

Hydrochlorothiazide is a widely used diuretic and anti-hypertensive was degraded under different stress conditions to developed a stability-indicating high performance liquid chromatographic (HPLC) using a reversed-phase (C18).

ESTUDOS DE DEGRADAÇÃO FORÇADA NO INSUMO FARMACÊUTICO ATIVO HIDROCLOROTIAZIDA E NA FORMA FARMACÊUTICA COMPRIMIDO, PARA DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO INDICATIVO DE ESTABILIDADE POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)

Marcela da S. Lira Correia^a, Bruno Aires dos Santos^b e Aila Karla M. Santana^{a, b*}

^aFaculdade Pernambucana de Saúde, Avenida Jean Emile Fravre, 422 - 51200-060- Recife -PE, Brasil

^b Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco Governador Miguel Arraes (LAFEPE), Avenida Dois Irmãos, 1117-52171-101- Recife-PE, Brasil

[\(\) Manuscrito com material suplementar](#)

[\(x \) Manuscrito sem material suplementar](#)

*e-mail: aila.santana@lafepe.pe.gov.br

STRESS DEGRADATION STUDIES ON INPUT HYDROCHLOROTHIAZIDE ACTIVE PHARMACEUTICAL AND PHARMACEUTICAL FORM TABLET FOR DEVELOPMENT AND VALIDATION OF METHOD FOR STABILITY OF INDICATIVE HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY (HPLC)

Thiazide diuretic is a first-line class of antihypertensive drug that has been used in treatments of arterial hypertension for 40 years. In this work, a study of imposed degradation of hydrochlorothiazide was performed in order to evaluate the specificity of the analytical method applied for its identification and quantification. Hydrochlorothiazide active pharmaceutical ingredient and the hydrochlorothiazide tablet LAFEPE (25 mg) were undergo the following degrading stress conditions: thermolysis, hydrolysis (acidic, neutral and alkaline), oxidation, photolysis and exposure to metal ions. The protocol applied to quantify the hydrochlorothiazide content in pills and raw material is described in the 5th edition of Brazilian Pharmacopoeia by using high performance liquid chromatography (HPLC). It was observed seven degradation products eluted in different retention times in the chromatogram and none of them overlapped the peak of the active product. The drug and IFA were stable during thermolysis and also photolysis. The degrading agents: oxidation and alkaline hydrolysis, were the ones which generated higher number of products, on the other hand the neutral hydrolysis produced higher percentage of degradation. Indeed, this analytical methodology presented specificity towards hydrochlorothiazide analysis. In addition, the method can indicate product stability and is able to be validated.

Key words: Hydrochlorothiazide. Stress test. Stability. High performance liquid chromatography.

INTRODUÇÃO

A hidroclorotiazida, protótipo dos diuréticos tiazídicos, é indicada, em baixas doses orais, como primeira escolha no tratamento de hipertensão arterial sistêmica. É usado como adjuvante no tratamento de insuficiência cardíaca crônica controlada, tendo a vantagem de efeito diurético moderado e possibilidade de uma administração diária. Pode também ser empregada em hipercaliúria e em diabetes não insulino dependente (diabetes tipo II)¹. Compõe o elenco de medicamentos gratuitos para hipertensão, do Programa Farmácia Popular do Brasil e Programa "Saúde Não Tem Preço"².

A hidroclorotiazida é um fármaco que possui fórmula estrutural conforme descrito na Farmacopéia Brasileira (Figura 01) e fórmula química $C_7H_8ClN_3O_4S_2$ - 1,1-Dióxido de 6-cloro-3,4-dihidro-2H-1,2,4benzotiazina-7-sulfonamida³. Possui aspecto físico de pó cristalino branco ou quase branco, inodoro e pouca solubilidade em água, solúvel em etanol e solúvel em acetona e em soluções de hidróxidos alcalinos³. A USP 37⁴ cita as impurezas que podem aparecer e determina os limites aceitáveis para cada uma destas, no caso da benzotiazina e clorotiazida e os limites preconizados são 1 e 0,5% respectivamente. A benzotiazina é formada junto ao formadeído por hidrólise⁵, que junto a clorotiazida são as mais conhecidas impurezas de processo, sendo já conhecida uma terceira, o dímero HCTZ-CH₂-HCTZ^{6,7}.

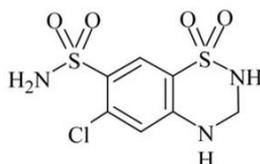


Figura 1. Fórmula Estrutural da Hidroclorotiazida³

Além dos efeitos adversos causados pelo insumo farmacêutico ativo (IFA), devemos acompanhar suas características físicas e químicas na forma farmacêutica, através da estabilidade do medicamento. A estabilidade de insumos e produtos farmacêuticos depende de fatores extrínsecos 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 propriedades dos materiais de embalagem⁸. A estabilidade é definida como o tempo durante o qual a especialidade farmacêutica ou a matéria-prima 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 fabricação⁹.

No Brasil, os estudos de estabilidade de medicamentos devem ser conduzidos de acordo com a RE nº1/2005 da ANVISA⁹, na qual está prevista, dentre outros testes, a quantificação de produtos de degradação e o método analítico correspondente. Em consonância com esta resolução, a RDC nº53/2015¹⁰, estabelece parâmetros para a notificação, identificação e qualificação de produtos de degradação em medicamentos com substâncias ativas sintéticas e semissintéticas.

De acordo com a RDC nº 53 da ANVISA¹⁰ e a International Conference on Harmonization (ICH) através de seu guia ‘Stability Testing of New Drug Substances and Products’ (Q1A)¹¹, ambos tratam sobre o delineamento de estudos de estresse referente a insumo farmacêutico ativo. Eles sugerem que os produtos de degradação são submetidos a variações de condições e que estas situações sugerem a formação de produtos de degradação ou passos que aceleram o aparecimento da degradação¹².

Nos ensaios de degradação forçada, o insumo e o medicamento devem ser submetidos às condições de estresse: termólise, hidrólise (ácida, básica e neutra), oxidação, fotólise e exposição a íons metálicos, a fim de gerar produtos de degradação em quantidade suficiente para se desenvolver e validar a metodologia analítica utilizada para a quantificação do teor do fármaco e dos produtos de degradação. Os resultados destes ensaios são utilizados pelas indústrias farmacêuticas, principalmente, para avaliação da especificidade do método analítico, conforme estabelecido na RE nº 899/2003¹³.

O uso da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) permite a análise quantitativa de misturas e possibilita verificar possíveis produtos de degradação, sendo, portanto, amplamente utilizado no controle de qualidade de fármaco e medicamentos. O uso do detector de arranjo de fotodiodos (DAD) permite calcular a pureza dos picos cromatográficos, fator importante a ser considerado, pois um pico cromatográfico, aparentemente de apenas um componente, pode ser correspondente a mais de um composto. Assim, o uso do DAD, é de fundamental importância na validação de métodos por CLAE, pois permite inferir que um determinado pico cromatográfico refere-se àquela substância, sem interferentes¹⁴.

O teste de estresse mostra-se como uma tendência dentro do planejamento para o desenvolvimento de uma forma farmacêutica, pois a investigação da estabilidade intrínseca do fármaco fornece abordagens de formulação, processos de produção e indica tipos de adjuvantes, aditivos de proteção específicos e de acondicionamento primário e condições de armazenagem, que provavelmente melhorarão a integridade do fármaco e do produto. Demonstrando-se assim, que o conhecimento do

comportamento químico pode ser usado para garantir a estabilidade da forma farmacêutica desejada¹⁵.

Desta forma, o objetivo deste trabalho é o desenvolvimento de um método indicativo de estabilidade para o medicamento hidroclorotiazida 25 mg comprimido, contemplado no planejamento do Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco LAFEPE®.

