



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CENTRO DE ENGENHARIAS E CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO INDICATIVO
DE ESTABILIDADE PARA QUANTIFICAÇÃO DE SECNIDAZOL
E COMPOSTOS RELACIONADOS POR CROMATOGRAFIA
LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA**

Luana de Fátima Maestrello



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CENTRO DE ENGENHARIAS E CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

Desenvolvimento e validação de método indicativo de estabilidade para quantificação de secnidazol e compostos relacionados por cromatografia líquida de alta eficiência

Luana de Fátima Maestrello

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Unioeste/*Campus* Toledo, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Química.

Orientador(a): Prof. Dr. Maurício Ferreira da Rosa
Coorientador(a): Dra. Marilesia Ferreira de Souza

Ficha de identificação da obra elaborada através do Formulário de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da Unioeste.

Fátima Maestrello, Luana de
Desenvolvimento e validação de método indicativo de estabilidade para quantificação de secnidazol e compostos relacionados por cromatografia líquida de alta eficiência / Luana de Fátima Maestrello; orientador(a), Maurício Ferreira da Rosa; coorientador(a), Marilesia Ferreira de Souza, 2020.
61 f.

Dissertação (mestrado), Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus de Toledo, Centro de Engenharias e Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química, 2020.

1. Secnidazol. 2. Compostos relacionados. 3. Produtos de degradação. 4. Método indicativo de estabilidade. I. Ferreira da Rosa, Maurício. II. Ferreira de Souza, Marilesia. III. Título.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

A COMISSÃO EXAMINADORA ABAIXO ASSINADA, APROVA A DISSERTAÇÃO

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO INDICATIVO DE
ESTABILIDADE PARA QUANTIFICAÇÃO DE SECNIDAZOL E COMPOSTOS
RELACIONADOS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA**

ELABORADA POR:

Luana de Fátima Maestrello

COMO REQUISITO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM QUÍMICA

COMISSÃO EXAMINADORA:

Prof. Dr. Maurício Ferreira da Rosa - Orientador - UNIOESTE

Prof. Dr. Jefferson Pereira e Silva - USP

Prof. Dr. Renato Eising – UTFPR

Toledo-PR, 2020

“Freedom would be not to choose between black and white but to abjure such prescribed choices.”

Theodor W. Adorno

A Deus e aos meus queridos pais, amigos e mestres.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIACÕES	8
LISTA DE TABELAS.....	10
LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	11
RESUMO	12
ABSTRACT	13
1 INTRODUÇÃO.....	14
2 OBJETIVOS	16
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	17
3.1. INSUMO FARMACÊUTICO ATIVO E REGULAMENTAÇÃO BRASILEIRA....	17
3.2. IMPUREZAS, PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO E MÉTODO INDICATIVO DE ESTABILIDADE	21
3.3. SECNIDAZOL: APLICAÇÃO, SINTESE E METODOLOGIA ANALÍTICA.....	27
4 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO INDICATIVO DE ESTABILIDADE PARA QUANTIFICAÇÃO DE SECNIDAZOL E SUBSTÂNCIAS RELACIONADAS EM MATÉRIA-PRIMA POR HPLC	38
INTRODUÇÃO	41
PARTE EXPERIMENTAL.....	42
RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
CONCLUSÃO	55
AGRADECIMENTOS	55
REFERÊNCIAS	55
5 REFERÊNCIAS	57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC	Association of Official Agricultural Chemist
API-ES	Atmospheric pressure ionization electrospray
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CG	Cromatografia gasosa
CLND	Detector de quimioluminescência de nitrogênio
DAD	Detector de Arranjo de Fotodiodo
DDA	Doença diarreica aguda
DMF	Drug Master File
ELSD	Evaporativo com espalhamento de luz
FDA	U.S. Food and Drug Administration
FeCl ₃	Cloreto férrico
FID	Detector de ionização de chama
GIPeFEA	Grupo Interdisciplinar de Pesquisa em Fotoquímica e Eletroquímica Ambiental
H ₂ O	Água
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HCl	Ácido clorídrico
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
ICH	International Conference on Harmonization
IFA	Insumo Farmacêutico Ativo
IR	Espectroscopia no infravermelho
IT	Instrução Normativa
LC	Cromatografia Líquida
LI	Limite inferior
LQ	Limite de quantificação
LS	Limite superior
MeOH	Metanol
MIE	Método Indicativo de Estabilidade
MS	Espectrometria de massas
MS	Ministério da Saúde
NaOH	Hidróxido de sódio
NT	Nota técnica
OMS	Organização Mundial da Saúde
PD	Produtos de degradação
PVDF	Fluoreto de polivinilideno

RDC	Resolução da diretoria Colegiada
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RE	Resolução
RMN	Espectroscopia por ressonância magnética nuclear
SCZ	Secnidazol
S _N 1	Substituição nucleofílica unimolecular
S _N 2	Substituição nucleofílica bimolecular
SPE	Extração em fase sólida
UR	Umidade relativa
UV/Vis	Espectrofotometria de ultravioleta visível

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1.1: Normas vigentes relacionadas ao IFA.....	20
Tabela 3.1.2: Guias ICH utilizados como referência para os requisitos técnicos de IFAs.	20
Tabela 3.2.1: Estudo de estabilidade na zona IVb vs condições de armazenamento.....	24
Tabela 3.2.2: Condições de estresse comumente utilizadas nos estudos de degradação forçada	26
Tabela 3.3.1: Metodologias analíticas relacionadas ao SCN relatadas em literatura científica.....	34

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 3.3.1. Estrutura química do secnidazol (1-(2-metil-5-nitroimidazol-1-il)propan-2-ol)	28
Figura 3.3.2. Rota sintética para obtenção do secnidazol.....	28
Figura 3.3.3. Rota sintética para obtenção do secnidazol.....	29
Figura 3.3.4. Reação de nitração do 2-metil-imidazol.....	29
Figura 3.3.5. Reação de alquilação do 2-metil-4(5)-nitroimidazol.....	30
Figura 3.3.6. Mecanismos de abertura do anel epóxido em meio ácido.....	33
Figura 3.3.7. Estruturas dos enantiômeros S-(+)-secnidazol (A) e R-(-)-secnidazol (B). .	36

RESUMO

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO INDICATIVO DE ESTABILIDADE PARA QUANTIFICAÇÃO DE SECNIDAZOL E COMPOSTOS RELACIONADOS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

No ano de 2017 foram notificados, no Brasil, 4.757 óbitos por doença diarreica aguda (DDA) o que representa uma taxa de mortalidade de 2,3 x 100.000 habitantes. Dentre os principais agentes etiológicos das DDA está o protozoário *Giardia lamblia*, isto tanto nos países em desenvolvimento quanto nos desenvolvidos. A giardíase causa, normalmente, diarreia e, mesmo na ausência de manifestações clínicas aparentes, está relacionada à má absorção de nutrientes e a deficiências no crescimento, principalmente em crianças menores de 10 anos de idade. Dentre os tratamentos sugeridos pelo Ministério da Saúde (MS) está a administração oral do antiparasitário secnidazol (SCZ), que mesmo sendo um importante ativo para o tratamento de giardíase, e de outras doenças negligenciáveis, não possui metodologia de análise descrita na Farmacopeia Brasileira ou em outros compêndios intercambiáveis. A resolução que estabelece parâmetros para a notificação, identificação e qualificação de produtos de degradação (PD) em medicamentos com substâncias ativas sintéticas é a Resolução da diretoria Colegiada (RDC) nº 53, de 04 de dezembro de 2015. Para os insumos farmacêuticos ativos classificados como sintéticos e semissintéticos a expectativa da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) é que estes sejam qualificados de acordo com os parâmetros definidos pela RDC nº 53/2015, mas seguindo os limites de qualificação estabelecidos pelo *International Conference on Harmonization* (ICH) no guia Q3A (R2), até que entre em vigência a legislação específica. Simultaneamente a publicação da RDC nº 53/2015, também foi publicado o Guia nº 4 que trata da obtenção do perfil de degradação, e identificação e qualificação de PD em medicamentos, o que trouxe um maior esclarecimento sobre como proceder durante um estudo de degradação forçada, bem como sua importância para o desenvolvimento de um método indicativo de estabilidade. Tendo isto em vista, o objetivo do presente trabalho foi desenvolver e validar um método indicativo de estabilidade capaz de quantificar o antiparasitário secnidazol e seus compostos relacionados por cromatografia de alta eficiência. Para as condições otimizadas tem-se como fase estacionária uma coluna Symmetry C8 (250 x 4,6 mm, 5µm), como fase móvel metanol : água (20 : 80 v/v), fluxo de 1,0 m/min, e 319 nm como comprimento de onda de detecção. Os resultados obtidos mostram que a metodologia analítica é precisa, exata, robusta e linear na faixa de concentração 400 a 600 µg/mL de SCZ. Ainda se mostrou precisa, exata, robusta e linear na faixa de concentração 0,50 a 1,80 µg/mL para as impurezas de síntese de secnidazol. Durante o estudo de degradação o SCZ se mostrou susceptível principalmente a hidrólise básica apresentando PD de m/z 606 e 321 respectivamente.

Palavras-Chave: Secnidazol, compostos relacionados, produtos de degradação e método indicativo de estabilidade.

ABSTRACT

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF AN INDICATIVE STABILITY METHOD FOR QUANTIFICATION OF SECNIDAZOLE AND RELATED COMPOUNDS BY HIGH-EFFICIENT LIQUID CHROMATOGRAPHY

In 2017, 4,757 deaths due to acute diarrheal disease (ADD) were reported in Brazil, which represents a mortality rate of 2.3 x 100,000 inhabitants. Among the main etiological agents of ADD is the protozoan *Giardia duodenalis*, both in developing and developed countries. Giardiasis usually causes diarrhea and, even in the absence of apparent clinical manifestations, it is related to no absorption of nutrient and growth deficiencies, especially in children under 10 years of age. Among the treatments suggested by the Ministry of health is the oral administration of the antiparasitic secnidazole (SCZ), which, despite being an important Active pharmaceutical ingredient for the treatment of giardiasis, and other negligible diseases, does not have an analysis methodology described in the Brazilian Pharmacopoeia or in other compendiums interchangeable. The resolution that establishes parameters for the notification, identification, and qualification of degradation products in medicines with synthetic active substances is RDC nº 53, December 4th, 2015. For the active pharmaceutical ingredients classified as synthetic and semi-synthetic, ANVISA expects that they are qualified according to the parameters defined by RDC Nº. 53/2015 but following the qualification limits established by the ICH Q3A (R2) guide, until the specific legislation comes into force. Simultaneously with the publication of RDC No. 53/2015, Guide No. 4 was also published, which deals with obtaining the degradation profile, and identification and qualification of degradation products in medicines, which brought further clarification on how to proceed during a forced degradation study, as well as its importance for the development of an indicative method of stability. Therefore, the objective of the present work was to develop and validate a method indicative of stability capable of quantifying the antiparasitic secnidazole and its related compounds by high performance chromatography. For the optimized conditions, a Symmetry C8 column (250 x 4.6 mm, 5µm) is used as a stationary phase, as a mobile phase: methanol: water (20: 80 v / v), flow of 1.0 mL / min, and 319 nm as the detection wavelength. The results obtained show that the analytical methodology is precise, exact, robust, and linear in the concentration range 400 to 600 µg / mL of SCZ. It was also shown to be precise, accurate, robust, and linear in the concentration range 0.50 to 1.80 µg / mL for the impurities of SCZ synthesis. During the degradation study, the SCZ was mainly susceptible to basic hydrolysis, presenting degradation products of m/z 606 and 321, respectively.

Keywords: Secnidazole, related substances, degradation products and method indicative of stability.

1 INTRODUÇÃO

Quando o consumidor retira um medicamento na farmácia ou drogaria, dificilmente tem a percepção do longo caminho percorrido até este ser obtido. A cadeia de fabricação dos medicamentos quase sempre começa fora do país, com a importação dos insumos farmacêuticos. Até que os medicamentos sejam expostos nas prateleiras, seus constituintes passam por diversas etapas de avaliações sistematizadas. O insumo que chega ao país pode dirigir-se diretamente a fábrica para sua transformação, como pode ser fracionado em uma empresa, distribuído por outra e processado em uma terceira para, só então, ser transformado em medicamento.

Seja adquirido por um processo de importação direta junto ao fabricante ou através de uma empresa terceirizada, o Insumo Farmacêutico Ativo (IFA) não poderá ser industrializado, exposto à venda ou comercializado no Brasil antes de registrado na ANVISA, exceto àquele destinado a pesquisa científica ou tecnológica, bem como a pesquisa e desenvolvimento de formulações. Em 2017 o Brasil se tornou o sexto maior mercado farmacêutico do mundo, com vendas estimadas em US\$ 33,1 bilhões. Considerando a crescente ascensão do mercado farmacêutico no Brasil, o acesso a um IFA de qualidade deve ser uma política pública prioritária, visto que a baixa qualidade deste pode comprometer a qualidade, a segurança e a eficácia do medicamento.

Contraditoriamente também somos um país onde as desigualdades sociais e falta de saneamento básico são evidentes em muitas regiões, fazendo com que as parasitoses ainda representem um grave problema de saúde pública em função de sua alta incidência em locais onde as condições de moradia, higiene e saneamento são precárias. Como exemplo de parasitose podemos citar a giardíase, que por ser frequente em grande parte do planeta foi incluída pela Organização Mundial da Saúde (OMS) no grupo de doenças negligenciadas. No Brasil, sua ocorrência varia de 12,4% a 50%, dependendo do estudo, da região e da faixa etária pesquisada, predominando em crianças entre zero e seis anos. O MS propõe como tratamento para a giardíase a administração oral de 2g de SCZ, em dose única para adultos, e 30mg/kg ou 1mL/kg para crianças, também em dose única e após a refeição. O SCZ é um derivado sintético da série dos nitroimidazóis, dotado de atividade parasiticida, sendo também uma alternativa terapêutica para amebíase intestinal sob todas as formas, amebíase hepática, tricomoníase e vaginites inespecíficas geralmente provocadas por *Gardnerella vaginalis*.

Um IFA contaminado ou com baixo padrão de qualidade pode causar dano a saúde ou até mesmo risco de morte, sem mencionar as consequências financeiras como perdas

de produtividade e custos adicionais com saúde pública. A Farmacopeia Brasileira e outros compêndios estipulam as especificações mínimas para um controle da qualidade do IFA, contudo não há metodologia analítica descrita em compêndio oficial para o SCZ. Sendo um importante insumo para a produção de medicamento utilizado no tratamento de doenças negligenciáveis, se faz necessário o desenvolvimento de uma metodologia analítica seletiva, robusta, precisa e exata para a quantificação de SCZ, seus compostos relacionados e seus possíveis PD no IFA em circulação no mercado nacional.

2 OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

O presente trabalho tem como objetivo desenvolver e validar um método indicativo de estabilidade para quantificação de secnidazol, substâncias relacionadas a sua síntese e seus possíveis produtos de degradação por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

2.2. Objetivos Específicos

- ✓ Realizar estudo de degradação forçada de SCZ
- ✓ Desenvolver e validar uma metodologia analítica para quantificação de secnidazol por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de Arranjo de Fotodiodo (HPLC-DAD);
- ✓ Desenvolver e validar uma metodologia analítica para quantificação de substâncias relacionadas e PD de secnidazol por HPLC-DAD;
- ✓ Identificar e caracterizar as principais impurezas orgânicas relacionadas a síntese de SCZ em amostra comercial;
- ✓ Identificar o principal produto de degradação e sua via de formação;

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1. INSUMO FARMACÊUTICO ATIVO E REGULAMENTAÇÃO BRASILEIRA

IFA é conceituado como “droga”: substância ou matéria-prima que tenha a finalidade medicamentosa ou sanitária [1]. É o componente farmacologicamente ativo destinado ao emprego em medicamento, denominado também como fármaco ou, simplesmente, como princípio ativo [2]. Pode exercer atividade farmacológica ou outro efeito direto no diagnóstico, cura, tratamento ou prevenção de uma doença, podendo ainda afetar a estrutura e o funcionamento do organismo humano [3]. A produção de medicamentos acontece resumidamente em duas grandes etapas, na primeira matérias-primas são convertidas em IFA e, na segunda, os IFAs são convertidos a medicamentos na forma que são comercializados [4].

