

## **ESTUDO COMPARATIVO DO PERFIL CROMATOGRÁFICO ENTRE OS MEDICAMENTOS GENÉRICO E SIMILAR DE HIDROCLOROTIAZIDA APÓS CONDIÇÕES DE DEGRADAÇÃO FORÇADA SOB CONDIÇÕES DE ESTRESSE TÉRMICO, FOTOLÍTICO E OXIDATIVO.**

Alan Diego Silva Frade (1); Cláudia Cristina Bezerra do Vale (1); Kímblerly Stefanny da Silva (2); Steno Lacerda de Oliveira (3)\*

*Faculdade de Ciências Médicas da Paraíba FCM-PB, alandiegofrade@hotmail.com*

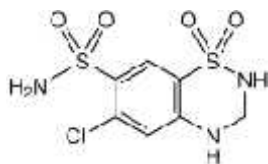
Doenças cardiovasculares são as maiores responsáveis pelas causas de morte no mundo, onde estas poderiam ser evitadas com medidas preventivas e medicamentosas. A hipertensão arterial sistêmica faz parte do grupo destas doenças, sendo considerada como grande fator de risco para complicações cardíacas e cerebrovasculares. A hidroclorotiazida é um anti-hipertensivo classificado como diurético tiazídico utilizado na terapêutica possuindo bastante eficácia. A qualidade dos medicamentos pode interferir diretamente na eficácia e segurança devido alterações da estabilidade. O estudo de degradação forçada (EDF) é formado através de experimentos, promovendo exposição do fármaco a condições extremas de estresse como: hidrólise ácida/básica, oxidação, umidade, calor, luz e temperatura. A estabilidade do medicamento é avaliada para fins de estudos e acompanhamento da qualidade de produtos acabados. Portanto, esse trabalho tem por objetivo realizar um estudo comparativo do perfil do Rf (Fator de retenção), por cromatografia em camada delgada (CCD), entre comprimidos de hidroclorotiazida genérico e similar antes e após ser submetida a condições: fotolíticas expondo-as a uma combinação de luz UV e fluorescente, térmicas expondo-as diretamente entre 30-60°C em estufa e oxidativa utilizando uma solução de peróxido de hidrogênio 3% a 25°C e 60°C, posteriormente preparada a CCD para EDF. O uso de CCD torna-se uma ferramenta de fácil aplicação, baixo custo e boa sensibilidade. Após análise, conclui-se que diante dessa condição experimental, a hidroclorotiazida no comparativo dos medicamentos genérico e similar permaneceram estáveis durante o estresse fotolítico e térmico. Entretanto, foi susceptível à oxidação, obtendo a formação de dois produtos de degradação.

Palavras-chave: Hidroclorotiazida, estabilidade, degradação forçada.

"Quebra de seção contínua"

## Introdução

A hipertensão arterial sistêmica (HAS) faz parte de um grupo de doenças e é considerada como grande fator de risco para complicações cardíacas e cerebrovasculares, considerado um grave problema de saúde pública. Com o objetivo de controlar a pressão arterial são utilizados medicamentos anti-hipertensivos, sendo representados, entre outros, pela hidroclorotiazida (Figura 1). Pertencente à classe de diuréticos tiazídicos, atua diretamente nos rins, promovendo uma reabsorção de sódio tubular distal aumentando a osmolaridade e ocasionando que menos água seja reabsorvida pelos dutos coletores, o que leva, conseqüentemente, a um aumento do volume urinário. (MARTINS, 2011).



**Figura 1.** Estrutura da Hidroclorotiazida.

Em 1958 a hidroclorotiazida foi a primeira droga realmente eficaz no tratamento da hipertensão arterial leve, moderada e edemas, e nos últimos anos, tem sido a mais utilizada na terapêutica anti-hipertensiva (MARTINS, 2011).

