



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CEILÂNDIA
CURSO DE FARMÁCIA**

JOÃO PAULO CORNÉLIO ARAÚJO

**ESTUDO DOS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO FORÇADA DO ANTI-
INFLAMATÓRIO NÃO ESTEROIDAL PIROXICAM POR
CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA E TÉCNICAS
CORRELATAS.**

BRASÍLIA, 2018

Ficha catalográfica elaborada automaticamente, com
os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

CC814e Cornélio Araújo, João Paulo
 Estudo dos produtos de degradação forçada do anti
 inflamatório não esteroidal piroxicam por cromatografia
 líquida de alta eficiência e técnicas correlatas. / João
 Paulo Cornélio Araújo; orientador Juliano Alexandre Chaker.
 -- Brasília, 2018.
 48 p.

 Monografia (Graduação - Farmácia) -- Universidade de
 Brasília, 2018.

 1. Produtos de degradação. 2. CLAE. 3. Espectrometria de
 massas. 4. Piroxicam. 5. Estabilidade. I. Chaker, Juliano
 Alexandre, orient. II. Título.



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CEILÂNDIA
CURSO DE FARMÁCIA**

JOÃO PAULO CORNÉLIO ARAÚJO

**ESTUDO DOS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO FORÇADA DO ANTI-
INFLAMATÓRIO NÃO ESTEROIDAL PIROXICAM POR
CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA E TÉCNICAS
CORRELATAS.**

Banca examinadora

Juliano Chaker

Orientador: Professor Juliano Alexandre Chaker
Faculdade de Ceilândia – Universidade de Brasília

Paula M. Martins

Professora Paula Melo Martins

Faculdade de Ceilândia – Universidade de Brasília

Carlos José Correia de Santana

Carlos José Correia de Santana

Instituto de Biologia – Universidade de Brasília

BRASÍLIA, 2018

JOÃO PAULO CORNÉLIO ARAÚJO

**ESTUDO DOS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO FORÇADA DO ANTI-
INFLAMATÓRIO NÃO ESTEROIDAL PIROXICAM POR
CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA E TÉCNICAS
CORRELATAS.**

Monografia de Conclusão de Curso apresentada
como requisito parcial para obtenção do grau de
Farmacêutico, na Universidade de Brasília,
Faculdade de Ceilândia.

Orientador: Professor Juliano Alexandre Chaker

BRASÍLIA, 2018

RESUMO

Desde 2008, a análise de produtos de degradação vem sendo um dos principais assuntos dentro da legislação de estabilidade seguida pela indústria farmacêutica. Em 2015, a ANVISA publicou a RDC 53, resolução responsável por nortear a realização deste tipo de teste, agora obrigatório para registro de novos medicamentos. Este trabalho buscou realizar a análise do perfil de degradação do anti-inflamatório não-esteroidal piroxicam, através de um método por CLAE capaz de dosar o princípio ativo e identificar produtos de degradação gerados em diferentes condições de degradação (aquecimento, variações de pH, degradação fotolítica, oxidativa e por íons metálicos). Os resultados obtidos foram enquadrados aos parâmetros da legislação citada. O método de análise utiliza como fase móvel uma solução de acetonitrila/tampão fosfato de sódio dibásico 0,03M (60:40), num fluxo de 1,0 mL/min. Em outro estudo, as amostras foram analisadas por espectrometria de massas por MALDI-TOF para a elucidação estrutural dos compostos. Três produtos de degradação foram encontrados na análise cromatográfica, nas condições de degradação de aquecimento, fotolítica e oxidativa. A análise por MALDI-TOF identificou oito diferentes compostos, e as massas exatas foram comparadas com dados da literatura para identificação estrutural. Este trabalho foi capaz de estabelecer os principais produtos de degradação do piroxicam e também descrever os mecanismos de degradação dos produtos encontrados.

Palavras-chave: Produtos de degradação. CLAE. Espectrometria de massas. Piroxicam. Estabilidade.

ABSTRACT

Since 2008, the analysis of degradation products has been one of the main issues inside the stability legislation obeyed by the pharmaceutical industry. In 2015, ANVISA published RDC 53, the resolution responsible for conducting this kind of test, now mandatory for registration of new drugs in Brazil. This work aimed to perform the analysis of the degradation profile of the non-steroidal anti-inflammatory piroxicam by an CLAE method, able to dose the active ingredient and identify degradation products generated under different degradation conditions (heating, pH variations, photolytic degradation, oxidative degradation and degradation by metal ions). The results obtained were framed into the mentioned legislation. The method of analysis uses as

the mobile phase a solution of acetonitrile / buffer 0,03M (60:40), in a flow of 1.0 mL / min. Then, the samples were analyzed by MALDI-TOF mass spectrometry for structural elucidation of the compounds. Three degradation products were found in the chromatographic analysis under the conditions of heating, photolytic degradation and oxidative degradation. MALDI-TOF analysis identified eight different compounds, and the exact masses were compared with literature data to structural identification. This work was able to establish the main degradation products of piroxicam and to describe the mechanisms of degradation of the products found.

Degradation products. HPLC. Mass spectrometry. Piroxicam. Stability.

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 Limites de notificação, identificação e quantificação de produtos de degradação segundo dose máxima diária. (BRASIL, 2015).....	16
Quadro 2 Produtos de degradação identificados distribuídos de acordo com condição de degradação, tipo de amostra, percentual e classificação.	37
Quadro 3 Presença de potenciais produtos de degradação classificados pela massa exata (m/z) em relação a condição de degradação forçada.....	39

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Comparação entre metodologias cromatográficas para quantificação do piroxicam.....	25
Figura 2 Curva de calibração: Concentração piroxicam (mg/mL) x área da curva ...	26
Figura 3 Evolução da concentração de piroxicam padrão e comercial em estresse oxidativo	28
Figura 4 Cromatograma amostras de piroxicam padrão submetidas à estresse oxidativo	29
Figura 5 Cromatograma amostras de piroxicam comercial submetidas à estresse oxidativo	29
Figura 6 Cromatograma amostras de piroxicam (Branco), ampliado para o tempo de 2,7 minutos.....	30
Figura 7 Evolução da concentração de piroxicam padrão e comercial em estresse por aquecimento.....	31
Figura 8 Cromatograma amostras de piroxicam padrão submetidas à estresse por aquecimento.....	32
Figura 9 Cromatograma amostras de piroxicam comercial submetidas à estresse por aquecimento.....	32
Figura 10 Cromatograma amostras de piroxicam (Branco), ampliado para o tempo de 4,1 minutos.....	33
Figura 11 Evolução da concentração de piroxicam padrão e comercial em estresse por exposição fotolítica.....	34
Figura 12 Cromatograma amostras de piroxicam padrão submetidas à estresse por exposição fotolítica.....	35
Figura 13 Cromatograma amostras de piroxicam comercial submetidas à estresse por exposição fotolítica.....	35
Figura 14 Cromatograma amostras de piroxicam (Branco), ampliado para o tempo de 1,5 minutos.....	36
Figura 15 Comparação estruturas moleculares propostas na literatura com espectros MS/MS das moléculas identificadas nos estudos de degradação forçada.....	41
Figura 16 Locais de quebras de ligação do piroxicam para a formação de produtos de degradação.	42

LISTA DE SIGLAS

AINE: Anti-inflamatório Não-Esteroidal

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CLAE: Cromatografia Líquida de alta eficiência

COX: Ciclo-oxigenase

INTERFARMA: Associação da Indústria Farmacêutica de Pesquisa

MALDI-TOF/MS: *Matrix-assisted laser desorption/ionization – Time of flight / Mass spectrometry*

MIP: Medicamentos isentos de prescrição

RDC: Resolução da Diretoria Colegiada

RENAME: Relação Nacional de Medicamentos Essenciais

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
3 JUSTIFICATIVA	20
4 OBJETIVOS	21
4.1 Objetivo geral.....	21
4.2 Objetivos específicos	21
5 METODOLOGIA.....	22
5.1 Método Cromatográfico	22
5.2 Degradação Forçada	22
5.3 Elucidação Estrutural	23
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	24
6.1 - Método Cromatográfico	24
6.2 Degradação forçada	26
6.2.1 Estresses ácidos e básicos	27
6.2.2 Estresse por íons metálicos	27
6.2.3 Estresse oxidativo	27
6.2.4 Estresse por aquecimento.....	30
6.2.5 Estresse por exposição fotolítica.....	33
6.3 Elucidação estrutural	38
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45

1 INTRODUÇÃO

Para o desenvolvimento de um produto industrializado em qualquer área de conhecimento, se faz necessário que apresente características finais desejadas previamente definidas. Dentro da indústria farmacêutica, esta regra possui ainda mais importância, visto que os seus produtos são consumidos pelo destinatário final, e qualquer falha pode acarretar em danos complexos em sua saúde. Além disso, o produto farmacêutico geralmente é desenvolvido para uma população que está em situação de risco em saúde, e, portanto, é de extrema importância que este produto seja capaz de cumprir com suas especificações.

Com o objetivo de avaliar se o produto farmacêutico está cumprindo com as regulamentações vigentes em nosso país, a indústria realiza testes de controle de qualidade em diferentes etapas da cadeia de produção. Estes testes são determinados por legislação fornecida pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e são constantemente atualizados. Em 2015 a ANVISA publicou no Diário Oficial da União a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) Nº 53, que estabelece parâmetros para a notificação, identificação e qualificação de produtos de degradação em medicamentos com substâncias ativas sintéticas e semissintéticas, classificados como novos, genéricos e similares. Pode-se verificar que todos os medicamentos comercializados no Brasil devem apresentar, dentre os outros testes de controle de qualidade, a análise do perfil de degradação da substância. Esta legislação foi aprovada devido ao fenômeno no qual as substâncias ativas quando submetidas a condições desfavoráveis podem sofrer degradação e formar novas moléculas, que podem interagir de maneiras totalmente diferentes da molécula original. Em outras palavras, a legislação busca prover segurança ao paciente por meio de estudos dos produtos de degradação que determinada molécula pode gerar, definindo as quantidades limite e as condições em que devem ser testadas.

Este trabalho utilizou como fármaco modelo o anti-inflamatório não esteroideal (AINE) piroxicam (4-hydroxy-2-methyl-N-(2-pyridinyl)-2 H- 1,2-benzothiazine-3-carboxamide 1,1dioxide), medicamento de fácil acesso pela população brasileira. Este fármaco é classificado como um AINE (anti-inflamatório não esteroideal) do tipo oxicana, sendo uma molécula fracamente seletiva para um dos subtipos da enzima, a ciclo-oxigenase (COX) 2. Entre as suas principais indicações estão a artrite reumatoide, osteoartrite, gota aguda, dor pós-operatória, lesões musculoesqueléticas

e dor, sendo capaz de apresentar atividade anti-inflamatória, antipirética e analgésica. Em geral, este medicamento é bem tolerado pelos pacientes, apresentando como principal efeito adverso distúrbios gastrointestinais.

Existem trabalhos na literatura que descrevem estudos de degradação forçada para o piroxicam e seus produtos de degradação, utilizando principalmente a técnica por CLAE/MS, sendo considerada por muitos autores a técnica padrão para este tipo de análise.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Segundo dados da consultoria IMS Health divulgados na página virtual da Associação da Indústria Farmacêutica de Pesquisa (INTERFARMA), em 2017 o Brasil ocupava o sexto lugar no ranking dos países que mais consomem medicamentos em todo o mundo, com perspectivas de alcançar o quinto lugar até o ano de 2022. Segundo Aquino (2008), o medicamento é encarado como bem de consumo, sendo assim não está desvinculado do incentivo do capitalismo através, por exemplo, da publicidade maciça.

No Brasil, AINEs estão entre os medicamentos mais consumidos, responsáveis por movimentar um mercado de cerca de um bilhão de reais no ano de 2017 (INTERFARMA, 2018). Entre os 20 medicamentos mais vendidos deste ano, seis contem em sua formulação algum AINE (INTERFARMA, 2018), demonstrando a sua ampla presença no mercado nacional. Dentre as principais causas para esses números, destacam-se a grande facilidade de acesso ao fármaco e uma população mais idosa com concomitantes doenças reumatológicas (MELGAÇO et al., 2010). Na Europa, estima-se que esta classe representa 7,7% de todas as prescrições (SOSTRES et al., 2010).

Os AINEs são uma classe de fármacos composta por grupos quimicamente heterogêneos, mas que compartilham propriedades analgésica, antitérmica, anti-inflamatória e antitrombótica (PINHEIRO; WANNMACHER, 2012), sendo muitas vezes utilizados de maneira sintomática. O estudo dos AINEs tem início no ano de 1836, quando Pina isolou o ácido salicílico (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMAN, 2012). Nas décadas seguintes, Kolb foi capaz de sintetizar a molécula, que passou a ser produzida industrialmente em 1874.

