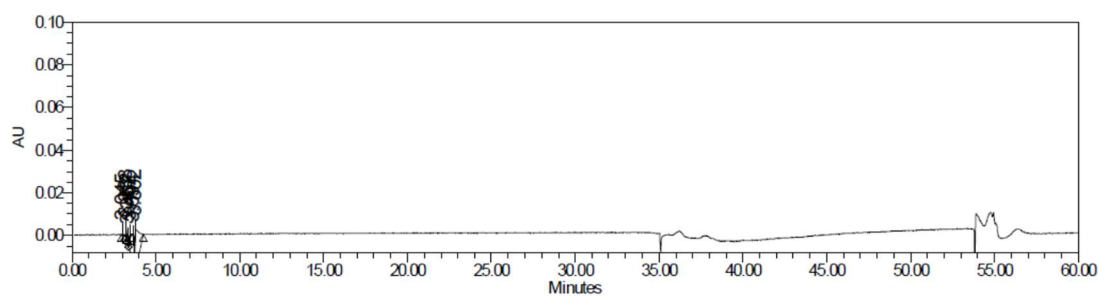
**Figura 4.104** Cromatograma de branco - NaOH 1N - Compostos relacionados Ativo X



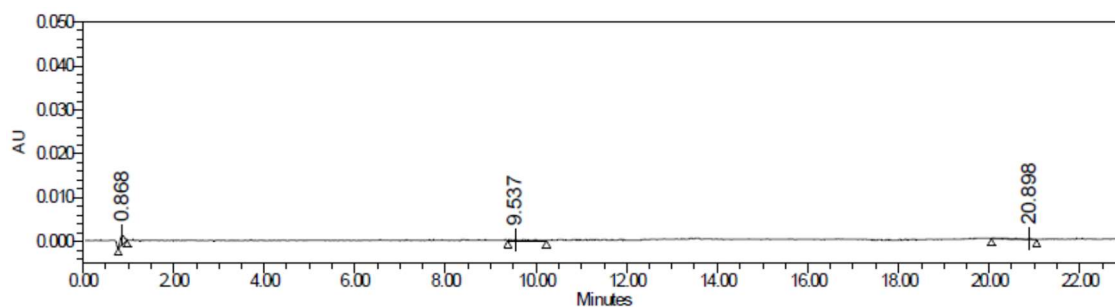
**Figura 4.105** Cromatograma de diluente - Compostos relacionados Ativo Y



**Figura 4.106** Cromatograma de branco - NaOH 0,5N - Compostos relacionados Ativo Y



**Figura 4.107** Cromatograma de branco - NaOH 1N - Compostos relacionados Ativo Y



**Figura 4.108** Cromatograma de diluente – Impureza F do Ativo Y



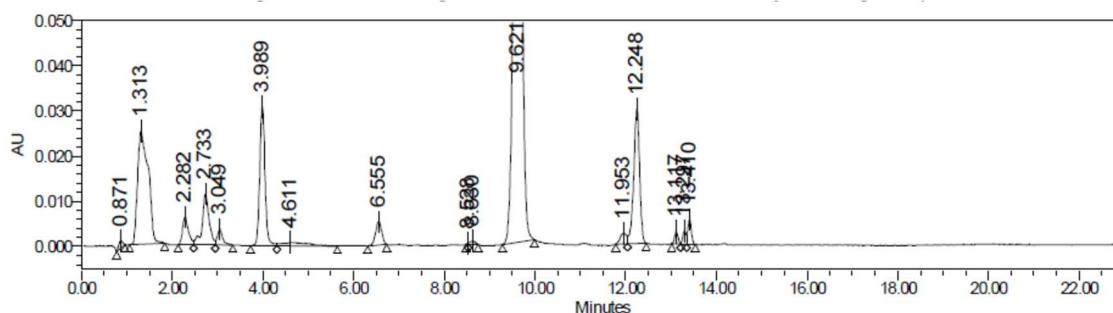


Figura 4.109 Cromatograma de branco – NaOH 1N – Impureza F do Ativo Y

#### 4.8. Hidrólise Ácida

O Ativo X e o Ativo Y foram submetidos a várias concentrações de ácido clorídrico (HCl) durante 7 e 14 dias. Após a exposição as amostras foram analisadas de acordo com os métodos de doseamento e compostos relacionados. Foi, ainda, realizada a quantificação de Impureza F na amostra de Ativo Y com ácido clorídrico 1N durante 14 dias.

##### 4.8.1. Ativo X

Na tabela 4.19 estão representados os resultados obtidos após exposição do Ativo X a várias concentrações de ácido clorídrico.

Tabela 4.19 Resultados do Ativo X após exposição a hidrólise ácida

| Condição /<br>Duração | Doseamento  |                 |                     | Compostos Relacionados |           |             |                 |                     | Balanço<br>mássico<br>(%) |
|-----------------------|-------------|-----------------|---------------------|------------------------|-----------|-------------|-----------------|---------------------|---------------------------|
|                       | Teor<br>(%) | Purity<br>angle | Purity<br>threshold | TRR                    | Impurezas | Teor<br>(%) | Purity<br>angle | Purity<br>threshold |                           |
| HCl 1N<br>7 dias      | 97,64       | 0,102           | 0,276               | ---                    | ---       | ---         | 1,20            | 3,15                | 2,3                       |
| HCl 1N<br>14 dias     | 101,7       | 0,098           | 0,278               | ---                    | ---       | ---         | 1,27            | 3,21                | 1,8                       |
| HCl 2N<br>7 dias      | 82,89       | 0,127           | 0,276               | ---                    | ---       | ---         | 0,480           | 1,88                | 17                        |
| HCl 2N<br>14 dias     | 78,18       | 0,121           | 0,301               | ---                    | ---       | ---         | 0,479           | 1,67                | 22                        |
| HCl 3N<br>7 dias      | 44,04       | 0,172           | 0,366               | ---                    | ---       | ---         | 0,365           | 1,45                | 56                        |
| HCl 3N<br>14 dias     | 46,81       | 0,178           | 0,370               | ---                    | ---       | ---         | 6,695           | 5,19                | 53                        |

A amostra de Ativo X foi exposta a condições de hidrólise ácida durante 7 e 14 dias. Pelos resultados obtidos, é possível verificar a sua suscetibilidade a estas condições com a diminuição do teor de ativo no método de doseamento, à medida que aumenta a concentração de ácido clorídrico (HCl). No entanto, não foram detetados picos de impurezas de degradação superiores ao limite de quantificação (0,05%), pelo método de compostos relacionados.

O tempo de exposição não parece ter influência na degradação, uma vez que para cada concentração, entre os 7 e 14 dias, não existiram grandes diferenças nos resultados.

Relativamente à pureza do pico do ativo, temos que o valor de *purity angle* é inferior ao de *purity threshold*, o que evidencia essa pureza.

Os balanços de massa são inferiores a 10% apenas para a condição HCl 1N durante 7 e 14 dias. Nas restantes condições, os balanços são superiores a 10% e para a condição HCl 3N a diminuição do teor de ativo ultrapassa os 30%.

Após verificação dos resultados, não é possível afirmar que o Ativo X é, efetivamente, suscetível a condições de hidrólise alcalina devido à ausência de impurezas de degradação. Isto é, apesar de haver um decréscimo significativo do teor de ativo, não significa que haja degradação, o ativo pode ter apenas precipitado impossibilitando a sua correta quantificação. Por outro lado, pode ter ocorrido degradação, mas as volatilidades dos compostos formados levaram a que se perdessem. Existe ainda, a possibilidade de a degradação ter sido tão agressiva que levou à destruição do grupo cromóforo, e consequente formação de produtos secundários que nada têm a ver com o ativo, impossibilitando a sua deteção ao comprimento de onda utilizado no método [11].

#### 4.8.2. Ativo Y

Na tabela 4.20 estão representados os resultados obtidos após exposição do Ativo Y a várias concentrações de ácido clorídrico.

**Tabela 4.20 Resultados do Ativo Y após exposição a hidrólise ácida**

| Condição /<br>Duração | Doseamento  |                 |                     | Compostos Relacionados              |                                                                               |                                                 |                 |                     | Balanço<br>mássico<br>(%) |
|-----------------------|-------------|-----------------|---------------------|-------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------|-----------------|---------------------|---------------------------|
|                       | Teor<br>(%) | Purity<br>angle | Purity<br>threshold | TRR                                 | Impurezas                                                                     | Teor (%)                                        | Purity<br>angle | Purity<br>threshold |                           |
| HCl 1N<br>7 dias      | 99,27       | 0,074           | 0,271               | ---                                 | ---                                                                           | ---                                             | 6,10            | 4,51                | 1,1                       |
| HCl 1N<br>14 dias     | 103,1       | 0,072           | 0,268               | ---                                 | Impureza F                                                                    | <b>0,03</b>                                     | 5,48            | 4,81                | 2,8                       |
| HCl 2N<br>7 dias      | 99,45       | 0,072           | 0,270               | 0,29<br>0,31<br>---                 | Desconhecida<br>Desconhecida<br><b>Total:</b>                                 | 0,017<br>0,019<br><b>0,036</b>                  | 6,06            | 4,27                | 0,8                       |
| HCl 2N<br>14 dias     | 103,6       | 0,069           | 0,269               | 0,29<br>0,32<br>---                 | Desconhecida<br>Desconhecida<br><b>Total:</b>                                 | 0,018<br>0,020<br><b>0,038</b>                  | 7,04            | 5,06                | 3,3                       |
| HCl 3N<br>7 dias      | 99,78       | 0,072           | 0,270               | 0,29<br>0,31<br>---                 | Desconhecida<br>Desconhecida<br><b>Total:</b>                                 | 0,024<br>0,043<br><b>0,07</b>                   | 6,32            | 4,43                | 2,5                       |
| HCl 3N<br>14 dias     | 103,1       | 0,072           | 0,271               | 0,30<br>0,31<br>0,31<br>0,33<br>--- | Desconhecida<br>Desconhecida<br>Desconhecida<br>Desconhecida<br><b>Total:</b> | 0,064<br>0,020<br>0,031<br>0,054<br><b>0,17</b> | 7,67            | 4,48                | 2,9                       |

O Ativo Y foi exposto a condições de hidrólise ácida durante 7 e 14 dias. Após a exposição, não se verificou alterações significativas no teor de ativo no método de doseamento. Na condição HCl 1N, 14 dias foi detetado o pico da impureza F correspondente a um teor de 0,03%, explicado através da possível protonação do grupo amina pela água, o que facilita a sua

libertação e, conseqüentemente, a detecção desta impureza nestas condições [28]. Duas impurezas desconhecidas formaram-se com um tempo de retenção relativo 0,29 e 0,31, em contacto com HCl 2N e HCl 3N. Com a exposição à concentração mais elevada durante 14 dias, houve um aumento no número de impurezas desconhecidas.

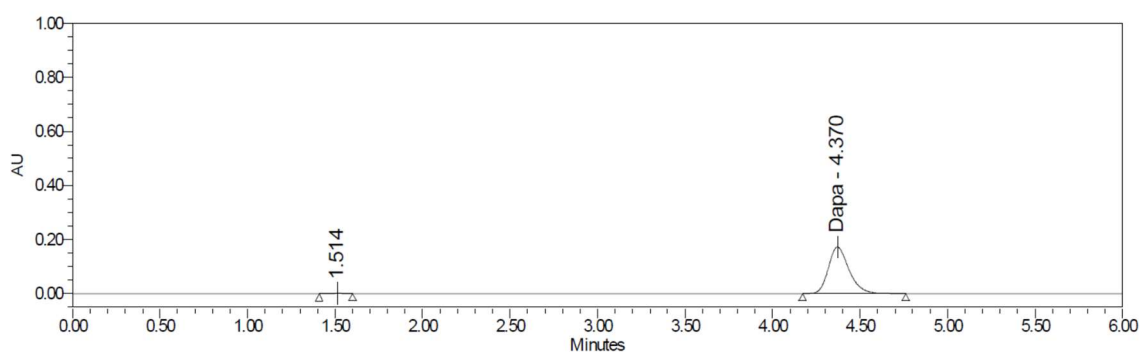
Os balanços de massa são inferiores a 10%.

Relativamente à pureza do pico do Ativo Y, o valor de *purity angle* é inferior ao de *purity threshold*, o que evidencia a pureza do pico no método de doseamento. O mesmo não acontece no método de compostos relacionados devido à elevada concentração do ativo, e que leva à saturação do pico cromatográfico. No entanto, o facto de no método de doseamento se obter pureza do pico e de o método dos compostos relacionados utilizado estar descrito na farmacopeia europeia, é possível afirmar que o pico do Ativo Y é puro.

Apesar de estas condições serem demasiado severas e não serem esperadas em condições normais de utilização e armazenamento, seria importante proteger o ativo de situações de hidrólise ácida.

#### 4.8.3. Cromatogramas do Ativo X e do Ativo Y – Hidrólise Ácida

Nas figuras 4.110 a 4.121 estão representados os cromatogramas obtidos para o Ativo X no método de doseamento e compostos relacionados, respetivamente.



**Figura 4.110 Cromatograma do Ativo X - Doseamento – HCl 1N, 7 dias**

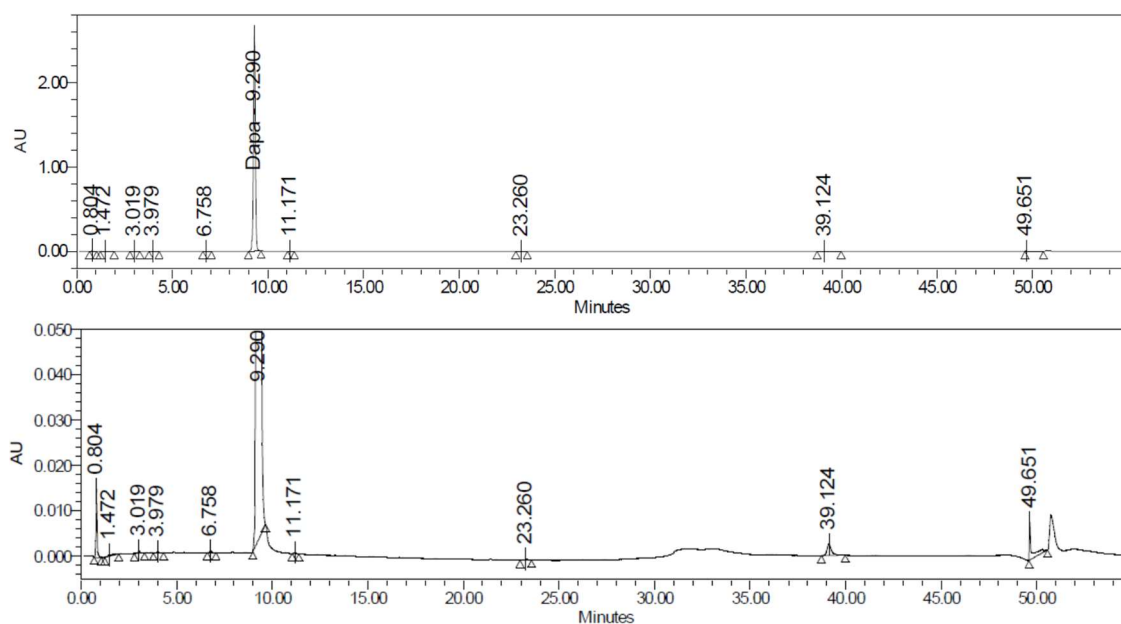


Figura 4.111 Cromatograma do Ativo X - Compostos relacionados – HCl 1N, 7 dias

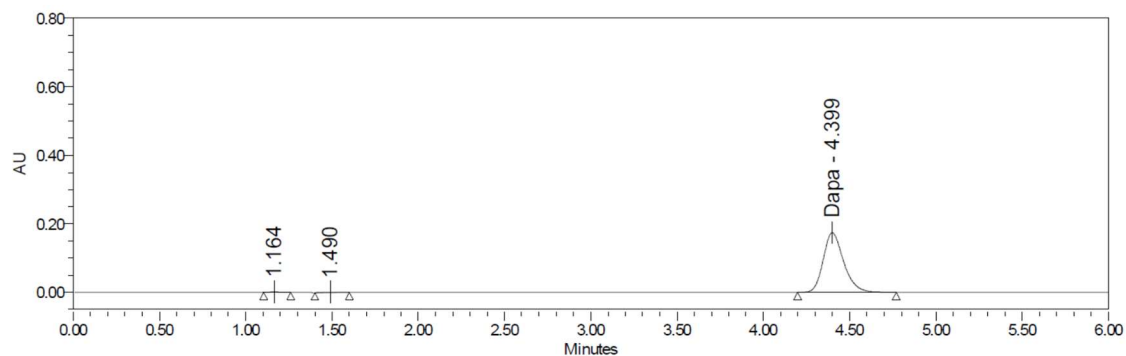


Figura 4.112 Cromatograma do Ativo X - Doseamento – HCl 1N, 14 dias

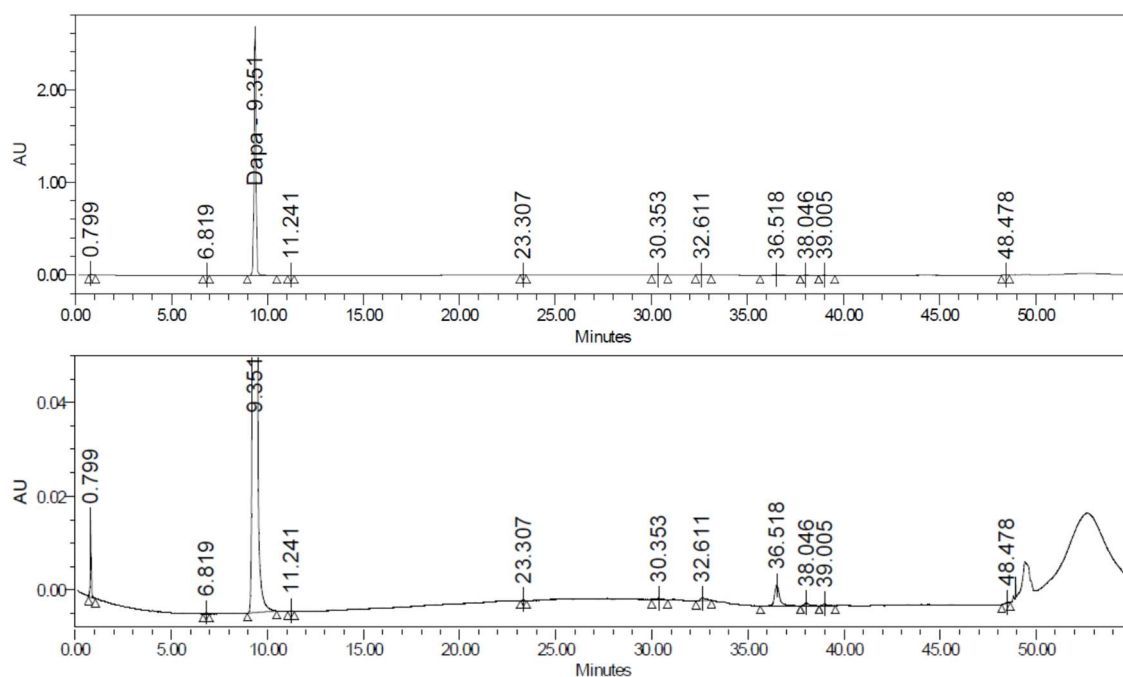
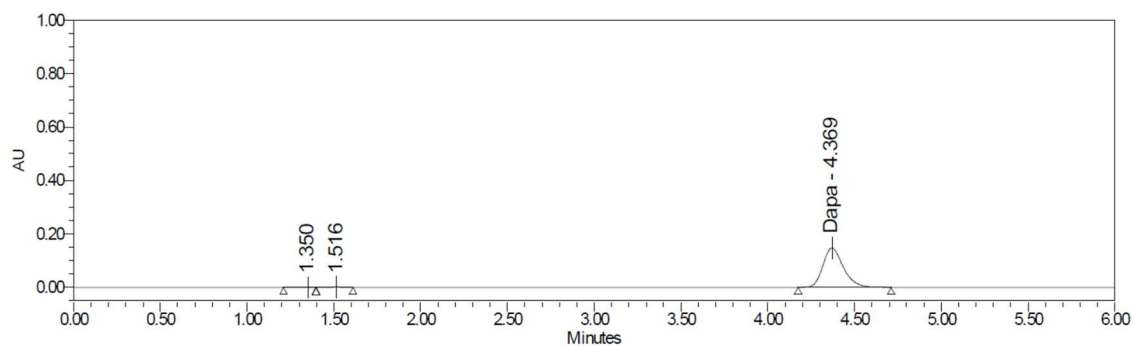
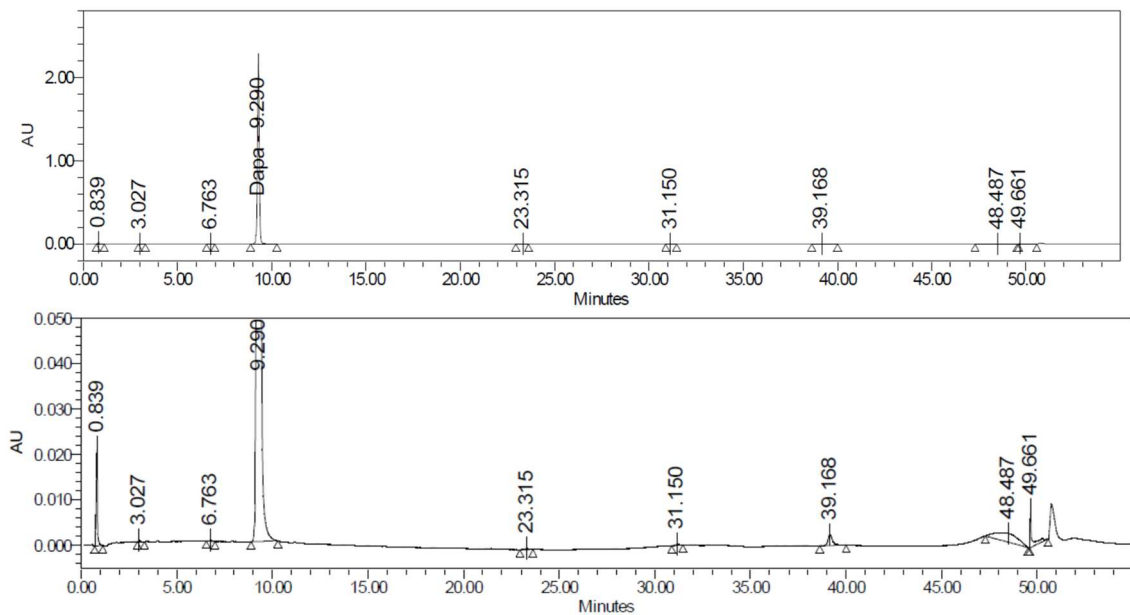