Devido a grande diversidade de medicamentos genéricos e similares no mercado, levantou-se o questionamento se

estes teriam a mesma qualidade, apresentando os resultados equivalentes aos medicamentos de referência. Para isso, a indústria farmacêutica utiliza diferentes ferramentas analíticas voltadas ao controle da qualidade de insumos e medicamentos, em cumprimento à legislação e à necessidade dos pacientes. (MALUF, 2008).

A farmacoterapia pode ser prejudicada devido à qualidade dos medicamentos, desta forma interferindo diretamente na eficácia e segurança, pois o fármaco pode ter a estabilidade alterada. (GUIDOLIN, [ano desconhecido]).

A estabilidade dos produtos farmacêuticos depende de fatores ambientais como temperatura, umidade, luz e de outros fatores relacionados ao próprio produto como propriedades físicas e químicas, de substâncias ativas e excipientes farmacêuticos, forma farmacêutica e sua composição, processo de fabricação, tipo e propriedades dos materiais de embalagens (BRASIL, 2005).

Estudos de degradação forçada fornecem dados e é formado através de experimentos tendo como principal característica a exposição do fármaco a condições extremas de estresse como: hidrólise ácido-básica e oxidação, umidade, calor, luz e temperatura. Portanto, é avaliada a estabilidade do medicamento para fins de estudos e

acompanhamento da qualidade de produtos acabados. (ANVISA, 2014)

O uso da cromatografia em camada delgada torna-se uma ferramenta de fácil aplicação, baixo custo e boa sensibilidade, facilitando o entendimento dos estudos, avaliando fatores que possam interferir em sua capacidade de se manter estável no produto acabado e dentro do prazo de validade. (MALUF, 2008).

Diante do exposto, esse trabalho tem por objetivo realizar um estudo comparativo do perfil do Rf (Fator de retenção), por cromatografia em camada delgada analítica, entre os medicamentos genérico e similar da hidroclorotiazida antes e após serem submetidos a condições fotolíticas, térmicas e oxidativa para estudo de degradação forçada.

## **Metodologia**

### **Estudos de degradação forçada**

Para realização de estudos de degradação forçada (EDF) o Ministério da saúde (MS) juntamente com a Agência nacional de vigilância sanitária (ANVISA) preconiza que sejam realizados de acordo com a RDC N° 58, de 20 de dezembro de 2013, estabelecendo parâmetros para a verificação de produtos de degradação em medicamentos, avaliando seu comportamento, perfil e sua qualidade diante

do prazo de validade determinado pelo fabricante. Para efeito desta resolução, são adotados estudos de degradação forçada, onde o medicamento acabado é exposto, induzindo-o a formação de produtos de degradação através de condições de estresse como: hidrólise ácido-básica e oxidação, umidade, luz e temperatura (Tabela 1). Desta forma é avaliada a estabilidade do medicamento, fornecendo informações para possíveis rotas de degradação de um determinado produto. (ANVISA, 2013).

A formação dos produtos de degradação se caracterizam como impurezas, geralmente orgânicas, obtidas através do resultado de alterações químicas que acontecem durante o período de armazenamento do medicamento, devido a alguns fatores como pH, umidade, efeitos da luz, temperatura e das características inerentes ao fármaco, da reação com os excipientes ou até devido ao contato com a embalagem primária. O processo de decomposição do princípio ativo geralmente ocorre devido a sua interação com os excipientes da formulação, material de embalagem, devido ao envelhecimento da formulação, ou das condições de armazenamento inadequadas e transporte incorreto que podem provocar estresse do princípio ativo e iniciar sua degradação. O produto de degradação do fármaco pode provocar ineficácia terapêutica e até mesmo

eventos adversos nos pacientes a depender de sua atividade toxicológica. (MELO, 2014).

**Tabela 1.** Condições de estresse para realização de degradação forçada.

Aquecimento	60 °C
Umidade	75% UR ou maior
Solução ácida	0,1 M HCl
Solução básica	0,1 M NaOH
Solução oxidativa	3% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
Fotolítica	UV-B fluorescente

Fonte: ANVISA, 2013.