Atualmente no mercado farmacêutico existem mais de 50 diferentes tipos de AINEs (SANDOVAL et al., 2017), com diversas variações na forma de apresentação como comprimidos, injeções e géis (DALE; RANG, 2008). Na Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (RENAME) de 2017 (BRASIL, 2017), estão presentes quatro princípios ativos pertencentes à classe: Ácido salicílico (na forma de pomada, pertencente ao componente básico), Ácido acetilsalicílico (na forma de comprimido, incluído no componente básico), ibuprofeno (na forma de comprimido e de suspensão oral, classificados dentro do componente básico) e naproxeno (na forma de comprimido, pertencente ao componente especializado) (BRASIL, 2017).

Os principais efeitos terapêuticos dos AINEs são os efeitos anti-inflamatórios, analgésicos e antipiréticos (DALE; RANG, 2008), e na clínica são usados no manejo de sintomas em pacientes com artrite reumatoide, polimiosite, lúpus eritematoso sistêmico, esclerose sistêmica progressiva, poliarterite nodosa, granulomatose de Wegener, espondilite anquilosante e entesopatias (PINHEIRO; WANNMACHER, 2012).

O grupo dos ácidos enólicos, inseridos na classe dos AINES, tem como principal vantagem a sua longa meia vida, permitindo o seu uso em dose única diária (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMAN, 2012). Um dos exemplos de fármacos dessa classe é o piroxicam(4-hydroxy-2-methyl-N-(2-pyridinyl)-2 H- 1,2-benzothiazine-3-carboxamide 1,1dioxide), geralmente prescrito para tratamento de artrite reumatoide e da osteoartrite. É um fármaco praticamente insolúvel em água, possui uma alta absorção após ingestão oral e alcança seu pico plasmático em até seis horas, apresentando uma meia vida de 54 horas (SKIBA et al., 2012).

Dentre os efeitos adversos destacam-se os danos gastrintestinais, riscos cardiovasculares e os riscos renais (PINHEIRO; WANNMACHER, 2012), sendo os danos no sistema digestório os mais comuns (SOSTRES et al., 2010). A idade em geral se correlaciona a uma probabilidade maior de desenvolver reações adversas sérias (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMAN, 2012).

Uma das principais problemáticas a respeito dos AINES está relacionada com o fácil acesso desses medicamentos, desconsiderando as restrições de indicação, efeitos adversos e interações medicamentosas (PINHEIRO; WANNMACHER, 2012). A lista de medicamentos isentos de prescrição (MIPs) apresentada na instrução normativa 11 de 29 de setembro de 2016, contém três fármacos desta classe, além de contemplar todos os analgésicos não narcóticos. (BRASIL, 2016). Isto contribui para que os AINEs estejam entre os líderes do ranking de medicamentos mais automedicados do Brasil (ARRAIS et al., 1997). Exemplo do alto número de casos de automedicação de anti-inflamatórios pode ser observado no trabalho de Arrais et al. (1997), onde os autores fizeram um levantamento em 3 estados diferentes, enquadrando os anti-inflamatórios na terceira posição entre as classes mais utilizadas por conta própria, representando 5,6% dos casos.

A automedicação é uma das questões relacionadas com a segurança de medicamentos. Visto que o público consumidor de medicamentos está naturalmente fragilizado, se faz necessário que estes produtos estejam disponíveis na forma mais segura ao paciente, ou seja, com a maior qualidade possível. Quando aplicadas dentro da indústria farmacêutica, a qualidade dos medicamentos apresenta impacto marcante, permeando ganhos inclusive financeiros (GIL, 2010). No Brasil, as normas a respeito destes estudos são definidas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) através da Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) Número 17 de 2010, que dispõe sobre as boas práticas de fabricação de medicamentos. Este documento aborda os diversos aspectos que podem interferir na qualidade final do produto, indicando quais procedimentos devem ser implantados e, quando necessário, indica legislações específicas para cada caso (BRASIL, 2010).

Ao final do processo de produção de um medicamento, se faz necessário que o impacto das ações de garantia de qualidade seja mensurado, ou seja, é preciso avaliar a qualidade do produto finalizado. Esta etapa é denominada “Controle de qualidade”, definido como o “conjunto de procedimentos que asseguram que os produtos não estarão liberados para a venda ou fornecimento até que a qualidade dos mesmos seja atestada” (GIL, 2010). Os testes para controle de qualidade de medicamentos também são indicados pela ANVISA, por meio da 5ª edição da Farmacopéia Brasileira. No primeiro volume deste documento, estão descritas as principais análises (gerais e físico-químicas) que podem ser realizadas dependendo do tipo do produto final, bem como qual o procedimento que deve ser adotado.

Porém, não basta que o teste realizado aponte resultado positivo para que a qualidade do produto seja atestada. É necessário que o “método analítico seja capaz de produzir resultados confiáveis e que seja adequado a sua finalidade, de forma documentada e mediante critérios objetivos” (BRASIL, 2017). A este processo atribuímos o nome de validação. Existem diversos outros conceitos de validação analítica, sendo considerado um conceito em constante construção (RIBANI et al., 2004). Segundo Gil (2010), “validação é um processo pelo qual são empregados estudos estatísticos para garantir que o método em questão atenda as exigências desejadas”.

Dentro da validação analítica, estão presentes algumas características que um método deve conter para que possa apresentar resultados confiáveis, ou seja,

compatíveis com a realidade. Estes parâmetros analíticos estão descritos e definidos na RDC ANVISA 166/2017, que dispõe justamente sobre a validação de métodos analíticos, exemplificados a seguir:

- a) Seletividade: Capacidade do método de identificar ou quantificar o analito de interesse em maior que outras substâncias;
 - b) Linearidade: Capacidade do método de produzir resposta analítica proporcional a concentração real da amostra;
- (BRASIL, 2017)

Existem ainda outras legislações que versam sobre aspectos relacionados ao controle e/ou garantia da qualidade. A Resolução número 1 de 2005 da ANVISA é um desses exemplos, visto que apresenta o guia para a realização de estudos de estabilidade de medicamentos (BRASIL, 2005).

O conceito de estabilidade é apresentado por Silva et al. (2009)

Tempo durante o qual a especialidade farmacêutica ou mesmo a matéria prima considerada isoladamente, mantém dentro dos limites especificados e durante todo o período de estocagem e uso, as mesmas condições e características que possuía quando da época de sua fabricação.

Todos os fármacos estão sujeitos a decomposição física ou química, variando apenas no seu grau de vulnerabilidade (GIL, 2010), sendo que diversos fatores podem afetar a estabilidade da forma farmacêutica. Segundo a RE 1/2005 a estabilidade de produtos farmacêuticos depende de “fatores ambientais como temperatura, umidade e luz, e de outros relacionados ao próprio produto como propriedades físicas e químicas de substâncias ativas e excipientes farmacêuticos, forma farmacêutica e sua composição, processo de fabricação, tipo e embalagem.” (BRASIL, 2005).

Inserida nesta mesma legislação, estão descritas todas as informações que o relatório de estabilidade deve apresentar para sua respectiva aprovação. Entre estas informações está a quantificação de produtos de degradação e método analítico correspondente, estudo que ainda apresenta poucas descrições na literatura (SILVA et al., 2009).

Ao constatar a dificuldade das indústrias farmacêuticas em realizar tais análises, a ANVISA publicou o Informe Técnico número 1 de 2008, esclarecendo dúvidas a respeito do procedimento a ser tomado. Este documento proporcionou a

publicação da RDC 53/2015, que estabeleceu de forma mais clara os parâmetros para a verificação de produtos de degradação em medicamentos, definindo os limites de notificação, identificação e qualificação, e também estabelecendo as condições de degradação forçada. A legislação trouxe a definição do termo “produto de degradação” na seguinte descrição: impurezas resultantes de alterações químicas que surgem durante a fabricação ou armazenamento do medicamento (BRASIL, 2015).

Para novos medicamentos o estudo de produtos de degradação se mostra de extrema relevância, visto que a estabilidade química de moléculas farmacêuticas afeta diretamente a segurança e a eficácia do produto (BLESSY et al., 2013). A RDC traz também o procedimento detalhado acerca da análise dos produtos de degradação. O Estudo de degradação forçada é apresentado como uma “metodologia capaz de permitir a geração destes novos compostos através da exposição do insumo farmacêutico ativo e produto acabado a condições de estresse, devendo ser aplicado tanto ao insumo isolado como na presença de excipientes” (BRASIL, 2015). Outros autores (BRUMER, 2011) indicam ainda que o estresse de umidade também é um parâmetro importante a ser avaliado quando o analito em questão estiver no estado sólido. Neste mesmo trabalho, Brumer (2011) demonstra a influência de excipientes na análise do perfil de degradação. Ao colocar uma amostra isolada sob degradação forçada, e comparar os resultados com um placebo contendo apenas um conservante, foi observado que a maioria dos novos produtos formados pertenciam ao excipiente, e não ao princípio ativo. Para Blessy et al. (2013), “as condições de degradação são amplamente variáveis, devendo apenas ser compatíveis com as condições ambientais pelo qual o medicamento teste é submetido (produção, estocagem) e serem capazes de degradar pelo menos 10% do fármaco”. Esta compatibilidade entre condições ambientais e condições de estresse pode ser observada no trabalho de Lima, Nunes e Barros (2010). A observação do armazenamento de medicamentos em um domicílio atendido pelo programa Saúde da Família demonstrou que 37% encontrados nos domicílios estavam localizados em paredes, balcões ou outras superfícies desprovidas do abrigo contra luz, calor ou umidade, fatores que podem ser capazes de formar produtos de degradação (BRASIL, 2015).

As condições de degradação propostas pela ANVISA são: aquecimento, umidade, solução ácida, solução básica, solução oxidante, exposição fotolítica, íons metálicos (BRASIL, 2015). O estudo nessas condições se faz necessário para

“reduzir ou prevenir a ocorrência de deterioração devido à hidrólise, oxidação, entre outros processos, sendo necessário ao se considerar as diferentes zonas climáticas ao qual o produto é submetido” (SILVA et al., 2009).

Para Blessy et al. (2013), O estudo de degradação forçada apresenta os seguintes objetivos principais:

- a) Estabelecer rotas de degradação;
- b) Diferenciar produtos originários do princípio ativo daqueles advindos de outras moléculas;
- c) Elucidar a estrutura dos produtos de degradação;
- d) Gerar mecanismos de degradação (hidrólise, oxidação, etc.);
- e) Gerar formulações mais estáveis.

A regulação feita pela ANVISA busca atender estes objetivos de forma categórica, ao estabelecer parâmetros com limites de notificação, identificação e qualificação (BRASIL, 2015), como apresentado no Quadro 1.

Quadro 1 Limites de notificação, identificação e quantificação de produtos de degradação segundo dose máxima diária.

	DOSE MÁXIMA DIÁRIA	LIMITES
Limites de Notificação	<1g	0,1%
	>1g	0,05%
Limites de Identificação	<1mg	1,0% ou 5µg ATD*, o que for menor
	1mg-10mg	0,5% ou 20µg ATD, o que for menor
	>10mg-2mg	0,2% ou 2mg ATD, o que for menor
	>2g	0,10%
Limites de Qualificação	<10mg	1,0% ou 50µg ATD, o que for menor
	10mg-100mg	0,5% ou 200µg ATD, o que for menor
	>100mg-2g	0,2% ou 3mg ATD, o que for menor
	>2g	0,15%

Fonte: BRASIL (2015)

*Administração total diária.

Os diferentes parâmetros envolvidos no estudo de produtos de degradação podem ser listados abaixo.

- i. O estudo de hidrólise (ácida ou básica) está relacionado com a decomposição do fármaco por reagir com a água, através da catálise dos grupos funcionais ionizantes presentes na molécula (BLESSY et al., 2013). “Para realizar o estudo de estresse em condição de hidrólise ácida, utiliza-se principalmente ácido clorídrico e para a hidrólise básica utiliza-se hidróxido de sódio, sendo que em pH neutro não são observadas diferenças significativas” (SILVA et al., 2009).
- ii. “A degradação oxidativa é uma das principais causas de instabilidade de fármacos, envolvendo a remoção de um átomo eletropositivo, radical ou elétron, ou a adição de um átomo eletronegativo ou radical” (SILVA et al., 2009), utilizando-se geralmente o peróxido de hidrogênio.
- iii. O estudo fotolítico deve ser realizado para demonstrar que a exposição à luz não leva a alterações significativas (BLESSY et al., 2013). A radiação ultravioleta é muito energética e pode propiciar a clivagem de muitas ligações químicas, ocorrendo a degradação da molécula com potencial formação de novo produtos cuja atividade no organismo ainda não é conhecida (SILVA et al., 2009).
- iv. A degradação térmica, segundo Blessy et al. (2013), deve ser realizada tanto em calor úmido quanto em calor seco, numa faixa de temperatura entre 40-80°C.
- v. A degradação por metais não apresenta mecanismos de degradação descritos na literatura, sendo que alguns autores (SILVA et al., 2009) tratam essa condição de estresse como opcional.

