

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos
Área de Produção e Controle Farmacêuticos

**Aplicação da eletroforese capilar - espectrometria de massas para
identificação dos produtos de degradação do aripiprazol em
medicamentos**

Frank Alonso Gavilano Fajardo

Dissertação para obtenção do
Título de MESTRE

Orientadora: Profa. Dra. María Segunda Aurora Prado

São Paulo

2022

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos
Área de Produção e Controle Farmacêuticos

**Aplicação da eletroforese capilar-espectrometria de massas para
identificação dos produtos de degradação do aripiprazol em
medicamentos**

Frank Alonso Gavilano Fajardo

Versão Original

Dissertação para obtenção do
Título de MESTRE

Orientadora: Profa. Dra. María Segunda Aurora Prado

São Paulo

2022

Frank Alonso Gavilano Fajardo

**Aplicação da eletroforese capilar - espectrometria de massas para
identificação dos produtos de degradação do aripiprazol em
medicamentos**

Comissão Julgadora

da

Dissertação para obtenção do Título de MESTRE

Profa. Dra. María Segunda Aurora Prado (Orientadora/presidente)

1° examinador

2° examinador

3° examinador

4° examinador

São Paulo, ____ de _____ de 2022

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

F111a	Fajardo, Frank Alonso Gavilano Aplicação da eletroforese capilar - espectrometria de massas para identificação dos produtos de degradação do aripiprazol em medicamentos / Frank Alonso Gavilano Fajardo. - São Paulo, 2022. 125 p.
	Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Farmácia - Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos. Orientador: Prado, Maria Segunda Aurora
	1. Aripiprazol. 2. Eletroforese capilar. 3. Degradação forçada. 4. Espectrometria de massas. I. T. II. Prado, Maria Segunda Aurora, orientador.

RESUMO

GAVILANO FAJARDO, F. A. **Aplicação da eletroforese capilar - espectrometria de massas para identificação dos produtos de degradação do aripiprazol em medicamentos.** 2022. 125 p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

Diretrizes internacionais e nacionais como a FDA (*Food and Drug Administration*), ICH (*International Council for Harmonisation*) e ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) estabelecem a exigência de testes de estabilidade para entender melhor a qualidade de um medicamento. O estudo de estabilidade deve ser realizado usando métodos indicativos de estabilidade que possam qualificar e quantificar os insumos farmacêuticos do medicamento, bem como as impurezas e produtos de degradação nele contidos. O aripiprazol é um antipsicótico atípico de segunda geração aprovado para o tratamento de esquizofrenia, transtorno bipolar, depressão e transtornos do espectro do autismo. Os métodos oficiais descritos nas farmacopeias para avaliar o aripiprazol e suas impurezas utilizam a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) como técnica principal. Nesta pesquisa, objetivou-se desenvolver um método indicativo de estabilidade por eletroforese capilar de zona (CZE) para o aripiprazol na forma farmacêutica de comprimidos, e identificação dos produtos de degradação por espectrometria de massas. O estudo de degradação forçada e a otimização do método desenvolvido por CZE foram realizados utilizando o conceito de delineamento de experimentos (DoE). A separação do aripiprazol de seus produtos de degradação foi conseguida usando uma coluna capilar de sílica fundida (30,2 cm x 75 µm ID), eletrólito de formiato de amônio 6 mmol/L (pH 3) com 5% de metanol sob um potencial de 15 kV e detecção em 214 nm. A capacidade indicativa de estabilidade do método foi investigada pela análise do aripiprazol após ser submetido a condições de estresse ácido, alcalino, térmico, fotolítico e oxidativo, de acordo com as diretrizes ICH. A oxidação foi a principal via de degradação entre as condições de estresse avaliadas. O aripiprazol foi separado dos seus produtos de degradação oxidativa em tempo de corrida abaixo de 5 minutos. O método por CZE mostrou ser linear na faixa de 60 - 140 µg/mL, $R^2 = 0,9980$, precisão calculada como desvio padrão relativo (DPR) menor que 2% e exatidão calculada como recuperação média de $100,93 \pm 0,77\%$. Os resultados obtidos demonstram que o método por HPLC-RP em modo gradiente, separou o aripiprazol e seus produtos de degradação em um tempo de corrida de 30 minutos. Quatro produtos de degradação foram detectados pelo método LC-MS e o principal produto de degradação oxidativo foi identificado. O aripiprazol mostrou-se suscetível à oxidação no grupo piperazina, gerando principalmente o composto aripiprazol-1-N-óxido.

Palavras chave: Aripiprazol, eletroforese capilar, degradação forçada, espectrometria de massas.

ABSTRACT

GAVILANO FAJARDO, F. A. **Application of capillary electrophoresis - mass spectrometry to identify aripiprazole degradation products in drugs.** 2022. 125 p. Dissertation (Master) – Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, 2022.

International and national guidelines such as the FDA (Food and Drug Administration), ICH (International Council for Harmonization) and ANVISA (National Health Surveillance Agency) establish the requirement for stability tests to better understand quality of a medicine. The stability study must be carried out using stability indicating methods that can qualify and quantify the pharmaceutical ingredients of the drug, as well as the impurities and degradation products contained therein. Aripiprazole is a second-generation atypic antipsychotic drug approved for the treatment of schizophrenia, bipolar disorder, depression, and autism spectrum disorders. The official method described in the pharmacopoeias to evaluate aripiprazole and its impurities is high performance liquid chromatography (HPLC) as the main technique. In this research, the objective was to develop an indicative method of stability by capillary zone electrophoresis (CZE) for aripiprazole in the pharmaceutical form of tablets, and identification of degradation products by mass spectrometry. The forced degradation study and the optimization of the method developed by CZE were carried out using the concept of design of experiments (DoE). The separation of aripiprazole from its degradation products was achieved using a fused silica capillary column (30,2 cm x 75 µm ID), 6 mmol/L ammonium formate electrolyte (pH 3) with 5% methanol under a potential of 15 kV and detection at 214 nm. The indicative stability of the method was investigated by analyzing aripiprazole after being subjected to acid, alkali, thermal, photolytic and oxidative stress conditions, according to the ICH guidelines. Oxidation was the main degradation pathway among the stress conditions evaluated. Aripiprazole was separated from its oxidative degradation products at run times below 5 minutes. The CZE method proved to be linear in the range of 60 - 140 µg/mL, $R^2 = 0,9980$, precision calculated as a relative standard deviation (DPR) of less than 2% and accuracy calculated as a mean recovery of $100,93 \pm 0,77\%$. The results obtained demonstrate that the HPLC-RP method in gradient mode separated aripiprazole and its degradation products in a run time of 30 minutes. Four degradation products were detected by the LC-MS method and the main oxidative degradation product was identified. Aripiprazole was shown to be susceptible to oxidation in the piperazine group, generating mainly the compound aripiprazole-1-N-oxide.

Keywords: Aripiprazole, capillary electrophoresis, forced degradation, mass spectrometry

Dedico esse trabalho aos meus pais Gregoria e Walter, por serem bons exemplos de vida, por todo o amor e educação que me deram. Ao meu irmão, Erald por todos os conselhos e apoio, por ser o amigo que sempre está comigo.

Muito obrigado

A educação não é aprendizagem de fatos, mas o treinamento da mente para pensar.

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

A minha família toda e amigos por sempre acreditar em mim e incentivaram na conclusão do trabalho.

A Profa. Dra. María Segunda Aurora Prado, pela oportunidade, orientação, amizade, ensinamentos e acreditar no meu sonho de me tornar um pesquisador.

Aos professores Dr. Felipe Rebello, Dr. Paulo Moreno, Dra. Inar Castro, pelos seus ensinamentos nas disciplinas realizadas.

Aos professores do Instituto de Química da USP, Dra. Marina Franco Tavares e Dr. Claudimir Lucio do Lago, pelas correções e sugestões na etapa de qualificação.

A Profa. Dra. Marina Tavares e seus alunos Carolina Raissa, Lucas Enrique, Andrea Faccio, pela amabilidade e disponibilidade enquanto ao uso do equipamento de CE.

Aos funcionários da FCF-USP David, Alexandre, Sueli e Shirley pelo profissionalismo, atenção e auxílio de sempre.

Aos colegas do programa Edilson Nazareth, Andressa Costa, Thamires Batello e Rosmery Merma, pela amizade e convivência e aos colegas que conheci no Laboratório de Controle Físico e Químico de Qualidade de Medicamentos e Cosméticos, Marcela, Fernando, Octávio, Roberto, Larissa H, Amanda, Francielle, Michelly, Penelopy, Joseph, Joel, Yuleisy, Jesus, Raul, Diego e Roberta, pelo companheirismo e apoio.

Ao Marcelo Redígolo pelo suporte com os espectros de massas.

À empresa Laboratórios Apsen, pela doação da matéria prima e padrões utilizados.

À Central analítica IQ-US, pelo serviço na realização das análises de espectrometria de massas.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, pela oportunidade de realização do curso de mestrado.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

A todos aqueles que contribuíram de qualquer forma para a realização deste trabalho, obrigado.

Muito obrigado.

SUMÁRIO

SUMÁRIO	i
LISTA DE FIGURAS	v
LISTA DE QUADROS.....	xi
LISTA DE TABELAS	xiii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xv
LISTA DE SÍMBOLOS E UNIDADES.....	xviii
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS.....	5
2.1 Objetivo geral	6
2.2 Objetivos específicos.....	6
3. REVISÃO DA LITERATURA	7
3.1 Aripiprazol	8
3.2 Impurezas e produtos de degradação	9
3.3 Métodos indicativos de estabilidade	13
3.4 Degradação forçada.....	16
3.4.1 Hidrólise ácida/básica	18
3.4.2 Oxidação	18
3.4.3 Fotólise	19
3.4.4 Termólise.....	19
3.4.5 Umidade	20
3.4.6 Íons metálicos.....	20
3.5 Identificação de produtos de degradação	20
3.6 Eletroforese capilar (CE) e eletroforese capilar acoplada à espectrometria de massas (CE-MS).....	21
3.6.1 Eletroforese Capilar (CE)	21
3.6.2 Eletroforese capilar acoplado à espectrometria de massas (CE-MS)	22
3.7 Metodologias disponíveis na literatura.....	23
4. MATERIAIS E MÉTODOS	28
4.1 Materiais.....	29
4.1.1 Substâncias de referência.....	29
4.1.2 Amostra	29
4.1.3 Placebo.....	29
4.1.4 Reagentes	29
4.1.5 Equipamentos.....	30
4.1.6 Consumíveis e outros materiais	30
4.2 Métodos.....	31
4.2.1 Estudo teórico preliminar.....	32
4.2.2 Experimentos exploratórios.....	34

4.2.3 Aprimoramento e otimização da metodologia desenvolvida por eletroforese capilar em zona (CZE)	41
4.2.4 Aprimoramento da metodologia por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)	41
4.2.5 Validação da metodologia desenvolvida por eletroforese capilar em zona (CZE)	42
4.2.5.1 Preparação das soluções estoque e soluções de trabalho	42
4.2.5.2 Padronização do método	43
4.2.5.3 Especificidade/Seletividade.....	44
4.2.5.4 Linearidade, limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)	45
4.2.5.5 Exatidão.....	45
4.2.5.6 Precisão.....	45
4.2.5.7 Robustez	46
4.2.6 Aplicação do planejamento de experimentos para otimizar as condições de degradação oxidativas.....	46
4.2.7 Identificação dos produtos de degradação forçada mediante espectrometria de massas..	47
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
5.1 Estudo teórico preliminar	49
5.1.1 Características do fármaco e suas impurezas	49
5.1.2 Características da formulação em estudo.....	50
5.2 Experimentos preliminares.....	51
5.2.1 Desenvolvimento de metodologias	51
5.2.1.1 Eletroforese capilar de zona (CZE) e cromatografia eletrocínética micelar (MECK).....	51
5.2.1.2 Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)	55
5.2.2 Estudo preliminar de degradação forçada (métodos HPLC e CE)	55
5.2.2.1. Método HPLC	57
5.2.2.2. Eletroforese capilar	60
5.3 Aprimoramento e otimização da metodologia desenvolvida por eletroforese capilar em zona (CZE).....	65
5.4 Aprimoramento da metodologia desenvolvida por cromatografia líquida de alta performance (HPLC)	70
5.5 Validação da metodologia desenvolvida por eletroforese capilar em zona (CZE)	71
5.5.1 Adequabilidade do sistema	71
5.3.1 Seletividade/especificidade e estudo de degradação forçada.....	71
5.3.2 Linearidade, limite de detecção e quantificação.....	75
5.3.3 Exatidão	76
5.3.4 Precisão	77
5.3.5 Robustez	77
5.4. Otimização das condições de degradação oxidativa pelo planejamento de experimentos.....	78
5.5. Identificação dos produtos de degradação por espectrometria de massas	80
6. CONCLUSÃO	87

7. REFERÊNCIAS.....	88
---------------------	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura química do Aripiprazol.....	9
Figura 2 – Classificação de impurezas segundo a ICH.....	10
Figura 3 – Recomendação sobre parâmetros comuns de degradação forçada a serem incluídos no teste de estresse de IFA e medicamento.....	17
Figura 4 – Representação das impurezas mencionadas na monografia <i>Aripiprazole</i> na Ph.Eur.....	25
Figura 5 – Cromatograma de referência para o teste de impurezas da monografia de <i>Aripiprazole</i>	25
Figura 6 – Representação das impurezas mencionadas na monografia <i>Aripiprazole tablets</i> da USP.....	26
Figura 7 – Fluxograma utilizado no desenvolvimento deste estudo.....	32
Figura 8 – Representação do aripiprazol e impurezas mencionadas nos compêndios USP-NF e Ph.Eur.....	33
Figura 9 – Espectro de absorção do aripiprazol, placebo e branco.....	51
Figura 10 – Eletroferograma do aripiprazol (ARP) 0,1 mg/mL por CZE. Condições: capilar de sílica fundida comprimento total de 30,2 cm x 75 µm d.i.; eletrólito: 10 mmol/L tampão formiato de amônio, pH 3,0; tensão: +12kV; temperatura: 25 °C, injeção hidrodinâmica: 0,4 psi/5s; detecção UV: 214nm.....	53
Figura 11 – Eletroferograma do aripiprazol (ARP) 0,1 mg/mL por CZE. Condições: capilar de sílica fundida comprimento total de 30,2 cm x 75 µm d.i.; eletrólito: 10mmol/L tampão acetato de amônio, pH 3,0; tensão: +12kV; temperatura: 25 °C, injeção hidrodinâmica: 0,4 psi/5s; detecção UV: 214nm.....	53
Figura 12 – Cromatograma do aripiprazol (ARP) 0,1 mg/mL por MECK. Condições: capilar de sílica fundida comprimento total de 30,2 cm total x 75 µm d.i.; eletrólito: tetraborato de sódio 25 mmol/L e dodecil sulfato de sódio 25 mmol/L, pH 9,5; tensão: +15kV; temperatura: 25 °C, injeção hidrodinâmica: 0,4 psi/5s; detecção UV: 214nm.....	54

Figura 13 – Cromatograma do aripiprazol (ARP) 0,1 mg/mL por MECK. Condições: capilar de sílica fundida comprimento total de 30,2 cm total x 75 µm d.i.; eletrólito: TRIS (tris-hidroximetil aminometano) 25 mmol/L e dodecil sulfato de sódio 25 mmol/L, pH 9,5; tensão: +15kV; temperatura: 25 °C, injeção hidrodinâmica: 0,4 psi/5s; detecção UV: 214nm.....54

Figura 14 – Cromatograma do aripiprazol (ARP) 0,1 mg/mL. Condições: Coluna Eclipse XDB-Phenyl (250 mm x 4,6 mm x 5µm); fase móvel TFA 0,2% aquoso: acetonitrila (55:45), fluxo de 1,0 mL/min, volume de injeção: 5µL, temperatura: 30°C; detecção UV: 214 nm.....55

Figura 15 – Cromatograma do aripiprazol (ARP) 0,1 mg/mL, exposto a degradação por hidrólise ácida (HCl 0,1 mol/L a 60°C/5h). Condições: Coluna Eclipse XDB-Phenyl (250 mm x 4,6 mm x 5µm); fase móvel TFA 0,2% aquoso: acetonitrila (55:45), fluxo de 1,0 mL/min, volume de injeção: 5µL, temperatura: 30°C; detecção UV: 214 nm.....58

Figura 16 – Cromatograma do aripiprazol (ARP) 0,1 mg/mL, exposto a degradação por hidrólise alcalina (NaOH 0,1 mol/L a 60°C/5h). Condições: Coluna Eclipse XDB-Phenyl (250 mm x 4,6 mm x 5µm); fase móvel TFA 0,2% aquoso: acetonitrila (55:45), fluxo de 1,0 mL/min, volume de injeção: 5µL, temperatura: 30°C; detecção UV: 214 nm.....58

Figura 17 – Cromatograma do aripiprazol (ARP) 0,1 mg/mL, exposto a degradação por oxidação (H₂O₂ 3% a 60°C/5h). Condições: Coluna Eclipse XDB-Phenyl (250 mm x 4,6 mm x 5µm); fase móvel TFA 0,2% aquoso: acetonitrila (55:45), fluxo de 1,0 mL/min, volume de injeção: 5µL, temperatura: 30°C; detecção UV: 214 nm. DP (Produto Degradação)59

Figura 18 – Cromatograma do aripiprazol (ARP) 0,1 mg/mL, exposto a degradação por degradação fotolítica (120h). Condições: Coluna Eclipse XDB-Phenyl (250 mm x 4,6 mm x 5µm); fase móvel TFA 0,2% aquoso: acetonitrila (55:45), fluxo de 1,0 mL/min, volume de injeção: 5µL, temperatura: 30°C; detecção UV: 214 nm.....59

Figura 19 – Cromatograma do aripiprazol (ARP) 0,1 mg/mL, exposto a degradação por degradação térmica (105 °C/48 h). Condições: Coluna Eclipse XDB-Phenyl (250 mm x 4,6 mm x 5µm); fase móvel TFA 0,2% aquoso: acetonitrila (55:45), fluxo de 1,0 mL/min, volume de injeção: 5µL, temperatura: 30°C; detecção UV: 214 nm.....60

Figura 20 – Eletroferograma do aripiprazol (ARP) 0,1 mg/mL, exposto a degradação por hidrólise ácida (HCl 0,1 mol/L a 60°C/5h). Condições: capilar de sílica fundida comprimento total de 30,2 cm total x 75 µm d.i.; eletrólito: 10 mmol/L tampão formiato de amônio, pH 3,0; tensão: +15kV; temperatura: 25 °C, injeção hidrodinâmica: 0,4 psi/5s; detecção UV: 214nm.....61

Figura 21 – Eletroferograma do aripiprazol (ARP) 0,1 mg/mL, exposto a degradação por hidrólise alcalina (NaOH 0,1 mol/L a 60°C/5h). Condições: capilar de sílica fundida comprimento total de 30,2 cm total x 75 µm d.i.; eletrólito: 10 mmol/L tampão formiato de amônio, pH 3,0; tensão: +15kV; temperatura: 25 °C, injeção hidrodinâmica: 0,4 psi/5s; detecção UV: 214nm.....61

Figura 22 – Eletroferograma do aripiprazol (ARP) 0,1 mg/mL, exposto a degradação por oxidação (H₂O₂ 3% a 60°C/5h). Condições: capilar de sílica fundida comprimento total de 30,2 cm total x 75 µm d.i.; eletrólito: 10 mmol/L tampão formiato de amônio, pH 3,0; tensão: +15kV; temperatura: 25 °C, injeção hidrodinâmica: 0,4 psi/5s; detecção UV: 214nm. DP (Produto Degradação)62

Figura 23 – Eletroferograma do aripiprazol (ARP) 0,1 mg/mL, exposto a degradação por degradação fotolítica (120h). Condições: capilar de sílica fundida comprimento total de 30,2 cm total x 75 µm d.i.; eletrólito: 10 mmol/L tampão formiato de amônio, pH 3,0; tensão: +15kV; temperatura: 25 °C, injeção hidrodinâmica: 0,4 psi/5s; detecção UV: 214nm.....62

Figura 24 – Eletroferograma do aripiprazol (ARP) 0,1 mg/mL, exposto a degradação por degradação térmica (105 °C/48 h). Condições: capilar de sílica fundida comprimento total de 30,2 cm total x 75 µm d.i.; eletrólito: 10 mmol/L tampão formiato de amônio, pH 3,0; tensão: +15kV; temperatura: 25 °C, injeção hidrodinâmica: 0,4 psi/5s; detecção UV: 214nm.....63

Figura 25 – Eletroferograma do padrão interno (IS) prometazina em presença do aripiprazol (ARP) 0,1 mg/mL, exposto a degradação por oxidação (H₂O₂ 3% a 60°C/5h). Condições: capilar de sílica fundida comprimento total de 30,2 cm total x 75 µm d.i.; eletrólito: 10 mmol/L tampão formiato de amônio, pH 3,0; tensão: +15kV; temperatura: 25 °C, injeção hidrodinâmica: 0,4 psi/5s; detecção UV: 214nm. DP (Produto Degradação)64

Figura 26 – Eletroferogramas do efeito dos valores de pH (2,2 a 3,5) na forma e resolução do pico do IS, ARP e de seus produtos de degradação oxidativa. Amostra: ARP degradado com 10% H₂O₂ por 2h a 60 °C (ARP 100 µg/mL e IS 160 µg/mL). Condições: capilar não revestido de sílica fundida (30,2 cm de comprimento total x 75 µm i.d.); electrólito: 10 mmol/L de formato de amônio/ácido fórmico; injeção hidrodinâmica: 0.4 psi/5 s; tensão aplicada: +12 kV; temperatura: 25 °C; detecção a 214 nm. Picos: IS (prometazina), (ARP) aripiprazol, DP (produtos de degradação) ...66

Figura 27 – Eletroferogramas do efeito da concentração de formato de amônio/ácido fórmico (5 a 25 mmol L⁻¹) na forma e resolução do pico de IS, ARP e produtos de degradação oxidativa. Amostra: ARP degradado com 10% H₂O₂ por 2h a 60 °C (100 µg/mL de ARP e 160 µg/mL de IS). Condições: capilar não revestido de sílica fundida (30,2 cm de comprimento total x 75 µm i.d.); eletrólito: (5 – 25 mmol/L) formato de amônio/ácido fórmico; injeção hidrodinâmica: 0,4 psi/5 s; tensão aplicada: +12 kV; temperatura: 25 °C; detecção a 214 nm. Picos: IS (prometazina), ARP (aripiprazol), DP (produto de degradação)67

Figura 28 – Otimizador de resposta mostrando as condições ideais de CE.....69

Figura 29 – Cromatograma da solução padrão de aripiprazol (ARP) 0,1 mg/mL após estresse sob H₂O₂ 3 % a 60°C/3h (sinal superior) e cromatograma do branco (sinal inferior). Condições: Coluna Eclipse XDB-Phenyl (250 mm x 4,6 mm x 5µm), fase móvel gradiente de Solução A e Solução B, fluxo de 1,0 mL/min, vol. injeção de 5 µL, temperatura de 30°C, comprimento de onda em 214 nm. DP (Produto Degradação)70

Figura 30 – Eletroferogramas nas condições finais otimizadas do CE. (A) Amostra placebo de Aristab[®], (B) Solução padrão de ARP (100 µg/mL) e IS (160 µg/mL) (sem estresse), (C) Amostra de Aristab[®] (sem estresse), (D) Condições oxidativas (3% H₂O₂ a 60 °C por 4 h); (E) Hidrólise ácida (0,1 mol/L HCl a 60 °C por 2 h), (F) Hidrólise ácida (0,1 mol/L NaOH a 60 °C por 2 h), (G) Condições térmicas (105 ° C por 48 h) e, (H) Condições fotolíticas (UVA/luz visível por 50 h). Condições: sílica fundida não revestida (30,2 cm de comprimento total x 75 µm i.d.); eletrólito: 6 mmol/L de formato de amônio/ácido fórmico pH 3 com 5% de metanol; injeção hidrodinâmica: 0,4 psi/5 s; voltagem aplicada: +15 kV; temperatura: 25 °C; detecção a 214 nm. Picos:

prometazina (IS), aripiprazol (ARP), produto de degradação oxidativa 1 (ODP1), produto de degradação oxidativa 2 (ODP2), produto de degradação oxidativa 3 (ODP3)	74
Figura 31 – Gráfico de parcelas residuais para o modelo de regressão linear.....	76
Figura 32 – Gráfico de interação do efeito das interações dos fatores na degradação oxidativa.....	79
Figura 33 – Oxidação do aripiprazol. A: aripiprazol-1-N-óxido, B: aripiprazol 1,4-di-N-óxido.....	80
Figura 34 – Cromatograma da solução amostra de aripiprazol após degradação oxidativa (Aristab®) (ARP) 0,1 mg/mL. Condições: Coluna Eclipse XDB-Phenyl (250 mm x 4,6 mm x 5µm); fase móvel: gradiente de TFA 0,2% aquoso e acetonitrila, fluxo de 1,0 mL/min, volume de injeção: 5µL, temperatura: 30°C; detecção UV: 214 nm....	80
Figura 35 – Cromatograma do aripiprazol (ARP) após degradação oxidativa 0,1 mg/mL. Condições: Coluna Eclipse XDB-Phenyl (250 mm x 4,6 mm x 5µm); fase móvel: gradiente de TFA 0,2% aquoso e acetonitrila, fluxo de 1,0 mL/min, volume de injeção: 5µL, temperatura: 30°C; detecção UV: 214 nm.....	81
Figura 36 – Espectro de massa do aripiprazol (ARP).....	82
Figura 37 – Espectro de massa do produto de degradação 1 (DP 1) no TR de 2,4 min.....	83
Figura 38 – Espectro de massa do produto de degradação 2 (DP 2) no TR de 7,6 min.....	84
Figura 39 – Espectro de massa do produto de degradação 3 (DP 3) no TR de 10,0 min.....	85
Figura 40 – Espectro de massa do produto de degradação 4 (DP 4) no TR de 17,9 min.....	86

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Aripiprazol e impurezas mencionadas nos compêndios USP-NF e Ph.Eur.....	33
Quadro 2 – Sistema cromatográfico de fase reversa em modo isocrático avaliado para o aripiprazol.....	36
Quadro 3 – Descrição dos procedimentos para preparo das amostras degradadas.....	40
Quadro 4 – Sistema cromatográfico de fase reversa em modo gradiente avaliado para o aripiprazol.....	42
Quadro 5 – Resultados de degradação forçada obtidos por HPLC.....	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Limites para impurezas de fármacos.....	11
Tabela 2 – Limites de notificação, identificação e qualificação de produtos de degradação em medicamentos.....	12
Tabela 3 – Monografias relacionadas ao aripiprazol e sua disponibilidade nas edições atuais dos principais compêndios farmacopéicos. (√) disponível na edição atual; (-) ausente.....	24
Tabela 4 – Componentes qualitativos e quantitativos simulados da formulação de referência de aripiprazol 10,00 mg/comprimido.....	34
Tabela 5 – Valores de log D e espécie(s) presentes segundo os diferentes pH do aripiprazol e suas impurezas.....	50
Tabela 6 – Resultados de adequação do sistema (limites de aceitação RSD % < 2). ^a Média de seis repetições; MT: tempo de migração; N: eficiência (número de placas); PAR: razão da área do pico; Rs: resolução; IS: padrão interno ARP: aripiprazol.....	71
Tabela 7 – Condições de estresse usadas para o teste de degradação forçada e conteúdo residual de fármaco em cada condição. ^a n = 2 para cada condição; ARP: aripiprazol.....	72
Tabela 8 – Validação do método quanto à linearidade e aos limites de detecção e quantificação pelo método CZE. $F_{crítico}$, $\alpha = 0.05 = 4.67$; DF: graus de liberdade; SS: Soma dos quadrados; MS: Quadrados Médios; ARP: aripiprazol.....	75
Tabela 9 – Dados de recuperação e precisão para determinação do aripiprazol pelo método CZE proposto. ^a Média das três replicatas; ^b Média de todos os níveis de recuperação (n = 9); ^c Média de seis determinações e um analista; ^d Média de seis determinações e dois analistas; SD: desvio padrão; RSD: desvio padrão relativo....	77
Tabela 10 – Resultados de robustez para quantificação de medicamentos (limite de aceitação RSD% < 2). ^a Média de três determinações; ARP: aripiprazol; IS: Padrão Interno; RSD: Desvio padrão relativo; kV: quilovolt.....	78
Tabela 11 – Matriz experimental do planejamento fatorial 2 ³ para a degradação oxidativa. a n = 2 para cada condição.....	78

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CE-MS	Eletoforese capilar acoplada à espectrometria de massas
EOF	Fluxo electroosmótico
ARP	Aripiprazol
ECSL	Eletoforese capilar de zona em solução livre
MIE	Métodos indicativos de estabilidade
ICH	<i>Internacional Conference on Harmonisation</i>
USP	<i>United States Pharmacopeia</i>
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
DoE	<i>Design of Experiments</i>
HPLC-RP	Cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa
LC-MS	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas
CE	Eletoforese capilar
pKa	- log de Ka onde Ka é a constante de dissociação ácida
IFA	Ingrediente Farmacêutico Ativo
pH	Potencial hidrogeniônico
UV	Ultravioleta
SCB	Sistema de classificação biofarmacêutica
(m/z)	Relação massa carga
5-HT1A	5-hidroxitriptamina 1A
5-HT2A	5-hidroxitriptamina 2A
Log P	Coeficiente de partição octanol / água
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
INDs	<i>Investigational New Drugs</i>
NDAs	<i>New Drug Applications</i>
CG-MS	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
RMN	Ressonância magnética nuclear
OMS	Organização Mundial da Saúde
EMA	Agência Europeia de Medicamentos
AIBN	azobisisobutironitrilo
W/m²	Watt por metro quadrado
DAD	Detector de arranjo de diodo
CIEF	Eletoforese capilar com focalização isoelétrica
CGE	Eletoforese capilar em gel
MEKC	Cromatografia eletrocínética micelar
ACE	Eletoforese capilar por afinidade

ESI	Ionização por eletrospray
CEC	Eletrocromatografia capilar
EC-ESI-MS	Eletroforese capilar-ionização por electro spray-acoplada à espectrometria de massas
USP-NF	<i>United States Pharmacopeia</i> - National Formulary
Ph.Eur.	<i>European Pharmacopoeia</i>
log D	Coeficiente de distribuição
PVDF	Fluoreto de polivinilideno
PTFE	Politetrafluoretileno
i.d.	Diâmetro interno

LISTA DE SÍMBOLOS E UNIDADES

%	Porcentagem
kV	Quilovolts
mmol	Milimolar
ppm	Partes por milhão
i.d	Diâmetro interno
°C	Grau Celcius
<	Menor
>	Maior
µL	Microlitro
µm	Micrômetro
µg	Micrograma
cm²	Centímetro quadrado
g	Gramma
L	Litro
mA	Miliampere
mg	Miligrama
min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mol	Molaridade
seg	Segundo

1. INTRODUÇÃO

A esquizofrenia é um transtorno mental grave que afeta mais de 21 milhões de pessoas em todo o mundo. Embora esta doença seja um distúrbio tratável, uma em cada duas pessoas que vivem com esquizofrenia não recebe cuidados para a condição (WHO (1), 2018). A esquizofrenia é caracterizada por uma distorção de pensamento, percepções, emoções, linguagem, autoconsciência e comportamento. Algumas das experiências mais frequentes são alucinações (ouvir vozes ou ver coisas inexistentes) e delírios (crenças errôneas e persistentes) (WHO (2), 2018). Estima-se que a prevalência internacional de esquizofrenia é de 0,33% a 0,75% (MORENO-KÜSTNER; MARTÍN; PASTOR, 2018), e que 4,9% das pessoas com esquizofrenia morrem por suicídio (PALMER; PANKRATZ; BOSTWICK, 2005).

Por ser uma condição crônica, a esquizofrenia demanda tratamento medicamentoso prolongado e este se dá, principalmente, pela utilização de antipsicóticos (GILLESPIE et al., 2017). O manejo farmacológico mudou na última década para esse transtorno mental, em parte devido à aceitação de uma nova classe de medicamentos, geralmente denominados antipsicóticos atípicos ou de segunda geração. Esses medicamentos têm uma menor incidência de efeitos colaterais do que os antipsicóticos mais antigos, e seu uso provavelmente se tornou de primeira linha (OWEN; SAWA; MORTENSEN, 2016).

O aripiprazol (ARP) é um antipsicótico de segunda geração (atípico) aprovado para o tratamento de esquizofrenia, transtorno bipolar, depressão e transtornos do espectro do autismo (FDA, 2015). O ARP combina atividade agonista parcial nos receptores dopamina-2 (D2), dopamina-3 (D3) e serotonina-1A (5-HT1A) com atividade antagonista nos receptores serotonina-2A (5-HT2A) e D2 (NABER; LAMBERT, 2004).

A segurança de um fármaco é determinada pelo seu perfil farmacológico-toxicológico, bem como pelos efeitos adversos causados pelas impurezas tanto em matérias-primas como formas farmacêuticas (ICH, 2006; KAṬNY; FRANKOWSKI, 2017). Assim, as atividades analíticas relativas há impurezas nos ativos farmacêuticos e medicamentos estão entre as questões mais importantes na análise farmacêutica moderna. Portanto, é indispensável que os produtos destinados ao consumo humano,

principalmente os medicamentos, devem ser caracterizados o mais completamente possível. (NAGESWARA RAO; NAGARAJU, 2003).