### Teste de fotólise

Para realização do estudo de fotólise é necessário que haja a exposição a exposição da luz. É realizado com o objetivo de demonstrar ou esclarecer que a exposição à luz resulta em alterações significantes ou não na molécula do fármaco. Este teste deve ser constituído de duas etapas: degradação forçada e teste confirmatório, podendo ser realizado apenas com um lote do fármaco. Quando não realizado este teste deve-se apresentar uma justificativa técnica com evidência científica de que o fármaco não sofre degradação na presença de luz (ANVISA, 2012).

A reação de fotólise é iniciada após absorção de radiação eletromagnética, onde a maioria dos fármacos ativos empregados na preparação de medicamentos apresenta máximos de absorção na região do ultravioleta do espectro eletromagnético. A radiação ultravioleta é muito energética e pode propiciar a clivagem de muitas ligações químicas, ocorrendo degradação da molécula. Desta forma, é importante conhecer a fotoestabilidade das drogas utilizadas como medicamentos e os produtos formados devido à fotólise, além de avaliar a toxicidade destes últimos. (MORIWAKI, 2001).

Os fármacos são submetidos a exposição a comprimentos de onda curtas ou longas dentro da faixa de UV, ou luz fluorescente de iluminação, sob temperatura ambiente. O período de exposição pode variar de algumas horas a vários meses, dependendo da intensidade da fonte luminosa. Para saber se um fármaco é sensível à fotólise ou não, depende da variação do comportamento de decomposição observado. Os estudos de fotoestabilidade são feitos em fármacos na forma sólida ou em solução (SINGH & BAKSHI, 2000).

### Preparo da amostra

Para os estudos de estresse fotolítico foram pesadas 0,050g do padrão, dois comprimidos genéricos e dois comprimidos

similares de hidroclorotiazida, correspondendo a aproximadamente 0,050g do princípio ativo. As amostras foram espalhadas em uma fina camada em vidros de relógio a 25°C, expondo-as diretamente a uma combinação de luz UV e fluorescente em uma câmara escura de luz UV, com coletas em tempos determinados, em triplicata (ICH, 1996). Posteriormente preparada a CCD com fase móvel contendo acetato de etila e clorofórmio (8:2 v/v).

### **Teste de Oxidação**

Uma das principais causas de instabilidade dos fármacos é a degradação oxidativa. O seu mecanismo envolve a remoção de um átomo eletropositivo, radical ou elétron, ou a adição de um átomo eletronegativo ou radical. Muitas oxidações são reações em cadeia, que procedem lentamente sob a influência do oxigênio molecular. Tal processo de reação é referido como uma auto-oxidação. A substância utilizada para o teste de estudo de oxidação é o peróxido de hidrogênio, sendo a substância mais simples, de fácil obtenção, baixo custo em relação a outros agentes oxidantes. A concentração de peróxido utilizada varia entre 1% a 30%. (SILVA, et al., 2009).

### **Preparo da amostra**

Para os estudos de estresse oxidativo foram pesadas 0,050g do padrão, dois comprimidos genéricos e dois comprimidos similares de hidroclorotiazida, correspondendo a aproximadamente 0,050g do princípio ativo. As amostras foram solubilizadas em 1mL do solvente acetona, obtendo-se uma solução padrão de 5mg/ml, posteriormente foram transferidas para um balão volumétrico de 100mL contendo 50mL da solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 3%, e em seguida avolumadas a 100mL. Feito isso, o balão foi devidamente tampado, vedados com papel alumínio e reservados à temperatura ambiente e a 60°C durante 24 horas. As amostras foram preparadas em triplicata. Posteriormente preparada a CCD com fase móvel contendo acetato de etila e clorofórmio (8:2 v/v).

### **Teste de temperatura**

As técnicas termo-analíticas embora não substituam os estudos convencionais, tem-se mostrado extremamente útil em estudos de estabilidade, facilitando a escolha das formulações mais estáveis com extrema rapidez, fator desejável especialmente para a indústria farmacêutica (BAZZO & SILVA, 2005).