A legislação a respeito da análise de produtos de degradação se aplica aos medicamentos com substâncias ativas sintéticas e semissintéticas, classificados como novos, genéricos e similares (BRASIL, 2015), uma demanda significativa de amostras. Após as recentes publicações da ANVISA sobre o tema, o estudo de degradação forçada foi abordado em pesquisas tanto no Brasil como no exterior, sendo que a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) se apresenta como uma das técnicas mais exploradas neste segmento, conforme apresentado a seguir.

Garg et al. (2010) realizou testes de degradação forçada para o Fentanil, um analgésico opioide. Expondo o fármaco nas condições de degradação de luz, hidrólise ácida/básica, calor e oxidação, os autores conseguiram identificar por CLAE sete diferentes produtos de degradação. O fármaco se mostrou estável em pH básico e também em exposição a luz. O método cromatográfico foi acoplado a um espectrômetro de massas com fins de realizar a elucidação estrutural dos produtos de degradação.

Em contrapartida, em outro trabalho (ZHOU et al., 2014) observou-se que as mudanças de pH não influenciaram a estabilidade de um fármaco diferente, onde se buscava estabelecer um método de identificação e caracterização dos produtos de degradação da alogliptina, um hipoglicemiante oral (BERTOL, 2017). Os autores encontraram as maiores quantidades de produtos de degradação nos estresses ácido e básico, resultado obtido também através de um método de CLAE.

A suscetibilidade em desenvolver produtos de degradação por hidrólise também foi observada no estudo de Sonawane e Gide (2012), que analisou a estabilidade do Eplerenone, um fármaco antagonista da aldosterona. Este trabalho apresenta como diferencial a aplicação do teste tanto no princípio ativo isolado quanto na forma farmacêutica, sem diferenças significativas no resultado. Todos os produtos de degradação formados foram analisados por CLAE-MS. Resultados semelhantes foram encontrados por Rolim (2010) ao avaliar o comportamento do Benznidazol frente à degradação forçada. Foram identificados dois produtos de degradação no estresse relativo a temperatura, que foram obtidos através de CLAE-MS/MS. Também são encontrados na literatura fármacos antibióticos submetidos a testes de degradação forçada. Pesquisadores (RAO et al., 2011), expuseram o anti-retroviral abacavir às condições de degradação já listadas anteriormente. Como resultado, obtiveram 8 produtos de degradação, separados por CLAE e identificados por espectrometria de massas. Além da identificação, este trabalho foi capaz de estabelecer as rotas de fragmentação do abacavir, informação que ainda não havia sido descrita na literatura.

Outras metodologias além da cromatografia também podem ser aplicadas na avaliação dos resultados do teste de degradação forçada. Isler (2014) em sua tese indica que métodos cromatográficos são úteis na avaliação de produtos de degradação já conhecidos e disponíveis em sua forma pura. Porém, para estabelecer

rotas novas em medicamentos novos, a autora indica a ressonância magnética nuclear, que seria uma técnica de identificação mais abrangente. O fármaco escolhido foi a rosuvastatina, onde sua degradação foi mensurada pelo método e os produtos de degradação foram identificados de forma mais econômica em relação aos recursos utilizados para uma análise cromatográfica.

O piroxicam também já foi exposto a testes de degradação forçada por autores. Modhave et al. (2011) aplicou este teste ao piroxicam e ao meloxicam, fármacos do mesmo grupo químico (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMAN, 2012), e os autores foram capazes de identificar 9 diferentes produtos de degradação, sendo 5 derivados do piroxicam e 4 oriundos do meloxicam. Tanto o fármaco no estado sólido quanto no estado líquido foi exposto ao estresse forçado, método pouco abordado nas pesquisas anteriormente citadas. Os autores concluíram que ambas as moléculas foram degradadas nos estresses hidrolíticos, oxidativos, térmicos e fotolíticos, apresentando caminhos de fragmentação também semelhantes, como a hidrólise envolvendo o grupamento amida, por exemplo.

O teste de degradação forçada também já foi aplicado ao piroxicam misturado a outras drogas, como o paracetamol (KHAN et al., 2013). Neste trabalho, foi desenvolvido um método cromatográfico simples e rápido capaz de separar os produtos de degradação de ambas as moléculas. Formulações farmacêuticas contendo o piroxicam e outros fármacos também foram objeto de estudo de Cioroiu et al. (2016), ao submeter uma associação entre ciclobenzaprina, lidocaína e piroxicam à degradação forçada. Neste estudo, as condições de degradação que mais promoveram a degradação foram a oxidação e a hidrólise ácida, gerando produtos que foram separados e identificados pelo método desenvolvido em CLAE MS/MS.

A cromatografia por camada delgada também é uma técnica passível de ser aplicada na verificação dos resultados de um teste de degradação forçada (STAREK et al., 2008). Com essa metodologia, os autores conseguiram identificar e quantificar tanto o piroxicam como um de seus produtos de degradação, a 2-aminopiridina. Além disso, Starek (2008) indica que a decomposição do piroxicam é uma reação de primeira ordem, e os altos valores de energia de ativação demonstram que o fármaco é um produto relativamente estável.

3 JUSTIFICATIVA

Levando o baixo número de resultados encontrados na literatura sobre a análise dos produtos de degradação do anti-inflamatório piroxicam, considerando que as regulamentações e exigências a respeito dos produtos de degradação para o registro de fármacos no país são recentes, e ainda a carência na literatura do número de trabalhos envolvendo a elucidação estrutural molecular dos produtos de degradação do piroxicam, torna-se oportuno o desenvolvimento deste projeto. Além disso, se faz necessária a melhoria das metodologias analíticas desenvolvidas para produtos de degradação em geral.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

- Desenvolvimento de método para estudo do perfil de degradação do piroxicam.

4.2 Objetivos específicos

- Quantificar a taxa de degradação forçada do piroxicam mediante a diferentes condições de degradação;
- Determinar os produtos de degradação forçada para o piroxicam isolado e na forma medicamentosa;
- Elucidar a estrutura molecular dos principais produtos de degradação do piroxicam.

5 METODOLOGIA

5.1 Método Cromatográfico

A primeira etapa para a análise do perfil de degradação do piroxicam foi a definição do método de análise por CLAE. Uma solução contendo 0,08 mg/mL de piroxicam padrão (Sigma Aldrich®) foi submetida a duas corridas cromatográficas, cada uma utilizando uma metodologia diferente: A primeira utilizou como fase móvel o padrão descrito na 5ª edição da Farmacopeia Brasileira, um solvente Metanol/Tampão fosfato de sódio dibásico 0,03M (60:40), sendo que todas as amostras eram diluídas em metanol/água (60:40) numa proporção de 1:3 antes de serem inseridas no equipamento. O volume de injeção utilizado neste caso foi de 15 µL, com um fluxo de 1,2 mL/min e um tempo de corrida de 7 minutos. A detecção dos picos cromatográficos foi realizada com auxílio de um detector ultravioleta nos comprimentos de onda de 357 nm. O segundo método testado consiste na substituição do metanol da fase móvel anterior por acetonitrila, além de uma alteração do fluxo de 1,2 para 1,0 mL/min e diminuição do tempo de corrida para 5 minutos. Neste método, as amostras eram diluídas numa solução idêntica a fase móvel, e a detecção dos picos cromatográficos foi realizada nos comprimentos de onda de 337 nm. Em ambos os casos as amostras foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) no cromatógrafo Shimadzu, composto por uma bomba LC-20AT, injetor SIL-20A, unidade controladora CBM-20A, utilizando uma coluna analítica Shim-pack VP-ODS (150 x 4,6mm) e detector SPD-M20A UV- Vis.

Definido o método de análise, foi construída uma curva de calibração com o padrão de piroxicam, nas concentrações de 0,005, 0,010, 0,015, 0,020 e 0,025 mg/mL para verificar a linearidade do método.

5.2 Degradação Forçada

Após este processo, foi possível iniciar a degradação forçada do medicamento em questão. Preparou-se 500 mL de uma solução estoque de concentração igual a 0,08 mg/mL de piroxicam padrão diluída em uma mistura de metanol e água numa proporção de 60:40. Esta solução foi distribuída em 7 diferentes frascos de vidro com tampa, particionados em 50 mL cada, cada frasco submetido a um estresse diferente, denominados como “condições de degradação”. As condições de degradação foram definidas de acordo com os parâmetros estabelecidos na RDC Nº 53 da ANVISA: Aquecimento (60 °C em estufa), solução ácida (HCl 0,1M), solução básica (NaOH

0,1M), solução oxidante (H_2O_2 3% v/v), íons metálicos (Fe^{2+} 0,05M) e exposição fotolítica (exposição direta do frasco de vidro em frente a lâmpada emissora de radiação UV). Para preparar a solução de ferro para testes da solução metálica, utilizou-se o sulfato de ferro heptahidratado ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$). Ao sétimo frasco nada foi adicionado, e sua análise tem como objetivo a comparação com os outros testes, funcionando como referência para os estudos, sendo um estudo denominado como “Branco”. Com exceção dos frascos submetidos ao aquecimento em estufa e à exposição fotolítica, todos os frascos foram envoltos em papel alumínio e armazenados em caixa protegida do calor e da umidade. Todos os frascos foram deixados sob estas condições por 10 dias consecutivos, onde a cada dia foram retiradas alíquotas em triplicata com o auxílio de uma pipeta automática.

O mesmo procedimento foi aplicado a uma segunda solução de concentração igual a 0,08 mg/mL, mas preparada com o conteúdo macerado de duas cápsulas comerciais diluídas numa mistura de metanol/água numa proporção de 60:40.

As alíquotas foram armazenadas em congelador até o momento da análise cromatográfica. No caso das amostras comerciais, procedeu-se a filtração (filtro de porosidade igual a $0,45\mu\text{m}$) em seringa momentos antes da análise cromatográfica.

5.3 Elucidação Estrutural

Tendo os produtos de degradação sido observados nos testes de degradação forçada, buscou-se estabelecer a massa de cada composto por espectrometria de massas do tipo *Matrix-assisted laser desorption/ionization – Time of flight* (MALDI-TOF, modelo AB SCIEX TOF/TOF 5800 System). Primeiramente, uma coleta ativa foi realizada diretamente na cânula de saída da coluna do CLAE, nos tempos de retenção correspondentes aos dos produtos de degradação formados. Em seguida, retirou-se cerca de 10 μL de amostra para a mistura com 24 μL da matriz α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid (responsável por promover a ionização da amostra). A aplicação da mistura na placa de amostras foi feita com aproximadamente 1 μL da mistura com auxílio de micropipeta, e as análises foram feitas pelo método refletor negativo. O conhecimento das massas dos compostos foi utilizado para comparar com dados oriundos da literatura para se definir a estrutura molecular de cada um. As amostras totais, ou seja, sem terem passado pela corrida cromatográfica, também foram analisadas por este método, com o objetivo de se avaliar a sua sensibilidade e poder de discriminação.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 - Método Cromatográfico

A proposta inicial do estudo era a de se utilizar o método para quantificação do piroxicam estabelecido na 5ª edição da Farmacopeia Brasileira em monografia específica. A figura 1 apresenta a comparação os dois métodos propostos anteriormente, com modificações principalmente na natureza da fase móvel. É possível, perceber que o pico de piroxicam no método farmacopéico apresenta tempo de retenção de 4,05 minutos, e o mesmo apresenta uma característica caudal indesejável para as análises, pois o prolongamento do pico pode eventualmente se sobrepor a outro com tempo de retenção próximo. No segundo método estudado, observa-se redução do tempo de retenção em relação ao método anterior, passando a ser de aproximadamente 3,50 minutos. Também é possível destacar que o pico de piroxicam não apresenta aspecto caudal no cromatograma e o aumento da intensidade do pico, característica que evidencia o aumento da sensibilidade do método. Acredita-se que a melhora de resolução do pico está relacionada com as forças de interação do solvente com a fase móvel. O metanol, capaz de interagir por interações de hidrogênio com as moléculas de piroxicam, talvez esteja produzindo uma “blindagem” muito estável do composto. Com o tempo, o tampão passaria a competir com o metanol para interagir com o piroxicam, e esta competição pode ter levado ao aspecto caudal do pico. Já a acetonitrila, que interage com o piroxicam com fracas forças dipolo, promoveria uma blindagem menos eficiente, facilmente desfeita no momento em que o tampão passa a solvatar estas moléculas, levando a uma melhora na resolução dos picos. Desta forma, foi escolhido o segundo método apresentado para a análise das amostras.