Devido a isso, para que medicamentos contendo aripiprazol cumpram sua função, deve-se garantir sua estabilidade em função de não perder potência e não exceder limites de impurezas, fatos estes que podem-lhe conferir um aumento de toxicidade. As impurezas podem ser classificadas em: impurezas inorgânicas, solventes residuais e impurezas orgânicas (ICH, 2006). Entre os tipos de impurezas orgânicas, os produtos de degradação merecem especial atenção devido ao fato de apresentarem limites específicos estabelecidos pelas agências regulamentares como a *International Conference on Harmonization* (ICH) (Q3B R2) e RDC nº 58 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (ICH, 2006; BRASIL (2), 2015).

Com o objetivo de monitorar a presença de impurezas, é necessário desenvolver métodos quantitativos indicadores de estabilidade. Esses métodos atendem às diretrizes do ICH e *Food and Drug Administration* (FDA). (ICH, 2003; FDA, 2015). Para avaliar as condições de um determinado fármaco durante o período de estudo, é necessário que estes métodos sejam totalmente validados (ICH, 2003). O FDA define um método indicativo de estabilidade como um procedimento analítico, preciso e exato, capaz de determinar seus constituintes ativos e seus produtos de degradação (ICH, 2003).

Para determinar a estabilidade de uma molécula, realizam-se degradações forçadas ou testes de estresse, processos que envolvem a degradação de substâncias ativas e medicamentos em condições como aquecimento, umidade, hidrólise ácida, hidrólise básica, oxidação, exposição fotolítica e metais de transição (Brasil (1), 2015). Uma abordagem recente no campo da degradação forçada de fármacos e medicamentos é avaliar a interdependência de parâmetros de degradação forçada aplicando o conceito de planejamento de experimento (*Design of Experiment*, DoE) (ICH, 2009). O planejamento de experimento, também é uma ferramenta estabelecida para desenvolver e otimizar métodos indicativos de estabilidade e métodos de perfis de impurezas envolvendo a separação de muitos componentes (PERAMAN; BHADRAYA; PADMANABHA REDDY, 2015).

Na indústria farmacêutica, existe a necessidade de desenvolver métodos analíticos rápidos e simples que permitam avaliar o perfil de impurezas e produtos de degradação. A cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa (HPLC-RP) é extensivamente aplicada e altamente recomendada pela ANVISA para o acompanhamento de estudos de estabilidade de medicamentos (Brasil (1), 2015). Nos últimos anos, vários estudos têm surgido sobre o uso da eletroforese capilar (CE) para a determinação de produtos de degradação e impurezas de fármacos, devido ao advento de sistemas de eletroforese capilar altamente automatizados e sensíveis (KLAMPFL, 2006). A CE é uma técnica rápida e de utilização de pequenos volumes de amostra e solventes orgânicos, diminuindo desta forma seu impacto ambiental através da redução de geração de resíduos orgânicos (ROCHET, 2006).

A utilização de técnicas hífenadas como CE-MS, permite a identificação e elucidação estrutural de produtos de degradação de forma rápida e inequívoca (ROCHET, 2006). O uso de espectrometria de massas, um modo de detecção mais universal, complementa ou substitui favoravelmente a detecção UV, fornecendo algumas informações estruturais e de massa molar (m/z). Além disso, o CE-MS é extremamente seletivo e permite discriminar entre as moléculas coeluentes de diferentes massas nominais extraíndo m/z particular dos eletroferogramas de íons totais (VON BROCKE; NICHOLSON; BAYER, 2001).

O presente trabalho propõe desenvolver um método indicativo de estabilidade por CE e identificação dos produtos de degradação do fármaco e comprimidos de aripiprazol por espectrometria de massas, aplicando-se o conceito de planejamento de experimento no estudo de degradação forçada e na otimização do método analítico. Como resultado disso, procura-se demonstrar as vantagens e aplicabilidade da eletroforese capilar como técnica analítica rápida, versátil e confiável em análises de rotina em laboratórios em geral e na indústria farmacêutica.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O presente estudo tem como objetivo aplicar um método por eletroforese capilar e espectrometria de massas, para identificar os produtos de degradação do aripiprazol em medicamentos.

2.2 Objetivos específicos

- Realizar o estudo de degradação forçada do insumo farmacêutico ativo, placebo (IFA) e comprimidos de aripiprazol aplicando DoE, seguindo as diretrizes da ANVISA;
- Desenvolver um método indicativo de estabilidade para determinar aripiprazol em comprimidos por eletroforese capilar seguindo as diretrizes da ICH, USP e ANVISA;
- Adequar um método por HPLC para avaliar o aripiprazol e seus produtos de degradação;
- Otimizar o método analítico desenvolvido aplicando DoE;
- Validar o método indicativo de estabilidade por eletroforese capilar seguindo as diretrizes da ICH, USP e ANVISA;
- Identificar e realizar a elucidação estrutural dos possíveis produtos de degradação do aripiprazol por espectrofotometria de massas.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Aripiprazol

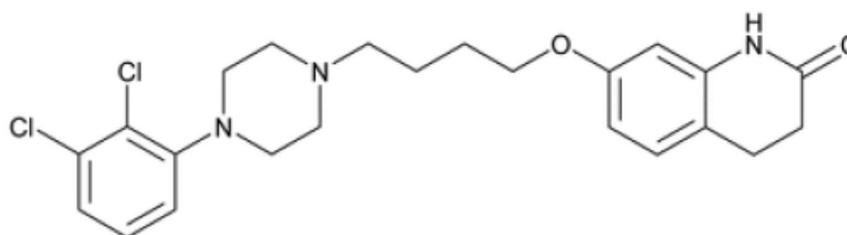
O aripiprazol (ARP) é um IFA desenvolvido pela companhia Otsuka Pharmaceutical e comercializado pela Bristol Meyers-Squibb sob a marca Abilify® (OTSUKA, 2018). O ARP foi aprovado pelo FDA para esquizofrenia em 15 de novembro de 2002, como uma formulação de comprimido oral na faixa de dose de 2 a 30 mg. Atualmente o ARP apresenta-se nas formas farmacêuticas de comprimido oral, comprimidos de desintegração oral, solução oral, e solução aquosa para injeção intramuscular (CASEY; CANAL, 2017). Esse fármaco é um antipsicótico de segunda geração e seu mecanismo de ação caracteriza-se pela sua atividade agonista nos receptores dopaminérgicos D2, D3 e serotoninérgicos 5-HT1A, bem como pela atividade antagonista nos receptores serotoninérgicos 5-HT2A. O ARP tem um risco significativamente menor de efeitos colaterais do movimento comparado com os antipsicóticos de primeira geração, como o haloperidol (DE BARTOLOMEIS; TOMASETTI; IASEVOLI, 2015; RIBEIRO et al., 2018).

Na atualidade, o ARP está aprovado para as seguintes indicações: 1) esquizofrenia, 2) transtorno bipolar I (episódios maníacos e mistos), 3) transtorno depressivo maior em adultos, como terapia adjuvante, 4) irritabilidade associada ao transtorno do espectro do autismo em pacientes pediátricos, e 5) tiques vocais e motores associados à síndrome de Tourette em pacientes pediátricos. Além disso, a formulação intramuscular é aprovada para tratar a agitação associada à esquizofrenia ou à mania bipolar em adultos. Geralmente, para as crianças são iniciadas dose de aripiprazol de 2 mg/dia, e pode ser utilizada até 10 mg/dia, dependendo do distúrbio e gravidade. Os adultos, por outro lado, geralmente começam com 10 mg/dia e pode ser prescrito até o máximo de 30 mg/dia dependendo da sua resposta (DI SCIASCIO; RIVA, 2015; OTSUKA, 2018).

O aripiprazol, 7-[4-[4-(2,3-Dichlorophenyl)-1-piperazinyl]butoxy]-3,4-dihydrocarbostyryl (Figura 1) é um composto derivado de piperazina e quinolona de massa molar 448,39 g/mol ($C_{23}H_{27}Cl_2N_3O_2$). O ARP é um composto pertencente à Classe IV do Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB), ou seja, é um composto de baixa solubilidade e permeabilidade. Apresenta-se como um pó cristalino de cor branca ou quase branca, sendo facilmente solúvel em diclorometano,

moderadamente solúvel em tolueno, e insolúvel em metanol e água. Apresenta coeficiente de partição octanol/água (Log P) de 4,9 e constantes de dissociação de 7,46 e 13,51. Possui um único doador de ligação de hidrogênio e quatro aceitadores de hidrogênio. Essas propriedades físico-químicas estão de acordo com a regra de cinco de Lipinski e fornecem ao composto alta biodisponibilidade (87%, independente de ingestão de alimentos), alta ligação às proteínas plasmáticas (> 99%) e um perfil metabólico aceitável (CASEY; CANAL, 2017; UNITED, 2018; PUBCHEM, 2019; CHEMICALIZE, 2019).

Figura 1 – Estrutura química do Aripiprazol



Fonte: (UNITED States Pharmacopeia, USP 45)

3.2 Impurezas e produtos de degradação

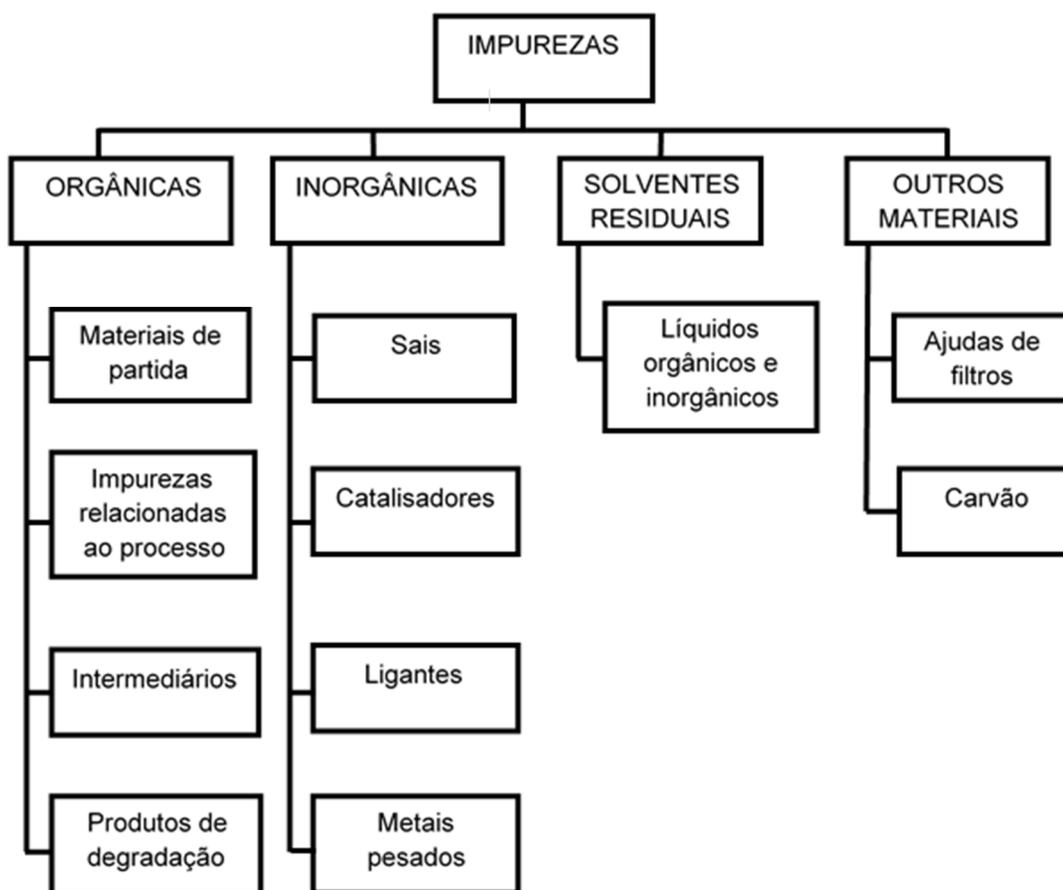
Segurança e eficácia de produtos farmacêuticos são duas questões principais de importância na terapia medicamentosa. A segurança de um medicamento é determinada pelo seu perfil farmacológico-toxicológico e depende não apenas das propriedades toxicológicas da substância, mas também das impurezas que ela contém (KAṬNY; FRANKOWSKI, 2017). Segundo a ANVISA, a eficácia de um medicamento é a capacidade de um medicamento de produzir os efeitos benéficos pretendidos em um indivíduo de uma determinada população, em condições ideais de uso (Brasil, 2009).

De acordo com o ICH (2006), as impurezas são classificadas como solventes residuais, impurezas inorgânicas, impurezas orgânicas e outros materiais (Figura 2) (ICH, 2006; MATVEEVA; KOVALEVA, 2016). Os solventes residuais são produtos químicos orgânicos voláteis utilizados ou produzidos durante a fabricação de substância, ou excipientes empregados na síntese do princípio ativo, ou na fabricação

de medicamentos (ICH, 2006). O guia Q3C (R6) do ICH descreve os limites toxicológicos desses solventes (ICH (1), 2016).

As impurezas inorgânicas são derivadas do processo produtivo e normalmente são conhecidas e identificadas como reagentes, ligantes, sais inorgânicos, metais pesados, catalisadores e filtros. Estes compostos são pouco encontrados nas matérias-primas, contudo, em alguns casos, podem causar problemas sérios de contaminação. Além disso, muitas reações são promovidas por catalisadores metálicos e, em conjunto com reagentes, podem reagir com os intermediários ou produtos finais e formar subprodutos (GÖRÖG, 2003; ICH, 2006). O guia Q3D do ICH estabelece as avaliações necessárias para o controle dessas impurezas (ICH, 2014).

Figura 2 – Classificação de impurezas segundo a ICH



Fonte: Adaptado de (ICH, 2006).

As impurezas orgânicas incluem materiais de partida, intermediários sintéticos, subprodutos de síntese, e produtos de degradação. Materiais de partida e intermediários sintéticos abrangem aqueles compostos usados para sintetizar a forma

final do princípio ativo, e aqueles relacionados à etapa de purificação. As impurezas presentes nos materiais de partida também contribuem para a contaminação do produto final. A determinação dos materiais de partida e intermediários sintéticos pode auxiliar na identificação das impurezas presentes no produto final e contribuir na compreensão dos mecanismos de formação destas impurezas (GAVIN et al., 2006).

Os subprodutos de síntese são impurezas de síntese mais comuns em matérias-primas. Esses tipos de impurezas podem ser formados a partir de uma variedade de reações secundárias como isomerização, dimerização, rearranjo, reação incompleta, e reações indesejadas entre os materiais de partida e catalisadores (QIU; NORWOOD, 2007).

Os produtos de degradação, na área farmacêutica, são moléculas resultantes de modificações químicas causadas pela exposição do princípio ativo ou medicamento a fatores como hidrólise, oxidação, calor, luz e umidade. Esses produtos também podem resultar da reação com a embalagem primária e da interação do princípio ativo com os excipientes, como resultado de reação de incompatibilidade (ICH (2), 2016; BRASIL, 2013).

Segundo a ANVISA, define-se os produtos de degradação como impurezas resultantes de alterações químicas, que surgem durante a fabricação ou armazenamento do medicamento (BRASIL (2), 2015).

Com o objetivo de monitorar ou controlar a presença de impurezas, tanto no princípio ativo como no medicamento, guias do ICH, FDA e ANVISA estabelecem especificações de limite aceitáveis de impurezas conforme apresentado na Tabela 1.

Tabela 1 – Limites para impurezas de fármacos

Dose Diária Máxima¹	Limite de Notificação^{2,3}	Limite de identificação³	Limite de Qualificação³
≤ 2 g/dia	0,05%	0,10% ou 1 mg ingerido por dia (o que for menor)	0,15% ou 1 mg ingerido por dia (o que for menor)
> 2 g/dia	0,03%	0,05%	0,05%

Notas:

¹ Quantidade de fármaco ingerido por dia

² Limites de notificação maiores devem ser cientificamente justificados

³ Limites menores podem ser assumidos se a impureza for extremamente tóxica

Fonte: (ICH, 2006)

Considerando que os produtos de degradação são um tipo de impurezas orgânicas, eles possuem especial importância, porque atendem diretrizes específicas de limites descritos no guia Q3B (R2) do ICH, assim como a RDC nº 53 da ANVISA. Esses limites correspondem a limites de notificação, quantificação e qualificação dos produtos de degradação, e devem ser avaliados durante o estudo de estabilidade do medicamento (Tabela 2). Segundo a ANVISA, o limite de notificação é aquele valor acima do qual um produto de degradação deverá ser relatado no estudo de estabilidade do medicamento (BRASIL (2), 2015).

Define-se um produto de degradação identificado, como aquele composto estruturalmente caracterizado por uma ou mais técnicas espectroscópicas de identificação aceitáveis, tais como infravermelho, ressonância magnética nuclear ou espectrometria de massas (ICH, 2006). O limite de qualificação é aquele valor acima do qual um produto de degradação deverá ser qualificado, isto é, de acordo com seu poder de mutagenicidade e carcinogenicidade (BRASIL (2), 2015).

Tabela 2 – Limites de notificação, identificação e qualificação de produtos de degradação em medicamentos.

Limites de Notificação	
Dose Diária Máxima¹	Limite²
≤ 1 g	0,1%
> 1 g	0,05%
Limites de Identificação	
Dose Diária Máxima¹	Limite²
< 1 mg	1,0% ou 5 µg ATD, o que for menor
1 mg - 10 mg	0,5% ou 20 µg ATD, o que for menor
> 10 mg – 2 g	0,2% ou 2 mg ATD, o que for menor
> 2 g	0,10%
Limites de Qualificação	
Dose Diária Máxima¹	Limite²
< 10 mg	1,0% ou 50 µg ATD, o que for menor
10 mg - 100 mg	0,5% ou 200 µg ATD, o que for menor
> 100 mg – 2 g	0,2% ou 3 mg ATD, o que for menor
> 2 g	0,15%

Notas:

¹ Quantidade máxima do insumo farmacêutico ativo administrado por dia

² Limites dos produtos de degradação são expressos como a percentagem do insumo farmacêutico ativo ou como a administração total diária (ATD) de um produto de degradação.

Fonte: (BRASIL (2), 2015).

3.3 Métodos indicativos de estabilidade

A eficácia e a segurança dos medicamentos estão intimamente relacionadas à estabilidade, pois as impurezas podem comprometer o efeito farmacológico e, em alguns casos, pode levar a efeitos adversos. Portanto, o teor do IFA e impurezas deve ser avaliado durante o tempo de armazenamento, para não exceder os limites de segurança (KOGAWA; SALGADO, 2016).

Neste contexto, torna-se necessário desenvolver métodos que sejam capazes de quantificar inequivocamente o fármaco e todos os produtos de degradação, na presença de excipientes e aditivos presentes na formulação. Estes métodos são essenciais para detectar impurezas conhecidas, ou aquelas que possam aparecer durante a meia vida do produto. Tais métodos são definidos como métodos indicativos de estabilidade (MIE) (RAO; GOYAL, 2016).

De acordo com o FDA, os MIE são métodos analíticos quantitativos validados que podem detectar as mudanças com o tempo nas propriedades físico-químicas e microbiológicas do princípio ativo e medicamento, e que são específicos para que o conteúdo do ingrediente ativo, produtos de degradação e outros componentes de interesse possam ser medidos com precisão sem interferência (FDA, 2003). Está implícito na definição que os MIE devem ser métodos quantitativos, específicos e reprodutíveis. A demonstração dessas características, que tornam o método adequado para o uso proposto, deve sempre ser documentada (MAGGIO; VIGNADUZZO; KAUFMAN, 2013).

Os MIE são necessários para: 1) estudos de estabilidade, 2) informações de estabilidade para envios regulamentares, como *Investigational New Drugs (INDs)* e *New Drug Applications (NDAs)*, 3) definir datas de expiração para princípios ativos e medicamentos. Os MIE também são necessários para cumprir outros eventos regulamentados, como liberação de princípios ativos e medicamentos, soluções de dosagem de toxicologia, avaliação de compatibilidade de excipiente, estudos de pré-formulação e embalagem. Eles também são ferramentas poderosas para controle de qualidade de rotina e para investigar resultados fora de especificação e fora de tendência (PERSICH et al., 2018).

Não há uma estratégia definida para o desenvolvimento dos MIE, contudo, três grandes etapas são reconhecidas atualmente. Estes incluem: (a) gerar amostras adequadas para testar a seletividade do método, (b) escolher um método e otimizar sua seletividade e sensibilidade, e finalmente, (c) validação do método. (AUBRY; TATTERSALL; RUAN, 2009; BLESSY et al., 2014). No entanto, Bakshi e Singh (2002) consideraram que o desenvolvimento dos MIE com probabilidade de atender aos requisitos regulatórios é um processo de sete passos que envolve: (a) estudo crítico da estrutura do fármaco para avaliar a provável rota (s) de decomposição, (b) coleta de informações sobre propriedades físico-químicas, (c) conduzir estudos de estresse (decomposição forçada), d) Estudos preliminares de separação em amostras estressadas, (e) desenvolvimento e otimização do método final, f) Identificação e caracterização de produtos de degradação, e preparação de padrões; e, g) validação dos MIE (BAKSHI; SINGH, 2002; DEOKATE; GORDE, 2014).

O método analítico de escolha deve ser sensível o suficiente para detectar impurezas em níveis baixos, e as respostas devem estar dentro da faixa de linearidade do detector. Métodos espectroscópicos como UV ou fluorescência não parecem capazes de ser indicativos de estabilidade, devido ao fato que normalmente não ocorre separação real ou virtual do sinal do analito e, muitas vezes, não cumprem os requisitos de especificidade, sensibilidade ou robustez. Contudo, os sistemas de cromatografia líquida de alta eficiência com detectores UV e fluorescência são altamente usados para o desenvolvimento dos MIE (MAGGIO; VIGNADUZZO; KAUFMAN, 2013).

Entre as técnicas utilizadas para o desenvolvimento dos MIE, podem-se citar a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), cromatografia em camada delgada (CCD), cromatografia gasosa (CG), eletroforese capilar (CE). Quanto aos produtos de degradação, se não podem ser isolados de forma pura, devem ser utilizadas técnicas hífenadas, como a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (HPLC-MS), a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada com ressonância magnética nuclear (HPLC-RMN) ou cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-MS) (QUADRI et al., 2014; PERSICH et al., 2018). Os métodos de cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa (HPLC-RF) são

extensivamente aplicados e altamente recomendados pela ANVISA para o acompanhamento de estudos de estabilidade de medicamentos (Brasil (1), 2015).

Regulamentos, diretrizes, conceitos e aplicações dos MIE tem sido discutidos pelas principais agências regulatórias internacionais como FDA (FDA 21 CFR section 211), ICH (Q1A (R2), Q3B (R2) e Q6A), Organização Mundial da Saúde (OMS) (Relatório Técnico 953), Agência Europeia de Medicamentos (EMA) (CPMP/QWP/122/02,rev 1), assim como agências nacionais, como a ANVISA (RDC nº 45 do ano 2012) e outros órgãos científicos como as farmacopeias (USP capítulos <2> e <1086>) (FDA, 2018; ICH, 2003; ICH (2), 2016; ICH, 1999; EMA, 2007; WHO, 2009; BRASIL, 2012; UNITED (2), 2018; HOLM; ELDER, 2016; MORAES DO CARMO; PEREIRA; GRATIERI, 2018).

Nos últimos anos, o FDA solicitou estritamente o balanço de massa nos métodos para provar a especificidade e a capacidade de quantificar as impurezas de degradação. A falta do equilíbrio de massa leva há uma suspeita na capacidade do método de quantificar exatamente todos os produtos de degradação. O equilíbrio de massa é sempre desafiador para avaliar com precisão. O desequilíbrio de massa, além de gerar respostas variadas do analito e dos produtos de degradação, pode acontecer devido à potencial perda de produtos de degradação voláteis, formação de compostos não cromóforos, e no caso da HPLC, formação de eluentes precoces e retenção de compostos na coluna (SHARMA; MURUGESAN, 2017). Os níveis em torno de 1 a 2% de balanço de massa normalmente não serão questionados, no entanto, valores mais altos atraem a atenção e perguntas, e portanto, precisam ser explicados pelos laboratórios (ZHOU; PORTER; ZHANG, 2017). Como regra geral, uma variabilidade padrão total de cerca de 5% para o balanço de massa pode ser considerada não-crítica, dependendo do número e nível de impurezas obtidas. Em níveis de 5% ou mais, a relevância e a aplicabilidade da diretriz ICH M7 devem ser consideradas para avaliação de mutagenicidade, que deve ser discutida caso a caso e dependendo de sua probabilidade de formação sob condições de armazenamento a longo prazo. O guia Q1E do ICH (avaliação da estabilidade) descreve que a adequação do balanço de massa deve ser avaliada. Especialmente todos os fatores que poderiam causar uma aparente falha no balanço de massa precisam ser

considerados, incluindo o mecanismo (s) de degradação dos princípios ativos (ZHOU; PORTER; ZHANG, 2017).

3.4 Degradação forçada

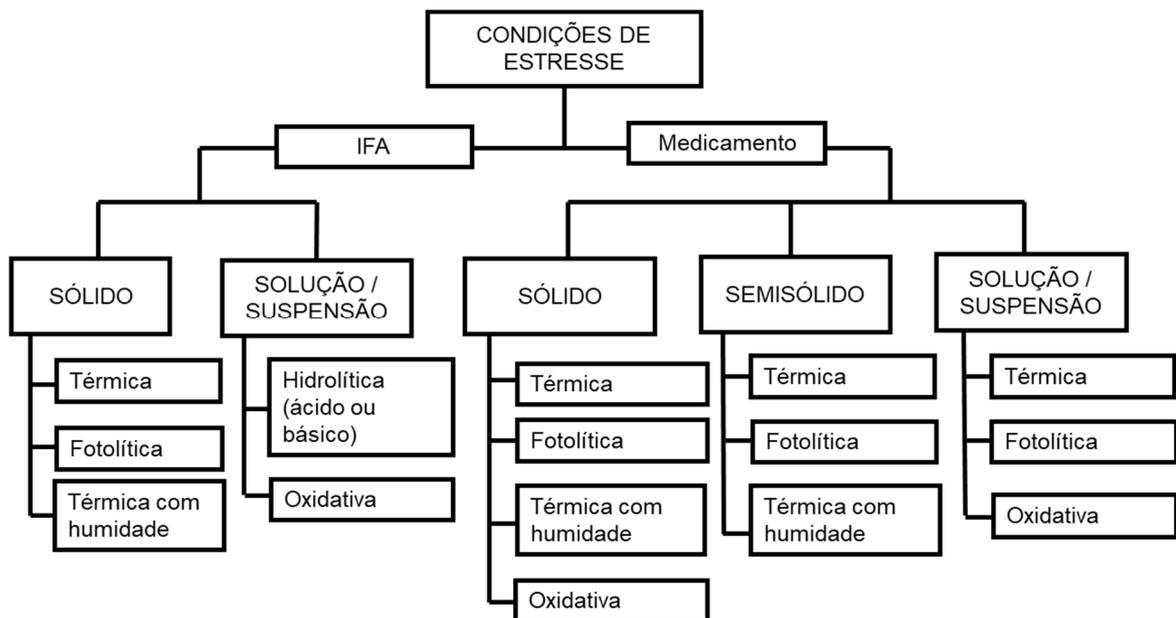
Define-se como degradação forçada, ou teste de estresse, um processo que envolve a degradação do IFA e medicamento em condições mais severas do que as condições de estabilidade acelerada. Esse processo gera produtos de degradação que podem ser estudados para determinar a estabilidade da molécula e o produto (BLESSY et al., 2014). O estudo da degradação forçada é uma ferramenta útil para prever a estabilidade relacionada à pureza, potência e segurança de uma substância ou medicamento; em consequência, é importante conhecer o perfil e comportamento das impurezas de uma substância sob várias condições de estresse (SHARMA; MURUGESAN, 2017).

A degradação forçada é uma ferramenta útil porque podem ser atingidos os seguintes objetivos: a) estabelecer vias de degradação de IFAs e medicamentos, b) distinguir produtos de degradação em formulações que estão relacionadas ao IFA daquelas que estão relacionadas aos excipientes, c) elucidar a estrutura dos produtos de degradação, d) determinar a estabilidade intrínseca do IFA na formulação, e) revelar os mecanismos de degradação do fármaco e medicamento, f) estabelecer a natureza indicativa de estabilidade de um método desenvolvido, g) entender a química do IFA, h) gerar formulações mais estáveis, i) gerar um perfil de degradação que imite o que seria observado em um estudo de estabilidade formal sob condições dos organismos regulamentares, j) determinar as condições corretas de armazenamento e embalagem, k) resolver problemas relacionados à estabilidade (por exemplo, balanço de massa), e l) facilitar melhorias no processo de fabricação e formulações em paralelo com estudos farmacêuticos acelerados (DEOKATE; GORDE, 2014; BLESSY et al., 2014; SHARMA; MURUGESAN, 2017).

As diretrizes do FDA e do ICH determinam a exigência de degradação forçada, para reconhecer como a qualidade de uma substância e medicamento varia com o tempo e com diferentes fatores ambientais. Essas diretrizes obrigam a realização dos estudos de degradação forçada sob uma variedade de condições, contudo as

condições experimentais adequadas para esses estudos (temperatura, duração e extensão da degradação, etc.) não são especificadas em detalhe. A natureza do teste de estresse depende da substância individual do fármaco e do tipo de medicamento envolvidos (SENGUPTA; CHATTERJEE; TEKADE, 2018). Algumas recomendações sobre parâmetros comuns de degradação forçada são mostradas na Figura 3.

Figura 3 – Recomendação sobre parâmetros comuns de degradação forçada a serem incluídos no teste de estresse de IFA e medicamento.



FONTE: Adaptado de (SENGUPTA; CHATTERJEE; TEKADE, 2018)

A questão da extensão de degradação tem sido o tópico de muitas discussões entre cientistas farmacêuticos. Degradação de fármacos entre 5 e 20% foi aceito como razoável para validação de testes cromatográficos. Alguns cientistas farmacêuticos determinam que 10% de degradação é suficiente para fármacos que possuem limites de estabilidade aceitável de 90%. O estresse excessivo dos fármacos podem levar à formação de produtos de degradação secundários, que não poderiam ser vistos em estudos de estabilidade formais, no entanto, baixos níveis de estresse não geram produtos de degradação suficientes (ZIMMER, 2018).

Segundo a ANVISA, os estudos de degradação forçada são aqueles estudos que permitem a geração de produtos de degradação, através da exposição do IFA e

produto acabado sob condições de estresse como, por exemplo, luz, temperatura, calor, umidade, hidrólise ácida/básica, oxidação e íons metálicos (BRASIL (2), 2015).

3.4.1 Hidrólise ácida/básica

Os estudos de hidrólise são geralmente realizados em ácido e base. Nestas reações químicas o fármaco se decompõe reagindo com água. As soluções ácidas e básicas são utilizadas para realizar a hidrólise a uma ampla gama de pH (por exemplo, 2 a 12). Os reagentes comumente utilizados para a hidrólise ácida são ácido clorídrico e ácido sulfúrico, e para a hidrólise básica, hidróxido de sódio ou hidróxido de potássio. A concentração de ácido ou base depende da estabilidade molecular. Inicialmente, o estudo de estresse deve ser realizado à temperatura ambiente, se a degradação desejada não for alcançada, então a combinação de condições de estresse (por exemplo, temperatura) pode ser aplicada. As amostras de degradação ácida ou base devem ser neutralizadas com a mesma concentração de base e ácido, respectivamente, para evitar mais reação de degradação. Cossolventes podem ser utilizados se os compostos forem pouco solúveis em água (TAMIZI; JOUYBAN, 2016; BAERTSCHI; ALSANTE; REED, 2016).

3.4.2 Oxidação

O peróxido de hidrogênio é largamente utilizado para a oxidação de fármacos em estudos de degradação forçada, mas também podem ser utilizados outros agentes oxidantes, tais como, íons metálicos, oxigênio e iniciadores de radicais (por exemplo, azobisisobutironitrilo, (AIBN)). A seleção de um agente oxidante, assim como, sua concentração e condições dependem do fármaco. É relatado que submeter as soluções a 0,1 - 3% de peróxido de hidrogênio em pH neutro, e temperatura ambiente por sete dias ou até um máximo de 20% de degradação poderia gerar produtos de degradação relevantes. O estresse combinado (temperatura elevada) deve ser evitado com peróxido de hidrogênio, porque quimicamente, no peróxido de hidrogênio as ligações O-O não são exatamente estáveis, e o composto se decompõe a temperatura elevada. O aquecimento de uma solução de peróxido de hidrogênio quebra essas ligações ainda mais rapidamente, o que leva à hidrólise do fármaco em

vez de oxidação. A degradação oxidativa do fármaco envolve um mecanismo de transferência de elétrons para formar ânions e cátions reativos, aminas, sulfetos e fenóis que são suscetíveis à oxidação por transferência de elétrons para fornecer N-óxidos, hidroxilamina, sulfonas e sulfóxido. O grupo funcional com hidrogênio lábil, como o carbono benzílico, o carbono alílico e o carbono terciário ou as posições α em relação ao heteroátomo é suscetível à oxidação para formar hidroperóxidos, hidróxido ou cetona (DEOKATE; GORDE, 2014; BAERTSCHI; ALSANTE; REED, 2016; ZHOU; PORTER; ZHANG, 2017).