A análise térmica fornece dados que possibilitam uma ampla faixa de aplicação para medidas de propriedades físicas, como: estudo de reações químicas, avaliação da

estabilidade térmica, determinação da composição de materiais e desenvolvimento de metodologia analítica. Essas análises são de grande importância e tem sido utilizada na indústria farmacêutica como ferramenta útil para avaliar rapidamente uma possível interação entre os componentes ativos e os excipientes em estudos de compatibilidade na pré-formulação, além de avaliar a existência de polimorfismo, compostos de inclusão e dispersões sólidas, determinação de pureza química, estudos de reações no estado sólido, análise de formas farmacêuticas sólidas e controle de qualidade. (TOMASSETTI, 2005).

### Preparo da amostra

Para os estudos de estresse térmico foram pesadas 0,050g do padrão, dois comprimidos genéricos e dois comprimidos similares de hidroclorotiazida, correspondendo a aproximadamente 0,050g do princípio ativo. As amostras foram espalhadas em uma fina camada do fármaco em vidros de relógio, expondo-as diretamente a 30°C em estufa. As amostras foram mantidas em estufa, cuja temperatura foi monitorada durante todo o período de análise. Durante o período de exposição, as amostras foram coletadas a 40, 50 e 60°C e uma coleta após 24 horas de exposição à 60°C. As amostras foram solubilizadas em 1mL do

solvente acetona, foram preparadas em triplicata. Posteriormente preparada a CCD com fase móvel contendo acetato de etila e clorofórmio (8:2 v/v).

### Resultados e Discussão

Para realização de estudos de degradação da hidroclorotiazida é necessário a preparação de uma CCD com fase móvel contendo acetato de etila e clorofórmio (8:2v/v) e a aplicação das amostras padrão (P), genérico (G), similar (S) de hidroclorotiazida antes de serem submetidas a testes de estresse (Figura 2), onde através desta, serão realizados comparativos, obtendo dados.

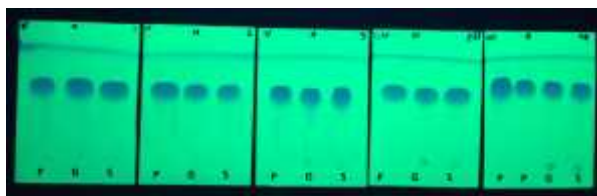


**Figura 2.** Perfil cromatográfico (CCD) das amostras padrão (P), genérico (G), similar (S) de hidroclorotiazida antes de serem submetidas a testes de estresse; ambos visualizados através da câmara de UV a 254 nm. Fase móvel contendo acetato de etila e clorofórmio (8:2 v/v).

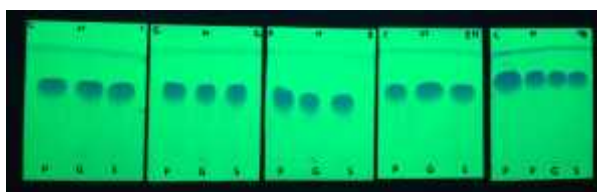


A droga foi submetida a diferentes condições de estresse tais como fotólise, aquecimento e oxidação.

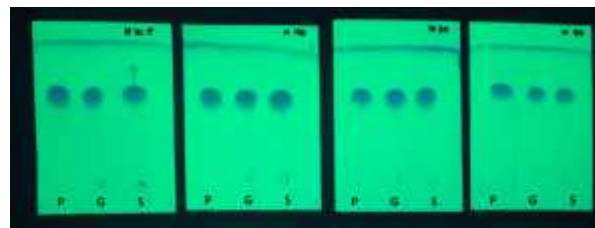
Após a análise dos dados obtidos, foi possível observar por CCD, que a solução da amostra de hidroclorotiazida não apresentou degradação quando exposto a condições fotolíticas (fluorescente e UV) e térmicas (30, 40, 50 e 60°C), (Figuras 3, 4 e 5), corroborando com Mahajan et al., 2012.