Na primeira etapa, o IFA pode ser obtido por meio de processos de extração, de síntese química ou biotecnológica ou da combinação destes. No processo de extração, solventes ou outros materiais são utilizados para a extração de substâncias específicas de plantas ou outras fontes biológicas. No processo de síntese química, a molécula específica é formada por meio do emprego de reações químicas que possibilitem a sua formação. Já na síntese biotecnológica, ocorre o emprego de microrganismos em processos fermentativos para a obtenção de substâncias de interesse. Há, ainda, IFAs obtidos por semissíntese, obtidos por uma combinação de processos sintéticos com processos de extração ou biotecnológicos [4].

Já na segunda etapa tem-se o IFA como principal matéria-prima para a produção de medicamentos, logo, a eficácia e a segurança no uso de medicamentos estão diretamente relacionadas à qualidade do IFA utilizado em sua fabricação. Estima-se que o IFA custe o valor de 5 a 10% do total do produto, para produtos novos e próximo a 2% para moléculas antigas e com muitos fabricantes no mercado [4].

No Brasil, o controle sanitário de IFA tem sua previsão legal na Lei nº 6.360, de 23 de setembro de 1976, que dispõe sobre a vigilância sanitária a que ficam sujeitos os Medicamentos, as Drogas, os Insumos Farmacêuticos e Correlatos,

Cosméticos, Saneantes e Outros Produtos, mas foi a partir da criação da Anvisa, que se iniciou a análise dos requisitos técnicos do IFA [5, 6].

A Resolução - RE nº 391, de 9 de agosto de 1999, que aprovou o Regulamento Técnico para Medicamentos Genéricos foi a primeira das normas editadas pela Agência. Nela já era previsto, dentre outros requisitos, que fármacos não descritos em compêndios oficiais deveriam ter seus fabricantes e sua rota de síntese informada; suas especificações descritas, seus métodos analíticos devidamente validados, além disso, a identificação, quantificação e limites para seus principais contaminantes de acordo com a rota de síntese, e a relação dos solventes utilizados no processo também eram exigidos [7].

A análise do IFA foi ganhando importância e sendo aprofundada e, a cada nova norma de registro e pós-registro de medicamentos, novos requisitos foram sendo contemplados. De fato, o mercado brasileiro é um grande produtor de medicamentos e um maior controle sanitário dos insumos utilizados em todo território nacional sempre foi uma necessidade. Por isso em 2005, foi criado o Programa de Insumos Farmacêuticos Ativos [8] e o Regulamento Técnico das Boas Práticas de Fabricação de Produtos Intermediários e Insumos Farmacêuticos Ativos [9].

Outro marco regulatório ocorreu em 2008, com a obrigatoriedade de cadastro, junto à ANVISA, de todos os insumos farmacêuticos ativos utilizados nacionalmente. Isto teve como objetivo identificar os insumos farmacêuticos ativos utilizados no Brasil, suas especificações, fabricantes, importadores, fracionadores e distribuidores, formando assim um banco de informações sobre os insumos farmacêuticos ativos produzidos ou comercializados no país, sendo este constantemente atualizado [10]. Com isto, verificou-se que o país era responsável apenas pela fabricação de aproximadamente 2% dos IFAs utilizados na fabricação de medicamentos, demonstrando extrema dependência da importação de IFA, sendo que 78% das instalações produtivas no exterior que exportam para o Brasil localizam-se na China e na Índia [11].

No ano seguinte, foi publicada a normativa que trata sobre o registro de IFA no Brasil, sendo também estabelecidos os prazos e cronograma da primeira etapa da implantação [2, 12]. Com a publicação de uma norma específica para o registro de IFA, com requisitos técnicos mais próximos daqueles trabalhados em mercados

altamente regulados, a análise de requisitos técnicos de um IFA foi elevada a um novo patamar.

Ainda nesta evolutiva regulatória, em 2010 iniciaram-se as inspeções em farmoquímicas internacionais com o objetivo de fornecer certificação de Boas Práticas de Fabricação para fabricantes internacionais de IFA que pretendam exportar seus insumos, ou os medicamentos que os contenham, para o Brasil [13, 14]. Dois anos depois, houve a publicação de normativa específica para os estudos de estabilidade de IFA, revisada atualmente para maior alinhamento ao Guia Q1A de estabilidade do ICH [15, 16].

O ICH é o principal fórum de harmonização de requerimentos técnicos composto por entidades reguladoras e indústria farmacêutica. Em 2012 a reforma deste conselho teve início, o que possibilitou a aproximação da ANVISA. A reforma tornou o ICH uma entidade sem fins lucrativos sob o regime da lei suíça desde 23 de outubro de 2015 [17, 18, 19].

Essas alterações organizacionais possibilitaram que a Anvisa pleiteasse uma vaga na condição de membro, o que a tornou oficialmente uma observadora do ICH. Em novembro de 2016 foi aceita como membro regulado e com isto, tornou-se necessária a harmonização e implementação dos guias ICH no Brasil [17, 18, 19].

Ao longo dos anos normas foram atualizadas e outras novas publicadas, contudo em sua maioria são regulamentações para medicamentos genéricos, similares e novos, que contém alguma discussão sobre o IFA. Na TAB. 3.1.1 são listadas as normas vigentes relacionadas a IFA e na TAB. 3.1.2 são listados os guias ICH utilizados como referência primária para os requisitos técnicos de IFAs.

Tabela 3.1.1: Normas vigentes relacionadas ao IFA

NORMA	DESCRIÇÃO
<i>RDC Nº 30, de 15 de maio de 2008</i>	Dispõe sobre a obrigatoriedade de todas as empresas estabelecidas no país, que exerçam as atividades de fabricar, importar, exportar, fracionar, armazenar, expedir e distribuir insumos farmacêuticos ativos, cadastrarem junto à ANVISA todos os insumos farmacêuticos ativos com os quais trabalham.
<i>RDC nº 57, de 17 de novembro de 2009</i>	Registro de insumos farmacêuticos ativos
<i>IN nº 15, de 17 de novembro de 2009</i>	Prazos, cronograma e as priorizações para a primeira etapa da implantação do registro de insumos farmacêuticos ativos
<i>RDC nº 318, de 06 de novembro de 2019</i>	Estabelece os critérios para a realização de Estudos de Estabilidade de insumos farmacêuticos ativos e medicamentos, exceto biológicos, e dá outras providências
<i>IN nº 3, de 28 de junho de 2013</i>	Prazos e o cronograma para a segunda etapa da implantação do registro de insumos farmacêuticos ativos
<i>RDC nº 69, de 8 de dezembro de 2014</i>	Boas Práticas de Fabricação de Insumos Farmacêuticos Ativos
<i>NT nº 06-001 de 08 de setembro de 2015</i>	Material de partida nos processos de produção de insumos farmacêuticos ativos obtidos por síntese e semissíntese.
<i>NT nº 01 de 22 de abril de 2016</i>	Uso de mistura de solventes na fabricação de IFAs

Tabela 3.1.2: Guias ICH utilizados como referência para os requisitos técnicos de IFAs

GUIA	DESCRIÇÃO
<i>ICH Q3A</i>	Estabelece critérios para controle de impurezas em IFAs
<i>ICH Q3C</i>	Estabelece os critérios para controle de solventes residuais
<i>ICH Q6A</i>	Estabelece critérios para controle de qualidade de IFAs (especificação, métodos e critérios de aceitação)
<i>ICH M4Q</i>	Contém alguns requisitos técnicos, apesar de, primariamente, estabelecer o formato padrão de submissão
<i>ICH Q7</i>	Trata das boas práticas de fabricação de insumos farmacêuticos ativos e foi, em grande parte, internalizado pela RDC nº 69/2014
<i>ICH Q11</i>	Trata de desenvolvimento e fabricação de insumos farmacêuticos ativos e estabelece os critérios para definição do material de partida, conceito fundamental na regulação de IFAs.
<i>ICH M7</i>	Estabelece critérios para controle de impurezas mutagênicas. Pelo fato de conter conceitos de qualidade e de segurança, classifica-se como multidisciplinar (designado pela letra "M"), ao contrário dos demais, que são guias essencialmente de qualidade.
<i>ICH Q3D</i>	Estabelece os critérios para controle de impurezas elementares

O Brasil é o principal mercado farmacêutico da América Latina, em 2017 se tornou o sexto maior mercado farmacêutico do mundo, com vendas estimadas em US\$ 33,1 bilhões. Espera-se que, até 2022, o país se torne o quinto maior mercado farmacêutico do mundo, ultrapassando a França. Neste mesmo ano o setor farmacêutico vendeu cerca de R\$ 69,5 bilhões em medicamentos, sendo 72% deste

faturamento devido a produtos classificados como Genéricos, Novos e Similares, que utilizam IFAs sintéticos [20, 21, 22].

Em 2018 o mercado mundial de IFA foi da ordem de US\$ 158,2 bilhões, sendo 73% desse valor referente aos IFAs de origem sintética. No mesmo período, o Brasil teve uma importação de US\$ 2,954 bilhões e exportou US\$ 596,5 milhões, ou seja, importamos quase cinco vezes o que exportamos [4]. O país produz somente cerca de 2% do IFA em comparação ao total importado. Como resultado disto, em 2012, obtivemos um déficit de US\$ 1,8 bilhão no segmento farmoquímico. Tal fato vai de encontro com as estratégias do mercado internacional que, por sua vez, priorizam o investimento em pesquisa e desenvolvimento para obtenção de princípios ativos ao invés dos produtos, visto que, o monopólio da tecnologia de fabricação do fármaco é altamente lucrativo na medida em que esse representa de 70% a 80% do preço final do medicamento [22].

A grande dependência do país frente aos produtores internacionais e a alta representatividade do insumo farmacêutico no custo total de medicamento nos remetem novamente aos padrões de qualidade aceitos em nosso país como política pública prioritária pois impactam diretamente na qualidade, a segurança e a eficácia dos medicamentos aqui produzidos. Ensaio analítico fundamentado nas diretrizes dos órgãos reguladores, nacionais e internacionais, do setor farmacêutico evitam inúmeros ônus às entidades reguladas e principalmente ao consumidor. Um exemplo disto foi visto no primeiro semestre do ano passado, onde mais de 200 lotes de 26 medicamentos para hipertensão foram recolhidos por não apresentarem testes específicos para quantificação de nitrosaminas, classe de impurezas orgânicas com potencial carcinogênico para seres humanos e oriundas, principalmente, do processo de manufatura do IFA [23, 24].

3.2. IMPUREZAS, PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO E MÉTODO INDICATIVO DE ESTABILIDADE

Impurezas é qualquer componente presente no insumo farmacêutico ou no produto terminado que não seja o insumo farmacêutico ativo nem o(s) excipiente(s). São resultantes de inúmeras fontes, desde as matérias-primas utilizadas no processo de fabricação do IFA até os PD que podem surgir ao longo da

vida útil do insumo. Entender a origem, controlar e quantificar essas impurezas é um passo importante para a produção de fármacos e medicamentos de alta qualidade. Contudo, como exposto na sessão anterior, não há nenhuma regulamentação publicada pela ANVISA que estabeleça os critérios para o controle de impurezas no IFA, sendo hoje adotados como referência as resoluções aplicadas a medicamentos e os guias internacionais relacionados ao IFA [25, 26, 27, 28].

Em 2015, a ANVISA publicou a RDC nº 53, nela são estabelecidos parâmetros para a notificação, identificação e qualificação de PD em medicamentos com substâncias ativas sintéticas e semissintéticas, classificados como novos, genéricos e similares. Além de fornecer diretrizes para que sejam verificados adequadamente os PD em medicamentos, que podem apresentar toxicidade relevante ou provocar ineficácia terapêutica, esta resolução faz necessário o estudo do perfil de degradação forçada, cujos resultados serão utilizados para a determinação de um Método Indicativo de Estabilidade (MIE). A norma também apresenta detalhes sobre o procedimento do estudo de degradação forçada, que deve ser realizado com a formulação, com o placebo e com os insumos farmacêuticos ativos (isolados e associados, quando aplicável), para fins de comparação [29, 30].

Concomitantemente à publicação da RDC nº 53 de 4 de dezembro de 2015, a ANVISA publicou o Guia nº 4, versão 1. Este Guia tem o objetivo de expor a opinião da Agência e demonstrar o melhor entendimento para o cumprimento da RDC nº 53, mais especificamente, na realização de estudos de degradação forçada e estudos de perfil de degradação, na identificação e qualificação de PD, e ainda abrange os seguintes temas: realização do estudo de degradação forçada; documentação a ser enviada para a ANVISA sobre perfil de degradação; procedimentos para identificação de PD; e procedimentos para qualificação de PD [30, 31].

Segundo este Guia, impureza é qualquer componente presente no insumo farmacêutico ou no produto acabado que não seja o insumo farmacêutico ativo nem excipiente, e define o perfil de Impurezas como a composição qualitativa e quantitativa de todas as impurezas presentes, sejam elas orgânicas ou inorgânicas [31]. Já de acordo com os guias Q3A, Q3B e Q3C do ICH as impurezas podem ser classificadas como orgânicas, inorgânicas e solventes residuais. As impurezas

orgânicas podem ser conhecidas ou não, voláteis ou não, e incluem material de partida, intermediários, subprodutos, reagentes, ligantes, catalizadores ou PD. As impurezas inorgânicas podem resultar do processo de fabricação e incluem, reagentes, ligantes e catalizadores, resíduos de metais, sais inorgânicos e outros materiais como o carvão vegetal por exemplo. Os solventes residuais são normalmente líquidos orgânicos ou inorgânicos utilizados como veículos no preparo de soluções, na síntese do IFA ou no processo de manufatura do medicamento [25, 32].

Produto de degradação é uma molécula resultante de uma mudança química ocorrida no intermediário ou insumo farmacêutico ativo devido à ação do tempo e/ou à ação de agentes externos, tais como luz, temperatura, pH, água, ou pela reação com um excipiente e/ou com a embalagem primária [15, 16]. Após a síntese de um insumo situações como a perda de água ou aumento de temperatura podem interromper o equilíbrio reacional e muitas vezes levar a reações secundárias onde PD podem ser formados [33], por isso o acompanhamento da estabilidade, seja do IFA ou do medicamento, é de extrema importância.

A estabilidade é um importante parâmetro para avaliar a qualidade, segurança e eficácia exigida para o registro sanitário de produtos farmacêuticos, sendo esses requisitos essenciais para o sucesso de um tratamento. Ela é definida como o tempo durante o qual o fármaco ou o medicamento, mantém, dentro dos limites especificados, as mesmas condições e características que possuía quando da época de sua fabricação. Logo, testes de estabilidade de insumos farmacêuticos ativos tem como objetivo prever, determinar ou acompanhar sua data de reteste ou seu prazo de validade [34].

