

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA**  
**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**DECONVOLUÇÃO DE ESPECTROS UV DIRETAMENTE DE  
SOLUÇÕES DE DEGRADAÇÃO FORÇADA DE FÁRMACOS**

**Stéphany Gegenheimer Tagarro Vianna\***

Dissertação apresentada como parte dos  
requisitos para obtenção do título de  
MESTRA EM QUÍMICA, área de  
concentração: QUÍMICA ANALÍTICA.

**Orientador(a):** Prof. Dr. Renato Lajarim Carneiro

\*Bolsista CAPES

**São Carlos - SP**  
**2022**



## UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia  
Programa de Pós-Graduação em Química

---

### Folha de Aprovação

---

Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Stéphaney Gegenheimer Tagarro Vianna, realizada em 27/04/2022.

#### Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Renato Lajarim Carneiro (UFSCar)

Prof. Dr. Paulo Henrique Março (UTFPR)

Profa. Dra. Fabíola Manhas Verbi Pereira (UNESP)

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Química.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço imensamente aos meus pais, Claudio e Sandra, por me fornecerem todo o apoio durante minha jornada.

Às minhas avós Hilda e Adalgiza por incentivarem cada sonho e comemorarem cada conquista.

À Samara pelo carinho, incentivo e companheirismo.

Ao Rennan e à Letícia pela amizade e por sempre estarem presentes.

Ao Prof. Dr. Renato Lajarim Carneiro pela orientação, apoio e conselhos durante o mestrado.

Aos amigos de São Carlos, Priscilla, Fernanda, Mariana, Keila, Maria Júlia, Letícia, Nelson, João e Vinícius pelos momentos de descontração e companhia durante minha estadia na cidade.

Aos colegas do GQA, Benedito, Wallace e Danilo pela recepção e pelo suporte para dar início a este trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Química da UFSCar e a todos os professores pela oportunidade e pela estrutura oferecida para a realização dessa etapa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida.

E a todos que contribuíram de alguma forma para a realização desse trabalho.

## LISTA DE ABREVIATURAS

AAS – Ácido Acetilsalicílico

ALS – Quadrados Mínimos Alternados (do inglês, *Alternating Least Squares*)

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

EDF – Ensaio de degradação forçada

EP – Farmacopeia Europeia (do inglês, *European Pharmacopoeia*)

ICH – Conselho Internacional para Harmonização de Requisitos Técnicos para Medicamentos de Uso Humano (do inglês, *International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use*)

IFA – Insumo Farmacêutico Ativo

LEV – Levocetirizina

MCR – Resolução Multivariada de Curvas (do inglês, *Multivariate Curve Resolution*)

OMS – Organização Mundial da Saúde

PCA – Análise de Componentes Principais (do inglês, *Principal Component Analysis*)

pH – Potencial Hidrogeniônico

RDC – Resolução de Diretoria Colegiada

TAN – Tansulosina

TCG – Ticagrelor

USP – Farmacopeia dos Estados Unidos (do inglês, *United States Pharmacopoeia*)

UV-Vis – Ultravioleta-Visível

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Limites de notificação, identificação e qualificação de produtos de degradação em novos medicamentos. ....	5
TABELA 2 - Estruturas dos produtos de degradação do Ácido Acetilsalicílico gerados no estudo de degradação forçada. ....	7
TABELA 3 - Estruturas dos produtos de degradação da Levocetirizina gerados no estudo de degradação forçada. ....	10
TABELA 4 - Estruturas dos produtos de degradação da Tansulosina gerados no estudo de degradação forçada. ....	13
TABELA 5 - Estruturas dos produtos de degradação de Ticagrelor gerados no estudo de degradação forçada. ....	17