3.4.3 Fotólise

O teste de estabilidade fotoelétrica de substâncias medicamentosas deve ser avaliado para demonstrar que a exposição à luz não resulta em alterações inaceitáveis. Estudos de estabilidade fotoelétrica são realizados para gerar degradantes primários da substância farmacológica por exposição a condições UV ou fluorescentes. Algumas condições recomendadas para testes de fotoestabilidade são descritas nas diretrizes da ICH Q1B. As amostras da substância e do medicamento sólido / líquido devem ser expostas a um mínimo de 1,2 milhões de luz horas e 200 W/m² de luz. O comprimento de onda mais comumente aceito da luz está na faixa de 300 a 800 nm. Essas condições de estresse podem induzir foto oxidação por mecanismo de radicais livres. Grupos funcionais como carbonilas, nitro-aromáticos, N-óxidos, alcenos, cloretos de arila, ligações fracas de C-H e O-H, sulfetos e polienos provavelmente geram reações de fotossensibilidade (ICH, 1996; WELANKIWAR et al., 2013; BAERTSCHI; ALSANTE; REED, 2016).

3.4.4 Termólise

A degradação térmica, por exemplo, calor seco e calor úmido, deve ser realizada em condições mais extenuantes do que as condições recomendadas nos estudos de estabilidade aceleradas. Amostras de substâncias medicamentosas no estado sólido e medicamentos devem ser expostas ao calor seco e úmido, enquanto os medicamentos líquidos devem ser expostos ao calor seco. Os estudos podem ser conduzidos em temperaturas mais altas por um período mais curto. A degradação térmica envolve diferentes reações como pirólise, hidrólise, descarboxilação,

isomerização, rearranjo e polimerização. O estudo de degradação térmica é realizado a 40-80 °C (BAERTSCHI; ALSANTE; REED, 2016; ZHOU; PORTER; ZHANG, 2017).

3.4.5 Umidade

A umidade é um dos fatores chave no estabelecimento dos potenciais degradantes no produto acabado e no IFA. Para o estabelecimento de amostras neste tipo de degradação, recomenda-se 90% de umidade durante uma semana (ICH, 2003; BAERTSCHI; ALSANTE; REED, 2016).

3.4.6 Íons metálicos

Este tipo de degradação antes era um teste opcional, mas com a nova RDC 53 da ANVISA tornou-se mandatório para o estudo de degradação forçada. Este teste também é uma forma de degradação por oxidação, em que, a adição de íons metálicos em soluções contendo o fármaco, é também uma ferramenta importante para verificar a tendência do composto à oxidação. São testes realizados com soluções de Fe^{3+} ou Cu^{2+} , em concentrações, geralmente de $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ (BRASIL (1), 2015; BAERTSCHI; ALSANTE; REED, 2016).

3.5 Identificação de produtos de degradação

A identificação e caracterização de produtos de degradação devem ser realizadas com base nos resultados de estabilidade, de acordo com os requisitos da ICH. As técnicas convencionais (por exemplo, HPLC) ou técnicas hífenadas (por exemplo, LC-MS, LC-RMN, HPLC-RMN, CE-MS) podem ser utilizadas na identificação e caracterização dos produtos de degradação. Deve-se notar que a caracterização estrutural de produtos de degradação é necessária para as impurezas que são formadas durante os estudos de estabilidade. O detector deve conter recursos de dados 3D, como detectores de arranjo de diodos (DAD) ou espectrômetros de massas, para detectar a não homogeneidade espectral (GÖRÖG, 2018). A limitação do DAD surge quando os espectros UV são semelhantes para o pico do analito e impureza ou pico de degradação; além disso, quando o nível de ruído do sistema é elevado, ele pode mascarar as impurezas ou degradantes coeluentes.

Compostos de massas moleculares e grupos funcionais semelhantes, tais como diastereoisómeros, podem exibir espectros UV semelhantes. Nesses casos, devem ser feitas tentativas para modificar os parâmetros de análise para obter a separação necessária. Deve-se selecionar o comprimento de onda ótimo para detectar e quantificar todas as impurezas e degradantes potenciais. Uma ferramenta valiosa no desenvolvimento de métodos é a sobreposição de sinais de separação em diferentes comprimentos de onda, para descobrir diferenças nos espectros dos picos (BAERTSCHI; ALSANTE; REED, 2016).

3.6 Eletroforese capilar (CE) e eletroforese capilar acoplada à espectrometria de massas (CE-MS)

3.6.1 Eletroforese Capilar (CE)

A técnica de eletroforese refere-se ao movimento de íons ou espécies carregadas sob a influência de um campo elétrico. Basicamente, é uma técnica de separação baseada em forças elétricas onde os analitos são separados com base em sua mobilidade eletroforética diferente sob uma tensão aplicada. A mobilidade eletroforética depende da carga de analitos e da viscosidade do eletrólito de fundo (BGE), o movimento dos analitos é diretamente proporcional ao potencial aplicado. A eletroforese capilar é referida à eletroforese realizada em capilares. A CE é uma técnica de alta velocidade, boa sensibilidade, baixo limite de detecção e quantificação com preço experimental econômico (AHUJA, 2008).

A configuração do equipamento de eletroforese capilar consiste em injetor, capilar, eletrodos, vasos do eletrólito, fonte de alimentação de alta voltagem, detector e registrador. A amostra é carregada no capilar no final da injeção. A corrente elétrica é fornecida por uma fonte de alimentação de alta voltagem. As zonas de migração da amostra são detectadas na extremidade de detecção do capilar por um detector (O'FLAHERTY; NUNNALLY, 2008).

A separação dos compostos ocorre pela aplicação de voltagem, de modo que os cátions migram para o polo negativo (cátodo) e os ânions migram para o polo positivo (ânodo). Esta mobilidade eletroforética das partículas é determinada pelo tamanho e número de cargas dos íons: na separação, quanto menor o íon e maior a

sua carga mais rapidamente será a saída deste íon. A velocidade em que ocorre esta separação depende da diferença de potencial (ddp) aplicada. Outro fator importante na mobilidade dos íons é o pH das soluções, a mobilidade pode ser influenciada pelo valor do pKa, portanto quanto mais ionizada a partícula maior será sua mobilidade. Partículas neutras não são atraídas aos polos e seguem o fluxo eletrosmótico (JIMIDAR, 2008). O fluxo eletrosmótico é a força responsável pelo transporte dos solutos, independente da carga, ao longo do capilar e ocorre pela ionização dos grupos silanóis presentes na sílica no interior do capilar. O fluxo é gerado quando cátions presentes no eletrólito de corrida são atraídos pelos grupos silanóis formando uma camada fixa próxima à parede interna do capilar, uma segunda camada móvel de cátions é formada migrando no sentido do cátodo, na aplicação de um campo elétrico, e deslocando o volume da solução contida no capilar (AHUJA, 2008).

Ao longo do tempo, diversas mudanças foram feitas na eletroforese capilar levando a diferentes modos de eletroforese. Os tipos mais significativos são eletroforese capilar de zona (CZE) ou eletroforese capilar de solução livre (FSCE), eletroforese capilar em gel (CGE), focalização isoeletrica capilar (CIEF), cromatografia eletrocínética micelar (MEKC), cromatografia eletrocínética por microemulsão (MEEKC), eletroforese capilar por afinidade (ACE) e eletrocromatografia capilar (CEC). Esses modos de eletroforese capilar variam nos princípios de funcionamento e, conseqüentemente, podem ser usados para uma variedade de aplicações. Entre os diferentes tipos de eletroforese capilar, a FSCE é a mais aceita por causa de sua extensa gama de aplicações (JIMIDAR, 2008).

3.6.2 Eletroforese capilar acoplado à espectrometria de massas (CE-MS)

Dos métodos para avaliação de perfil de impureza de fármacos, a eletroforese capilar acoplado à espectrometria de massa (CE-MS) é definitivamente o segundo lugar atrás de CLAE-MS (GÖRÖG, 2018).

A CE-MS é uma poderosa técnica analítica que combina alta eficiência, curto tempo de análise, alta seletividade e versatilidade de separação da CE, com a seletividade, sensibilidade e possibilidade de identificação e elucidação estrutural de analitos desconhecidos desde o ponto de vista da detecção do MS. Estes benefícios

predeterminam a CE-MS como ferramenta analítica de alto potencial para a separação enantiomérica de fármacos e seus metabolitos em várias matrizes e amostras (por exemplo, materiais farmacêuticos a granel, produtos finais, urina, sangue, soro, etc.) (CINDRIC; MATYSIK, 2015). O ponto crítico da realização da conexão CE-MS é a transferência dos íons separados do capilar de separação para a fonte de íons do MS. Ao usar a combinação on-line do CE-MS, essa transferência é fornecida por uma interface especial. A separação em si é realizada em um capilar de sílica fundida em eletrólitos predominantemente aquosos, enquanto a detecção dos íons produzidos na fonte de íons é realizada em um analisador de massa situado no MS sob alto vácuo (SCHAPPLER; GONZÁLEZ-RUIZ; RUDAZ, 2016).

Para a realização da técnica on-line CE-MS, apenas algumas técnicas de ionização são disponíveis e adequadas de utilizar. Essas fontes de íons pertencem às técnicas de ionização por eletrospray (ESI), ionização química por pressão atmosférica (APCI), fotoionização a pressão atmosférica (APPI), plasma indutivamente acoplado (ICP), bombardeamento rápido de átomos (FAB) e ionização e dessorção a laser assistida por matriz (MALDI). No caso do CE-MS, a fonte de íons mais comumente usada é a ESI, que permite a transferência relativamente simples dos íons na fase líquida do capilar de separação para a fase gasosa na fonte de íons MS. A conexão de CE para MS realiza uma transferência direta dos analitos separados da etapa CE para o detector MS. A aplicação do CE-ESI-MS cobre mais de 99% dos trabalhos atualmente publicados, e isso é similar quando o CE-ESI-MS é usado para a análise de compostos quirais (VOETEN et al., 2018).

3.7 Metodologias disponíveis na literatura

Entre os principais compêndios farmacopeicos, apenas a USP-NF, a *European Pharmacopeia* (Ph. Eur.) e a *British Pharmacopeia* (BP) apresentam monografias relacionadas ao aripiprazol e medicamentos contendo este IFA. A edição atual da Farmacopeia Brasileira (6ª Edição, 2019, última atualização pela RDC nº 609 de 9 de março de 2022) não apresenta monografias mencionando este IFA nem medicamentos relacionados a ele.

A Tabela 3 resume os compêndios farmacopéicos que possuem monografias para as diferentes formas do IFA e os produtos farmacêuticos que o contém.

Tabela 3 – Monografias relacionadas ao aripiprazol e sua disponibilidade nas edições atuais dos principais compêndios farmacopéicos. (√) disponível na edição atual; (-) ausente

Princípio ativo / Produto	Compendio farmacopéico		
	USP 45 - NF 40	BP 2022	Ph. Eur. 10 th
Aripiprazol	√	√	√
Tabletas	√	-	-
Tabletas de desintegração oral	√	-	-

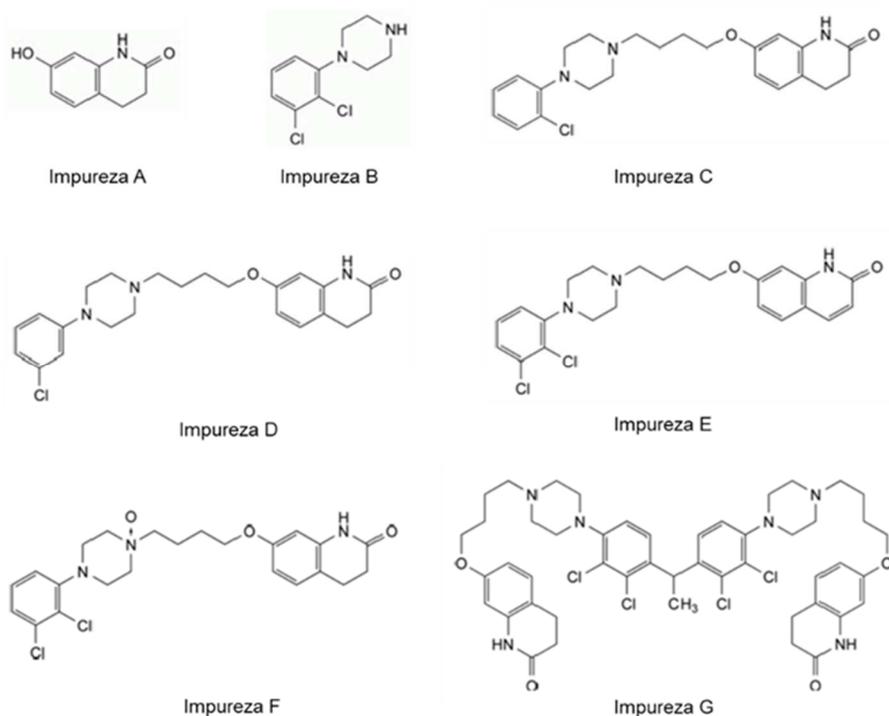
Fonte: Farmacopeias USP 45 - NF 40, BP 2022 e Ph. Eur. 10th

Nas monografias da matéria-prima mencionadas na Tabela 3, listam-se testes necessários para avaliar a qualidade do IFA. Estes testes incluem: identificação, aparência da solução, teor, impurezas (resíduos de incineração e impurezas orgânicas) e perda por secagem. Os parâmetros requeridos nas monografias da USP-NF para os medicamentos contendo aripiprazol incluem testes para identificação do IFA, utilizando espectrofotometria no infravermelho e cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Outras determinações incluem teor, dissolução, uniformidade de dose, impurezas orgânicas e desintegração.

Os métodos descritos para determinação de teor e impurezas orgânicas, na matéria-prima e medicamento, são feitos diante a técnica por HPLC com detecção UV. No caso da matéria-prima, os métodos da USP 45, BP 2022 e Ph. Eur. 10th são semelhantes em quanto às condições cromatográficas e concentrações de amostras. Além disso, utiliza-se o mesmo método para as duas determinações (teor e impurezas orgânicas).

Na monografia *Aripiprazole* da Ph. Eur. 10th é mencionado a determinação de 7 impurezas conhecidas (impurezas: A, B, C, D, E, F e G) (Figura 4), em quanto que na monografia da USP 45, são mencionados 3 (impurezas: F, G e 4,4'-dimero de aripiprazol).

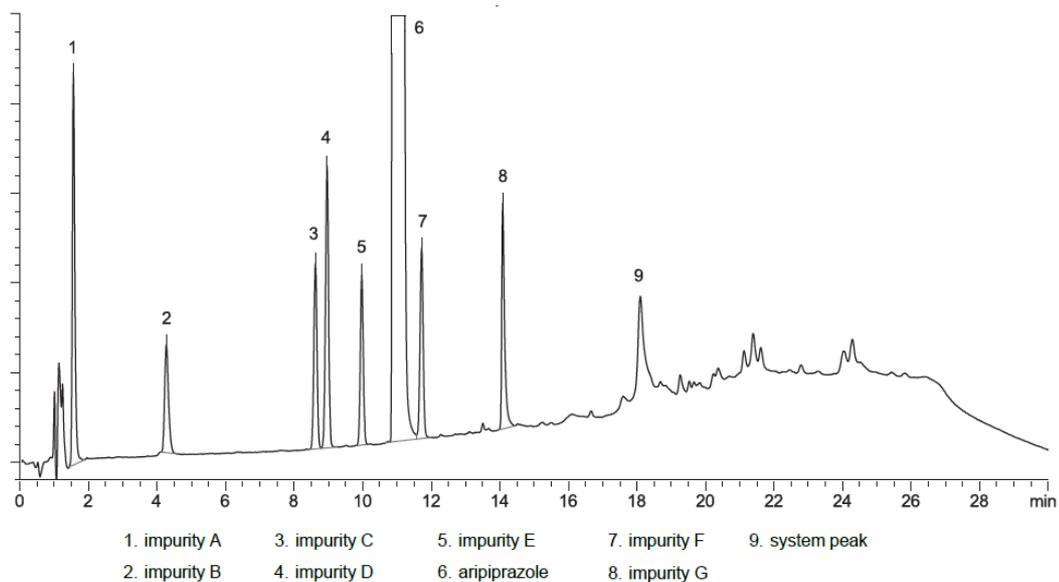
Figura 4 – Representação das impurezas mencionadas na monografia *Aripiprazole* na Ph.Eur.



Fonte: European Pharmacopeia. Ph. Eur. 10th

A Figura 5 mostra o cromatograma de referência disponível para a monografia de *Aripiprazole* da Ph. Eur.

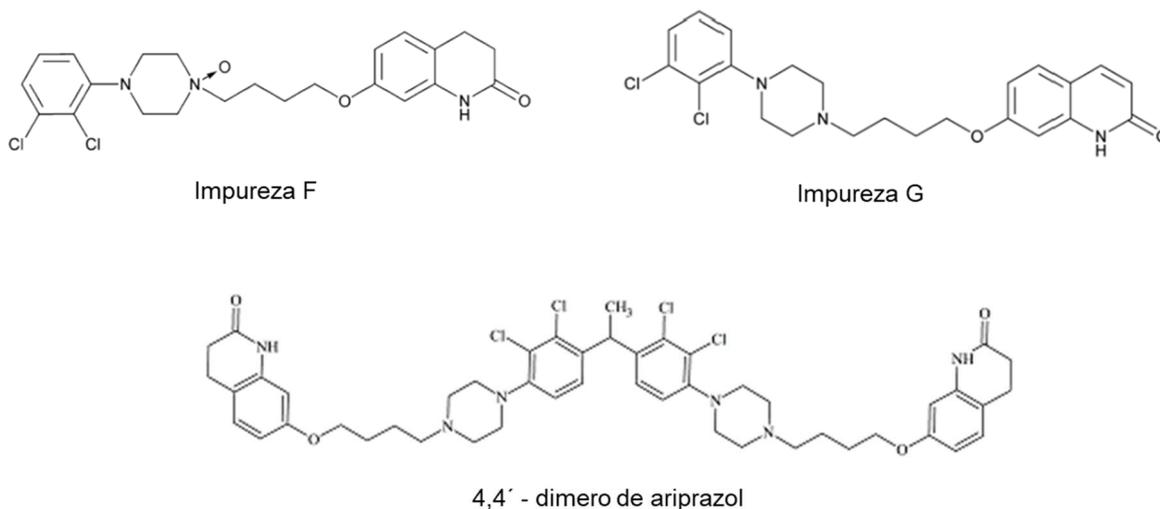
Figura 5 – Cromatograma de referência para o teste de impurezas da monografia de *Aripiprazole*.



Fonte: European Pharmacopeia. Ph. Eur. 10th

Caso contrário, nos métodos descritos na USP 45 para determinação de teor e impurezas orgânicas no medicamento, são utilizados sistemas cromatográficos e concentrações de amostras diferentes. Nessa monografia são mencionadas as mesmas impurezas da monografia para a matéria-prima. (impurezas: F, G e 4,4'-dimero de aripiprazol) (Figura 6).

Figura 6 – Representação das impurezas mencionadas na monografia *Aripiprazole tablets* da USP.



Fonte: United States Pharmacopeia, USP 45 - NF 40.

Estudos prévios utilizaram métodos para determinação do aripiprazol em fluidos farmacêuticos e biológicos por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (NERKAR et al., 2009; PAI; DUBHASHI, 2010; KALAICHELVI; THANGABALAN; RAO, 2010; NARAYANA; CHANDRASEKHAR, 2012; MONDAL; RANI; ALEKHYA, 2013; RMANDIĆ; MALENOVIĆ, 2020), cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS) (KUBO et al., 2005; REDDY et al., 2010; PATEL et al., 2013; KRISHNA; RAO; VENUGOPAL, 2017), espectrofotometria (KALAICHELVI et al., 2009; JAIN et al., 2011; SANDEEP; INDURI; SUDHAKAR, 2013), métodos voltamétricos (AŞANGIL; TAŞDEMIR; KILIÇ, 2012; MERLI et al., 2013) e métodos de eletroforese capilar (CE) (MUSENGA et al., 2008; HWANG et al., 2010; TSAI et al., 2011). Para a determinação do aripiprazol e dehidroaripiprazol no plasma, Hwang et al. (2010) desenvolveram um pré-tratamento da amostra por extração líquido-líquido (ELL) utilizando éter dietílico e posterior quantificação por eletroforese capilar de zona (CZE), com injeção da amostra amplificada por campo na coluna (FASI-CZE). Os

analitos foram determinados em 12 minutos. Por outro lado, no estudo de Tsai et al. (2011), foi desenvolvido um método de CE para quantificação do aripiprazol e dehidropiprazol em amostras de sangue de pacientes psiquiátricos usando 80 mmol L⁻¹ 2-3% de dimetilsulfóxido-fosfato como tampão em pH 3, e tempo de retenção de 30 minutos. Em geral, esses métodos avaliam o aripiprazol e seus respectivos metabólitos médios em amostras biológicas, entretanto, não foram encontrados métodos de EC que avaliem a estabilidade e os produtos de degradação do aripiprazol em produtos farmacêuticos. Tendo em vista os fatores relatados, os objetivos da pesquisa são desenvolver, otimizar e validar um método CZE indicador de estabilidade para determinação do aripiprazol em produtos farmacêuticos, e na presença de produtos de degradação oxidativa do aripiprazol. Complementarmente, para otimização dos métodos farmacêuticos será aplicado o conceito de planejamento de experimentos no estudo da degradação forçada do aripiprazol.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

4.1.1 Substâncias de referência

- Aripiprazol substância química de referência com grau de pureza de 100,1%, fornecido gentilmente pela empresa APSEN Farmacêutica S.A. (São Paulo, Brasil).
- Cloridrato de prometazina substância química de referência com grau de pureza de 97,0%. (Sigma Aldrich, São Paulo – Brasil)

4.1.2 Amostra

- Aristab® Comprimidos 10mg do fabricante Aché foi utilizado no desenvolvimento da metodologia e como amostra nos estudos de degradação forçada. Esse medicamento foi adquirido como amostra medica gentilmente doada em farmácia de manipulação local.

4.1.3 Placebo

O placebo foi formulado com os mesmos excipientes utilizados na formulação comercial utilizada na validação da metodologia. A formula empregada na preparação do placebo do Aristab® Comprimidos foi a seguinte: monohidrato de lactose, amido de milho, celulose microcristalina, hidroxipropilcelulose, estearato de magnésio e óxido de ferro vermelho).

4.1.4 Reagentes

- Acetato de amônio (Synth);
- Acetonitrila grau HPLC (Merck);
- Ácido acético glacial (J.T.Baker);
- Ácido clorídrico P.A (Merck);
- Ácido o-Fosfórico P.A (Merck);
- Ácido fórmico (Merck);
- Água ultra-puificada Milli-Q (Millipore Corporation, EUA)
- Formiato de amônio P.A (Synth);
- Hidróxido de sódio P.A (Synth);
- Metanol grau HPLC (Merck);
- Peroxido de hidrogênio 30% P.A (J.T.Baker);

4.1.5 Equipamentos

- Sistema de eletroforese capilar P/ACE MDQ (Beckman and Coulter Instruments, Fullerton, CA, USA) equipado com detector UV-VIS, com arranjo de diodos operado em conjunto com o software Karat® V.8.0 para aquisição e tratamento de dados.
- Sistema de eletroforese capilar Agilent 7100 (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, USA) equipado com detector UV-VIS com arranjo de diodos operado em conjunto com o software OpenLab ChemStation® para aquisição e tratamento de dados.
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência marca Thermo Scientific Dionex UltiMate 3000 com bomba quaternária, degaseificador online, amostrador automático, aquecedor/resfriador de coluna e detector tipo UV e DAD (Diode-Array Dectector) conjunto com o software Chromeleon para aquisição e tratamento de dados;
- Sistema cromatográfico LC-MS, marca Shimatzu (módulos: controladora CBM-20^a, bombas LC-20AD, detector: SPD-20 A, autoinjeter SIL-20AC, forno CTO-20^a), acoplado a espectrômetro de massas do tipo UHR-ESI-Q-TOF (Ultra High Resolution – 3G, Bruker Daltonics) com fonte de ionização por ESI.
- Câmara de fotoestabilidade Ethik 424CF
- Chapa de aquecimento - IKA® C-MAG HS 7
- Termómetro
- Banho-maria com circulação modelo Marconi
- Balança analítica Mettler Toledo®, modelo AB204;
- pHmetro digital modelo PG1800
- Banho ultra-sônico com aquecimento modelo 800^a

4.1.6 Consumíveis e outros materiais

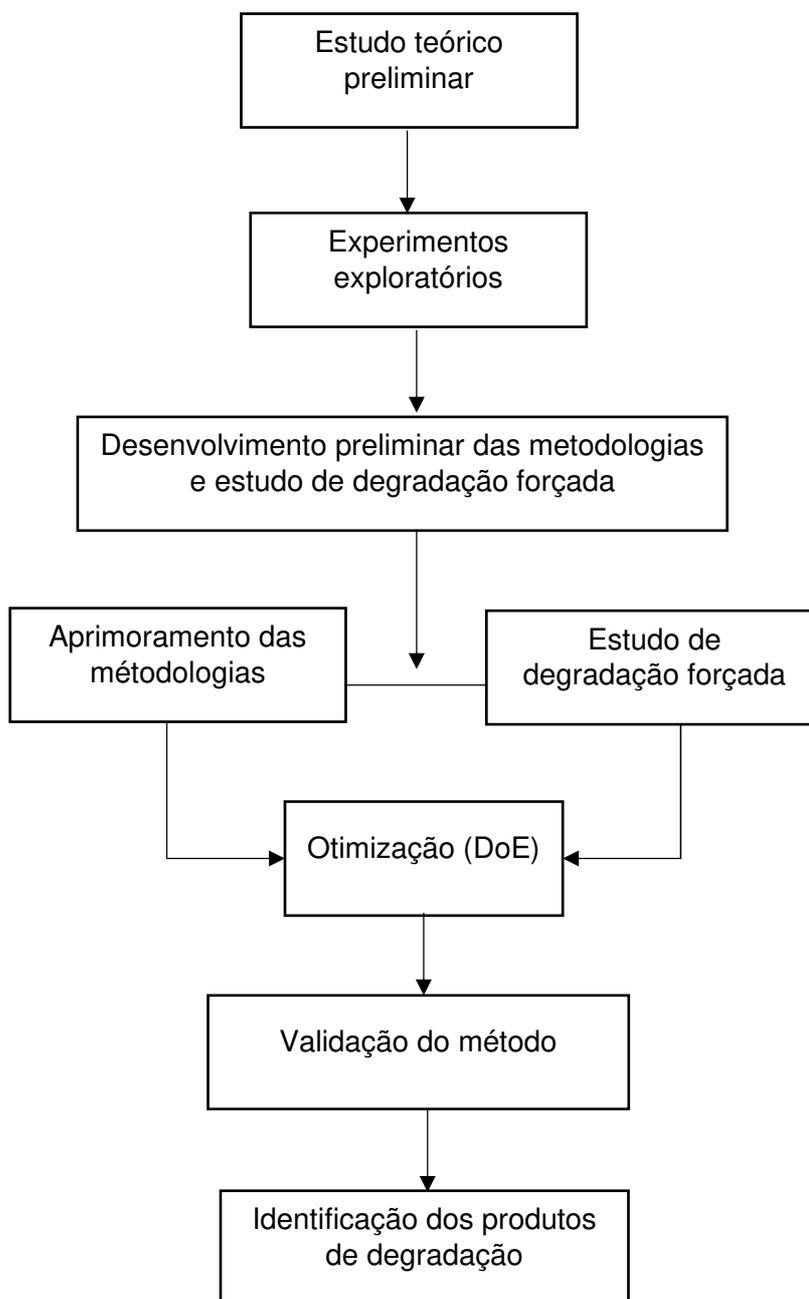
- Micropipeta monocal de 10 a 100 µL – Eppendorf®;
- Micropipeta monocal de 100 a 1000 µL – Eppendorf®;
- Micropipeta monocal de 500 a 5.000 µL – Transferpette®;

- Unidade filtrante Millex com membrana politetrafluoretileno (PTFE) com 13 mm de diâmetro e poro de 0,45 μm marca (Millipore);
- Unidade filtrante Millex com membrana fluoreto de polivinilideno (PVDF) com 13 mm de diâmetro e poro de 0,45 μm marca (Millipore);
- Membranas filtrantes HPDV 0,47 mm de diâmetro poro 0,45 μm marca Millipore;
- Colunas capilares de sílica fundida (Polymicro Technologies, USA) com diâmetro interno de 75 μm
- Coluna cromatográfica Eclipse XDB-C18 (150 x 4,6 mm) tamanho de partícula 5 μm , Agilent Technologies.

4.2 Métodos

Os métodos envolvidos no decorrer do presente estudo são mostrados no fluxograma da Figura 7.

Figura 7 – Fluxograma utilizado no desenvolvimento deste estudo.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

4.2.1 Estudo teórico preliminar

4.2.1.1 Características do fármaco e impurezas

Foi realizada o estudo das características do aripiprazol e suas impurezas conhecidas, para a delimitação das condições iniciais do desenvolvimento do método

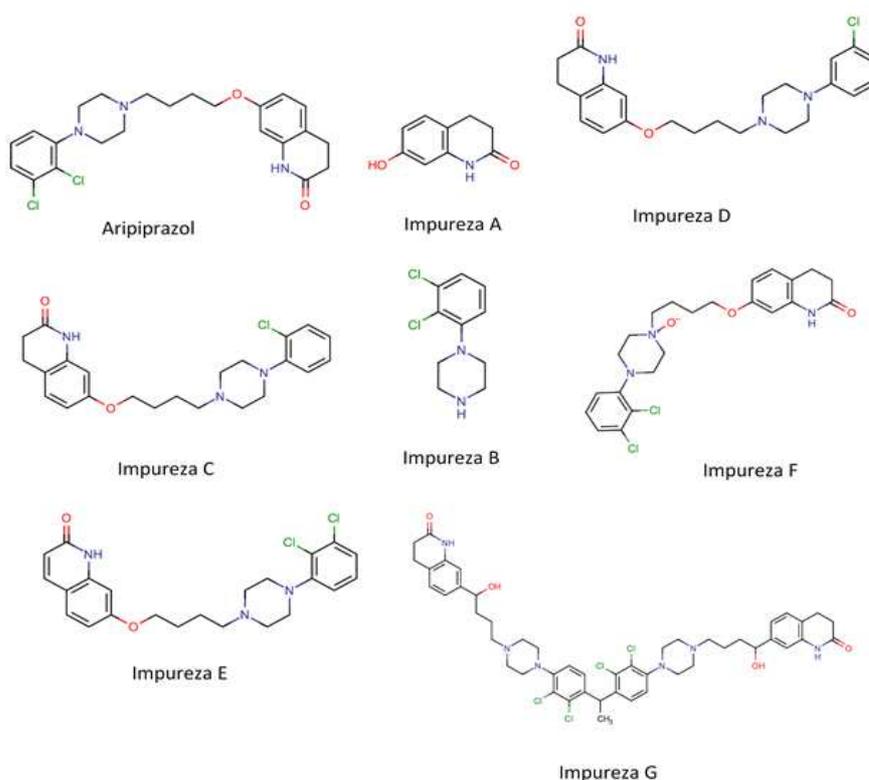
indicativo de estabilidade por CE, e posterior identificação dos possíveis produtos de degradação por CE-MS. O aripiprazol e suas impurezas conhecidas mencionadas nos compêndios USP-NF e Ph.Eur. estão descritas no Quadro 1 e representadas na Figura 8.

Quadro 1 - Aripiprazol e impurezas mencionadas nos compêndios USP-NF e Ph.Eur.

Composto / Impureza / Composto Relacionado	
USP	Ph. Eur.
Aripiprazol (M= 448,39 g/mol)	
-	Impureza A (M= 163,18 g/mol)
-	Impureza B (M= 231,12 g/mol)
-	Impureza C (M= 413,95 g/mol)
-	Impureza D (M= 413,95 g/mol)
Composto relacionado G de aripiprazol	Impureza E (M= 446,37 g/mol)
Composto relacionado F de aripiprazol	Impureza F (M= 464,39 g/mol)
4,4 dímero de aripiprazol	Impureza G (M= 920,31 g/mol)

Fonte: Ph. Eur. 10th e USP 45 - NF 40

Figura 8 – Representação do aripiprazol e impurezas mencionadas nos compêndios USP-NF e Ph.Eur.



Fonte: Ph. Eur. 10th e USP 45 - NF 40

4.2.1.2 Características da formulação em estudo e preparo do placebo

Foi preparado o placebo do medicamento com o objetivo de determinar possíveis interferências dos excipientes da formulação. A preparação do placebo foi baseada no medicamento Aristab® 10,00 mg/comprimido do laboratório Aché, que segundo a bula descrita pela EMA apresenta os seguintes excipientes: lactose monohidratada, amido, celulose microcristalina, hidroxipropil celulose, estearato de magnésio e corante óxido de ferro vermelho. Esse produto apresenta fórmula qualitativa similar do produto de referência Abilify® 10,00 mg/comprimido do laboratório Bristol-Myers Squibb, conforme bula descrita pela EMA (European Medicines Agency (EMA, 2018). A quantidade de cada excipiente foi calculada levando-se em consideração o percentual de concentração descrito em manuais de excipientes farmacêuticos (SHESKEY et al., 2020). A formula quali-quantitativa utilizada se apresenta na Tabela 4.