Estudos de estabilidade classificam-se como acelerado e de longa duração. O estudo acelerado foi projetado para acelerar possível degradação química e/ou mudanças físicas de insumos farmacêuticos ativos em condições forçadas de armazenamento. Os dados assim obtidos, juntamente com aqueles derivados dos estudos de longa duração, podem ser usados para avaliar efeitos químicos e físicos prolongados em condições não aceleradas e para avaliar o impacto de curtas exposições a condições fora daquelas estabelecidas no rótulo do insumo farmacêutico ativo. Já o estudo de estabilidade de longa duração foi projetado para

verificação das características físicas, químicas, biológicas e microbiológicas de um insumo farmacêutico ativo e, opcionalmente, após a data de reteste ou o prazo de validade esperado. Os resultados são usados para estabelecer ou confirmar a data de reteste ou o prazo de validade e recomendar as condições de armazenamento [15, 16].

Para IFAs que sejam utilizados ou fabricados no Brasil, deve-se apresentar estudo de estabilidade em zona IVb, quente e úmido de acordo com a OMS. Para IFAs importado e utilizados em medicamentos nacionais deve-se apresentar estudo de estabilidade nas condições climáticas do local de fabricação do IFA ou do local de fabricação do medicamento em que o IFA for utilizado/armazenado, o que for mais crítico [15, 16]. A TAB. 3.2.1 descreve as condições utilizadas para estudo de estabilidade na zona IVb de acordo com as condições de armazenamento normais do IFA.

Tabela 3.2.1: Estudo de estabilidade na zona IVb vs condições de armazenamento

CONDUÇÃO DO ESTUDO DE ESTABILIDADE		
ARMAZENAMENTO	ACELERADA	LONGA DURAÇÃO
Até 30 °C	40 °C ± 2 °C / 75% UR ± 5% UR	30 °C ± 2 °C / 75% UR ± 5% UR
2 °C a 8 °C	25 °C ± 2 °C / 60% UR ± 5% UR	5°C ± 3 °C
-15 °C a -25 °C	-	-20 °C ± 5 °C
-20 °C	-	Tratados caso a caso.

O perfil de degradação de interesse sanitário é aquele gerado pela condição a qual o medicamento é exposto em sua vida útil, que é simulada no estudo de estabilidade em longa duração. Logo, o perfil de degradação de interesse sanitário é aquele obtido após a exposição do medicamento ou IFA à temperatura e umidade da estabilidade de longa duração [31].

Contudo, para o acompanhamento do estudo de estabilidade e avaliação do perfil de degradação “real” do IFA são necessários métodos analíticos quantitativos validados, capazes de detectar, ao longo do tempo, mudanças nas propriedades físicas, químicas ou microbiológicas de uma substância, sendo também necessário que sejam específicos, capazes de mensurar com exatidão o teor do insumo farmacêutico ativo, PD e outros componentes de interesse, sem interferência. Esses métodos são conhecidos como MIE. Porém, não é possível desenvolver tal

método utilizando-se apenas amostras do IFA ou do medicamento no final do estudo de estabilidade de longa duração porque em geral a degradação é pequena, sendo possíveis dois tipos de problemas: formação de PD cujo método é incapaz de detectar ou coeluição dos PD gerados com o próprio ativo [31, 35].

Por estes motivos, é necessário causar deliberadamente a degradação em maior escala do IFA ou medicamento, expondo-os a condições mais extremas que aquela praticada no estudo de estabilidade de longa duração. Ou seja, é necessário realizar o estudo de degradação forçada, também chamado de estudo de estresse. O estudo de degradação forçada é, portanto, a ferramenta utilizada para se obter um perfil de degradação para o desenvolvimento do método indicativo de estabilidade. No entanto, como o perfil de degradação depende das condições a que se expõe o analito, o perfil obtido na degradação forçada não será igual ao obtido no estudo de estabilidade, sendo necessário por tanto a realização de degradação forçada em diversas condições para gerar todos os PD que possivelmente aparecerão nos estudos de estabilidade [31, 35].

O estudo do perfil de degradação é composto por duas partes: experimental e crítica. No início do estudo é realizada uma pesquisa bibliográfica detalhada sobre o IFA e, no caso de medicamentos, dos excipientes utilizados. São fontes bibliográficas desejáveis o *Drug Master File* (DMF), também conhecido como arquivo mestre do fármaco, literatura científica e compêndios oficiais. A finalidade deste levantamento é obter informações sobre os possíveis caminhos de degradação considerando as reações mais comuns dos grupos funcionais do IFA; previsibilidade de produtos de degradação com alertas estruturais para toxicidade e/ou genotoxicidade; e o conhecimento das impurezas de síntese que devem ser separadas de maneira eficiente dos PD [31].

As condições que compõe a parte experimental do estudo do perfil de degradação devem ser variadas para que se atinja uma redução no teor do ativo de pelo menos 10%, idealmente sem ocorrer geração de produtos de degradação secundários. Parâmetros como tempo de exposição, temperatura, concentração ou magnitude do agente degradante, podem ser variados. Abaixo estão listadas as condições recomendadas pela ANVISA para a realização do estudo experimental e

na TAB. 3.2.2 são descritas as condições de estresse normalmente utilizadas durante este estudo [31, 36].

- Ácida, utilizando-se uma solução tampão em pH abaixo de 7,0 ou um ácido mineral, como ácido clorídrico (HCl);
- Alcalina, utilizando-se uma solução tampão em pH acima de 7,0 ou um hidróxido de metal alcalino, como hidróxido de sódio (NaOH);
- Oxidante, usando-se peróxido de hidrogênio (H₂O₂) ou outro agente oxidante;
- Aquecimento (Térmica seca), devendo ser feito sem aumento de umidade no ambiente, sem dissolver o produto;
- Umidade (Térmica úmida), devendo ser feita no produto sem dissolver, mas com umidade relativa controlada e acima da umidade ambiente.
- Fotolítica, variando a quantidade de lux hora e/ou watt hora por metro quadrado;
- Sob influência de íons de metais de transição, geralmente soluções de Ferro III ou Cobre II.

Tabela 3.2.2: Condições de estresse comumente utilizadas nos estudos de degradação forçada [36]

CONDIÇÃO DE ESTRESSE	EXPOSIÇÃO	TEMPO DE EXPOSIÇÃO
<i>Térmica seca</i>	60°C	1-10 dias
<i>Exposição à luz</i>	2,4 milhões de lux.hora ou Halogeneto metálico, mercúrio, xenônio ou ultravioleta-B	Suficiente para a exposição de 2,4 milhões de lux
<i>Hidrólise básica</i>	NaOH 0,1 mol/L	1-10 dias
<i>Íons Metálicos</i>	0.05 mol/L Fe ₂ ⁺ ou Cu ₂	1-10 dias
<i>Térmica úmida</i>	40°C/75% UR	10 dias
<i>Umidade</i>	75% de umidade relativa ou superior	1-10 dias
<i>Oxidação</i>	3% H ₂ O ₂	1-3 horas
<i>Hidrólise Ácida</i>	HCl 0,1 mol/L	1-10 dias

A técnica de análise recomendada para desenvolvimento de métodos de produtos de degradação é a HPLC-DAD. Outros detectores, como e de Ultravioleta-Visível (UV-VIS), o Espectrômetro de Massas, o de Índice de Refração, o evaporativo com espalhamento de luz (*evaporative light scattering detector* ou ELSD)

e o detector de quimioluminescência de nitrogênio (*Chemiluminescent Nitrogen Detector* ou CLND); e técnicas, como termogravimetria e eletroforese capilar; podem desempenhar um papel auxiliar importante, principalmente na investigação de grandes diferenças no fator resposta [31].

A identificação dos produtos de degradação deve ser realizada nas situações previstas na Resolução de produtos de degradação, sendo considerados métodos aceitáveis de identificação de um produto de degradação a injeção de um padrão caracterizado ou farmacopeico de uma substância que tenha o mesmo tempo de retenção e o mesmo espectro de UV no método indicativo de estabilidade (HPLC-DAD); A proposição de um mecanismo de degradação que leve a uma estrutura já confirmada através de alguma técnica de caracterização como por exemplo, espectrometria em massa, espectroscopia no infravermelho (IR) ou espectroscopia por ressonância magnética nuclear (RMN); ou uma caracterização conclusiva, realizada com pelo menos duas técnicas diferentes tais como IR e RMN [31].

3.3. SECNIDAZOL: APLICAÇÃO, SINTESE E METODOLOGIA ANALÍTICA

O SCZ é um antimicrobiano derivado do nitroimidazol. É considerado de segunda geração sendo estruturalmente relacionado a outros nitroimidazóis incluindo metronidazol e tinidazol. Apresenta melhor absorção oral e maior meia-vida que outros agentes antimicrobianos desta classe e é seletivo contra muitas bactérias anaeróbicas Gram-positivas e Gram-negativas, além de também ser seletivo contra protozoários. Em setembro de 2017, A *U.S. Food and Drug Administration* (FDA) concedeu aprovação para o uso do SCZ, sob o nome comercial Solosec®, como um tratamento oral de dose única para vaginose bacteriana, infecção comum em mulheres de 15 a 44 anos normalmente causada por *Gardnerella vaginalis*. Este medicamento também é indicado para o tratamento de amebíase intestinal, amebíase hepática, giardíase e tricomoníase [37, 38, 39, 40].

Pó branco, de fórmula molecular $C_7H_{11}N_3O_3$, massa molar de 185,18 g / mol, quimicamente denominado *1-(2-metil-5-nitroimidazol-1-il)propan-2-ol*, o SCZ, cuja estrutura é descrita na FIG. 3.3.1, foi sintetizado pela primeira vez entre os anos de 1960 e 1970, nos laboratórios de pesquisa da Rhone-Poulenc na França, pertencendo à classe dos nitroimidazóis de segunda geração [38, 41].

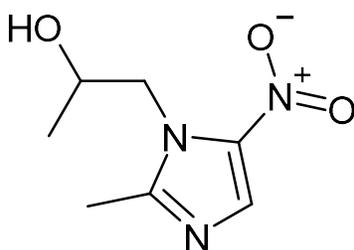


Figura 3.3.1. Estrutura química do secnidazol (1-(2-metil-5-nitroimidazol-1-il)propan-2-ol)

A primeira síntese de SCZ data de 1963 e utilizava como material de partida o 2-metil-4(5)-nitroimidazol e óxido de propileno, à pressão reduzida e utilizando ácido fórmico como catalisador. Poucos anos depois, em 1971, outro processo foi relatado, mas este por sua vez utilizava a cloro-propanona, em meio básico e sobre refluxo, ao invés de óxido de propileno, conforme descrito na FIG. 3.3.2. Ambos os processos foram patenteados pela indústria francesa Rhone-Poulenc SA [42, 43, 44, 45].

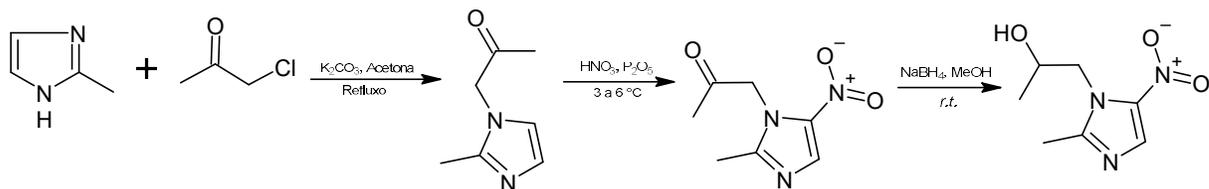


Figura 3.3.2. Rota de sintética para obtenção do secnidazol [43].

Outros dois processos semelhantes aos descritos acima também foram patenteados pela Rhone-Poulenc SA. Um em 1972, que partia da reação do o 2-metil-4(5)-nitroimidazol e óxido de propileno em etanol, com posterior acetilação, nitração e hidrólise para a obtenção do secnidazol. E outro em 1991, que utilizava o 1-acetoxil-metil-2-metil-5-nitroimidazol, dissolvido em diclorometano, e óxido de propileno como material de partida [45].

Posteriormente, em 2002 e 2006, outros dois processos de manufatura do SCZ foram registrados no banco de patente Chinesa. O primeiro processo citado é similar a síntese proposta pela Rhone-Poulenc em 1963, mas traz como inovação a alteração do sistema de solventes utilizados. A FIG. 3.3.3 traz o esquema da síntese proposta, observa-se que neste caso o ácido de Lewis é inicialmente suspenso em acetato de etila, em seguida é adicionado ao meio reacional o 2-metil-4(5)-

nitroimidazol, a mistura é mantida na faixa de 0 a 5°C e então o óxido de propileno é lentamente gotejado no meio. Essa alteração resultou em um surpreendente ganho no rendimento, aproximando-se de valores de 50% [45].

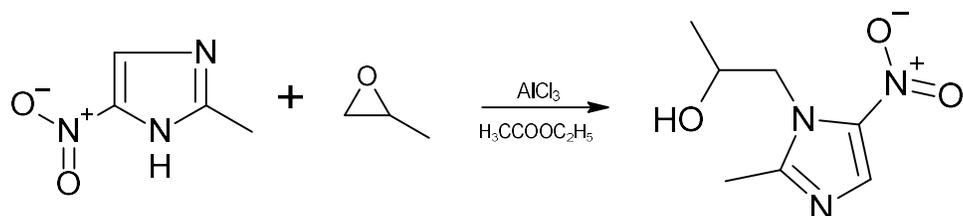


Figura 3.3.3. Rota sintética para obtenção do Secnidazol [45].

Já síntese proposta em 2006 aborda a utilização do 1-cloro-propanol não só como material de partida, mas também como solvente da reação. O 2-metil-4(5)-nitroimidazol reage com o 1-cloro-propanol por aquecimento a 85 – 95 °C por 6 – 7,5 horas, tudo ocorre em um ciclo reduzido de etapas e tem um rendimento na faixa de 56 – 60% [44].

Como pode ser visto nos parágrafos anteriores, os materiais de partida mais utilizados para a síntese de SCZ são o 2-metil-4(5)-nitroimidazol e o óxido de propileno. O 2-metil-4(5)-nitroimidazol está disponível por um baixo custo no mercado farmoquímico, podendo ser obtido através da reação de nitração do 2-metilimidazol que, em função de sua simetria, produz um produto de nitração com duas formas tautoméricas, o 2-metil-4-nitroimidazol e o 2-metil-5-nitroimidazol, FIG. 3.3.4 [46].

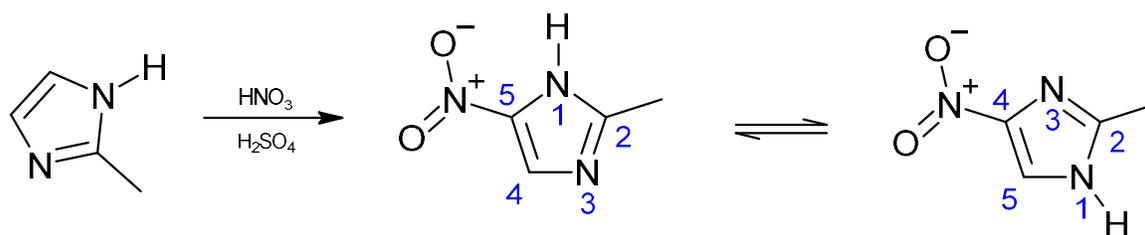


Figura 3.3.4. Reação de nitração do 2-metil-imidazol [46].

