

# Impurezas de Degradação



## Flávio Leite

Diretor da T&E Analítica  
Campinas (SP)  
Brasil  
flavio@teanalitica.com.br

## Resumo

Os profissionais da química analítica têm colocado como desafio o isolamento dos compostos presentes em outros compostos. Considerando que os compostos em pesquisa podem ser subprodutos ou, ainda, impurezas que podem possuir complexidade de cadeia carbônica e grupos funcionais, a exigência para as técnicas identificativas e separativas é cada vez maior.

Todo produto quando é sintetizado ou extraído possui um equilíbrio reacional que mantém estruturas estáveis àquela condição de temperatura, pressão, umidade, salinidade, pH, viscosidade, solubilidade, velocidade, etc. A partir do momento em que este equilíbrio é interrompido, por exemplo, oxidações ou perda de água podem levar a reações secundárias que modifiquem o meio e, por consequência, novas estruturas podem se tornar presentes no agora denominado produto final. Resíduos de reagentes da rota química, resíduos de solventes utilizados na fabricação e produtos de reações secundárias diversas passam a compor as denominadas IMPUREZAS do produto ou ativo principal, ou simplesmente IMPUREZAS DE DEGRADAÇÃO.

### Palavras-chave

Impurezas, impurezas de degradação, isolamento de compostos.

## Abstract

Nowadays analytical chemistry scientists must face the challenge of isolating compounds that are present in minor quantities in other compounds. Considering that the target substances can be reaction byproducts, impurities or degradation compounds which can present complex carbonic chains and functional groups, sophisticated identification and separation techniques are required.

Every synthesized or extracted product presents an equilibrium of chemical reactions that keep molecular structures stable to certain conditions like temperature, pressure, humidity, salinity, pH, viscosity, solubility, speed, etc. When this equilibrium is disrupted by physical or chemical agents like light, heat, oxidation, dehydration, secondary reactions may take place and, as a consequence, new structures can appear in the final product. These structures, along with reagent residues from the chemical route of production and residues of solvents, compose the IMPURITIES of the active ingredient or DEGRADATION IMPURITIES.

### Keywords

Impurity, degradation impurity, composed isolation.

## 1. Classificação das Impurezas

As impurezas podem ser classificadas ou subdivididas, em função de suas origens, como:

- a) Impurezas provenientes da rota química da síntese de fabricação
- b) Impurezas residuais de solventes ou os denominados IOV (impurezas orgânicas voláteis)
- c) Impurezas de Degradação Intrínsecas da reação do produto. Permanecem presentes mesmo depois dos processos de purificação.
- d) Impurezas de Degradação por Exposição:
  - Algumas dessas impurezas são formadas com o tempo de vida do produto, por meio de oxidação lenta com o ar atmosférico, micro reações de impurezas com o ativo principal, micro reações de impurezas com impurezas, absorção de água originando hidrólises, ambiente de armazenamento interferente ou fora de compatibilidade (como exemplo: próximo a produtos voláteis), luminosidade e temperatura de armazenamento.
  - Impurezas geradas em procedimentos de validação da metodologia analítica de teor, visando antecipar a formação de impurezas por meio da exposição do ativo ou da mistura contendo o ativo, em condições forçadas, denominadas de “stress” químico ou físico. É importante para o item seletividade, no qual a impureza formada não deve interferir na quantificação do ativo principal, ou ainda, no item toxicidade.

## 2. Impurezas de rota química

Analiticamente, podem se tornar conhecidas por meio das informações bibliográficas, ou publicações dos fabricantes, ou ainda, em artigos acadêmicos. Hoje, na competitividade de mercado, há interesse dos fabricantes em mostrar que o produto é isento de determinadas impurezas, principalmente tóxicas, ou que possam afetar a qualidade do produto final, quer como excipiente ou como produto principal. Do ponto de vista analítico, se a impureza é conhecida, provavelmente haverá uma metodologia com técnica que a determina.

## 3. Impurezas residuais voláteis

Impurezas voláteis e semivoláteis, normalmente são cromatografadas pela técnica Cromatografia em Fase Gasosa. Com o acoplamento desta cromatografia ao espectrômetro de massas, há uma enorme possibilidade de identificação, tendo em vista que o espectrômetro de massas, acoplado a cromatografia em fase gasosa, técnica separativa por excelência e o espectrômetro de massas deste acoplamento, possui estabilidade no feixe de elétrons que promove a quebra da molécula, gerando fragmentação constante para aquela molécula. Com essa constância na quebra de elétrons e ajuda da informática, consegue-se estabelecer biblioteca de moléculas padrões, permitindo comparar os fragmentos provenientes da composição da amostra com os fragmentos padrões, dando confiabilidades da ordem de 99% em identificação. Este acoplamento ainda permite a quantificação dos compostos, contra padrões referenciados ou pela integração em área porcentual.

## 4. Impurezas de degradação intrínsecas

Algumas impurezas de degradação são conhecidas e descritas em bibliografias. Na farmacêutica, são chamadas de Substâncias Relacionadas, pois são reconhecidamente interferentes da eficácia do produto quando introduzida no meio biológico. Do ponto de vista analítico, é de baixa complexidade, pois se é conhecida, provavelmente haverá situação analítica para sua identificação e quantificação.

## 5. Impurezas de degradação por exposição

Os espécies que compõem um produto quer seja um ativo de alta pureza (lembrar que não há comercialmente, substância de pureza 100%) ou uma mistura, podem com o tempo se interagirem formando novas substâncias. Se essas novas substâncias não forem identificadas após o processamento, são denominadas de impurezas de degradação.