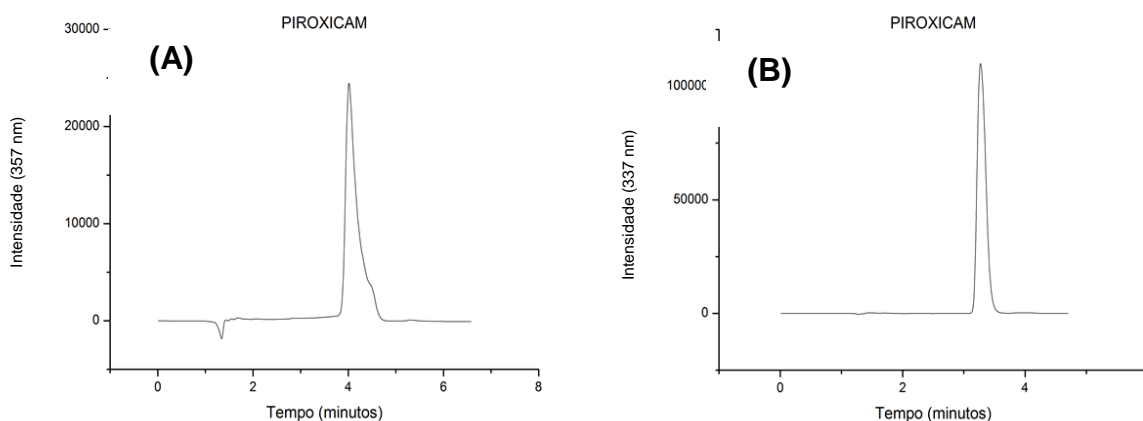


Figura 1 Comparação entre metodologias cromatográficas para quantificação do piroxicam: (A) Cromatograma de piroxicam obtido pelo método da Farmacopeia (metanol/tampão). Destaque para o aspecto caudal ao final do pico de piroxicam, em 4,02 minutos. (B) Cromatograma de piroxicam obtido pelo método alternativo (acetonitrila/tampão). Destaque para o aumento da resolução do pico de piroxicam, observado neste método com tempo de retenção de aproximadamente 3,50 minutos. Fonte: Autoria própria

Definido o método de análise, foi preparada uma curva de calibração para verificar a linearidade do método. Cinco amostras com diferentes concentrações conhecidas de piroxicam padrão foram inseridas no equipamento para leitura e construção da curva. Segundo Brito et al. (2003), este deve ser o número mínimo de amostras para este tipo de análise. Os resultados estão demonstrados na figura 2. Nota-se que o coeficiente de correlação apresenta valor maior a 0,99, indicando que neste método, os dados estão relacionados entre si de forma consistente. Em outras palavras, este valor do coeficiente de correlação indica linearidade satisfatória do método, cujos dados apresentam correlação fortíssima (BRITO et al., 2003). A construção da curva de calibração é uma atividade importante para a validação do método analítico, e neste caso específico indica que o método escolhido é capaz de diferenciar diferentes concentrações de princípio ativo, característica fundamental para analisar a degradação do piroxicam.

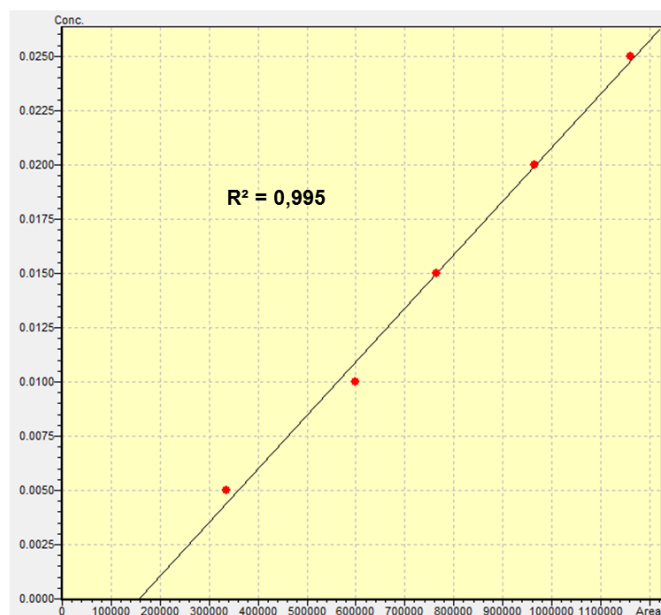


Figura 2 Curva de calibração: Concentração piroxicam (mg/mL) x área da curva

Fonte: Autoria própria

6.2 Degradação forçada

Após a construção da curva de calibração, foi iniciada a análise das alíquotas coletadas. De maneira geral, foi possível perceber uma irregularidade nas taxas de piroxicam com o passar dos dias, ou seja, na maioria dos estudos não foi observada diminuição progressiva da concentração de piroxicam. Acredita-se que este comportamento ocorreu devido à alta concentração inicial da molécula de interesse (0,08mg/mL), demonstrada tendo em vista a formação de precipitado amarelo na parede dos microtubos de plástico utilizados para armazenamento das amostras. Esta formação de precipitado pode ter prejudicado a alíquotagem das amostras, pois a quantidade de piroxicam coletada pode não ter correspondido com a concentração real em algumas amostras. Em estudos de degradação forçada, pode ocorrer que a degradação do composto de interesse se mostre de forma muito sutil, menor do que o mínimo de 5% defendido por muitos autores (BLESSY et al., 2013) (BRUMER, 2011). Assim, a alta concentração de piroxicam pode ter encoberto a visualização da sua degradação. Vale ressaltar que a legislação brasileira que guia os testes de degradação forçada não estabelece a concentração inicial da solução teste e

tampouco define o percentual de degradação que deve ser promovida para o encaminhamento das análises. A falta destas informações dificulta a realização das análises de forma padrão, podendo levar a discrepâncias dos resultados apresentados entre os diferentes documentos de registro de medicamentos. A seguir estão apresentados os resultados das análises divididos por condições de degradação, onde as características apresentadas acima serão exemplificadas.

6.2.1 Estresses ácidos e básicos

Como as coletas das alíquotas foram realizadas em dias consecutivos, esperava-se que fosse observada uma redução da concentração de piroxicam com o passar do tempo, ou seja, que as amostras referentes ao dia 10 apresentassem concentração menor do que as amostras referentes aos dias 5 ou 1, por exemplo. Porém, na degradação forçada por variação de pH, não foram observadas degradações mensuráveis do piroxicam. Esta estabilidade do piroxicam em frente a diferenças de pH já foi descrita em outros trabalhos, onde a estrutura molecular do piroxicam, com destaque ao anel piridina ligado ao grupo amida proporciona a esta droga uma característica de *zwitterion* em determinadas faixas de pH (ABDULKARIM, 2010). Porém, a alta concentração da solução inicial pode ter encoberto degradações pequenas do fármaco em questão, como será apresentado posteriormente. Desta forma, não foi possível identificar produtos de degradação nos cromatogramas destes estudos.

6.2.2 Estresse por íons metálicos

A exposição por íons metálicos, apresentou resultados semelhantes aos estresses ácidos e básicos. Não foi possível observar degradação do piroxicam, e conseqüentemente não foi possível identificar a formação de novos picos formados devido à degradação forçada.

6.2.3 Estresse oxidativo

A exposição a estresse oxidativo apresentou diferenças em relação a solução padrão e a solução comercial (Figura 3). Verifica-se que a solução padrão apresentou variação irregular, novamente exemplificando a hipótese anterior de que mesmo que a degradação esteja acontecendo, a alta concentração do composto encobriu a visualização deste fenômeno. Já na solução comercial, a diminuição dos níveis de piroxicam é nítida o suficiente para superar o viés descrito anteriormente, alcançando no décimo dia uma taxa de apenas 12,78% em relação ao início do estudo. Estes

resultados demonstram que existe alguma substância presente na forma medicamentosa que interage com o piroxicam favorecendo as reações de oxirredução responsáveis pela sua degradação a consequente formação de novos compostos. É possível identificar como viés deste estudo o aparecimento de um pico no tempo de retenção de 1,60 minutos, desde o início das análises, fruto do reagente utilizado. Por estar presente em quantidade significativa, este interferente pode estar sobreposto a algum produto de degradação, mas não foi possível evitar a sua presença.

Foi possível identificar no cromatograma um pico formado no tempo de 2,7 minutos aproximadamente, tanto na solução contendo o padrão (Figura 4) quanto na solução comercial (Figura 5). A Figura 6 traz, para fins de comparação, o cromatograma do mesmo intervalo de tempo em que este produto de degradação foi encontrado, mas em relação às amostras que não foram submetidas a nenhuma condição de degradação (Branco). Nota-se que não é possível observar nenhum pico no tempo de 2,7 minutos, evidenciando que este novo composto foi gerado devido a exposição a degradação oxidativa.

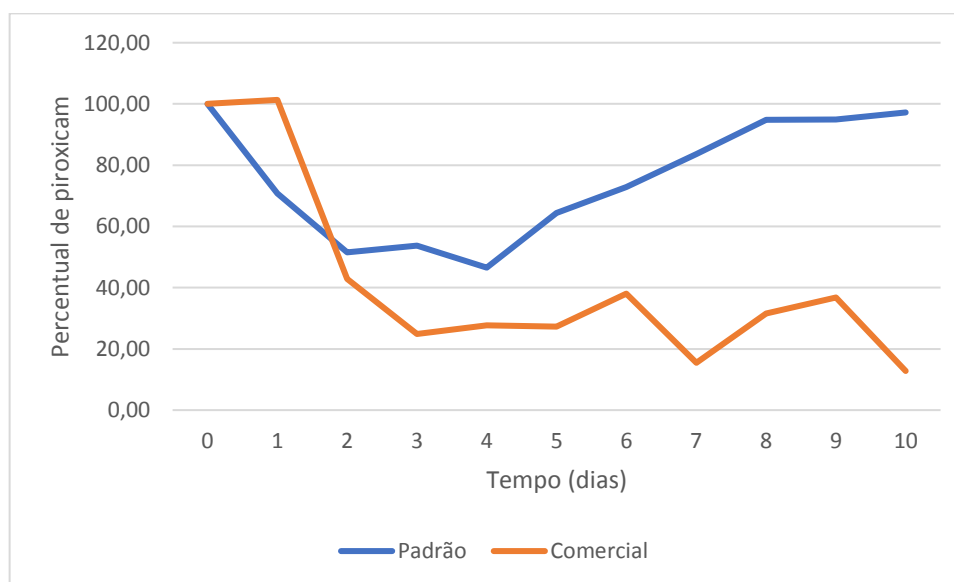


Figura 3 Evolução da concentração de piroxicam padrão e comercial em estresse oxidativo. Fonte: Autoria própria

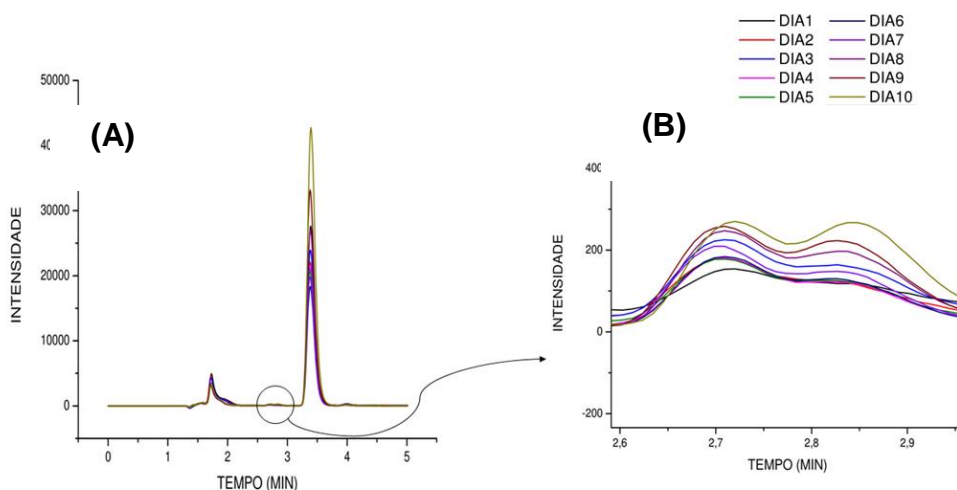


Figura 4 (A) Cromatograma amostras de piroxicam padrão submetidas à estresse oxidativo. (B) Destaque para o pico formado no tempo de retenção de aproximadamente 2,7 minutos. Apesar da degradação irregular do piroxicam, este novo composto apresenta aumento gradual com o passar dos dias, corroborando com a hipótese de que ao se analisar em menores concentrações, resultados mais lineares podem ser encontrados. Fonte: Autoria própria.