Tabela 4 - Componentes qualitativos e quantitativos simulados da formulação de referência de aripiprazol 10,00 mg/comprimido.

Componente da formulação	Quantidade (mg)
Aripiprazol	10,00
Lactose monohidrado	50,00
Amido	15,00
Hidroxipropil celulose	1,30
Celulose microcristalina	22,68
Estearato de magnesio	1,00
Corante óxido de ferro vermelho	0,02

Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

4.2.2 Experimentos exploratórios

4.2.2.1 Desenvolvimento preliminar de metodologias

4.2.2.1.1 Eletroforese capilar de zona (CZE) e Cromatografia eletrocinética micelar (MECK)

Foi preparada uma solução estoque de padrão de aripiprazol na concentração de 1,0 mg/mL; para isso foram pesados analiticamente 25 mg do padrão de aripiprazol e transferidos para um balão volumétrico de 25 mL, adicionaram-se 20 mL de acetonitrila, levou-se a ultrassom por 5 minutos. Após solubilização total, o volume do

balão foi completado com o mesmo solvente. Esta solução foi armazenada sob refrigeração de 2 - 8°C. As soluções de trabalho foram preparadas antes do uso, misturando-se 1000 µL de solução padrão estoque de aripiprazol (1,0 mg/mL) com posterior diluição com diluente em balão volumétrico de 10 mL (100 µg/mL). A solução foi filtrada por meio de um filtro de membrana de PTFE de 0,45 µm e injetada no sistema eletroforético. No início de cada dia de análise, o capilar foi acondicionado por meio da lavagem com NaOH (0,1 mol/L) por 30 minutos, seguido de água ultrapura por 20 minutos e, em seguida, com o eletrólito de corrida por 30 minutos. O capilar foi lavado com NaOH (0,1 mol/L) por 1 min entre as corridas, seguido de água ultrapura por 1 minuto e, finalmente, com o eletrólito por 2 min. Na troca de eletrólitos, o novo eletrólito a ser testado foi acondicionado por 15 minutos. Para o método de eletroforese capilar em zona, foram testados os eletrólitos de acetato de amônio e formiato de amônio na concentração de 10 mmol/L e pH de 3,0. Para o método de cromatografia eletrocínética micelar, foram testados os eletrólitos de tetraborato de sódio 25 mmol/L e dodecil sulfato de sódio 25 mmol/L, pH 9,5, e TRIS (tris-hidroximetil aminometano) 25 mmol/L e dodecil sulfato de sódio 25 mmol/L, pH 9,5. As condições eletroforéticas iniciais estabelecidas foram: capilar de sílica fundida comprimento total de 30,2 cm x 75 µm d.i.; tensão: +12kV; temperatura: 25 °C, injeção hidrodinâmica: 0,4 psi/5s; detecção UV: 214nm.

4.2.2.1.2 Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

Foi preparada uma solução estoque de padrão de aripiprazol na concentração de 1,0 mg/mL; para isso foram pesados analiticamente 25 mg do padrão de aripiprazol e transferidos para um balão volumétrico de 25 mL, adicionaram-se 20 mL de acetonitrila, levou-se a ultrassom por 5 minutos. Após solubilização total, o volume do balão foi completado com o mesmo solvente. Esta solução foi filtrada usando uma membrana PTFE de 0,45 µm e armazenada sob refrigeração de 2 - 8°C. As soluções de trabalho foram preparadas antes do uso, misturando-se 1000 µL de solução padrão estoque de aripiprazol (1,0 mg/mL) com posterior diluição com diluente em balão volumétrico de 10 mL (100 µg/mL). A solução foi filtrada por meio de um filtro de membrana de PTFE de 0,45 µm e injetada no sistema cromatográfico.

Foi avaliado o sistema cromatográfico de fase reversa (HPLC – RP) em modo isocrático, conforme descrito no Quadro 2.

Quadro 2 – Sistema cromatográfico de fase reversa em modo isocrático avaliado para o aripiprazol.

Método	HPLC - RP; Isocrático
Fase estacionária	Coluna Eclipse XDB-Phenyl (250 x 4,6mm x 5µm)
Fase Móvel	Ácido trifluoroacético 0,2% em água : Acetonitrila (55:45)
Fluxo	1 mL/min
Temperatura do forno de coluna	30 °C
Detector	UV-DAD
Comprimento de onda	214 nm
Equipamento	Cromatógrafo Modelo Thermo Scientific Dionex UltiMate 3000

Fonte: (SRINIVAS et al., 2008).

4.2.2.2 Estudo preliminar de degradação forçada

4.2.2.2.1 Preparo de soluções

Solução estoque de aripiprazol

Foram pesados analiticamente 50 mg do padrão de aripiprazol e transferidos para um balão volumétrico de 50 mL, adicionaram-se 30 mL de acetonitrila, levou-se a ultrassom por 5 minutos (concentração final: 1 mg/mL). Após total solubilização, o volume do balão foi completado com o mesmo solvente. Esta solução foi filtrada usando uma membrana PTFE de 0,45 µm e armazenada sob refrigeração de 2 – 8 °C. Esta solução foi diluída apropriadamente no momento da análise.

Solução padrão controle de aripiprazol

Foi transferido 1 mL da solução estoque de aripiprazol para um balão volumétrico de 10 mL, o volume do balão foi completado com diluente. Esta solução foi filtrada usando uma membrana PTFE de 0,45 µm (concentração final: 0,1 mg/mL)

Com o objetivo de avaliar a miscibilidade dos solventes utilizados no preparo das amostras para degradação forçada, foram preparadas soluções HCL 0,1, 0,5 e 1 mol/L; NaOH 0,1, 0,5 e 1 mol/L; H₂O₂ 1%, 3% e 6%. A proporção de miscibilidade entre a solução estoque de aripiprazol e as soluções degradantes foi de 1:1 (v/v)

- a) Solução de ácido clorídrico 0,1 mol/L: Adicionaram-se 4,2 mL de ácido clorídrico 37% em balão volumétrico de 500 mL contendo 200 mL de água. Após a solução atingir temperatura ambiente, completou-se o volume com água purificada.
- b) Solução de ácido clorídrico 0,5 mol/L: Adicionaram-se 21,0 mL de ácido clorídrico 37% em balão volumétrico de 500 mL contendo 200 mL de água. Após a solução atingir temperatura ambiente, completou-se o volume com água purificada.
- c) Solução de ácido clorídrico 1,0 mol/L: Adicionaram-se 42,0 mL de ácido clorídrico 37% em balão volumétrico de 500 mL contendo 200 mL de água. Após a solução atingir temperatura ambiente, completou-se o volume com água purificada.
- d) Solução de hidróxido de sódio 0,1 mol/L: 2 g de hidróxido de sódio foram pesados e transferidos para um balão volumétrico de 500 mL e dissolvidos com 200 mL de água purificada. Após a solução atingir temperatura ambiente, completou-se o volume com água purificada.
- e) Solução de hidróxido de sódio 0,5 mol/L: 10 g de hidróxido de sódio foram pesados e transferidos para um balão volumétrico de 500 mL e dissolvidos com 200 mL de água purificada. Após a solução atingir temperatura ambiente, completou-se o volume com água purificada.
- f) Solução de hidróxido de sódio 1,0 mol/L: 20 g de hidróxido de sódio foram pesados e transferidos para um balão volumétrico de 500 mL e dissolvidos com 200 mL de água purificada. Após a solução atingir temperatura ambiente, completou-se o volume com água purificada.

- g)** Solução de peróxido de hidrogênio 1%: Adicionaram-se 3,3 mL da solução de peróxido de hidrogênio 30% em balão volumétrico de 100 mL e completou-se com água purificada. Esta solução foi armazenada e protegida da luz sob refrigeração de 2 – 8 °C.
- h)** Solução de peróxido de hidrogênio 3%: Adicionaram-se 10 mL da solução de peróxido de hidrogênio 30% em balão volumétrico de 100 mL e completou-se com água purificada. Esta solução foi armazenada e protegida da luz sob refrigeração de 2 – 8 °C.
- i)** Solução de peróxido de hidrogênio 6%: Adicionaram-se 20 mL da solução de peróxido de hidrogênio 30% em balão volumétrico de 100 mL e completou-se com água purificada. Esta solução foi armazenada e protegida da luz sob refrigeração de 2 – 8 °C.

Com o objetivo de atingir as concentrações das condições de estresse, foram preparadas soluções degradantes no dobro da concentração uma vez que elas serão diluídas conforme modo de preparo descrito no Quadro 3.

1 mL solução degradante (X mol/L ou Y%) + 1 mL solução estoque = 2 mL amostra na condição de estresse X/2 mol/L ou Y/2%

Foram preparadas soluções degradantes de HCl 0,2 mol/L para a degradação por hidrólise ácida; NaOH 0,2 mol/L para a degradação por hidrólise alcalina; e H₂O₂ 6 % para a degradação oxidativa.

a) Solução de ácido clorídrico 0,2 mol/L: Adicionaram-se 8,4 mL de ácido clorídrico 37% em balão volumétrico de 500 mL contendo 200 mL de água. Após a solução atingir temperatura ambiente, completou-se o volume com água purificada.

b) Solução de hidróxido de sódio 0,2 mol/L: 4 g de hidróxido de sódio foram pesados e transferidos para um balão volumétrico de 500 mL e dissolvidos com 200

mL de água purificada. Após a solução atingir temperatura ambiente, completou-se o volume com água purificada.

c) Solução de peróxido de hidrogênio 6%: Adicionaram-se 20 mL da solução de peróxido de hidrogênio 30% em balão volumétrico de 100 mL e completou-se com água purificada. Esta solução foi armazenada e protegida da luz sob refrigeração de 2 – 8 °C.

Preparo de amostras degradadas

Para gerar as amostras a usarem no desenvolvimento do método, foram realizados ensaios de degradação forçada nas seguintes condições: hidrólise ácida e básica, oxidação, termólise e fotólise. Nesta etapa, as análises foram feitas utilizando o padrão de aripiprazol. Essas amostras foram preparadas conforme descrito no Quadro 3. O preparo das amostras para análise em HPLC e CE diferem no uso do diluente final, conforme seguinte:

a) Preparo de amostras para análise em HPLC

O diluente utilizado corresponde à fase móvel: ácido trifluoroacético 0,2% em água e acetonitrila (55:45). Todas as amostras foram filtradas por membrana PTFE de 0,45 µm.

b) Preparo de amostras para análise em CE

O diluente utilizado corresponde à mistura: acetonitrila, metanol, tampão formiato de amônio 6mmol/L (35:15:50, v/v/v) ajustado a pH 3 com ácido fórmico. Todas as amostras foram filtradas por membrana de PTFE de 0,45 µm.

Com o objetivo de aprimorar a precisão do método e sistema, foi avaliado o uso de um padrão interno. Foram testadas substâncias como clozapina, carbamazepina, risperidona e prometazina. Essas substâncias foram avaliadas em presença do aripiprazol e nas amostras onde foram encontradas presença de produtos de degradação. Além disso, foi avaliado a adição de um modificador orgânico na composição do eletrólito, com a finalidade de melhorar a resolução do pico do aripiprazol e os produtos de degradação obtidos nessa etapa preliminar do estudo. Para isso, foram preparados eletrólitos contendo metanol nas proporções de 5, 10, 20 e 40%.

Quadro 3 – Descrição dos procedimentos para preparo das amostras degradadas.

Condição de estresse	Modo de Preparo
Hidrólise ácida 0,1 mol/L	Tomou-se 1,0 mL de solução estoque de aripiprazol em acetonitrila e transferiu-se para balão volumétrico de 10mL. Acrescentou-se 1,0 mL de solução de ácido clorídrico 0,2 mol/L. Os balões foram levados para estufa a 60 °C por 1, 2, 3, 5, 8, 14 e 16 horas. Após a degradação, as soluções foram neutralizadas com hidróxido de sódio 0,2 mol/L. Os balões foram completados e homogeneizados com diluente. Concentração final: 0,1 mg/mL
Hidrólise básica 0,1 mol/L	Tomou-se 1,0 mL de solução estoque de aripiprazol em acetonitrila e transferiu-se para balão volumétrico de 10 mL. Acrescentou-se 1,0 mL de solução de hidróxido de sódio 0,2 mol/L. Os balões foram levados para estufa a 60 °C por 1, 2, 3, 5, 8, 14 e 16 horas. Após a degradação, as soluções foram neutralizadas com ácido clorídrico 0,2 mol/L. Os balões foram completados e homogeneizados com diluente. Concentração final: 0,1 mg/mL
Oxidação 3%	Tomou-se 1,0 mL de solução estoque de aripiprazol em acetonitrila e transferiu-se para balão volumétrico de 10 mL. Acrescentou-se 1,0 mL de solução de peróxido de hidrogênio 6%. Os balões foram levados para estufa a 60 °C por 1, 2, 3, 5, 8, 14 e 16 horas. Após degradação, os balões foram completados e homogeneizados com diluente. Concentração final: 0,1 mg/mL
Termólise	Transferiu-se aproximadamente 20 mg de padrão de aripiprazol na forma sólida para placa de Petri e foi exposta a aquecimento em estufa a 80°C e 105°C por 48 horas. Após degradação, pesou-se 5 mg de amostra e transferiu-se para balões volumétricos de 50mL. Adicionou-se 5 mL de acetonitrila e sonicou-se por 5 minutos. Os balões foram completados e homogeneizados com diluente. Concentração final: 0,1 mg/mL
Fotólise	Adicionaram-se aproximadamente 20 mg de padrão de aripiprazol para placa de Petri e foi exposta em câmara de fotoestabilidade por 50 horas e 5 dias. Após degradação, pesou-se 5 mg de amostra e transferiu-se para balões volumétricos de 50mL. Adicionaram-se 5 mL de acetonitrila e sonicou-se por 5 minutos. Os balões foram completados e homogeneizados com diluente. Concentração final: 0,1 mg/mL
Padrão controle	Tomou-se 1,0 mL de solução estoque de aripiprazol em acetonitrila e transferiu-se para balão volumétrico de 10mL. Os balões foram completados e homogeneizados com diluente. Concentração final: 0,1 mg/mL

Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

4.2.3 Aprimoramento e otimização da metodologia desenvolvida por eletroforese capilar em zona (CZE)

A solução onde ocorreu a degradação foi usada para o aprimoramento do método por CZE. As condições de CZE para a separação de aripiprazol e seus produtos de degradação foram investigadas variando a tensão aplicada (10 - 25 kV), temperatura capilar (20 - 30°C), tempo de injeção hidrodinâmica (3 - 6s), pH do eletrólito (pH 2,2 – 3,5), concentrações do eletrólito (5 – 25 mmol/L) e uso de modificador orgânico (metanol) como componente do eletrólito.

A otimização da metodologia permitiu melhorar a resolução entre os picos encontrados na degradação forçada oxidativa e o pico do aripiprazol. Ensaio analítico preliminares foram realizados para identificar os fatores significativos que afetam o desempenho do método por eletroforese capilar em solução livre. Foram avaliados os fatores de pH do eletrólito, concentração do eletrólito e a presença de modificador orgânico (metanol) diante um delineamento de experimentos (DoE) do tipo fatorial completo (2³). Os resultados obtidos dos experimentos preliminares foram levados em consideração para estabelecer os níveis (baixo e alto) de cada fator. As condições otimizadas do método foram avaliadas usando a ferramenta de otimização de resposta do software Minitab® V 18.

4.2.4 Aprimoramento da metodologia por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

O aprimoramento da metodologia por HPLC permitiu melhorar a resolução entre os picos encontrados na degradação forçada oxidativa e o pico do aripiprazol. Para isso, a metodologia avaliada por cromatográfica líquida de alta eficiência de fase reversa (HPLC–FR) em modo isocrático na etapa de experimentos preliminares foi adequada em modo gradiente. O critério de aceitação foi estabelecer resolução maior de 1,5, garantindo uma separação completa. As condições cromatográficas utilizadas em modo gradiente estão descritas no Quadro 4.

Quadro 4 – Sistema cromatográfico de fase reversa em modo gradiente avaliado para o aripiprazol.

Método	HPLC -RF; Gradiente		
Fase estacionária	Coluna Eclipse XDB-Phenyl (250 x 4,6mm x 5µm)		
Fase Móvel	Gradiente de Solução A y Solução B: Solução A: Ácido trifluoroacético 0,2% em água Solução B: Acetonitrila		
	Tempo (min)	Solução A (%)	Solução B (%)
	0	70	30
	2	70	30
	10	30	70
	18	10	90
	22	10	90
	24	70	30
	30	70	30
Fluxo	1 mL/min		
Temperatura do forno de coluna	30 °C		
Detector	UV-DAD		
Comprimento de onda	214 nm		
Equipamento	Cromatógrafo Modelo Thermo Scientific Dionex UltiMate 3000		

Fonte: Adaptado de (SRINIVAS et al., 2008).

4.2.5 Validação da metodologia desenvolvida por eletroforese capilar em zona (CZE)

4.2.5.1 Preparação das soluções estoque e soluções de trabalho

A solução padrão estoque de aripiprazol foi preparada pesando-se 25 mg de padrão aripiprazol em um balão volumétrico de 25 mL, e dissolvendo-se o conteúdo em acetonitrila (concentração final de 1000 µg/mL). A solução estoque de prometazina (padrão interno) foi preparada dissolvendo-se 50 mg de padrão de prometazina em um balão volumétrico âmbar de 25 mL com água purificada (concentração final de 2000 µg/mL). O diluente utilizado nas soluções corresponde a uma mistura de

acetonitrila, metanol e solução de formato de amônio (6 mmol/L) na proporção 35:15:50, ajustado para pH 3 com ácido fórmico.

Para preparar a solução estoque de amostra, vinte comprimidos de Aristab® 10 mg foram pesados, e posteriormente pulverizados por meio da fricção entre um almofariz e pilão para obtenção de um pó fino. Posteriormente, uma quantidade de pó equivalente a 10 mg de aripiprazol foi transferida para um balão volumétrico de 10 mL. O conteúdo foi diluído com 6 mL de diluente. A mistura foi então levada a ultrassom por 10 min e em seguida diluída até o volume desejado com diluente para obtenção de uma concentração final de 1000 µg/mL de aripiprazol. As soluções foram então filtradas por meio de um filtro de membrana de PTFE de 0,45 µm e armazenadas em geladeira, onde se mostraram estáveis por um período de 60 dias, a uma temperatura de 4°C. Antes do uso, tais soluções eram deixadas em temperatura ambiente. As soluções de trabalho do padrão e amostra foram preparadas misturando-se 800 µL de solução estoque do padrão interno (2000 µg/mL) e 1000 µL de solução padrão/amostra estoque de aripiprazol (1000 µg/mL) com posterior diluição com diluente em balão volumétrico de 10 mL. As concentrações finais de aripiprazol e prometazina (padrão interno) nas soluções de trabalho foram 100 µg/mL e 160 µg/mL, respectivamente.

4.2.5.2 Padronização do método

Na padronização do método foram utilizados os seguintes parâmetros:

Coluna capilar: Sílica fundida comprimento total de 30,2 x 75 µm d.i.

Eletrólito: formiato de amônio 6 mmol/L pH 3.0, ajustado com ácido fórmico e 5% de metanol

Tensão: +15kV

Detecção UV: 214 nm

Temperatura: 25° C

Injeção pressão: 0.4 psi/5 s

4.2.5.3 Especificidade/Seletividade

A pureza do pico do aripiprazol foi avaliada com a ajuda de um detector de arranjo de fotodiodos. A interferência potencial dos aditivos dos comprimidos foi avaliada submetendo-se o placebo às mesmas condições de degradação das amostras de aripiprazol. O placebo foi preparado de acordo com a fórmula qualitativa do Aristab[®] (monohidrato de lactose, amido de milho, celulose microcristalina, hidroxipropilcelulose, estearato de magnésio e óxido de ferro vermelho). A quantidade de cada excipiente foi calculada levando-se em consideração o percentual de concentração descrito em manuais de excipientes farmacêuticos (SHESKEY *et al.*, 2020). A especificidade do método proposto foi estabelecida pela injeção do diluente, da solução matriz de placebo, da solução padrão e do produto farmacêutico (Aristab[®]) no sistema eletroforetico. O estudo de degradação forçada é essencial para o desenvolvimento de um método de indicação de estabilidade. Portanto, a seletividade do método desenvolvido foi examinada submetendo o padrão de aripiprazol e as amostras de Aristab[®] (1000 µg/mL de aripiprazol) a diferentes condições de estresse. Os estudos de degradação forçada foram realizados sob condições hidrolíticas (ácidas e alcalinas), oxidativas, fotolíticas e térmicas conforme as recomendações ICH Q1A(R2) (ICH, 2003). As hidrólises ácidas e alcalinas foram realizadas em 0,1 mol/L de HCl e NaOH, respectivamente, na concentração de 1,0 mg/mL de aripiprazol. As soluções permaneceram em temperatura ambiente e sob proteção da luz durante 7 dias. Posteriormente, as soluções foram neutralizadas.

A degradação oxidativa foi realizada em H₂O₂ 3%, as amostras foram expostas em temperatura ambiente por 7 dias e protegidas da luz. Amostras separadas de soluções ácidas, alcalinas e oxidativas, como mencionado acima, também foram expostas a 60 °C por 2 h.

A degradação fotolítica foi realizada por exposição do fármaco no estado sólido em um período entre 50 e 120 h em uma câmara de fotoestabilidade. Um período de 50 h foi suficiente para atingir a dosagem de luz UVA necessária (no mínimo 200 Wh /m²) conforme as diretrizes do ICH (European Medicines Agency, 1998).

A degradação térmica foi realizada em estufa a 105 °C, por 2 e 7 dias.

Após as degradações, uma alíquota da solução estoque de padrão interno foi adicionada a todas as soluções degradadas e, em seguida, diluída com diluente até a concentração final de 100 µg/mL de ARP e 160 µg/mL do padrão interno.

4.2.5.4 Linearidade, limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

Para determinar a linearidade do método CZE, três curvas analíticas contendo cinco concentrações de soluções padrão aripiprazol na faixa de 60 µg/mL a 140 µg/mL, e uma concentração fixa de padrão interno (160 µg/mL) foram obtidas. As curvas analíticas foram plotadas por meio da relação entre a área do pico (área do pico de aripiprazol /área do pico de padrão interno) e as concentrações de aripiprazol. O método de regressão dos mínimos quadrados e a análise de variância (ANOVA) foram usados para determinar a linearidade do método (p-valor = 0,05). Os valores de LD e LQ foram calculados conforme as seguintes equações (Equações 1 e 2, respectivamente), onde σ corresponde ao desvio padrão do intercepto do eixo y, e α corresponde à média da inclinação da reta (ICH, 1995). Os valores foram expressos em concentração (µg/mL).

$$LD = 3,3 \times (\sigma/\alpha) \quad (1)$$

$$LQ = 10 \times (\sigma/\alpha) \quad (2)$$

4.2.5.5 Exatidão

A exatidão do método proposto foi confirmada pela adição do placebo do produto farmacêutico (Aristab®) ao padrão do aripiprazol, separadamente, e em três níveis diferentes (80%, 100% e 120%) da concentração nominal (80, 100 e 120 µg/mL, respectivamente). Adicionalmente, foram registradas determinações em triplicada para cada nível.

4.2.5.6 Precisão

Análises de repetibilidade e precisão intermediárias foram realizadas para avaliar a precisão do método. A repetibilidade foi testada por meio do ensaio de seis soluções de amostra independentes, preparadas no mesmo dia por um mesmo analista utilizando o equipamento de eletroforese capilar P/ACE MDQ. A precisão

intermediária foi avaliada pela análise do conjunto de seis soluções de amostra preparadas por um analista diferente, em dia diferente utilizando o equipamento de eletroforese capilar Agilent 7100. A solução padrão de aripiprazol (100 µg/mL) e a solução de padrão interno (160 µg/mL) foram usadas nos experimentos de precisão. A precisão foi expressa por porcentagem de desvio padrão relativo (%RSD) para o teor de aripiprazol nos comprimidos.

4.2.5.7 Robustez

Os parâmetros mais importantes que influenciaram o desempenho analítico do método criado foram avaliados: concentração e valor de pH do eletrólito e % de modificador orgânico (metanol). Todavia, outros parâmetros que podem ser alterados e afetarem o desempenho do método durante a análise também foram avaliados. Foram investigadas pequenas alterações da tensão ótima aplicada (± 2 kV), da temperatura capilar (± 1 °C) e do tempo de injeção hidrodinâmica (± 1 s). Para cada condição alterada, as razões (aripiprazol/padrão interno) foram comparadas com a condição ótima de referência.

4.2.6 Aplicação do planejamento de experimentos para otimizar as condições de degradação oxidativas

Visando a otimização da degradação oxidativa, os fatores que afetam a oxidação do aripiprazol como concentração de peróxido, temperatura e tempo, foram estudados e otimizados por meio de um planejamento fatorial completo 2^n para degradar o fármaco em 10%. Desta forma, 1,0 mg/mL de aripiprazol foi misturado com X_1 (% H_2O_2) e aquecido por um período X_2 (h) a uma temperatura X_3 (°C). Foram selecionados dois níveis para cada variável. O nível mais alto (+1) para X_1 , X_2 e X_3 foi de 20%, 5h e 60 °C, respectivamente, enquanto o nível baixo (-1) para X_1 , X_2 e X_3 correspondeu a 10%, 2h e 40 °C, respectivamente. Visto que três variáveis foram consideradas em dois níveis, um planejamento fatorial completo 2^3 foi conduzido, resultando em 8 experimentos. O diagrama de Pareto foi avaliado por meio do software Minitab® (Versão 18), para encontrar os fatores significativos. Adicionalmente, os gráficos de contorno e a ferramenta de predição fornecidos pelo

software foram utilizados para caracterizar as variáveis X_1 , X_2 e X_3 . Por fim, os experimentos foram realizados usando valores teóricos calculados de X_1 , X_2 e X_3 para confirmar se a porcentagem de degradação experimental era correspondente ao valor calculado.

4.2.7 Identificação dos produtos de degradação forçada mediante espectrometria de massas

A determinação e identificação do aripiprazol e seus produtos de degradação, gerados durante a degradação forçada, foram realizadas por meio de um sistema de cromatografia líquida de alta performance (Shimatzu) acoplado a um sistema de espectrometria de massa (MAXIS 3G – Bruker Daltonics). Os módulos utilizados do sistema HPLC (Shimatzu) foram: controladora:CBM-20A, bombas: LC-20AD, detector: SPD-20 A, autoinjeter: SIL-20AC, forno: CTO-20A. O equipamento de massas MAXIS 3G – Bruker Daltonics foi utilizado aplicando ionização por electrospray no modo positivo (ESI(+)), com analisador q-TOF programado com as seguintes características: *end plate offset*: 500V, capillar: 4500 V, nebulizador: 2 bar, gás seco: 7 L/min, temperatura: 300 °C. As separações em HPLC-MS foram realizadas com uma coluna Eclipse XDB-Phenyl (250 x 4,6mm x 5µm). Foi utilizado gradiente de eluicao (A) ácido trifluoroacetico 0,2 % aquoso em combinação com (B) acetonitrila. O gradiente foi programado conforme descrito no Quadro 4.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Estudo teórico preliminar

5.1.1 Características do fármaco e suas impurezas

Considerando que os potenciais produtos de degradação poderiam apresentar estrutura e características físico-químicas similares às impurezas do fármaco, foram avaliados a distribuição das espécies envolvidas segundo o pH e os valores de log D desses compostos.

De acordo com o estudo teórico preliminar, o aripiprazol e a maioria de suas impurezas conhecidas encontram-se ionizados em pHs ácidos. Foi possível concluir que as impurezas A e F possuem caráter neutro, enquanto que as demais impurezas tem prevalência na forma protonada em pH ácido menores que 5. Em pH neutro, a distribuição de espécies do aripiprazol e suas impurezas variam entre a forma neutra e protonada; em quanto que, em pH alcalino, prevalecem na forma neutra.

Considerando que a prevalência de uma espécie de cada composto é importante para a separação no CE, foi definida a faixa de pH ácida de 2 - 5 para o preparo dos eletrólitos. Além disso, o valor de pka do aripiprazol (7,46) auxiliou na determinação desta faixa, devido a que é recomendável usar valores de pH de no mínimo duas unidades de diferença do pka do composto. Segundo o estudo dos valores de log D, foi possível determinar que, nesta faixa de pH entre 2 – 5, os compostos são mais hidrofílicos, sendo a impureza B o composto mais hidrofílico dentre os demais. A avaliação da natureza hidrofílica ou hidrofóbica dos compostos envolvidos, permitiu considerar o uso de solventes adequados no eletrólito a usar, isto é, para garantir a solubilidade destes durante todas as análises e, em consequência, permitir a detecção deles.

Os valores de log D e espécie(s) presentes segundo os diferentes pH avaliados são mostrados na Tabela 5. Esses valores foram obtidos da análise do aripiprazol e suas impurezas conhecidas segundo CHEMICALIZE (2019).

Tabela 5 – Valores de log D e espécie(s) presentes segundo os diferentes pH do ARP e suas impurezas.

Composto	pH 4		pH 7		pH 10	
	log D	Espécie	log D	Espécie	log D	Espécie
Aripiprazol	2,13	[M] ⁺	4,57	[M] ⁺ ; M	4,79	M
Impureza A	1,21	M	1,21	M	0,3	[M] ⁻
Impureza B	-0,45	[M] ⁺	1,32	[M] ⁺	1,87	M
Impureza C	1,44	[[M] ⁺	3,91	[M] ⁺ ; M	4,16	M
Impureza D	1,02	[M] ⁺	3,38	[M] ⁺	3,84	M
Impureza E	2,21	[M] ⁺	4,65	[M] ⁺ ; M	4,87	M
Impureza F	3,77	[M] ⁺ ; M	3,78	M	3,78	M
Impureza G	3,94	[M] ⁺²	8,65	[M] ⁺² ; [M] ⁺ ; M	8,97	M

Notas:

[M]⁺: espécie carregada positivamente

[M]⁻: espécie carregada negativamente

M: espécie neutra

Fonte: CHEMICALIZE (2019).

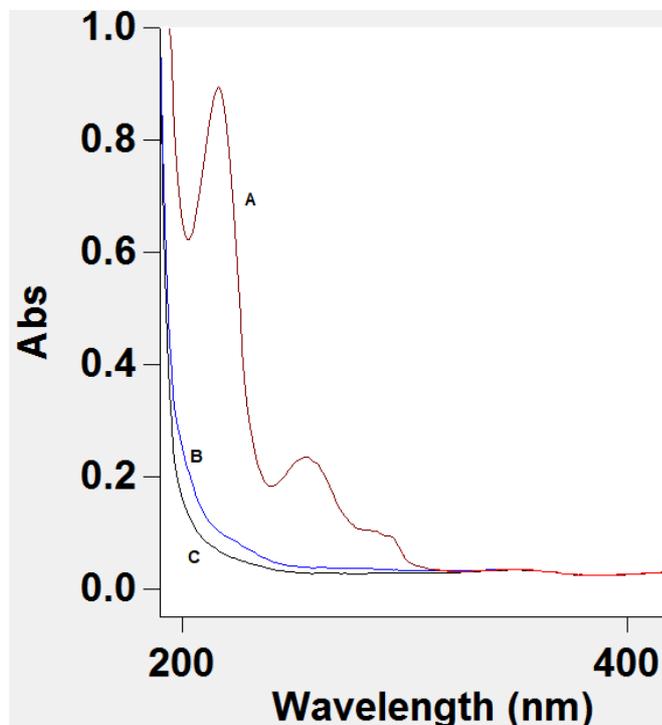
5.1.2 Características da formulação em estudo

Uma variável para considerar durante o desenvolvimento do método é o comprimento de onda de detecção. Os componentes de uma formulação apresentam, além do fármaco, excipientes de características orgânicas e inorgânicas. Recomenda-se que esse excipientes não devem apresentar uma absorção máxima na mesma região do fármaco ativo, já que poderia interferir na sua detecção e quantificação (BAERTSCHI; ALSANTE; REED, 2016a). Além disso, as impurezas também podem se formar em um produto farmacêutico a partir de interações com os excipientes, e podem se tornar agentes indutores de reações como resultado de reação de incompatibilidade (BHARATE; BHARATE; BAJAJ, 2010).

Foi preparado um placebo segundo a formulação do medicamento de referência descrita na Tabela 4. Foram obtidos os espectros de absorção do aripiprazol, placebo e branco na faixa de 190 nm e 400 nm conforme Figura 9. O aripiprazol mostrou máximos de absorção em 214, 250 e 284 nm. O comprimento de

onda de 214 nm foi selecionado para garantir que o método apresente sensibilidade e precisão adequadas.

Figura 9 – Espectro de absorção do aripiprazol, placebo e branco.