Se as impurezas de degradação forem se apresentando (evoluindo) com o tempo de vida do produto, maior será a complexidade analítica para sua determinação. Devido a esta complexidade, introduzem-se os denominados estudos de Estabilidade. Nesses estudos, acompanha-se a evolução do produto por estimativa de tempo que concluirá como o Tempo ou Prazo de Validade deste produto. Na farmacêutica e

em alimentos, esse estudo pode levar de semanas a alguns anos, é a chamada estabilidade de longa duração. Esta estabilidade, do ponto de vista comercial, apesar de fundamental, resulta lançamento tardio do produto no mercado consumidor, além do patrocinador ter custo durante o período de tempo estabelecido para o estudo.

Para estimar o prazo de validade, utiliza-se da estabilidade condições de energia, acima das ambientais, denominado de Estabilidade Acelerada. Nesta estabilidade, alguns parâmetros de comparação, com a situação ambiente como exemplo, podem ser introduzidos: temperatura, umidade relativa, hidrólise, luminosidade, oxidação (esta oxidação pode utilizar da ação do oxigênio ou da oxidação química por meio de transferência de elétrons).

A estabilidade, propriamente dita, busca verificar a redução do ativo de interesse, na condição forçada, e extrapolar esta redução para um prazo de validade ao produto. Este prazo pode ser avaliado por equações da cinética química ou, se encontradas, publicações oficiais. No Brasil, pode-se citar a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) ou organismo internacionais, como o ICH (International Conference on Harmonisation) e FDA (Food and Drug Administration). A estabilidade forçada ou acelerada, como colocado anteriormente, também, busca resultados para o estudo da Seletividade na análise do ativo presente numa mistura (produto). Se uma mistura possui todos seus componentes conhecidos, pode-se estabelecer parâmetros de observação do “aparecimento” dessas impurezas, em comparação com um tempo zero (produto antes de receber o aumento de energias). Estas impurezas podem ser originárias da degradação de excipientes ou da degradação do próprio ativo ou, ainda, da junção de ambas. A complexidade está em identificar e quantificar esta nova substância, pois as conhecidas nas matérias-primas já foram realizadas em ensaios próprios (muitas com monografias existentes em compêndios da área, como o Índice Merck; Hand-Books; Farmacopeias; artigos científicos etc., porém, quando em mistura, constitui desafio aos analistas e aos conhecimentos em química qualitativa e quantitativa.

## 6. Análise das impurezas de degradação

Considerando um determinado método analítico, por cromatografia em fase líquida com detecção na luz ultravioleta, os compostos que produzirão sinal analítico (picos), são os que possuem absorção desta luz; por exemplo, compostos com insaturações na cadeia carbônica.

### 6.1. Situação 1: Método não Visualiza

Utilizando-se deste método sobre as amostras colocadas sob os efeitos de energia (stress), poderão resultar em impurezas que não sejam absorvidas pela luz ultravioleta. Desta forma, o sinal analítico não será percebido. A partir deste momento, se inicia a complexidade analítica, pois não basta trocar o sistema de detecção, ou melhor, para cada metodologia ou técnica ou, ainda, detecção de a direção analítica, se não se consegue “enxergar” o produto gerado pela energia.

### 6.2. Situação 2: Método Visualiza

Caso utilizando da metodologia, um ou mais sinais são observados, como saber a relevância do mesmo em quantidade ou toxicidade. Em termos de quantidade, existem os artifícios; no caso da análise instrumental, das integrações que resultam em um valor de área. A porcentagem da área da impureza em relação as demais áreas não deixa de ser uma medida quantitativa, porém, não real. Por quê? Porque a absorção de luz é diferente em intensidade para diferentes moléculas. Como fazer então? Se houver literatura e a substância for comercial, problema resolvido. Caso contrário, isolar e ter quantidade suficiente para propor uma identificação mais acreditável e utilizar do fator de resposta para melhor quantificação. É um trabalho de pesquisa.

## 7. Técnicas analíticas

*Técnicas Separativas:* As técnicas analíticas mais comuns e utilizadas para separar são as técnicas cromatográficas em suas várias modalidades, como: **CCD:** Cromatografia de Camada Delgada, ou cromatografia de capa fina ou **TLC** (Thin Layer Chromatography) ou, ainda, cromatografia de placa, tanto em papel, como em sílica ou outros suportes. **CC:** Cromatografia de Coluna, cuja eluição do solvente sobre a fase estacionária ocorre pela ação da gravidade. **HPLC** (High performance (pressure) liquid Chromatography) ou **CLAE:** Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. **CFG:** Cromatografia em Fase Gasosa.

As técnicas mencionadas como separativas, hoje instrumentalizadas, têm permitido obter, por métodos comparativos, a análise qualitativa, em concepção normal ou com acoplamentos com detectores específicos. Essas técnicas buscam o conhecimento da distribuição das espécies na amostra com a finalidade de seletividade e isolamento para a

identificação. Considerando a existência de uma substância de referência, ou simplesmente a razão de áreas de uma corrida analítica, obter a quantificação.

Outras técnicas podem vir a compor a pesquisa da identificação de uma molécula, após o processo de separação, técnicas como: **UV/VIS**: Espectrometria de absorção a luz ultravioleta e Visível. **MS**: Espectrometria de Massas. **IV**: Espectrometria Vibracional à luz Infravermelha. **RMN**: Ressonância Magnética Nuclear de Próton ou Carbono (mais comuns), entre outras.