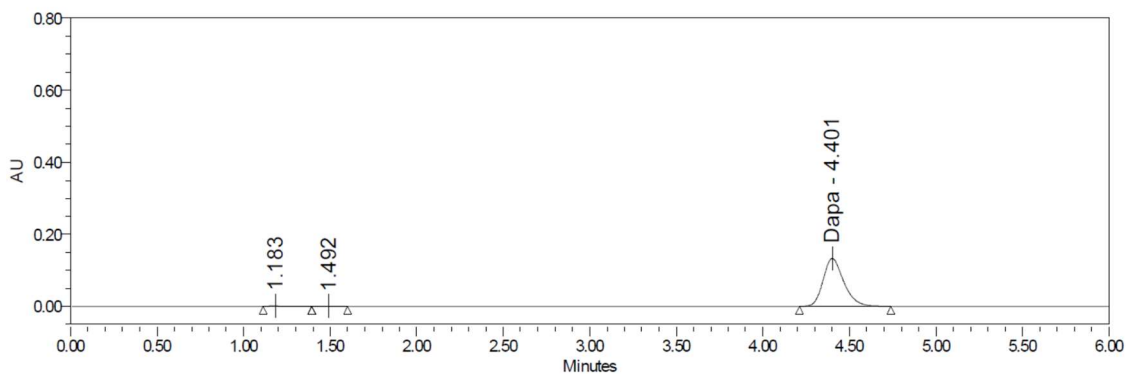
Figura 4.113 Cromatograma do Ativo X - Compostos relacionados – HCl 1N, 14 dias



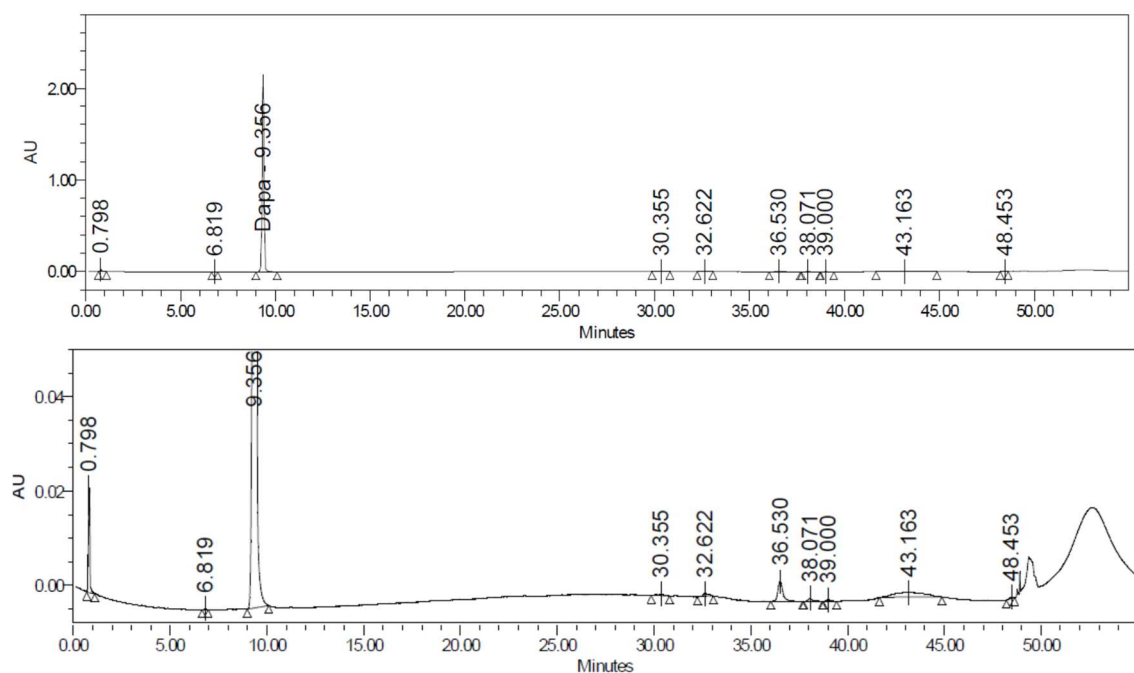
**Figura 4.114 Cromatograma do Ativo X - Doseamento – HCl 2N, 7 dias**



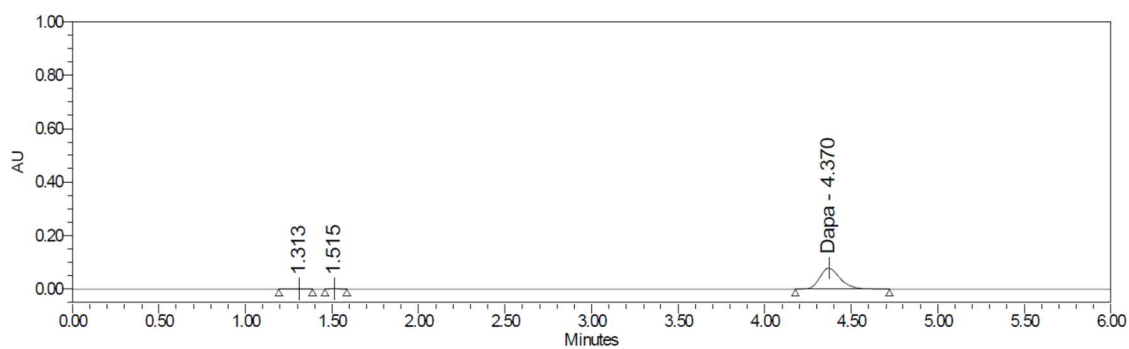
**Figura 4.115 Cromatograma do Ativo X - Compostos relacionados – HCl 2N, 7 dias**



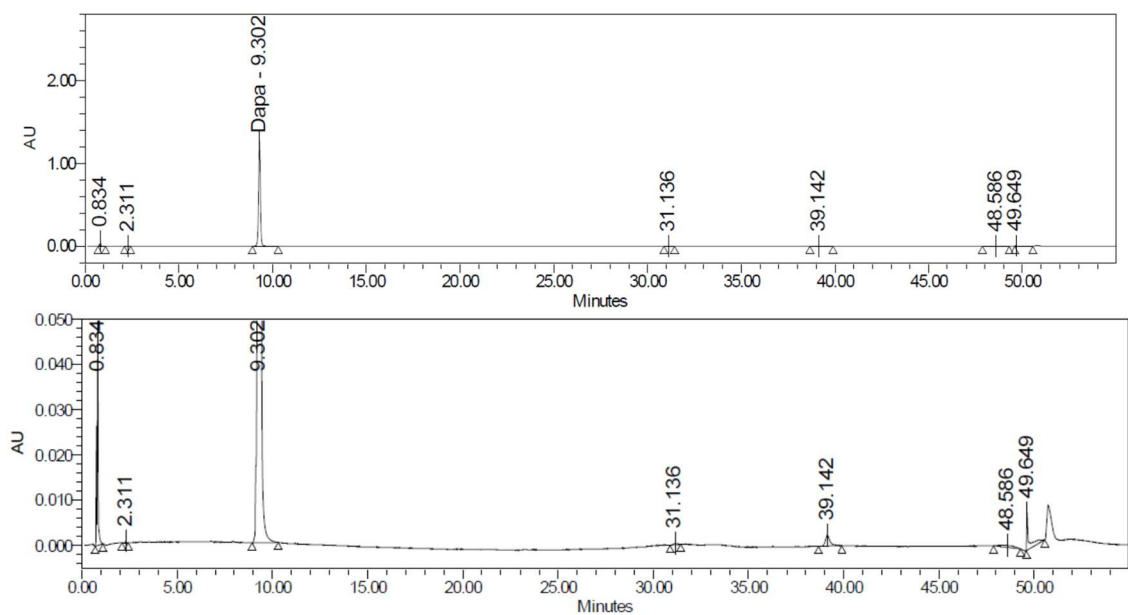
**Figura 4.116 Cromatograma do Ativo X - Doseamento – HCl 2N, 14 dias**



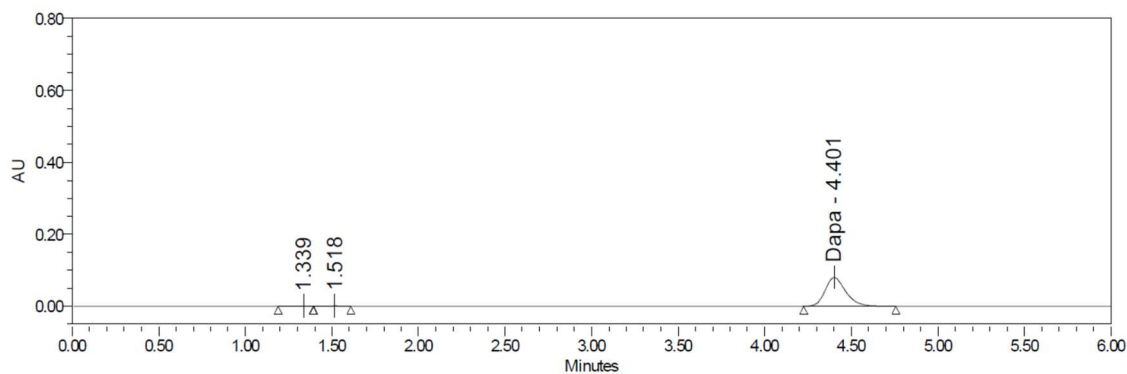
**Figura 4.117 Cromatograma do Ativo X - Compostos relacionados – HCl 2N, 14 dias**



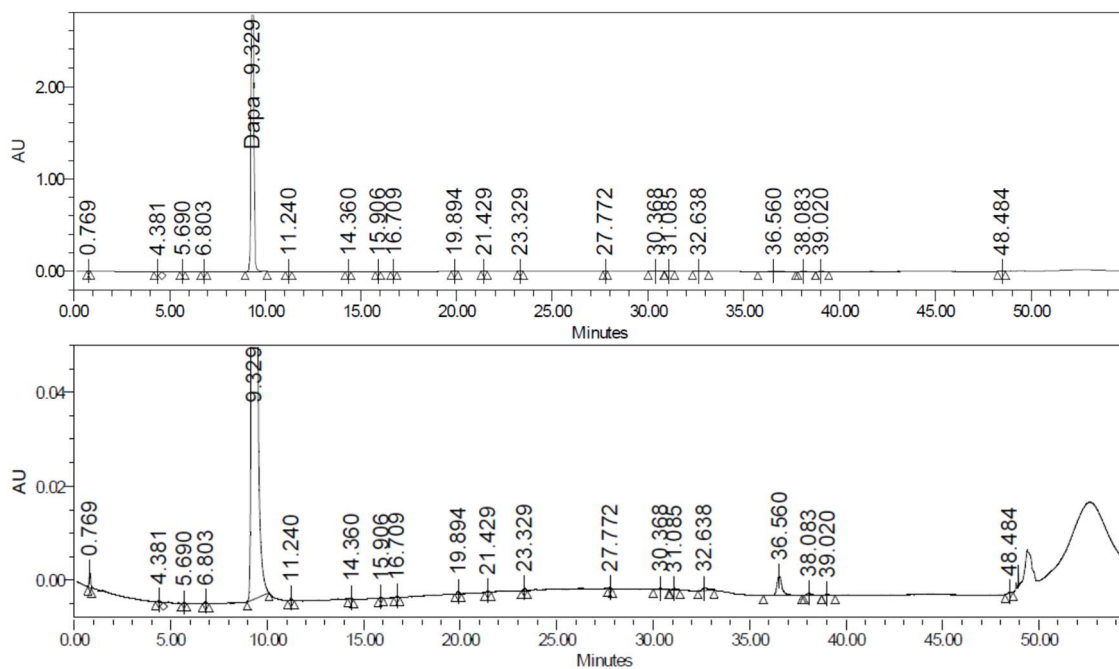
**Figura 4.118 Cromatograma do Ativo X - Doseamento – HCl 3N, 7 dias**



**Figura 4.119 Cromatograma do Ativo X - Compostos relacionados – HCl 3N, 7 dias**

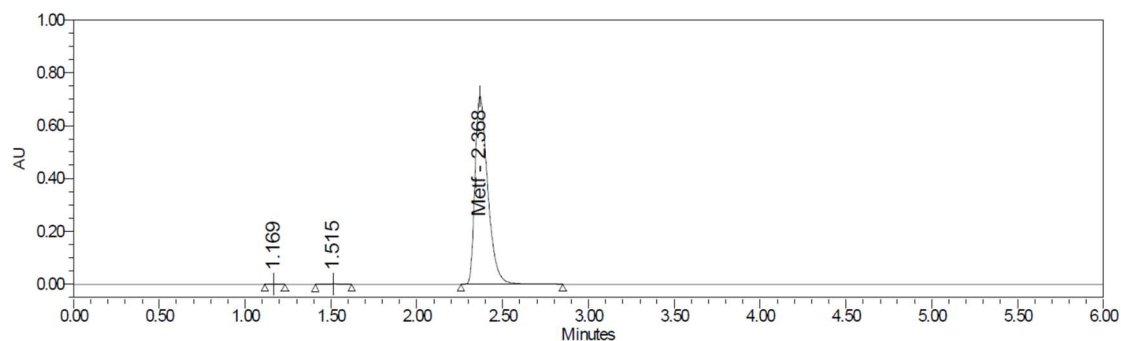


**Figura 4.120 Cromatograma do Ativo X - Doseamento – HCl 3N, 14 dias**

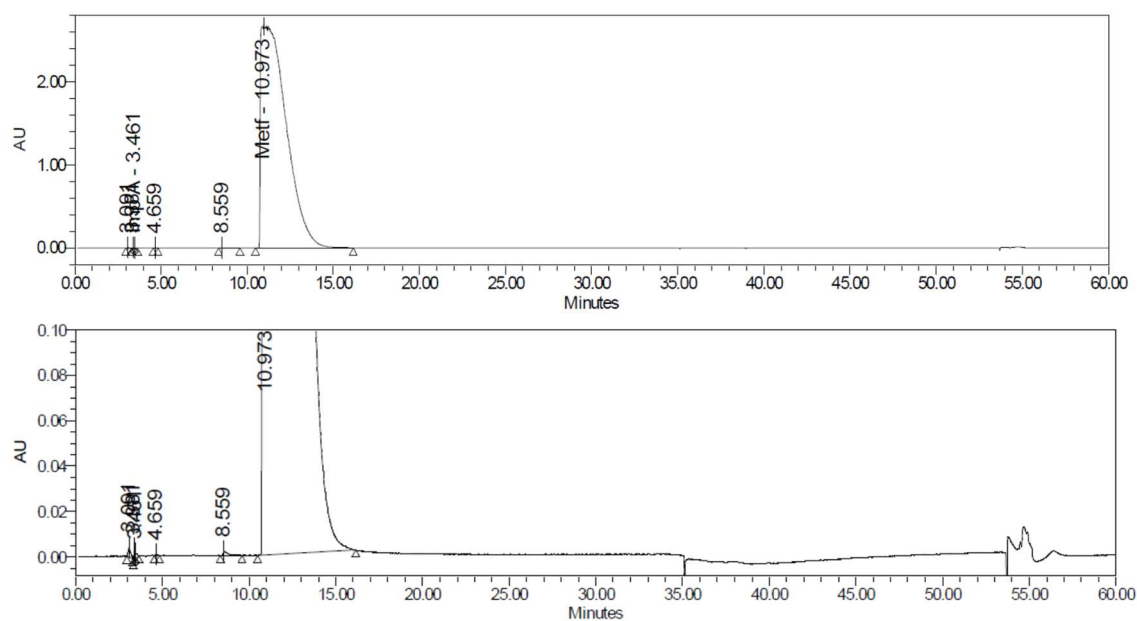


**Figura 4.121 Cromatograma do Ativo X - Compostos relacionados – HCl 3N, 14 dias**

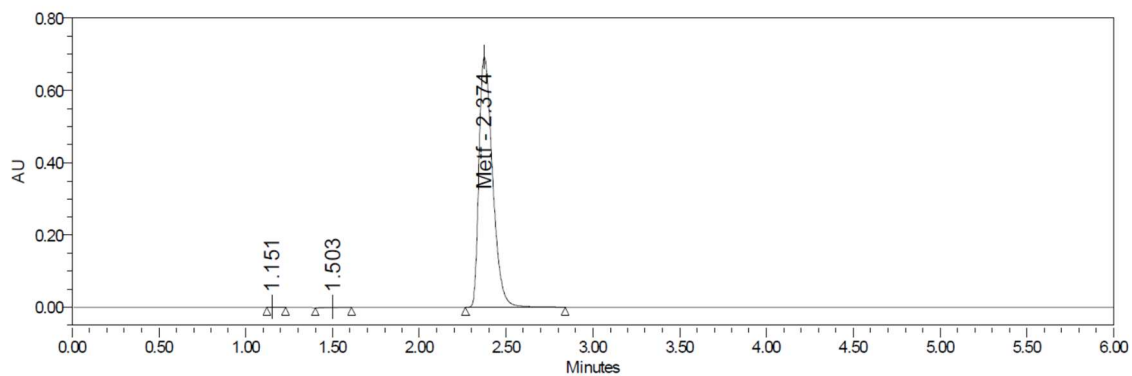
Nas figuras 4.122 a 4.134 estão representados os cromatogramas obtidos para o Ativo Y no método de doseamento, compostos relacionados e impureza F.