PARTE EXPERIMENTAL

Amostras

As amostras utilizadas foram LAFEPE Hidroclorotiazida 25 mg comprimido, lote 15050268 e Hidroclorotiazida matéria-prima (IFA), lote SUZHOU LIXIN 20151109 e o placebo LAFEPE 1604LBSO01.

As substâncias químicas de referência (SQR) foram: Hidroclorotiazida USP Lote J0F070, Clorotiazida USP Lote I0L188 e Benzotiadiazina componente relacionado A USP J0L279.

Reagentes

Foram utilizados acetonitrila grau HPLC Merck[®], fosfato de potássio Merck[®], ácido clorídrico Quimex[®], hidróxido de sódio e peróxido de hidrogênio Synth[®], sulfato de cobre Neon[®], ácido fosfórico Synth[®] e água ultrapurificada (Milli Q[®]).

Condições Cromatográficas

A metodologia empregada nas análises, é descrita na Farmacopéia Brasileira 5^a edição para Hidroclorotiazida comprimidos. Utilizou-se um cromatógrafo líquido de alta eficiência Hitach[®] Elite LaChrom composto por bomba L-2130, amostrador L-2200, forno 2300 e detector Diode Array (DAD) 2455 gerenciado pelo software Ezchrom Elite[®]. Os demais parâmetros cromatográficos estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Condições cromatográficas do método analítico

Características	Descrição
Fase Estacionária	Phenomenex [®] Modelo Gemini 250 x 4,6 mm; C18; 5µm
Fase Móvel	Solução de Fosfato de Potássio 0,1 M e Acetonitrila pH 3,0 (9:1)
Fluxo	2 mL/min.
Comprimento de onda	254 nm, empregando DAD
Volume de injeção	20 µL
Tempo de corrida	30 min.
Temperatura	25°C

Solução padrão primário

Para o preparo do padrão pesou-se analiticamente 15 mg e transferiu-se para um balão volumétrico de capacidade de 10 mL com auxílio de 1 mL de acetonitrila, esse balão foi submetido a sonicação por 10 minutos e o volume foi completado com a fase móvel (Solução P1).

Para preparação da amostra transferiu-se 5 mL da Solução P1 para balões volumétricos de 50 mL, completando o volume com fase móvel (solução de tampão fosfato pH 3 :acetonitrila – 9:1). As soluções foram filtradas em unidades filtrantes de PVDF de 0,45 µm e analisadas por CLAE, para a quantificação do teor de hidroclorotiazida e dos produtos de degradação. A concentração final da solução foi de 0,15 mg/mL. Todas as soluções foram preparadas em triplicatas autênticas.

Solução padrão trabalho

Para o preparo do padrão pesou-se analiticamente 75 mg e transferiu-se para um balão volumétrico de capacidade de 100 mL com auxílio de 10 mL de acetonitrila, esse balão foi submetido a sonicação por 10 minutos e o volume foi completado com a fase móvel (Solução PT1).

Para preparação da amostra transferiu-se 5 mL da Solução PT1 para balões volumétricos de 25 mL, completando o volume com fase móvel (solução de tampão fosfato pH 3 :acetonitrila – 9:1). As soluções foram filtradas em unidades filtrantes de PVDF de 0,45 µm e analisadas por CLAE, para a quantificação do teor de hidroclorotiazida e dos produtos de degradação. A concentração final da solução foi de 0,15 mg/mL. Todas as soluções foram preparadas em triplicatas autênticas.

Degradação hidrolítica, oxidativa e por íons metálicos

Para o estudo de degradação pesou-se analiticamente o equivalente a 75 mg de hidroclorotiazida, transferiu-se para um balão volumétrico de capacidade de 100 mL com auxílio de 10 mL de acetonitrila, esse balão foi submetido a sonicação por 10 minutos e o volume foi completado com as respectivas soluções de degradação (hidrólise neutra: água ultrapura, hidrólise ácida: HCl 5M, hidrólise básica: NaOH 0,2M, oxidação: H₂O₂ 30% e íons metálicos: CuSO₄ 0,01M), para a amostra controle foi utilizado fase móvel. Essas soluções foram armazenadas em frasco âmbar e mantidas em temperatura ambiente durante os tempos de estudo 0h, 24h, 48h, 72h, 7 dias, 15 dias e 30 dias (Soluções A1).

Degradação térmica e fotolítica

Para o estudo de degradação térmica as amostras foram acondicionadas em estufa FANEM[®] (calor seco) a 60 °C, durante 15 dias. As amostras em quantidade suficiente foram distribuídas em placa de Petri, de modo que não ultrapassassem espessura de 1 mm de pó, durante o tempo de 15 dias, do qual foram retiradas amostras para teste nos tempo 0, 1, 2, 3, 7 e 15 dias.

O estudo fotolítico procedeu com a distribuição em uma placa de Petri de aproximadamente 1 mm de pó de IFA, submetido a exposição de 1,2 milhões de lux.horas + 200 watt.horas/m² (UV) em câmara de fotoestabilidade CARON[®] modelo 60402. As amostras e os controles (amostra em placa de petri coberta com papel alumínio) foram submetidas ao teste no mesmo momento. Também foram realizados testes dos comprimidos, placebos e comprimidos em sua embalagem primária, verificando assim a efetividade da proteção da embalagem.

Para estes estudos de degradação pesou-se analiticamente o equivalente a 75 mg de hidroclorotiazida, transferiu-se para um balão volumétrico de capacidade de 100 mL com auxílio de 10 mL de acetonitrila, esse balão foi submetido a sonicação por 10 minutos e o volume foi completado com fase móvel (Solução A1).

Solução de Injeção (Amostras)

Para preparação da amostra de injeção transferiu-se 5 mL das Solução A1 para os respectivos balões volumétricos de 25 mL, completando o volume com fase móvel (solução de tampão fosfato pH 3:acetonitrila – 9:1). As soluções foram filtradas em unidades filtrantes de PVDF de 0,45 µm e analisadas por CLAE, para a quantificação do teor de hidroclorotiazida e dos produtos de degradação. A concentração final da solução foi de 0,15 mg/mL. Todas as soluções foram preparadas em triplicatas autênticas.

Solução diluente controle

O diluente utilizado para as amostras na condição controle foi a fase móvel, portanto injetou-se fase móvel como solução diluente controle.

Solução branco de degradação

As soluções de degradação foram utilizados como amostras branco para cada condição de degradação.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A metodologia analítica foi avaliada para adequabilidade do sistema conforme indica a Farmacopeia Brasileira em sua 5ª edição³ e USP 37⁴. Os parâmetros avaliados foram: resolução, desvio padrão relativo (DPR) de área e tempo de retenção, fator de cauda, pratos teóricos e assimetria. Para isso foi preparada solução de resolução conforme descrito na farmacopéia e realizadas cinco replicatas de injeção. Na tabela 2, observa-se que o sistema estava adequado. Na figura 2 pode ser observado os picos referentes ao padrão Hidroclorotiazida-HCTZ na concentração de 0,075 mg/mL, e as substancias Clorotiazida-CTZ (TRR 0,821) na concentração de 0,075 mg/mL, e Benzotiadiazina-BTDZ componente relacionado A (TRR 0,687) na concentração de 0,03 mg/mL, essas concentrações foram baseadas na USP 37⁴.