## 8. Isolando uma impureza ou um ativo

Um exemplo que pode ser complexo e em produto natural: consideremos uma planta com relatos de que o “chá” de suas folhas é benéfico para algum sintoma do ser humano. A pesquisa para buscar espécies químicas presentes de origem orgânica e, posteriormente, correlacioná-las com o sintoma, normalmente, consiste, inicialmente, no conhecimento da planta, “habitat” e logicamente possuir uma amostra das referidas folhas. Uma das formas de trabalhá-las é secá-las ao sol de forma protegida para evitar interferências. A seguir, são obtidos extratos a partir de água e solventes orgânicos. Desta forma, as espécies são transferidas para os solventes de acordo com suas polaridades e

constantes dielétricas dos solventes, como pode ser observado no fluxograma abaixo, que exemplifica alguns solventes. O Etanol é o solvente de maior utilização no processo de extração, porém, outros solventes, como metanol, isopropanol, ciclohexano, diclorometano, acetato de etila, éter etílico, tolueno etc. também podem ser utilizados. A mistura de solventes com polaridades e constantes dielétricas distintas produz ações extrativas com forças intermediárias, podendo promover melhoria na extração de algumas espécies químicas.

Os extratos são submetidos à caracterização de duas formas: **Induzida**, quando a busca está direcionada para espécies químicas já conhecidas, cujos padrões (substância de referência) são disponíveis para a pesquisa. Esse tipo de pesquisa, de certa forma, é mais rápida, pois há direções analíticas já previstas em referências bibliográficas ou no grupo da pesquisa. A **Não Induzida**, ou quando há pouca informação disponível, inicia-se por pesquisa bibliográfica avançada, baseada nos relatos da ação sobre o organismo. Como exemplos, para efeito calmante, buscam-se substâncias com ação neurológica; para efeito de redução da pressão arterial, buscam-se substâncias com ação no sistema circulatório etc. Antes do início do estudo analítico, alguns pesquisadores procuram maior embasamento científico, trabalhando com a experimentação “in vivo” do denominado “chá”.

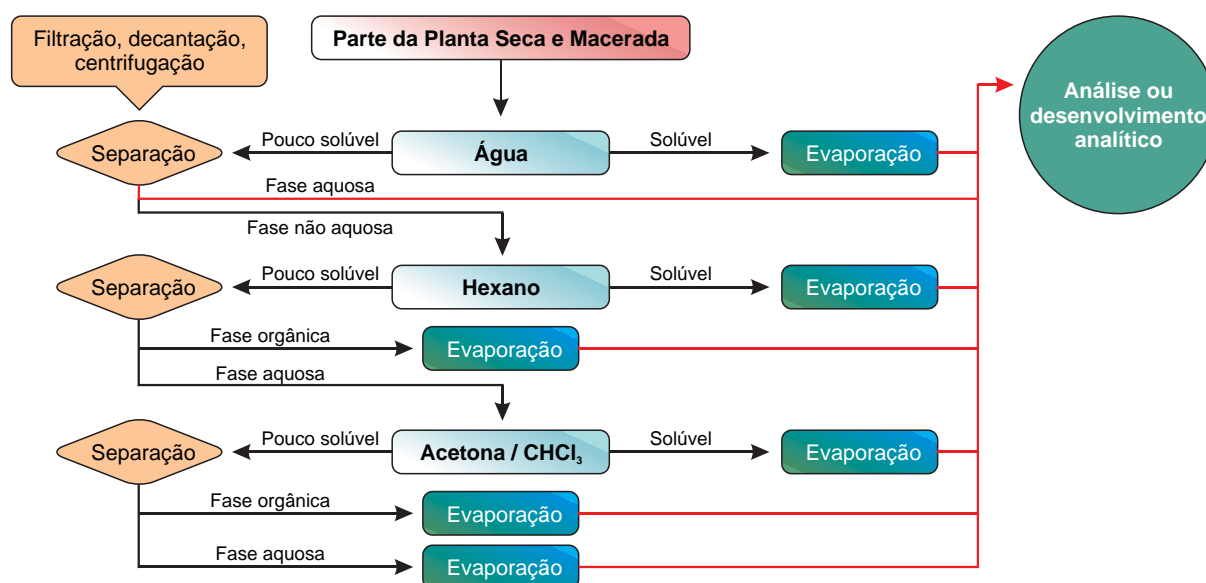


Figura 1. Exemplo ilustrativo de um processo de extração em fitoquímica.

Obtido o extrato, podem ser propostas as seguintes etapas, as quais, contudo, devem ser consideradas como gerais ou básicas:

- 1 Obtenção do Espectro de Absorção à luz nas regiões do ultravioleta e da luz visível (**UV/Vis**). Desta forma, pode-se verificar presença de espécies químicas insaturadas (presença de dupla ligação) e espécies químicas coloridas (apresentam grupos cromógenos fortes).
- 2 Obtenção de Espectro Vibracional à luz Infravermelho (**IV**). Desta forma, podem-se observar os grupos funcionais mais evidentes das espécies químicas (o grupo funcional classifica a molécula. Por exemplo: Álcoois possuem o grupo funcional OH; Aromáticos, o anel benzênico) presentes no extrato.
- 3 Baseando-se nos solventes de extração, inicia-se o estudo separativo por **CCD** ou **CC**, podendo-se prever a quantidade de espécies ou grupos de espécies presentes naquele extrato. Neste momento, pode-se isolar o grupo e iniciar pesquisa de caracterização avançada, dando início à chamada análise preparativa.
- 4 A **CFG**, normalmente acoplada ao **MS**, pode ser aplicada, analisando-se o composto tal qual (apenas filtrado) diretamente ou os vapores do seu espaço aéreo (técnica de “**Head Space**”). O acoplamento **CFG/MS** por impacto de elétrons permite comparação com bibliotecas de espectros, as quais apresentam, atualmente, cerca de 400000 espectros de substâncias catalogadas. As comparações são acompanhadas de probabilidade de acerto, na qual uma comparação com 95% de probabilidade é uma assertividade expressiva para a pesquisa.
- 5 A maioria das espécies químicas presentes nas plantas, excetuando-se a água e espécies minerais, são poucos voláteis, necessitando a intervenção da **HPLC**. Neste caso, inicia-se a opção pelo modo de eluição, ou seja, em fase reversa (fase estacionária de baixa polaridade e fase móvel polar) ou fase normal (fase estacionária polar e fase móvel apolar ou de baixa polaridade), além do sistema de detecção. Baseando-se na **CCD**, pode-se optar pelo sistema de detecção por absorção à luz Ultravioleta (**UV**) ou pelo Índice de Refração Diferencial (**IR**), como principais. Outros detectores são

disponíveis, como por exemplo o **PAD** (Photo Diode Array), que permite varredura de comprimentos de onda, facilitando a busca do melhor sinal analítico.

Atualmente, pelo acoplamento da **HPLC** com a **MS**, denominado **LC/MS** ou, ainda, o *tandem* **LC/MSMS**, obtém-se espectros ou fragmentogramas que permitem fazer propostas de caracterização ou comparar estes espectros com padrões de referência disponíveis.

- 6 Avançando ainda mais na caracterização, um cromatograma do extrato de um fitoterápico pode conter na condição analítica da pesquisa de 4 a 130 sinais analíticos, entre espécies, isômeros, contaminações etc. Uma forma trabalhosa de isolar esses sinais é utilizando-se da análise preparativa. Se a técnica a ser utilizada for a **HPLC**, denomina-se Cromatografia Líquida Preparativa. Nesta técnica, à medida que as espécies são separadas na coluna cromatográfica, o eluído é coletado em um recipiente, como um tubo de ensaio. Após várias coletas, no mesmo tempo do sinal analítico da espécie, procede-se a evaporação do solvente, obtendo-se o extrato seco ou ainda um extrato concentrado daquela fração. Esta fração é encaminhada para técnicas como **IV**, **MS** e **RMN**. O **IV**, como já mencionado, permite visualizar os grupos funcionais presentes; o **MS** permite uma proposta do peso molecular e os fragmentos gerados a partir da quebra da molécula. O **RMN** permite maior conhecimento da cadeia carbônica. Desta forma, pode-se aprimorar a proposta de caracterização da espécie química sobre esta amostra.
- 7 Informações sobre de composição térmica também ajudam na busca da estrutura de uma espécie ou até de uma formulação, como exemplo nas **AT** (análises térmicas) em suas principais variantes **ATG** (análise térmica gravimétrica) que por aquecimento controlado decompõe a espécie química ou a mistura; desta forma, pode-se quantificar perda de água, perda de dióxido de carbono etc. e a **ATD** (análise térmica diferencial) que permite determinar se houve perda ou ganho de energia, ou seja, reações endotérmicas e exotérmicas.



- 8 Obtida a proposta mais aceita sobre a identidade da espécie presente, podem ser tomados dois caminhos preferenciais: ensaio de pesquisa clínica em cobaias ou verificação se esta espécie está presente em outras plantas. Caso esta espécie seja majoritária ou única para esta planta, passa-se a denominá-la de substância marcadora ou simplesmente marcador.
- 9 Esta substância, agora considerada um marcador, recebe tratamento de purificação e pode ser comercialmente vendida como marcador. Como exemplo, a quercetina no Ginkgo Biloba se constitui em uma das espécies químicas que compõem o ginkgoflavonoides presentes nesta planta.

Atualmente, a análise de um produto fitoterápico em produto acabado pode ser feita com a comparação entre cromatogramas, espectros etc., caso os marcadores sejam inexistentes ou indisponíveis comercialmente. Neste caso, essa análise é denominada de “Perfil Cromatográfico”. Porém, quando os marcadores são disponíveis, as análises devem ser orientadas pelas monografias existentes em farmacopeias ou compêndios da área para uma melhor uniformidade de informações. Ainda hoje persiste a dificuldade para a validação das metodologias analíticas envolvendo um monofitoterápico, mesmo com a existência de marcadores. A mistura de dois ou mais fitoterápicos no produto final, mesmo conhecendo-se os marcadores, é considerada uma análise complexa e demorada do ponto de vista de desenvolvimento e validação.

## 9. Estabilidade do produto

Com as devidas proporções aos produtos fitoquímicos, ou fitoterápicos (quando utilizado para ação farmacológica), nos produtos sintéticos, como fármacos (remédios), alimentos, enfim, produtos de consumo, as mesmas direções poderão ser utilizadas. Porém, como criar energia para antecipar o estudo de estabilidade de longa duração. As fontes de alteração sobre a química de um produto, mais próximas em conhecimento são:

- Luz;
- Umidade relativa do ar;
- Temperatura ambiente;
- Ar atmosférico.

Quando se trata de produto de consumo a estabilidade em função do clima é estabelecido mundialmente por Zona 1, 2, 3 e 4.