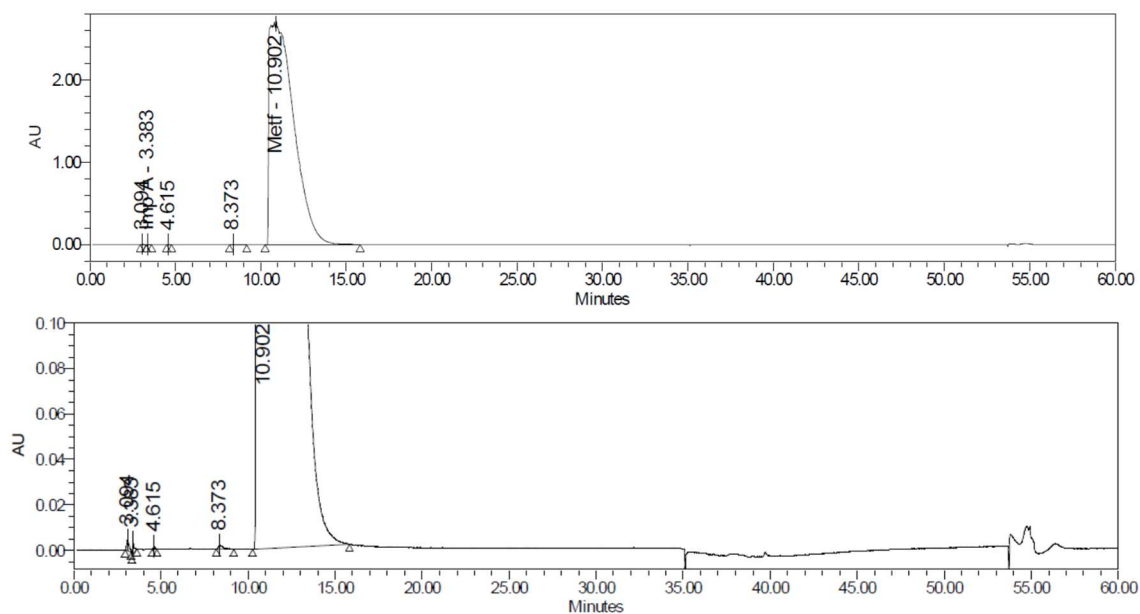
**Figura 4.122 Cromatograma do Ativo Y - Doseamento – HCl 1N, 7 dias**



**Figura 4.123 Cromatograma do Ativo Y - Compostos relacionados – HCl 1N, 7 dias**

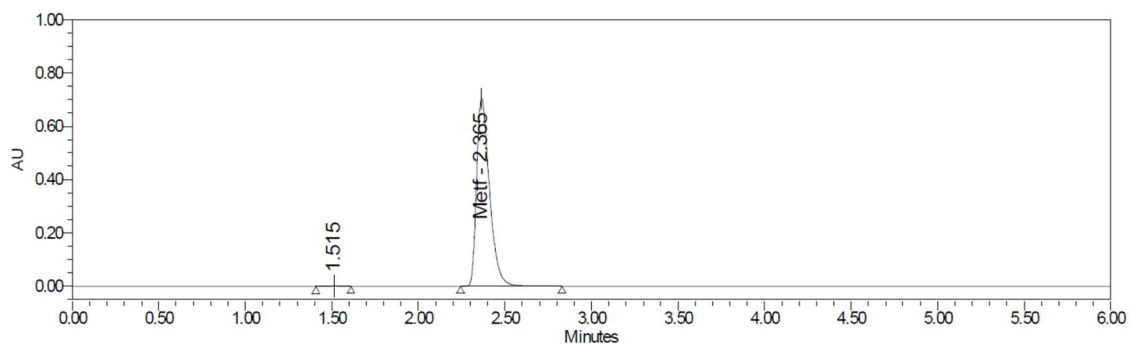


**Figura 4.124 Cromatograma do Ativo Y - Doseamento – HCl 1N, 14 dias**

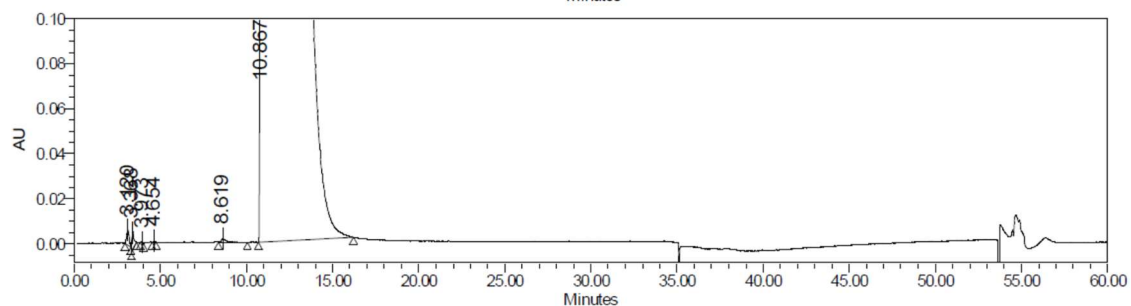
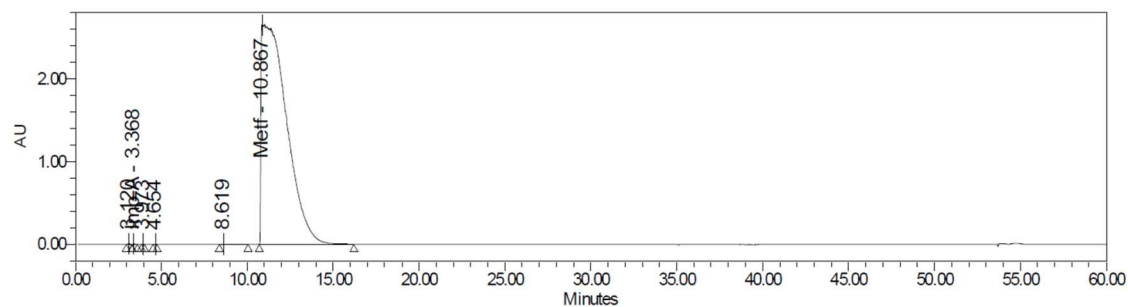


**Figura 4.125 Cromatograma do Ativo Y - Compostos relacionados – HCl 1N, 14 dias**

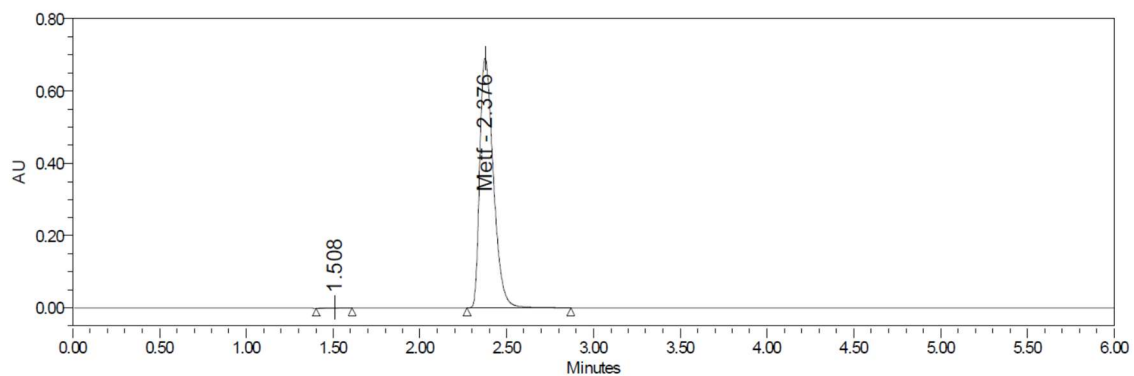




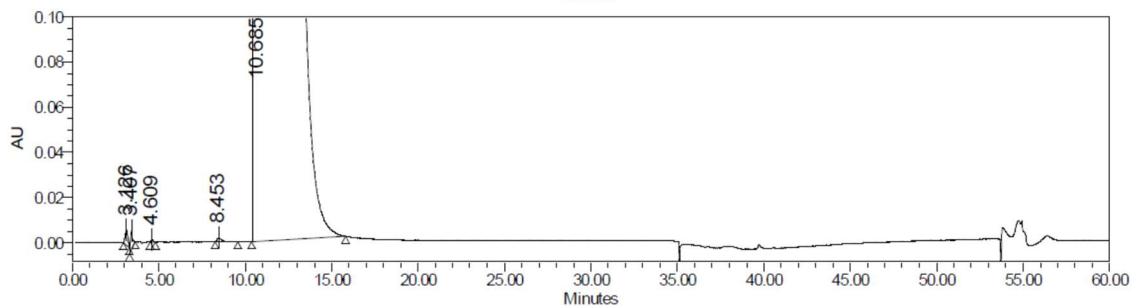
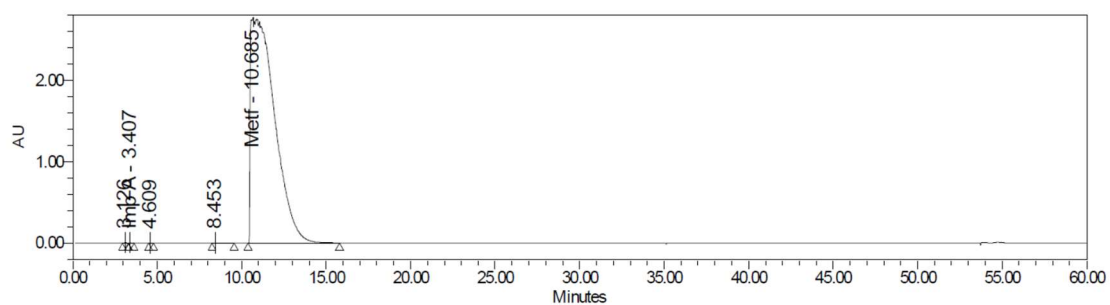
**Figura 4.126 Cromatograma do Ativo Y - Doseamento – HCl 2N, 7 dias**



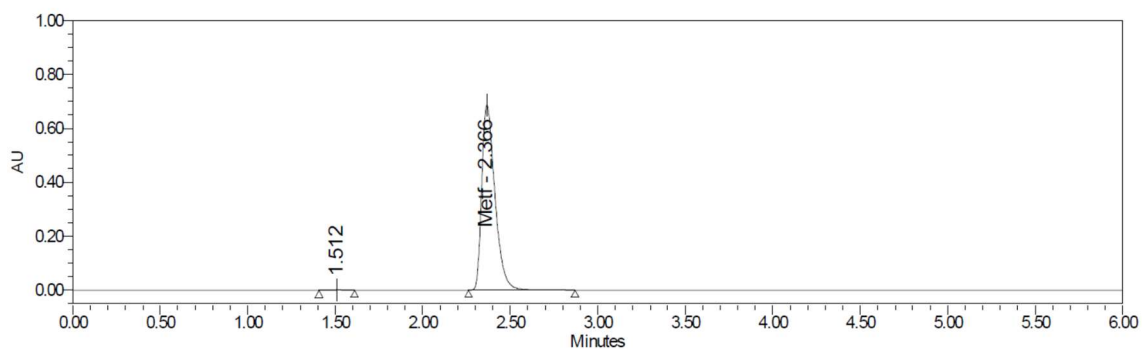
**Figura 4.127 Cromatograma do Ativo Y - Compostos relacionados – HCl 2N, 7 dias**



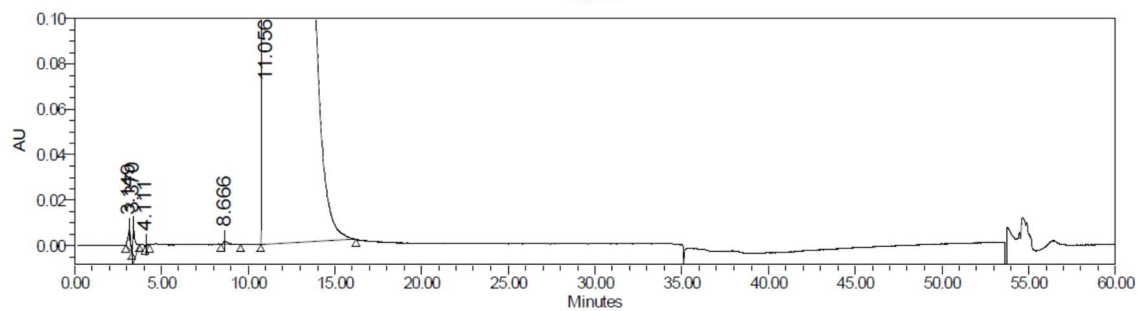
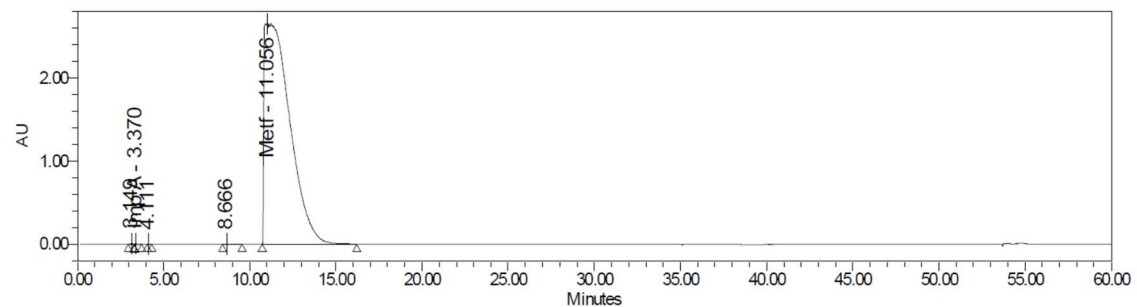
**Figura 4.128 Cromatograma do Ativo Y - Doseamento – HCl 2N, 14 dias**



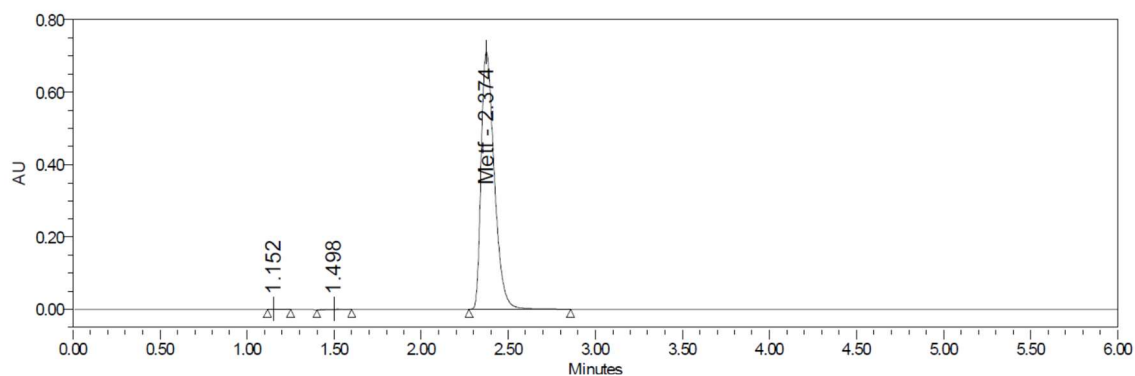
**Figura 4.129** Cromatograma do Ativo Y - Compostos relacionados – HCl 2N, 14 dias



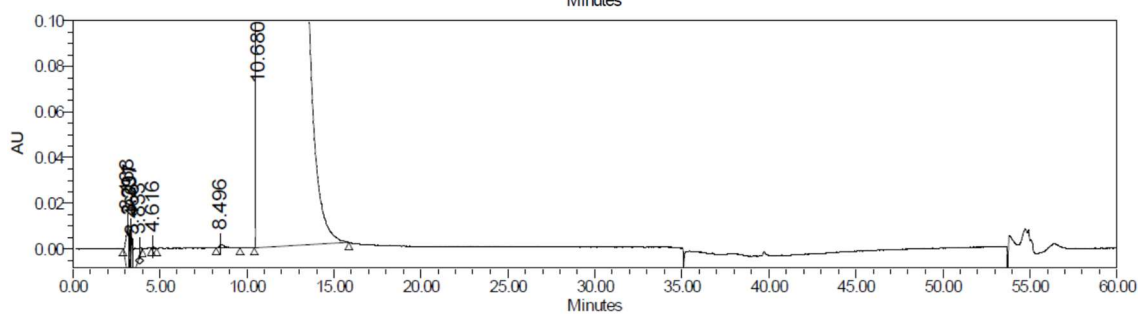
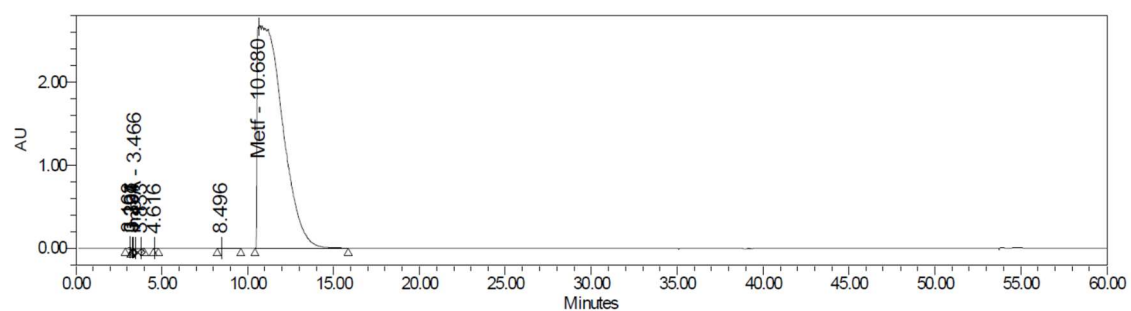
**Figura 4.130** Cromatograma do Ativo Y - Doseamento – HCl 3N, 7 dias



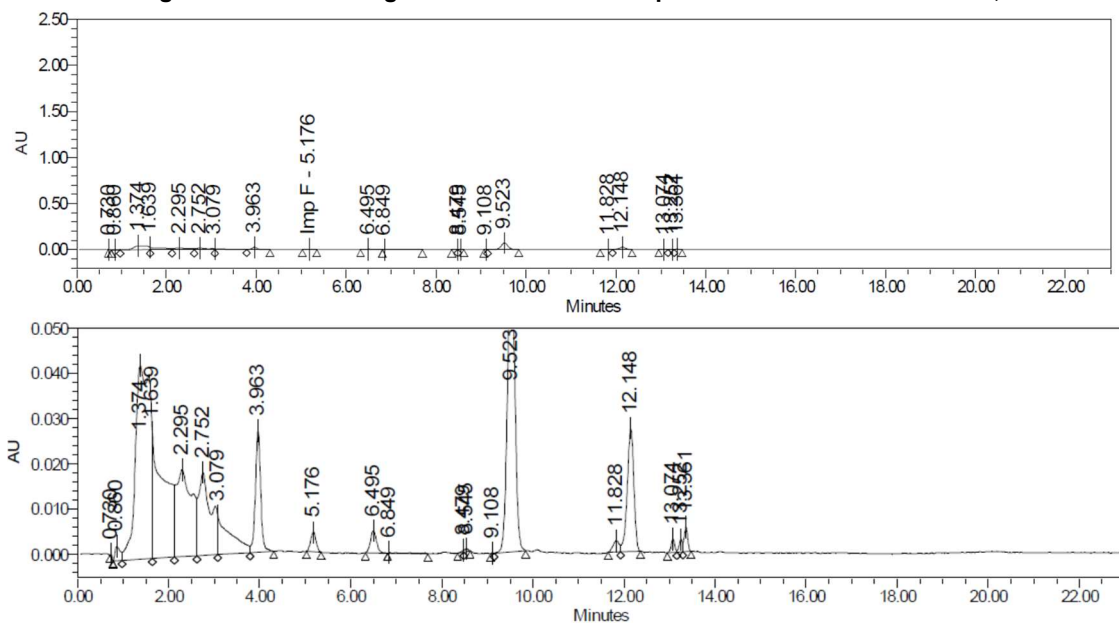
**Figura 4.131** Cromatograma do Ativo Y - Compostos relacionados – HCl 3N, 7 dias



**Figura 4.132 Cromatograma do Ativo Y - Doseamento – HCl 3N, 14 dias**



**Figura 4.133 Cromatograma do Ativo Y - Compuestos relacionados – HCl 3N, 14 dias**



**Figura 4.134 Cromatograma do Ativo Y - Impureza F do Ativo Y – HCl 1N, 14 dias**

#### 4.8.4. Cromatogramas de diluentes e soluções em branco – Hidrólise Ácida

Nas figuras 4.135 a 4.144 estão representados os cromatogramas dos diluentes e das soluções em branco. Estes foram comparados com os cromatogramas das substâncias ativas para que os picos referentes a diluentes e reagentes não fossem quantificados erradamente como impurezas de degradação.