Tabela 2. Resultados do teste de adequabilidade do sistema

	Critério de aceitação	Resultado
Hidroclorotiazida	DPR área: no máximo 2%	0,53
	DPR tempo de retenção: <2 %	0,21
	Pratos teóricos: > 5000	9607
	Resolução: > 2	7,41
	Assimetria: 0,8 – 2,0	1,15
Clorotiazida	DPR área: no máximo 2%	0,52
	DPR tempo de retenção: <2 %	0,19
	Pratos teóricos: > 5000	8612
	Resolução: > 2	4,08
	Assimetria: 0,8 – 2,0	1,23
Benzotiadiazina	DPR área: no máximo 2%	0,52
	DPR tempo de retenção: <2 %	0,16
	Pratos teóricos: > 5000	8121
	Resolução: > 2	3,82
	Assimetria: 0,8 – 2,0	1,22

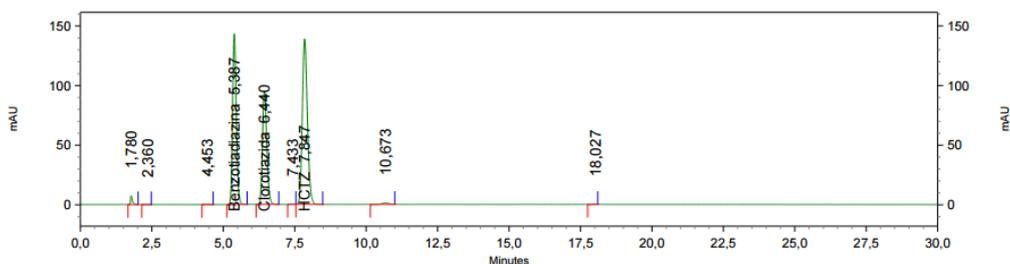


Figura 2. Cromatograma dos padrões primários Hidroclorotiazida (HCTZ), benzotiadiazina e clorotiazida com seus respectivos tempos de retenção

A análise de pureza de picos foi realizada pelo detector de arranjo de diodos (DAD), o qual pode indicar a especificidade e seletividade do método através da identificação ou não de outros componentes no mesmo pico. Assim, pode-se observar nas Figuras 3 e 4 que as amostras de hidroclorotiazida, clorotiazida e benzotiadiazina componente relacionado A apresentaram pureza total e similaridade, igual a 1,000.

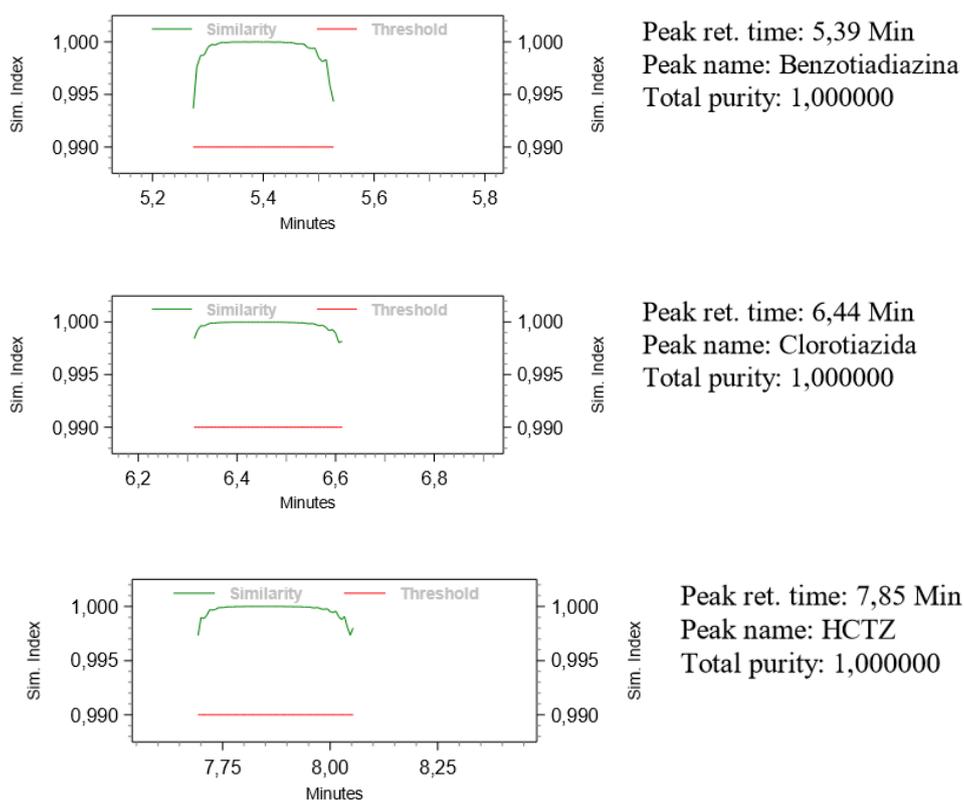


Figura 3. Gráficos de pureza da Benzotiadiazina, Clorotiazida e Hidroclorotiazida. A linha de base é representada em vermelho, e o pico em verde

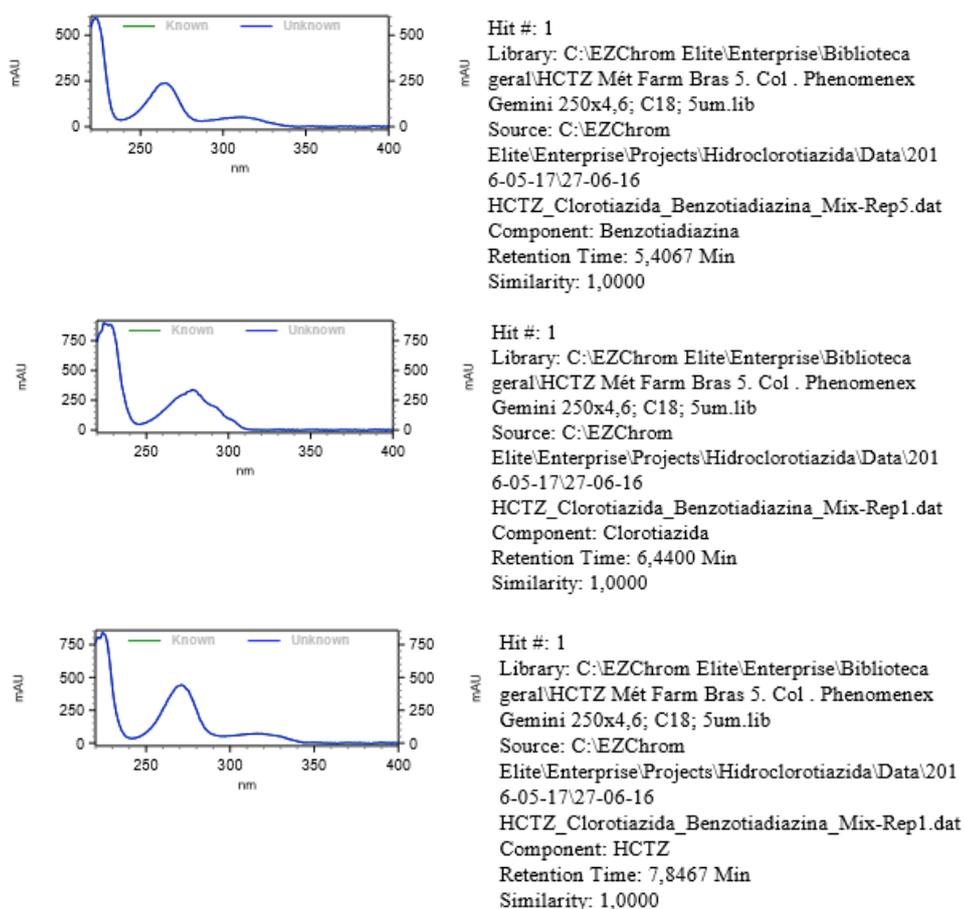


Figura 4. Gráficos de similaridade da Benzotiadiazina, Clorotiazida e Hidroclorotiazida. Padrão representado em verde, amostra em azul

Os resultados mostrados nas figuras 2, 3 e 4 evidenciam que o método foi eficaz e verifica ainda que compostos mesmo em concentrações baixas podem ser analisados, e ainda que os compostos ficaram com boa resolução e que o método foi considerado confiável.