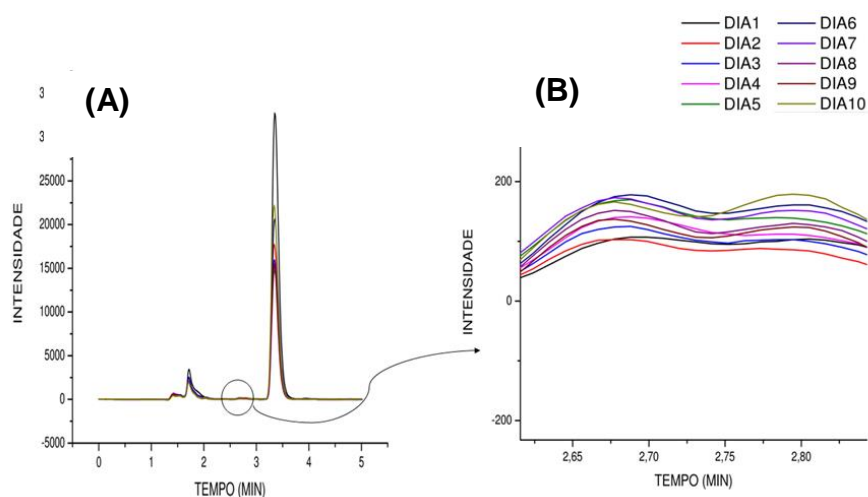


Figura 5 (A) Cromatograma amostras de piroxicam comercial submetidas à estresse oxidativo. (B) Destaque para o pico formado no tempo de retenção de aproximadamente 2,7 minutos, da mesma forma que ocorreu com o piroxicam padrão. Fonte: Autoria própria.

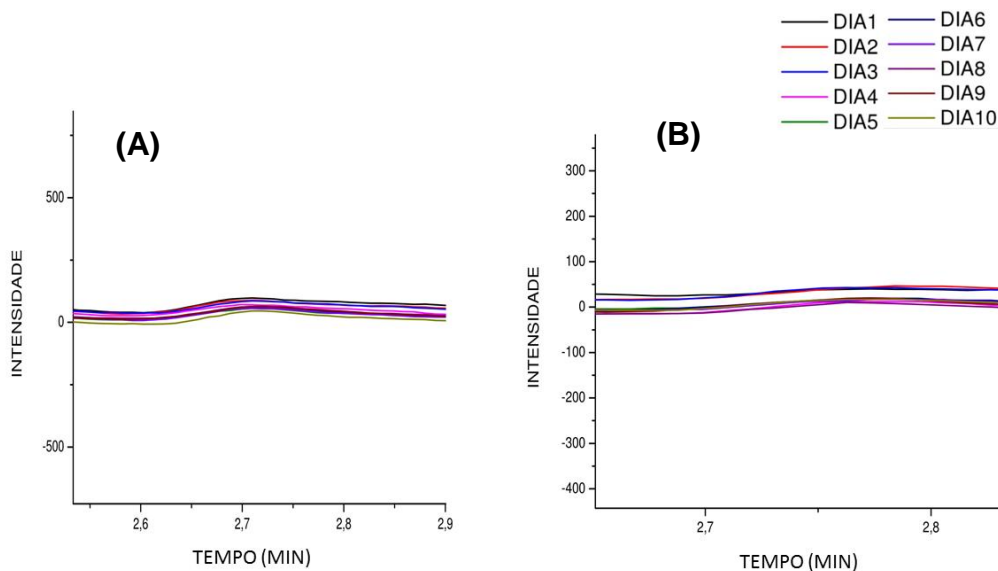


Figura 6 Cromatograma amostras de piroxicam (Branco), ampliado para o tempo de 2,7 minutos. (A) amostra padrão. (B) amostra comercial. A ampliação no tempo de retenção de 2,5 a 3,0 minutos demonstra a ausência de novos picos, reforçando a influência do estresse oxidativo na formação de produtos de degradação do piroxicam. Fonte: Autoria própria.

6.2.4 Estresse por aquecimento

A exposição ao aquecimento foi uma condição de degradação com capacidade de diminuir as taxas de piroxicam com o passar dos dias. Isto significa que o aumento de temperatura foi capaz de promover alterações significativas nas moléculas de piroxicam, formando novos compostos. Porém, esta degradação só foi observada no estudo realizado com o piroxicam comercial. O mesmo estudo realizado com o piroxicam isolado não apresentou decaimento da concentração de piroxicam, como está representado na Figura 7, de maneira semelhante ao observado no estresse por solução oxidativa. Estes resultados indicam que, no piroxicam comercial, existem outras substâncias que podem ter proporcionado a degradação da molécula principal, sendo que na ausência desta substância a degradação não ocorre significativamente.

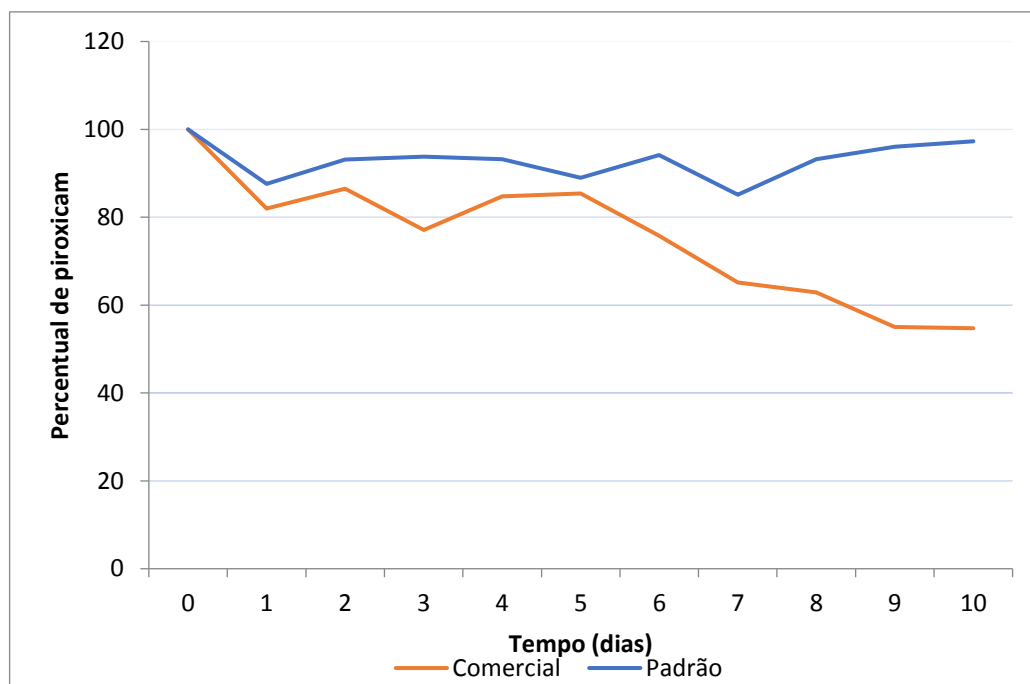


Figura 7 Evolução da concentração de piroxicam padrão e comercial em estresse por aquecimento Fonte: Autoria própria.

O principal produto de degradação encontrado neste estudo, apresenta no cromatograma um tempo de retenção de aproximadamente 4,1 minutos, tanto na solução padrão (Figura 8) quanto na solução comercial (Figura 9). Além disso, verificou-se a formação de um outro produto de degradação num tempo de retenção por volta de 1,5 minutos, mas identificado apenas na solução comercial (Figura 9). Este resultado indica que a diferença entre o perfil de degradação do piroxicam padrão e do comercial não está apenas na sua taxa de degradação, mas também na formação de novas moléculas.

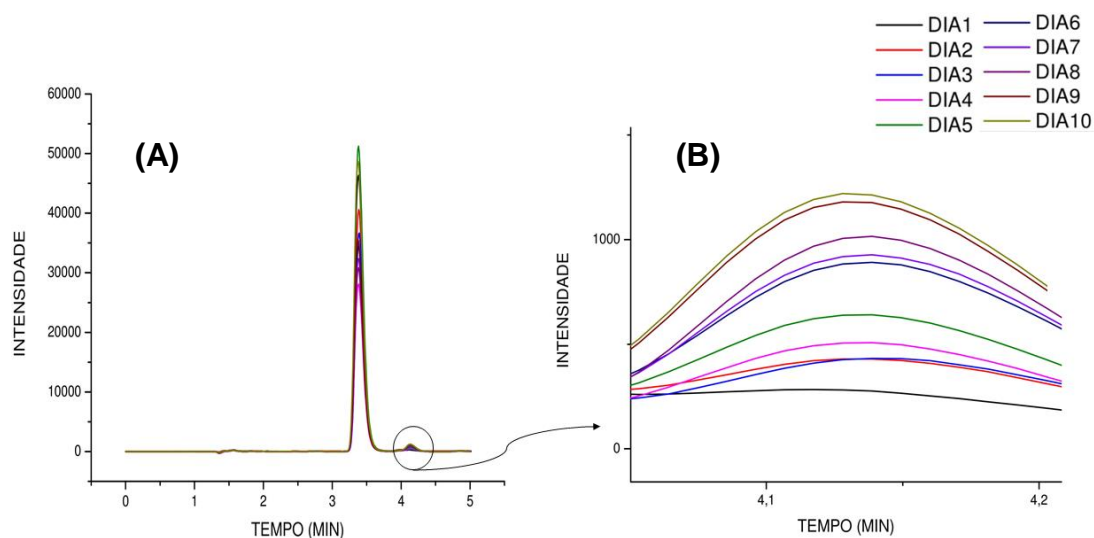


Figura 8 (A) Cromatograma amostras de piroxicam padrão submetidas à estresse por aquecimento. (B) Destaque para o pico formado no tempo de retenção de aproximadamente 4,1 minutos. Apesar da variação irregular da concentração de piroxicam, este novo composto apresenta aumento gradual com o passar dos dias, corroborando com a hipótese de que ao se analisar em menores concentrações, resultados mais lineares podem ser encontrados. Fonte: Autoria própria.

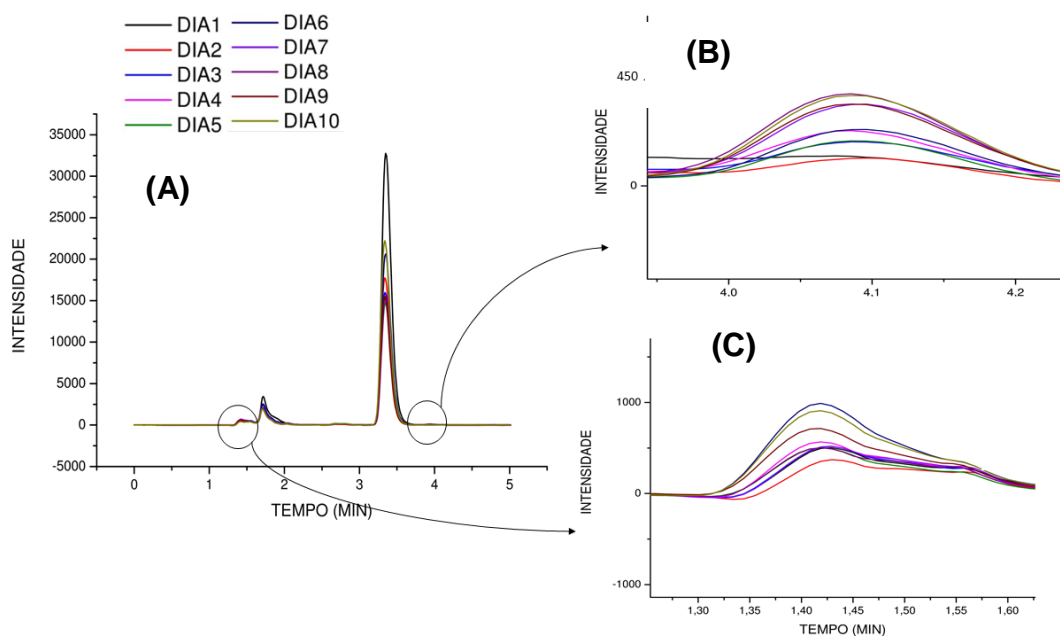


Figura 9 (A) Cromatograma amostras de piroxicam comercial submetidas à estresse por aquecimento (B) Destaque para o pico formado no tempo de retenção de aproximadamente 4,1 minutos, da mesma forma que ocorreu com o piroxicam padrão,

e (C) para o pico formado no tempo de retenção de aproximadamente 1,5 minutos, encontrado exclusivamente na solução comercial. Fonte: Autoria própria

A Figura 10 traz, para fins de comparação, o cromatograma do mesmo intervalo de tempo em que este produto de degradação foi encontrado, mas em relação as amostras que não foram submetidas a nenhuma condição de degradação (Branco). Nota-se que não é possível observar nenhum pico no tempo de 4,1 minutos, evidenciando que este novo composto foi gerado devido a exposição a degradação por aquecimento.