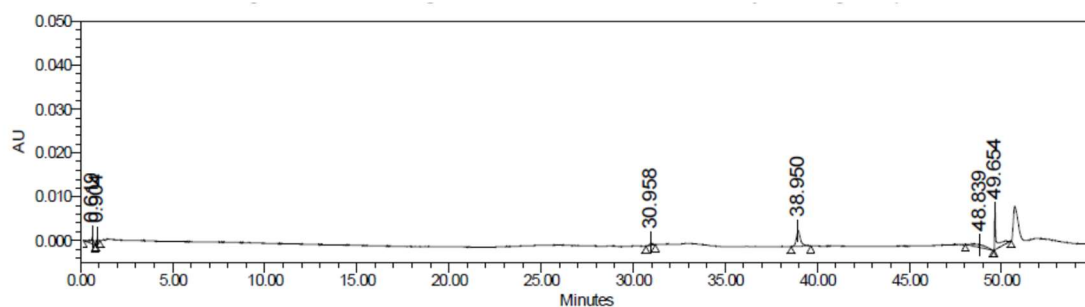


Figura 4.135 Cromatograma de diluente - Compostos relacionados Ativo X

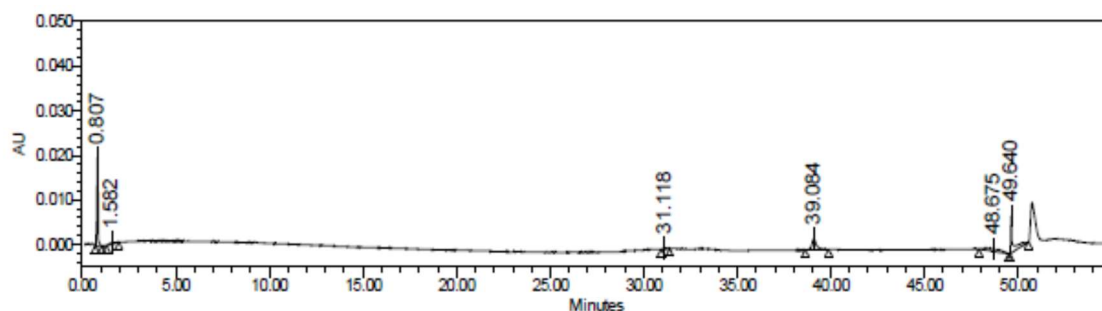


Figura 4.136 Cromatograma de branco - HCl 1N - Compostos relacionados Ativo X

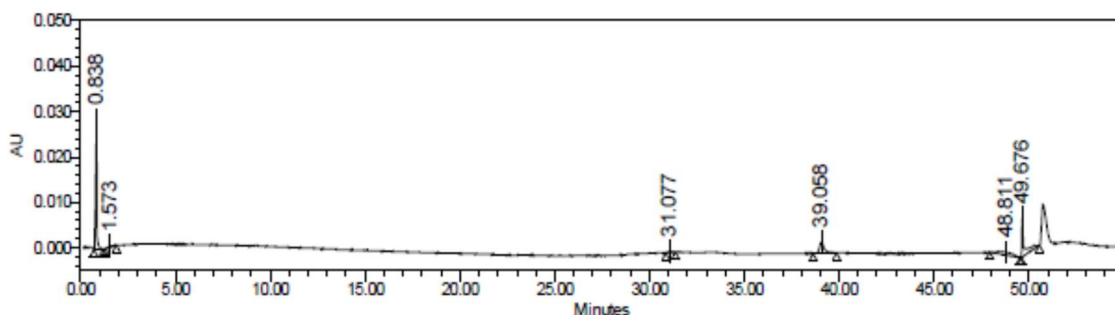


Figura 4.137 Cromatograma de branco - HCl 2N - Compostos relacionados Ativo X

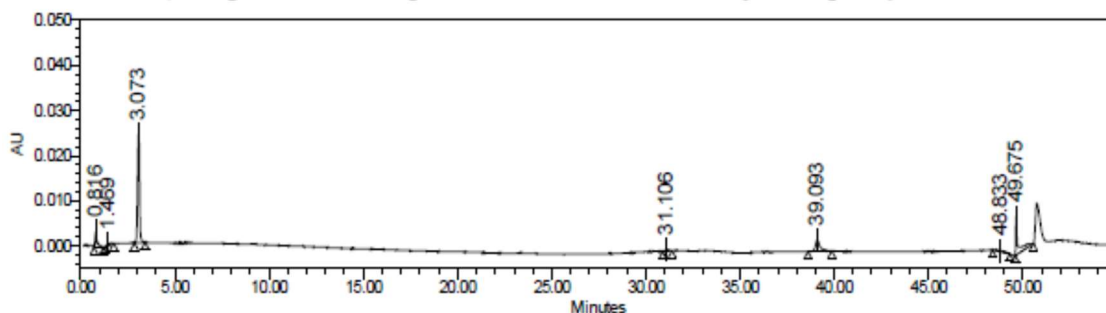
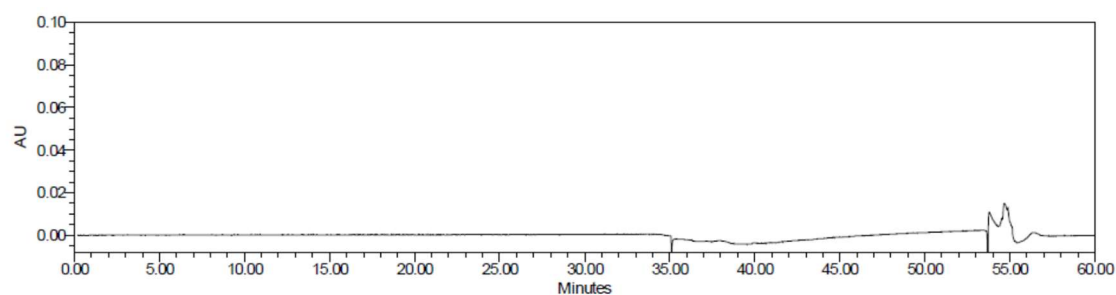
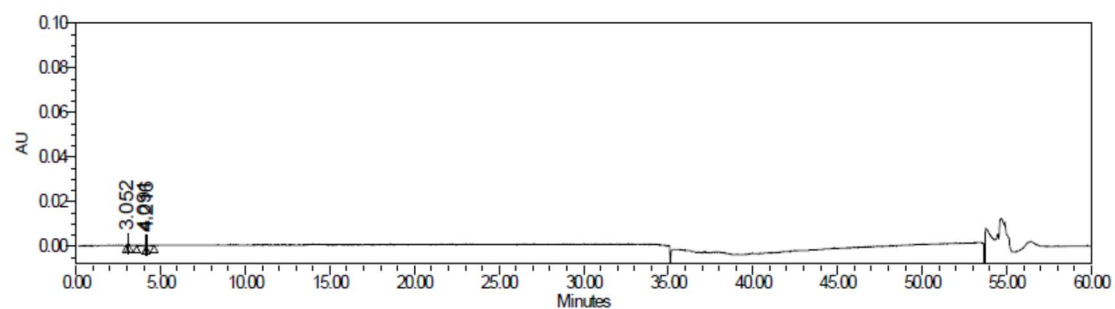


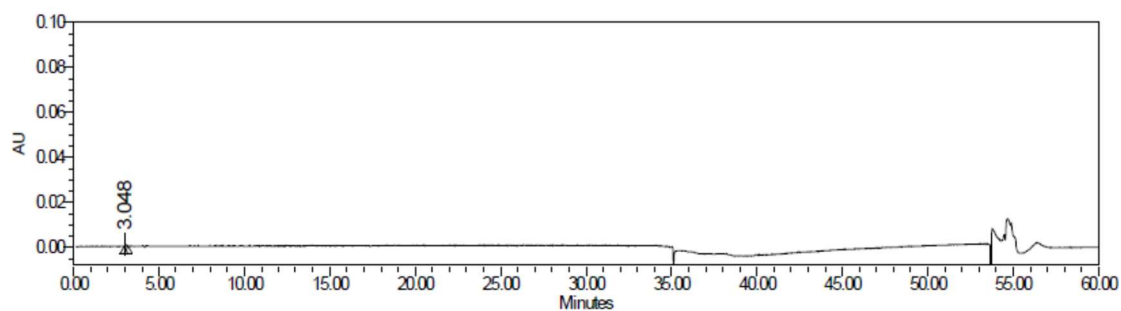
Figura 4.138 Cromatograma de branco - HCl 3N - Compostos relacionados Ativo X



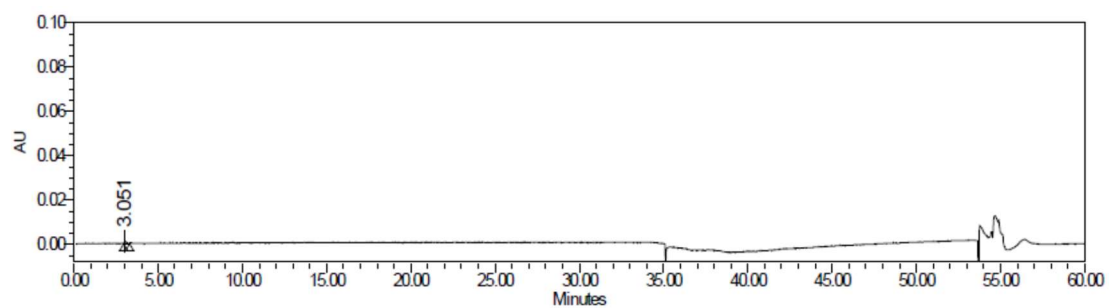
**Figura 4.139** Cromatograma de diluente - Compostos relacionados Ativo Y



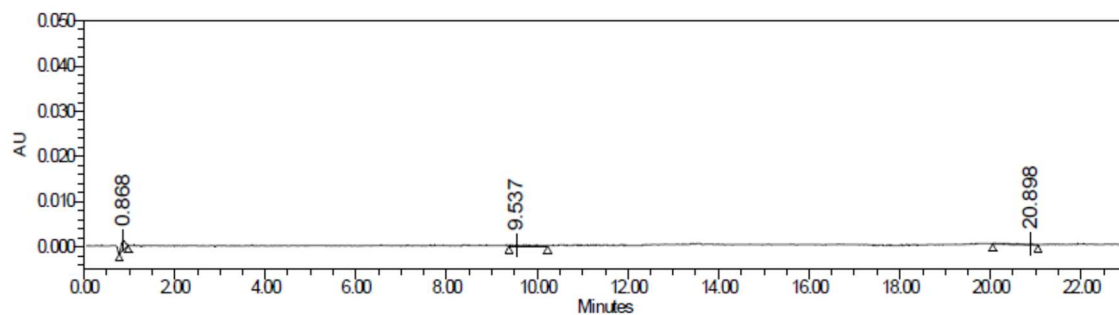
**Figura 4.140** Cromatograma de branco - HCl 1N - Compostos relacionados Ativo Y



**Figura 4.141** Cromatograma de branco - HCl 2N - Compostos relacionados Ativo Y



**Figura 4.142** Cromatograma de branco - HCl 3N - Compostos relacionados Ativo Y



**Figura 4.143** Cromatograma de diluente – Impureza F do Ativo Y

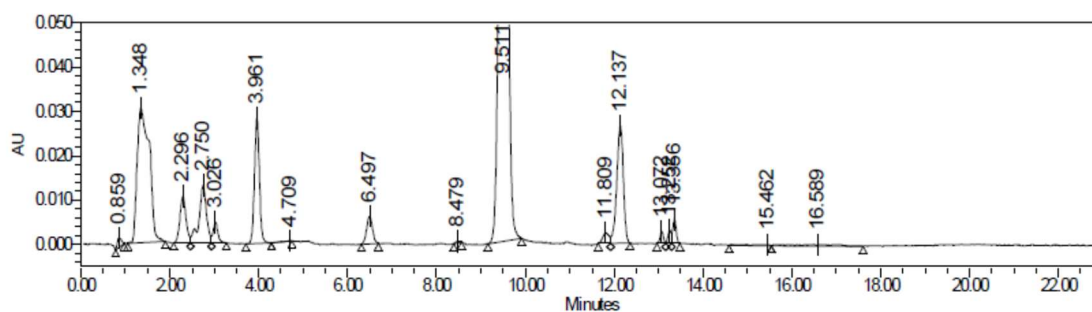


Figura 4.144 Cromatograma de branco – HCl 1N – Impureza F do Ativo Y

#### 4.9. Oxidação

Amostras de Ativo X e Ativo Y foram expostas a várias concentrações de peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ) durante 7 e 14 dias. Após a exposição, as amostras foram analisadas de acordo com os métodos de doseamento e compostos relacionados. Foi, ainda, realizada a quantificação de Impureza F na amostra de Ativo Y com uma concentração de 10% de peróxido de hidrogénio depois de 14 dias.

##### 4.9.1. Ativo X

Na tabela 4.21 estão representados os resultados obtidos após exposição do Ativo X a várias concentrações de peróxido de hidrogénio.

Tabela 4.21 Resultados do Ativo X após exposição a oxidação

| Condição / Duração      | Doseamento |              |                  | Compostos Relacionados |               |             |              |                  | Balanço mássico (%) |
|-------------------------|------------|--------------|------------------|------------------------|---------------|-------------|--------------|------------------|---------------------|
|                         | Teor (%)   | Purity angle | Purity threshold | TRR                    | Impurezas     | Teor (%)    | Purity angle | Purity threshold |                     |
| 10% $H_2O_2$<br>7 dias  | 95,81      | 0,107        | 0,284            | 0,38                   | Desconhecida  | 0,084       | 5,09         | 9,20             | 3,8                 |
|                         |            |              |                  | 0,49                   | Desconhecida  | 0,079       |              |                  |                     |
|                         |            |              |                  | 0,54                   | Desconhecida  | 0,080       |              |                  |                     |
|                         |            |              |                  | 0,57                   | Desconhecida  | 0,098       |              |                  |                     |
|                         |            |              |                  | ---                    | <b>Total:</b> | <b>0,34</b> |              |                  |                     |
| 10% $H_2O_2$<br>14 dias | 100,2      | 0,106        | 0,285            | 0,38                   | Desconhecida  | 0,104       | 11,1         | 30,6             | 0,6                 |
|                         |            |              |                  | 0,55                   | Desconhecida  | 0,087       |              |                  |                     |
|                         |            |              |                  | 0,57                   | Desconhecida  | 0,119       |              |                  |                     |
|                         |            |              |                  | ---                    | <b>Total:</b> | <b>0,31</b> |              |                  |                     |
|                         |            |              |                  |                        |               |             |              |                  |                     |
| 20% $H_2O_2$<br>7 dias  | 96,24      | 0,104        | 0,282            | 0,38                   | Desconhecida  | 0,103       | 2,83         | 3,15             | 3,3                 |
|                         |            |              |                  | 0,49                   | Desconhecida  | 0,089       |              |                  |                     |
|                         |            |              |                  | 0,54                   | Desconhecida  | 0,080       |              |                  |                     |
|                         |            |              |                  | 0,57                   | Desconhecida  | 0,109       |              |                  |                     |
|                         |            |              |                  | ---                    | <b>Total:</b> | <b>0,38</b> |              |                  |                     |
| 20% $H_2O_2$<br>14 dias | 100,0      | 0,111        | 0,287            | 0,38                   | Desconhecida  | 0,147       | 4,28         | 7,50             | 0,6                 |
|                         |            |              |                  | 0,50                   | Desconhecida  | 0,052       |              |                  |                     |
|                         |            |              |                  | 0,51                   | Desconhecida  | 0,045       |              |                  |                     |
|                         |            |              |                  | 0,55                   | Desconhecida  | 0,086       |              |                  |                     |
|                         |            |              |                  | 0,57                   | Desconhecida  | 0,143       |              |                  |                     |
|                         |            |              |                  | 0,85                   | Desconhecida  | 0,055       |              |                  |                     |
|                         |            |              |                  | ---                    | <b>Total:</b> | <b>0,53</b> |              |                  |                     |

Tabela 4.21 Resultados do Ativo X após exposição a oxidação (continuação)

| Condição / Duração                    | Doseamento |              |                  | Compostos Relacionados |               |             |              |                  | Balanço mássico (%) |
|---------------------------------------|------------|--------------|------------------|------------------------|---------------|-------------|--------------|------------------|---------------------|
|                                       | Teor (%)   | Purity angle | Purity threshold | TRR                    | Impurezas     | Teor (%)    | Purity angle | Purity threshold |                     |
| 30% $\text{H}_2\text{O}_2$<br>7 dias  | 97,17      | 0,115        | 0,293            | 0,38                   | Desconhecida  | 0,105       | 6,78         | 11,2             | 2,4                 |
|                                       |            |              |                  | 0,49                   | Desconhecida  | 0,090       |              |                  |                     |
|                                       |            |              |                  | 0,54                   | Desconhecida  | 0,070       |              |                  |                     |
|                                       |            |              |                  | 0,57                   | Desconhecida  | 0,100       |              |                  |                     |
|                                       |            |              |                  | ---                    | <b>Total:</b> | <b>0,37</b> |              |                  |                     |
| 30% $\text{H}_2\text{O}_2$<br>14 dias | 100,0      | 0,170        | 0,312            | 0,38                   | Desconhecida  | 0,157       | 4,08         | 6,79             | 0,6                 |
|                                       |            |              |                  | 0,50                   | Desconhecida  | 0,050       |              |                  |                     |
|                                       |            |              |                  | 0,51                   | Desconhecida  | 0,049       |              |                  |                     |
|                                       |            |              |                  | 0,55                   | Desconhecida  | 0,073       |              |                  |                     |
|                                       |            |              |                  | 0,57                   | Desconhecida  | 0,129       |              |                  |                     |
|                                       |            |              |                  | 0,85                   | Desconhecida  | 0,06        |              |                  |                     |
|                                       |            |              |                  | ---                    | <b>Total:</b> | <b>0,52</b> |              |                  |                     |

O Ativo X apresentou alguma sensibilidade perante a oxidação. Apesar de não haver alterações significativas no seu teor no método de doseamento, com diminuições inferiores a 10%, houve a formação de diversas impurezas desconhecidas. O teor total das impurezas oscilou entre 0,3% e 0,5%, consoante a concentração de reagente e o tempo de exposição.

Entre as várias condições de oxidação, as impurezas formadas apresentam tempos de retenção relativos semelhantes, o que indica que serão as mesmas impurezas. Com a exposição a 10%  $\text{H}_2\text{O}_2$  e 30%  $\text{H}_2\text{O}_2$  durante 14 dias, houve um aumento do número de impurezas desconhecidas (6 impurezas).

Relativamente à pureza do pico do ativo, temos que o valor de *purity angle* é inferior ao de *purity threshold*, o que evidencia essa pureza.

Os balanços de massa são inferiores a 10%.

As condições de oxidação utilizadas foram demasiado fortes, não sendo esperadas em condições normais de utilização e armazenamento do ativo, no entanto seria importante proteger o Ativo X de condições oxidativas.

#### 4.9.2. Ativo Y

Na tabela 4.22 estão representados os resultados obtidos após exposição do Ativo Y a várias concentrações de peróxido de hidrogénio.

Tabela 4.22 Resultados do Ativo Y após exposição a oxidação

| Condição / Duração                    | Doseamento |              |                  | Compostos Relacionados |               |             |              |                  | Balanço mássico (%) |
|---------------------------------------|------------|--------------|------------------|------------------------|---------------|-------------|--------------|------------------|---------------------|
|                                       | Teor (%)   | Purity angle | Purity threshold | TRR                    | Impurezas     | Teor (%)    | Purity angle | Purity threshold |                     |
| 10% $\text{H}_2\text{O}_2$<br>7 dias  | 92,85      | 0,268        | 0,085            | 0,28                   | Desconhecida  | 0,286       | 6,80         | 4,35             | 0,6                 |
|                                       |            |              |                  | 0,30                   | Desconhecida  | 7,151       |              |                  |                     |
|                                       |            |              |                  | 0,42                   | Desconhecida  | 0,083       |              |                  |                     |
|                                       |            |              |                  | 0,53                   | Desconhecida  | 0,254       |              |                  |                     |
|                                       |            |              |                  | 0,58                   | Desconhecida  | 0,022       |              |                  |                     |
|                                       |            |              |                  | 0,62                   | Desconhecida  | 0,110       |              |                  |                     |
|                                       |            |              |                  | 0,75                   | Desconhecida  | 0,107       |              |                  |                     |
|                                       |            |              |                  | 0,85                   | Desconhecida  | 0,031       |              |                  |                     |
|                                       |            |              |                  | ---                    | <b>Total:</b> | <b>8,04</b> |              |                  |                     |
|                                       |            |              |                  |                        |               |             |              |                  |                     |
| 10% $\text{H}_2\text{O}_2$<br>14 dias | 88,32      | 0,083        | 0,263            | 0,28                   | Desconhecida  | 0,915       | 6,14         | 4,26             | 1,1                 |
|                                       |            |              |                  | 0,31                   | Desconhecida  | 7,035       |              |                  |                     |
|                                       |            |              |                  | 0,43                   | Desconhecida  | 0,128       |              |                  |                     |
|                                       |            |              |                  | 0,54                   | Desconhecida  | 0,238       |              |                  |                     |
|                                       |            |              |                  | 0,58                   | Desconhecida  | 0,058       |              |                  |                     |
|                                       |            |              |                  | 0,62                   | Desconhecida  | 0,116       |              |                  |                     |
|                                       |            |              |                  | 0,76                   | Desconhecida  | 0,160       |              |                  |                     |
|                                       |            |              |                  | ---                    | Impureza F    | 2,298       |              |                  |                     |
|                                       |            |              |                  | ---                    | <b>Total:</b> | <b>10,9</b> |              |                  |                     |
|                                       |            |              |                  |                        |               |             |              |                  |                     |
| 20% $\text{H}_2\text{O}_2$<br>7 dias  | 80,42      | 0,082        | 0,264            | 0,27                   | Desconhecida  | 1,078       | 6,41         | 3,94             | 10                  |
|                                       |            |              |                  | 0,30                   | Desconhecida  | 8,509       |              |                  |                     |
|                                       |            |              |                  | 0,39                   | Desconhecida  | 0,030       |              |                  |                     |
|                                       |            |              |                  | 0,42                   | Desconhecida  | 0,171       |              |                  |                     |
|                                       |            |              |                  | 0,52                   | Desconhecida  | 0,282       |              |                  |                     |
|                                       |            |              |                  | 0,56                   | Desconhecida  | 0,071       |              |                  |                     |
|                                       |            |              |                  | 0,61                   | Desconhecida  | 0,098       |              |                  |                     |
|                                       |            |              |                  | 0,74                   | Desconhecida  | 0,091       |              |                  |                     |
|                                       |            |              |                  | 0,84                   | Desconhecida  | 0,029       |              |                  |                     |
|                                       |            |              |                  | ---                    | <b>Total:</b> | <b>10,4</b> |              |                  |                     |
|                                       |            |              |                  |                        |               |             |              |                  |                     |
| 20% $\text{H}_2\text{O}_2$<br>14 dias | 67,01      | 0,082        | 0,263            | 0,28                   | Desconhecida  | 2,715       | 4,23         | 3,91             | 21                  |
|                                       |            |              |                  | 0,30                   | Desconhecida  | 8,296       |              |                  |                     |
|                                       |            |              |                  | 0,36                   | Desconhecida  | 0,015       |              |                  |                     |
|                                       |            |              |                  | 0,40                   | Desconhecida  | 0,065       |              |                  |                     |
|                                       |            |              |                  | 0,41                   | Desconhecida  | 0,189       |              |                  |                     |
|                                       |            |              |                  | 0,52                   | Desconhecida  | 0,228       |              |                  |                     |
|                                       |            |              |                  | 0,56                   | Desconhecida  | 0,142       |              |                  |                     |
|                                       |            |              |                  | 0,60                   | Desconhecida  | 0,219       |              |                  |                     |
|                                       |            |              |                  | 0,79                   | Desconhecida  | 0,076       |              |                  |                     |
|                                       |            |              |                  | ---                    | <b>Total:</b> | <b>11,9</b> |              |                  |                     |