No estudo de degradação forçada utilizou-se as condições de estresse: térmica, fotolítica, hidrólise neutra, ácida e básica, oxidação e íons metálicos. Nem todas as condições apresentaram degradação relevante, ao todo foram obtidos 7 produtos de degradação que foram nomeados de acordo com o tempo de retenção relativo (TRR). Nos testes de degradação forçada, os cromatogramas obtidos das soluções do insumo farmacêutico ativo (IFA) hidroclorotiazida, produto acabado e placebo submetidos a diferentes condições de estresse, foram comparados aos cromatogramas das mesmas soluções não submetidas à degradação e preparadas no momento do teste. Nas condições de controle não houve aparecimento de picos no tempo de retenção da hidroclorotiazida, demonstrando especificidade do método (Tabelas 3 e 4). Todos os estudos foram testados com placebos que não também não apresentaram picos nas áreas relacionadas ao padrão ou a picos de degradação da IFA ou comprimido.

Tabela 3. Produtos de degradação da hidroclorotiazida nas condições: hidrólise neutra, ácida e básica, oxidação e íons metálicos (IFA) no tempo 30 dias

Condição	Produto de degradação	Tempo de retenção relativo (TRR)	Teor dos picos (%)	Percentual de Hidroclorotiazida (%)
Hidrólise neutra	Produto 1	0,675	18,17	86,99
Hidrólise ácida	Produto 1	0,676	6,08	91,70
Hidrólise básica	Produto 1	0,677	9,79	94,02
	Produto 2	0,508	0,48	
	Produto 3	0,407	0,41	
	Produto 4	0,822	0,21	
	Produto 12	0,382	0,35	
	Produto 6	0,786	0,20	
Oxidação	Produto 1	0,677	0,98	78,59
	Produto 11	0,932	0,31	
	Produto 9	0,294	0,90	
	Produto 4	0,821	3,30	
	Produto 2	0,467	0,15	
	Produto 10	2,987	0,35	
Íons metálicos	Produto 1	0,676	11,77	93,25

O produto 1 pode corresponder a benzotiadiazina componente relacionado A com TRR de 0,5, este foi o produto de degradação que apareceu em todos os tempos e todas as condições, inclusive estava presente no padrão primário e secundário (Figura 5). Entretanto, o aparecimento da benzotiadiazina nos padrões estavam dentro dos limites descritos na USP 37⁴, já que se trata de uma substância relacionada, o que não ocorreu no estudo de degradação que o mesmo teve seu percentual aumentado em contato com os agentes degradantes. Diante disto, todos os resultados tiveram a área desse pico 1 diminuída nos cálculos de degradação. Apenas nas condições de hidrólise básica e oxidação apareceu o produto 4 que pode corresponder a clorotiazida com TRR de 0,8, compatível com a USP 37⁴.

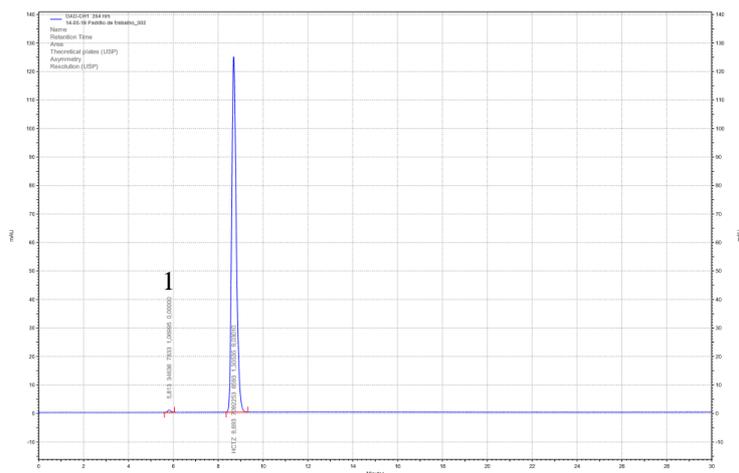


Figura 5. Cromatograma do padrão Hidroclorotiazida (HCTZ), demonstrando a presença do pico 1, com similaridade e pureza em 1,000 para Benzotiadiazina

Na hidrólise neutra (Figura 6A), ácida (Figura 6B) e íons metálicos (Figura 6C) só houve a ocorrência do produto 1, que teve sua área aumentada com o passar do tempo.

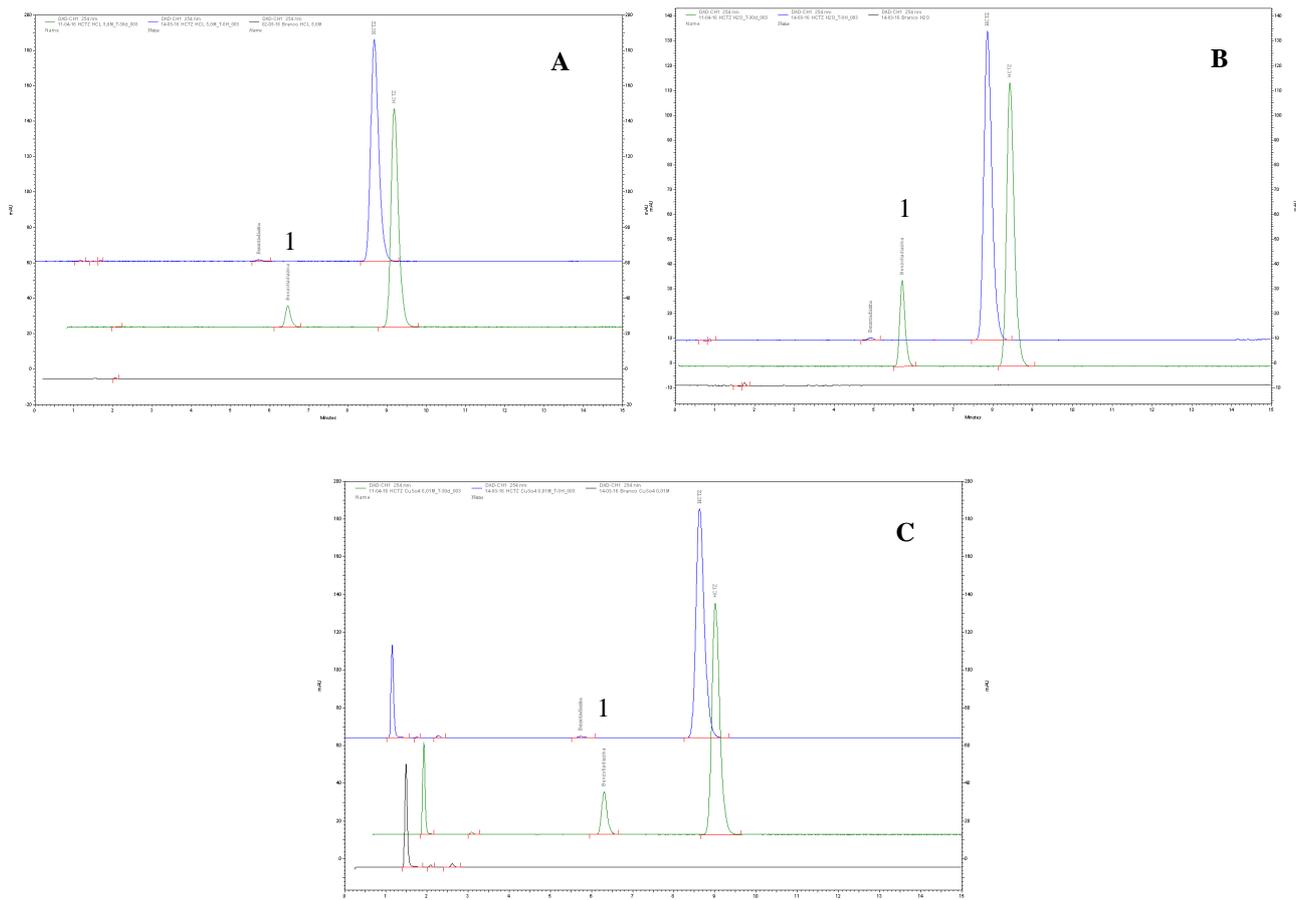


Figura 6. Overlay dos cromatogramas na condição de hidrólise ácida 5,0 M (A), hidrólise neutra (H₂O) (B) e íons metálicos CuSO₄ 0,01 M (C) nos tempos zero (azul), 30 dias (verde) e branco (preto) para IFA