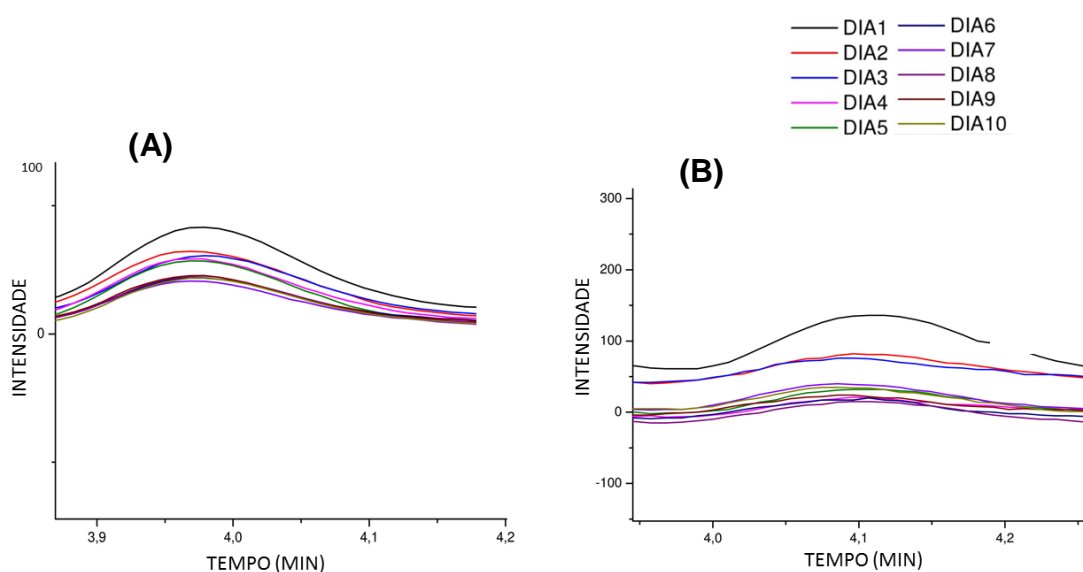


Figura 10 Cromatograma amostras de piroxicam (Branco), ampliado para o tempo de 4,1 minutos. (A) amostra padrão. (B: amostra comercial. A ampliação no tempo de retenção de 4,1 minutos demonstra que há a presença de um composto com tempo de retenção próximo, mas não igual ao tempo de retenção observado anteriormente. Fonte: Autoria própria

6.2.5 Estresse por exposição fotolítica

A condição de degradação relacionada com a exposição fotolítica apresentou taxas de decaimento rápidas e intensas. Observa-se na figura 11 que a concentração de piroxicam diminui bruscamente com o passar dos dias. A partir do dia 5, já não é possível identificar piroxicam na solução padrão, enquanto que na solução comercial os níveis não chegam a se esgotar, mas se mantém num nível muito baixo (entre 3% e 1%). Esta característica deste estudo está em desacordo com a RDC 53/ANVISA,

que orienta que a degradação forçada não deve levar ao esgotamento da droga. Portanto, para o piroxicam, outras metodologias para a análise em frente a exposição fotolítica devem ser abordadas. Este resultado indica a alta capacidade da radiação ultravioleta de interagir com o piroxicam, promovendo a sua alteração molecular, mas evidencia a existência de um possível fator presente na solução comercial que leva a manutenção de níveis basais do medicamento nestas condições. Conforme destacado nos cromatogramas, verifica-se a presença de um possível produto de degradação, no tempo de retenção de 1,50 minutos aproximadamente, sendo observado tanto na solução padrão (Figura 12) quanto na solução comercial (Figura 13).

A Figura 14 traz, para fins de comparação, o cromatograma do mesmo intervalo de tempo em que este produto de degradação foi encontrado, mas em relação às amostras que não foram submetidas a nenhuma condição de degradação. Nota-se que no branco existem alguns picos mal definidos neste tempo de retenção, possivelmente relativos a mesma molécula identificada na degradação forçada. Porém, deve-se destacar que o cromatograma referente ao teste apresenta picos com maior definição, pois estão presentes em quantidade maior em relação ao branco.

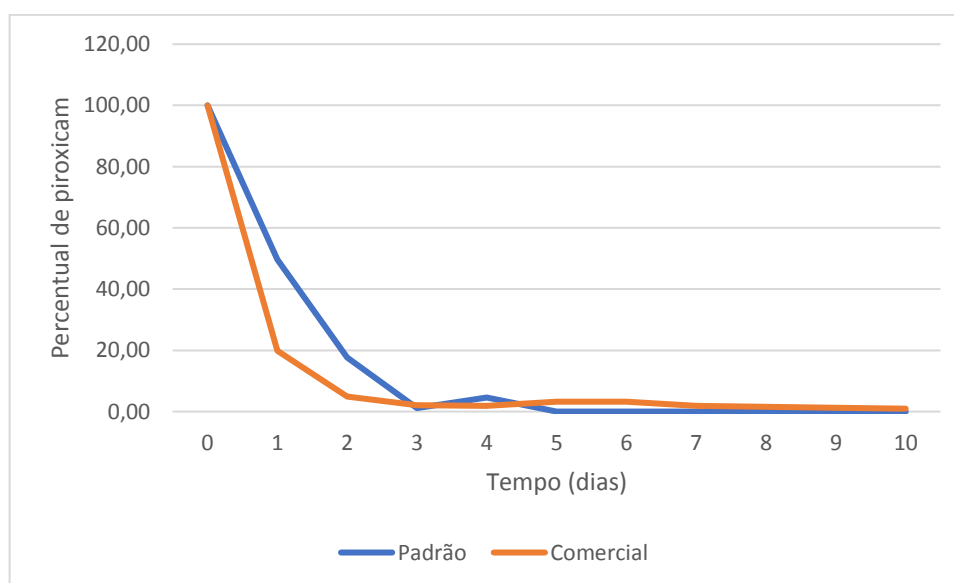


Figura 11 Evolução da concentração de piroxicam padrão e comercial em estresse por exposição fotolítica. Fonte: Autoria própria

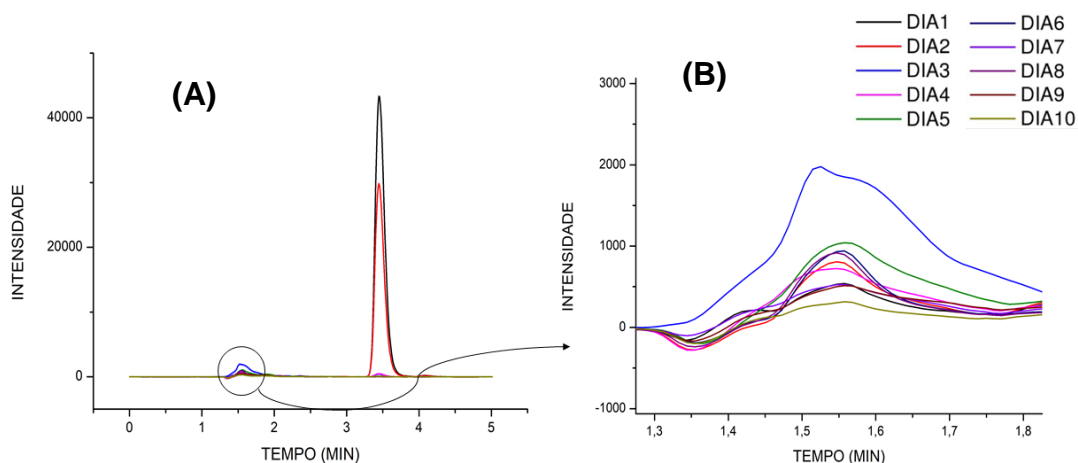


Figura 12 (A) Cromatograma amostras de piroxicam padrão submetidas à estresse por exposição fotolítica. (B) Destaque para o pico formado no tempo de retenção de aproximadamente 1,5 minutos, apresentando aumento gradual até o terceiro dia de degradação, quando sua intensidade começa a diminuir. Acredita-se que o alto grau de estresse provocado por este estudo foi responsável não só por degradar a molécula principal, como também todas as outras formadas durante este processo. Fonte: Autoria própria

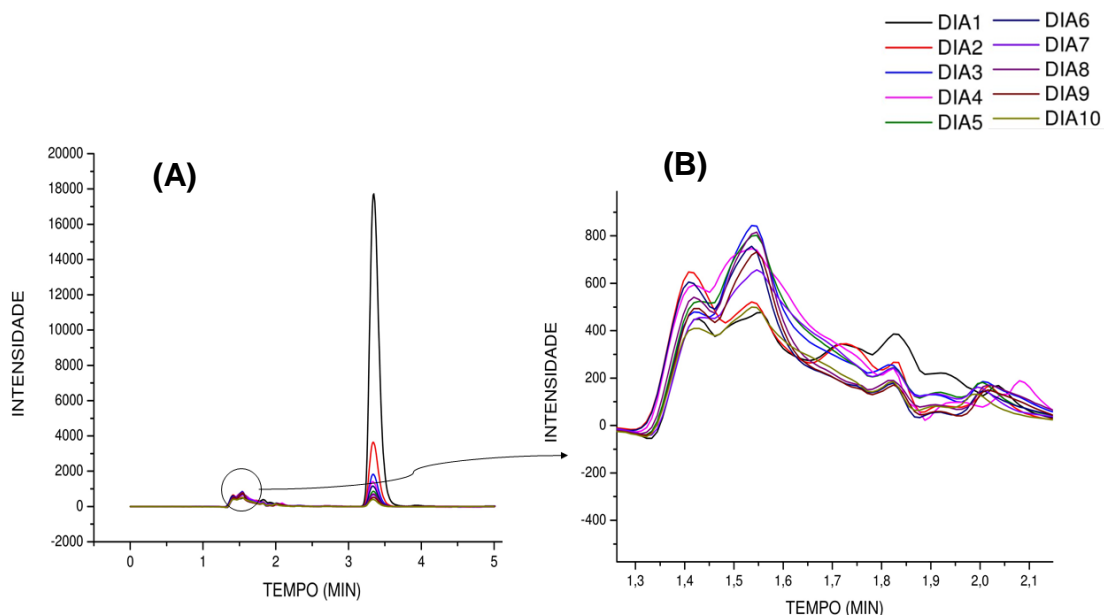


Figura 13 (A) Cromatograma amostras de piroxicam comercial submetidas à estresse por exposição fotolítica. (B) Destaque para o pico formado no tempo de retenção de

aproximadamente 1,5 minutos, com as mesmas características explicadas na figura anterior. Fonte: Autoria própria

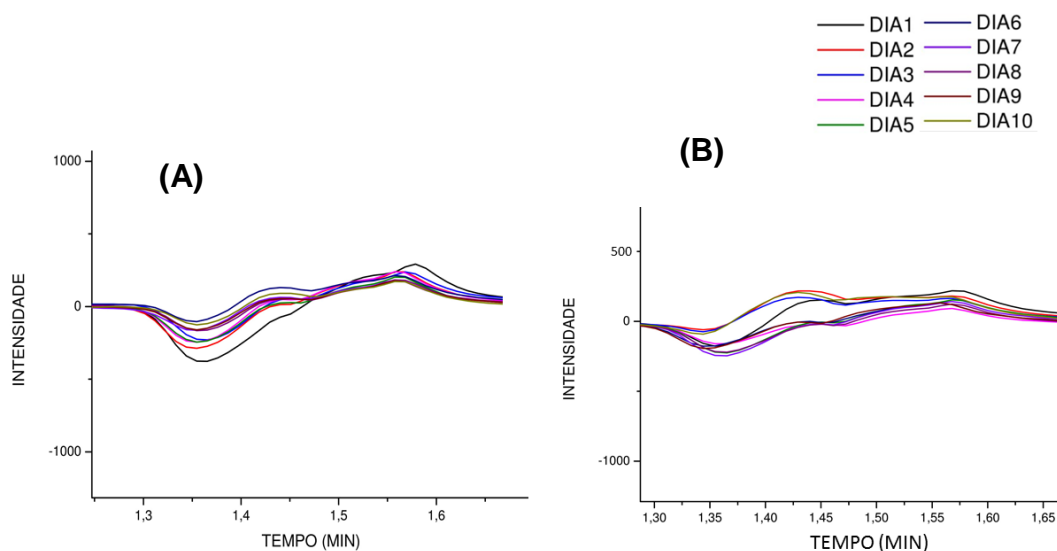


Figura 14 Cromatograma amostras de piroxicam (Branco), ampliado para o tempo de 1,5 minutos. (A) amostra padrão. (B) amostra comercial. Na ampliação no tempo de retenção de 1,5 minutos verifica-se a ausência de quantidades significativas de novos picos, reforçando a influência do estresse por exposição fotolítica na formação de produtos de degradação do piroxicam. Esta conclusão também é válida para o composto encontrado na degradação por aquecimento, cujo tempo de retenção é o mesmo observado nesta figura. Fonte: Autoria própria.