Tabela 4.22 Resultados do Ativo Y após exposição a oxidação (continuação)

| Condição / Duração                    | Doseamento |              |                  | Compostos Relacionados |               |             |              |                  | Balanço mássico (%) |
|---------------------------------------|------------|--------------|------------------|------------------------|---------------|-------------|--------------|------------------|---------------------|
|                                       | Teor (%)   | Purity angle | Purity threshold | TRR                    | Impurezas     | Teor (%)    | Purity angle | Purity threshold |                     |
| 30% $\text{H}_2\text{O}_2$<br>7 dias  | 64,41      | 0,083        | 0,259            | 0,27                   | Desconhecida  | 2,731       | 3,79         | 3,48             | 23                  |
|                                       |            |              |                  | 0,29                   | Desconhecida  | 9,632       |              |                  |                     |
|                                       |            |              |                  | 0,38                   | Desconhecida  | 0,060       |              |                  |                     |
|                                       |            |              |                  | 0,41                   | Desconhecida  | 0,193       |              |                  |                     |
|                                       |            |              |                  | 0,51                   | Desconhecida  | 0,295       |              |                  |                     |
|                                       |            |              |                  | 0,55                   | Desconhecida  | 0,140       |              |                  |                     |
|                                       |            |              |                  | 0,60                   | Desconhecida  | 0,130       |              |                  |                     |
|                                       |            |              |                  | 0,73                   | Desconhecida  | 0,029       |              |                  |                     |
|                                       |            |              |                  | 0,78                   | Desconhecida  | 0,035       |              |                  |                     |
|                                       |            |              |                  | ---                    | <b>Total:</b> | <b>13,2</b> |              |                  |                     |
|                                       |            |              |                  |                        |               |             |              |                  |                     |
| 30% $\text{H}_2\text{O}_2$<br>14 dias | 40,86      | 0,074        | 0,256            | 0,27                   | Desconhecida  | 4,301       | 2,218        | 2,236            | 45                  |
|                                       |            |              |                  | 0,29                   | Desconhecida  | 8,806       |              |                  |                     |
|                                       |            |              |                  | 0,35                   | Desconhecida  | 0,054       |              |                  |                     |
|                                       |            |              |                  | 0,38                   | Desconhecida  | 0,142       |              |                  |                     |
|                                       |            |              |                  | 0,40                   | Desconhecida  | 0,111       |              |                  |                     |
|                                       |            |              |                  | 0,43                   | Desconhecida  | 0,016       |              |                  |                     |
|                                       |            |              |                  | 0,50                   | Desconhecida  | 0,173       |              |                  |                     |
|                                       |            |              |                  | 0,54                   | Desconhecida  | 0,234       |              |                  |                     |
|                                       |            |              |                  | 0,58                   | Desconhecida  | 0,293       |              |                  |                     |
|                                       |            |              |                  | 0,77                   | Desconhecida  | 0,055       |              |                  |                     |
|                                       |            |              |                  | ---                    | <b>Total:</b> | <b>14,7</b> |              |                  |                     |

O Ativo Y demonstrou ser vulnerável quando exposta a condições oxidativas. A partir da condição com exposição a peróxido de hidrogénio 20% durante 14 dias, as diminuições de teor de ativo no método de doseamento ultrapassam os 30%, assim como os balaços mássicos estão acima de 10%. Foram detetadas entre 8 e 10 impurezas desconhecidas, sendo que as principais apresentam um tempo de retenção relativo na ordem dos 0,28 e 0,30 e um teor superior a 0,2% e 7,1%, respetivamente.

Durante a oxidação as substâncias oxidadas que se formam podem sair juntas na frente de solvente, devido à sua polaridade, o que dificulta a sua identificação, uma vez que o HPLC apenas identifica as substâncias pelo tempo de retenção. Esta situação verificou-se e a impureza com um tempo de retenção relativo na ordem dos 0,30 estava a ser identificada como Impureza A devido ao tempo de retenção semelhante. No entanto, tudo indica que não se trate dessa impureza, uma vez que não existem evidências do seu aparecimento nestas condições e o seu espectro não corresponde ao da Impureza A, pelo que se identificou a impureza como desconhecida. Esta impureza poderá ser a Impureza E, uma vez que para a oxidação do Ativo Y estão propostos mecanismos de radicais livres de hidróxido, cujo principal produto de degradação é Impureza E [30, 31].

A impureza F foi detetada na amostra em que foi quantificada (10% $\text{H}_2\text{O}_2$  durante 14 dias) com um teor de 2,3%.

Relativamente à pureza do pico do Ativo Y, o valor de *purity angle* é inferior ao de *purity threshold*, o que evidencia a pureza do pico no método de doseamento. O mesmo não acontece no método de compostos relacionados devido à elevada concentração do ativo, e que leva à

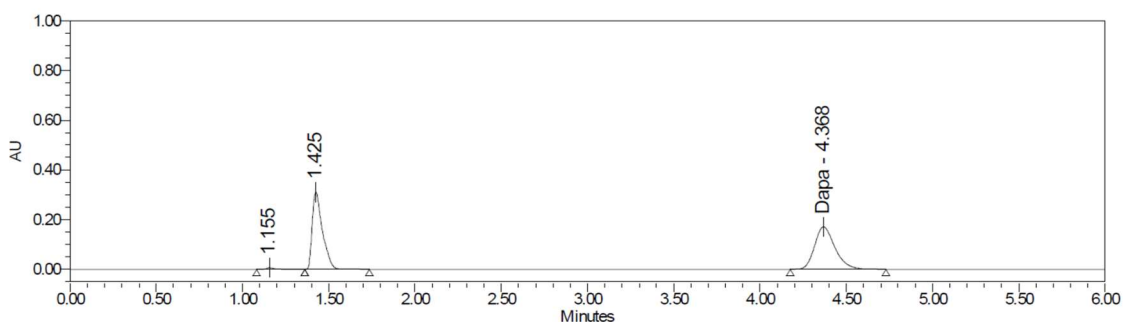
saturação do pico cromatográfico. No entanto, o facto de no método de doseamento se obter pureza do pico e de o método dos compostos relacionados utilizado estar descrito na farmacopeia europeia, é possível afirmar que o pico do Ativo Y é puro.

Estes resultados indicam que o Ativo Y é sensível a condições de oxidação, no entanto não foi possível quantificar a totalidade das impurezas formadas em todas as condições, talvez, devido à sua volatilidade, ou à possibilidade de a degradação ter sido tão agressiva que levou à destruição do grupo cromóforo, e consequente formação de produtos secundários que nada têm a ver com o Ativo Y, impossibilitando a sua deteção ao comprimento de onda utilizado no método [11].

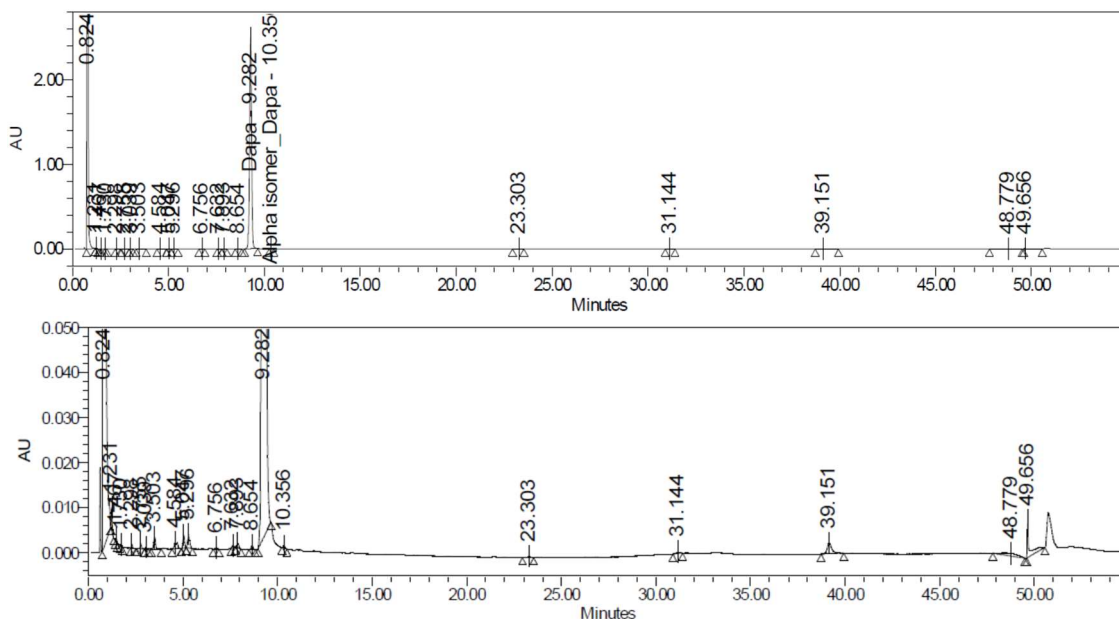
As condições de oxidação utilizadas foram demasiado fortes, não sendo esperadas em condições normais de utilização e armazenamento do ativo, no entanto seria importante proteger o Ativo Y de condições oxidativas.

#### 4.9.3. Cromatogramas do Ativo X e do Ativo Y – Oxidação

Nas figuras 4.145 a 4.156 estão representados os cromatogramas obtidos para o Ativo X no método de doseamento e compostos relacionados, respetivamente.



**Figura 4.145 Cromatograma do Ativo X - Doseamento – 10% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 7 dias**



**Figura 4.146 Cromatograma do Ativo X - Compostos relacionados – 10% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 7 dias**

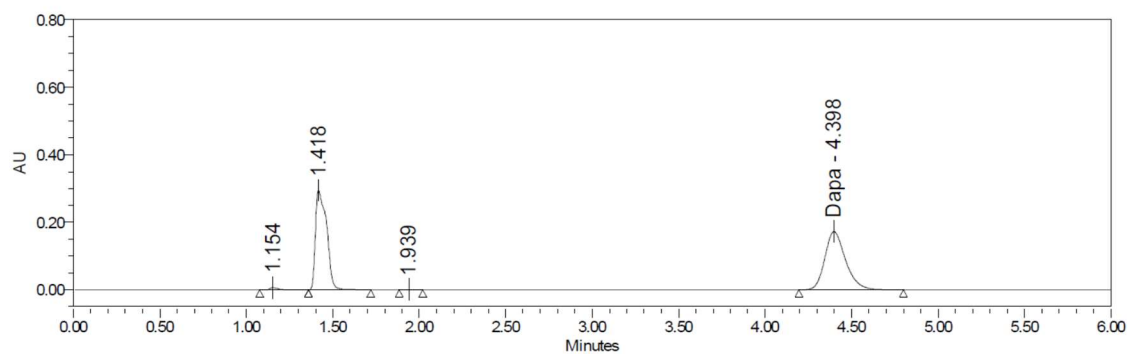


Figura 4.147 Cromatograma do Ativo X - Doseamento – 10% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 14 dias

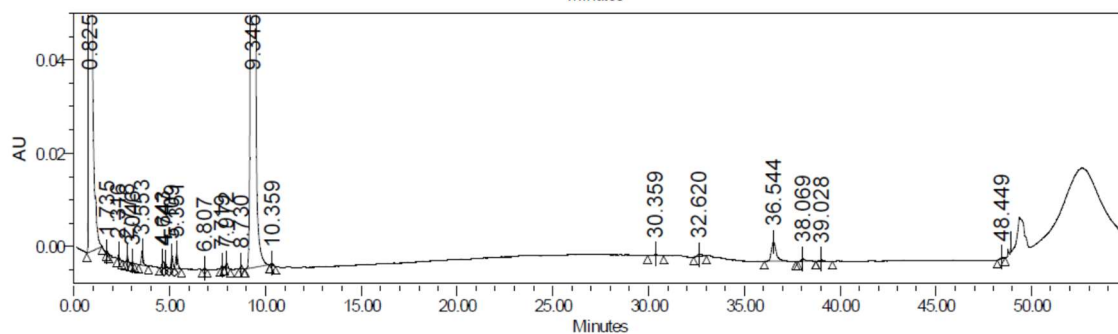
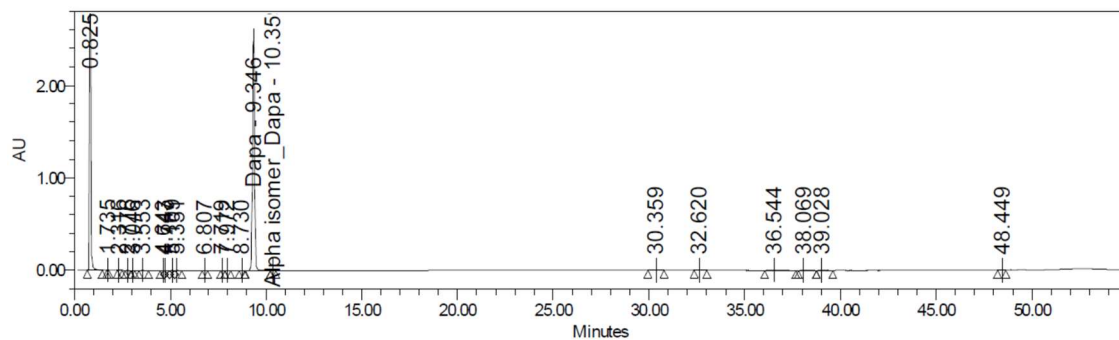


Figura 4.148 Cromatograma do Ativo X - Compostos relacionados – 10% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 14 dias

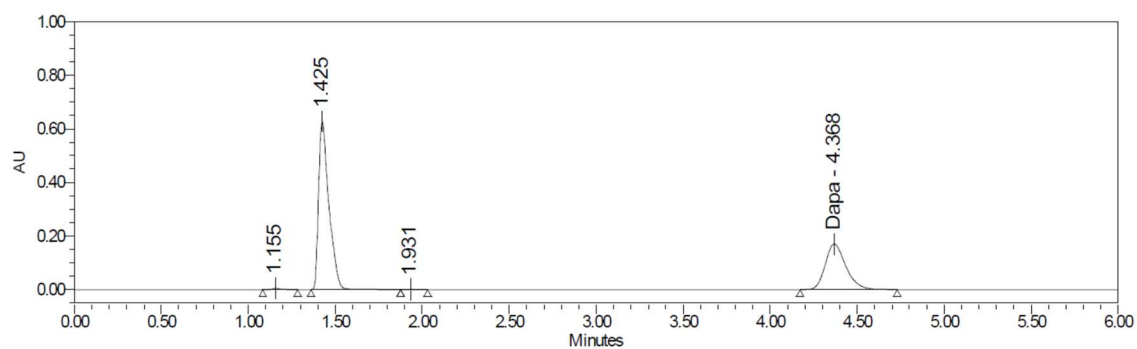
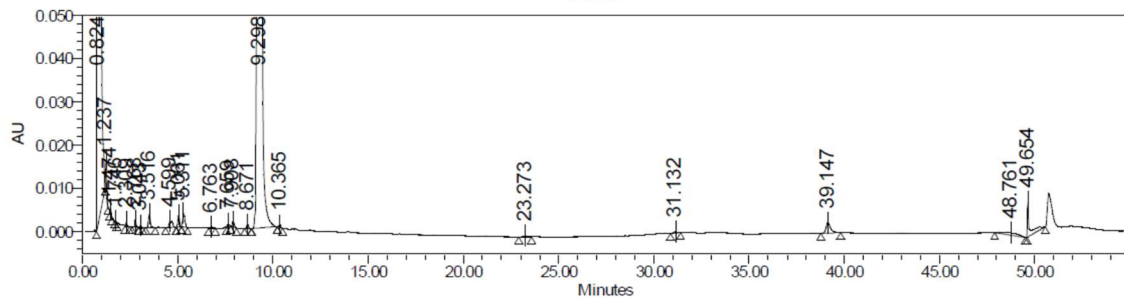
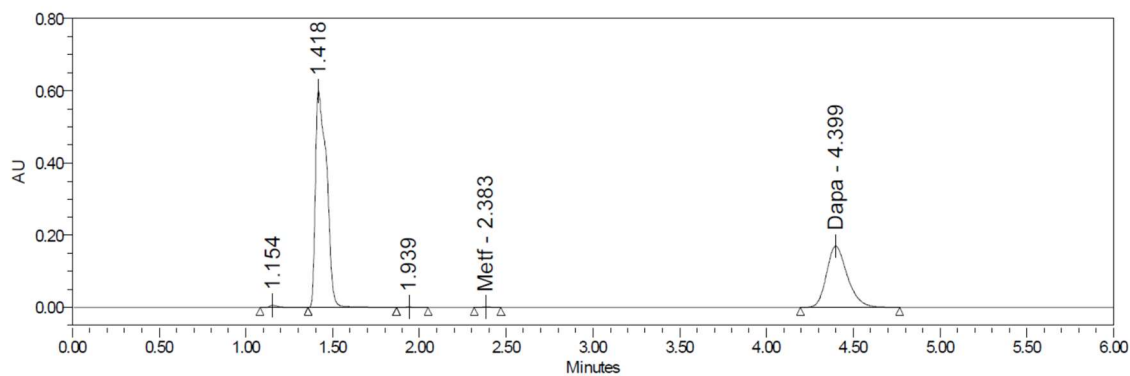


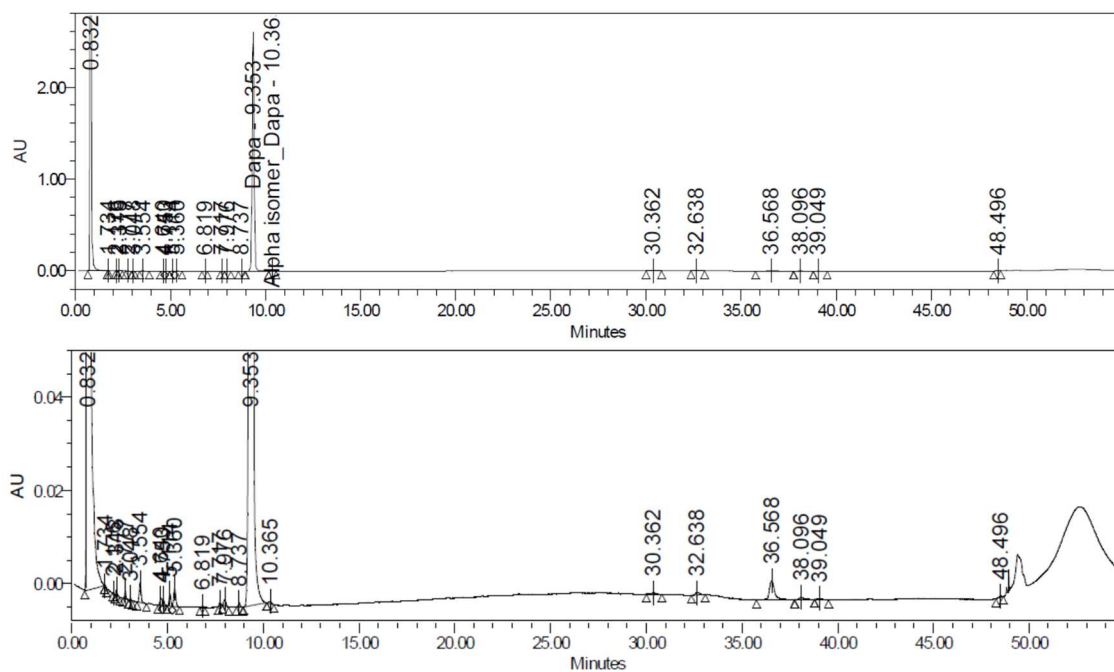
Figura 4.149 Cromatograma do Ativo X - Doseamento – 20% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 7 dias