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Fórmula estrutural do ácido acetil salicílico.....	7
FIGURA 2 - As seis impurezas do AAS mencionadas na EP. ....	8
FIGURA 3 - Fórmula estrutural da Levocetirizina.....	9
FIGURA 4 - Impurezas encontradas no compêndio USP. ....	10
FIGURA 5 - Fórmula estrutural da Tansulosina.....	11
FIGURA 6 - Impurezas da TAN mencionadas na EP. ....	12
FIGURA 7 - Fórmula estrutural do Ticagrelor. ....	15
FIGURA 8 - Impurezas do TCG segundo a EP.....	16
FIGURA 9 - Representação esquemática do MCR. ....	21
FIGURA 10 - Espectros de absorvância do Ácido Acetilsalicílico obtidos a partir de soluções de ensaios de degradação forçada em meio ácido.....	28
FIGURA 11 - Resultados da resolução MCR-ALS. (a) Perfis espectrais puros e perfis de concentração relativa dos componentes da mistura; (b) Gráfico da concentração relativa do AAS em meio ácido.....	29
FIGURA 12 - Espectros de absorvância do Ácido Acetilsalicílico obtidos a partir de soluções de ensaios de degradação forçada em meio básico. ....	30
FIGURA 13 - Resultados da resolução MCR-ALS. (a) Perfis espectrais puros e perfis de concentração relativa dos componentes da mistura; (b) Gráfico da concentração relativa do AAS em meio básico. ....	31
FIGURA 14 - Espectros de absorvância do Ácido Acetilsalicílico obtidos a partir de soluções de ensaios de degradação forçada em meio oxidativo. ....	32
FIGURA 15 - Resultados da resolução MCR-ALS. (a) Perfis espectrais puros e perfis de concentração relativa dos componentes da mistura; (b) Gráfico da concentração relativa do AAS em meio oxidativo.....	33
FIGURA 16 - Espectros de absorvância do Ácido Acetilsalicílico obtidos a partir de soluções de ensaios de degradação forçada em meio fotolítico.....	34

FIGURA 17 - Resultados da resolução MCR-ALS. (a) Perfis espectrais puros e perfis de concentração relativa dos componentes da mistura; (b) Gráfico da concentração relativa de AAS em meio fotolítico. ....	34
FIGURA 18 - Espectros de absorbância da Levocetirizina obtidos a partir de soluções de ensaios de degradação forçada em meio ácido.....	35
FIGURA 19 - Resultados da resolução MCR-ALS. (a) Perfis espectrais puros e perfis de concentração relativa dos componentes da mistura; (b) Gráfico da concentração relativa de LEV em meio ácido. ....	36
FIGURA 20 - Espectros de absorbância da Levocetirizina obtidos a partir de soluções de ensaios de degradação forçada em meio básico. ....	37
FIGURA 21 - Resultados da resolução MCR-ALS. (a) Perfis espectrais puros e perfis de concentração relativa dos componentes da mistura; (b) Gráfico da concentração relativa de LEV em meio básico. ....	38
FIGURA 22 - Espectros de absorbância da Levocetirizina obtidos a partir de soluções de ensaios de degradação forçada em meio oxidativo. ....	38
FIGURA 23 - Resultados da resolução MCR-ALS. (a) Perfis espectrais puros e perfis de concentração relativa dos componentes da mistura; (b) Gráfico da concentração relativa da LEV em meio oxidativo. ....	39
FIGURA 24 - Espectros de absorbância da Levocetirizina obtidos a partir de soluções de ensaios de degradação forçada em meio fotolítico.....	40
FIGURA 25 - Resultados da resolução MCR-ALS. (a) Perfis espectrais puros e perfis de concentração relativa dos componentes da mistura; (b) Gráfico da concentração relativa de LEV em meio fotolítico. ....	41
FIGURA 26 - Espectros de absorbância da Tansulosina obtidos a partir de soluções de ensaios de degradação forçada em meio ácido.....	42
FIGURA 27 - Resultados da resolução MCR-ALS. (a) Perfis de concentração e espectros dos componentes mais puros da TAN; (b) Gráfico da concentração relativa de TAN em meio ácido. ....	43