Notas:

A: espectro de absorção do aripiprazol em UV (5 µg/mL em acetonitrila)

B: espectro de absorção do placebo em UV (5 µg/mL em acetonitrila)

C: branco (acetonitrila)

Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

5.2 Experimentos preliminares

5.2.1 Desenvolvimento de metodologias

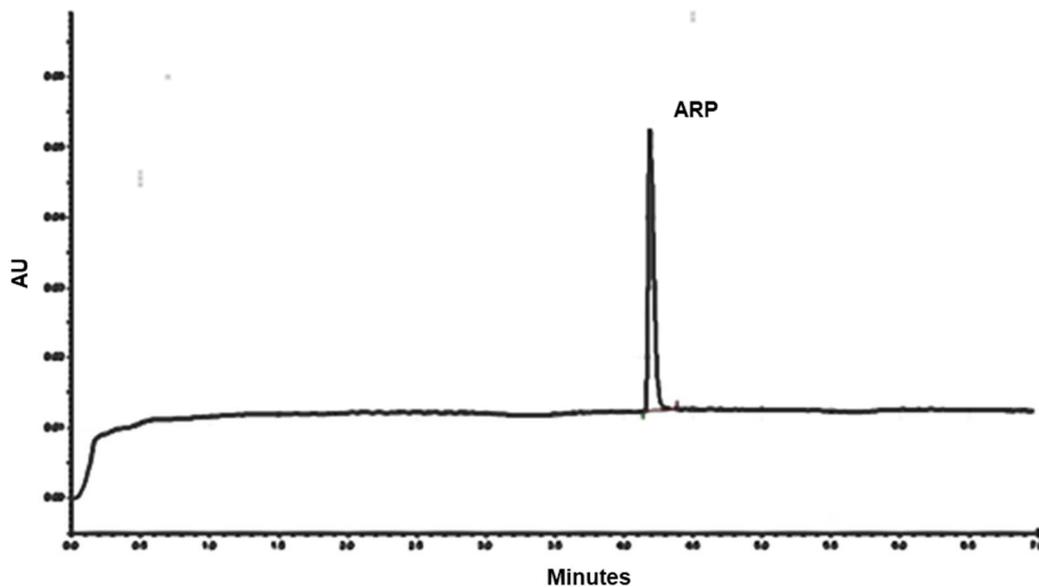
5.2.1.1 Eletroforese capilar de zona (CZE) e cromatografia eletrocínética micelar (MECK)

Antes de proceder o desenvolvimento do método, as características estruturais do aripiprazol e impurezas foram levadas em conta. Segundo o estudo teórico preliminar, o aripiprazol e suas impurezas conhecidas possuem grupos amina que podem ser protonados empregando-se um tampão ácido, em consequência, métodos de eletroforese capilar a pH baixo ou moderado, poderiam ser adequados para a determinação dos compostos envolvidos (ALTRIA, 1996). O aripiprazol é uma base

fraca com pKa de 7,46 (ZHOU et al., 2021), que corresponde ao equilíbrio de protonação dos grupos amina terciária (grupo piperidínico), desta forma, em pH menor do que o pKa, o analito encontra-se totalmente protonado e carregado positivamente. Esta característica torna a eletroforese capilar uma técnica adequada para a determinação do aripiprazol, visto que o analito migrará eletroforeticamente em direção ao cátodo, sob a influência de um campo elétrico. Nesta etapa do desenvolvimento do método por CE, teve-se cuidado na escolha de eletrólitos compatíveis com a fonte de ionização por *electrospray* do espectrômetro de massas; isto é, para evitar a supressão de íons e contaminação da câmara de ionização quando usado eletrólitos não voláteis.

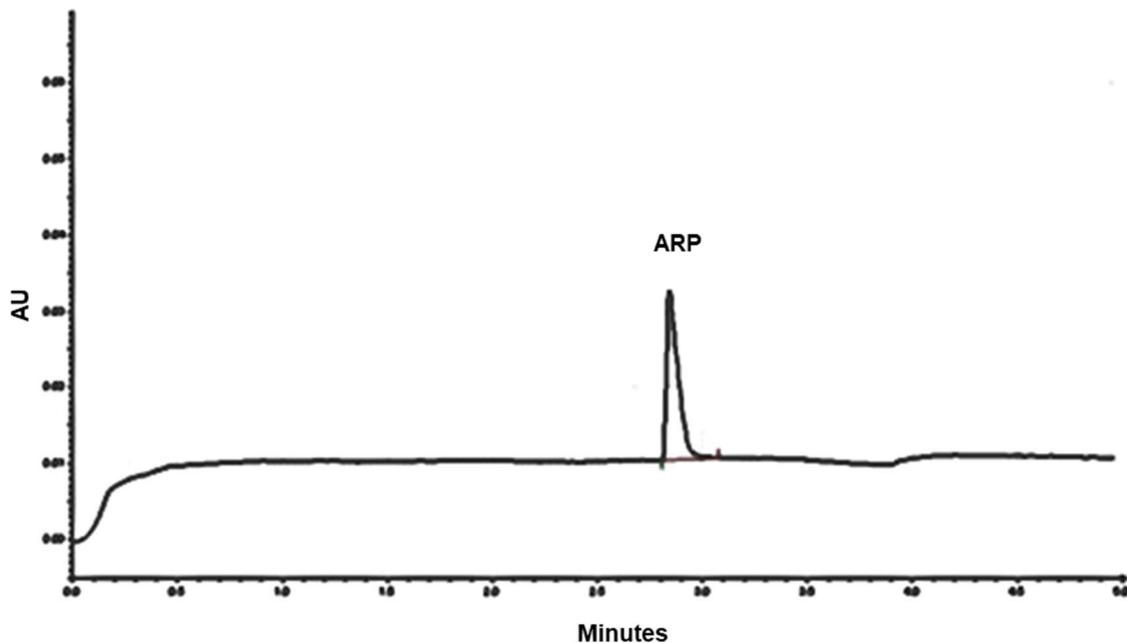
Electrólitos voláteis de baixa força iônica, tais como ácidos acético e fórmico, amônia e suas combinações, são constituintes preferidos para estas análises (PANTÛCKOVÁ et al., 2009). O eletrólito formiato de amônio 10 mmol/L, pH 3,0 apresentou melhor resultado em termos de assimetria do pico e tempo de retenção para o aripiprazol (Figura 10). O eletrólito de acetato de amônio 10 mmol/L, pH 3,0, apresentou falta da simetria e a presença de cauda do pico do aripiprazol (Figura 11). Para o método por cromatografia eletrocínética micelar (MECK), foram testados os eletrólitos tetraborato de sódio 25 mmol/L e dodecil sulfato de sódio 25 mmol/L, pH 9,5, e TRIS (tris-hidroximetil aminometano) 25 mmol/L e dodecil sulfato de sódio 25 mmol/L, pH 9,5. Os problemas encontrados com esses eletrólitos foram alargamento da banda e falta de simetria do pico do aripiprazol. Isto, provavelmente a baixa solubilidade desses produtos em pH alcalino (Figuras 12 e 13).

Figura 10 – Eletroferograma do aripiprazol (ARP) 0,1 mg/mL por CZE. Condições: capilar de sílica fundida comprimento total de 30,2 cm x 75 µm d.i.; eletrólito: 10 mmol/L tampão formiato de amônio, pH 3,0; tensão: +12kV; temperatura: 25 °C, injeção hidrodinâmica: 0,4 psi/5s; detecção UV: 214nm.



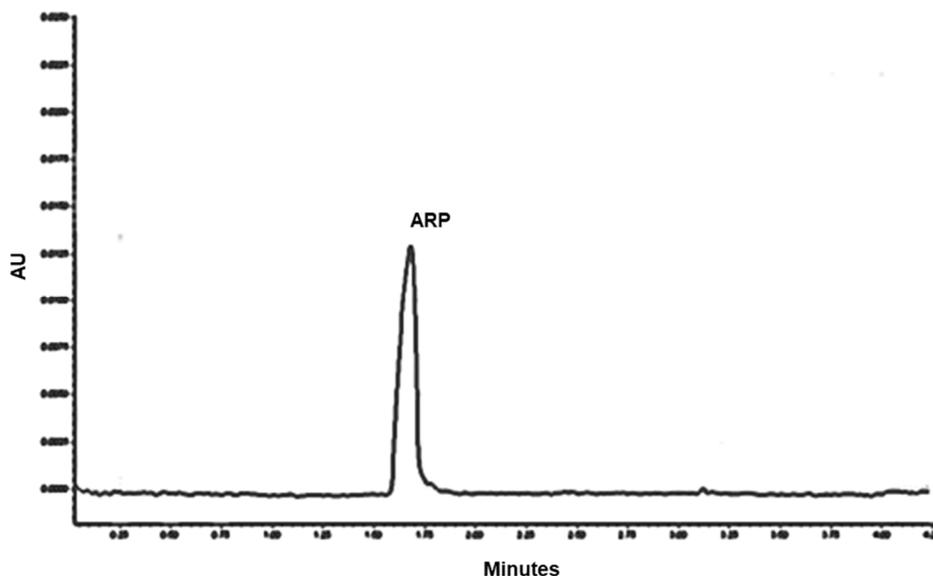
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 11 – Eletroferograma do aripiprazol (ARP) 0,1 mg/mL por CZE. Condições: capilar de sílica fundida comprimento total de 30,2 cm x 75 µm d.i.; eletrólito: 10mmol/L tampão acetato de amônio, pH 3,0; tensão: +12kV; temperatura: 25 °C, injeção hidrodinâmica: 0,4 psi/5s; detecção UV: 214nm.



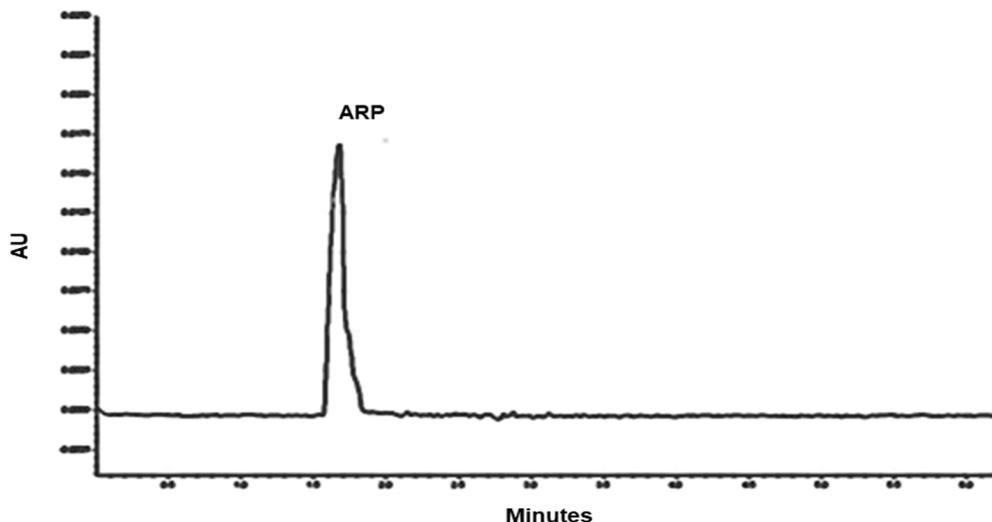
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 12 – Cromatograma do aripiprazol (ARP) 0,1 mg/mL por MECK. Condições: capilar de sílica fundida comprimento total de 30,2 cm total x 75 µm d.i.; eletrólito: tetraborato de sódio 25 mmol/L e dodecil sulfato de sódio 25 mmol/L, pH 9,5; tensão: +15kV; temperatura: 25 °C, injeção hidrodinâmica: 0,4 psi/5s; detecção UV: 214nm.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 13 – Cromatograma do aripiprazol (ARP) 0,1 mg/mL por MECK. Condições: capilar de sílica fundida comprimento total de 30,2 cm total x 75 µm d.i.; eletrólito: TRIS (tris-hidroximetil aminometano) 25 mmol/L e dodecil sulfato de sódio 25 mmol/L, pH 9,5; tensão: +15kV; temperatura: 25 °C, injeção hidrodinâmica: 0,4 psi/5s; detecção UV: 214nm.



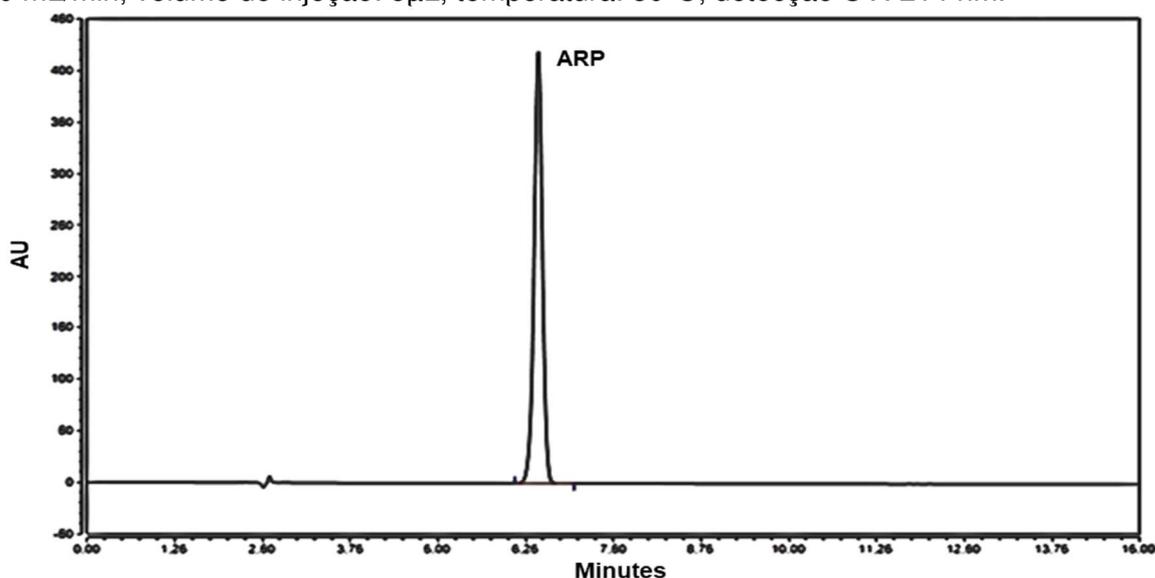
Fonte: Elaborado pelo autor.

5.2.1.2 Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

Com o objetivo de auxiliar o desenvolvimento da metodologia por eletroforese capilar, uma metodologia por HPLC foi utilizada para determinação do aripiprazol e os possíveis produtos de degradação.

Dos métodos indicativos de estabilidade por HPLC disponíveis na literatura para avaliar o aripiprazol e suas impurezas, foi selecionada a metodologia descrita por SRINIVAS et al. Essa metodologia apresenta tempo de corrida de 15 minutos e demonstrou ser indicativa de estabilidade (SRINIVAS et al., 2008). O pico do aripiprazol apresentou ser simétrico e com tempo de retenção de 6,4 minutos. O perfil cromatográfico do sistema HPLC – FR em modo isocrático mostra-se na Figura 14.

Figura 14 – Cromatograma do aripiprazol (ARP) 0,1 mg/mL. Condições: Coluna Eclipse XDB-Phenyl (250 mm x 4,6 mm x 5µm); fase móvel TFA 0,2% aquoso: acetonitrila (55:45), fluxo de 1,0 mL/min, volume de injeção: 5µL, temperatura: 30°C; detecção UV: 214 nm.



Fonte: Elaborado pelo autor.

5.2.2 Estudo preliminar de degradação forçada (métodos HPLC e CE)

Nesta etapa inicial do desenvolvimento da metodologia, os testes de degradação foram feitos com o padrão do aripiprazol. A preparação das amostras é um processo crítico devido a que se precisa garantir que o analito e os produtos de degradação estejam solubilizados e, em consequência, possam ser detectados. Caso

o princípio ativo resulte em soluções límpidas em todas as condições de degradação, pode-se concluir que as condições de preparação da amostra estão adequadas (BRASIL, 2015).

A baixa solubilidade do aripiprazol em meio aquoso, representou o principal problema a avaliar para o desenvolvimento do método. Sendo que o aripiprazol é um composto insolúvel em água, utilizou-se acetonitrila como principal solvente no preparo das amostras; isto é, nas soluções estoque e como componente (cossolvente) dos diluentes utilizados.

Segundo a ANVISA, os parâmetros do estudo devem ser variados para que a degradação aceitável seja atingida (mínimo de 10%) em cada condição de estresse. Os seguintes parâmetros podem ser variados: a) tempo de exposição; b) temperatura; c) concentração ou magnitude do agente degradante (BRASIL, 2015).

Com relação ao uso de solventes orgânicos, na preparação das amostras para análise, recomenda-se verificar sua miscibilidade na solução resultante do processo de exposição/neutralização. Deve-se notar que alguns solventes miscíveis em água, como acetonitrila, podem não o ser em soluções alcalinas ou salinas concentradas (BRASIL, 2015). Foram feitos testes de miscibilidade entre soluções estoque do aripiprazol (1,0 mg/mL) e soluções degradantes na proporção 1:1, v/v.

Foram avaliadas as seguintes soluções degradantes: HCL 0,1, 0,5 e 1,0 mol/L; NaOH 0,1, 0,5 e 1,0 mol/L; H₂O₂ 1%, 3% e 6%. Conforme resultados obtidos nesses testes de miscibilidade, todas foram miscíveis, com exceção do NaOH 1 mol/L.

Segundo os testes de miscibilidade feitos entre as soluções estoque do aripiprazol e as soluções degradantes testadas, determinou-se utilizar as concentrações de HCl 0,2 mol/L, NaOH 0,2 mol/L e H₂O₂ 6%. Os testes de degradação forçada foram feitos à temperatura de 60°C. Este valor de temperatura foi determinado seguindo as recomendações da ICH e ANVISA, uma vez que indicam usar valores de temperatura de no mínimo 10°C acima da temperatura utilizada em estudos de estabilidade acelerada (BRASIL, 2015; TAMIZI; JOUYBAN, 2016).

5.2.2.1. Método HPLC

Nesta etapa exploratória, a metodologia por HPLC – RP em modo isocrático descrita no Quadro 2 foi utilizada como suporte para determinar possíveis vias de degradação do aripiprazol, assim como quantificar as quedas do ativo após as diferentes condições de estresse avaliadas.

O Quadro 5 mostra as condições e os resultados obtidos por HPLC da degradação do aripiprazol. Os cálculos foram realizados por queda da área do pico do aripiprazol utilizando uma solução padrão controle de concentração conhecida (0,1 mg/mL). O aripiprazol apresentou-se mais sensível sob as condições de oxidação e termólise.

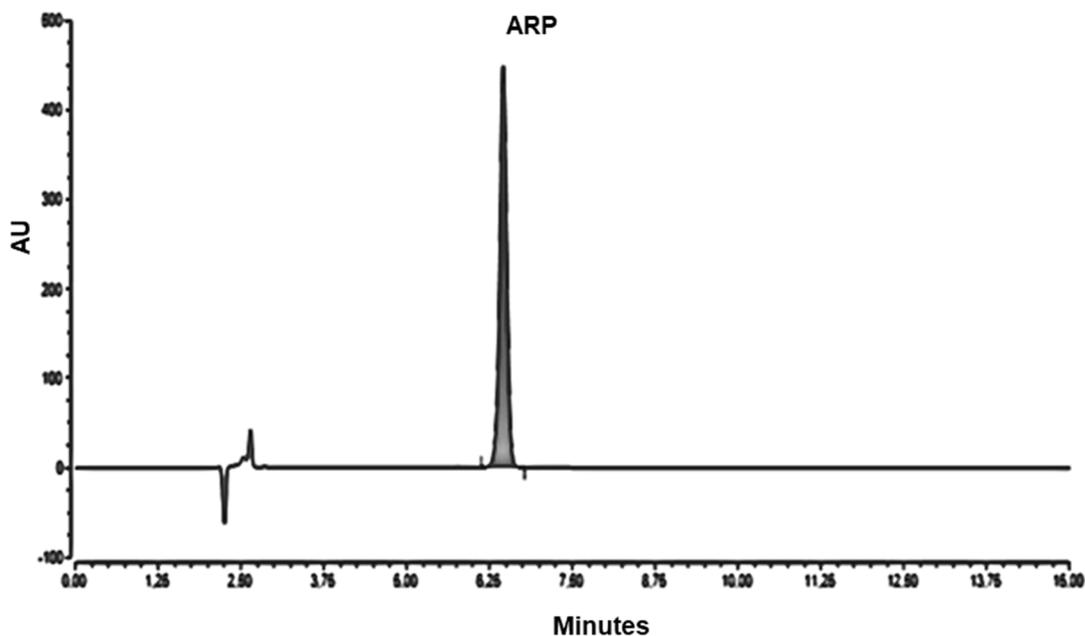
Quadro 5 - Resultados de degradação forçada obtidos por HPLC.

Tempo de degradação	Condição de estresse					Luz
	HCl 0,1 mol/L	NaOH 0,1 mol/L	H ₂ O ₂ 3%	Calor		
				80 °C	105°C	
1H	0,1%	0,4%	5,8%	-	-	-
2H	1,3%	0,6%	13,8%	-	-	-
3H	0,3%	0,5%	19,6%	-	-	-
5H	1,0%	0,8%	32,3%	-	-	-
8H	0,9%	1,2%	42,7%	-	-	-
14H	0,7%	0,9%	66,0%	-	-	-
16H	0,5%	1,5%	67,0%	-	-	-
48H	-	-	-	5,6%	12,1%	-
50H	-	-	-	-	-	0,6%
120H	-	-	-	-	-	0,7%

Fonte: Elaborado pelo autor

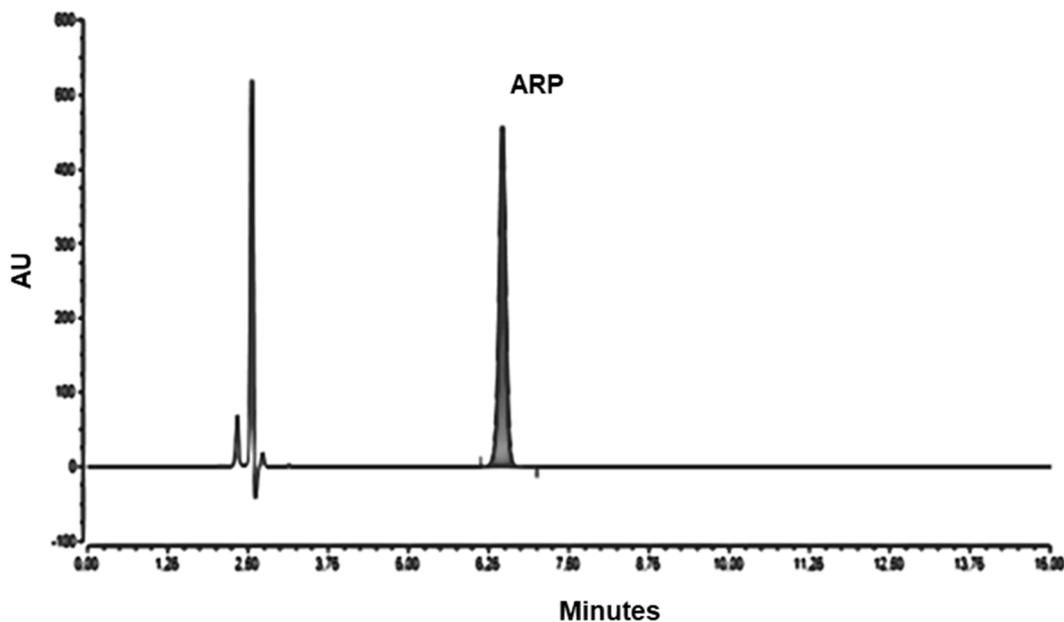
As Figuras 15 a 19 apresentam os cromatogramas do padrão do aripiprazol e as degradações nas diferentes condições de estresse. Conforme resultados obtidos, pode-se observar que se formaram produtos de degradação na condição de estresse oxidativa.

Figura 15 – Cromatograma do aripiprazol (ARP) 0,1 mg/mL, exposto a degradação por hidrólise ácida (HCl 0,1 mol/L a 60°C/5h). Condições: Coluna Eclipse XDB-Phenyl (250 mm x 4,6 mm x 5µm); fase móvel TFA 0,2% aquoso: acetonitrila (55:45), fluxo de 1,0 mL/min, volume de injeção: 5µL, temperatura: 30°C; detecção UV: 214 nm.



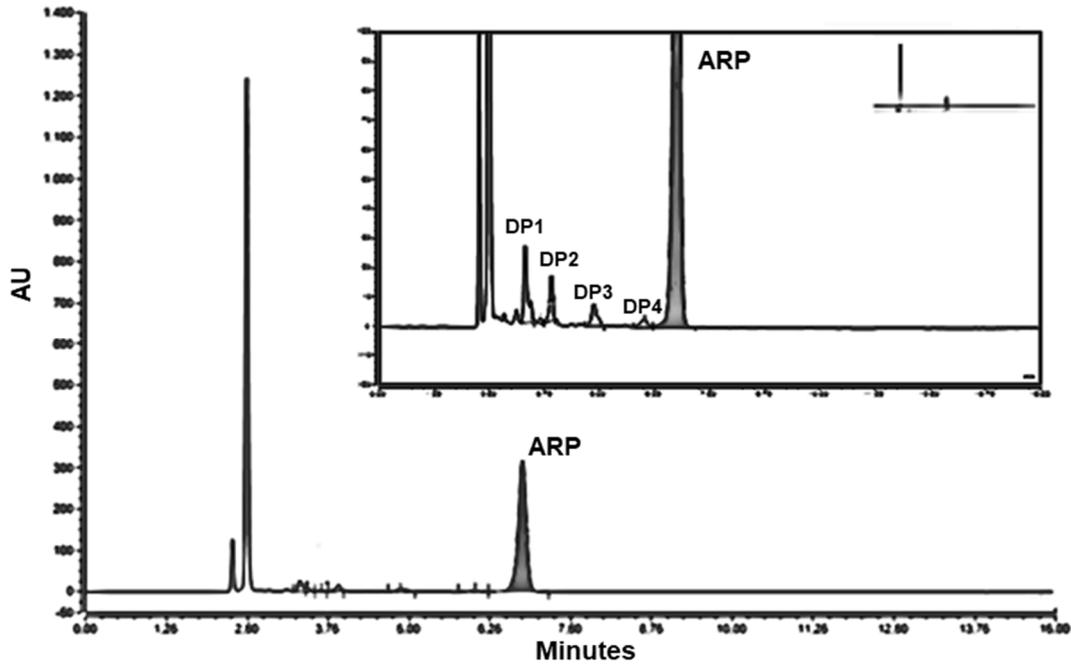
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 16 – Cromatograma do aripiprazol (ARP) 0,1 mg/mL, exposto a degradação por hidrólise alcalina (NaOH 0,1 mol/L a 60°C/5h). Condições: Coluna Eclipse XDB-Phenyl (250 mm x 4,6 mm x 5µm); fase móvel TFA 0,2% aquoso: acetonitrila (55:45), fluxo de 1,0 mL/min, volume de injeção: 5µL, temperatura: 30°C; detecção UV: 214 nm.



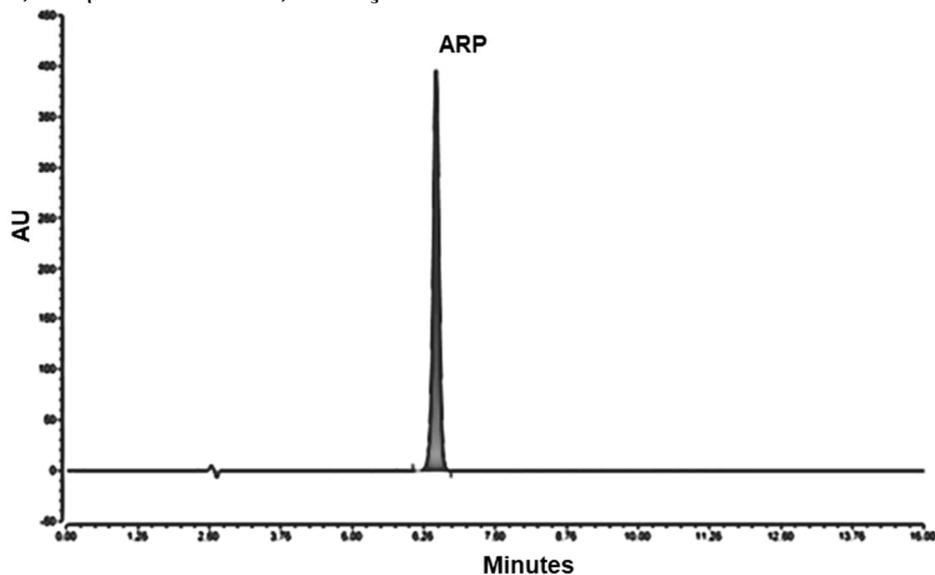
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 17 – Cromatograma do aripiprazol (ARP) 0,1 mg/mL, exposto a degradação por oxidação (H₂O₂ 3% a 60°C/5h). Condições: Coluna Eclipse XDB-Phenyl (250 mm x 4,6 mm x 5µm); fase móvel TFA 0,2% aquoso: acetonitrila (55:45), fluxo de 1,0 mL/min, volume de injeção: 5µL, temperatura: 30°C; detecção UV: 214 nm. DP (Produto Degradação).



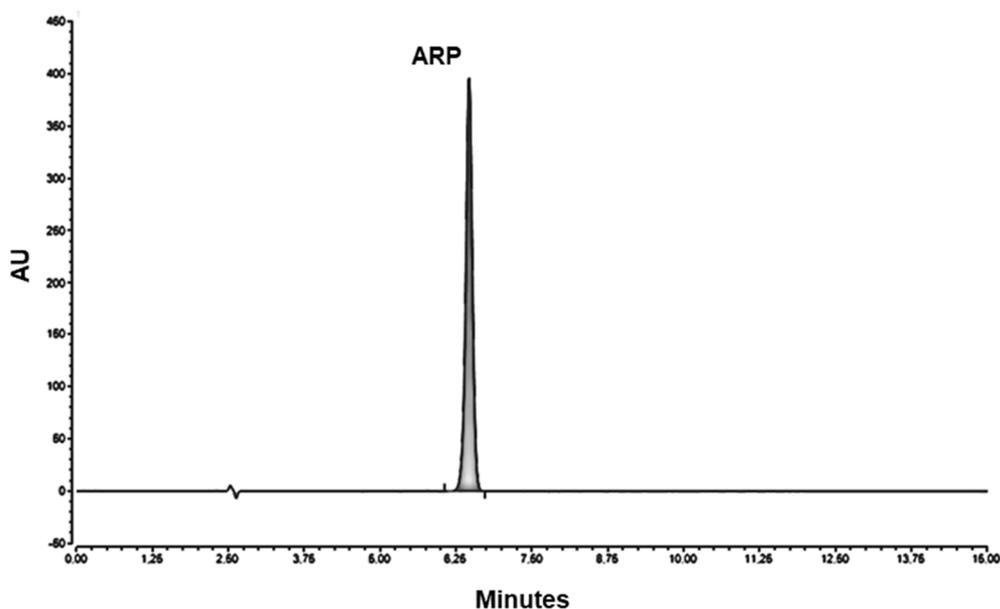
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 18 – Cromatograma do aripiprazol (ARP) 0,1 mg/mL, exposto a degradação por degradação fotolítica (120h). Condições: Coluna Eclipse XDB-Phenyl (250 mm x 4,6 mm x 5µm); fase móvel TFA 0,2% aquoso: acetonitrila (55:45), fluxo de 1,0 mL/min, volume de injeção: 5µL, temperatura: 30°C; detecção UV: 214 nm.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 19 – Cromatograma do aripiprazol (ARP) 0,1 mg/mL, exposto a degradação por degradação térmica (105 °C/48 h). Condições: Coluna Eclipse XDB-Phenyl (250 mm x 4,6 mm x 5µm); fase móvel TFA 0,2% aquoso: acetonitrila (55:45), fluxo de 1,0 mL/min, volume de injeção: 5µL, temperatura: 30°C; detecção UV: 214 nm.



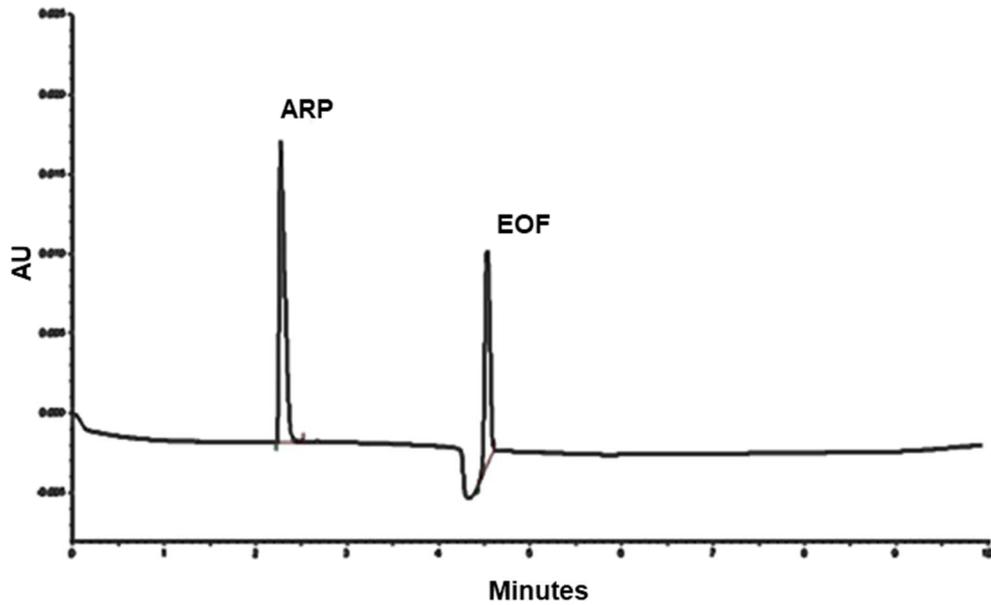
Fonte: Elaborado pelo autor.