Na condição contendo hidróxido de sódio 0,2 M, no tempo zero já foi possível verificar a presença de um pico com tempo de retenção relativa (TRR) de 0,668 que permaneceu único até 72 horas. Outros produtos apareceram a partir do tempo 7 dias, com o máximo de 6 picos no último tempo do estudo – 30 dias (figura 7).

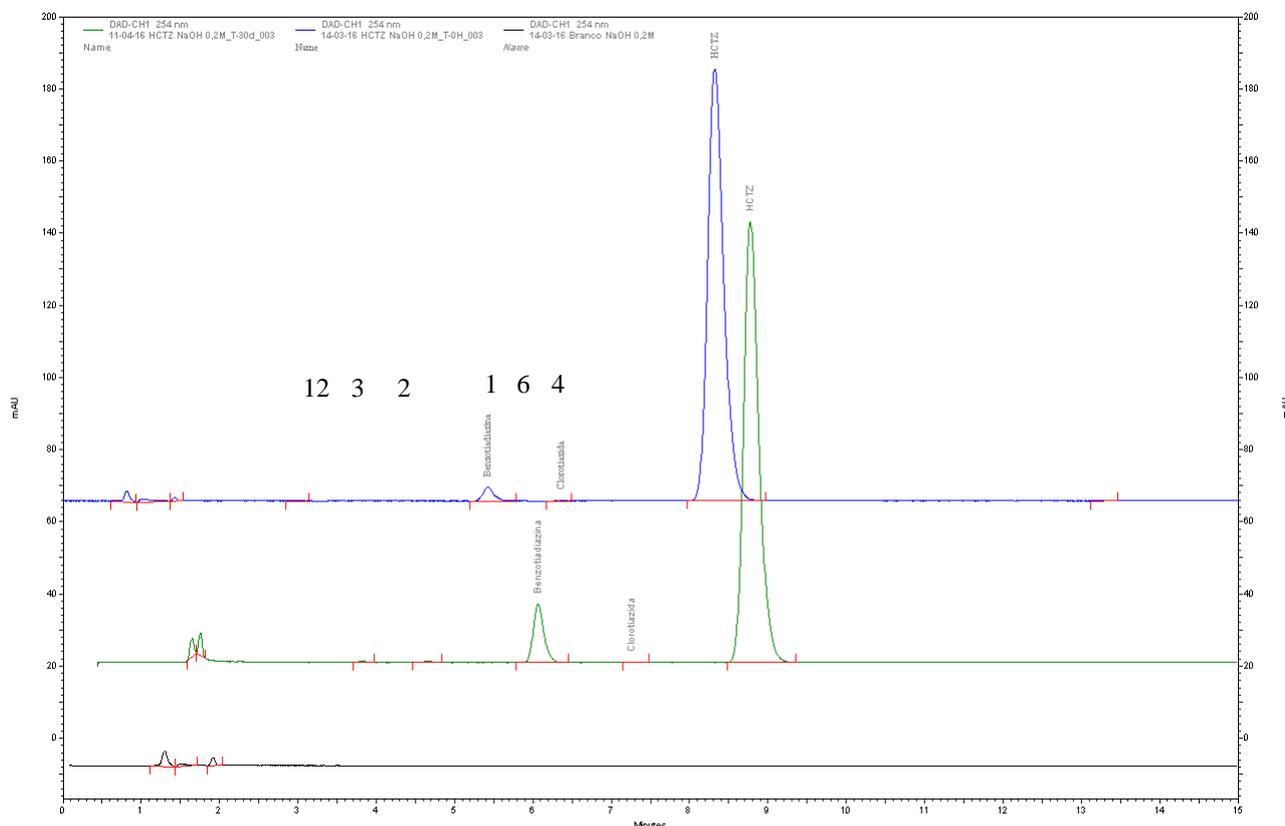


Figura 7. Overlay dos cromatogramas de IFA na condição de NaOH 0,2 M nos tempos zero (azul), 30 dias (verde) e branco (preto)

Na condição oxidativa, o produto 1, tem seu aparecimento desde o tempo zero, como ocorre em todas as degradações e o produto 9 tem seu aparecimento a partir do tempo 48 horas, o produto 4 começa a ocorrer no tempo 72 horas, o produto 11 se inicia com 7 dias e os produtos 2 e 10 só ocorrem no último tempo do estudo – 30 dias (Figura 8).

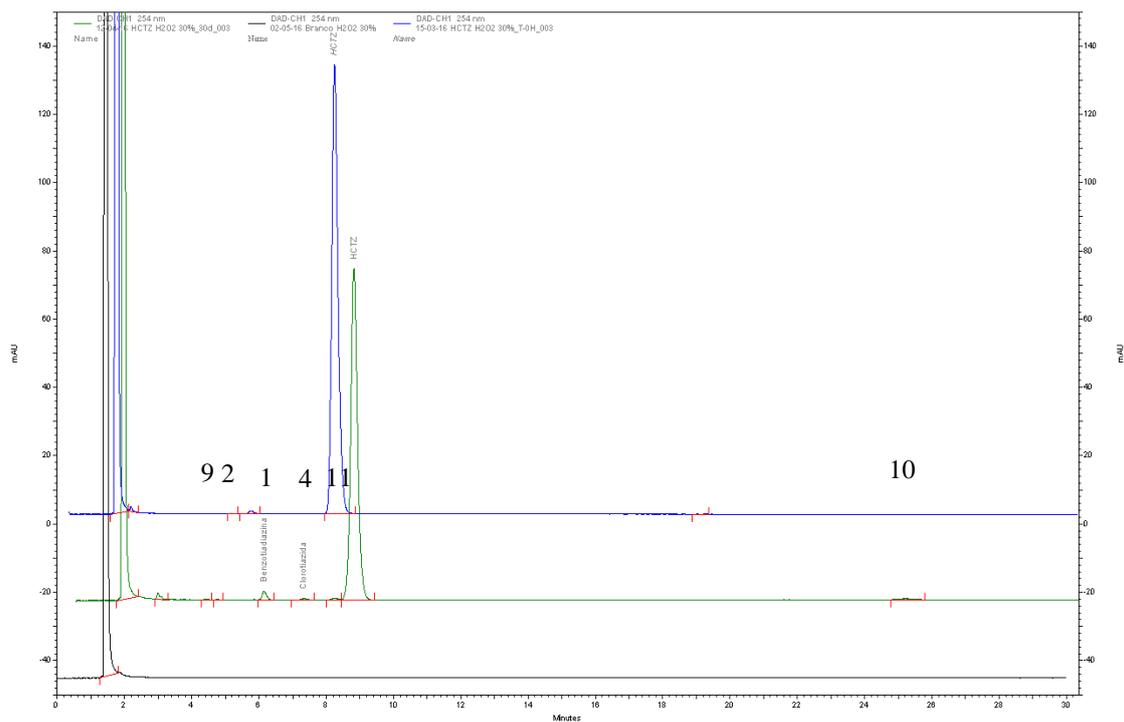


Figura 8. Overlay dos cromatogramas de IFA na condição de H₂O₂ 30% nos tempos zero (azul), 30 dias (verde) e branco (preto)

A hidrólise básica e a oxidação conforme pode ser observado nas Figuras 9 e 10, nos cromatogramas destas condições no produto acabado (comprimido), foram as condições que apresentaram maior quantidade de picos tanto na condição do insumo farmacêutico como no produto acabado. Todavia, a maioria dos produtos com exceção do produto 1 apresentaram porcentagem menor que 0,5%.