FIGURA 28 - Espectros de absorbância da Tansulosina obtidos a partir de soluções de ensaios de degradação forçada em meio básico. ....	44
FIGURA 29 - Resultados da resolução MCR-ALS. (a) Perfis de concentração e espectros dos componentes mais puros da TAN; (b) Gráfico de concentração relativa de TAN em meio básico.....	44
FIGURA 30 - Espectros de absorbância da Tansulosina obtidos a partir de soluções de ensaios de degradação forçada em meio oxidativo. ....	45
FIGURA 31 - Resultados da resolução MCR-ALS. (a) Perfis de concentração e espectros dos componentes mais puros da TAN; (b) Gráfico de concentração relativa de TAN em meio oxidativo.....	46
FIGURA 32 - Espectros de absorbância da Tansulosina obtidos a partir de soluções de ensaios de degradação forçada em meio fotolítico.....	47
FIGURA 33 - Resultados da resolução MCR-ALS. (a) Perfis de concentração e espectros dos componentes mais puros da TAN; (b) Gráfico de concentração relativa de TAN em meio fotolítico. ....	48
FIGURA 34 - Espectros de absorbância de Ticagrelor obtidos a partir de soluções de ensaios de degradação forçada em meio ácido.....	49
FIGURA 35 - Resultados da resolução MCR-ALS. (a) Perfis de concentração e espectros dos componentes mais puros da TCG; (b) Gráfico da concentração de TCG em meio ácido. ....	50
FIGURA 36 - Espectros de absorbância de Ticagrelor obtidos a partir de soluções de ensaios de degradação forçada em meio básico. ....	51
FIGURA 37 - Resultados da resolução MCR-ALS. (a) Perfis de concentração e espectral dos componentes mais puros da TCG; (b) Gráfico da concentração relativa de TCG em meio básico.....	51
FIGURA 38 - Espectros de absorbância de Ticagrelor obtidos a partir de soluções de ensaios de degradação forçada em meio oxidativo. ....	52



FIGURA 39 - Resultados da resolução MCR-ALS. (a) Perfis de concentração e espectros dos componentes mais puros da TCG; (b) Gráfico da concentração relativa de TCG em meio oxidativo. ....	53
FIGURA 40 - Espectros de absorvância de Ticagrelor obtidos a partir de soluções de ensaios de degradação forçada em meio fotolítico.....	54
FIGURA 41 - Resultados da resolução MCR-ALS. (a) Perfis de concentração e espectros dos componentes mais puros da TCG; (b) Gráfico da concentração de TCG em meio fotolítico. ....	55

## RESUMO

DECONVOLUÇÃO DE ESPECTROS UV DIRETAMENTE DE SOLUÇÕES DE DEGRADAÇÃO FORÇADA DE FÁRMACOS. Os estudos de degradação forçada (EDFs) são ensaios nos quais produtos farmacêuticos são colocados em condições de estresse, as quais incluem meios ácido, básico, oxidativo, alta temperatura, fotodegradação, umidade e íons metálicos. Eles são realizados para validação de métodos analíticos, os quais devem ser capazes de quantificar os insumos farmacêuticos ativos (IFAs) sem interferência de qualquer excipiente ou produto de degradação, e ainda, detectar com resolução aceitável os produtos de degradação formados. Os EDFs podem ser realizados antes de finalizar o desenvolvimento do produto com o intuito de se obter informações sobre a estabilidade intrínseca do IFA e sobre a compatibilidade com excipientes, o que auxilia na escolha desses excipientes, tipo de embalagens e o prazo de validade. Para a validação de métodos analíticos, os EDFs devem promover uma degradação do IFA entre 10 % e 30 %, segundo as agências reguladoras. Desta maneira, as empresas devem encontrar as condições ideais de degradação de cada produto para cada condição de estresse, o que, empregando métodos cromatográficos, leva a um gasto excessivo de tempo e recursos. Portanto, o presente trabalho teve como objetivo a identificação das condições ideais de degradação de maneira direta pelo uso de espectroscopia UV-Vis, um método simples, rápido e de baixo custo. Aliado a metodologias quimiométricas como a resolução multivariada de curvas (MCR), foi possível a estimar as condições em que o ativo degrada dentro do intervalo esperado assim como o espectro dos produtos de degradação formados. O método foi aplicado a quatro fármacos: Ácido Acetilsalicílico, Levocetirizina, Tansulosina, Ticagrelor e se mostrou bastante promissor uma vez que foi possível resolver os perfis espectrais puros de todos os componentes originais além dos perfis de concentração relativos.