De acordo com ANVISA-Brasil

**Tabela 1.** Zonas de Estabilidade de acordo com ANVISA-Brasil

Zonas	Temperatura Considerada (°C)	Umidade Média Relativa (%)	Exemplo de Países
Zona 1 (temperada)	21	45	Chile; USA
Zona 2 (subtropical)	25	60	África do Sul, México
Zona 3 (quente e seca)	30	35	Austrália, Marrocos
Zona 4 (quente e úmida)	30* a 40**	75	Brasil

\* estabilidade de longa duração

\*\* estabilidade acelerada

De acordo com o draft da WHO (World Health Organization-Organização Mundial da Saúde)

**Tabela 2.** Zonas de Estabilidade segundo draft WHO (World Health Organization-Organização Mundial da Saúde)<sup>1-6</sup>

Zona	Definição	Critério Média anual da temperatura medida ao ar livre/média anual da pressão de vapor d'água	Condições do ensaio em Longa Duração	Exemplo de Países
1	Clima Temperado	≤ 15 °C / ≤ 11 hPa	21 °C / 45% RH	Chile; USA
2	Clima Subtropical e Mediterrâneo	>15 a 22 °C / > 11 a 18 hPa	25 °C / 60% RH	África do Sul, México
3	Clima Quente e Seco	> 22 °C / ≤ 15 hPa	30 °C / 35% RH	Austrália, Marrocos
4A	Clima quente e úmido	> 22 °C / > 15 a 27 hPa	30 °C / 65% RH	Argentina
4B	Clima quente e muito úmido	> 22 °C / > 27 hPa	30 °C / 75% RH	Brasil

Referências:[3] a [8].

### 9.1. Luz

Se estudarmos sobre da luz, pode-se verificar que trata-se de uma composição de cores que formam o denominado espectro. Em termos de energia, a luz ultravioleta produz energia destacada e hoje largamente estudada em seus diferentes comprimentos de onda.

### 9.2. Umidade relativa do ar

Como efeito, a umidade introduz água na molécula. Essa introdução pode resultar na reação de hidrólise, ou ainda potencializar o caráter ácido ou básico, próprio da molécula em estudo. No caso de fármacos (remédios) é comum submeter o produto formulado ou a matéria-prima, ao contato com ácidos e bases.

### 9.3. Temperatura ambiente

Como as fontes anteriores, a temperatura é um agente de ação sobre a velocidade das reações, de acordo com van't Hoof (Jacobus Henricus van't Hoff - 30 de agosto de 1852, Roterdã, Países Baixos - 1 de março de 1911, Berlim - muito conhecido pelos estudos de cinética e equilíbrio químico - Prêmio Nobel de Química em 1901).

### 9.4. Ar atmosférico

Considerando que a composição básica do ar atmosférico é em média 20% de oxigênio e que atua no processo oxidativo das substâncias, quer de forma lenta (amarelidão de uma folha de papel), forma rápida (combustão) e extremamente rápida (explosão), deve ser levada em consideração no processo de estabilidade.

A operação de estabilidade não será discutida neste livro, pois várias são as situações para tal decisão. Para não se alongar, a ANVISA, MAPA, ICH, FDA possuem normas definidas para estudo de estabilidade, que incluem produtos fotodegradáveis, termolábeis etc., assim como, a ação de fazer as respectivas estabilidades.

## 10. Operacionalizando o estudo de impurezas de degradação

Sabe-se que submetendo-se uma substância ou uma mistura de substâncias a situações de energia diferentes do ambiente, pode resultar em degradação da composição. Muito se discute qual seria a condição mais representativa, pois poucas instituições arriscam uma definição, ao passo que os resultados a serem obtidos, podem ter ou não pertinência. É comum encontrar em literaturas: “*Obter as impurezas de degradação por: temperatura, umidade, luz, oxidação, hidrólise ácida e básica.*”

Sempre será difícil é definir qual temperatura e umidade, qual quantidade de luz e para a oxidação e hidrólise ácida e base, qual o reagente e quais as concentrações.

Considerando as intempéries médias no Brasil e escolhendo parâmetros de aumento de energia para a evolução reacional, para a TEMPERATURA, talvez, a maior temperatura encontrada seja próxima a 50°C, então, pode-se estabelecer 50 ou 60°C. Para a média de UMIDADE RELATIVA, 60 a 80% são boas estimativas.

Para LUZ, consideremos a Luz Ultravioleta. A radiação UV faz parte da luz solar que atinge a Terra. A radiação UV que atinge a Terra se divide em radiação UVA e UVB (os raios UVC não atingem a Terra). As Radiação UVA e UVB são radiações que o olho humano não consegue enxergar. A diferença entre eles

está no comprimento de onda. A radiação UVA apresenta comprimento de onda de 315-400nm. Já os raios UVB têm comprimento de onda de 280-315nm (nanômetros). Os raios UVC são menores que 280nm (usados em microbiologia ou salas de esterilização).

Como curiosidade, os raios UVA atingem as camadas mais profundas da pele. Por isso são os principais responsáveis pelo desenvolvimento do câncer de pele, envelhecimento precoce, bronzeamento (escurecimento) e catarata (doença nos olhos que pode causar cegueira). A radiação UVB atinge as camadas mais superficiais da pele. Quando há uma exposição sem os devidos cuidados, esta radiação leva a vermelhidão (eritema) e queimaduras solares. A vermelhidão geralmente tem início 2 a 7 horas após o contato com o Sol de forma prolongada e contínua.