A nitração do 2-metil-imidazol é uma reação que ocorre via mecanismo de substituição eletrofílica. Existem muitos métodos para preparar este precursor diferindo entre si pelos reagentes iniciais, temperatura de síntese e tempo de reação. A abordagem clássica para introduzir o grupo nitro no anel imidazólico se dá por uma mistura de ácidos nítrico e sulfúrico concentrados, na presença de sulfato de

sódio anidro, sob aquecimento a 130°C durante 4 horas, e apresentado um rendimento de aproximadamente 66%. Assim como este, quase todos os processos de nitração ocorrem sob severas condições de síntese, sendo difícil sua aplicação em escala industrial uma vez que ácidos altamente concentrados e altas temperaturas aumentam a corrosividade do meio, além disso, baixo rendimento e a baixa qualidade do produto obtido também são observados [47, 48]. Contudo, hoje sabe-se que o rendimento deste produto é depende da temperatura da mistura reacional e da razão molar dos reagentes. Para o caso de uma nitração clássica, a temperatura de 100°C com os reagentes 2-metil-imidazol e ácido nítrico na razão molar de 0,3:1,13 respectivamente, tem-se um rendimento de 85%. Já para o caso de uma nitração com nitrato de sódio, as condições ideais, com rendimento de 95%, ocorrem a temperatura de 130°C com os reagentes 2-metil-imidazol, água, e nitrato de sódio na razão molar de 1,0: 6,4: 2,2; respectivamente [47].

Considerando as duas formas tautoméricas resultantes da nitração do 2-metil-imidazol, conclui-se que reações de alquilação podem ocorrer em ambos os átomos de nitrogênio, gerando o 2-metil-nitroimidazol 1-*N*-substituído ou 2-metil-nitroimidazol 3-*N*-substituídos, ou ainda, uma mistura destes isômeros, FIG. 3.3.5 [46].

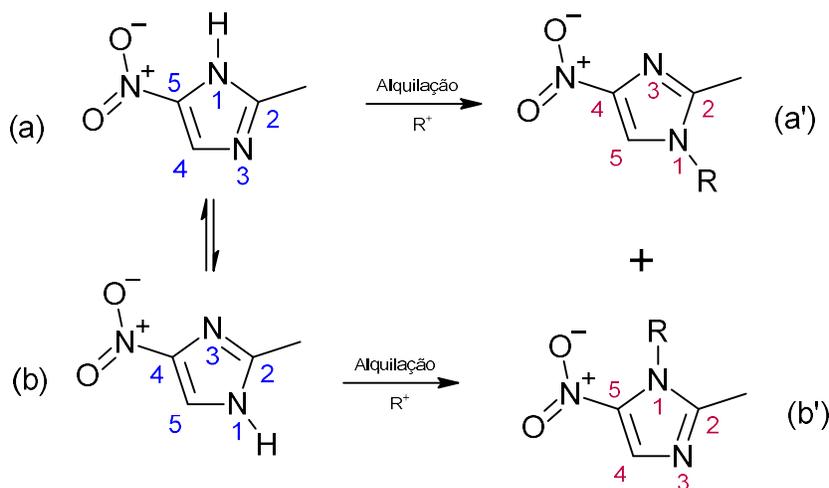


Figura 3.3.5. Reação de alquilação do 2-metil-4(5)-nitroimidazol [46].

Ainda na FIG. 3.3.5, as distinções podem ser sutis, mas geralmente os isômeros 4-nitro (a') são menos básicos, menos solúveis em solventes orgânicos e possuem máximos de absorção no ultravioleta em comprimentos de onda

ligeiramente menores que os isômeros 5-nitro (b'). Devido ao efeito elétron atrator do grupo NO₂, os átomos de hidrogênio do carbono diretamente ligado ao nitrogênio, no isômero 5-nitro (b'), apresentam sinais de RMN com deslocamento químico maior quando comparados ao isômero 4-nitro (a') [46].

A alquilação do 2-metil-4(5)-nitroimidazol por haletos ou sulfatos de alquila, em meio básico, tem como produto principal o isômero 4-nitro (a'), uma vez que na base conjugada do tautômero (a), o nitrogênio-3 é o mais básico e o mais nucleofílico. Isto porque o efeito do substituinte no caráter nucleofílico dos dois átomos de nitrogênio do anel imidazólico parece envolver muito mais o efeito indutivo (elétrons σ) que o de conjugação (elétrons π) [46].

Em condições neutras ou levemente ácidas, a formação do isômero 5-nitro (b') é favorecida. Dentre as duas formas tautoméricas possíveis, a forma protonada menos ácida prevalece, pois o sistema tautomérico assumirá predominantemente a forma na qual a ligação N-H é mais forte. Já em condições fortemente ácidas o tautômero com nitrogênio mais nucleofílico é favorecido. Um fator, independente de pH, que pode favorecer a formação do tautômero 4-nitro (a') é o impedimento estérico causado pela metila e pelo grupo nitro ao nitrogênio situado entre ambos [46].

Agora olhando para o óxido de propileno, que além de ser um material de partida comum em reações de obtenção de SCZ, é uma substância altamente reativa e versátil. Em função de sua polaridade e da tensão inerente ao ciclo de três membros, é aberto facilmente através de reações com uma grande variedade de substâncias. A maioria dessas reações são catalisadas, embora o óxido de propileno reaja espontaneamente com todos os compostos com átomos de hidrogênio ativos (incluindo os halogenetos de hidrogênio), além de cloro e amônia. Em escala industrial catalisadores alcalinos, como o hidróxido de sódio, acetato de sódio, alcóxido de sódio ou alcóxido de potássio, são preferidos. Catalisadores ácidos, como ácido sulfúrico, trifluoreto de boro ou tetracloreto de estanho, frequentemente formam subprodutos convertendo óxidos em éteres cíclicos ou aldeídos [49, 50].

Um importante tipo de reação envolvendo o óxido de propileno é a adição deste a compostos contendo hidrogênio lábil. Poliglicóis podem ser obtidos através da reação de hidrólise do oxido de propileno, além disso, este composto também reage com cetonas e aldeídos para formação de cetais e acetais cíclicos, e

com dióxido de carbono formando carbonato de propileno. Outra importante reação do ponto de vista comercial, é a polimerização na presença de catalisadores, gerando o poliéter poliálcool que é um componente chave para obtenção de poliuretanas. Muitas outras reações também são possíveis, incluindo reações com amido ou celulose., contudo reações envolvendo óxido de propileno podem se tornar violentas se não forem adequadamente controladas [49].

O óxido de propileno é um éter cíclico pertencente ao grupo dos epóxido ou oxiranos, assim como outros éteres, sofre quebra de ligação em meio ácido, mas sob condições muito mais brandas por causa da tensão no anel. Entretanto, reações de abertura do anel epóxido, dependendo da natureza do epóxido e das condições da reação, podem ocorrer via substituição nucleofílica unimolecular (S_N1) ou bimolecular (S_N2). Por exemplo, quando um epóxido assimétrico sofre solvólise em metanol básico, a abertura do anel ocorre por um mecanismo S_N2 , e o carbono menos substituído sofrerá o ataque nucleofílico [51].

Por outro lado, quando a solvólise ocorre em metanol ácido, uma mistura de produtos pode ser obtida, pois se ambos os átomos de carbono do epóxido são primários ou secundários, o ataque nucleofílico ocorre principalmente no local menos substituído, um resultado semelhante ao de uma reação S_N2 . Entretanto, quando o átomo de carbono do epóxido é terciário, o ataque nucleofílico acontece principalmente no local mais substituído, um resultado semelhante ao uma reação S_N1 . A melhor maneira de definir reações de abertura do anel epóxido catalisada por ácido é descrevê-la como uma mistura do mecanismo S_N2 e S_N1 , onde inicialmente o oxigênio doa o par de elétrons livres para formação de uma nova ligação ao mesmo tempo que sua ligação com o átomo de carbono começa a se romper e a carga positiva começa a se acumular no carbono mais substituído, conforme representado na FIG. 3.3.6 [51, 52].

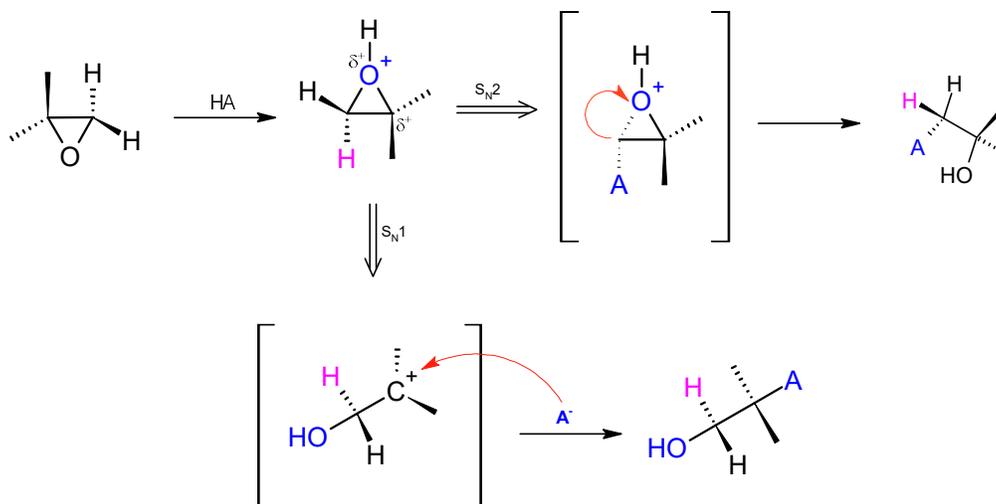


Figura 3.3.6. Mecanismos de abertura do anel epóxido em meio ácido [52].

Considerando todo o relatado acima, é possível supor que na síntese para obtenção de SCZ, proposta na FIG. 3.3.3, subprodutos sejam formados. Entretanto, há uma lacuna a esse respeito na literatura científica, visto que ainda não foram encontrados relatos sobre a identificação e caracterização de compostos relacionados a síntese deste ativo. Em 2009 foi publicado o artigo intitulado “*Determination of secnidazole and its related substances by HPLC*”, contudo, apesar do título com considerável alusão ao tema, há nesta publicação o relato da identificação por HPLC-UV-MS de três substâncias relacionadas ao SCZ, o precursor 2-metil-5-nitroimidazol e mais dois subprodutos, cujas estruturas foram especuladas como sendo prováveis isômeros do SCZ, mas não foram confirmadas [53].

Vários procedimentos analíticos foram relatados para a determinação do secnidazol, contudo a maioria é aplicada a formulações farmacêuticas, incluindo algumas associações com outros fármacos [54]. Dentre os métodos relatados na literatura podemos citar colorimetria, espectrofotometria, densitometria, voltametria, polarografia de pulso diferencial, cromatografia em camada delgada, cromatografia gasosa, cromatografia líquida e cromatografia em fluido supercrítico [55, 56, 57, 58, 59, 60]. Abaixo, na TAB. 3.3.1, são sumarizadas as metodologias analíticas relacionadas ao SCZ encontradas durante o levantamento bibliográfico.

Tabela 3.3.1: Metodologias analíticas relacionadas ao SCN relatadas em literatura científica.

Técnica	Parâmetros	Aplicabilidade	Analito	Ref.
<i>UV</i>	Espectrofotômetro Shimadzu UV- 1601 PC, Scan speed: 120 nm/min. Chart speed: 60 nm/min. tempo de resposta 10 s, Diluente: H ₂ SO ₄ a 0,1 N, comprimento de onda: 296 nm.	Doseamento	Comprimido e pó para suspensão oral	[59]
<i>HPLC</i>	Cromatógrafo Perkin Elmer, coluna Bondapak C18 5µm, 150 X 4.6 mm, Fase-móvel: metanol 30%, Fluxo: 1,0 mL/min, comprimento de onda: 319 nm.	Doseamento	Comprimido e pós para suspensão oral	[59]
<i>CCD densitométrica</i>	Fase móvel: acetato de etila, comprimento de onda: 311 nm.	Doseamento	Comprimido e pós para suspensão oral	[59]
<i>Titulação com Derivatização</i>	Diazotização da sulfanilamida com os íons nitritos de secnidazol liberados por hidrólise básica, com subsequente acoplamento do azo com dicloridrato de N-naftil-etileno-diamina.	Doseamento	Comprimido e pós para suspensão oral	[59]
<i>HPLC*</i>	Cromatógrafo Waters, coluna Spherisorb ODS2 C18 5µm, 250 X 4.6 mm, Fase-móvel: metanol 15%, Fluxo: - mL/min, comprimento de onda: 310 nm.	Doseamento	Matéria-prima	[62]
<i>LC-MS</i>	Finnigan Mat LCQ ion-trap, coluna Spherisorb ODS2 C18 5µm, 250 X 4.6 mm, modo APCI positivo, faixa de 100 – 500 Da, Fase-móvel: acetonitrila 14%, Fluxo: - mL/min, comprimento de onda: 310 nm.	Identificação	Matéria-prima	[62]
<i>UPLC*</i>	Cromatógrafo Waters, coluna BEH C18 1,7 µ, 100 x 2,1 mm, Fase-móvel: 0.002 M Na ₂ HPO ₄ e acetonitrila, temperatura da coluna: 40°C, gradiente, Fluxo: 0,3 mL/min, comprimento de onda: 210 nm.	Doseamento	comprimido	[54]
<i>HPLC*</i>	Cromatógrafo Jasco, coluna HiQsil C18 5µm, 250 X 4.6 mm, Fase-móvel: metanol 60%, Fluxo: 1 mL/min, comprimento de onda: 310 nm.	Doseamento	comprimido	[55]
<i>HPLC</i>	Cromatógrafo Shimadzu, coluna Luna C18 5µm, 150 X 4.6 mm, Fase-móvel: metanol 60%, Fluxo: 1 mL/min, comprimento de onda: 310 nm.	Doseamento	comprimido	[63]
<i>UV</i>	Espectrofotômetro Shimadzu UV AUY220, Solvente: Metanol, comprimento de onda: 325 nm.	Doseamento	comprimido	[60]
<i>Voltametria cíclica</i>	Estação de trabalho eletroquímica CHI760D. Eletrodo de pasta de carbono ou 1,4-BQMCPPE como eletrodo de trabalho cloreto de prata saturado como eletrodo referência, e fio de platina como contra-eletrodo.	Doseamento	comprimido	[58]
<i>HPLC*</i>	Cromatógrafo Shimadzu, coluna Inertsil ODS-3V C18 5µm, 150 X 4.6 mm, Fase-móvel: Fosfato de potássio monobásico a 0,01 M : Acetonitrila: metanol (70: 25: 5), Fluxo: 1,5 mL/min, comprimento de onda: 228 nm.	Doseamento	Pó para suspensão Oral	[64]
<i>HPLC*</i>	Cromatógrafo Waters 1525, coluna Luna CN 5µm, 250 X 4.6 mm, Fase-móvel: água purificada + 0,7% de ácido acético: etanol (78: 22), Fluxo: 1,3 mL/min, comprimento de onda: 318 nm.	Doseamento	Comprimido	[65]

*Método Validado conforme ICH.

Tabela 3.3.1: Metodologias analíticas relacionadas ao SCN relatadas em literatura científica, continuação.