**Figura 4.150 Cromatograma do Ativo X - Compostos relacionados – 20% $H_2O_2$ , 7 dias**



**Figura 4.151 Cromatograma do Ativo X - Doseamento – 20% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 14 dias**



**Figura 4.152 Cromatograma do Ativo X - Compostos relacionados – 20% $H_2O_2$ , 14 dias**

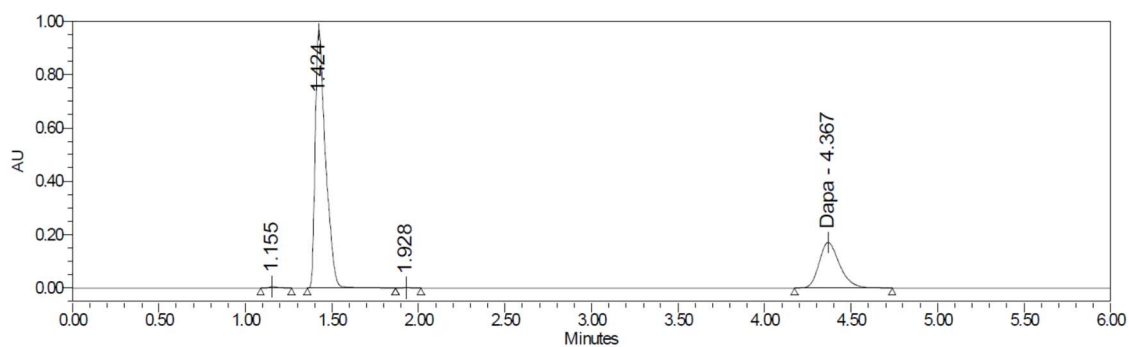


Figura 4.153 Cromatograma do Ativo X - Doseamento – 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 7 dias

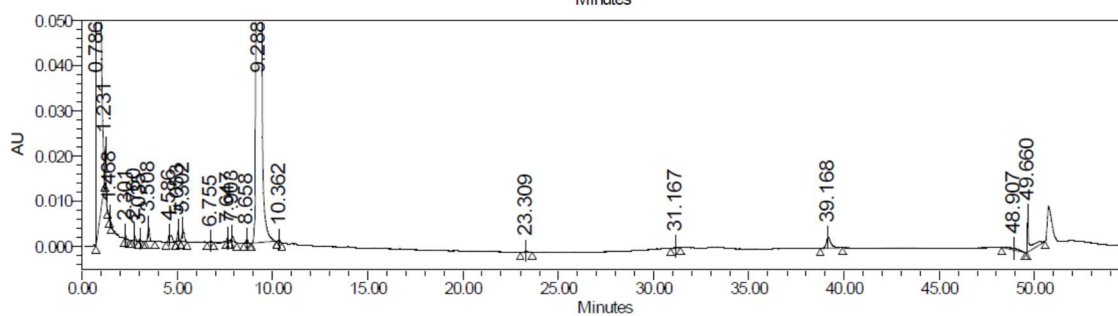
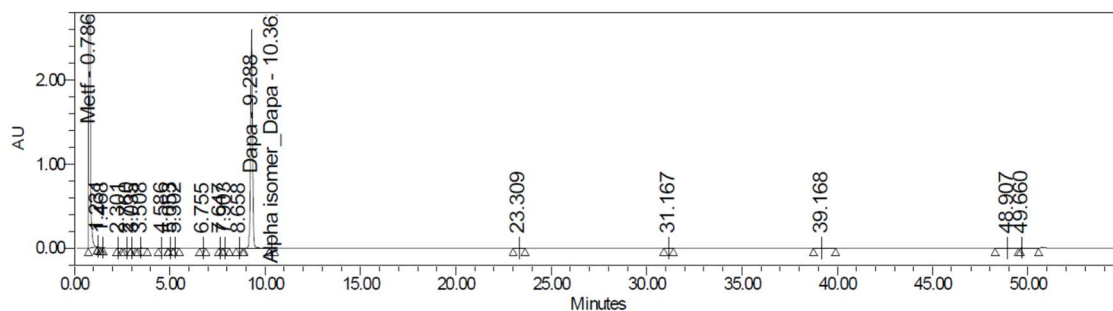


Figura 4.154 Cromatograma do Ativo X - Compostos relacionados – 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 7 dias

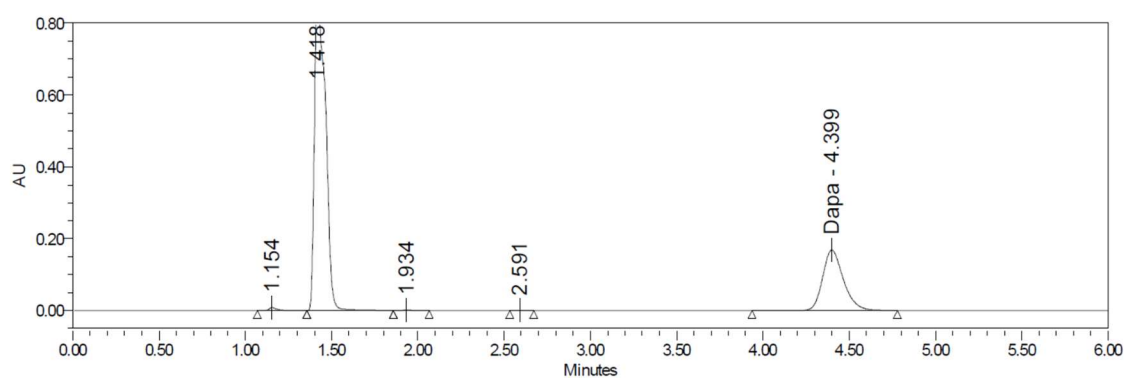
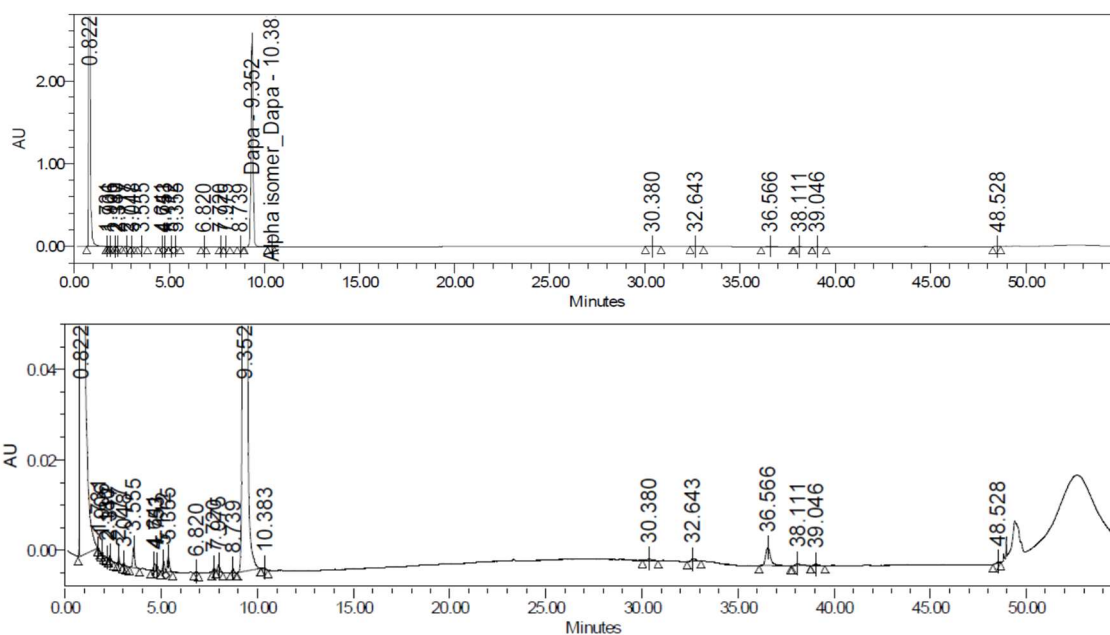
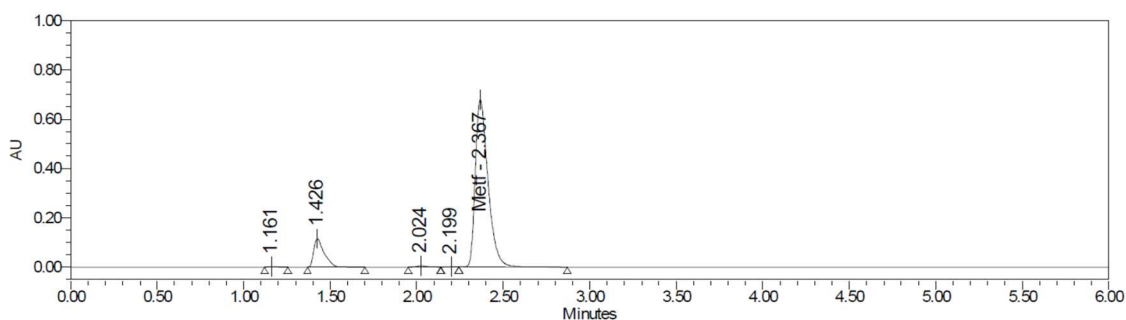


Figura 4.155 Cromatograma do Ativo X - Doseamento – 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 14 dias

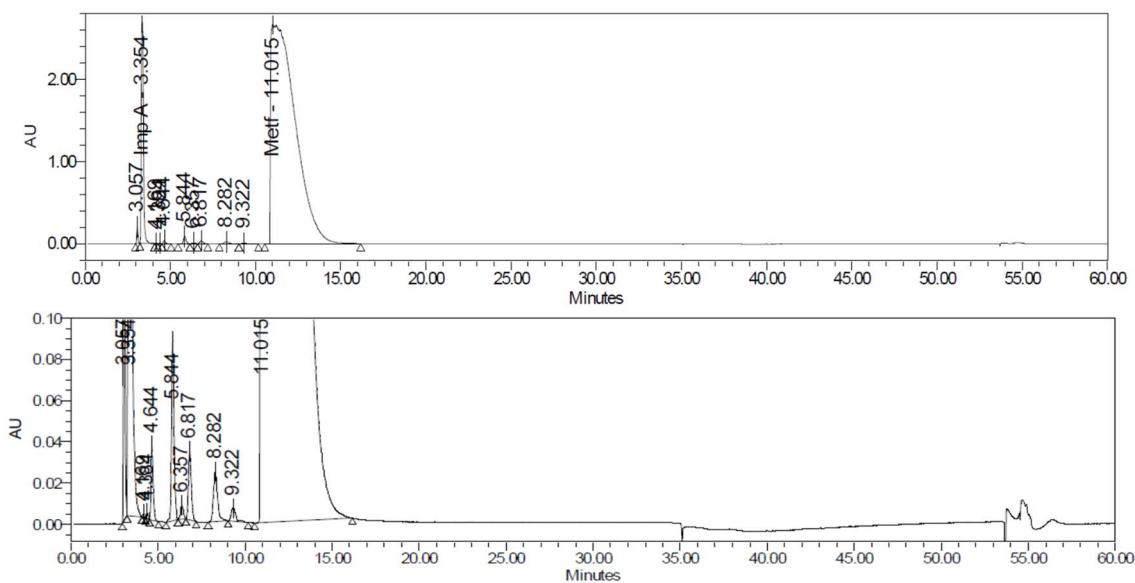


**Figura 4.156 Cromatograma do Ativo X - Compostos relacionados – 30% $\text{H}_2\text{O}_2$ , 14 dias**

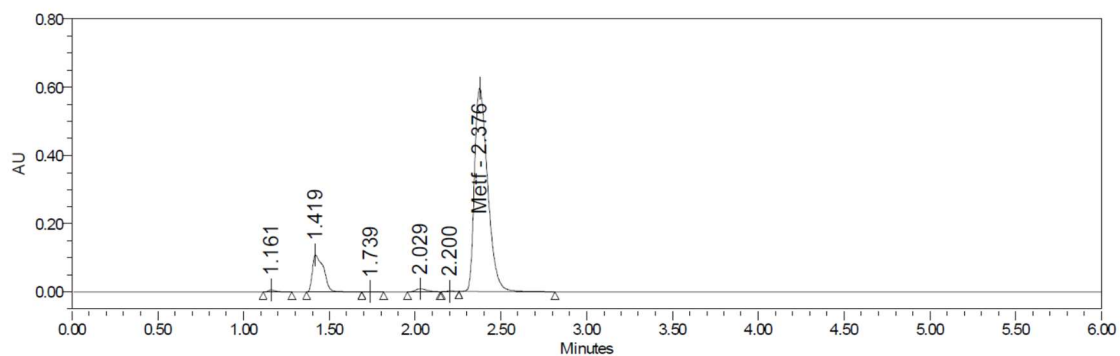
Nas figuras 4.157 a 4.169 estão representados os cromatogramas obtidos para o Ativo Y no método de doseamento, compostos relacionados e impureza F.



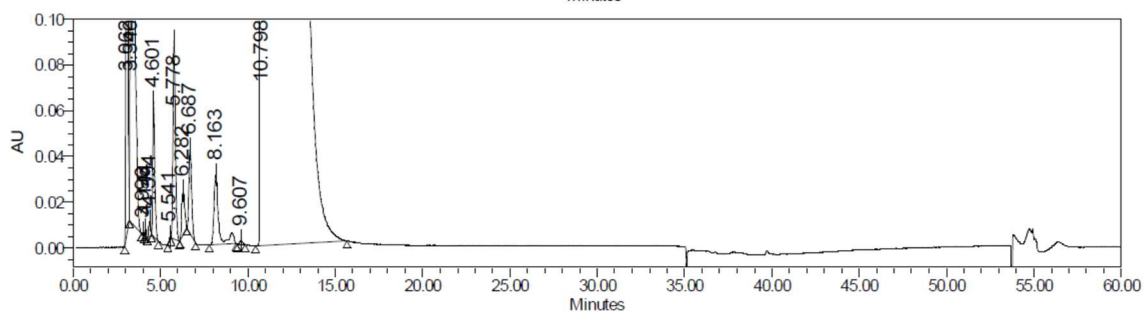
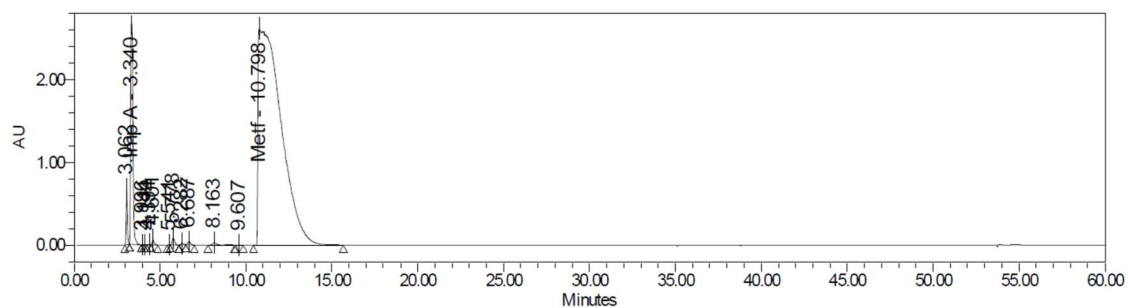
**Figura 4.157 Cromatograma do Ativo Y - Doseamento – 10%  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 7 dias**



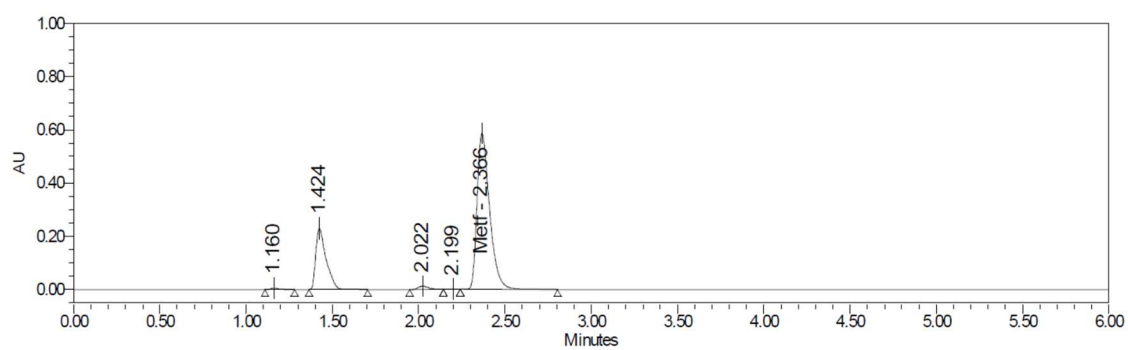
**Figura 4.158 Cromatograma do Ativo Y - Compostos relacionados – 10%  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 7 dias**



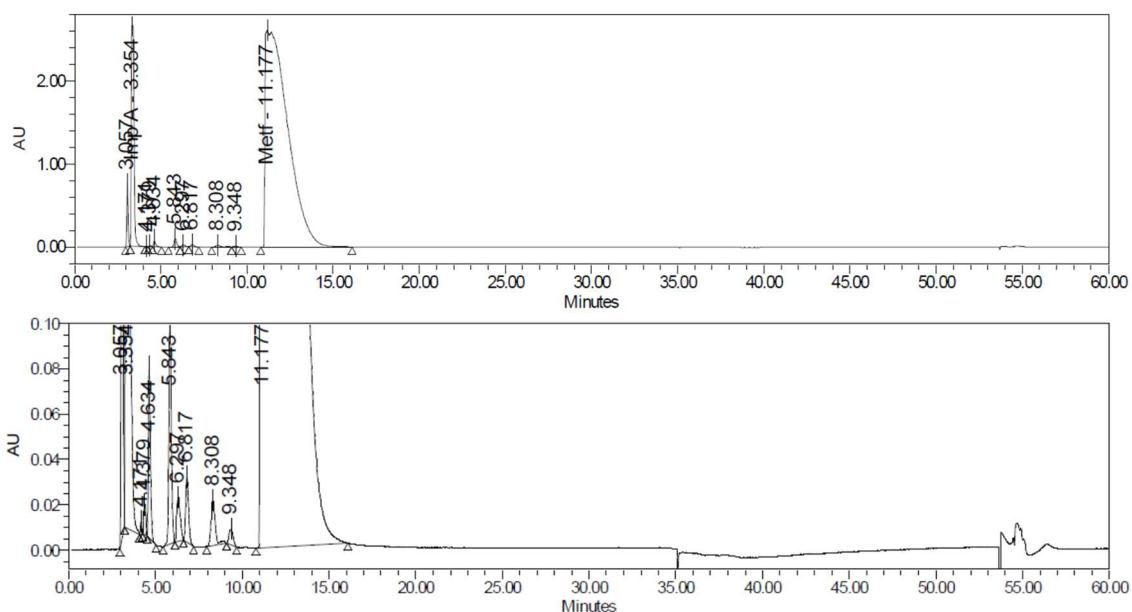
**Figura 4.159 Cromatograma do Ativo Y - Doseamento – 10% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 14 dias**



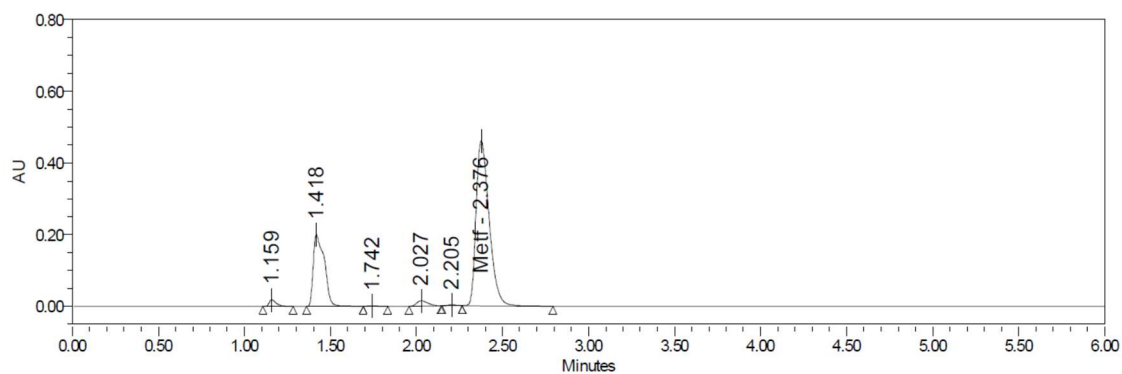
**Figura 4.160 Cromatograma do Ativo Y - Compostos relacionados – 10% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 14 dias**