O eletrólito formiato de amônio 10 mmol/L ajustado a pH 3,0 com ácido fórmico apresentou melhor resultado em termos de assimetria do pico e tempo de retenção para o aripiprazol. Contudo, não foi observada uma boa seletividade e resolução aceitável do aripiprazol e seus produtos de degradação, após estresse em meio oxidativo (H₂O₂ 3% a 60°C por 3h) observando-se também co-eluição de dois produtos de degradação.

5.2.2.2. Eletroforese capilar

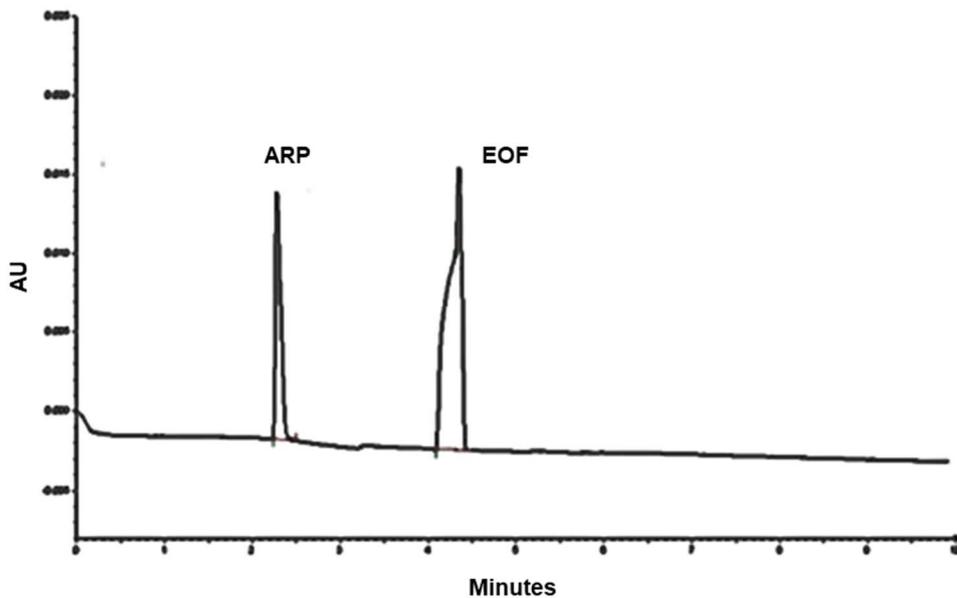
As Figuras 20 a 24 apresentam os eletroferogramas do padrão do aripiprazol e as degradações nos diferentes meios estressantes. Os resultados obtidos mostram que se formaram produtos de degradação na condição de estresse oxidativa. Nesta etapa exploratória foi utilizada a voltagem de +15kV com o objetivo de obter tempos de retenção relativos menores em relação a voltagem inicial estabelecida de +12kV.

Figura 20 – Eletroferograma do aripiprazol (ARP) 0,1 mg/mL, exposto a degradação por hidrólise ácida (HCl 0,1 mol/L a 60°C/5h). Condições: capilar de sílica fundida comprimento total de 30,2 cm total x 75 µm d.i.; eletrólito: 10 mmol/L tampão formiato de amônio, pH 3,0; tensão: +15kV; temperatura: 25 °C, injeção hidrodinâmica: 0,4 psi/5s; detecção UV: 214nm.



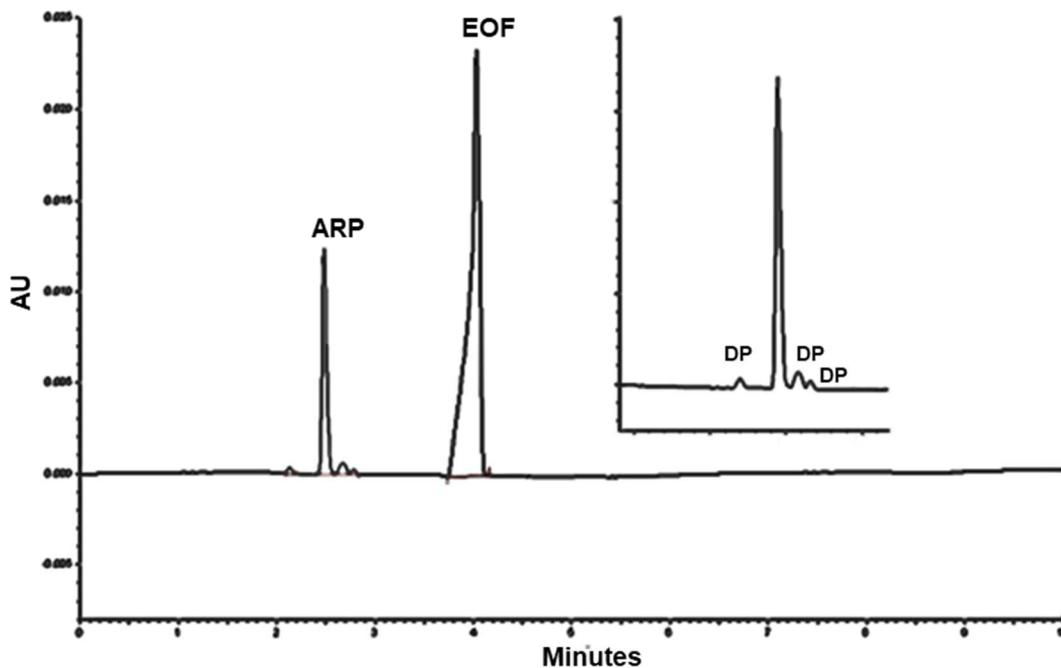
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 21 – Eletroferograma do aripiprazol (ARP) 0,1 mg/mL, exposto a degradação por hidrólise alcalina (NaOH 0,1 mol/L a 60°C/5h). Condições: capilar de sílica fundida comprimento total de 30,2 cm total x 75 µm d.i.; eletrólito: 10 mmol/L tampão formiato de amônio, pH 3,0; tensão: +15kV; temperatura: 25 °C, injeção hidrodinâmica: 0,4 psi/5s; detecção UV: 214nm.



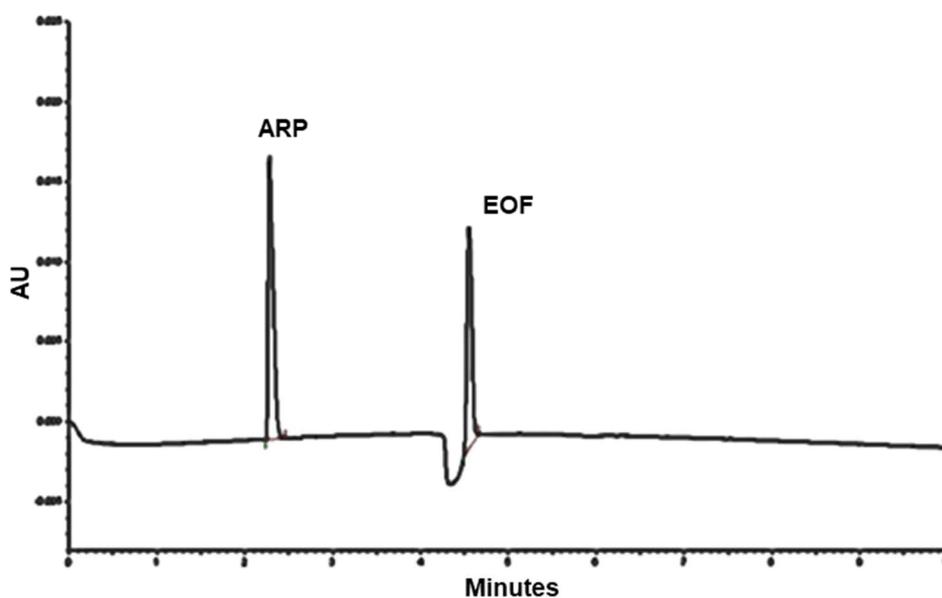
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 22 – Eletroferograma do aripiprazol (ARP) 0,1 mg/mL, exposto a degradação por oxidação (H₂O₂ 3% a 60°C/5h). Condições: capilar de sílica fundida comprimento total de 30,2 cm total x 75 µm d.i.; eletrólito: 10 mmol/L tampão formiato de amônio, pH 3,0; tensão: +15kV; temperatura: 25 °C, injeção hidrodinâmica: 0,4 psi/5s; detecção UV: 214nm. DP (Produto Degradação).



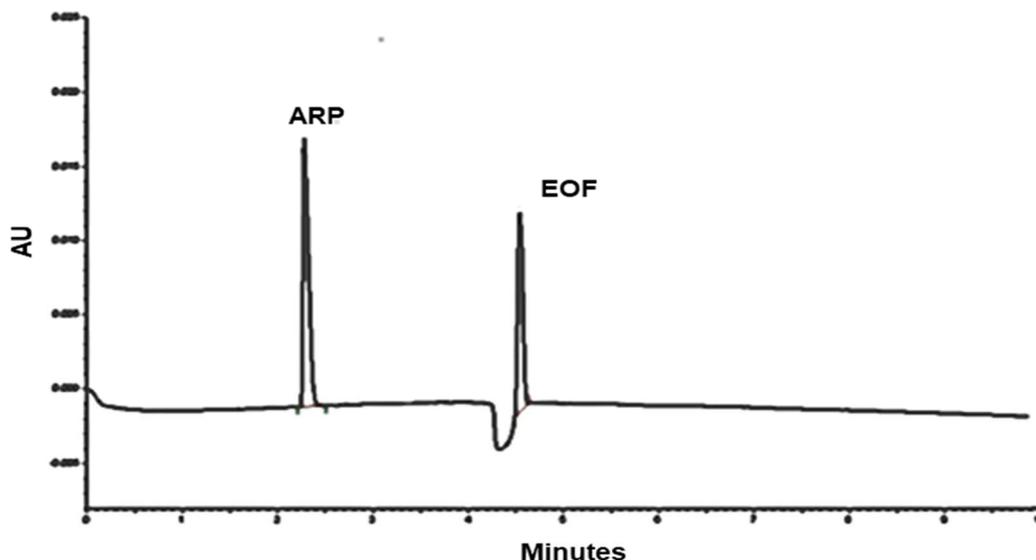
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 23 – Eletroferograma do aripiprazol (ARP) 0,1 mg/mL, exposto a degradação por degradação fotolítica (120h). Condições: capilar de sílica fundida comprimento total de 30,2 cm total x 75 µm d.i.; eletrólito: 10 mmol/L tampão formiato de amônio, pH 3,0; tensão: +15kV; temperatura: 25 °C, injeção hidrodinâmica: 0,4 psi/5s; detecção UV: 214nm.



Fonte: Elaborado pelo autor.

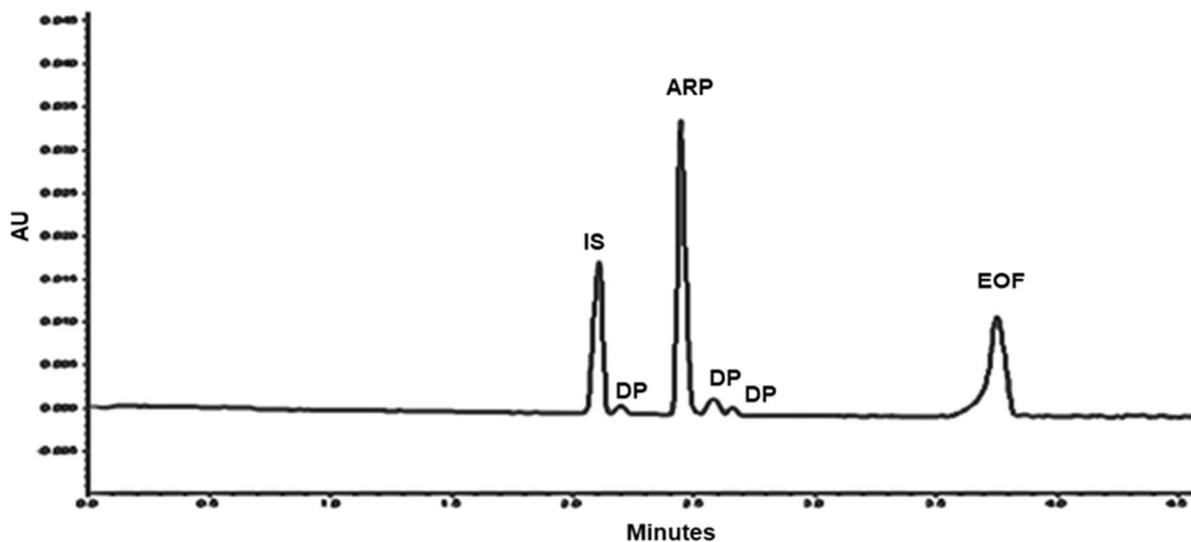
Figura 24 – Eletroferograma do aripiprazol (ARP) 0,1 mg/mL, exposto a degradação por degradação térmica (105 °C/48 h). Condições: capilar de sílica fundida comprimento total de 30,2 cm total x 75 µm d.i.; eletrólito: 10 mmol/L tampão formiato de amônio, pH 3,0; tensão: +15kV; temperatura: 25 °C, injeção hidrodinâmica: 0,4 psi/5s; detecção UV: 214nm.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Com o objetivo de aprimorar a precisão do método e sistema, foi avaliado o uso de um padrão interno. Os padrões internos são frequentemente usados para minimizar flutuações do volume de injeção, erros de diluição e erros durante o tratamento da amostra. A escolha adequada de um padrão interno pode melhorar substancialmente a precisão das determinações de área de pico (BIDULOCK et al., 2017). Foram testadas substâncias como levomepromazina, clorpromazina, risperidona e prometazina. Dentre elas, a prometazina apresentou melhor resposta, melhor tempo de migração, melhor simetria e melhor resolução com o pico do aripiprazol (Figura 25); contudo, é preciso otimizar a metodologia pois a prometazina possui baixa resolução com um produto de degradação na amostra oxidativa.

Figura 25 – Eletroferograma do padrão interno (IS) prometazina em presença do aripiprazol (ARP) 0,1 mg/mL, exposto a degradação por oxidação (H₂O₂ 3% a 60°C/5h). Condições: capilar de sílica fundida comprimento total de 30,2 cm total x 75 µm d.i.; eletrólito: 10 mmol/L tampão formiato de amônio, pH 3,0; tensão: +15kV; temperatura: 25 °C, injeção hidrodinâmica: 0,4 psi/5s; detecção UV: 214nm. DP (Produto Degradação).



Fonte: Elaborado pelo autor.

Considerando que a seletividade na CZE pode ser alterada pela adição de um modificador orgânico, foi utilizado o metanol como nas proporções de 5, 10, 20 e 40%. Esse aditivo devido a que modifica o mecanismo de migração alterando a polaridade e a viscosidade do eletrólito. Portanto, tanto o fluxo electroosmótico (EOF) quanto a mobilidade eletroforética dos analitos são afetados (ALTRIA, 1996).

Os resultados mostraram melhor separação dos produtos de degradação em todas as concentrações de metanol testadas, porém a concentração de 5% mostrou melhor resolução na linha base em um tempo de migração curto. Observou-se que o tempo de migração do aripiprazol aumentava conforme se incrementava a concentração de metanol. Isto é explicado porque a mobilidade do fluxo eletrosmótico diminui quase linearmente quando se aumenta a concentração de metanol (JIMIDAR, 2008).

5.3 Aprimoramento e otimização da metodologia desenvolvida por eletroforese capilar em zona (CZE)

Por meio de testes preliminares, ao utilizar uma tensão de +15 kV foi observado o comprometimento da resolução e da forma do pico dos produtos de degradação oxidativa. Todavia, quanto maior a tensão aplicada, menor foi o tempo de migração do aripiprazol e de seus produtos de degradação. Desta forma, uma voltagem de +12 kV foi selecionada, devido a formação de picos aceitáveis.

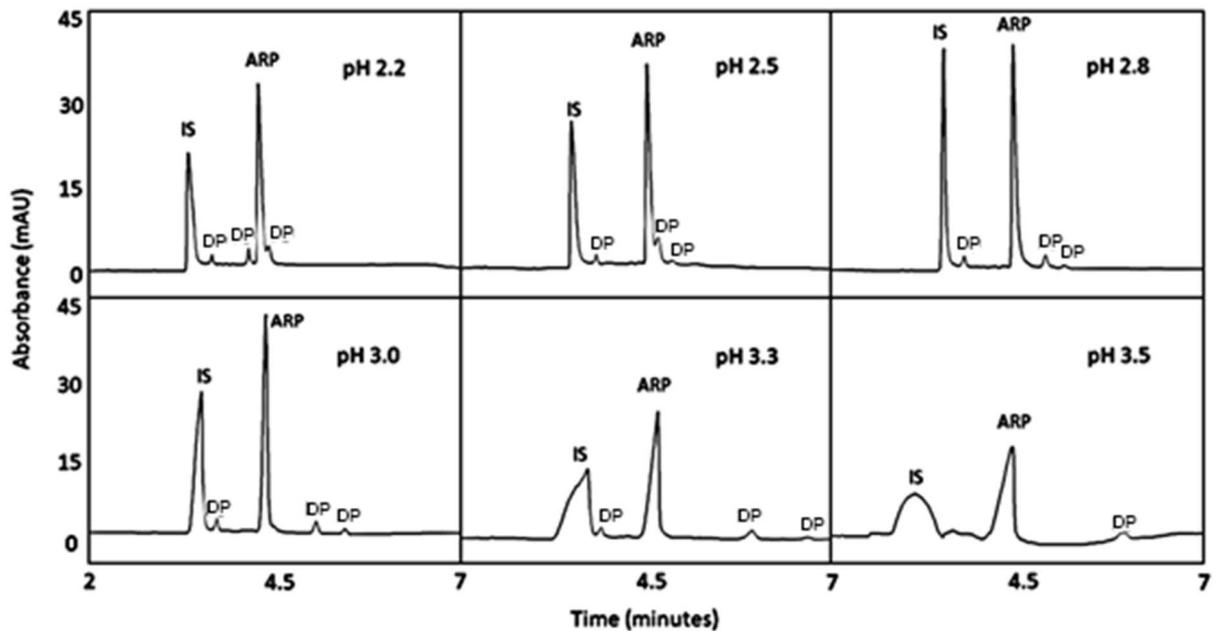
Através do desenvolvimento do método, a separação mais crítica foi observada entre dois produtos de degradação, na amostra degradada com H₂O₂. Para melhorar a resolução deste par crítico, outros desenvolvimentos foram considerados.

O primeiro passo no desenvolvimento do método foi a seleção do tipo e do pH adequados para o eletrólito. Para potencial uso do método com a espectrometria de massas, dois sistemas eletrolíticos voláteis foram avaliados: formato de amônio/ácido fórmico e acetato de amônio/ácido acético como soluções tampão apresentando capacidade de tampão adequada em torno do pH 3. Ambas as soluções foram avaliadas na faixa de pH de 2,2 a 3,5 e com concentrações de tampão variando entre 5 e 25 mmol/L. Ao utilizar o tampão acetato de amônio/ácido acético nas concentrações e valores de pH mencionados anteriormente, foram observados picos largos de aripiprazol e altas correntes. Tal comportamento pode ser explicado pela concentração de sal, visto que quanto maior a concentração de sal, maiores são os valores de viscosidade e de corrente.

Ao utilizar o tampão de formato de amônio/ácido fórmico na faixa de pH entre 2,2 e 3 (Figura 26) e faixa de concentração entre 5 e 10 mmol/L (Figura 27), foi observada uma melhoria na forma do pico do aripiprazol, dos produtos de degradação e do IS, além da diminuição nos valores de corrente (aproximadamente 40 µA). Entretanto, picos mais largos de aripiprazol e padrão interno foram obtidos ao variar o pH de 3,3 para 3,5 (Figura 26), devido a menor solubilidade do aripiprazol com o aumento do pH. Adicionalmente, a resolução entre o aripiprazol e seus produtos de degradação oxidativa foi comprometida ao aumentar o pH de 2,2 para 2,5. De modo a melhorar a resolução entre o aripiprazol e dos produtos de degradação oxidativa foi considerado o uso de metanol (5%) como modificador orgânico do eletrólito. Os testes com

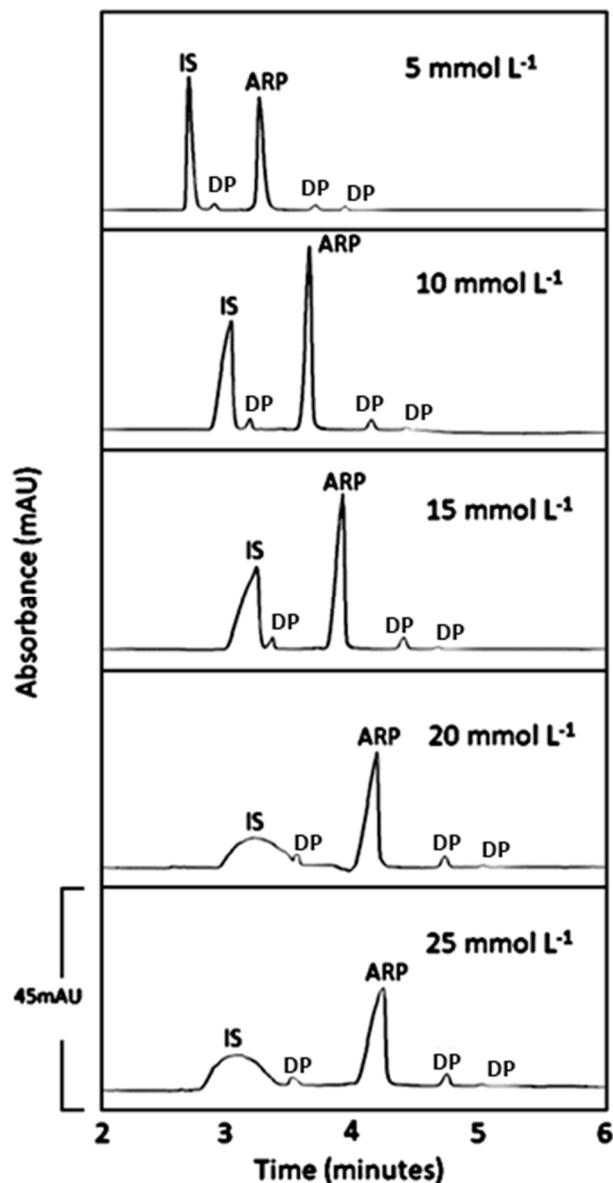
concentrações de metanol superiores a 5% mostraram tendência à formação de picos largos, além do aumento no tempo de migração.

Figura 26 – Eletroferogramas do efeito dos valores de pH (2,2 a 3,5) na forma e resolução do pico do IS, ARP e de seus produtos de degradação oxidativa. Amostra: ARP degradado com 10% H₂O₂ por 2h a 60 °C (ARP 100 µg/mL e IS 160 µg/mL). Condições: capilar não revestido de sílica fundida (30,2 cm de comprimento total x 75 µm i.d.); electrolito: 10 mmol/L de formato de amônio/ácido fórmico; injeção hidrodinâmica: 0.4 psi/5 s; tensão aplicada: +12 kV; temperatura: 25 °C; detecção a 214 nm. Picos: IS (prometazina), (ARP) aripiprazol, DP (produtos de degradação).



Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Figura 27 – Eletroferogramas do efeito da concentração de formato de amônio/ácido fórmico (5 a 25 mmol/L) na forma e resolução do pico de IS, ARP e produtos de degradação oxidatida. Amostra: ARP degradado com 10% H₂O₂ por 2h a 60 °C (100 µg/mL de ARP e 160 µg/mL de IS). Condições: capilar não revestido de sílica fundida (30,2 cm de comprimento total x 75 µm i.d.); eletrólito: (5 – 25 mmol/L) formato de amônio/ácido fórmico; injeção hidrodinâmica: 0,4 psi/5 s; tensão aplicada: +12 kV; temperatura: 25 °C; detecção a 214 nm. Picos: IS (prometazina), ARP (aripirazol), DP (produto de degradação).



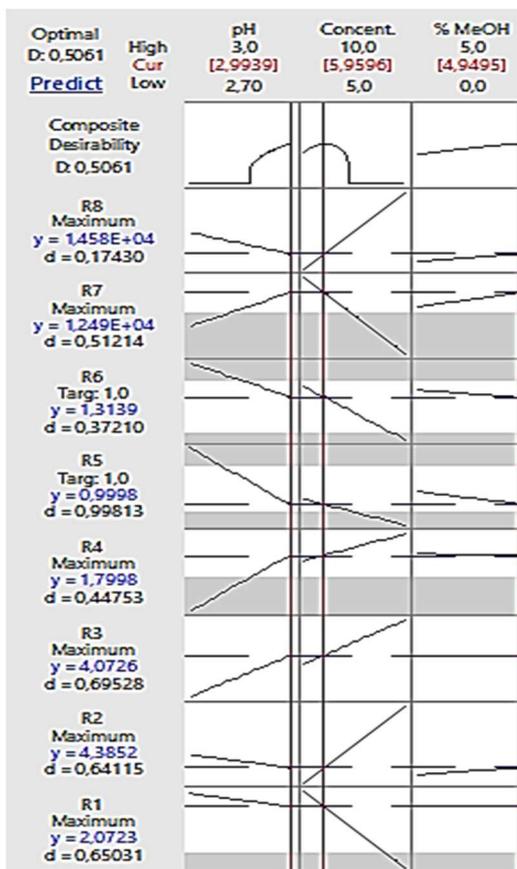
Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Por meio de experimentos preliminares durante o desenvolvimento do método, foram encontrados três fatores que afetam significativamente o desempenho do método CZE, correspondentes ao pH do eletrólito de fundo (X_1), a concentração do eletrólito de fundo (X_2) e o metanol utilizado como modificador orgânico (X_3). Portanto,

um planejamento fatorial completo (2^3) foi realizado para otimizar as condições eletroforéticas. Os níveis foram escolhidos com base nos testes preliminares realizados no desenvolvimento do método. Os níveis altos (+1) para os fatores X_1 , X_2 e X_3 foram 3, 10 mmol/L e 5%, respectivamente, enquanto os níveis baixos (-1) para X_1 , X_2 e X_3 foram 2,7, 5 mmol/L e 0%, respectivamente. Desta forma, oito experimentos foram realizados em duplicata, e submetidos a análise estatística.

Foram selecionados oito fatores de resposta: resoluções entre IS e OPD1 (R1), ARP e OPD1 (R2), ARP e OPD2 (R3), e entre OPD2 e OPD3 (R4); fatores de cauda dos picos IS (R5) e ARP (R6); número da placa calculado para os picos IS (R7) e ARP (R8). As condições ótimas de BGE foram obtidas por meio da ferramenta de otimização de resposta *Minitab*[®] (versão 18), sendo configuradas para obtenção de valores máximos de resolução para o R1, R2, R3 e R4, e um valor mínimo de 1,5. Para as respostas dos fatores de cauda (R5 e R6), o ajuste foi realizado para obter o valor 1 entre o intervalo de 0,9 a 1,6, enquanto para o número de placa (R7 e R8), o ajuste foi feito para obter os valores máximos possíveis. As condições ótimas de BGE são mostradas na Figura 28 (6 mmol/L de formato de amônio/tampão de ácido fórmico, pH 3 e 5% de metanol).

Figura 28 – Otimizador de resposta mostrando as condições ideais de CE.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

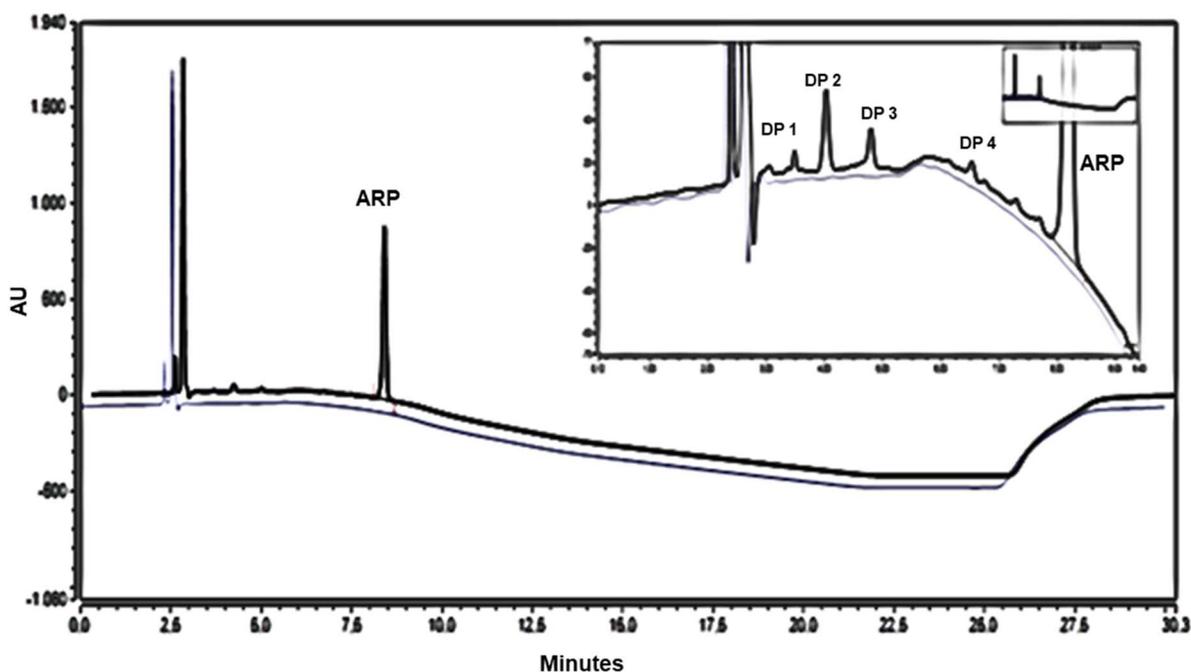
A média de três determinações usando as condições previstas do *Minitab*[®] (versão 18) apresentou resoluções acima de 2 (R1 = 2,2, R2 = 5,7, R3 = 5,5, R4 = 2,6), fator de cauda próximo a 1 (R5 = 1,05, R6 = 1,35) e placas teóricas acima de 10.000 (R7 = 18.643, R8 = 24.823).

O efeito da tensão também foi investigado na faixa entre 10 e 25 kV, e a tensão de 15 kV foi escolhida como a tensão ótima visto que apresentou um tempo total de execução inferior a 4 min e um menor valor de corrente (23 μ A). Portanto, as condições otimizadas foram: BGE composto por 6 mmol/L de formato de amônio tamponado ajustando-se o pH para 3 com ácido fórmico, e 5% de metanol; tensão aplicada correspondente a +15 kV; injeção hidrodinâmica (0,4 psi por 5 s), comprimento de onda de detecção a 214 nm, e temperatura correspondente a 25 °C.

5.4 Aprimoramento da metodologia desenvolvida por cromatografia líquida de alta performance (HPLC)

Foi testado um método novo, com o objetivo de reduzir o tempo de análise e melhorar a separação dos produtos de degradação gerados na degradação oxidativa. Para isso, optou-se por utilizar um método em gradiente, considerando as condições utilizadas do método descrito na primeira parte do desenvolvimento da presente pesquisa, cuja fase reversa era modo isocrática. As condições cromatográficas do novo método adequado em modo gradiente estão descritos no Quadro 4. A diferença do método anterior, a coluna utilizada foi uma coluna tipo Phenyl. Nesse caso, só foi testado a amostra após degradação oxidativa. Na degradação oxidativa (Figura 29) pode-se observar que os produtos de degradação apresentam boa separação.

Figura 29 – Cromatograma da solução padrão de aripiprazol (ARP) 0,1 mg/mL após estresse sob H_2O_2 3 % a $60^\circ C/3h$ (sinal superior) e cromatograma do branco (sinal inferior). Condições: Coluna Eclipse XDB-Phenyl (250 mm x 4,6 mm x $5\mu m$), fase móvel gradiente de Solução A e Solução B, fluxo de 1,0 mL/min, vol. injeção de 5 μL , temperatura de $30^\circ C$, comprimento de onda em 214 nm. DP (Produto Degradação).



Fonte: Elaborado pelo autor.

5.5 Validação da metodologia desenvolvida por eletroforese capilar em zona (CZE)

5.5.1 Adequabilidade do sistema

Para garantir que o sistema estava funcionando corretamente durante as análises, foi realizado um teste de adequação do sistema. Os resultados para seis réplicas mostraram que os parâmetros testados (tempo de migração, resolução, fator de cauda e números de placas) estavam dentro da faixa aceitável (ICH, 1995). O aripiprazol e o padrão interno foram resolvidos na linha de base, com tempo médio de migração de 3,06 e 2,54 min, respectivamente. Nestas condições foi possível obter boa resolução entre os picos ($R_s > 5$), e o fator de cauda para ambos os picos aripiprazol e o padrão interno não excedeu 1,4, indicando uma boa simetria de pico (o limite de aceitação é abaixo de 2). Os números médios das placas foram acima de 10.000. O método CZE apresentou alta sensibilidade, e o aripiprazol foi detectado com precisão. Os resultados estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 – Resultados de adequação do sistema (limites de aceitação RSD % < 2). ^aMédia de seis repetições; MT: tempo de migração; N: eficiência (número de placas); PAR: razão da área do pico; R_s : resolução; IS: padrão interno ARP: aripiprazol.