Técnica	Parâmetros	Aplicabilidade	Analito	Ref.
CG-FID	HP 6890 Hewlett Packard; coluna HP-1 0,32 mm × 30 m, 0,25 µm; termostato - 70 °C (3 min), 40 °C / min a 180 °C (2 min), 40 °C / min a 250 °C (3 min); injetor - 280 °C; detector - 280 °C; fluxo do gás de arraste (hélio) - 1,5 ml / min; modo split - 1: 2.	Doseamento	Matéria-prima	[56]
CG-MS	Agilent 6890N / 5973N / 7683; colunas HP-5MS 0,25 mm × 30 m, 0,25 µm; DB-17MS 0,25 mm × 30 m, 0,15 µm; as colunas são conectadas sequencialmente por meio do switch Deans; termostato - 70 °C (2 min), 45 °C / min. a 210 °C, 6 °C / min a 320 °C (12,56 min); linha de transferência - 280 °C; fonte de íons - 230 °C; quadrupolo - 150 °C; impacto de elétrons - 70eV; 40-750 m / z; injetor - 250 °C; modo sem divisão; pressão do gás arraste de entrada (hélio): 1ª coluna - 26,06 psi, 2ª coluna - 19,30 psi	Doseamento	Matéria-prima	[56]
UV*	espectrofotômetro Shimadzu UV-1800, solução aquosa de secnidazol foi lida em célula de quartzo combinada de 10 mm no modo varredura de 200 a 370 nm. O espectro de ordem zero foi obtido pelo software da sonda UV 2.42, absorvância do espectro foi medida a 320 nm.	Doseamento	Comprimido	[57]
HPLC*	Cromatógrafo Merck-Hitachi, Coluna Peerless basic, C18 3µm, 50 X 4.6 mm, temperatura ambiente, Fase-móvel: tampão: metanol (80: 20), Fluxo: 1,0 mL/min, comprimento de onda: 310 nm. Tampão: 1 ml de trietilamina dissolvida em 1000 ml de água grau HPLC, pH 3,0 ajustado com ácido fosfórico diluído.	Doseamento	Matéria-prima e Comprimido	[66]
HPLC	Cromatógrafo Shim-pack, Coluna Agilent, C18 5µm, 150 X 4.6 mm, temperatura 30°C, Fase-móvel: Solução de ácido fórmico a 0,1%: acetonitrila (90: 10), Fluxo: 1,0 mL/min, comprimento de onda: 320 nm.	Doseamento e Substâncias Relacionadas	Matéria-prima	[53]
HPLC	S-ornidazol foi utilizado como padrão interno. Enantiômeros de secnidazol foram extraídos de usando éter dietílico-diclorometano (3: 2, v / v). Cromatógrafo Agilent 1200. Coluna Chiral AGP 5µm, 150 mm × 4,0 mm, a 20 °C. Fase móvel acetato de amônio 10 mM-metanol (96: 4, v / v), Fluxo 0,5 mL / min, detecção em 318 nm	Separação enantiomérica	Plasma de rato	[67]

*Método Validado conforme ICH.

Os métodos de HPLC aplicados ao controle de qualidade de insumos são os principais utilizados pela farmacopeia Americana e outras intercambiáveis. A técnica é muito específica, precisa e exata desde que testes de adequabilidade do sistema sejam realizados previamente a cada análise. A escolha do sistema de detecção também é crítica para garantir a especificidade do método. Um dos detectores amplamente usados é o UV, que por sua vez é capaz de monitorar vários comprimentos de onda simultaneamente [61]. Cabe destacar que dentre as técnicas

utilizadas para quantificação de SCZ, TAB. 3.3.1, o HPLC tem sido o sistema mais utilizado.

Contudo, dentre os trabalhos relatados, somente um identificou produtos de degradação de SCZ [62], através da técnica de LC-MS, sendo estes produtos formados principalmente sob condições drásticas de hidrólise básica e oxidativa. Os demais relatos têm foco na quantificação somente do insumo e muitos se quer consideraram todos os parâmetros preconizado nos guias do ICH, não podendo, portanto, ser considerados métodos indicativos de estabilidade. A susceptibilidade de secnidazol á hidrólise básica e oxidativa também foi observada em outros estudos, contudo, estes também empregaram condições drásticas de degradação, com temperaturas de exposição que variaram de 60 à 100°C associadas ao agente degradante [55, 65].

Além das possíveis impurezas de síntese e dos prováveis produtos de degradação do secnidazol, há em sua estrutura um centro quiral, conforme ilustrado na FIG. 3.3.7, sendo este administrado como uma mistura racêmica na prática clínica. Sabe-se que os enantiômeros podem ter propriedades farmacodinâmicas, toxicológicas e farmacocinéticas diferentes, devido ao potencial de interações estereosseletivas com macromoléculas biológicas [67], sendo na maioria das vezes necessário um controle específico para impurezas enantioméricas.

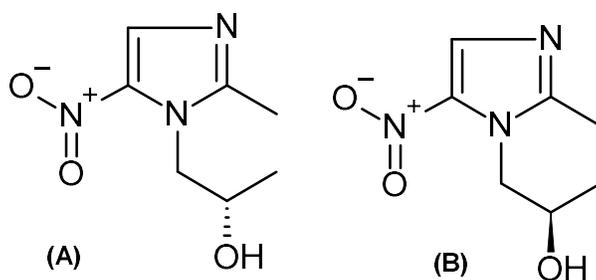


Figura 3.3.7. Estruturas dos enantiômeros S-(+)-secnidazol (A) e R-(-)-secnidazol (B) [67].

Contudo, não foi detectado em estudos *in vivo* processos de absorção ou eliminação estereosseletivos para o secnidazol. Outro dado relevante é que a inversão quiral *in vivo* entre os enantiômeros de secnidazol não ocorre, além disso, nenhuma evidência de interação enantiômero-enantiômero foi encontrada [67]. Considerando estas informações, não se julga necessário o controle enantiomérico para este insumo.

É importante destacar que durante o levantamento bibliográfico não foram encontrados métodos para quantificação de substâncias relacionadas e produtos de degradação inerentes ao IFA que cumpram as regulamentações nacionais e internacionais. Os artigos supracitados em sua maioria fazem menção ao doseamento de secnidazol em comprimido ou suspensão oral e não a quantificação dos possíveis produtos de degradação gerados durante os diferentes processos de fabricação ou durante o seu armazenamento.

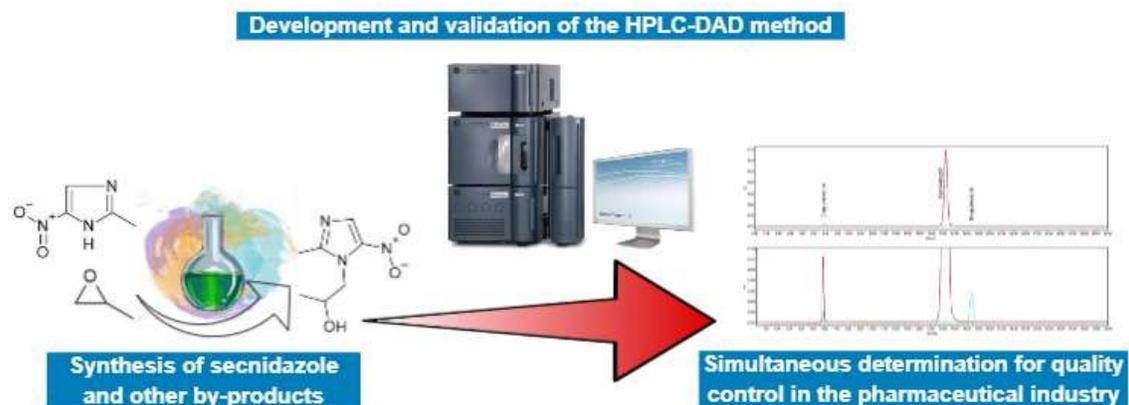
O referido insumo também não possui monografia de análise listada na Farmacopeia brasileira ou em outras intercambiáveis preconizadas na RDC N° 37, de 6 de julho de 2009. Portanto faz-se necessário um estudo mais aprofundado acerca das substâncias relacionadas a síntese de secnidazol, bem como de seus possíveis produtos de degradação, para que um método específico para a quantificação dessas substâncias possa ser desenvolvido e validado.

4 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO INDICATIVO DE ESTABILIDADE PARA QUANTIFICAÇÃO DE SECNIDAZOL E SUBSTÂNCIAS RELACIONADAS EM MATÉRIA-PRIMA POR HPLC

QUÍMICA NOVA

QUALIS B5

Graphical Abstract



A simple, sensitive, robust method for the estimation of secnidazole and related substances was developed and validated. The forced degradation study was carried out as per ANVISA and ICH guidelines.

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO INDICATIVO DE
ESTABILIDADE PARA QUANTIFICAÇÃO DE SECNIDAZOL E SUBSTÂNCIAS
RELACIONADAS EM MATÉRIA-PRIMA POR HPLC**

Luana de F. Maestrello^a, Viviane da S. Lobo^b, Lucas H. dos Santos^b, Marilésia F. de Souza^c, Maurício Rosa^{a*}.

^a Laboratório de Ciências Químicas, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, 85903-000 Toledo – PR, Brasil.

^b Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Unidade de Toledo, 85902-040 Toledo – PR, Brasil.

^c Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, 86051-980 Londrina – PR, Brasil.

-----*marque uma alternativa, não apague o texto em azul*-----

Manuscrito com material suplementar

Manuscrito sem material suplementar

*e-mail: mauriciofrosa@yahoo.com.br

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF AN INDICATIVE STABILITY METHOD FOR SECNIDAZOL QUANTIFICATION AND RELATED SUBSTANCES IN RAW MATERIAL BY HPLC

The present work consists of the development and validation of analytical methodology for evaluation of secnidazol and related substances in bulk drug by high performance liquid chromatography. The separation was made using the reversed-phase column LC-8, Methanol/water v/v, 20:80 v/v, as mobile phase and solvent, detection and quantification at 310 nm and, flow of 1.0 mL / min, injection volume of 10 μ L, at room temperature. The results here obtained show that the analytical methodology is accurate, reproducible, robust, and linear over the concentration range 400 – 600 μ g/mL of secnidazole and 0.50 – 1.80 μ g/mL for related substance. The statistical treated, carried out through the action Stat system, proved that the method may be considered a precise and accurate analytical alternative for quality control. The method was applied for secnidazole evaluation in two different pharmaceuticals manufacturer. The results of these analyzes are in accordance with the values declared. The method developed is effective to analyze secnidazole and related substance in bulk drug, being able to be used in quality control laboratory routine.

Keywords: Secnidazole; Related Substances; high performance liquid chromatography; validation analytical method.

INTRODUÇÃO

Dentre as drogas pertencentes ao grupo dos nitroimidazóis, o secnidazol (SCZ), quimicamente conhecido como 1-(2-metil-5-nitro-1-imidazolil)-2-propanol (Figura 1), é uma droga de segunda geração estruturalmente relacionada ao metronidazol e ao tinidazol, diferindo destes somente pela substituição N'-alquílica do anel imidazolinico.¹⁻⁴

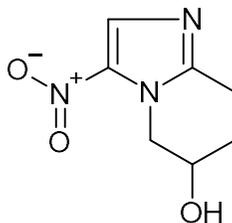


Figura 1. A Estrutura química do secnidazol

Essa modesta diferença estrutural é responsável por diferenças físico-químicas e bioquímicas significativas, como distribuição nos tecidos corporais e vias metabólicas.² O SCZ possui atividade antiparasitária e tem sido utilizado no tratamento de tricomoníase, giardíase, amebíase e vaginose bacteriana. Além disso, tem se mostrado eficaz contra a *Dientamoeba fragilis*, que pode causar diarreia, havendo também relatos de utilização desta droga no tratamento de periodontite.³ O mecanismo desta classe de compostos se dá através da formação do radical nitro aniônico de curta duração por bioredução em condição anaeróbica. O ânion radical gerado permeia as células e interage com o DNA, inibindo a síntese de ácido desoxirribonucleico, rompendo a estrutura dupla hélice do DNA, levando a degradação deste e conseqüentemente à morte celular.^{3,5}

Diferentes métodos analíticos têm sido utilizados para a determinação de SCZ, principalmente em formulações farmacêuticas, incluindo espectrofotometria de ultravioleta visível (UV/Vis), colorimetria, densitometria, voltametria, polarografia de pulso diferencial, cromatografia em camada delgada, cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), extração em fase sólida (SPE), cromatografia gasosa (CG), cromatografia em fluido supercrítico, cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas, eletroforese e eletrocromatografia-capilar acoplada a espectrometria de massas.^{3,6,7} Muitas dessas abordagens analíticas consomem um longo tempo e são dispendiosas, além de não considerarem todos os parâmetros preconizado nos guias do *International Conference on Harmonization (ICH)*, muito menos as normativas nacionais, para

a quantificação de secnidazol e compostos relacionados a sua síntese.^{6,7} Também é necessário destacar que tanto a matéria-prima quando do produto farmacêutico ainda não possuem monografia descrita na Farmacopeia Brasileira ou em compêndios oficiais. Diante disto, faz-se necessário o desenvolvimento e a validação de uma metodologia analítica que esteja de acordo com a regulamentação brasileira e guias internacionais, e que seja capaz de quantificar o fármaco, e substâncias relacionadas, atualmente comercializado no mercado nacional para a produção de medicamentos.

PARTE EXPERIMENTAL

Equipamentos

Foi utilizado cromatógrafo a líquido *Acquity Hclass Waters*. As colunas cromatográficas foram a Symmetry® C-8 (Waters, EUA), 25 cm de dimensão, 4,6 mm de d.i., 5 µm de tamanho de partícula, código 2293810613813, Kromasil® C-8 (Akzo Nobel, EUA), 25 cm de dimensão, 4,6 mm de d.i., 5 µm de tamanho de partícula, código E192617 (coluna 2) e pré-coluna Superguard® LC-8 (Supelco, EUA) com 2 cm de dimensão, 4,6 mm de d.i. e 5 µm de tamanho de partícula. Também foram utilizados: aparelho de ultrasson modelo Elmasonic P (Elma, Alemanha); balança analítica modelo excellence plus XP26 (Mettler Toledo, Brasil) e sistema de purificação de água modelo Elix Technology Inside Integral 5 (Merck, Alemanha).

Reagentes, soluções e amostras

O 1-(hidroxipropil)-2-metil-5-nitroimidazol (Secnidazol) Axios Reseach (Canadá), lote KV41127, foi utilizado como substância química de referência, apresentando validade até 10/20. O 2-metil-5-nitroimidazol (Impureza A) Axios Reseach (Canadá), lote BQ16902, foi utilizado como substância química de referência, apresentando validade até 10/21. O 1-(1-metil-2-hidroxietil)-2-metil-4-nitroimidazol (Isômero-I) Axios Reseach (Canadá), lote TN77384, foi utilizado como substância química de referência, apresentando validade até 11/20. O 1-(2-hidroxipropil)-2-metil-4-nitroimidazol (Isômero-II) Farchemia Srl (Índia), lote L0343/16, foi utilizado como substância química de referência, apresentando validade até 07/21.

A matéria-prima Secnidazol, lote 750280, validade 05/20 (Amostra I), foi fabricada e fornecida pela *Aarti Drugs Limited*. A matéria-prima Secnidazol, lote 858847, validade 06/20 (Amostra II), foi fabricada e fornecida pela *Zhejiang Supor Pharmaceuticals Co, Ltd*.

Os reagentes empregados foram ácido clorídrico (Synth, Brasil) grau P.A.; Hidróxido de sódio (Neon, Brasil) grau P.A.; Peróxido de hidrogênio (Neon, Brasil) grau P.A.; Cloreto férrico (Synth, Brasil) grau P.A.; e metanol (Biograde, Brasil) grau espectrofotométrico/HPLC.

Parâmetros cromatográficos

A escolha da fase móvel foi realizada através da mistura de solventes constituídos por água ultrapura e metanol v/v (80:20 v/v), e utilizando a própria fase móvel para solubilizar as amostras. As soluções das amostras e de estoque foram preparadas no momento da sua utilização. As condições de operação foram vazão de 1 mL.min⁻¹, tempo de corrida de 30 min e detecção no UV em 319 nm.

Validação do método analítico

O método proposto foi validado conforme a RDC no 166 de 24/07/2017 da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária),⁸ que estabelece critérios para a validação de métodos analíticos empregados em insumos farmacêuticos, medicamentos e produtos biológicos em todas as suas fases de produção, e recomendações da ICH (*The International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use*).⁹ Os parâmetros avaliados foram: seletividade; linearidade; intervalo, precisão, exatidão; limite de quantificação; e robustez.