O Quadro 2 apresentado a seguir resume os três diferentes produtos de degradação identificados a partir da análise dos cromatogramas de cada estudo. Observa-se que existem compostos (como é o caso daquele que apresenta tempo de retenção de 4,1 minutos) que são formados exclusivamente por uma condição de degradação que propicia um ambiente que cliva ligações específicas no processo de degradação forçada. Diferentes vias de degradação são reportadas no trabalho de Modhave et al. (2011), onde os autores destacam a via de degradação hidrolítica e a via de degradação oxidativa para o piroxicam e o meloxicam. Porém, também se mostrou visível que diferentes condições de degradação podem formar o mesmo composto, como observado na análise do pico que possui tempo de retenção igual a

1,5 minutos, gerado tanto na condição de aquecimento quanto na condição de exposição fotolítica. O Quadro 2 traz também a relação entre produto de degradação e piroxicam, gerando os percentuais apresentados na quarta coluna. A legislação que trata a respeito da análise de produtos de degradação não indica como este cálculo deve ser realizado, o que dificulta a comparação com outras metodologias e, novamente, dificulta a padronização dos resultados. Nota-se ainda no Quadro 2 que apenas o produto de degradação observado na condição de degradação oxidativa apresentou valor abaixo dos 0,5%, limite máximo da presença desse tipo de impureza antes de ser enquadrado no limite de qualificação. Isso significa que, de acordo com a RDC 53/2015, com exceção do composto citado anteriormente, todos os produtos de degradação do piroxicam encontrados neste estudo deveriam ter sua estrutura química identificada e realizada a quantificação individual, e quando apresentarem na sua estrutura química características que conduzam à classificação de produto potencialmente tóxico, deverão ter seu perfil de segurança estabelecido através da avaliação da segurança biológica (BRASIL, 2015).

Quadro 2 Produtos de degradação identificados distribuídos de acordo com condição de degradação, tipo de amostra, percentual e classificação.

TEMPO DE RETENÇÃO (min)	CONDIÇÃO DE DEGRADAÇÃO	AMOSTRA	PERCENTUAL EM RELAÇÃO AO PIROXICAM (DIA 10)	CLASSIFICAÇÃO SEGUNDO RDC 53/2015
1,5	Exposição fotolítica	Padrão	3,55%	Qualificação
		Comercial	1,42%	Qualificação
	Aquecimento	Comercial	1,79%	Qualificação
2,7	Estresse oxidativo	Padrão	0,53%	Qualificação
		Comercial	0,31%	Identificação
4,1	Aquecimento	Padrão	1,89%	Qualificação
		Comercial	0,97%	Qualificação

Fonte: Autoria própria.

6.3 Elucidação estrutural

A terceira etapa deste trabalho teve como objetivo a elucidação estrutural dos compostos identificados na cromatografia. A espectrometria de massas por MALDI-TOF aplicada nas amostras obtidas através da coleta ativa dos compostos de interesse não apresentou resultados satisfatórios. Este método de isolamento apresentou no espectro de massas a presença de várias substâncias, incluindo o próprio piroxicam. Esta dificuldade na separação das amostras para a aplicação no espectrômetro de massas impossibilitou neste trabalho a correlação entre os resultados observados nos cromatogramas com as estruturas moleculares que serão apresentadas a seguir. Uma alternativa para a solução deste viés é a utilização de um cromatógrafo já acoplado a um espectrômetro de massas. Assim, a espectrometria de massas por MALDI-TOF foi aplicada nas amostras totais (sem passar pela separação cromatográfica) referentes ao décimo dia de degradação de cada condição, visto que foram as amostras que apresentaram maiores quantidades de produtos de degradação. A exceção foi a degradação por exposição fotolítica, que apresentou maiores taxas no quinto dia de degradação. A espectrometria por MALDI-TOF é geralmente utilizada para moléculas grandes, com grande aplicação na área de proteômica. Identificação de fármacos com peso molecular muito mais baixo são pouco descritas na literatura utilizando esta técnica. Os resultados dessa análise inicial estão demonstrados no Quadro 3. Percebe-se que foram encontrados potenciais produtos de degradação em praticamente todos os estudos, diferentemente do observado no CLAE. Este resultado demonstra que a espectrometria de massas por MALDI-TOF se mostrou com sensibilidade consideravelmente maior em relação ao método cromatográfico e com alto poder de discriminação de compostos, fornecendo ainda as massas exatas das moléculas identificadas. Este aumento de sensibilidade mostrou, por exemplo, que a condição ácida de degradação promoveu formação de novas moléculas, e, portanto, levou a degradação do piroxicam, característica não observada nos resultados obtidos por CLAE. No geral, a comparação entre a amostra comercial e a amostra padrão geraram, dentro de cada condição de degradação, os mesmos subprodutos, demonstrando que o perfil de degradação da forma comercial do piroxicam é equivalente na natureza dos produtos formados na forma padrão, porém difere na velocidade de degradação do princípio ativo, e conseqüentemente na velocidade e quantidade de formação de produtos de degradação, conforme demonstrado no Quadro 2 e nos cromatogramas anteriores.

Padrão/Íons met.	X				X				X
Comercial/Íons met.	X				X				X
Padrão/Aquec.	X	X	X		X		X		X
Comercial/Aquec.	X	X			X		X	X	X
Padrão/Oxidativa	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Comercial/Oxidativa	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Padrão/Fotolítica	X		X	X	X	X	X	X	X
Comercial/Fotolítica					X	X		X	X

Fonte: Autoria própria.

(Conclusão)

Para se certificar de que as massas encontradas realmente correspondiam a produtos de degradação do piroxicam, recorreu-se a comparação com resultados obtidos por outros autores. Utilizando outras metodologias para a elucidação estrutural, Tománková, Šabartová (1989) identificou e propôs a estrutura de três produtos de degradação do piroxicam, cujas massas eram de: 94,11 m/z, 179 m/z e 211 m/z. Estas massas se aproximam das massas encontradas neste trabalho, identificadas no Quadro 3 como PD1, PD6 e PD8, respectivamente. Este mesmo raciocínio foi aplicado para o estudo realizado por Modhave et al. (2011), que realiza uma análise mais aprofundada da degradação do piroxicam. Em seu trabalho, Modhave et al. (2011) identifica como produtos de degradação do piroxicam estruturas com as seguintes massas: 95.0569 m/z, 167.0452 m/z, 180.0761 m/z, 212.0381 m/z e 198.0219 m/z, correspondendo com as moléculas encontradas neste trabalho e identificadas no Quadro 3 como PD1, PD6, PD7 e PD8. Dessa forma, verifica-se concordância entre os resultados apresentados na literatura com os obtidos experimentalmente neste trabalho, contribuindo com a hipótese de que as moléculas apresentadas no Quadro 3 correspondem a produtos de degradação do piroxicam.

Como as prováveis estruturas já foram apresentadas em outros artigos (TOMÁNKOVÁ; ŠABARTOVÁ, 1989) (MODHAVE et al., 2011), realizou-se o procedimento de fragmentação de cada uma das moléculas formadas (método MS/MS), para observar se a característica do seu espectro de massa corresponde com a fragmentação das estruturas propostas por estes autores. Percebe-se na Figura 15 que estas estruturas moleculares, quando clivadas no ponto indicado pela linha pontilhada, apresentam fragmentos cujas massas foram identificadas pela

espectrometria de massas. Estes resultados somados com a compatibilidade entre as massas exatas encontradas confirmam que os novos compostos identificados neste trabalho correspondem a produtos de degradação do piroxicam, cujas estruturas moleculares estão corretamente definidas na Figura 15.

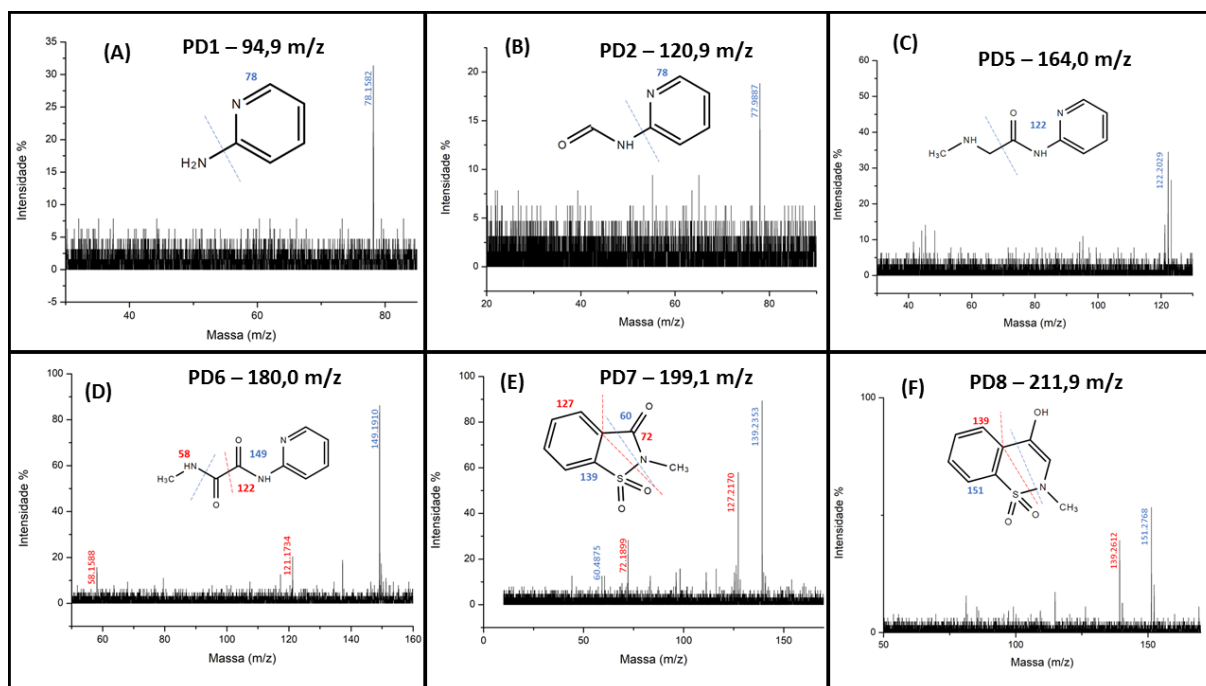


Figura 15 Comparação estruturas moleculares propostas na literatura com espectros MS/MS das moléculas identificadas nos estudos de degradação forçada Fonte: Autoria própria.

Definidas as estruturas moleculares, é possível propor o perfil de degradação do piroxicam, verificando onde ocorrem as principais quebras de ligações para que seja possível a formação dos produtos descritos acima. Este perfil é apresentado na Figura 16, onde a linha pontilhada representa a ligação quebrada no processo de degradação. Nota-se que a quebra do piroxicam em determinadas ligações (como mostrado nas letras “C”, “D” e “E”) formam ao mesmo tempo dois produtos de degradação identificados neste trabalho.

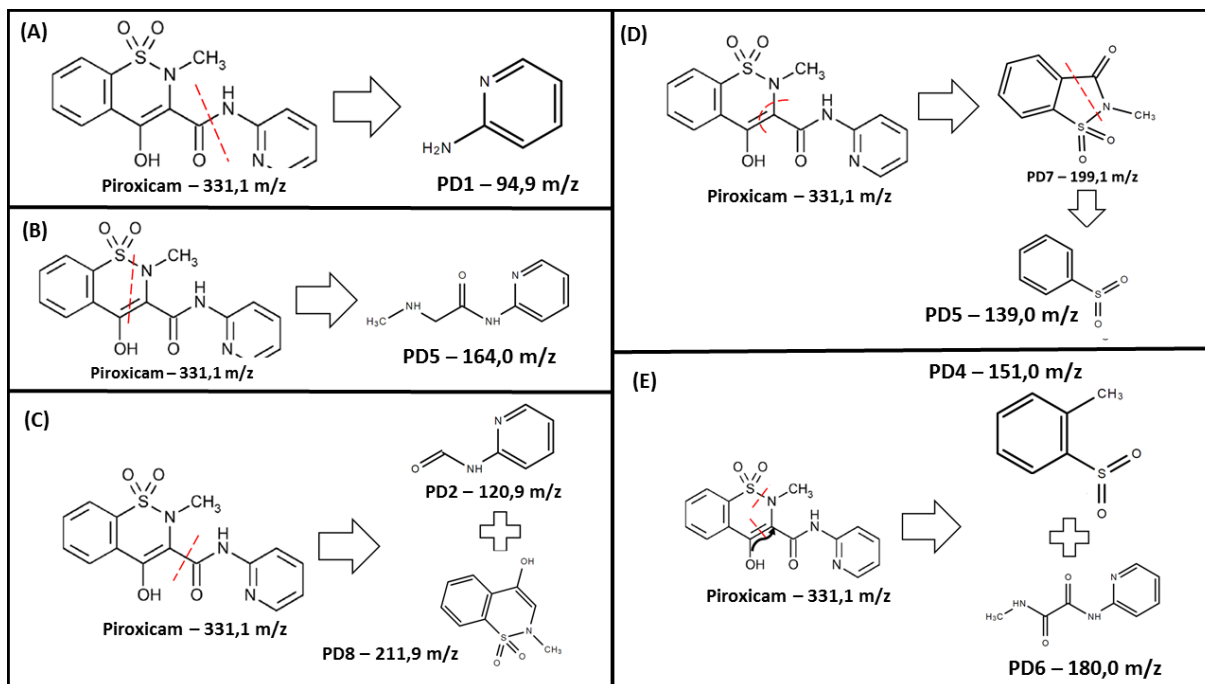


Figura 16 Locais de quebras de ligação do piroxicam para a formação de produtos de degradação. Fonte: Autoria própria.