	MT		Fator de cauda		N		PAR	R_s
	IS	ARP	IS	ARP	IS	ARP		
Média ^a	2,544	3,060	0,817	1,321	11616	21618	1,583	5,466
Desvio padrão	0,023	0,025	0,010	0,015	141,807	183,069	0,014	0,040
RSD%	1,018	0,828	1,213	1,101	1,221	0,847	0,906	0,733

Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

5.3.1 Seletividade/especificidade e estudo de degradação forçada

A especificidade do método CZE proposto foi confirmada pela ausência de interferência entre o aripiprazol e os excipientes no produto farmacêutico (Aristab®). De modo a estabelecer a capacidade indicadora de estabilidade do método, foram realizados estudos de degradação forçada. Para os estudos ácidos, alcalinos, fotolíticos e térmicos, o fármaco foi inicialmente degradado pela força intermediária do

agente de estresse, temperatura e pontos de tempo. Os resultados são apresentados na Figura 30, e os resumos das condições e dos resultados quantitativos são apresentados na Tabela 7. Os resultados foram calculados usando um controle para cada condição de degradação, e expressos como porcentagem do conteúdo residual de aripiprazol.

Tabela 7 – Condições de estresse usadas para o teste de degradação forçada e conteúdo residual de fármaco em cada condição. ^an = 2 para cada condição; ARP: aripiprazol.

Tipo de degradação	Condição	Tempo de exposição com temperatura	Conteúdo residual de ARP (%) ± SD^a
Ácida	0,1 mol/L HCl	7 dias, temp. ambiente	98,50 ± 0,47
		2 h, 60° C	99,31 ± 0,30
Alcalina	0,1 mol/L NaOH	7 dias, temp. ambiente	98,56 ± 0,28
		2 h, 60° C	99,29 ± 0,31
Oxidativa	3% H ₂ O ₂	7 dias, temp. ambiente	84,95 ± 0,26
		2 h, 60° C	95,45 ± 0,62
Térmica	105° C	2 dias	99,21 ± 0,23
		7 dias	99,37 ± 0,26
Fotolítica	UVA/luz visível	50 h	99,62 ± 0,25
		120 h	99,49 ± 0,19

Fonte: Elaborado pelo autor.

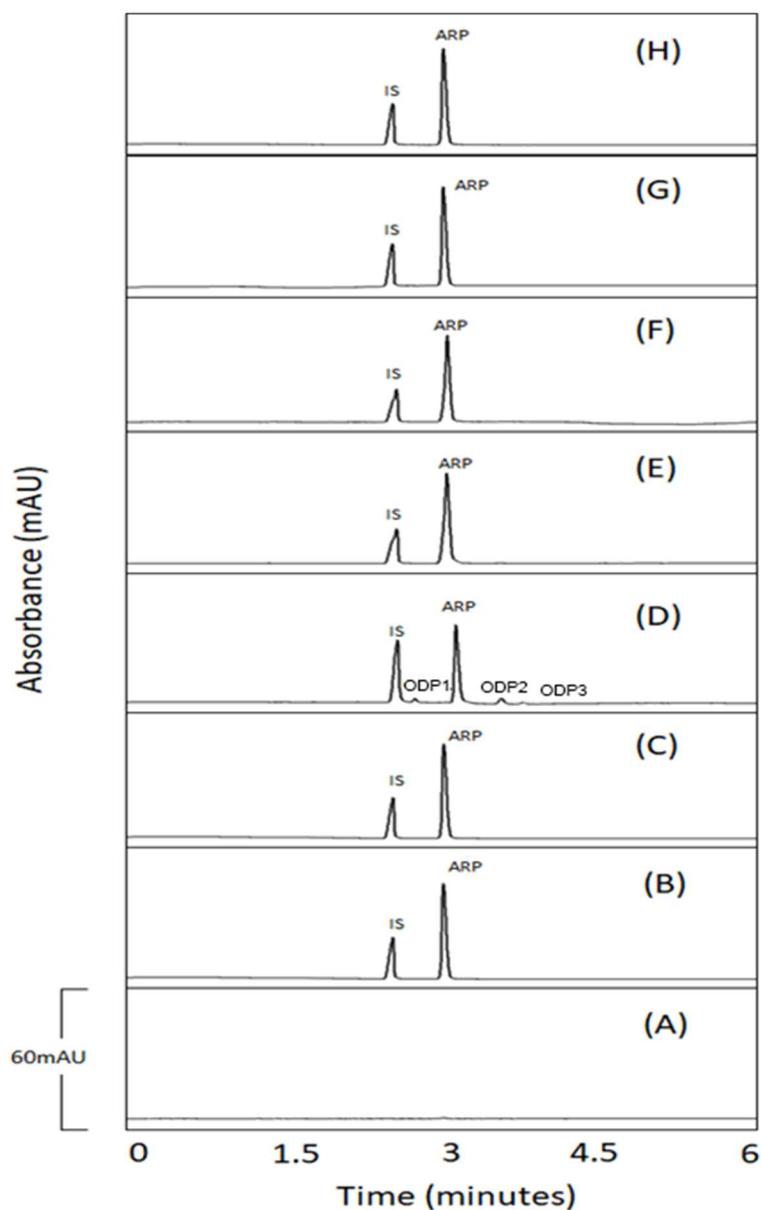
Os resultados de EC dessas condições intermediárias foram expressos em termos de porcentagem de degradação total e foram usados na seleção dos níveis dos parâmetros de degradação forçada para o planejamento fatorial completo.

O planejamento de experimentos foi aplicado apenas para as condições oxidativas. As condições ácidas, alcalinas, fotolíticas e térmicas foram excluídas, visto que a exposição da amostra a essas condições de estresse e sob o BGE ótimo não resultou na geração de picos de degradação (Figuras 30E, 30F, 30G e 30H, respectivamente).

O estresse oxidativo sob 3% de H₂O₂ por 7 dias a temperatura ambiente, e 2 h a 60 °C resultou em reduções de 15% e 4,6% no teor do aripiprazol, respectivamente. Três picos foram observados após a degradação oxidativa: o primeiro em 2,75 min

(OPD1), o segundo em 3,57 min (OPD2) e o terceiro em 3,77 min (OPD3) (Figura 30D). O pico do analito apresentou pureza superior a 99%, sugerindo que não houve co-migração, reforçando a especificidade do método. A pureza do pico foi verificada por um detector de arranjo de diodos. Adicionalmente, as amostras da matriz do comprimido Aristab[®] não apresentaram nenhum pico que pudesse interferir ou co-migrar com o aripiprazol (Figura 30A) em todas as condições de degradação.

Figura 30 – Eletroferogramas nas condições finais otimizadas do CE. (A) Amostra placebo de Aristab®, (B) Solução padrão de ARP (100 µg/mL) e IS (160 µg/mL) (sem estresse), (C) Amostra de Aristab® (sem estresse), (D) Condições oxidativas (3% H₂O₂ a 60 °C por 4 h); (E) Hidrólise ácida (0,1 mol/L HCl a 60 °C por 2 h), (F) Hidrólise ácida (0,1 mol/L NaOH a 60 °C por 2 h), (G) Condições térmicas (105 ° C por 48 h) e, (H) Condições fotolíticas (UVA/luz visível por 50 h). Condições: sílica fundida não revestida (30,2 cm de comprimento total x 75 µm i.d.); eletrólito: 6 mmol/L de formato de amônio/ácido fórmico pH 3 com 5% de metanol; injeção hidrodinâmica: 0,4 psi/5 s; voltagem aplicada: +15 kV; temperatura: 25 °C; detecção a 214 nm. Picos: prometazina (IS), aripirazol (ARP), produto de degradação oxidativa 1 (ODP1), produto de degradação oxidativa 2 (ODP2), produto de degradação oxidativa 3 (ODP3).



Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

5.3.2 Linearidade, limite de detecção e quantificação

Os dados obtidos por meio da plotagem das razões da área de pico entre o aripiprazol e o padrão interno, versus a concentração dos fármacos na faixa de 60 a 140 µg/mL confirmaram a linearidade do método CZE proposto, obtendo-se um coeficiente de determinação adequado ($R^2 = 0,9983$) (Tabela 8). Foi realizada uma análise de variância (ANOVA) para verificar o ajuste do método com nível de significância de 95%. A ANOVA permitiu a avaliação da linearidade do método e a validade da regressão linear. O valor de $F_{\text{calculado}}$ obtido foi superior ao valor $F_{\text{crítico}}$ ($F_{\text{calculado}} = 7643,54 > F_{\text{crítico}} = 4,67$, $\alpha = 0,05$) demonstrando diferença significativa entre os valores obtidos pelas curvas analíticas, e uma boa relação linear entre as áreas dos picos e as concentrações do fármaco.

Tabela 8 – Validação do método quanto à linearidade e aos limites de detecção e quantificação pelo método CZE. $F_{\text{crítico}}$, $\alpha = 0.05 = 4.67$; DF: graus de liberdade; SS: Soma dos quadrados; MS: Quadrados Médios; ARP: aripiprazol.

Parâmetro	Aripiprazol
Faixa de concentração (µg/mL)	60,0 – 140,0
Intercepto (b)	-0,4562
Inclinação (a)	0,0161
Coefficiente de determinação (R^2)	0,9983
Desvio padrão do intercepto (S_b)	0,0191
Desvio padrão da inclinação (S_a)	0,0001
Teste F	$2,14 \times 10^{-19}$
Limite de detecção (µg/mL)	3,92
Limite de quantificação (µg/mL)	11,89

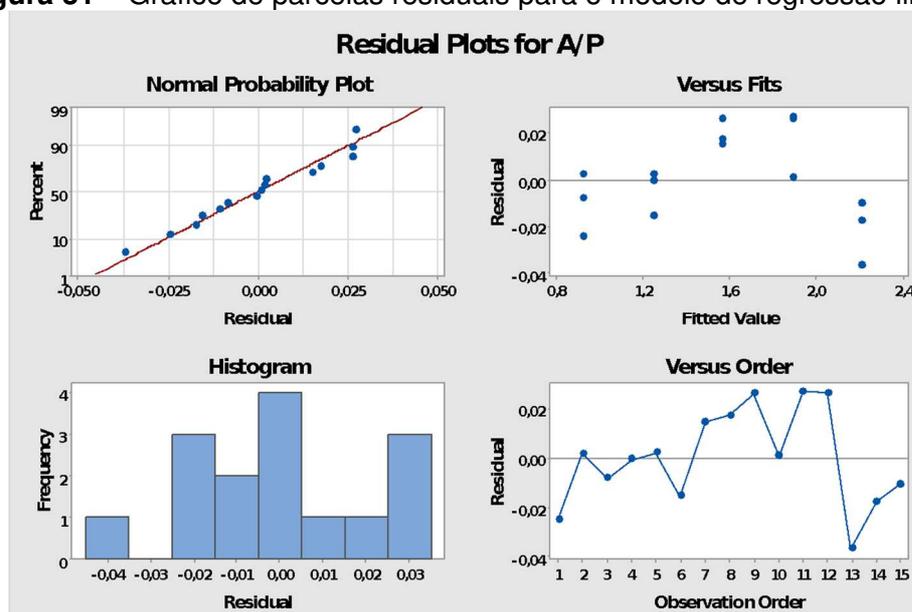
Análise de Variância na curva analítica do aripiprazol por CE				
	DF	SS	MS	F_{cal}
Regressão	1	3,12692698	3,12692698	7643,54
Residual	13	0,00531822	0,00040909	
Total	14	3,13224520		

Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

O gráfico de plotagem de resíduos mostra que os resíduos são distribuídos de forma normal e aleatória, além de serem independentes uns dos outros (Figura 31). Portanto, a suposição de homoscedasticidade é satisfeita, e reforça o bom ajuste para o modelo linear.

Os limites de detecção e quantificação foram calculados usando parâmetros de regressão, inclinação e desvio padrão do intercepto. Pequenos valores de LD e LQ foram mostrados na Tabela 8, demonstrando uma boa sensibilidade do método CZE proposto.

Figura 31 – Gráfico de parcelas residuais para o modelo de regressão linear.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

5.3.3 Exatidão

A exatidão do método CZE proposto foi avaliada por meio da porcentagem de recuperação do padrão do aripiprazol adicionado ao placebo, em experimentos de triplicada, e em três níveis diferentes (80%, 100% e 120%). A proximidade dos valores encontrados em diferentes níveis com as concentrações teóricas comprovou a veracidade/exatidão do método proposto. De acordo com a faixa de recuperação aceitável de 98 a 102% sugerida pelas diretrizes da Associação de Químicos Analíticos Oficiais (HORWITZ, 2000), os resultados foram excelentes, e apresentaram recuperação média de $(100,93 \pm 0,77\%)$ (Tabela 9).

5.3.4 Precisão

A precisão foi avaliada em termos de repetibilidade (intra-dia) e precisão intermediária (inter-dia). A porcentagem RSD para as precisões intra e inter-dia foram de 0,88 e 1,29, respectivamente. Os resultados de repetibilidade e os resultados de precisão intermediária apresentaram baixos valores de RSD% (<2 %), confirmando que o método CZE proposto é preciso. Os resultados são apresentados na Tabela 9.

Tabela 9 – Dados de recuperação e precisão para determinação do aripiprazol pelo método CZE proposto. ^aMédia das três replicatas; ^bMédia de todos os níveis de recuperação (n = 9); ^cMédia de seis determinações e um analista; ^dMédia de doze determinações e dois analistas; SD: desvio padrão; RSD: desvio padrão relativo.

Recuperação				
Concentração teórica (µg/mL)	Concentração encontrada ^a (µg/mL)	Recuperação (%±SD) ^a	RSD (%)	Recuperação média (%±SD) ^b
80	80,93	101,17 ± 0,43	0,42	100,93 ±
100	101,03	101,03 ± 0,43	0,42	0,77
120	120,72	100,60 ± 1,10	1,09	
Precisão				
Concentração (µg/mL)	Intra-dia			
	Recuperação média ^c (µg/mL)	SD	RSD %	
100	99,29	0,09	0,88	
Concentração (µg/mL)	Inter-dia			
	Recuperação média ^d (µg/mL)	SD	% RSD	
100	99,49	0,13	1,29	

Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

5.3.5 Robustez

Não foram observados efeitos significativos ao aplicar pequenas mudanças nas condições eletroforéticas (voltagem aplicada, temperatura capilar ou tempo de injeção hidrodinâmica). Os resultados apresentados Tabela 10 mostram que para todos os casos os RSD% foram inferiores a 2%, reforçado assim a robustez do método CZE proposto.

Tabela 10 – Resultados de robustez para quantificação de medicamentos (limite de aceitação RSD% < 2). ^aMédia de três determinações; ARP: aripiprazol; IS: Padrão Interno; RSD: Desvio padrão relativo; kV: quilovolt

Condição	Razão entre área dos picos (ARP/IS)	
	Média ^a	RSD %
Voltagem aplicada (kV)		
13	1,5490	1,36
15	1,5738	1,18
7	1,5541	1,34
Temperatura capilar (°C)		
24	1,5841	0,26
25	1,5883	0,16
26	1,5745	1,01
Tempo de injeção (s)		
4	1,5756	1,53
5	1,5636	0,83
6	1,5471	0,97

Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

5.4. Otimização das condições de degradação oxidativa pelo planejamento de experimentos

O planejamento de experimentos e os experimentos de degradação oxidativa realizados pelo planejamento fatorial estão apresentados na Tabela 11.

Tabela 11 - Matriz experimental do planejamento fatorial 2³ para a degradação oxidativa. ^a n = 2 para cada condição

Número do experimento	Nível do fator			% Degradação ^a
	X ₁	X ₂	X ₃	
1	-1	-1	-1	3,31
2	+1	-1	-1	4,70
3	-1	+1	-1	5,37
4	+1	+1	-1	6,13
5	-1	-1	+1	10,90
6	+1	-1	+1	13,91
7	-1	+1	+1	20,81
8	+1	+1	+1	26,67

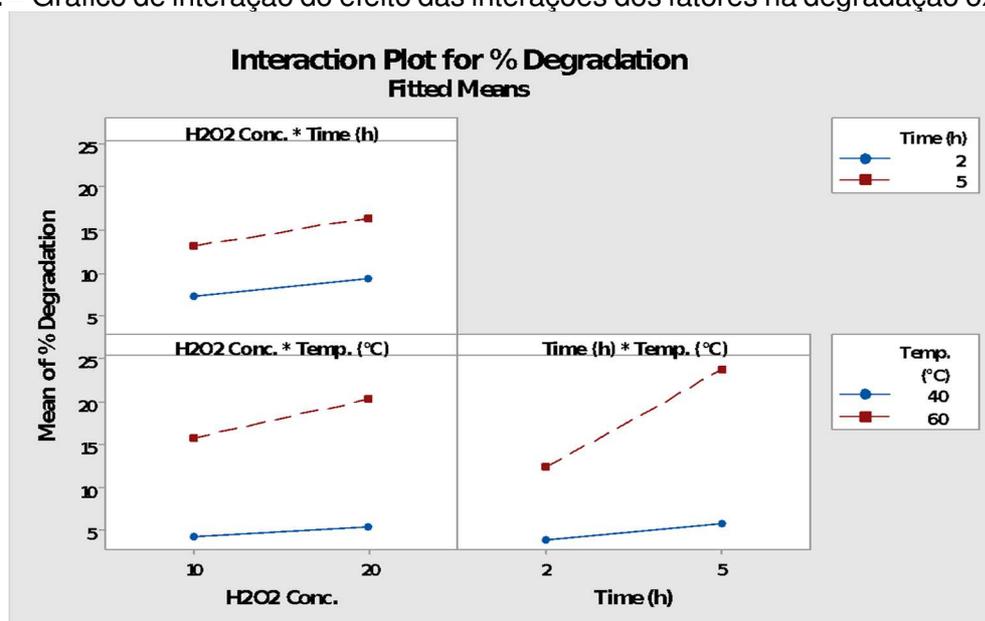
Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Após tratar os resultados obtidos por regressão múltipla, a seguinte equação foi obtida (Equação 4):

$$Y = -5,97 + 0,320 X_1 + 0,1526 X_2 - 2,02 X_3 - 0,00348 X_1X_2 - 0,2530 X_1X_3 + 0,0728 X_2X_3 + 0,00580 X_1X_2X_3 \quad (4)$$

O gráfico do efeito das interações dos fatores na porcentagem de degradação oxidativa gerado pela regressão múltipla (Figura 32) mostra que a temperatura (X_3) foi o fator mais significativo, comparado ao efeito do tempo de exposição (X_2) e da concentração de H_2O_2 (X_1). Adicionalmente, os resultados mostraram que as interações entre os fatores também foram significativas.

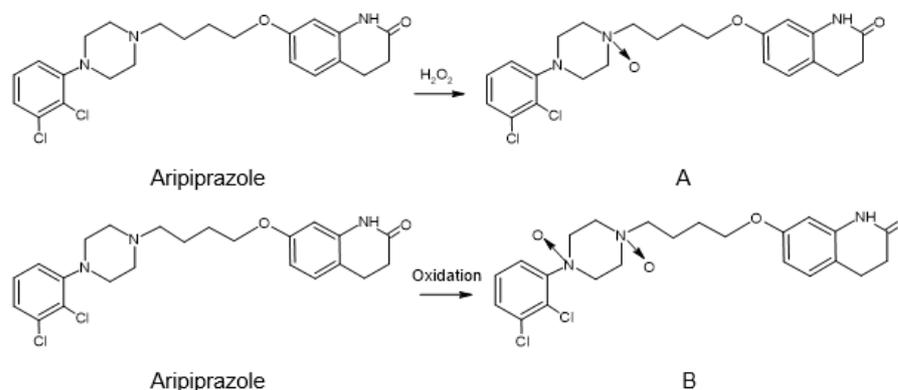
Figura 32 – Gráfico de interação do efeito das interações dos fatores na degradação oxidativa.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

As condições ideais indicadas pela ferramenta de otimização do Minitab® para degradar 10% do aripiprazol sob degradação oxidativa correspondem a valores de 10% de H_2O_2 , temperatura de 50 °C e 3h de reação. Ao seguir tais condições foi possível obter 11% de degradação do aripiprazol. Visto que o aripiprazol é suscetível a oxidação no grupo piperazina, o teste oxidativo deu origem ao aripiprazol-1-N-óxido (Figura 33A) ou aripiprazol 1,4-di-N-óxido (Figura 33B) (SATYANARAYANA *et al.*, 2005).

Figura 33 – Oxidação do aripiprazol. A: aripiprazol-1-N-óxido, B: aripiprazol 1,4-di-N-óxido.

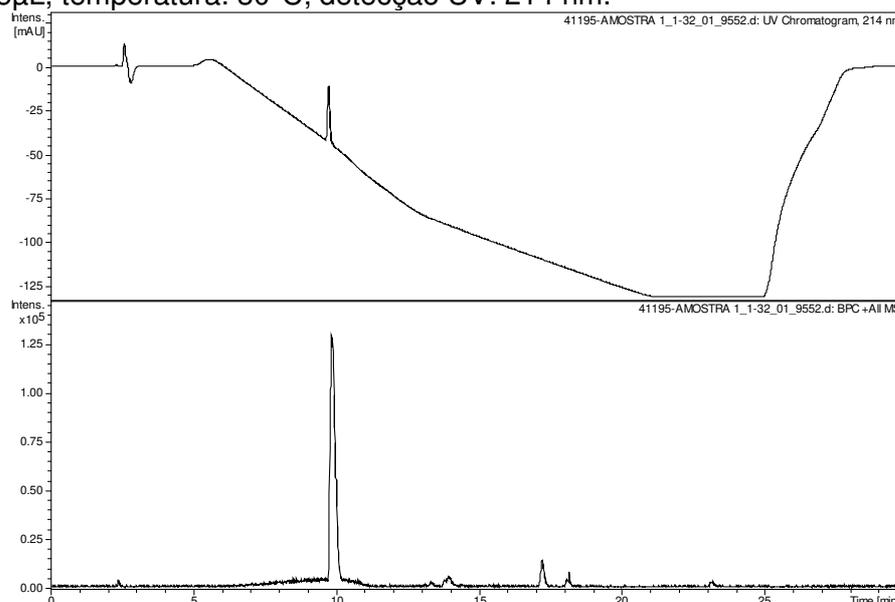


Fonte: (SATYANARAYANA *et al.*, 2005).

5.5. Identificação dos produtos de degradação por espectrometria de massas

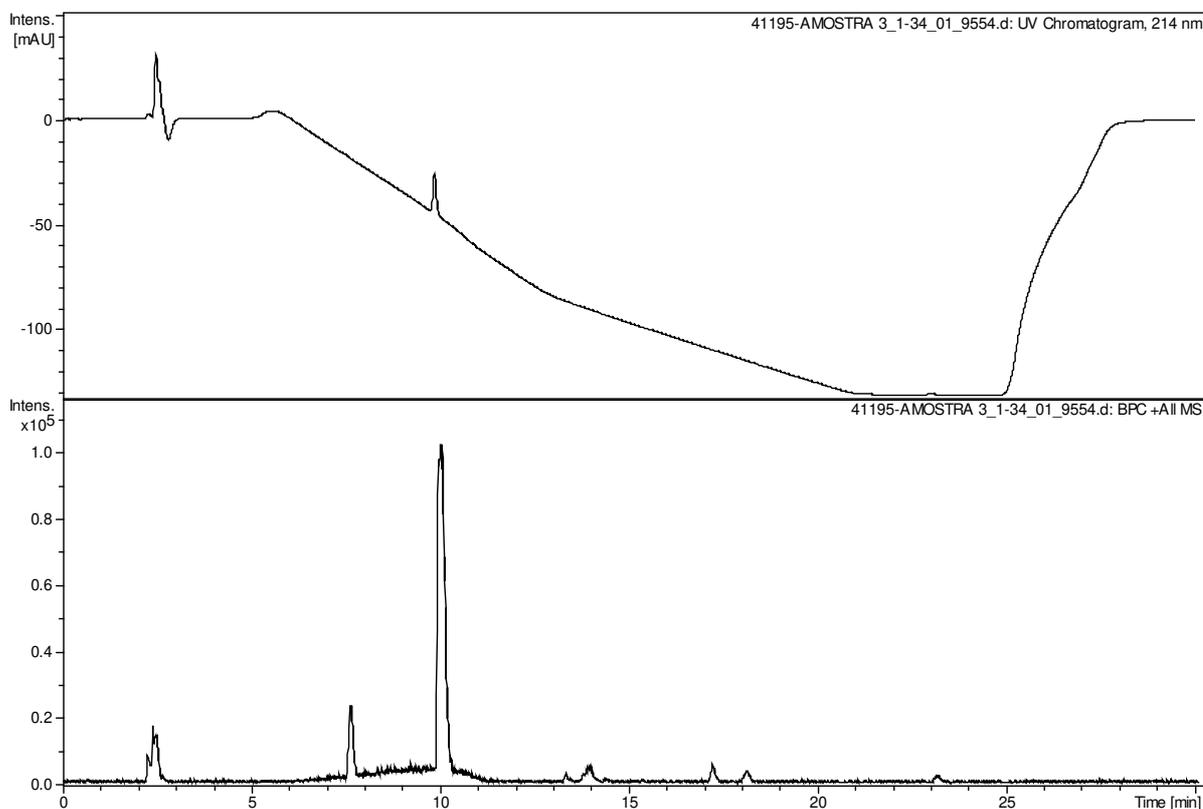
A solução padrão de aripiprazol (Figura 34) e solução amostra de aripiprazol após degradação oxidativa (Aristab®) (Figura 35) foram avaliadas com o intuito de elucidar os produtos de degradação obtidos nessa condição de estresse; para tanto, foi utilizada a técnica da cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (HPLC-MS).

Figura 34 - Cromatograma da solução amostra de aripiprazol após degradação oxidativa (Aristab®) (ARP) 0,1 mg/mL. Condições: Coluna Eclipse XDB-Phenyl (250 mm x 4,6 mm x 5µm); fase móvel: gradiente de TFA 0,2% aquoso e acetonitrila, fluxo de 1,0 mL/min, volume de injeção: 5µL, temperatura: 30°C; detecção UV: 214 nm.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 35 - Cromatograma do aripiprazol (ARP) após degradação oxidativa 0,1 mg/mL. Condições: Coluna Eclipse XDB-Phenyl (250 mm x 4,6 mm x 5 μ m); fase móvel: gradiente de TFA 0,2% aquoso e acetonitrila, fluxo de 1,0 mL/min, volume de injeção: 5 μ L, temperatura: 30°C; detecção UV: 214 nm.



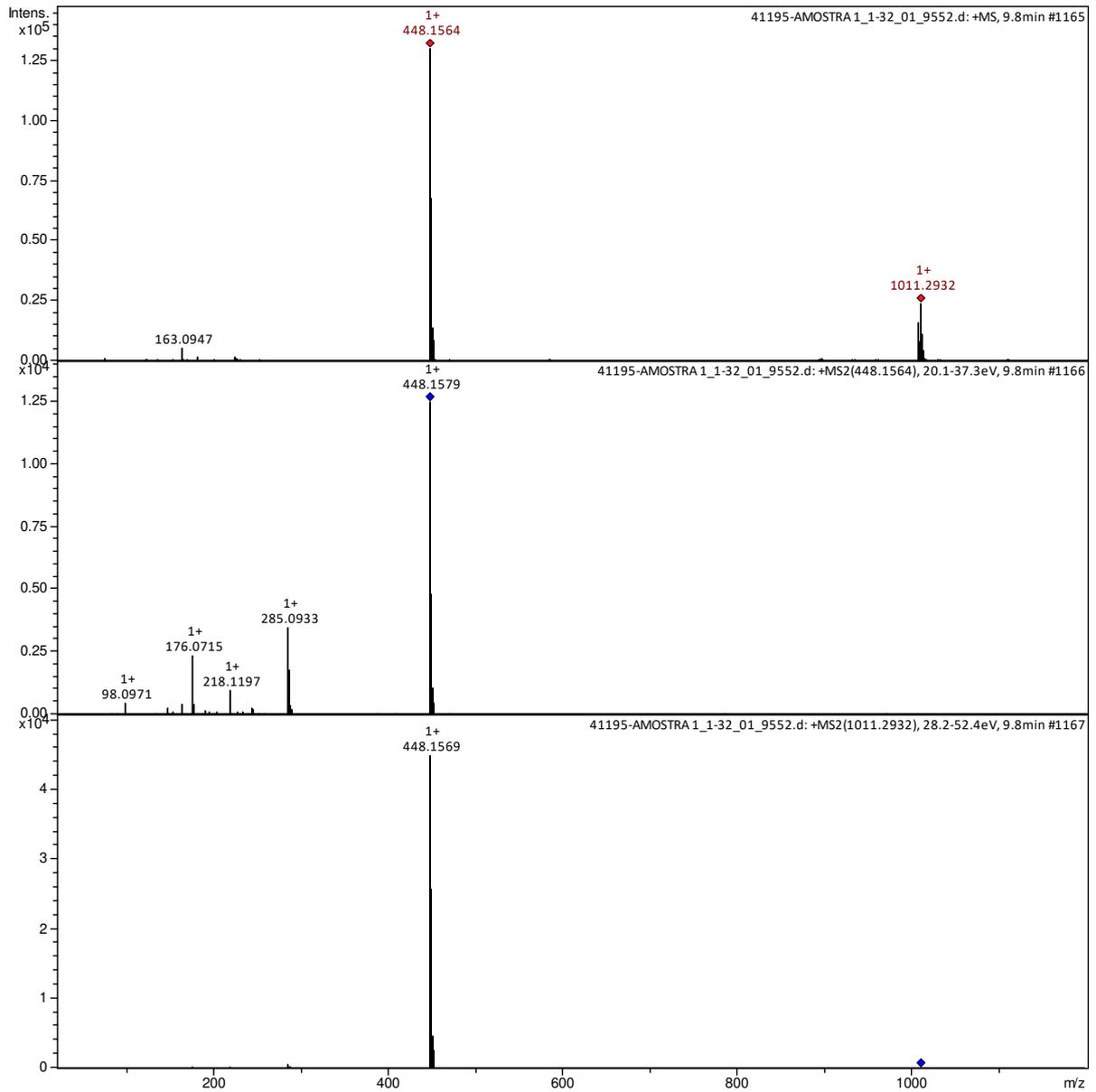
Fonte: Elaborado pelo autor.

O espectro de massa do aripiprazol sem degradação pode ser observado na Figura 36. Na degradação forçada do aripiprazol foram originados quatro produtos de degradação oxidativa: o produto de degradação 1 (DP 1) no TR de 2,4 min, produto de degradação 2 (DP 2) no TR de 7,6 min, produto de degradação 3 (DP 3) no TR de 10,0 min e produto de degradação 4 (DP 4) no TR de 17,2 min.