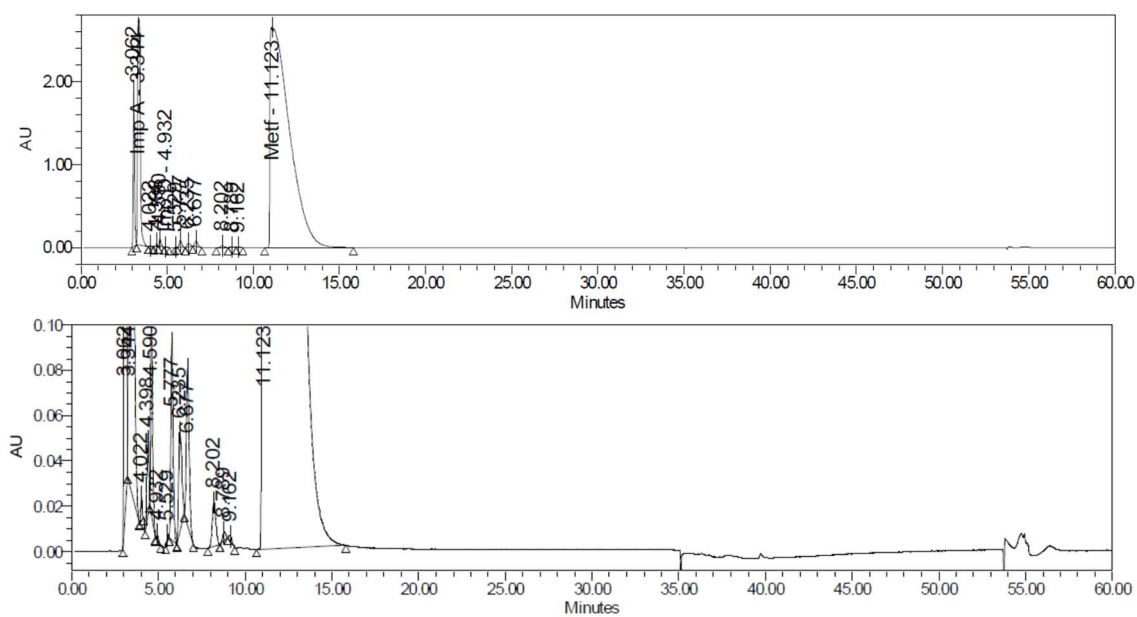
**Figura 4.161 Cromatograma do Ativo Y - Doseamento – 20% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 7 dias**



**Figura 4.162 Cromatograma do Ativo Y - Compostos relacionados – 20% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 7 dias**

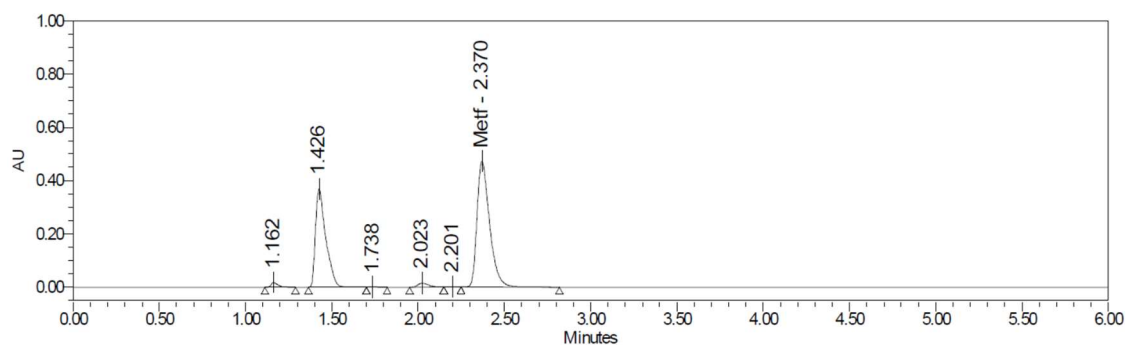


**Figura 4.163 Cromatograma do Ativo Y - Doseamento – 20% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 14 dias**

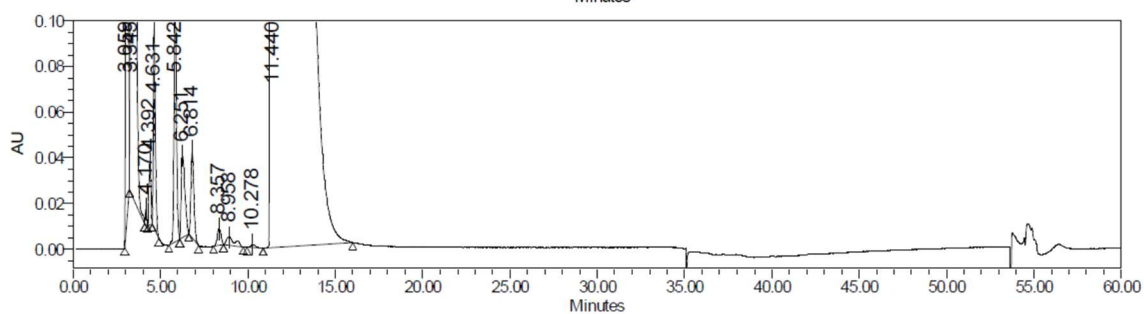
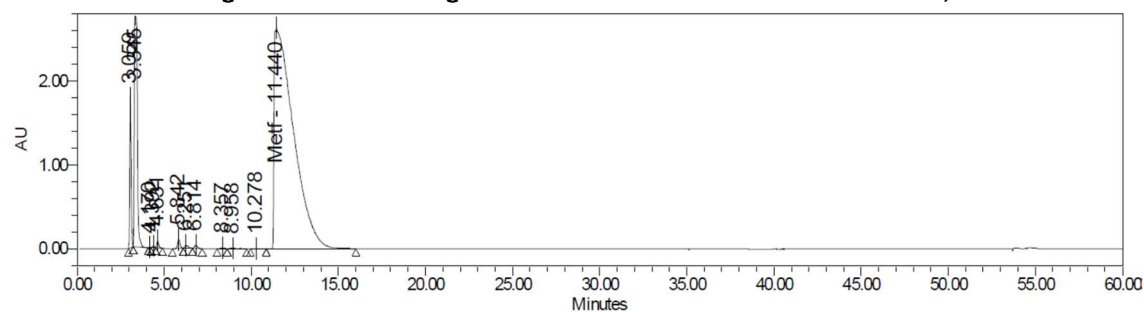


**Figura 4.164 Cromatograma do Ativo Y - Compostos relacionados – 20% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 14 dias**

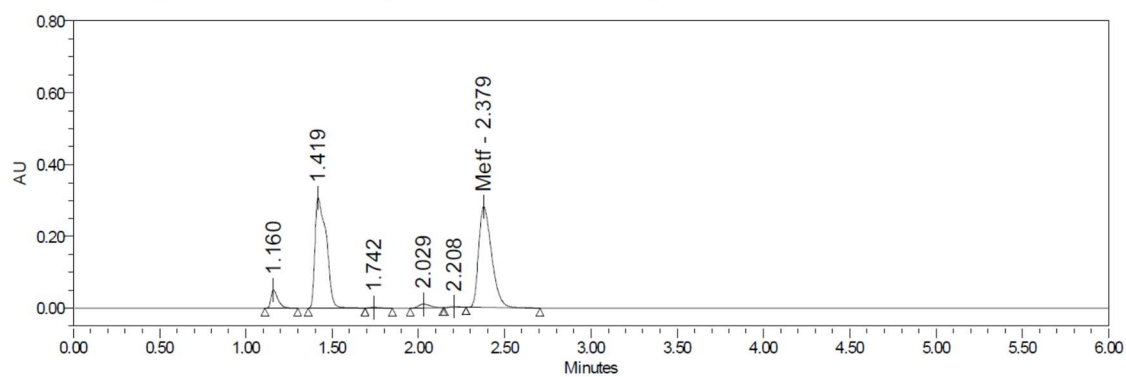




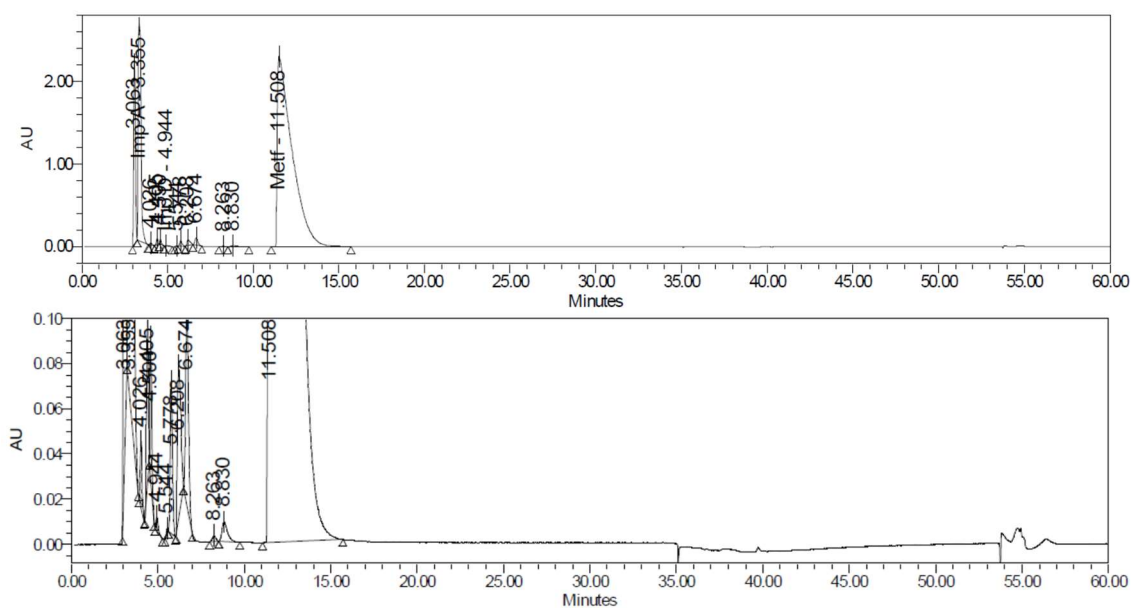
**Figura 4.165 Cromatograma do Ativo Y - Doseamento – 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 7 dias**



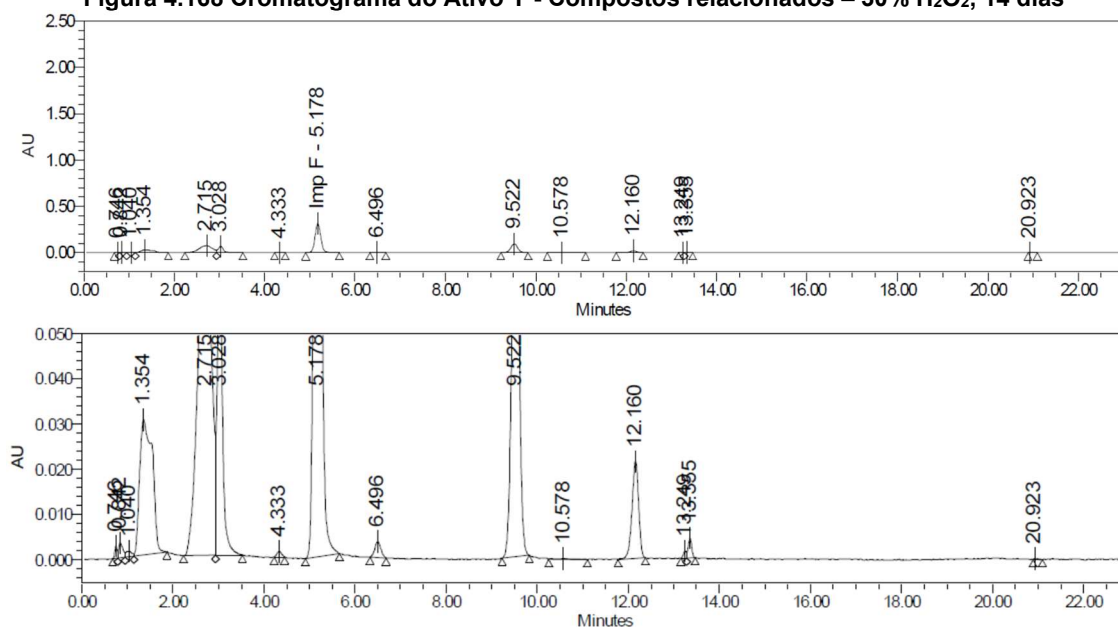
**Figura 4.166 Cromatograma do Ativo Y - Compostos relacionados – 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 7 dias**



**Figura 4.167 Cromatograma do Ativo Y - Doseamento – 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 14 dias**



**Figura 4.168 Cromatograma do Ativo Y - Compostos relacionados – 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 14 dias**



**Figura 4.169 Cromatograma do Ativo Y - Impureza F do Ativo Y – 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 14 dias**

#### 4.9.4. Cromatogramas de diluente e soluções em branco – Oxidação

Nas figuras 4.170 a 4.179 estão representados os cromatogramas dos diluentes e das soluções em branco. Estes foram comparados com os cromatogramas das substâncias ativas para que os picos referentes a diluentes e reagentes não fossem quantificados erradamente como impurezas de degradação.

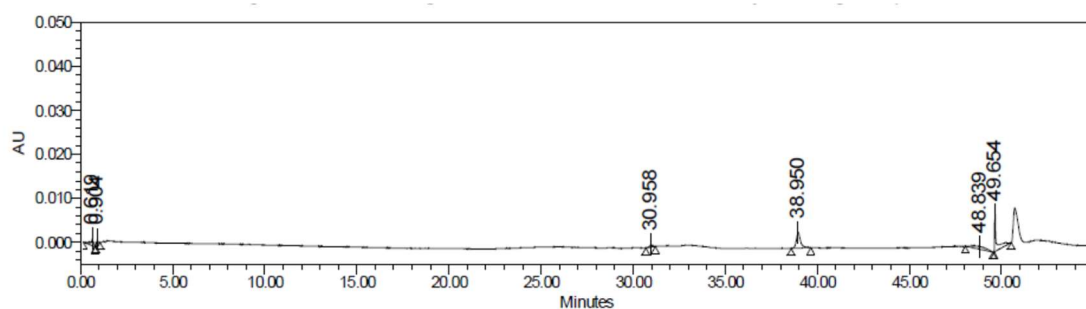


Figura 4.170 Cromatograma de diluente - Compostos relacionados Ativo X

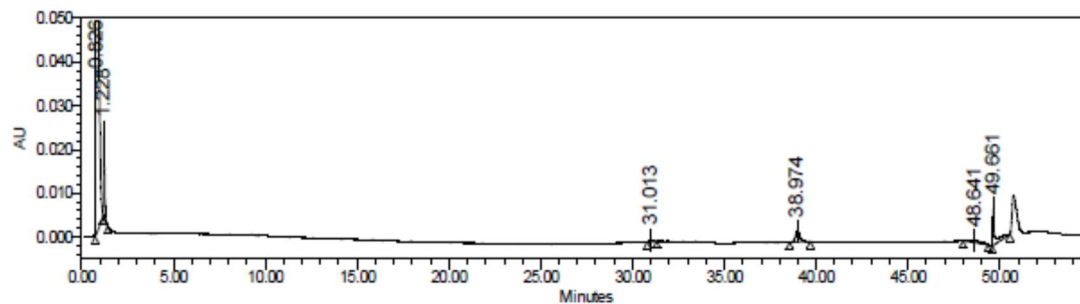


Figura 4.171 Cromatograma de branco – 10% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - Compostos relacionados Ativo X

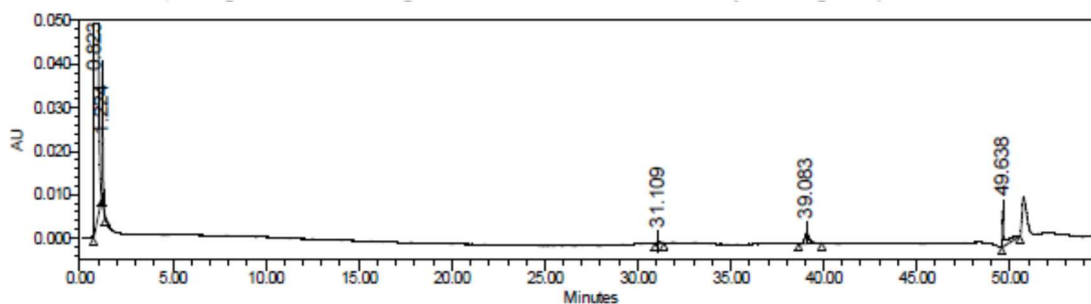


Figura 4.172 Cromatograma de branco - 20% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - Compostos relacionados Ativo X

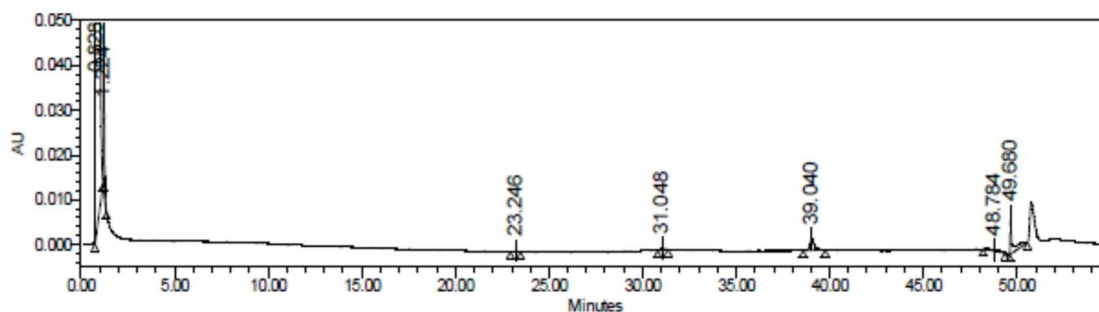


Figura 4.173 Cromatograma de branco - 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - Compostos relacionados Ativo X

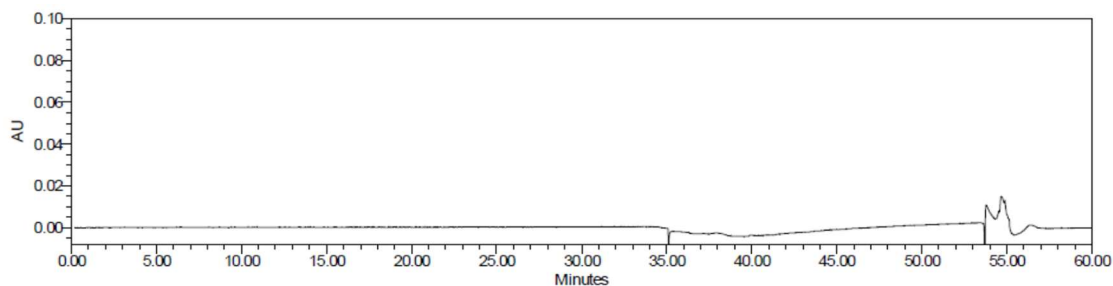


Figura 4.174 Cromatograma de diluente - Compostos relacionados Ativo Y

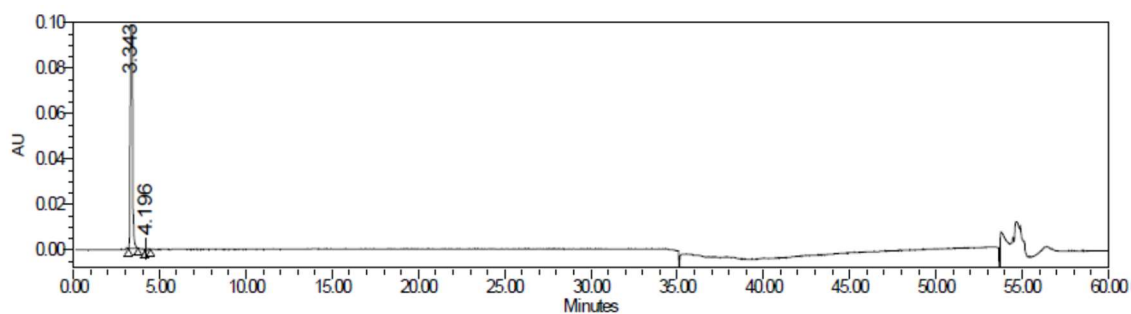


Figura 4.175 Cromatograma de branco - 10% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - Compostos relacionados Ativo Y

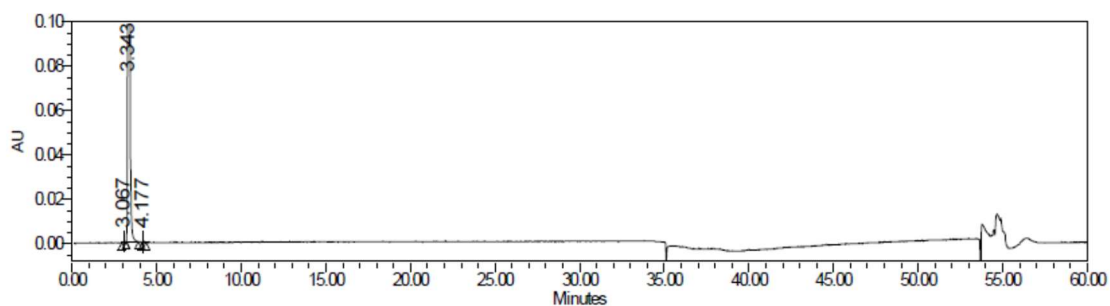


Figura 4.176 Cromatograma de branco - 20% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - Compostos relacionados Ativo Y