Cerca de 95% dos raios ultravioleta que atingem a Terra são do tipo UVA e apenas 5% são UVB. Isso porque a camada de ozônio absorve muito melhor os raios UVB. A luz UVB, por ser mais segura e dominada, é opção desejável para o estudo de degradação.

**Tabela 3.** Percentagens indicadas para cada tipo de lâmpada, correspondente à parcela de irradiância sobre o total da Região Ultravioleta de 260 a 400nm (conforme normas ASTM e projeto de norma ABNT)

Faixa, nm	Lâmpada UVB (313nm)	Referência Luz Solar*
260 – 270	<0,1%	0
271 – 280	0,1-0,7%	0
281 – 290	3,2-4,4%	0
291 – 300	10,7%-13,7%	0
301 – 320	38,0-44,6%	5,6%
321 – 340	25,5-30,9%	18,5%
341 – 360	7,7-10,7%	21,7%
361 – 380	2,5-5,5%	26,6%
381 – 400	0,0-1,5%	27,6%

Fonte: [9].

Notas: A. As faixas e valores indicados foram obtidos em medições feitas (internacionalmente), sobre a distribuição espectral para lâmpadas de diferentes idades e operando em diferentes níveis de irradiância controlada. As faixas indicadas são baseadas no limite de 3 desvios-padrão da média destes valores. Lâmpadas que atendem estas distribuições disponíveis no mercado, podem ter níveis de irradiância diferentes, mas mantém esta mesma distribuição espectral relativa.

B. Os valores de referência de luz solar são mostrados apenas a título indicativo, e foram obtidos no CIE (Comitê Brasileiro de Iluminação, órgão do Inmetro [http://www.inmetro.gov.br/met/Cientifica/cie/Publicacoes\\_biblioteca.pdf](http://www.inmetro.gov.br/met/Cientifica/cie/Publicacoes_biblioteca.pdf)), publicação CIE N° 85 da tabela 4 Solar Spectral Irradiance.

A indústria Philips é uma das fabricantes de lâmpadas de luz UVB para usos específicos. Duas lâmpadas são propostas pela empresa a de banda estreita (TL-01) e banda larga (TL-12).

**Banda Estreita:** é utilizada para ensaios com necessidade definida do específico comprimento de luz UVB. Em termos de Brasil, não é fácil de se encontrar comercialmente, havendo necessidade de

importação. É encontrada na potência de 20 e 40W (a emissão aumenta com a potência)

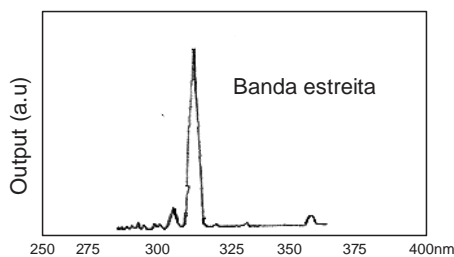


Figura 2. Banda estreita.

**Banda Larga:** é utilizada para ensaios que simulam o espectro da luz UVB. Em termos de Brasil, é mais fácil de se encontrar comercialmente. É encontrada na potência de 20 e 40W (a emissão aumenta com a potência)

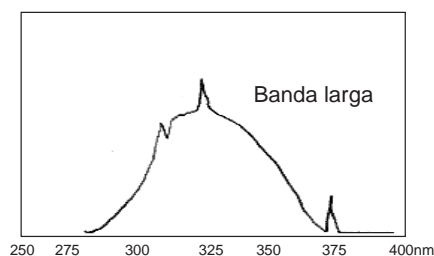


Figura 3. Banda larga.

Quanto a **HIDRÓLISE**, há vários aspectos, além da hidrólise simples em água, deve-se levar em consideração o caráter do meio, portanto, pH(s) ácido e básico são desejáveis. Deve-se evitar o uso de oxiácidos, como o ácido sulfúrico, este, sobretudo pelo fato de ser desidrante. O Ácido Clorídrico, por estar presente nos organismos vivos e por ser ácido forte, fica como indicado e o NaOH como base forte com grau de dissociação próxima a 100%. As concentrações iniciais devem ser soluções diluídas, portanto, menores que 1 molar, preferencialmente dez vezes menor (0,1 molar).

A **OXIDAÇÃO** pode ocorrer por ação do oxigênio, ou pelo processo de oxirredução. Considerando a oxidação por oxigênio, o reagente mais “fácil” do ponto de vista experimental é o peróxido de hidrogênio (água oxigenada). Considerando o produto na máxima concentração, a densidade relativa descrita em compêndios é de 1,463 g/cm<sup>3</sup>. Considerando o cálculo em massa, e a dificuldade da pesagem de alíquota, 2 mL deste peróxido de hidrogênio, diluídos a 100 gramas em água, resulta numa solução próxima a 3% (m/m) do peróxido de hidrogênio. No caso da oxirredução, transferência de elétrons, torna-se preferencial para espécies metálicas, por exemplo, verificar o comportamento do Ferro II na presença do Cobre II.

De forma geral, as condições de um “stress” ficam estabelecidas para a menor condição. Um aumento dos valores dessa condição é de extrema responsabilidade, para com o resultado. O tempo reacional também é difícil prever, pois espécies diferentes reagem diferentemente com o tempo de contato. Tempo maior que 24 horas são desejáveis, principalmente por serem reações em meio diluídos. Como as reações são para o produto, normalmente estão na solução de análise; desta forma, podem-se estimar proporções entre a solução do produto e o “stressante”, em 1:1 até 10:1 entre a solução de análise do produto definida no método e as soluções “stressantes”.