O DP 1 em 2.4 minutos apresenta-se relativamente intenso com massa 365 Da (Figura 37). Não foi observado fragmento proveniente do aripiprazol (464 Da) que se relacione com a massa de 365 Da, logo deve ser um composto do produto comercial, sem relação com a oxidação. O DP 2 em 7,6 min com massa 319 Da (Figura 38) pode ser considerado como composto resultante da quebra e perda do anel aromático ligado aos dois cloros (145 Da). O DP 3 em 10,0 min (Figura 39) sugere-se ao

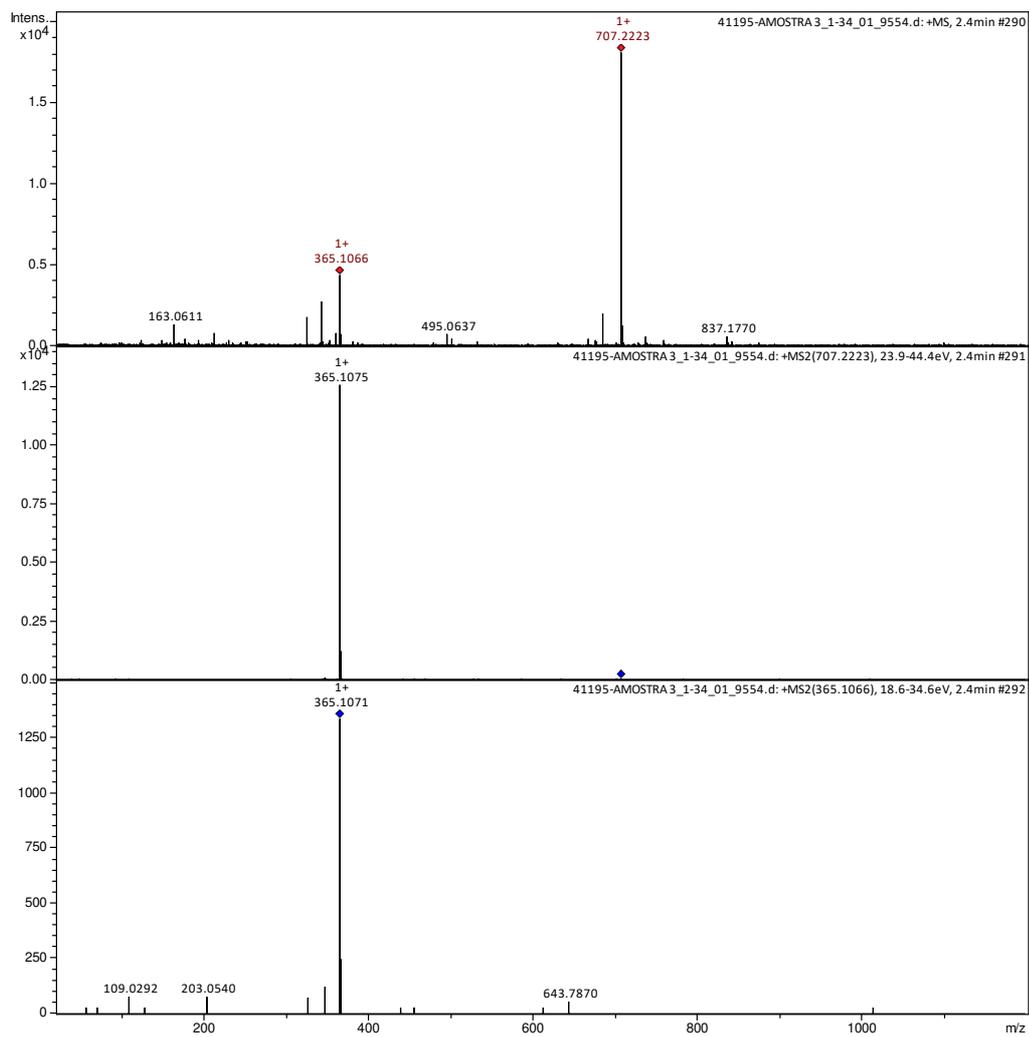
composto de formação de N-óxido no anel de piperazina do aripiprazol (nome químico 7-[4-[4-(2,3-diclorofenil)-1-piperazinil]-butoxi]-3,4-di-hidro-2(1H)-quinolinona-1N-óxido. O DP 4 em 17,9 min com massa 338 Da (Figura 40) apresenta intensidade considerável, porém não foi possível identificar esse composto.

Figura 36 – Espectro de massa do aripiprazol (ARP).



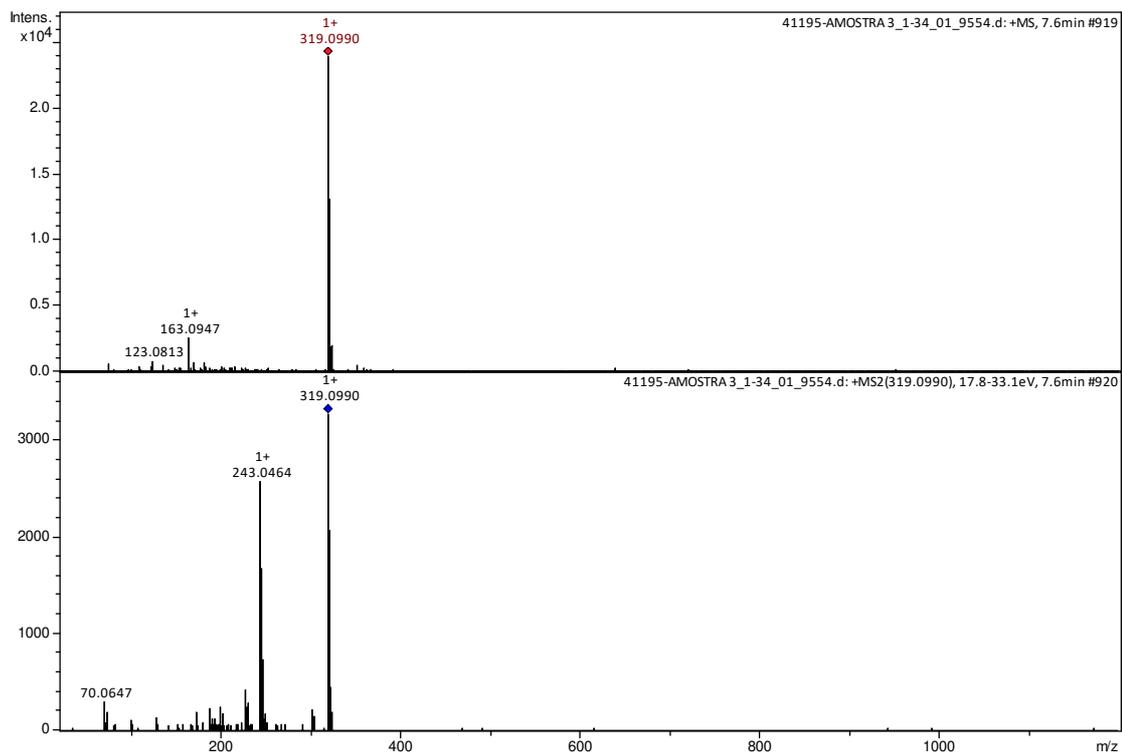
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 37 – Espectro de massa do produto de degradação 1 (DP 1) no TR de 2,4 min.



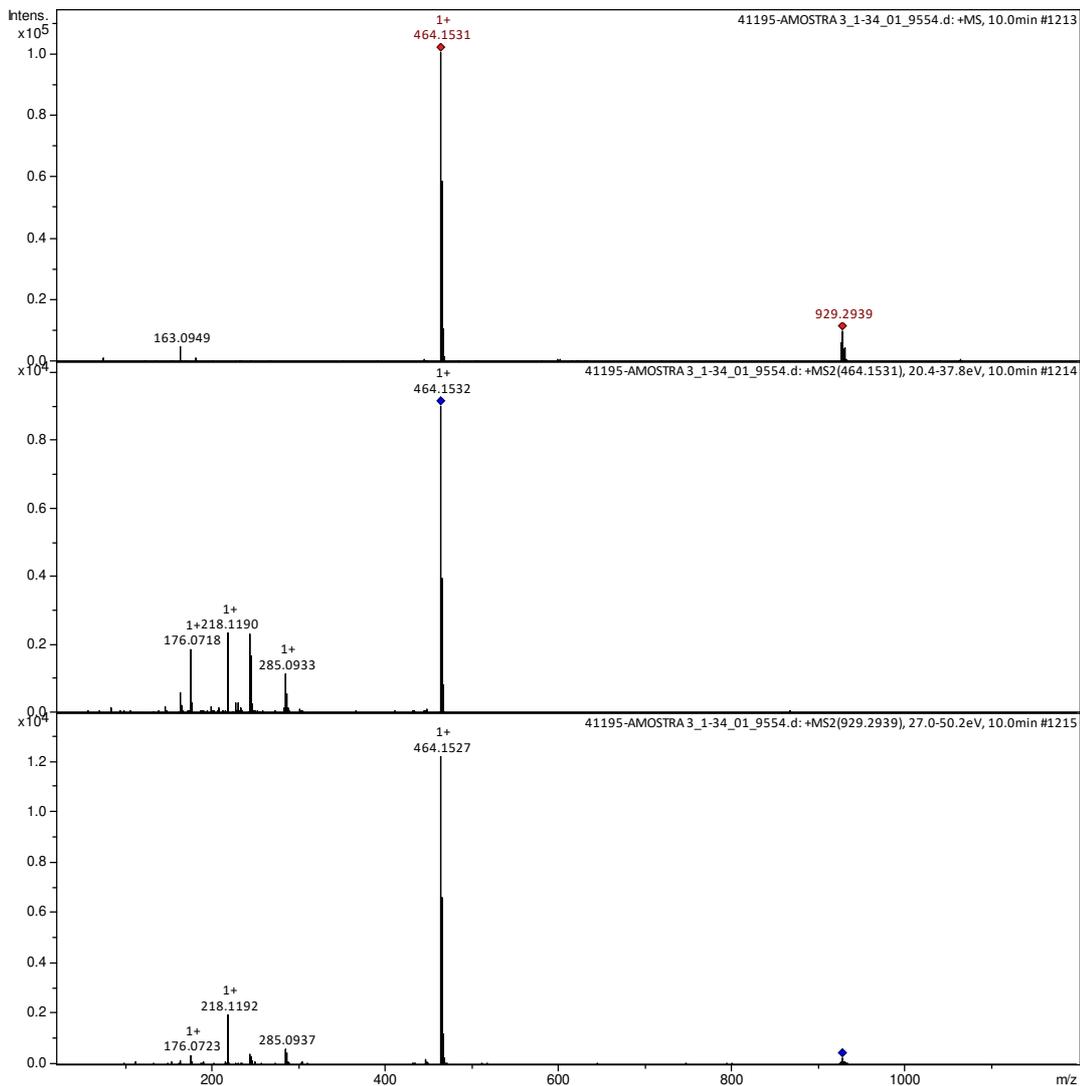
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 38 – Espectro de massa do produto de degradação 2 (DP 2) no TR de 7,6 min.



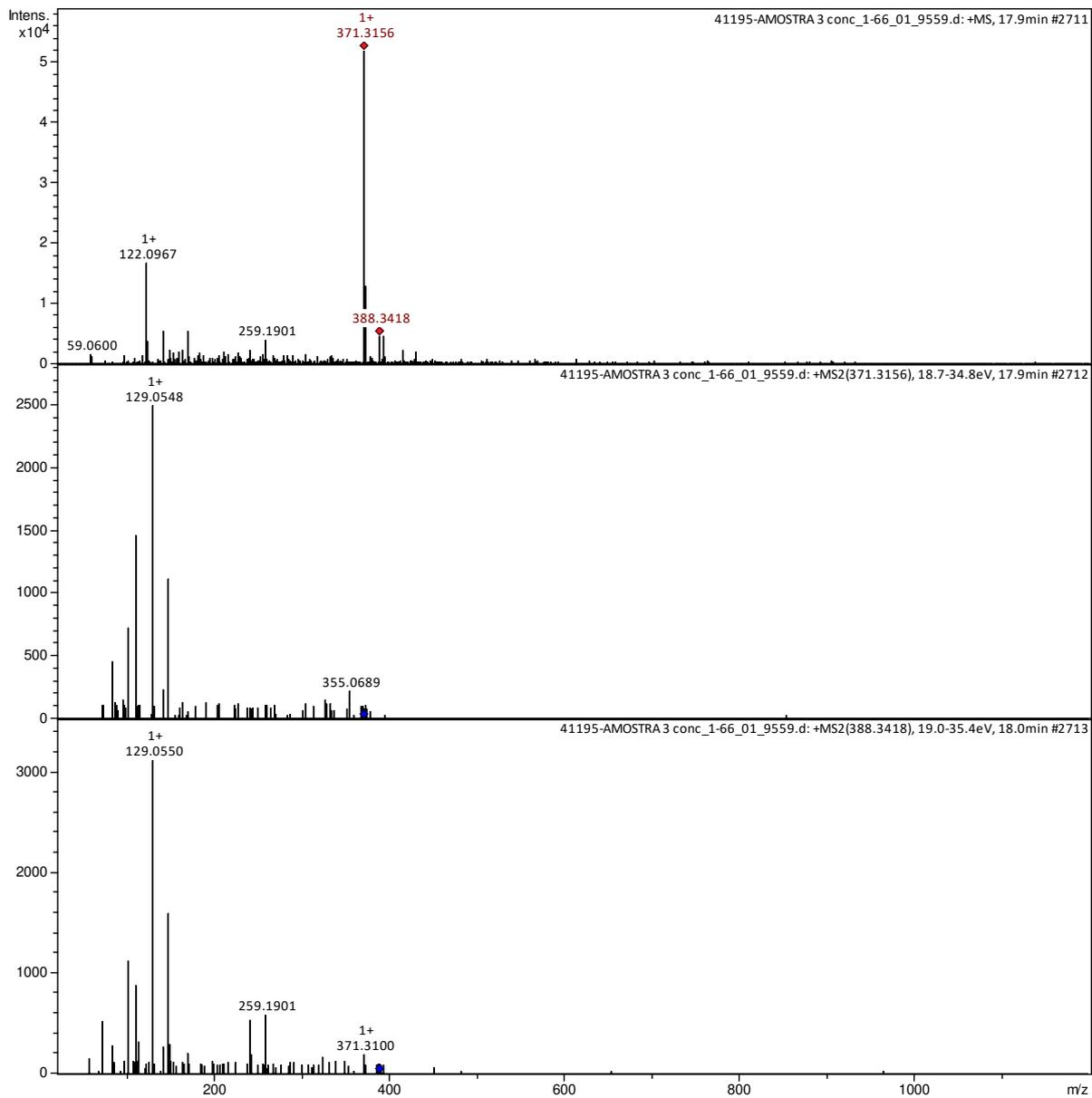
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 39 – Espectro de massa do produto de degradação 3 (DP 3) no TR de 10,0 min



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 40 – Espectro de massa do produto de degradação 4 (DP 4) no TR de 17,9 min



Fonte: Elaborado pelo autor.

6. CONCLUSÃO

Um novo método de eletroforese capilar de zona indicador de estabilidade ambientalmente amigável foi desenvolvido e validado para a determinação do aripiprazol em medicamentos. Neste estudo, o aripiprazol foi submetido a estudos de estresse conforme as diretrizes do ICH. A hidrólise ácida e alcalina e as condições fotolíticas e térmicas não promoveram a degradação do aripiprazol, e, portanto, não foram visualizados pelo método. O aripiprazol sofreu degradação significativa sob estresse oxidativo. O método de desenvolvimento baseado na abordagem da otimização por planejamento experimental foi eficiente na determinação do aripiprazol na presença de seus produtos de degradação, após o estresse oxidativo. Este é o primeiro método CZE proposto que indica a estabilidade para quantificação do aripiprazol na presença de produtos de degradação. Adicionalmente, o método proposto resultou em uma separação satisfatória do aripiprazol dos produtos de degradação. Conforme os resultados da análise estatística, o método foi linear, preciso, exato e robusto. A precisão e exatidão do método demonstraram sua alta qualidade, e os resultados de robustez reforçam a ampla aplicabilidade do método. Não foi observada nenhuma interferência de outros componentes da forma farmacêutica ou de produtos de degradação. O método CZE é simples e de fácil aplicação, apresentando diversas vantagens em meio aos métodos cromatográficos convencionais como a redução na utilização de solventes orgânicos, o menor volume de amostra e o aumento da eficiência e da resolução do método. Portanto, este novo método é viável, econômico e rápido, e pode ser aplicado com sucesso na análise de controle de qualidade de rotina de aripiprazol em preparações farmacêuticas na presença de produtos de degradação. O método utilizado por HPLC-RP modo gradiente permitiu separar o aripiprazol dos seus produtos de degradação. Esse método foi aplicado na avaliação dos produtos de degradação por LC-MS e permitiu identificar o principal produto de degradação oxidativa, o aripiprazol-1-N-óxido.

7. REFERÊNCIAS

AHUJA, S. 1 Overview of capillary electrophoresis in pharmaceutical analysis. In: AHUJA, S.; JIMIDAR, M. I. (Eds.). **Separation Science and Technology**. Capillary Electrophoresis Methods for Pharmaceutical Analysis. [s.l.] Academic Press, 2008. v. 9p. 1–8.

ALTRIA, K. D. Determination of drug-related impurities by capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 735, n. 1, p. 43–56, 31 maio 1996.

ARGENTINA. ANMAT. Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica. Disposición 6949-13, 2013. Disponível em: http://www.anmat.gov.ar/boletin_anmat/noviembre_2013/Dispo_6949-13.pdf. Acesso em 09 jan, 2022.

ARMSTRONG, N. A. **Pharmaceutical Experimental Design and Interpretation, Second Edition**. [s.l.] Taylor & Francis, 2006.

AUBRY, A.-F.; TATTERSALL, P.; RUAN, J. Development of Stability Indicating Methods. In: HUYNH-BA, K. (Ed.). **Handbook of Stability Testing in Pharmaceutical Development: Regulations, Methodologies, and Best Practices**. New York, NY: Springer New York, 2009. p. 139–161.

BAERTSCHI, S. W.; ALSANTE, K. M.; REED, R. A. **Pharmaceutical Stress Testing: Predicting Drug Degradation, Second Edition**. CRC Press, 2016.

BAKSHI, M.; SINGH, S. Development of validated stability-indicating assay methods—critical review. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 28, n. 6, p. 1011–1040, 15 jun. 2002.

BHARATE, S.; BHARATE, S.; BAJAJ, A. Interactions and Incompatibilities of Pharmaceutical Excipients with Active Pharmaceutical Ingredients: A Comprehensive Review. **Journal of Excipients and Food Chemicals**, v. 1, p. 3–26, 1 dez. 2010.

BIDULOCK, A. C. E. et al. Integrating Internal Standards into Disposable Capillary Electrophoresis Devices To Improve Quantification. **Analytical Chemistry**, v. 89, n. 5, p. 2886, 7 mar. 2017.

BLESSY, M. et al. Development of forced degradation and stability indicating studies of drugs—A review. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 4, n. 3, p. 159–165, 1 jun. 2014.

BRASIL. Resolução de Diretoria Colegiada – RDC n. 45, de 09 de agosto de 2012 – ANVISA. Dispõe sobre a realização de estudos de estabilidade de insumos farmacêuticos ativos. 2012. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33836/349509/RDC%2B45-2012%2BEstudos%2Bde%2BEstabilidade%2B-%2BIFA.pdf/4f387099-3ffc-42c6-9afe-41b4f880e17d>. Acesso em: 08 jan. 2022.

BRASIL. Resolução de Diretoria Colegiada – RDC n. 58, de 20 de dezembro de 2013 – ANVISA. Estabelece parâmetros para a notificação, identificação e qualificação de produtos de degradação em medicamentos com substâncias ativas sintéticas e semissintéticas, classificados como novos, genéricos e similares, e dá outras providências. 2013. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2013/rdc0058_20_12_2013.pdf. Acesso em: 10 março. 2022.

BRASIL. Resolução de Diretoria Colegiada – RDC n. 53, de 04 de dezembro de 2015 – ANVISA. Estabelece parâmetros para a notificação, identificação e qualificação de produtos de degradação em medicamentos com substâncias ativas sintéticas e semissintéticas, classificados como novos, genéricos e similares, e dá outras providências. 2015 (2). Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/3295768/%281%29RDC_53_2015_COMP.pdf/d38f507d-745c-4f6b-a0a6-bd250f2e9892. Acesso em: 10 março 2022.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Guia para obtenção do perfil de degradação, e identificação e qualificação de produtos de degradação em medicamentos. 2015 (1). Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2738062/Perfil+e+produtos+de+degrada%C3%A7%C3%A3o+em+medicamentos.pdf/c18a4857-9a5c-4292-a1bf-07af6cad6902?version=1.0>. Acesso em: 20 março. 2022.

BOCCARDI, GIOVANNI; Oxidative Susceptibility Testing. In: Baertschi, Steven W; (Editor). *Pharmaceutical Stress Testing in Predicting Drug Degradation*. Indiana, USA, 2008. Cap. 7, p.221-223.

CASEY, A. B.; CANAL, C. E. Classics in Chemical Neuroscience: Aripiprazole. **ACS chemical neuroscience**, v. 8, n. 6, p. 1135–1146, 21 jun. 2017.

CHEMICALIZE. Calculation. **Aripiprazole**. Disponível em: <https://chemicalize.com/#/calculation>. Acesso em: 03 jan. 2019.

CINDRIC, M.; MATYSIK, F.-M. Coupling electrochemistry to capillary electrophoresis-mass spectrometry. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, Electrochemistry combined with mass spectrometry. v. 70, p. 122–127, 1 jul. 2015.

DE BARTOLOMEIS, A.; TOMASETTI, C.; IASEVOLI, F. Update on the Mechanism of Action of Aripiprazole: Translational Insights into Antipsychotic Strategies Beyond Dopamine Receptor Antagonism. **CNS Drugs**, v. 29, p. 773–799, 2015.

DEOKATE, U. A.; GORDE, A. M. Forced degradation and Stability Testing: Strategies and Analytical Perspectives. **PharmaTutor**, v. 2, n. 6, p. 61–74, 6 jan. 2014.

DI SCIASCIO, G.; RIVA, M. A. Aripiprazole: from pharmacological profile to clinical use. **Neuropsychiatric Disease and Treatment**, v. 11, p. 2635–2647, 13 out. 2015.

EUROPEAN MEDICINES AGENCY. EMA. Committee for Proprietary Medicinal Products (CPMP). Guideline on stability testing: Stability testing of existing active substances and related finished products, 2007. Disponível em: https://www.ema.europa.eu/documents/scientific-guideline/guideline-stability-testing-stability-testing-existing-active-substances-related-finished-products_en.pdf. Acesso em 09 abr, 2022.

EUROPEAN MEDICINES AGENCY. EMA. Abilify. Product information, 2018. Disponível em: https://www.ema.europa.eu/documents/product-information/abilify-epar-product-information_en.pdf. Acesso em 09 abr, 2022.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, FDA. **CFR - Code of Federal Regulations Title 21**, 2018. Disponível em: <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?CFRPart=211&showFR=1>. Acesso em 09 abr, 2022.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, FDA. Q1A(R2). Guidance for Industry. Stability Testing of Drug Substances and Drug Products, 2003. Disponível em: <https://www.fda.gov/downloads/drugs/guidances/ucm073369.pdf>. Acesso em 14 jan, 2022.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, FDA. FDA prescribing information aripiprazole, 2015. Disponível em: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2014/021436s038,021713s030,021729s022,021866s023lbl.pdf. Acesso em: 23 jan. 2022.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, FDA. Center for Drug Evaluation and Research. Guidance for industry. Analytical procedures and method validation: chemistry, manufacturing and controls documentation. Rockville: FDA, 2015. Disponível em: <https://www.fda.gov/downloads/drugs/guidances/ucm386366.pdf>. Acesso em: 16 jan. 2022.

FURLANETTO, S. et al. Pitfalls and success of experimental design in the development of a mixed MEKC method for the analysis of budesonide and its impurities. **Electrophoresis**, v. 30, n. 4, p. 633–643, fev. 2009.

GAVIN, P. F. et al. A quality evaluation strategy for multi-sourced active pharmaceutical ingredient (API) starting materials. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 41, n. 4, p. 1251–1259, 16 jun. 2006.

GILLESPIE, A. et al. Is treatment-resistant schizophrenia categorically distinct from treatment-responsive schizophrenia? A systematic review. **BMC Psychiatry**, v. 17, 14 jan. 2017.

GÖRÖG, S. Chemical and analytical characterization of related organic impurities in drugs. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 377, n. 5, p. 852–862, nov. 2003.

GÖRÖG, S. Critical review of reports on impurity and degradation product profiling in the last decade. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, The Last Decade in Regulation and Control of Impurities in Pharmaceuticals. v. 101, p. 2–16, 1 abr. 2018.

HOLM, R.; ELDER, D. P. Analytical advances in pharmaceutical impurity profiling. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, Industrial Pharmaceutical Sciences. v. 87, p. 118–135, 25 maio 2016.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE. ICH Q6A. Harmonised tripartite guideline. Specifications: test procedures and acceptance criteria for new drug substances and new drug products: chemical substances.

1999. Disponível em:
https://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q6A/Step4/Q6Astep4.pdf. Acesso em 29 jan. 2022.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE. ICH Q1B. Harmonised Tripartite Guideline. STABILITY TESTING: PHOTOSTABILITY TESTING OF NEW DRUG SUBSTANCES AND PRODUCTS.

1996. Disponível em:
https://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q1B/Step4/Q1B_Guideline.pdf. Acesso em: 29 jan. 2022.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE. ICH Q3A (R2). Impurities in new drugs substances. 2006. Disponível em:

https://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q3A_R2/Step4/Q3A_R2_Guideline.pdf. Acesso em: 23 jan. 2022.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE. ICH Q1A (R2). Stability testing of new drug substances and products. 2003. Disponível em:

http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q1A_R2/Step4/Q1A_R2_Guideline.pdf. Acesso em: 23 fev. 2022.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE. ICH Q8(R2). Harmonised Tripartite Guideline. Pharmaceutical Development. 2009. Disponível em:

https://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q8_R1/Step4/Q8_R2_Guideline.pdf. Acesso em: 20 fev. 2022.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE. ICH Q3C (R6). Guideline for residual solvents. 2016 (1). Disponível em:

https://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q3C/Q3C_R6_Step_4.pdf. Acesso em: 02 jan. 2022.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION OF TECHNICAL REQUERIMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE. ICH Q3D. Guideline for elemental impurities. 2014. Disponível em: https://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q3D/Q3D_Step_4.pdf. Acesso em: 02 jan. 2022.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION OF TECHNICAL REQUERIMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE. ICH Q3B (R2). Impurities in new drug products. 2016 (2). Disponível em: https://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q3B_R2/Step4/Q3B_R2_Guideline.pdf. Acesso em: 02 jan. 2022.

JIMIDAR, M. I. 2 Theoretical considerations in performance of various modes of CE. In: AHUJA, S.; JIMIDAR, M. I. (Eds.). **Separation Science and Technology**. Capillary Electrophoresis Methods for Pharmaceutical Analysis. Academic Press, 2008. v. 9p. 9–530.

KĄTNY, M.; FRANKOWSKI, M. Impurities in Drug Products and Active Pharmaceutical Ingredients. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 47, n. 3, p. 187–193, 4 maio 2017.

KLAMPFL, C. W. Recent advances in the application of capillary electrophoresis with mass spectrometric detection. **ELECTROPHORESIS**, v. 27, n. 1, p. 3–34, 2006.

KOGAWA, A. C. [UNESP]; SALGADO, H. R. N. [UNESP]. Impurities and forced degradation studies: A review. **Current Pharmaceutical Analysis**, p. 18–24, 1 jan. 2016.

MAGGIO, R. M.; VIGNADUZZO, S. E.; KAUFMAN, T. S. Practical and regulatory considerations for stability-indicating methods for the assay of bulk drugs and drug formulations. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 49, p. 57–70, 1 set. 2013.

MORAES DO CARMO, A. C.; PEREIRA, R. S.; GRATIERI, T. Brazilian requirements for stability indicating methods. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 98, p. 58–63, 1 jan. 2018.

MORENO-KÜSTNER, B.; MARTÍN, C.; PASTOR, L. Prevalence of psychotic disorders and its association with methodological issues. A systematic review and meta-analyses. **PloS One**, v. 13, n. 4, p. e0195687, 2018.

NABER, D.; LAMBERT, M. Aripiprazole: a new atypical antipsychotic with a different pharmacological mechanism. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 28, n. 8, p. 1213–1219, dez. 2021.

NAGESWARA RAO, R.; NAGARAJU, V. An overview of the recent trends in development of HPLC methods for determination of impurities in drugs. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 33, n. 3, p. 335–377, 15 out. 2003.

O'FLAHERTY, B.; NUNNALLY, B. K. 3 Equipment considerations for capillary electrophoresis. In: AHUJA, S.; JIMIDAR, M. I. (Eds.). **Separation Science and Technology**. Capillary Electrophoresis Methods for Pharmaceutical Analysis. Academic Press, 2008. v. 9p. 43–62.

ORLANDINI, S.; PINZAUTI, S.; FURLANETTO, S. Application of quality by design to the development of analytical separation methods. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 405, n. 2–3, p. 443–450, jan. 2013.

OTSUKA Pharmaceutical Co, L. Abilify® Prescribing Information. 2018. Disponível em: <https://www.otsuka-us.com/media/static/Abilify-PI.pdf>. Acesso em: 29 dec. 2018.

OWEN, M. J.; SAWA, A.; MORTENSEN, P. B. Schizophrenia. **The Lancet**, v. 388, n. 10039, p. 86–97, 2 jul. 2016.

PALMER, B. A.; PANKRATZ, V. S.; BOSTWICK, J. M. The lifetime risk of suicide in schizophrenia: a reexamination. **Archives of General Psychiatry**, v. 62, n. 3, p. 247–253, mar. 2005.

PANTŮCKOVÁ, P. et al. Electrolyte systems for on-line CE-MS: detection requirements and separation possibilities. **Electrophoresis**, v. 30, n. 1, p. 203–214, jan. 2009.

PAPADOYANNIS, I. N.; GIKA, H. G. Peak Purity Determination with a Diode Array Detector. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 27, n. 6, p. 1083–1092, jan. 2004.

PERAMAN, R.; BHADRAYA, K.; PADMANABHA REDDY, Y. Analytical Quality by Design: A Tool for Regulatory Flexibility and Robust Analytics. **International Journal of Analytical Chemistry**, v. 2015, p. 1–9, 2015.

PERSICH, P. et al. A Model Approach for Developing Stability-Indicating Analytical Methods. In: BAJAJ, S.; SINGH, S. (Eds.). **Methods for Stability Testing of Pharmaceuticals**. Methods in Pharmacology and Toxicology. New York, NY: Springer New York, 2018. p. 99–121.

PUBCHEM. **Aripiprazole**. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/60795>. Acesso em: 3 jan. 2019.

QIU, F.; NORWOOD, D. L. Identification of Pharmaceutical Impurities. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 30, n. 5–7, p. 877–935, 1 fev. 2007.

QUADRI, S. S.; SONWANE, L. V.; POUL, B.; KAMSHETTE, S. Review on stability indicating assay methods (SIAMs). *PharmaTutor*, v. 2, n. 8, p. 16-31, 2014.

ROCHET, J.-C. Pharmaceutical Analysis: A Textbook for Pharmacy Students and Pharmaceutical Chemists. **American Journal of Pharmaceutical Education**, v. 70, n. 2, 2006.

RIBEIRO, E. L. A. et al. Efficacy and safety of aripiprazole for the treatment of schizophrenia: an overview of systematic reviews. **European Journal of Clinical Pharmacology**, v. 74, n. 10, p. 1215–1233, 1 out. 2018.

SCHAPPLER, J.; GONZÁLEZ-RUIZ, V.; RUDAZ, S. CE-MS in Drug Analysis and Bioanalysis. In: **Capillary Electrophoresis-Mass Spectrometry (CE-MS): Principles and Applications**, 2016, p. 129–157.

SENGUPTA, P.; CHATTERJEE, B.; TEKADE, R. K. Current regulatory requirements and practical approaches for stability analysis of pharmaceutical products: A comprehensive review. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 543, n. 1, p. 328–344, 30 maio 2018.

SHARMA, M. K.; MURUGESAN, M. Forced Degradation Study an Essential Approach to Develop Stability Indicating Method. **Journal of Chromatography & Separation Techniques**, v. 08, n. 01, 2017.

SRINIVAS, K. S. V. et al. Stress Degradation Studies on Aripiprazole and Development of a Validated Stability Indicating LC Method. **Chromatographia**, v. 68, n. 7, p. 635–640, 1 out. 2008.

TAMIZI, E.; JOUYBAN, A. Forced degradation studies of biopharmaceuticals: Selection of stress conditions. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 98, p. 26–46, 1 jan. 2016.

UNITED STATES PHARMACOPEIA: 41 (2); National Formulary; NF 36, Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2018. p.6325-6330, 7655-7658.

UNITED STATES PHARMACOPEIA: 41 (1); National Formulary; NF 36, Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2018. p.396-397, 6191.

VOETEN, R. L. C. et al. Capillary Electrophoresis: Trends and Recent Advances. **Analytical Chemistry**, v. 90, n. 3, p. 1464–1481, 6 fev. 2018.

VON, A. B.; NICHOLSON, G.; BAYER, E. Recent advances in capillary electrophoresis/electrospray-mass spectrometry. **Electrophoresis**, v. 22, n. 7, p. 1251–1266, abr. 2001.

WELANKIWAR, A. et al. Photostability testing of pharmaceutical products. **International Research Journal of Pharmacy**, v. 4, 1 set. 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, WHO. **Expert Committee on Specifications for Pharmaceutical Preparations: forty-third report**. Geneva: World Health Organization, 2009. Disponível em: https://www.who.int/medicines/publications/pharmprep/pdf_trs953.pdf?ua=1. Acesso em 09 fev, 2022.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, WHO (1), World Health Organization Mental health. Schizophrenia. Disponível em: https://www.who.int/mental_health/management/schizophrenia/en/. Acesso em: 20 dic. 2021.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, WHO (2), World Health Organization, Schizophrenia, Key Facts. Disponível em: <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/schizophrenia>. Acesso em: 20 dic. 2021.

ZHOU, D.; PORTER, W. R.; ZHANG, G. G. Z. Chapter 5 - Drug Stability and Degradation Studies. In: QIU, Y. et al. (Eds.). **Developing Solid Oral Dosage Forms (Second Edition)**. Boston: Academic Press, 2017. p. 113–149.

ZHOU, Q.; TAN, Z.; YANG, D.; TU, J.; WANG, Y.; ZHANG, Y.; LIU, Y.; GAN, G. Improving the solubility of aripiprazole by multicomponent crystallization. *Crystals*, v. 11, 2021. 3. DOI: 10.3390/cryst11040343.

ZIMMER, M. Forced Degradation and Long-Term Stability Testing for Oral Drug Products: A Practical Approach. In: BAJAJ, S.; SINGH, S. (Eds.). **Methods for Stability Testing of Pharmaceuticals**. Methods in Pharmacology and Toxicology. New York, NY: Springer New York, 2018. p. 75–98.