Seletividade

A especificidade do método foi determinada preparando-se soluções das substâncias químicas de referência do ativo e das impurezas nas concentrações finais de 500,0 µg/mL para o secnidazol e 0,50 µg/mL para as impurezas relacionadas a síntese do secnidazol. As soluções de padrão e amostras, previamente filtradas em filtros de 0,45 µm, foram injetadas em cromatógrafo, registrando-se os valores das áreas dos picos cromatográficos, calculando-se o percentual de resposta para o método e a estimativa de desvio padrão da determinação.

Para o estudo de degradação química prepararam-se amostras de 500,0 µg/mL. Para hidrólise ácida as amostras foram submetidas a 0,5 mol/L HCl, a 40°C, por 10 dias. Para hidrólise básica as amostras foram submetidas a 0,05M NaOH, a 40°C, por 2 horas, e após exposição as mesmas foram neutralizadas. Para estresse oxidativo as amostras foram submetidas a 0,5% H₂O₂, a temperatura ambiente, por 10 dias. Para estresse por íons metálicos as amostras foram submetidas a 1,0 mmol/L FeCl₃, a temperatura ambiente, por 24 horas.

Para o estudo de degradação física o pó foi submetido as condições de estresse e após prepararam-se amostras de 500,0 µg/mL. Para o estresse térmico as amostras foram armazenadas a 60°C por 10 dias. Para o estresse climático as amostras foram armazenadas a 75% UR, a 40°C, por 10 dias. Para o estresse fotolítico as amostras foram expostas a 2,4 milhões lux/h.

A pureza de pico foi calculada empregando-se o *autothreshold* e com absorção espectral máxima inferior a 1 mA.

Linearidade e intervalo

A linearidade foi determinada por meio da obtenção de três curvas analíticas nos intervalos de 400 a 600 µg.mL⁻¹ para o secnidazol (de 80-120% da concentração teórica do teste), de 0,25 a 0,60 µg.mL⁻¹ para impurezas inespecíficas (de 0,050-0,120% da concentração teórica do teste) e de 0,25 a 0,90 µg.mL⁻¹ para impurezas específicas (de 0,050-0,180% da concentração teórica do teste). A equação da reta (inclinação e intercepto com o eixo y) foi obtida pelo método dos mínimos quadrados e calculou-se o coeficiente de correlação linear. Os dados de cada nível de concentração foram avaliados por meio de análise de variância (ANOVA).

Precisão

A repetibilidade (precisão intradia) para a quantificação de secnidazol foi avaliada por meio de 6 replicas do ativo a 500 µg.mL⁻¹.

A repetibilidade (precisão intradia) para a quantificação de impurezas específicas foi avaliada por meio de nove replicas do ativo a 500 µg.mL⁻¹ contaminadas com alíquotas de soluções estoques de padrão das impurezas específicas em três níveis de concentração diferentes (0,05, 0,15 e 0,18%), contemplando o intervalo linear do método, e com três réplicas em cada nível.

A repetibilidade (precisão intradia) para a quantificação de impurezas inespecíficas foi avaliada por meio de nove replicas, preparadas a partir do padrão de secnidazol, em três níveis de concentração diferentes (0,05%, 0,10% e 0,12%), contemplando o intervalo linear do método, e com três réplicas em cada nível.

A precisão intermediária (precisão interdia) foi avaliada de forma semelhante à precisão intradia, no entanto, as análises foram realizadas em dias diferentes e com analistas distintos.

Exatidão

A exatidão para a quantificação de secnidazol foi avaliada por meio de nove réplicas, preparadas a partir do padrão de secnidazol, em três níveis de concentração diferentes (400, 500 e 600 $\mu\text{g mL}^{-1}$), contemplando o intervalo linear do método, e com três réplicas em cada nível. A exatidão para a quantificação de impurezas específicas foi avaliada de modo concomitante a repetibilidade (precisão intradia).

A exatidão para a quantificação de impurezas inespecíficas foi avaliada de modo concomitante a repetibilidade (precisão intradia).

Limite de quantificação (LQ)

Adotou-se como limite de quantificação o mesmo valor calculado para o limite de notificação, tendo como base a dose máxima diária do insumo.¹⁰

Robustez

A robustez do método foi avaliada através de variações deliberadas nos fatores considerados críticos para quantificação de secnidazol e substâncias relacionadas: proporção entre fase orgânica e aquosa na fase móvel, temperatura da coluna, fluxo da fase móvel, marca da coluna, tempo de ultrassom e membrana filtrante empregados na preparação da amostra, entre outros. As amostras foram preparadas conforme descrito anteriormente empregando as variações apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1. Fatores avaliados na robustez do método de quantificação de secnidazol e substâncias relacionadas

Fatores	Nominal	Varição I	Varição II
Tempo de ultrassom	10 minutos	5 minutos	15 minutos
Membrana filtrante	Centrifugação	PVDF 0,45 μm	PTFE 0,45 μm
Fluxo da Fase móvel	1,0 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$	0,8 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$	1,2 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$
Temperatura da coluna	30 ° C	28 ° C	32 ° C
Composição da Fase móvel (MeOH:H ₂ O)	20:80	18:82	22:78
Coluna cromatográfica	Waters Symmetry	Akzo Nobel Kromasil	-

Quantificação análise de amostras comerciais

utilizando-se o método validado, 50 mg de amostra foram transferidos para um balão volumétrico de 100 mL, após dissolvidos em 50 mL de fase móvel, foram levados ao ultrassom por 10 minutos. Em seguida, o balão foi avolumado com o mesmo diluente e homogeneizado por inversão. Filtrou-se a solução em membrana PVDF 0,45 μm com descarte de 2 mL. Procedimento realizado em duplicata.

Análises estatísticas

A análise estatística dos dados foi realizada por meio de análise de variância (ANOVA fator único), testes t e f com nível de confiança de 95% (probabilidade inferior a 5% - $p < 0,05$). A avaliação estatística dos resultados foi realizada por meio do Sistema Action Stat 3.7.¹¹

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Desenvolvimento e otimização do método

Apesar de não existir monografia farmacopeica para o secnidazol, existe para outros compostos da classe dos nitroimidazóis, como ornidazol, metronidazol e tinidazol. Com base no método descrito na farmacopeia americana para o metronidazol¹², a coluna cromatográfica foi otimizada envolvendo estudos relacionados com a alteração das dimensões e fase estacionária de forma a proporcionar a completa separação entre todos os analitos de interesse e com baixos tempos de retenção (Figura 2), favorecendo análise rápida para ser aplicada na rotina. Foram fixados os seguintes parâmetros: fase móvel constituída de água ultrapura e metanol (80:20 v/v) que também foi utilizada como solvente das amostras, vazão de 1 mL.min⁻¹, tempo de corrida de 30 min e detecção em 319 nm.

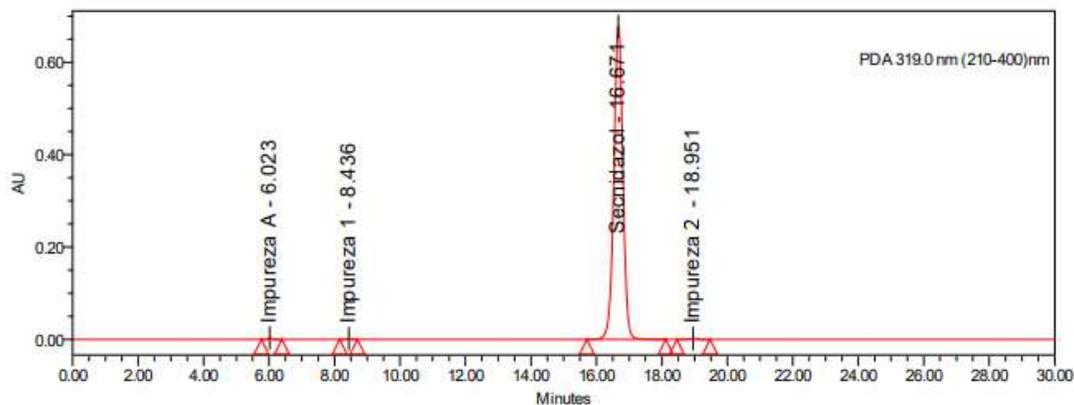


Figura 2. Perfil cromatográfico de secnidazol e substâncias relacionadas nas seguintes concentrações: [secnidazol] = 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, [impureza A] = 0,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, [isômero I] = 0,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, [isômero II] = 0,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$; utilizando como fase móvel água e metanol (80:20v/v), com detecção em 319 nm. Dados referentes ao pico de secnidazol: número de pratos teóricos= 17947; fator de assimetria 0,99; fator de capacidade 32,34.

Validação do método

Seletividade

A especificidade foi avaliada através da preparação de amostra contaminada com alíquotas de solução padrão das impurezas de secnidazol. Após análise dos cromatogramas, constatou-se que não houve interferência na detecção dos analitos uma vez que não há sinal de pico no cromatograma do diluente no mesmo tempo de retenção correspondente aos analitos, e o pico obtido para o secnidazol apresentou pureza espectral, com valores de *Purity Angle* menores que os valores de *Purity Treshold*, fornecendo um gráfico de *Purity Plot* com curvas paralelas e sem pontos de intersecção.

O estudo cromatográfico das amostras obtidas sobre diferentes condições de estresse, sugerem o seguinte perfil de degradação.

Condição ácida. Não foi observado alteração significativa do teor do ativo na solução amostra aquecida a 40°C, em solução de HCl a 0,5 mol/L, por 10 dias. Também não foi detectado o surgimento de picos secundários, indicando estabilidade do composto nessas condições.

Condição básica. Foi observada mudança na coloração da solução de incolor para púrpura, alteração significativa do teor do ativo na solução amostra aquecida a 40°C, em solução de NaOH a 0,05 mol/L, por 2 horas, com decaimento de aproximadamente 7% em relação a amostra controle. Além disso, também foi observado o surgimento de um produto de

degradação majoritário com tempo de retenção de aproximadamente 4 minutos e com máximos de absorção em 215, 254 e 347 nm, indicando susceptibilidade do composto a degradação nessas condições (Figura 3a). A amostra degradada foi submetida a estudos de LC-MS, sobre as mesmas condições propostas para a análise LC-DAD, detectando um composto de relação massa/carga de 621 g/mol (Figura 4). Isto indica que sobre estas condições pode haver reações secundárias, gerando alteração do grupo cromóforo. Contudo, outros testes são necessários para o completo entendimento deste mecanismo de degradação.

Condição oxidativa por peróxido de hidrogênio. Não foi observado alteração significativa do teor do ativo na solução amostra exposta a solução de H₂O₂ a 0,5 %, por 10 dias, com queda menor que 3% em relação a amostra controle. Foram detectados picos secundários entre 9 e 12 minutos, indicando pouca susceptibilidade do composto a degradação nessas condições (Figura 3b).

Condição oxidativa por íons metálicos. Não foi observado alteração significativa do teor do ativo na solução amostra exposta a solução de FeCl₃ a 1 mmol/L, por 24 horas. Também não foi detectado o surgimento de picos secundários, indicando estabilidade do composto nessas condições.

Condição fotolítica, térmica e climática. Não foi observado alteração significativa do teor do ativo na solução amostra preparada a partir do insumo exposto a aquecimento a 60°C por 10 dias, ou exposição a 2,4 milhões lux.h⁻¹, ou a 40°C e 75% UR por 10 dias. Também não foi detectado o surgimento de picos secundários, indicando estabilidade do composto nessas condições.

Na Tabela 2 são sumarizados os resultados obtidos durante a exposição das amostras às diferentes condições de degradação descritas anteriormente.

Tabela 2. Percentual de degradação observado durante o estudo de degradação forçada

Condição	% A	% I	% II	% PD	% Recuperado	Balanço de massa
Controle 1	-	-	0,08	-	95,29	-
Ácida	-	-	0,06	-	93,46	97,99
Básica	-	-	0,05	1,09	87,88	92,15
Oxidativa	-	-	0,07	0,46	93,32	97,85
Íons Metálicos	-	-	0,08	-	94,49	99,16
Controle 2	-	-	0,08	-	97,13	-
Térmica	-	-	0,08	-	98,26	101,08

Climática	-	-	0,08	-	96,95	99,73
Fotolítica	-	-	0,07	-	96,68	99,45

A = Impureza A, I = Isômero I, II = Isômero II, PD = Produto de degradação.

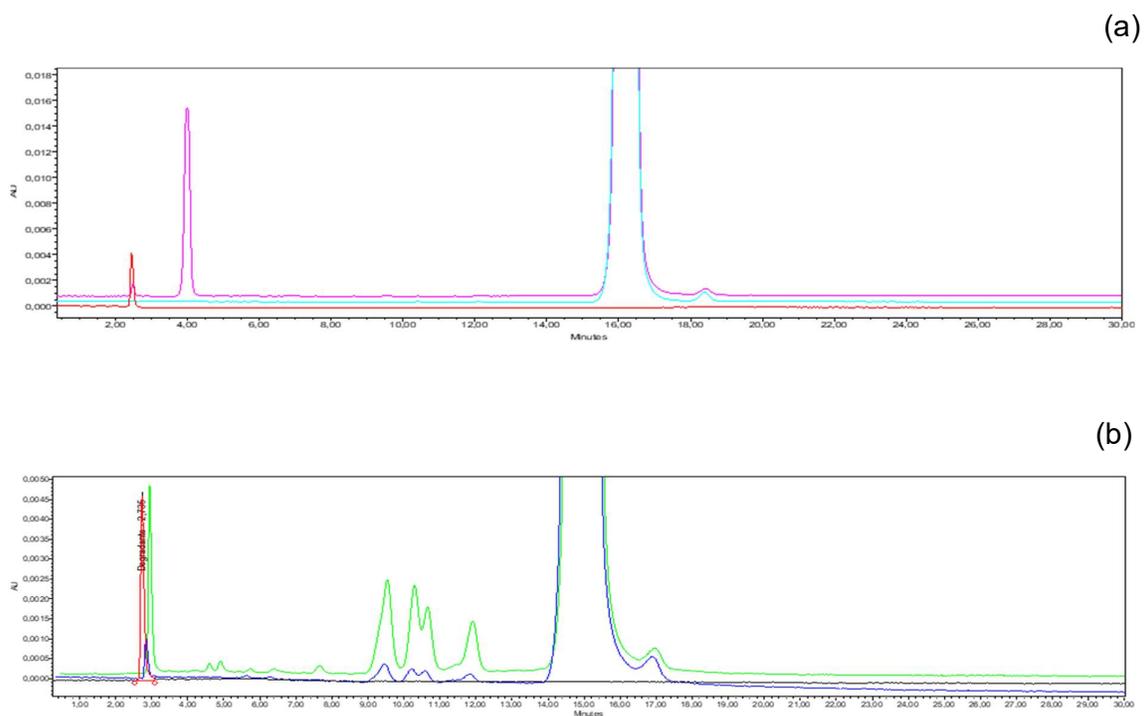


Figura 3. Perfis cromatográficos de secnidazol obtidos durante o estudo de degradação forçada. Sobreposição e ampliação dos cromatogramas da solução e amostra degradada. Condição básica (a), condição oxidativa por peróxido de hidrogênio (b).