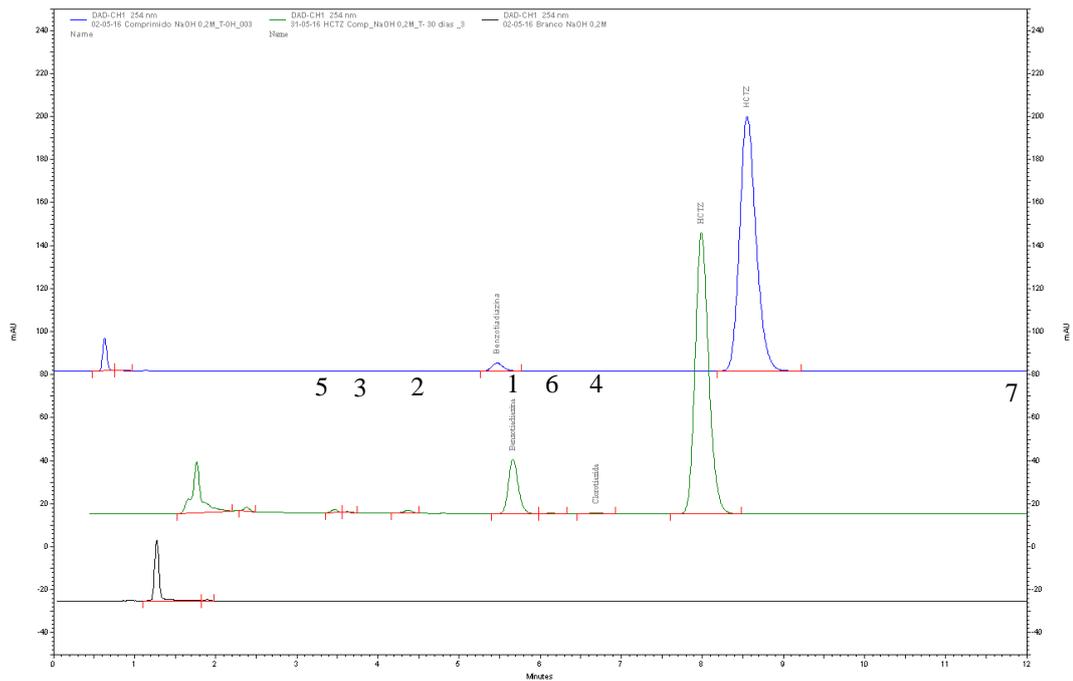


Figura 9. Overlay dos cromatogramas do comprimido na condição de NaOH 0,2 M nos tempos zero (azul), 30 dias (verde) e branco (preto)

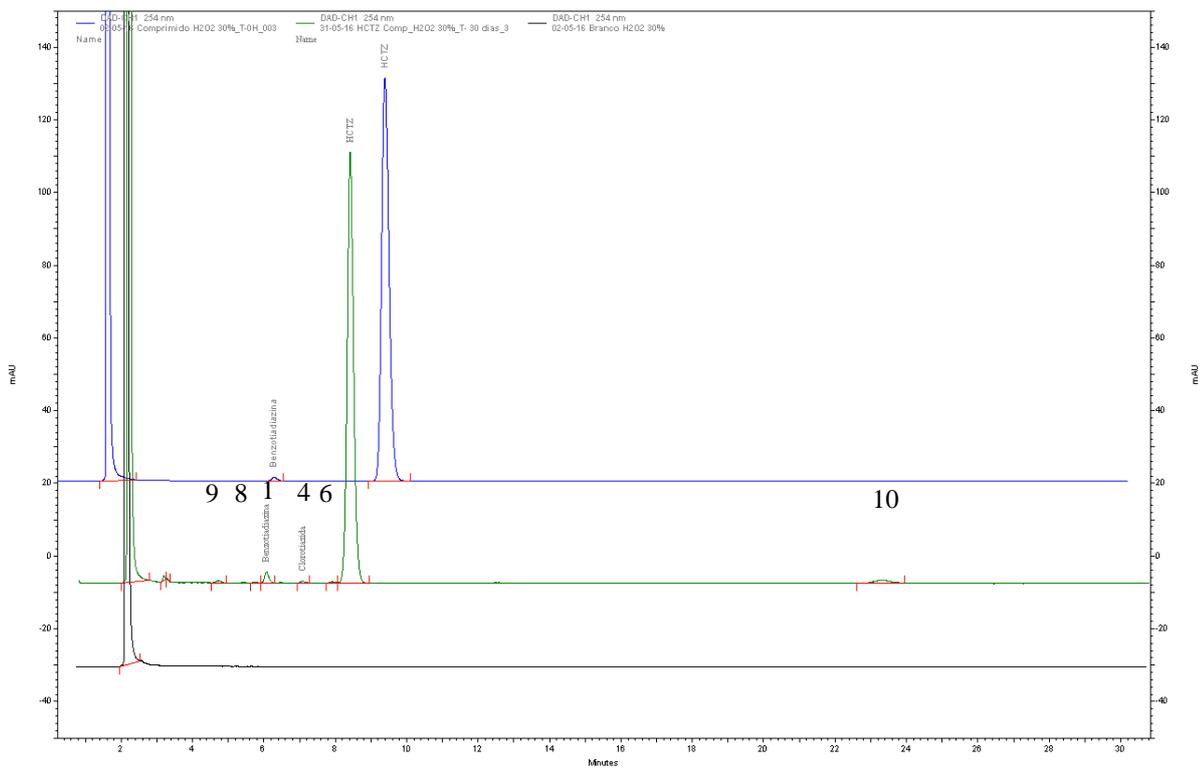


Figura 10. Overlay dos cromatogramas do comprimido na condição de H₂O₂ 30% nos tempos zero (azul), 30 dias (verde) e branco (preto)

Na tabela 4 estão descritas as degradações obtidas utilizando o produto acabado (comprimido).

Tabela 4. Produtos de degradação do comprimido LAFEPE hidroclorotiazida 25 mg nas condições: hidrólise neutra, ácida e básica, oxidação e íons metálicos no tempo 30 dias

Condição	Produto de degradação	Tempo de retenção relativo (TRR)	Teor dos picos (%)	Percentual da Hidroclorotiazida (%)
Hidrólise neutra	Produto 1	0,692	21,05	94,00
Hidrólise ácida	Produto 1	0,692	7,23	98,89
Hidrólise básica	Produto 1	0,692	11,78	85,91
	Produto 2	0,422	0,12	
	Produto 3	0,401	0,44	
	Produto 4	0,828	0,28	
	Produto 5	0,521	0,72	
	Produto 6	0,753	0,14	
	Produto 7	1,653	0,21	
Oxidação	Produto 1	0,691	6,15	81,98
	Produto 8	0,511	0,34	
	Produto 9	0,313	0,31	
	Produto 4	0,824	0,30	
	Produto 10	2,958	1,47	
	Produto 6	0,934	0,23	
Íons metálicos	Produto 1	0,693	7,83	99,17
	Produto 8	0,497	0,91	

Na condição ácida o percentual de hidroclorotiazida no estudo utilizando IFA foi de 91,70%, na mesma condição utilizando o comprimido o percentual de hidroclorotiazida praticamente não se alterou (98,89 %), foi possível observar a presença de um pico que se refere ao produto 1 também presente no padrão (Figura 11A), todavia é importante ressaltar que o percentual do produto 1 aumenta com o passar do tempo e no tempo 30 dias chega a 7,23%, mesmo não ocorrendo a diminuição da hidroclorotiazida na mesma amostra.