**Figura 3:** Perfil cromatográfico (CCD) das amostras padrão (P), genérico (G), similar (S) de hidroclorotiazida, submetidas à degradação fotolítica (Luz UV) em temperatura ambiente, com coletas nos tempos 5, 10, 30 minutos, 24 e 48 horas, respectivamente.

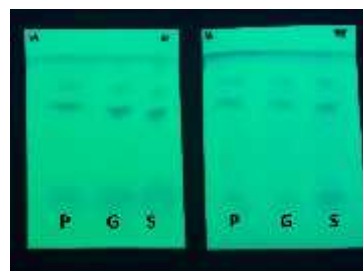


**Figura 4.** Perfil cromatográfico (CCD) das amostras padrão (P), genérico (G), similar (S) de hidroclorotiazida, submetidas à degradação fotolítica (Luz Fluorescente) em temperatura ambiente, com coletas nos tempos 5, 10, 30 minutos, 24 e 48 horas, respectivamente.



**Figura 5.** Perfil cromatográfico (CCD) das amostras padrão (P), genérico (G), similar (S) de hidroclorotiazida, submetidas à degradação térmica, com coletas nas temperaturas 30, 40, 50 e 60°C, respectivamente.

Após a análise dos dados obtidos, foi possível observar por CCD, que a solução da amostra de hidroclorotiazida apresentou degradação quando exposto a condições oxidativas (Figura 6), corroborando com Carvalho et al., 2005, onde explica que em várias reações químicas podem resultar na degradação de princípios ativos e excipientes. Qualquer alteração na estrutura do princípio ativo e excipientes podem reduzir a atividade terapêutica e levar a efeitos indesejados, devido à formação de produtos tóxicos.

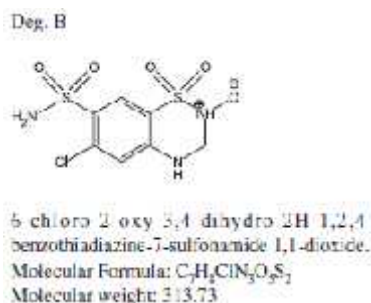


**Figura 6.** Perfil cromatográfico (CCD) das amostras padrão (P), genérico (G), similar (S) de hidroclorotiazida, submetidas à degradação oxidativa (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3%) em temperatura ambiente (esquerda) e à 60°C (direita) por 24 horas.

Em condições de degradação oxidativa pode-se gerar um ou dois produtos de degradação, onde em oxidação em temperatura 25°C ocorre a formação do produto de degradação A e em oxidação com aquecimento (60-80°C) (MAHAJAN et al., 2012).



**Figura 7.** Produto de degradação oxidativa em 25°C.



**Figura 8.** Produto de degradação oxidativa com aquecimento (60-80°C).

## Conclusão

De acordo com os resultados, conclui-se que diante dessa condição experimental, a hidroclorotiazida no comparativo dos medicamentos padrão, genérico e similar permaneceram estáveis durante o estresse

fotolítico e térmico. Entretanto, foi susceptível à oxidação, obtendo-se a formação de dois produtos de degradação.

Logo, o método de cromatografia em camada delgada (CCD) proposto para determinação da hidroclorotiazida demonstrou ser um método simples, rápido e de baixo custo, podendo ser aplicado para análise qualitativa de hidroclorotiazida forma farmacêutica de comprimido em ensaios de rotina do Controle de Qualidade deste fármaco para garantir a segurança e eficácia. Para obtenção de identificação dos produtos de degradação da hidroclorotiazida é necessário utilizar técnicas mais sensíveis como a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

## REFERÊNCIAS

BAZZO, G.C., SILVA, M.A.S. **Estudo termoanalítico de comprimidos revestidos contendo Captopril através de termogravimetria (TG) e calorimetria exploratória diferencial (DSC).** Rev Bras Cienc Farm. 2005; 41(3):315-22.

BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Resolução nº 01, de 29 de julho de 2005. Guia para a realização de estudos de estabilidade.** [Internet]. Poder Executivo, Brasília, DF,



Diário Oficial da União, 01 ago. 2005.  
Disponível em: <<http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=18109&word>>. Acessado em: 10/03/2016.

BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Resolução - RDC N° 45, de 9 de agosto de 2012. Dispõe sobre a realização de estudos de estabilidade de insumos farmacêuticos ativos.** [Internet]. [Aceso em: 2016 Mar 29]. Disponível em: <[http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2012/rdc0045\\_09\\_08\\_2012.html](http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2012/rdc0045_09_08_2012.html)>.

BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Resolução - RDC n° 58, de 20 de dezembro de 2013. Estabelece parâmetros para a notificação e qualificação de produtos de degradação em medicamentos com substâncias ativas sintéticas e semissintéticas, classificadas como novos, genéricos e similares, e dá outras providências.** 2013 dez 20.

BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Consulta Pública n° 68, de 29 de agosto de 2014. Guia para obtenção de produtos de degradação, e identificação e qualificação**

**de produtos de degradação.** Brasília. 2014 set 01.

CARVALHO, J.D.P., SANTOS. A.S., SA, A.S.D., TEIXEIRA, A.D.S., NOGUEIRA, M.S. **Estabilidade de Medicamentos no Âmbito da Farmacovigilância.** Rev. Fármacos & Medicamentos. Vol. 34, p. 22-27, 2005.

GUIDOLIN, G., CARVALHO, J.X., KRUM, F.B., FEITOSA, K.F., FERREIRA NETO, C.J.B. **Reestruturação do armazenamento de medicamentos na farmácia hospitalar do hospital de Ponta Grossa.** 7° CONEX; Apresentação Oral; Resumo Expandido. [ano desconhecido].

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION (ICH). **Guideline stability testing: photostability testing of new drug substances and products.** NOV. 1996.

MAHAJAN, A. A., ANIL, K.T., KRISHNAPRIYA, M. **LC, LC-MS/MS Studies for the Identification and Characterization of Degradation Products of Hydrochlorothiazide and Establishment of Mechanistic Approach towards Degradation.** J. Braz. Chem. Soc., Vol. 23, No. 3, 445-452, 2012.

MALUF, D. F., NAGATA, N., FARAGO, P. V., ZAMORA, P. G. P. **Determinação simultânea de paracetamol e cafeína por espectrometria UV-Vis associada a ferramentas matemáticas.** Rev. Bras. Farm., 89(1): 39-43, 2008.

MARTINS, A.L.T., BALDONI, A.O., FREITAS O., PEREIRA, L.R.L. **Análise do perfil dos usuários de hidroclorotiazida assistidos no sistema único de saúde de um município de São Paulo - Brasil.** Rev. Bras. Farm. 2011; 92(4): 373-377.

MELO, S.R.O., HOMEM-DE-MELLO, M., SILVEIRA, D., SIMEONI, L.A. **Advice on Degradation Products in Pharmaceuticals: A Toxicological Evaluation.** PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology. 2014; 68: 221-238.

MORIWAKI, C., BRESCANSIN, E.G., HIOKA, N., MAIONCHI, F., MATIOLI, G. **Estudo da degradação do fármaco Nabumetona por fotólise direta.** Acta Sci. 2001; 23(3):651-4.

SILVA, K. E. R.; ALVES, L. D. S.; SOARES, M. F. R.; PASSOS, R. C. S.;

FARIA, A. R.; ROLIM NETO, P. J. **Modelos de Avaliação da Estabilidade de Fármacos e Medicamentos para a Indústria Farmacêutica.** Rev Ciênc Farm Básica Apl.; 30(2):129-135, 2009.

SINGH, S., BAKSHI, M. **Guidance on conduct of stress tests to determine inherent stability of drugs.** Pharm Technol. 2000; 24:1-14.

TOMASSETTI, M., CATALANI, A., ROSSI, V., VECCHIO, S. **Thermal analysis study of the interactions between acetaminophen and excipients in solid dosage forms and in some binary mixtures.** J Pharm Biomed Anal. 2005; 37(5): 949-55.