Para os parâmetros: **Luz, Temperatura e Umidade** algumas considerações são colocadas para avaliações quanto ao aumento de energia sobre o produto em estabilidade na busca de formação de impurezas de degradação:

**Luz:** para ensaios científicos, não é possível utilizar da luz de uma lâmpada fluorescente comum pois luz ultravioleta, produzida por excitação de vapor de mercúrio em argônio, é convertida em luz branca por meio da cobertura de fósforo na superfície interna do tubo. A quantidade de luz UVB liberada para o ambiente, nesta lâmpada fluorescente de ambiente, é praticamente nula, visto que a lâmpada é feita em vidro, o qual impede a passagem da luz UVB (lembrar que nos espectros de absorção por ultravioleta, utiliza-se de cubeta de quartzo e não de vidro) e, ainda, em muitos casos, o vidro é recoberto por uma camada de plástico que também impede a passagem dessa luz. Daí o fato de se utilizar da luz fluorescente UVB específicas, como colocado neste capítulo.

**Temperatura:** 50 ou 60 °C são suficientes, a não ser em casos de produtos com vida declarada para temperaturas superiores ou inferiores (caso de armazenagem em geladeira devido a termolabilidade).

**Umidade Relativa:** A umidade relativa média, principalmente em países tropicais, é da ordem de 65%, se considerarmos umidade forçada ou fora da média, 75% é uma quantidade suficiente. Existem literaturas com umidade forçada a 90% (condição de chuva ou muito próxima de chuva).

Quadro 1. Resumo para condição de “STRESS”.

Oxidação ao peróxido de hidrogênio	Solução a 3% (m/m)
Hidrólise ácida ao HCl	Solução 0,1M
Hidrólise básica ao NaOH	Solução 0,1M
Luz	Ultravioleta B-fluorescente Banda Larga-20W
Umidade Relativa	75%
Temperatura	60°C
Oxidorredução	Soluções de Cu(II) 0,1M ou menor.



## 11. Forçando o “stress”

Pode-se aumentar ou diminuir a concentração das soluções, luz/umidade/temperatura e tempos de exposição. É importante entender a necessidade de “stressar” o produto, o que se espera e qual a correlação a ser feita, portanto, tempos de exposição, concentrações, intensidades devem ser avaliadas química e fisicamente pelo analista em função do objetivo do estudo.

## 12. Situações que podem ser previstas

Todo sistema reacional é passível, de micro reações ou de reações que alterem substancialmente o meio. Desta forma, a condição analítica pode tornar-se inviável e a busca por uma nova condição analítica leva ao ciclo: nova condição nova validação nova técnica. Alguns exemplos são colocados:

- 1 Nas reações com soluções, pode resultar em precipitações de novas espécies;
- 2 Podem ocorrer polimerizações;
- 3 Pode alterar a estrutura das espécies e elas não “aparecerem” na condição analítica;
- 4 Pode ocorrer alteração de cor, que dificultará a análise na condição analítica;
- 5 Adição de NaOH sobre uma solução alcoólica contendo, principalmente, o metanol; forma-se, no meio reacional, o metóxido, base mais forte eu a inorgânica;
- 6 Considerando que o método preveja extração com solvente para, posteriormente, reconstituição, é também de se supor que a impureza possa não ser extratível no solvente do método analítico utilizado;
- 7 Interações com a embalagem;
- 8 Reações conhecidas da química, como oxidação de aldeídos a alcoóis, hidrólise de ésteres, enfim, o os conhecimentos da Química são sempre bem-vindos, como reações de adição, eliminação, substituição, hidratação, oxidação etc.

## 13. Quantificando impurezas não conhecidas

O ideal na análise quantitativa é ter padrão confiável da espécie em análise. Num estudo de impurezas de degradação, normalmente não se conhece a impureza gerada. Esta impureza pode ser originária, por exemplo, da degradação do ativo, dos excipientes, da reação entre ativo e excipientes, dentre a mistura e solventes específicos.

Isolar a impureza é possível (complexo). Lembrando que a quantidade de impurezas que forem detectadas, normalmente é sempre pequena, o que exige trabalho analítico intenso para se obter massa suficiente para uma identificação precisa. De posse dessa massa, deve-se garantir o grau de pureza da mesma. Atribuir um nome a essa impureza, por resultados analíticos, nem sempre são comparáveis com nomes de impurezas comerciais. Todo esse trabalho é altamente custoso e o tempo de estudo pode se elevar por longos períodos, de semana a anos. Tal fato para uma única impureza e o ensaio pode resultar em mais que uma impureza.

Ensaiai isoladamente os constituintes da amostra até a solução de análise, também é possível, apesar de trabalhoso, porém, pode-se identificar melhor a fonte geradora de impureza, caso a origem seja uma das substâncias que compõem o produto e não de sua reação com o meio.

A quantificação por fator de resposta é uma boa opção para se ter um valor orientativo de grandeza. Pois a partir do momento que se observa a presença de uma impureza, a próxima pergunta é: “quanto tem”? Pode-se usar o fator de resposta do ativo principal, que normalmente possui padrão de referência à disposição. Qual o erro nesta determinação? A impureza pode não ter o mesmo fator de resposta do ativo principal, desta forma, um sinal de pequena intensidade da impureza analisada com seu respectivo padrão poderia resultar em concentração mais elevada que quantificada com o fator de resposta do ativo principal, o contrário também é verdadeiro, ou seja, um sinal elevado de intensidade da impureza, se quantificada com seu respectivo padrão, poderia resultar numa concentração de menor concentração que a quantificada com o fator de resposta do ativo principal. Apesar do erro analítico, esta técnica (alguns denominam de semiquantitativa) é uma boa referência quantitativa para este tipo de ensaio.