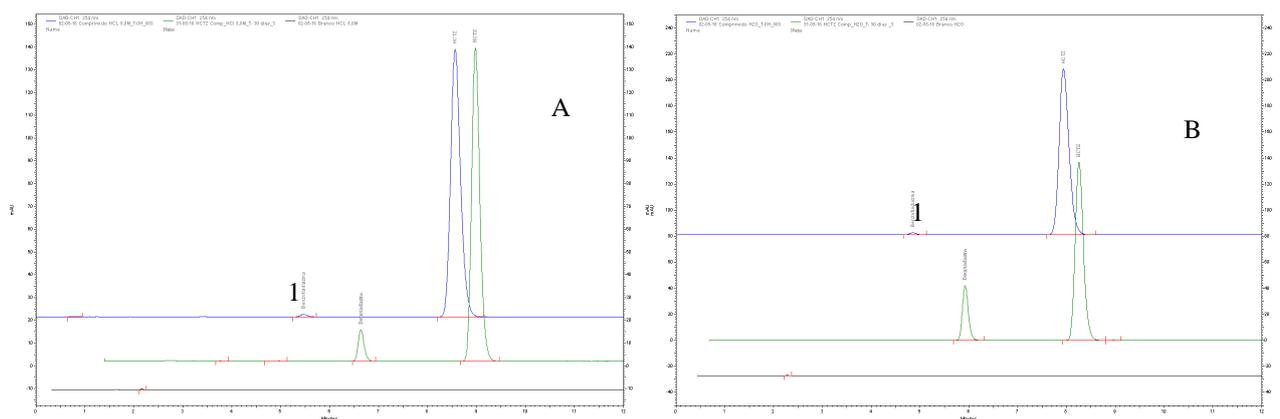


Figura 11. Overlay dos cromatogramas na condição de hidrólise ácida 5,0 M (A) e hidrólise neutra (H₂O) (B) nos tempos zero (azul), 30 dias (verde) e branco (preto) para comprimido

O principal agente degradante na aparição desse produto foi a água, que apresentou pico de até 21,95% na condição do produto acabado (Figura 11B).

Na condição de íons metálicos, o percentual de hidroclorotiazida no estudo utilizando IFA foi de 93,25%, na mesma condição utilizando o comprimido o percentual de hidroclorotiazida praticamente não se alterou (99,17%), todavia apareceu um produto que não estava presente no IFA, o produto 8 com o percentual de 0,91% (Figura 12).

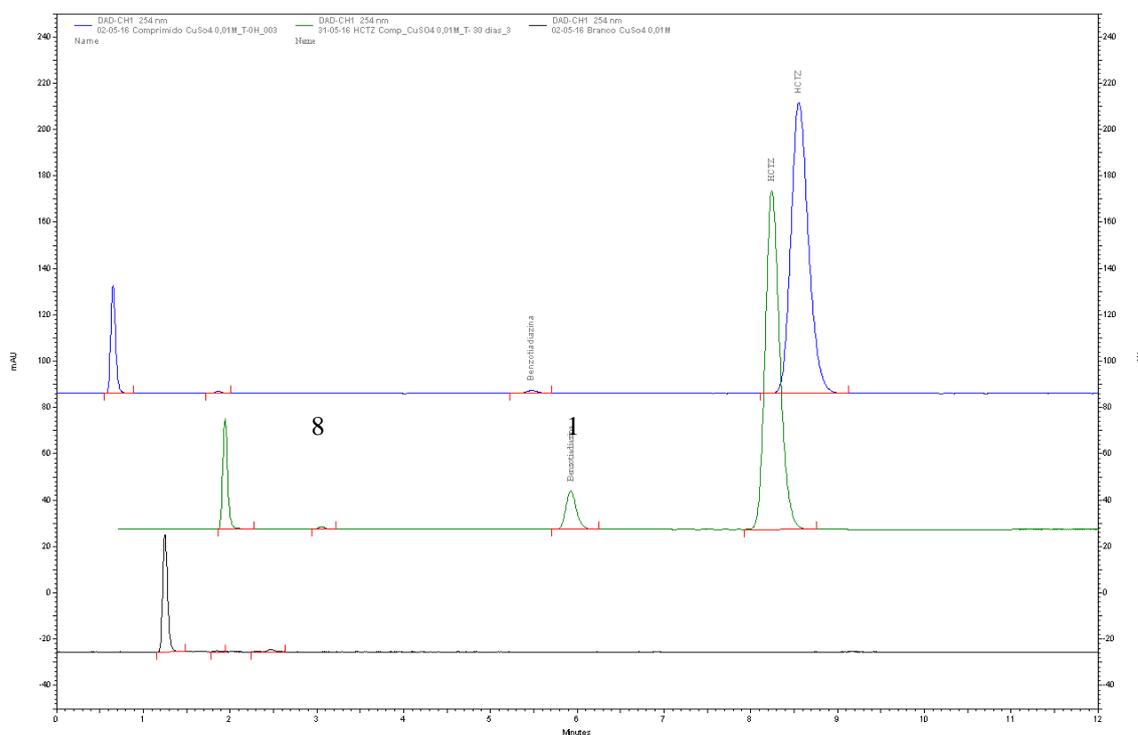


Figura 12. Overlay dos cromatogramas na condição de íons metálicos CuSO₄ 0,01 M nos tempos zero (azul), 30 dias (verde) e branco (preto) para comprimido

Todas as condições de estresse demonstraram algum percentual de degradação, e quando comparado a degradação entre a matéria-prima (IFA) e o comprimido (produto acabado), observou-se que o percentual de degradação diminuía quando se tratava do produto acabado, exceto para a condição de degradação NaOH, na qual o comprimido apresentou 14,09% de degradação e degradou mais que o IFA que apresentou uma degradação de 5,33%. Isso pode ser devido alguma interação entre os excipientes e o ativo potencializando essa degradação. Em todas as outras condições os excipientes pareceram proteger o ativo, diminuindo sua exposição ao agente e diminuindo essa degradação.

Não foi observada degradação térmica no IFA (Figura 13) e no produto acabado (Figura 13), mostrando certa estabilidade para esse parâmetro, esses dados são corroborados pelo estudo de Bhagwate e Gaikwad¹⁶, que utilizaram um tempo de 3 dias com temperatura de 70 °C e também não encontraram nenhuma degradação.