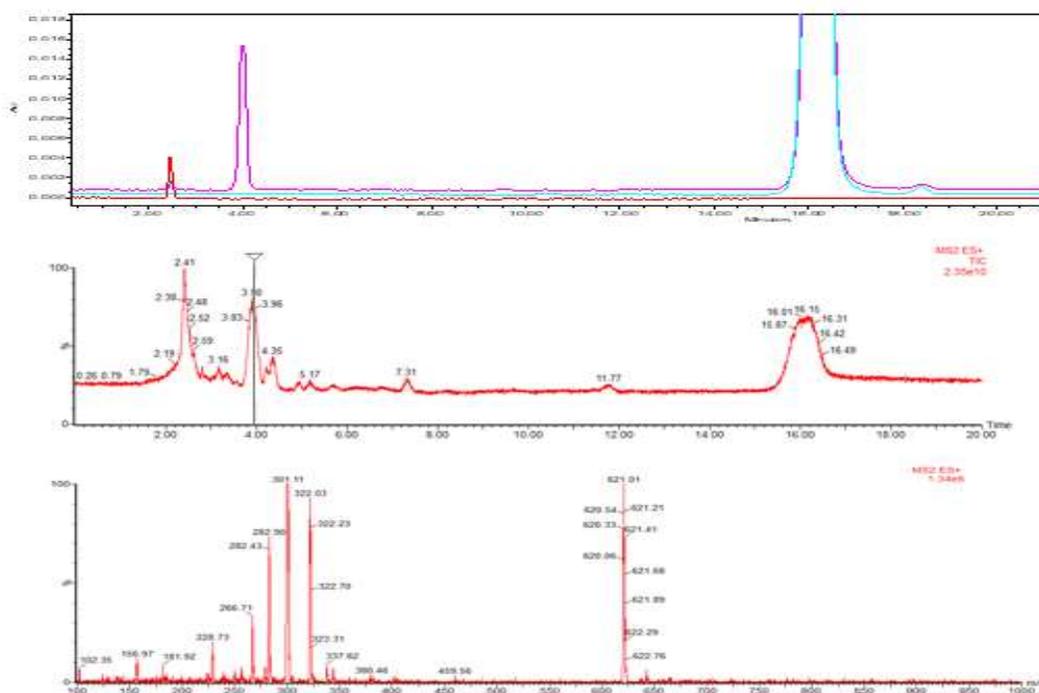


Figura 4. Cromatograma de secnidazol de gradação bsica. O canal superior representa a deteção por DAD, o canal intermediário representa a deteção por MS/API-ES⁺ modo scan, e o canal inferior representa o espectro de massas referente ao sinal em 3,99 minutos (produto de de gradação majoritrio)

Linearidade

Após avaliao estatstica das curvas de linearidade nos intervalos de concentrao estabelecidos para a quantificao do ativo e de seus compostos relacionados, observou-se que para todos os intervalos avaliados, no teste do coeficiente angular, o P-valor do teste F da ANOVA foi menor que 0,05, sendo portanto rejeitada a hip3tese nula (coeficiente angular zero) ao nvel de significncia de 5%. No teste do intercepto (Coeficiente Linear) o P-valor do teste t foi maior que 0,05, no sendo, portanto, rejeitada a hip3tese nula (intercepto igual a zero) ao nvel de significncia de 5%. Na avaliao do coeficiente de correlao de Pearson (*r*) os valores obtidos foram maiores que 0,990, existindo uma relao linear adequada. A avaliao do diagnstico dos resduos do modelo mostrou P-valores de *Anderson-Darling* maiores que 0,05, no sendo rejeitada a hip3tese de normalidade dos resduos ao nvel de significncia de 5%. Para o teste de independncia (Teste de Durbin-Watson) foram obtidos P-valores maiores que 0,05, logo a hip3tese de independncia das observaes ao nvel de significncia de 5% no foi rejeitada. Na avaliao da homocedasticidade (Teste de *Breusch Pagan*) obtiveram-se

P-valores maiores que 0,05, não sendo rejeitada a hipótese de igualdade das variâncias ao nível de significância de 5%, tendo, portanto, modelos homocedásticos. Além disto, não foram detectados pontos extremos nem pontos de alavanca, tampouco dependência entre as observações. A Tabela 3 resume os testes estatísticos realizados e os *P*-valores obtidos.

Tabela 3. Resultados obtidos na linearidade de secnidazol e substâncias relacionadas

Teste	<i>P-Valor</i>				
	Secnidazol	Secnidazol*	<i>A</i>	<i>I</i>	<i>II</i>
Coefficiente angular	0,000	0,000	0,0000	0,0000	0,0000
Coefficiente Linear	0,0973	0,1181	0,3079	0,5628	0,9248
Diagnóstico dos resíduos do modelo	0,9191	0,1199	0,0793	0,5112	0,1529
Independência (<i>Durbin-Watson</i>)	0,0542	0,1161	0,7505	0,8883	0,3293
Avaliação da homocedasticidade (<i>Breusch Pagan</i>)	0,9376	0,1432	0,1365	0,4053	0,9355

*Referente a análise de impurezas inespecíficas; *A* = Impureza A, *I* = Isômero I, *II* = Isômero II.

As curvas analíticas, obtidas por meio do método dos mínimos quadrados, apresentaram equações e coeficientes de correlação conforme expostos na Tabela 4.

Tabela 4. Resultados obtidos na linearidade de secnidazol e substâncias relacionadas

Composto	Intervalo $\mu\text{g.mL}^{-1}$	<i>Y</i>	<i>R</i>	<i>R</i> ²
Secnidazol	400 - 600	$-398452,7196 + 27603,536x$	0,9982	0,9963
Secnidazol	0,25 - 1,2	$-536,7998 + 26970,8158x$	0,9980	0,9960
Impureza A	0,25 - 1,8	$185,7201 + 27384,2306x$	0,9995	0,9989
Isômero I	0,25 - 1,8	$128,5225 + 22387,4882x$	0,9988	0,9976
isômero II	0,25 - 1,8	$-31,6695 + 20679,2401x$	0,9967	0,9935

A partir das curvas analíticas foram calculados os fatores respostas relativos das impurezas específicas de secnidazol, os valores obtidos estão dispostos na Tabela 5.

Tabela 5. Resultados obtidos na linearidade de secnidazol e substâncias relacionadas

Composto	Fator resposta (FR)
----------	---------------------

Secnidazol	1,0
Impureza A	1,03
Isômero I	0,83
isômero II	0,82

Precisão

Em seguida, foram avaliadas a repetibilidade e a precisão intermediária por meio de análises cromatográficas de soluções contendo secnidazol na concentração nominal de quantificação, e de soluções contaminadas com as impurezas específicas em três níveis de concentração diferentes. Os ensaios ocorreram em dois dias diferentes e com analistas diferentes. Os resultados obtidos para a repetibilidade e precisão intermediária, apresentados nas Tabelas 6, demonstram que o método proposto apresenta boa precisão com valores de desvio padrão relativo (DPR) de acordo com os critérios de aceitação estabelecidos pela AOAC¹³

Tabela 6. Resultados de repetibilidade e de precisão intermediária para a quantificação de secnidazol e compostos relacionados

Composto	Concentração ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Repetibilidade		Precisão Intermediária		DPR%
		Média%	DPR%	Média%	DPR%	
Secnidazol	500	94,41	0,61	94,32	0,37	0,48
	0,25	91,64	1,49	94,90	1,68	2,38
Secnidazol	0,50	91,47	0,84	94,66	1,44	2,15
	0,60	91,75	1,12	93,56	0,21	1,29
Impureza A	0,25	105,72	0,75	104,61	0,16	0,76
	0,75	98,65	0,46	101,84	2,55	2,41
	0,90	98,75	3,52	101,21	2,49	3,03
Isômero I	0,25	99,89	2,76	100,39	4,97	3,61
	0,75	98,76	2,16	102,40	3,75	3,40
	0,90	100,92	3,31	101,68	2,72	2,74
Isômero II	0,25	95,51	3,37	98,47	4,63	4,01
	0,75	104,16	0,93	102,88	3,33	2,28
	0,90	103,99	0,73	102,59	2,18	1,63

Exatidão

Com a confirmação da precisão do método proposto foram realizados ensaios para a determinação da exatidão. Os resultados do ensaio de recuperação das amostras analisadas nos três diferentes níveis de concentração estão apresentados na Tabela 7. Os resultados de exatidão para substâncias relacionadas estão descritos na Tabela 6, uma vez que o parâmetro foi avaliado juntamente com a repetibilidade. Todos os resultados estão de acordo com os critérios de aceitação estabelecidos pela *Association of Official Agricultural Chemist (AOAC)*¹³.

Tabela 7. Resultados de exatidão para a quantificação de secnidazol e compostos relacionados

Composto	Concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Média (%)	DPR (%)
Secnidazol	400	98,84	0,92
	500	99,65	0,77
	600	100,95	0,85

Limites de quantificação

O limite de quantificação é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas. O limite de quantificação deve ser coerente com o limite de especificação da impureza, devendo ser menor ou igual ao limite de notificação.⁸ A Tabela 8 traz os resultados da relação sinal/ruído obtidos para a concentração de $0,25 \mu\text{g.mL}^{-1}$, demonstrando, juntamente com os demais resultados, que o valor ao nível de 0,05% da concentração nominal do ativo está de acordo com o regulamentado.⁸

Tabela 8. Valores de relação sinal/ruído para compostos relacionados de secnidazol

Nível	Analito	Sinal/Ruído
0,05%	Secnidazol	19,77
	Impureza A	27,46
	Isômero I	14,97
	Isômero II	24,29

Robustez

A robustez foi verificada através de pequenas variações dos parâmetros analíticos do método, tais como coluna cromatográfica, composição da fase móvel, fluxo, temperatura da coluna,

membrana filtrante e tempo de ultrassom. Em todas as variações os resultados obtidos cumpriram com os critérios definidos para a exatidão, tanto para a quantificação do ativo quanto para a quantificação de compostos relacionados. O gráfico abaixo apresenta os resultados obtidos para a quantificação do ativo relacionados às variações realizadas.

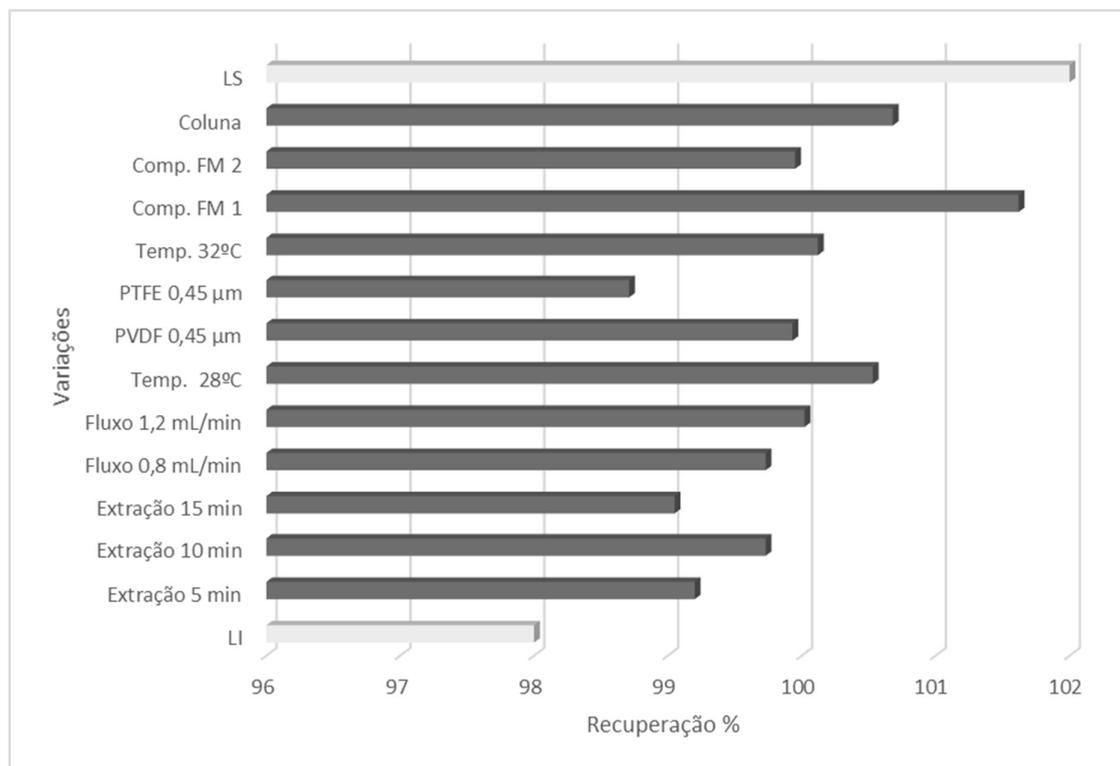


Gráfico 1. Resultados obtidos durante a análise cromatográfica de doseamento após a variação deliberada de alguns parâmetros para a avaliação da robustez. LS e LI são os limites superior e inferior, respectivamente, definidos conforme critérios utilizados na exatidão

Em todas as variações obteve-se uma resolução maior que 2,0% entre os analitos de interesse, e o pico de secnidazol mostrou-se puro segundo os mesmos critérios utilizados para a avaliação da seletividade. O método proposto foi robusto em todos os parâmetros avaliados demonstrando que o método é uma excelente alternativa na quantificação de secnidazol e impurezas geradas durante sua síntese, armazenamento ou transporte.

Análise de amostras comerciais

O método analítico proposto foi aplicado à a matéria-prima de dois fabricantes comercializados no mercado nacional. As médias dos teores obtidos para a quantificação de secnidazol e

compostos relacionados estão dentro dos limites de especificado nos certificados de análise dos fabricantes *Aarti Drugs Limited* e *Zhejiang Supor Pharmaceuticals Co, Ltd.* Entretanto, para o fabricante *Zhejiang Supor Pharmaceuticals Co, Ltd.*, a impureza identificada e quantificadas na amostra como isômero II de secnidazol, encontra-se acima dos limites recomendados pelo ICH.¹⁴ A Tabela 9 expõe a média dos resultados obtidos durante a análise das amostras comerciais no método proposto.

Tabela 2. Resultados das análises de amostras comerciais no método proposto

Lote/Fabricante	% Teor	% A	% I	% II	% Inesp.
750280/ <i>Zhejiang</i>	96,21	ND	ND	0,08	ND
858847/ <i>Aarti</i>	94,52	0,03	ND	ND	ND

A = Impureza A, I = Isômero I, II = Isômero II, *Inesp.* = Impureza inespecífica., ND = Não detectado

CONCLUSÃO

O método proposto mostrou-se eficiente e confiável, apresentando linearidade nas faixas de 400 a 600 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, para o doseamento de secnidazol, e 0,025 a 0,90 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, para a quantificação de impurezas, repetibilidade, exatidão e robustez permitindo o uso em análises rotineiras para o controle de qualidade de matérias-primas comercializadas no mercado nacional.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES). Ao apoio técnico oferecido por F. C. R. dos Santos, M. Percio e M. Donizetti. Ao Grupo Interdisciplinar de Pesquisa em Fotoquímica e Eletroquímica Ambiental – GIPeFEA. Ao Programa de pós-graduação em Química da Universidade Estadual do Oeste do Paraná – Unioeste/Toledo.

REFERÊNCIAS

1. Abd El Aziz et al. *BMC Women's Health*, **2019**, *19*, 121.
2. Flick, A. C., et al. *J. Med. Chem.*, **2019**, *62*, 7340.

3. Peng, P., et al. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, **2019**, *99*, 1495.
4. Pinto, M. F. *Dissertação de Mestrado*. Universidade Federal de Pernambuco, Brasil, 2010.
5. M. Mushtaque et al., *Journal of Molecular Structure*, **2019**, *1185*, 440.
6. Bakshi, M., Singh, S. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **2002**, *28*, 1011.
7. Bakshi, M., Singh, S. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. **2004**, *36*, 769.
8. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 166 de 2017.
9. ICH. Guidance for Industry. Q2B Validation of Analytical Procedures, 1996.
10. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 53 de 2015.
11. <http://www.portalaaction.com.br/manual-validacao-analitica>. Acessado em Agosto 2020.
12. USP, Metronidazole, USP 43 – NF 39, 4568.
13. AOAC, Official Methods of Analysis, Appendix F: Guidelines for Standard Method Performance Requirements. 2016.
14. ICH, Harmonized Tripartite Guideline, Impurities in new drug substances – Q3A.