A elucidação estrutural das moléculas PD3 e PD4, cujas massas não foram discutidas em outros trabalhos, foi realizada com base na observação da fragmentação dos produtos de degradação apresentados na Figura 15 e do próprio piroxicam. O composto PD3, por exemplo, apresenta uma massa de 139,0 m/z, mesma massa de um dos fragmentos do produto de degradação PD7. Dessa forma, acredita-se que o composto PD3 corresponde a um produto de degradação do composto PD7, ou seja, uma segunda etapa de degradação do piroxicam original, conforme mostrado na letra “D” da Figura 16. Por ser uma segunda reação na degradação do piroxicam, explica-se o fato dessa molécula só ter sido encontrada nas condições de degradação onde os maiores níveis de degradação do fármaco foram observados (aquecimento, degradação fotolítica e oxidativa).

Por fim, a proposta de formação do composto PD4, de massa igual a 151,0 m/z, é apresentada na letra “E” da Figura 16. Para a formação do composto PD6, ocorre quebra da ligação indicada pela linha pontilhada, formando ao mesmo tempo um fragmento de massa aproximada de 180 m/z e outro com massa aproximada de 151 m/z.

7 CONCLUSÃO

Através deste trabalho, foi possível identificar uma metodologia cromatográfica capaz de não só identificar e quantificar o anti-inflamatório piroxicam como também o separar dos seus produtos de degradação. Também permite avaliar diferenças em relação as condições de degradação exercidas sobre o piroxicam, como ficou observado nos estudos de aquecimento, solução oxidativa e exposição fotolítica, principais responsáveis pela degradação deste medicamento. Para o melhor aproveitamento desta técnica, recomenda-se o uso de uma solução estoque mais diluída, pois assim a observação da degradação do princípio ativo de interesse fica favorecida.

Verificou-se diferenças na taxa de degradação do piroxicam quando se alterou o tipo de amostra (comercial e padrão), bem como na formação de produtos de degradação. Porém, a segunda parte do trabalho indicou que esta diferença está na velocidade e na quantidade em que estas reações acontecem (mais rápidas e intensas na amostra comercial, na presença de excipientes), e não na sua natureza. Apesar disso, os produtos de degradação se mostraram em maior quantidade nos testes feitos com a amostra padrão, provavelmente devido à interação destas novas moléculas com outros componentes da matriz, diminuindo seus níveis disponíveis para quantificação. Praticamente todas as amostras ultrapassaram o limite máximo estabelecido pela legislação, se encaixando no limite de qualificação de cada um dos compostos.

A análise por espectrometria de massas do tipo MALDI-TOF se mostrou eficaz na elucidação estrutural de oito diferentes produtos de degradação, que são moléculas de baixa massa molecular, característica ainda pouco explorada na literatura. Sua alta sensibilidade permitiu o alinhamento destes resultados com os obtidos por CLAE, aumentando a credibilidade do estudo.

Durante a realização deste trabalho, verificou-se que a legislação vigente para a análise de produtos de degradação no Brasil, apesar de obrigatória, apresenta pouco detalhamento a respeito da condução dos testes, principalmente em relação ao tipo de amostra a ser utilizada (padrão ou comercial), à concentração da solução estoque e ao cálculo para quantificação do produto de degradação em relação à molécula inicial. Todas estas deficiências devem ser sanadas para um melhor

aproveitamento dos resultados obtidos pelas indústrias, que estarão visando a legislação para o registro de novos medicamentos e atualização de registros vigentes.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDULKARIM, Muthanna F et al. Topical piroxicam in vitro release and in vivo anti-inflammatory and analgesic effects from palm oil esters-based nanocream. **Int J Nanomedicine**, Penang, v. 5, n. 1, p.915-924, nov. 2010.

AQUINO, Daniela Silva de. Por que o uso racional de medicamentos deve ser uma prioridade?. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 13, p. 733-736, 2008.

ARRAIS, Paulo Sérgio D. et al. Perfil da automedicação no Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 31, p. 71-77, 1997.

BERTOL, Charise Dallazem. **Alogliptina: caracterização, estudo de compatibilidade, validação de metodologia analítica e estudo de estabilidade para avaliação da qualidade**. 2017. 141 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2017.

BLESSY, M. et al. Development of forced degradation and stability indicating studies of drugs - a review. **Journal Of Pharmaceutical Analysis**, Gujarat, v. 4, n. 3, p.159-165, set. 2013.

BORGES, Felipe Silva. **A automedicação em estudantes universitários da Faculdade de Ceilândia, Universidade de Brasília**. 2013. 49 f. Monografia - Curso de Farmácia, Universidade de Brasília, Ceilândia, 2013.

BRASIL. Informe Técnico ANVISA nº 1, de 15 de julho de 2008. Brasília, DF.

BRASIL. Instrução Normativa nº 11, de 29 de setembro de 2016. Dispõe sobre a lista de medicamentos isentos de prescrição. Brasília

BRASIL. RDC ANVISA nº 17, de 16 de abril de 2010. Dispõe sobre as Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos. Brasília, DF.

BRASIL. Rdc nº 53, de 04 de dezembro de 2015. Brasília, DF: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 08 dez. 2015.

BRASIL. Resolução ANVISA. nº 1, de 29 de julho de 2005. Brasília, DF.

BRASIL. Secretaria de Políticas de Saúde. **Relação nacional de medicamentos essenciais**: Rename. Brasília : Minist Saude, 2017. 210 p.

BRASIL. **Farmacopéia Brasileira**. 5. ed. Brasília, DF: Fiocruz, 24 nov. 2010. v. 2. Agência Nacional de Vigilância Sanitária

BRITO, Natilene Mesquita et al. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. **Pesticidas: R.ecotoxicol. e Meio Ambiente**, Curitiba, v. 13, n. 1, p.129-146, dez. 2003.

BRÜMMER, Hildegard. How to approach a forced degradation study. **Life Science**, Berlim, v. 31, n. 1, p.1-4, jan. 2011.

BRUNTON, Laurence L.; CHABNER, Bruce; KNOLLMANN, Björn C. (Org.). **As bases farmacológicas da terapêutica de Goodman & Gilman**. 12. ed. São Paulo: AMGH, 2012. xxi, 2079

CIOROIU, Bogdan Ionel et al. Determination of Degradation Products of Cyclobenzaprine Hydrochloride, Lidocaine and Piroxicam in a Semi-Topical Formulation: MS–MS Confirmation of Unknown Impurities. **Journal Of Chromatographic Science**, [s.l.], v. 54, n. 6, p.902-911, 7 abr. 2016. Oxford University Press (OUP).

FORTES, Renata Costa; CHAVES, Aline do Socorro. Prevalência da automedicação por funcionários de uma construção civil do Distrito Federal. **Saúde (santa Maria)**, Santa Maria, v. 41, n. 2, p.203-210, dez. 2015.

GARG, Anuradha et al. Forced degradation of fentanyl: Identification and analysis of impurities and degradants. **Journal Of Pharmaceutical And Biomedical Analysis**, [s.l.], v. 53, n. 3, p.325-334, nov. 2010. Elsevier BV.

GIL, Eric S. **Controle físico-químico de qualidade de medicamentos**. 3. ed. São Paulo: Pharmabooks, 2010. 511 p.

INTERFARMA. **Guia 2018**. Disponível em: <https://www.interfarma.org.br/guia/guia-2018/dados_do_setor#mercado_farmaceutico_mundial>. Acesso em: 12 jun. 2018.

ISLER, Ana Cristina. **Análise por RMN de produtos de degradação forçada em fármacos**. 2014. 102 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2014.

KHAN, Islam Ullah et al. Simultaneous determination of Piroxicam and paracetamol in Pharmaceutical formulations using Stability indicating CLAE method. **Journal Of**

Liquid Chromatography & Related Technologies, [s.l.], v. 36, n. 10, p.1437-1450, abr. 2013.

LIMA, Geandra Batista; NUNES, Lívio César Cunha; BARROS, José Augusto Cabral de. Uso de medicamentos armazenados em domicílio em uma população atendida pelo Programa Saúde da Família. **Ciência & Saúde Coletiva**, Teresina, v. 15, n. 3, p.3517-3522, 2010.

MELGAÇO, Sarah Suyanne Carvalho et al. Nefrotoxicidade dos anti-inflamatórios não esteroidais. **Medicina (Ribeirao Preto. Online)**, v. 43, n. 4, p. 382-390, 2010.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (Brasil). Resolução nº 58, de 20 de dezembro de 2013. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 20 dez. 2013. Seção 1, p. 127

MODHAVE, Dattatray T. et al. Successful characterization of degradation products of drugs using LC-MS tools: Application to piroxicam and meloxicam. **Analytical Methods**, v. 3, n. 12, p. 2864-2872, 2011.

PINHEIRO, Rafael Mota; WANNMACHER, Lenita. Uso racional de anti-inflamatórios não esteroides. **Ministério da Saúde (BR), Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Uso racional de medicamentos: temas selecionados. Brasília: Ministério da Saúde**, p. 41-50, 2012

RANG, H. P; DALE, M. Maureen. **Farmacologia**. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, c2008. xvii, 829 p.

RAO, R. Nageswara et al. Separation and characterization of forced degradation products of abacavir sulphate by LC-MS/MS. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 54, n. 2, p. 279-285, 2011.

RIBANI, Marcelo et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, Campinas, v. 27, n. 5, p.771-780, jun. 2004.

ROLIM, Larissa Araújo. **Estudo de degradação do fármaco benznidazol utilizado no combate a doença de chagas por hidrólise, oxidação, fotólise e termodegradação**. 2010. 129 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Inovação Terapêutica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2010.

SANDOVAL, Alline Corrêia et al. O uso indiscriminado dos Anti-Inflamatórios Não Esteroidais (AINES). **Revista Científica da Faculdade de Educação e Meio Ambiente. Ariquemes: FAEMA**, v. 8, n. 2, jul./dez., 2017.

SILVA, K. E. R. et al. Modelos de Avaliação da Estabilidade de Fármacos e Medicamentos para a Indústria Farmacêutica. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, Recife, v. 30, n. 2, p.129-135, set. 2009.

SKIBA, M. et al. Pharmacokinetic study of an oral piroxicam formulation containing different molar ratios of β -cyclodextrins. **Journal Of Inclusion Phenomena And Macrocyclic Chemistry**, [s.l.], v. 75, n. 3-4, p.311-314, 9 jun. 2012. Springer Nature.

SONAWANE, Sandeep; GIDE, Paraag. An experimental design approach for the forced degradation studies and development of a stability-indicating LC method for eplerenone in tablets. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 34, n. 17, p. 2020-2031, 2011.

SOSTRES, Carlos et al. Adverse effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs, aspirin and coxibs) on upper gastrointestinal tract. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, [s.l.], v. 24, n. 2, p.121-132, abr. 2010. Elsevier BV.

STAREK, M.; KRZEK, J.; TARSA, M.; ŻYLEWSKI, M.; Determination of Piroxicam and Degradation Products in Drugs by TLC. **Chromatographia** 01, 2008; 69(3):351-356.

TOMÁNKOVÁ, H.; ŠABARTOVÁ, J.; Determination of potential degradation products of piroxicam by HPTLC densitometry and CLAE. **Chromatographia**, 1989, Volume 28, Issue 3-4, pp 197-202.

ZHOU, YuXia et al. Characterization of process-related impurities including forced degradation products of alogliptin benzoate and the development of the corresponding reversed-phase high-performance liquid chromatography method. **Journal of separation science**, v. 37, n. 11, p. 1248-1255, 2014.