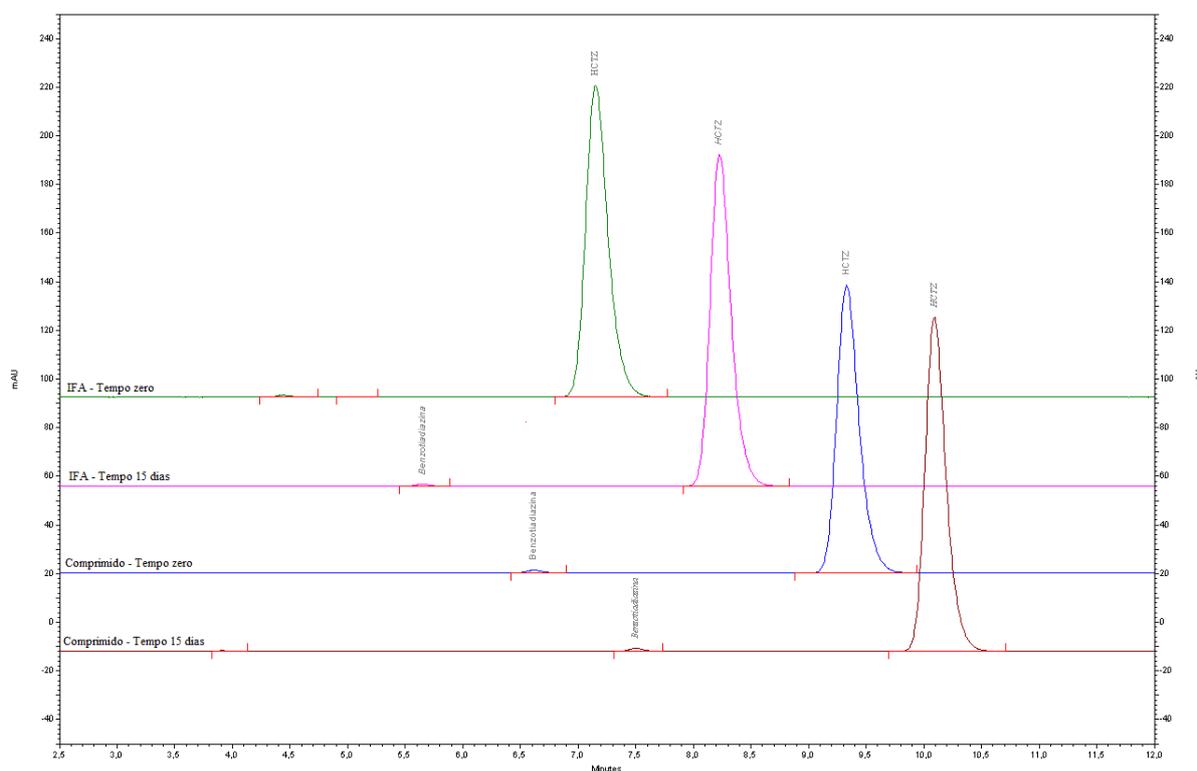


Figura 13. Overlay dos cromatogramas na Degradação térmica da IFA (tempo zero: verde e tempo 15 dias:rosa) e do comprimido (tempo zero: azul e tempo 15 dias: marrom)

Na condição fotolítica não foi observada degradação do IFA e do produto acabado. O produto 1 aparece em todas as amostras na condição do padrão e portanto não houve aumento, como um

produto da degradação da condição. As amostras controle não tiveram o aparecimento de nenhum pico de degradação.

Esses resultados são importantes porque apontam para estabilidade do produto em condições de armazenamento como umidade e direcionam às condições de estabilidade ideais para armazenamento a fim de manter a qualidade do fármaco até sua validade. Ainda foi possível verificar a estabilidade em condições de armazenamento como luz e calor.

A análise de pureza de picos é facilitada pelo detector de arranjo de diodos (DAD), o qual pode indicar a especificidade e seletividade do método através da identificação ou não de outros componentes no mesmo pico. Assim, observa-se que as amostras de hidroclorotiazida no tempo 30 dias em todas as condições apresentou pureza total e similaridade, igual a 1,000 e, portanto, mesmo a hidroclorotiazida apresentando um decaimento com 30 dias, a pureza do seu pico não é modificada durante o estudo, conforme artigo 7 da RDC 53¹⁰. Comparando o produto 1 com a benzotiadiazina a similaridade foi acima de 0,995 para todas as condições (Figura 14).

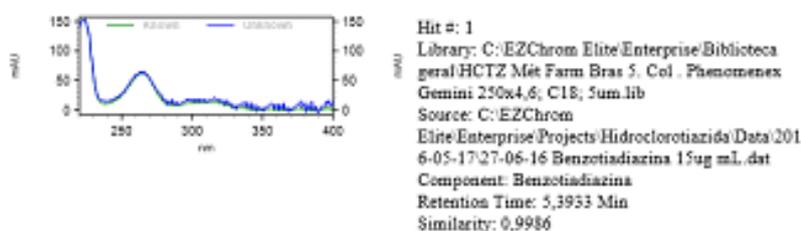


Figura 14. Gráficos de similaridade da Benzotiadiazina nas amostras de degradação. Padrão representado em verde, amostra em azul.

CONCLUSÃO

A partir dos resultados dos testes de estresse por hidrólise (básica, ácida e neutra), oxidação e térmica e fotolítica verificou-se que o método baseado na metodologia da Farmacopéia Brasileira 5ª edição consegue detectar produtos de degradação do produto acabado Hidroclorotiazida 25 mg, além de demonstrar especificidade e seletividade a partir da análise de pureza e similaridade de pico.

A identificação dos produtos de degradação foi possível através do uso de padrões conhecidos, para comparação com os picos de degradação visualizados nos diferentes cromatogramas e quantificação dos limites de aceitação.

É necessário que a metodologia seja validada, e este será o próximo passo do estudo.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao LAFEPE que possibilitou financeiramente a realização deste trabalho. E agradecem a João Victor, Ivo Lourenço, Cecília Regina, Jadon Jorge, Juliette Talita e Laís Freire pelo apoio técnico. E a Dr. Rimenys Jr pelo auxílio no abstract.

REFERÊNCIAS

1. http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/FTN_2010.pdf acessada em 21 de novembro de 2015.
2. http://portal.saude.gov.br/portal/saude/area.cfm?id_area=1095 acessada em 17 de julho 2016.
3. Anvisa. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Farmacopeia Brasileira, 5ª Ed, volume 1. Brasilia, 2010.
4. USP. The United States Pharmacopeia. USP 37 - NF 32. ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention 2016.
5. HERTZOG, D. L. et al. Development and validation of a stability-indicating HPLC method for the simultaneous determination of losartan potassium, hydrochlorothiazide, and their degradation products. *J Pharm Biomed Anal*, 2002, 30, 3, 747-60.
6. FANG, X. G. et al. Purification and identification of an impurity in bulk hydrochlorothiazide. *J Pharm Sci*, **2001**, 90, 11, 1800-1809.
7. LUSINA, M. et al. Stability study of losartan/hydrochlorothiazide tablets. *Int J Pharm*, v. **2005**, 291, 1-2, 127-137.
8. Freitas NCC, Nascimento, AP. Estudo de degradação forçada e avaliação da especificidade do método analítico para determinação de teor em atenolol comprimidos. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, **2014**, 35, 2, 285-291.
9. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). RE nº 01, de 29.07.2005. Guia para realização dos estudos de estabilidade. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 01 de agosto 2005.
10. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC nº 53, de 04.12.2015. Estabelece parâmetros para a notificação, identificação e qualificação de produtos de degradação em medicamentos com substâncias ativas sintéticas e semissintéticas, classificados como novos, genéricos e similares, e dá outras providências. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 05 de dezembro 2015.

11. ICH - International Conference on Harmonisation. Stability testing of new drug substances and products. Switzerland, 2003.
12. Singhi S, Bakshi M. Guidance on Conduct of Stress Tests to Determine Inherent Stability of Drugs. Pharmaceutical Technology on line, April **2000**,1–14.
13. BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). RE n° 899, de 29.05.2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 02 de junho 2003.
14. Donato EM. Tese de doutorado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil, 2008.
15. Silva KER, Alves LDS, Soares MFR, Passos RCS, Faria AR, Rolim Neto, PJ. Modelos de Avaliação da Estabilidade de Fármacos e Medicamentos para a Indústria Farmacêutica. Rev Ciênc Farm Básica Apl., **2009**, 30,2, 129-135.
16. Bhagwate, S.; Gaikwad, N. J.; Journal of Applied Pharmaceutical Science (2013), doi:10.7324/JAPS.2013.30215