5 REFERÊNCIAS

- [1] BRASIL, Presidência da República, Casa Civil, *Lei Nº 5.991, DE 17 de dezembro de 1973.*, Brasília, Distrito Federal, 1973.
- [2] BRASIL, MS, ANVISA, *Resolução da Diretoria Colegiada nº 57, de 17 de novembro de 2009: Dispõe sobre o registro de insumos farmacêuticos ativos (IFA) e dá outras providências*, Brasília, Distrito Federal, 2009.
- [3] BRASIL, ANVISA, *Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 69, de 8 de dezembro de 2014*, Brasília, Distrito Federal, 2014.
- [4] BRASIL, MS, ANVISA, Brasília, Distrito Federal, 2019.
- [5] BRASIL, Presidência da República, Casa Civil, *Lei nº 6.360, DE 23 DE SETEMBRO DE 1976*, Brasília, Distrito Federal, 1976.
- [6] BRASIL, Presidência da República, Casa Civil, *LEI Nº 9.782, DE 26 DE JANEIRO DE 1999*, Brasília, Distrito Federal, 1999.
- [7] BRASIL, MS, ANVISA, *RESOLUÇÃO Nº 391, DE 9 DE AGOSTO DE 1999*, Brasília, Distrito Federal, 1999.
- [8] M. d. s. A. N. d. V. S. BRASIL, *RESOLUÇÃO - RDC Nº 250, DE 13 DE SETEMBRO DE 2005*, Brasília, Distrito Federal, 2005.
- [9] BRASIL, MS, ANVISA, *RESOLUÇÃO DE DIRETORIA COLEGIADA – RDC Nº 249, DE 13 DE SETEMBRO DE 2005*, Brasília, Distrito Federal, 2005.
- [10] BRASIL, MS, ANVISA, *RESOLUÇÃO Nº 30, DE 15 DE MAIO DE 2008*, Brasília, Distrito Federal, 2008.
- [11] BRASIL, ANVISA, *RELATÓRIO INSPEÇÃO INTERNACIONAL DE FABRICANTES DE INSUMOS FARMACÊUTICOS ATIVOS*, Brasília, Distrito Federal, 2012.
- [12] BRASIL, ANVISA, *Instrução Normativa Nº 15, de 17 de Novembro de 2009*, Brasília, Distrito Federal, 2009.
- [13] BRASIL, ANVISA, *Resolução da Diretoria Colegiada, RDC Nº 29, de 10 de agosto de 2010*, Brasília, Distrito Federal, 2010.
- [14] BRASIL, ANVISA, *Resolução da diretoria colegiada, RDC Nº 362, de 27 de março de 2020*, Brasília, Distrito Federal, 2020.
- [15] BRASIL, MS, ANVISA, *Resolução da diretoria colegiada, RDC Nº 45, de 9 de agosto de 2012*, Brasília, Distrito Federal, 2012.
- [16] BRASIL, ANVISA, *Resolução da Diretoria Colegiada, RDC Nº 318 de 06 de novembro de 2019*, Brasília, Distrito Federal, 2019.
- [17] BRASIL, ANVISA, *Convergência Regulatória*.

- [18] BRASIL, ANVISA, *Anvisa é novo membro do ICH*, 2016.
- [19] BRASIL, ANVISA, *Diálogos regulatórios internacionais*, 2018.
- [20] EMIS, *Brazil Pharma and Healthcare Sector Report 2017/2021*, EMIS A Euromoney Institutional Investor company, 2017, p. 107.
- [21] Guia da Farmácia, *A indústria farmacêutica em foco*, 2018.
- [22] F. E. C. Dias, C. P. M. Ambrosino, N. R. d. Oliveira e J. L. d. Magalhães, "A DEPENDÊNCIA DE INSUMOS FARMACÊUTICOS IMPORTADOS NO BRASIL: UM ESTUDO DE CASO DO MEDICAMENTO ANTIRRETROVIRAL NEVIRAPINA NO LABORATÓRIO FARMACÊUTICO OFICIAL FARMANGUINHOS," *Revista de Gestão em Sistemas de Saúde, RGSS*, vol. 5, nº 2, pp. 125 - 133, 13 jul 2016.
- [23] F. d. O. Bidoia, *Recolhimento de lotes de medicamentos para hipertensão arterial - Presença de impurezas genotóxicas*, Farmacêuticas, 2019.
- [24] BRASIL, ANVISA, *RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA - RDC Nº 283, DE 17 DE MAIO DE 2019*, Brasília, Distrito Federal, 2019.
- [25] ICH, *ICH Harmonised Tripartite Guideline nº Q3A(2): IMPURITIES IN NEW DRUG SUBSTANCES.*, ICH, 2006, pp. 1 - 15.
- [26] World Health Organization, WHO, *Guidance on Amendments to an APIMF*, 2016.
- [27] Food and Drug Administration, FDA, *Guidance for Industry*, 2009.
- [28] Health Canada, *GUIDANCE DOCUMENT*, 2018.
- [29] BRASIL, ANVISA, *Resolução da diretoria colegiada, RDC Nº 53, de 4 de dezembro de 2015*, Brasília, Distrito Federal, 2015.
- [30] BRASIL, ANVISA, *Perguntas e Respostas RDC 53/2015 e Guia 04/2015*, Brasília, Distrito Federal, 2016.
- [31] BRASIL, MS, ANVISA, *Guia nº 4, de 08 de dezembro de 2015: Guia para obtenção do perfil de degradação, e identificação e qualificação de produtos de degradação em medicamentos*, Brasília, 2015.
- [32] ICH, *ICH Harmonised Tripartite Guideline nº Q3B (R2): IMPURITIES IN NEW DRUG PRODUCTS*, ICH, 2006, pp. 1 - 16.
- [33] F. Leite, "Impurezas de Degradação," *Scientia Chromatographica*, vol. 1, nº 2, pp. 63 - 73, jun 2009.
- [34] A. P. F. D. L. MATTOS, *PROPOSTA DE ESTUDO DE DEGRADAÇÃO FORÇADA E DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO INDICATIVO DE ESTABILIDADE PARA O INSUMO FARMACÊUTICO ATIVO PRAZICUANTEL E PRODUTO ACABADO*, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2017, p. 49.
- [35] BRASIL, ANVISA, *Perguntas & Respostas*, Brasília, Distrito Federal, 2017.

- [36] G. N. d. COSTA, G. M. VIANA, U. F. LIMA e L. M. CABRAL, "Diretrizes para elaboração de um protocolo e relatório de estudo de degradação forçada de medicamentos de acordo com a RDC 53/2015," *Infarma: Ciências Farmacêuticas*, pp. 194 - 202, 21 set 2018.
- [37] P. Peng, L. Liao, Z. Yu, M. Jiang, J. Deng e X. Xiao, "A novel sensor based on multi-walled carbon nanotubes and boron-doped double-layer molecularly imprinted membrane for the analysis of SCZ in pharmaceutical and biological samples," *INTERNATIONAL JOURNAL OF ENVIRONMENTAL ANALYTICAL CHEMISTRY*, pp. 1 - 20, 5 mai 2019.
- [38] A. C. Flick, C. A. Leverett, H. X. Ding, E. McInturff, S. J. Fink, C. J. Helal e C. J. O'Donnel, "Synthetic Approaches to the New Drugs Approved During 2017," *Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 62, p. 7340-738, 2 abr 2019.
- [39] M. A. Abd El Aziz, F. Sharifipour, P. Abed, S. Jahanfar e H. M. Judge, "Secnidazole for treatment of bacterial vaginosis: a systematic review," *BMC Women's Health*, vol. 19, nº 121, pp. 1 - 12, 2019.
- [40] S. M. Elghazaly, K. M. Hamam, M. M. Badawy, N. A. Y. Agha, A. Samy e A. M. Abbas, "Efficacy and safety of single dose of oral secnidazole 2 g in treatment of bacterial vaginosis: A systematic review and meta-analysis," *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, vol. 238, pp. 125-131, 14 mai 2019.
- [41] C. W. Ang, A. M. Jarrad, M. A. Cooper e M. A. T. Blaskovich, "Nitroimidazoles: Molecular Fireworks That Combat a Broad Spectrum of Infectious Diseases," *Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 60, nº 18, pp. 7636 - 7657, 2 mai 2017.
- [42] SOCIÉTÉ DES USINES CHIMIQUES RHÔNE-POULENC, "Nouveaux dérivés de l'imidazole et leur préparation". France Patente 1.427.627, 3 jan 1966.
- [43] SOCIÉTÉ DES USINES CHIMIQUES RHONE-POULENC, "Procédé de préparation de dérivés du nitro-5 imidazole". France Patente 70.05443, 16 fev 1970.
- [44] P. Yan, W. Wei, T. Weifeng, L. Jianguo e F. Youbin, "Method for preparing secnidazole". China Patente CN1850806A, 22 mai 2006.
- [45] A. V. Reidy, T. M. Sonnell e S. A. Despender, "Improved method of preparing secnidazole". China Patente CN1442410A, 05 Mar. 2002.
- [46] M. W. MILLER, H. . L. HOWES, R. V. KASUBICK e A. R. ENGLISH, "Alkylation of 2-Methyl-5-nitroimidazole. Some Potent Antiprotozoal Agents.," *Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 13, nº 5, pp. 849 - 852, 26 Jan 1970.
- [47] . M. V. LYAPUNOVA e V. S. MALKOV, "Experimental Comparison of 2-methylimidazole Nitration by Nitric Acid and Nitrate Salts of Alkali Metals," *Advanced Materials Research*, vol. 1085, pp. 143-147, 10 Fev 2015.
- [48] A. Zimójdzin, K. Urbaiski, E. Utecht e W. Stelmachowski, "PROCESS FOR THE SAFE NITRATION OF 2-METHYLMIDAZOLE". Poland Patente 4,209,631, 24 Jun 1980.

- [49] H. BAER, M. BERGAMO, A. FORLIN, L. H. POTTENGER e J. LINDNER, "Propylene Oxide," *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, pp. 1 - 29, 15 Out 2012.
- [50] T. A. Nijhuis, M. Makkee, J. A. Moulijn e B. M. Weckhuysen, "The Production of Propene Oxide: Catalytic Processes and Recent Developments," *Industrial & Engineering Chemistry Research*, vol. 45, pp. 3447-3459, 04 Abr 2006.
- [51] J. McMurry, "Éter e epóxidos; Tióis e Sulfetos," em *Química Orgânica*, 7 ed., vol. 2, Cengage Learning, 2016, pp. 616 - 654.
- [52] R. E. PARKER e N. S. ISAACS, "MECHANISMS OF EPOXIDE REACTIONS," *Chemical Reviews*, vol. 59, nº 4, p. 737-799, 01 Ago 1959.
- [53] J.-I. Zhang, Y.-z. Yuan, w. Qian e M. Zhang, "Determination of secnidazole and its related substances by HPLC," *Journal Of China Pharmaceutical University*, vol. 6, nº 40, pp. 527-530, jan 2009.
- [54] R. YANAMANDRA, A. CHAUDHARY, S. R. BANDARU, B. PATRO, Y. L. MURTHY, P. A. RAMAIAH e C. S. P. SASTRY, "UPLC Method for Simultaneous Separation and Estimation of Secnidazole, Fluconazole and Azithromycin in Pharmaceutical Dosage Forms," *E-Journal of Chemistry*, vol. 7, nº S1, pp. S363-S371, 18 Apr 2010.
- [55] P. P. Suryawanshi, P. A. Khan, M. Abhyankar, S. S. Sonawane e P. Gide, "A Validated Stability – Indicating Liquid Chromatographic Method," *Journal of Innovations in Pharmaceuticals and Biological Sciences*, vol. 2, nº 1, pp. 45-52, 2015.
- [56] O. V. Shovkova, L. Y. Klimenko, Z. V. Shovkova e M. O. Savchenko, "Development and validation of GLC/FID- and GLC/MSprocedures of secnidazole determination by the methods of additions," *Žurnal organičnoi ta farmacevtičnoi himii.*, vol. 16, nº 4 (64), pp. 40-47, 2018.
- [57] R. V. Rele, "UV Spectrophotometric Estimation of Secnidazole by zero order and area under curve methods in Bulk and Pharmaceutical Dosage Form," *Research J. Pharm. and Tech.*, vol. 12, nº 4, pp. 1753-1756., 10 Fev 2019.
- [58] Y. Nikodimos, B. Hagos, D. Dereje e M. Hussien, "Voltammetric study of secnidazole and its determination in pharmaceutical tablet using 1, 4-benzoquinone modified carbon paste electrode," *Chemistry International*, vol. 4, nº 1, pp. 43-51, Jan 2018.
- [59] A. A. Moustafa e L. I. Bibawy, "Stability-Indicating Assay of Secnidazole in the Presence of Its Degradation Products," *Spectroscopy Letters*, vol. 32, nº 6, pp. 1073 - 1098, nov 1999.
- [60] M. R. MARCÍLIO, A. L. RAISER, P. L. FUMAGALLI, R. BONFILIO, C. R. ANDRIGHETTI, E. B. RIBEIRO e D. M. d. S. VALLADÃO, "Determination and validation of secnidazole in tablets by UV spectrophotometric," *Bioscience Journal*, pp. 1351-1361, 2017.
- [61] M. R. Siddiqui, Z. A. AlOthman e N. Rahman, "Analytical techniques in pharmaceutical analysis: A review," *Arabian Journal of Chemistry*, vol. 10, nº 1, pp. S1409-S1421, Fev 2017.
- [62] M. Bakshi e S. Singh, "ICH guidance in practice: establishment of inherent stability of secnidazole and development of a validated stability-indicating high-performance liquid chromatographic

assay method.," *Journal Of Pharmaceutical And Biomedcal Analysis*, vol. 36, n° 4, pp. 769 - 775, nov 2004.

- [63] T. Sharmin, M. Akter e S. M. Hossain, "Analytical method development and validation of Secnidazole in the tablet dosage form by RP-HPLC method," *International Current Pharmaceutical Journa*, vol. 5, n° 4, pp. 41-44, Mar 2016.
- [64] D. A. Nagare, V. P. Patel, S. Gosavi e T. N. Deore, "DEVLOPEMENT AND VALIDATION OF STABILITY INDICATING RP-HPLC METHOD FOR SECNIDAZOLE GRANULES," *WORLD JOURNAL OF PHARMACY AND PHARMACEUTICAL SCIENCES*, vol. 4, n° 9, pp. 1041-1063, 20 Aug 2018.
- [65] J. G. d. S. Lima, A. C. Kogawa e H. R. N. Salgado, "GREEN ANALYTICAL METHOD FOR QUANTIFICATION OF SECNIDAZOLE IN TABLETS BY HPLC-UV," *Drug Analytical Research*, vol. 2, pp. 20 - 26, mar 2018.
- [66] R. V. Rele e S. P. Patil, "Development of Analytical method by RP-HPLC Technique for determination of Secnidazole in API and Pharmaceutical Dosage Form," *Research J. Pharm. and Tech.*, vol. 12, n° 10, pp. 4799-4802, 2019.
- [67] J. Du, P. Deng, X. Chen, H. Wang, T. You e D. Zhong, "Enantioselective HPLC determination and pharmacokinetic study of secnidazole enantiomers in rats," *Journal of Chromatography B*, vol. 965, p. 224–230, 29 jun 2014.