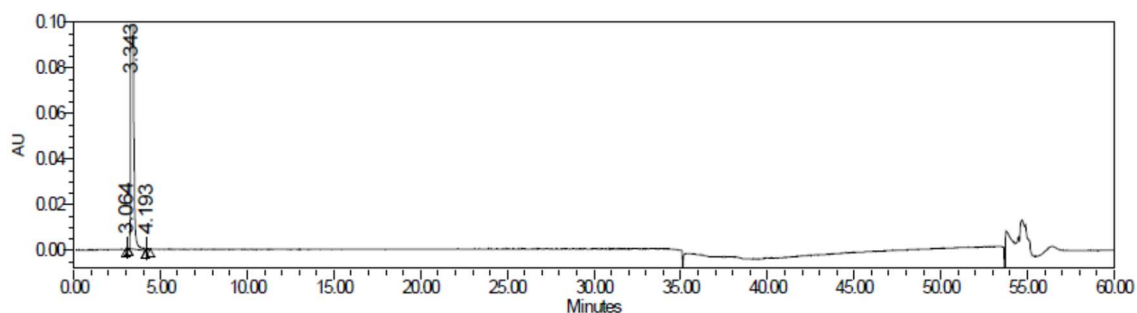


Figura 4.177 Cromatograma de branco - 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - Compostos relacionados Ativo Y

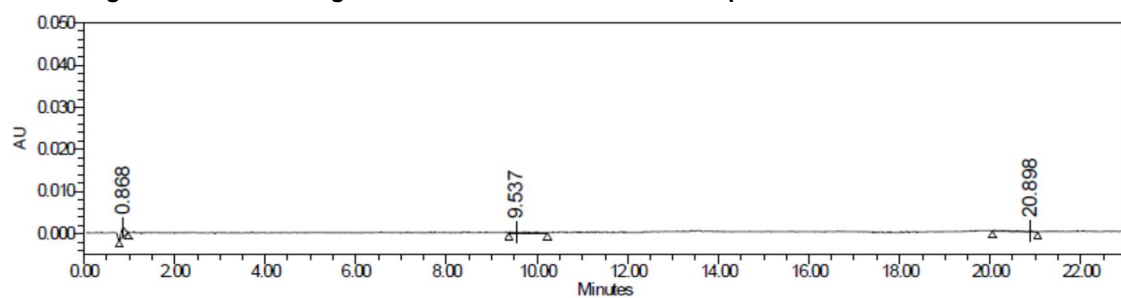


Figura 4.178 Cromatograma de diluente – Impureza F do Ativo Y

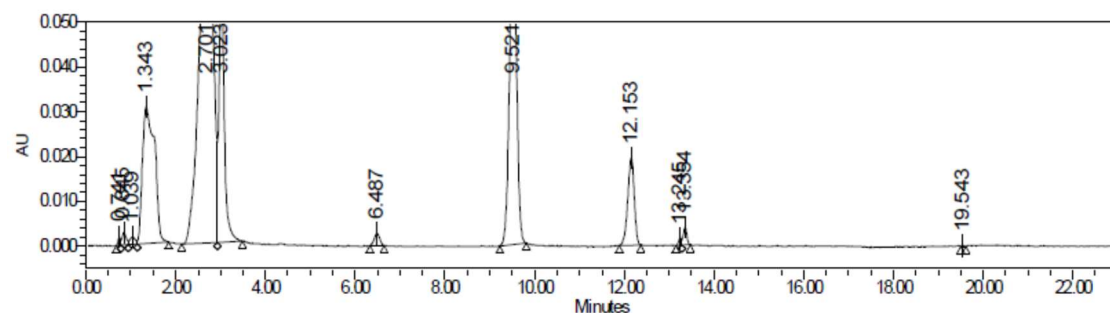


Figura 4.179 Cromatograma de branco – 10% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – Impureza F do Ativo Y



## 5. Conclusão e Proposta de Trabalho Futuro

### 5.1. Conclusão

Este trabalho teve como principal objetivo a obtenção das principais vias degradativas do Ativo X e do Ativo Y, através de um estudo de degradação forçada, onde as substâncias ativas foram expostas a diversos fatores de stress. Durante este estudo foi possível perceber em que condições as substâncias ativas apresentaram maior suscetibilidade. O estudo permitiu, ainda, verificar a adequabilidade dos métodos cromatográficos utilizados como indicadores de estabilidade dos ativos.

O Ativo X e o Ativo Y apresentaram estabilidade quando expostas a condições de luz, temperatura e humidade, não se verificando o aparecimento de impurezas de degradação superiores aos limites de quantificação 0,05% e 0,02%, respetivamente. Quando exposta a radiação UV era esperado que o Ativo X apresentasse suscetibilidade, devido à presença do átomo de halogénio no anel aromático [37], no entanto neste estudo não se verificou. Na estrutura molecular do Ativo Y está presente um grupo amina que pela sua volatilidade seria um bom grupo de saída, em condições de temperatura elevada, dando origem à Impureza A [27], o que não foi verificado nos resultados obtidos, a Impureza A não foi detetada e o Ativo Y apresentou estabilidade.

Em condições de hidrólise básica extremas, o Ativo X apresentou diminuições no teor de ativo no método de doseamento superiores a 30%, com hidróxido de sódio 3N, no entanto sem a deteção de picos de degradação. Ao ajustar as condições de hidrólise, diminuindo as concentrações do reagente e o tempo de exposição, não se verificou alterações significativas no teor do ativo nem a deteção de picos de degradação. O Ativo X apresenta uma ligação glicosídica na sua molécula, o que a torna suscetível à hidrólise [33]. Mais concretamente, em condições de hidrólise alcalina poderia haver a formação de um acetaldeído [32], no entanto o método de compostos relacionados utilizado não detetou a presença de impurezas de degradação.

Ao expor o Ativo Y a várias concentrações de hidróxido de sódio, verificou-se a sua elevada sensibilidade a condições de hidrólise básica com doseamento extremamente baixos nas concentrações mais elevadas de reagente. Mesmo ajustando as condições, houve um decréscimo superior a 15% no teor de ativo quando exposto a hidróxido de sódio 1N por apenas 24h. Foi detetada a presença da Impureza F, com teores de 1,2% e 3,5% após 8 e 24 horas de exposição, respetivamente. A Impureza A também foi detetada com um teor na ordem dos 0,02%, assim como outras impurezas desconhecidas. Em condições de hidrólise alcalina, devido à remoção de uma das moléculas de guanida, o Ativo Y poderia dar origem à Impureza F [28], o que se veio a verificar pelos resultados. Nestas condições, houve a formação da Impureza A e apesar de não ser a principal impureza prevista, existe um mecanismo proposto para a sua formação em que o grupo hidroxilo funciona como nucleófilo [29].

Após 7 e 14 dias de hidrólise ácida, o Ativo Y demonstrou diminuições no teor de ativo superiores a 30% com ácido clorídrico 3N, no entanto sem a formação de impurezas de degradação superiores ao limite de quantificação. Relativamente ao Ativo X, o Ativo Y não apresentou alterações significativas no seu teor, evidenciando a sua estabilidade perante estas condições. Foi detetada a formação de várias impurezas desconhecidas, assim como a formação da Impureza F com um teor de 0,03%, após exposição ao ácido clorídrico 1N durante 14 dias. Em condições de hidrólise é esperado que o Ativo X apresente vulnerabilidade, uma vez que apresenta um açúcar na sua molécula [32, 33]. No caso do Ativo Y, a protonação do grupo amina pela água, facilita a sua libertação e, consequentemente, a sua deteção nestas condições [18], como se verificou neste trabalho.

Nas condições de oxidação, em ambos os ativos houve a deteção de várias impurezas desconhecidas. No entanto, o Ativo Y demonstrou maior sensibilidade com diminuições significativas no seu teor, e com o aparecimento da Impureza F com um teor de 2,3% após 14 dias com Peróxido de hidrogénio a 10%. O método de compostos relacionados do Ativo Y detetou uma impureza desconhecida com teores superiores a 7,0% em todas as condições de oxidação. Esta impureza poderá ser a Impureza E, uma vez que para a oxidação do Ativo Y estão propostos mecanismos de radicais livres de hidróxido, cujo principal produto de degradação é a Impureza E [30, 31].

No geral, o Ativo X apresentou uma estabilidade superior perante as condições de degradação utilizadas. Esta situação poderá estar ligada ao facto de esta substância ativa apresentar uma estrutura cristalina. Numa estrutura desta natureza, os átomos ou moléculas estão dispostos segundo um padrão formado por forças intermoleculares uniformes, o que permite obter uma estrutura extremamente organizada [35]. Estas características permitem uma elevada estabilidade de sólidos cristalinos, sendo necessária a mesma quantidade de energia para quebrar todas as ligações existentes, em simultâneo [39].

Relativamente ao medicamento, este apresenta na sua formulação uma percentagem maior de Ativo Y, pelo que é de esperar que as vias degradativas desta substância ativa tenham um impacto superior no produto final. No entanto, na sua formulação, este possui outros componentes, nomeadamente o revestimento, que pode proteger os ativos de eventual degradação, aumentando a sua estabilidade. O material em que o fármaco é acondicionado também permite a sua preservação.

Durante o processo de fabrico, é sempre que possível evitada a exposição ao oxigénio, de modo a evitar a oxidação dos ativos. O processo envolve a adição de água e a exposição a determinadas temperaturas, situações que poderão promover a degradação dos ativos por hidrólise e por ação da temperatura, respetivamente. No entanto, as condições utilizadas no processo de fabrico são ajustadas às características dos ativos para garantir estabilidade durante a manufatura do medicamento.

As condições utilizadas para promover a degradação das amostras dos ativos foram muito severas, não sendo esperadas em condições normais de utilização e armazenamento. Assim, não é expectável que as impurezas formadas durante este estudo tenham um impacto significativo nos estudos de estabilidade do medicamento.

Em suma, concluiu-se que a hidrólise básica e a oxidação são as principais vias de degradação do Ativo Y, com a Impureza F como principal impureza conhecida detetada. O Ativo X apresentou como principais vias degradativas as hidrólises ácida e básica. Ficou também demonstrada a adequabilidade dos métodos utilizados na realização dos ensaios como indicadores de estabilidade dos ativos uma vez que, as condições em que foi possível obter resultados dentro das especificações, correspondem a condições já bastante agressivas para promover a degradação das substâncias ativas.

## **5.2. Proposta de Trabalho Futuro**

Com o intuito de identificar as principais impurezas desconhecidas obtidas nas diversas condições de degradação, nomeadamente na oxidação do Ativo Y, sugere-se a implementação de uma técnica de HPLC acoplada com espectrometria de massa (MS), normalmente designada por LC-MS [40].

A espectrometria de massa é uma técnica que permite ionizar as moléculas dos componentes de uma mistura e, de acordo com as cargas e massas molares, fazer a sua separação e deteção. No entanto, quando utilizada isoladamente, apresenta limitações na separação de componentes de misturas complexas, não conseguindo efetuar a separação. Esta situação deve-se ao facto de os componentes poderem apresentar massas molares semelhantes. De modo a contornar este problema, surgiu a técnica LC-MS que permite separar os componentes através das suas propriedades químicas e físicas e, posteriormente, detetar e identificar de acordo com o espectro de massa de cada componente. Para que os resultados sejam otimizados, é importante que os fluxos utilizados sejam inferiores aos utilizados, normalmente, em HPLC, assegurando assim a ionização completa e a sensibilidade do detetor MS [40].

Assim, futuramente, a obtenção dos picos cromatográficos e das massas molares das impurezas desconhecidas iria ajudar na sua identificação.





## Bibliografia

- [1] ICH, *Harmonisation for Better Health*, <https://www.ich.org/> (consultado a 18 de novembro de 2020)
- [2] Infarmed, *Certificação de conformidade com as Boas Práticas de Laboratório, de acordo com os princípios da OCDE, para a área farmacêutica*, [https://www.infarmed.pt/web/infarmed/alertas-de-seguranca/-/journal\\_content/56\\_INSTANCE\\_0000/15786/851132?p\\_p\\_state=pop\\_up&56\\_INSTANCE\\_0000\\_page=1&56\\_INSTANCE\\_0000\\_viewMode=print](https://www.infarmed.pt/web/infarmed/alertas-de-seguranca/-/journal_content/56_INSTANCE_0000/15786/851132?p_p_state=pop_up&56_INSTANCE_0000_page=1&56_INSTANCE_0000_viewMode=print) (consultado a 23 de novembro de 2020)
- [3] Portal QAS, *A Acreditação de Laboratórios - ISO/IEC 17025*, <https://portalqas.pt/acreditacao-de-laboratorios-np-en-isoiec-17025> (Consultado a 23 de novembro de 2020)
- [4] Tecnimede Group, <http://www.tecnimede.com/> (consultado a 18 de novembro de 2020)
- [5] Blessy, M., Patel, R. D., Prajapati, P. N., & Agrawal, Y. K. (2014), Development of forced degradation and stability indicating studies of drugs—A review, *Journal of Pharmaceutical Analysis*, Volume 4, Número 3, pág. 159–165.
- [6] Venkataraman, S., & Manasa, M. (2018), Forced degradation studies: Regulatory guidance, characterization of drugs, and their degradation products - A review. *Drug Invention Today*, Volume 10, Número 2, pág. 137–146.
- [7] Iram Farah, Iram Huma, Iqbal Azhar, H. A. (2016), Forced Degradation Studies, *MedCrave*, Volume 3, Número 6, pág. 1–5.
- [8] Janzen, H. (2016), Forced degradation studies – comparison between ICH, EMA, FDA and WHO guidelines and ANVISA's resolution RDC 53/2015. *N/A*, 59.
- [9] Reynolds, D. W., Facchine, K. L., Mullaney, J. F., Alsante, K. M., Hatajik, T. D., & Motto, M. G. (2002), *Available Guidance and Best Practices for Conducting Forced Degradation Studies*, *Pharmaceutical Technology*.
- [10] *Guideline Q1B (1996), STABILITY TESTING: PHOTOSTABILITY TESTING OF NEW DRUG SUBSTANCES AND PRODUCTS*, *International Conference on Harmonization*, Versão 4, pág. 1-8.
- [11] Guia nº 4 (2015), Guia para obtenção do perfil de degradação, e identificação e qualificação de produtos de degradação em medicamentos, *Agência Nacional de Vigilância Sanitária*, Versão 1, pág. 1–22.
- [12] Hage, D. S. (2018), Chromatography, *Principles and Applications of Clinical Mass Spectrometry : Small Molecules, Peptides, and Pathogens*, pág. 1–32
- [13] McPolin, O. (2009), *An introduction to HPLC for pharmaceutical analysis*, Mourne Training Services, pág. 1–30.
- [14] Weston, Andrea; R. Brown, P. (1997), *HPLC and CE. Principles and Practice*, W. B. Saunders Company, pág. 2-3.
- [15] Waters, *HPLC Separation Modes*, [https://www.waters.com/waters/en\\_US/HPLC-Separation-Modes/nav.htm?cid=10049076&locale=en\\_US](https://www.waters.com/waters/en_US/HPLC-Separation-Modes/nav.htm?cid=10049076&locale=en_US) (consultado a 08 de agosto de 2020)
- [16] Knauer, *What is the difference between isocratic and gradient application?*, <https://www.knauer.net/en/what-is-the-difference-between-isocratic-and-gradient-application/f19620> (consultado a 08 de agosto de 2020)
- [17] Schellinger, A. P., & Carr, P. W. (2006), Isocratic and gradient elution chromatography: A comparison in terms of speed, retention reproducibility and quantitation, *Journal of Chromatography A*, Volume 1109, Número 2, pág. 253–266.
- [18] Waters, *How Does High Performance Liquid Chromatography Work?*, [https://www.waters.com/waters/en\\_US/How-Does-High-Performance-Liquid-Chromatography-Work%3F/nav.htm?cid=10049055&locale=en\\_US](https://www.waters.com/waters/en_US/How-Does-High-Performance-Liquid-Chromatography-Work%3F/nav.htm?cid=10049055&locale=en_US) (consultado a 08 de agosto de 2020).
- [19] Ravisankar, P., Anusha, S., Supriya, K., & Kumar, U. A. (2019), Fundamental

Chromatographic Parameters, *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, Volume 55, Número 4, pág. 46–50.

[20] HPLC-MS, *GUIDANCE FOR SPECTRAL ANALYSIS USING Waters PDA WITH Empower*, <http://shula-lc.co.il/pda-sop/> (consultado a 29 de novembro de 2020).

[21] Sciencing, *The Differences Between HPLC & GC*, <https://sciencing.com/differences-between-hplc-gc-7456786.html> (consultado a 15 de agosto de 2020)

[22] Waters, *Beginner's Guide to UPLC*, [https://www.waters.com/waters/en\\_US/UPLC---Ultra-Performance-Liquid-Chromatography-Beginner%27s-Guide/nav.htm?cid=134803622&locale=en\\_US](https://www.waters.com/waters/en_US/UPLC---Ultra-Performance-Liquid-Chromatography-Beginner%27s-Guide/nav.htm?cid=134803622&locale=en_US) (consultado a 16 de agosto de 2020).

[23] AZoMaterials, *High-Performance Liquid Chromatography vs. Ultra-High Performance Liquid Chromatography*, <https://www.azom.com/article.aspx?ArticleID=15555> (consultado a 16 de agosto de 2020)

[24] Harron, D. W. G. (2013), Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use: The ICH Process, *The Textbook of Pharmaceutical Medicine*, pág. 447–460, Blackwell Publishing Ltd.

[25] McPolin, O. (2009), *Validation Of Analytical Methods For Pharmaceutical Analysis*, Mourne Training Services, pág. 1–4

[26] Ravichandran, V., Shalini, S., Sundram, K. M., & Rajak, H. (2010), Validation of analytical methods - Strategies & importance, *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, Volume 2, Número 3, pág. 18–22.

[27] Badran, I., Manasrah, A. D., & Nassar, N. N. (2019), A combined experimental and density functional theory study of oxy-cracking for pharmaceutical wastewater treatment, *RSC Advances*, Volume 9, Número 24, pág. 13403–13413.

[28] Gumieniczek, A., Berecka-Rycerz, A., Mroczek, T., & Wojtanowski, K. (2019), Determination of Chemical Stability of Two Oral FT-IR Methods, *Molecules*, pág. 1–24.

[29] Doomkaew, A., Prutthiwanasan, B., & Suntornsuk, L. (2014), Simultaneous analysis by capillary zone electrophoresis and its application in a stability study, *Journal of Separation Science*, Volume 37, Número 13, pág. 1687–1693.

[30] Paquin, F., Rivnay, J., Salleo, A., Stingelin, N., & Silva-Acuña, C. (2015), Multi-phase microstructures drive exciton dissociation in neat semicrystalline polymeric semiconductors, *Journal of Materials Chemistry C*, Volume 3, Número 41, pág. 10715–10722.

[31] Trouillas, P., Marchetti, C., Bonnefont-Rousselot, D., Lazzaroni, R., Jore, D., Gardès-Albert, M., & Collin, F. (2013), Mechanism of one-electron oxidation in aqueous solution. *Physical Chemistry Chemical Physics*, Volume 15, Número 24, pág. 9871.

[32] Zagahary, W. A., Mowaka, S., & Hendy, M. S. (2019), Kinetic Degradation Study Coupled with UHPLC Separation in the Presence of Major Degradation Product, *Chromatographia*, Volume 82, Número 4, pág. 777–789.

[33] Brito-Arias, M. (2016), Hydrolysis of Glycosides, *Synthesis and Characterization of Glycosides*, Springer International Publishing, pág. 355–367.

[34] Chemistry Steps, *Reactions at the Benzylic Position*, <https://www.chemistrysteps.com/reactions-at-the-benzylic-position/> (consultado a 30 de Novembro de 2020)

[35] Organic Chemistry Portal, *Synthesis of ketones by oxidation of benzylic substrates*, <https://www.organic-chemistry.org/synthesis/C2O/ketones/oxidationsbenzyls.shtml> (consultado a 30 de novembro de 2020)

[36] Master Organic Chemistry, *Reactions on the "Benzylic" Carbon: Bromination And Oxidation*, <https://www.masterorganicchemistry.com/2018/06/13/reactions-on-the-benzylic-carbon-bromination-and-oxidation/> (consultado a 30 de novembro de 2020)

[37] Abusallout, I., & Hua, G. (2016), Photolytic dehalogenation of disinfection byproducts in water by natural sunlight irradiation, *Chemosphere*, Volume 159, pág.184–192.

[38] Sciencing, *Crystalline Solid: Definition, Types, Characteristics & Examples*, <https://sciencing.com/crystalline-solid-definition-types-characteristics-examples-13723378.html> (consultado a 2 de dezembro de 2020)

[39] Chemistry LibreTexts, *Crystalline and Amorphous Solids* [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/General\\_Chemistry/Book%3A\\_Chemistry\\_\(Averill\\_and\\_Eldredge\)/12%3A\\_Solids/12.1%3A\\_Crystalline\\_and\\_Amorphous\\_Solids](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/General_Chemistry/Book%3A_Chemistry_(Averill_and_Eldredge)/12%3A_Solids/12.1%3A_Crystalline_and_Amorphous_Solids) (consultado a 2 de dezembro de 2020)

[40] Chemyx, *Basic Principles of LC, HPLC, MS, & MS*, <https://www.chemyx.com/support/knowledge-base/applications/basic-principles-hplc-ms-lc-ms/> (consultado a 22 de novembro de 2020)