## 14. Impurezas de degradação para metais, semimetais e ametais

Só se aplica em casos nos quais a alteração do número de oxidação é de fundamental importância na aplicação. Como exemplo, o antimônio utilizado no tratamento da “úlcer de Bauru”, no qual a mudança do número de oxidação do antimônio, resultado em dor elevada quando ministrado na forma injetável muscular. Como segundo exemplo está a aplicação sobre complexos metálicos, verificando o quanto é mantido na forma de quelato e na forma do metal em estado não quelato.

## 15. Análise de impurezas de degradação por outras técnicas

As técnicas cromatográficas, em seus detectores e acoplamentos, são as melhores para o estudo de impurezas de degradação, porém, nem todas as técnicas permitem análise de impurezas de degradação (como muitas descritas em compêndios oficiais para a análise do ativo, quer em matéria-prima como na mistura que resulta o produto acabado), como exemplo: volumetria, colorimetria, potenciometria, absorção a luz ultravioleta e visível, infravermelho etc. Técnicas que normalmente determinam a quantidade do produto presente no produto em análise. Há casos, porém, que o conhecimento químico sobre determinado produto induz a busca de novos compostos, como exemplo, a glicerina, que apesar de análise por via volumétrica, ou ainda cromatográfica, a formação de peróxidos é fundamental no estudo de sua degradação. Outros exemplos, como o cumeno, que pode ser analisado via CFG a sua oxidação podem resultar em hidroperóxido de cumila.

Vários compostos possuem sua quantificação por métodos microbiológicos, principalmente na área de fármacos. Para estes compostos, como neomicina, bacitracina, estudos bibliográficos e desenvolvimento por técnicas mais apuradas, como acoplamentos LC/MS podem oferecer resultados passíveis de avaliação.

## 16. Toxicidade ou Genotoxi

Um dos objetivos da busca pelas impurezas de degradação é conhecer a toxicidade ou possível mutagenicidade da impureza; o que é pertinente, visto que impurezas, mesmo em baixa concentração, podem resultar tóxicas para quem consome o produto.

Neste caso, o ensaio de toxicidade só é possível com o isolamento da(s) espécie(s), o que já é complexo e penoso em se obter massa suficiente para a identificação/quantificação e massa suficiente para os ensaios da própria toxicidade. Desta forma, o ensaio completo de impurezas de degradação torna-se possivelmente longo e custoso para empresas que geram produtos de consumo, no entanto, a matéria é farta para alimentar as Universidades em suas teses acadêmicas.

O ensaio de AMES e o DL<sub>50</sub> são citados, entre outros, em literaturas que tratam sobre o tema.

Algumas substâncias já possuem literatura quanto à degradação e toxicidade destas impurezas, facilitando o trabalho do analista.

## 17. Conclusão

É um estudo que o autor considera importante para moléculas novas e ou composições inéditas caso contrário, é preferível conhecer melhor os insumos que comporão o produto final, ter literaturas sobre cada um, conhecer o fornecedor e a rota química, estudar a química da mistura reacional antecipadamente dentre as possíveis direções. Desta forma, serão reduzidos os impactos que poderão advir quando do estudo da determinação de impurezas de degradação no produto final em estabilidade, quer acelerada ou em longa duração.

É um estudo complexo que, no jargão popular, seria chamado de “coisa de gente grande”, ou seja, exige muito conhecimento científico e recursos técnicos. Portanto; boa sorte.

## 18. Referências Bibliográficas

1. LEITE, Flávio - Validação em Análise Química- 5ª Edição- Editora Átomo- 2008
2. LEITE, Flávio - Análise de Fitoterápicos (Artigo) - Revista Racine - 2006
3. ANVISA- RE Nº. 1, DE 29 DE JULHO DE 2005. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/e-legis/>>.
4. ICH Topic Q 1-F Stability Data Package for Registration Applications in Climatic Zones III and IV- Junho 2006. Disponível em: <<http://www.emea.europa.eu/pdfs/human/ich/042102en.pdf>>
5. GUIDANCE FOR INDUSTRY ANDAs: Impurities in Drug Substances U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER) June 2009 Office of Generic Drugs R1 Disponível em: <<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM172002.pdf>>.
6. WHO-World Health Day 2010. Disponível em: <<http://www.who.int/world-health-day/en/index.html>>
7. ANVISA-REVISTA RACINE- Estabilidade de Medicamentos no Âmbito da Farmacovigilância - Janaína de Pina Carvalho, Alzeir Santana Santos, Argentina Santos de Sa, Christiane dos Santos Teixeira e Marcia Santos Nogueir. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/farmacovigilancia/trabalhos/RACINE\\_ESTABILIDADE.pdf](http://www.anvisa.gov.br/farmacovigilancia/trabalhos/RACINE_ESTABILIDADE.pdf)>.
8. WHO- Draft regional guidelines on stability testing of active substances and pharmaceutical products EM/RC53/12 August 2006. Disponível em: <<http://www.who.int/>>.
9. Q-LAB- Lâmpadas-Folheto ilustrativo e explicativo. Disponível em: <<http://www.emite.com.br/qp/LampadasUV.htm#Despectr#Despectr>>.