**Palavras-chave:** degradação forçada; fármacos; espectrometria UV; quimiometria; PCA; MCR.

## ABSTRACT

DECONVOLUTION OF UV SPECTRA DIRECTLY FROM FORCED DRUG DEGRADATION SOLUTIONS. Forced degradation studies (EDFs) are assays which pharmaceuticals are placed under stress conditions, which include acidic, basic, oxidative, high temperature, photodegradation, humidity and metal ions environments. The tests are performed to validate analytical methods that must be able to quantify active pharmaceutical ingredients (IFA) without interferences from any excipient or degradation product, and also detect the formed degradation products with acceptable resolution. EDFs can also be performed before finalizing the development of the product in order to obtain information on the intrinsic stability of the IFA and on the compatibility with excipients, which helps in the choice of these excipients, type of packaging and shelf life. For the validation of analytical methods, EDFs must promote an IFA degradation between 10% and 30%, according to regulatory agencies. Thus, companies must find the ideal degradation conditions for each product in each stress condition using chromatographic methods, which leads to an overspending of time and resources. Therefore, the present work aimed to directly identify the ideal degradation conditions by using UV-Vis spectroscopy, a simple, fast and low cost method. Allied to chemometric methodologies such as the multivariate resolution of curves (MCR), it was possible to estimate the conditions in which the active degrades within the expected range as well as the spectrum of the degradation products formed. The method was applied to four drugs: Acetylsalicylic Acid, Levocetirizine, Tamsulosin, Ticagrelor and proved to be very promising since it was possible to solve the pure spectral profiles of all the original components in addition to the relative concentration profiles.

**Keywords:** forced degradation; pharmaceuticals; UV spectroscopy; chemometrics; PCA; MCR.

## SUMÁRIO

1	- INTRODUÇÃO.....	1
1.1	- Estudos de degradação forçada .....	1
1.2	- Legislação.....	3
1.3	- Analitos estudados.....	6
1.4	- Ácido acetilsalicílico .....	6
1.5	- Levocetirizina .....	9
1.6	- Tansulosina.....	11
1.7	- Ticagrelor.....	14
1.8	- Análise Multivariada .....	18
1.9	- PCA .....	19
1.10	- MCR-ALS .....	20
2	- OBJETIVOS.....	24
2.1	- Objetivo geral .....	24
2.2	- Objetivos específicos.....	24
3	- METODOLOGIA EXPERIMENTAL.....	25
3.1	- Reagentes e Soluções .....	25
3.2	- Instrumentação .....	25
3.3	- Testes de Degradação Forçada.....	26
3.4	- Quimiometria.....	26
4	- RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	28
4.1	- Ácido acetilsalicílico .....	28
4.2	- Levocetirizina .....	35
4.3	- Tansulosina.....	41
4.4	- Ticagrelor.....	48
5	- CONCLUSÕES .....	56
6	- REFERÊNCIAS .....	57

# 1 - INTRODUÇÃO

## 1.1 - Estudos de degradação forçada

No controle de qualidade das indústrias farmacêuticas, a segurança e a eficácia dos fármacos são as principais preocupações, as quais dependem não apenas das propriedades do IFA (Insumo Farmacêutico Ativo) e de seu perfil de dissolução, mas também das impurezas que nele contém<sup>1</sup>.

O conceito de impureza consiste em qualquer composto que não seja o IFA e o excipiente do produto. Sua presença, mesmo que em quantidades pequenas, pode afetar a segurança do medicamento<sup>2</sup>.

Dentro da classe de impurezas, encontram-se os produtos de degradação que são gerados principalmente por reações de oxidação, termólise, fotólise e hidrólise promovidas por fatores externos como oxigênio, calor e luz ou internos como a interação com os excipientes e embalagens<sup>3,4</sup>. O monitoramento, o controle e a completa caracterização dos medicamentos para consumo humano devem ser feitos minuciosamente antes de sua comercialização.

O estudo de degradação forçada é uma ferramenta essencial para o entendimento acerca do comportamento químico do IFA. Nele os fármacos são submetidos a condições extremas de estresse como temperatura, calor, pH crítico, agentes oxidantes, radiação ultravioleta, entre outras<sup>5</sup>.

Com isso é possível obter o conhecimento da estabilidade intrínseca da molécula e esta informação é então levada em consideração ao desenvolver a formulação e determinar as condições de armazenamento que inclui o desenvolvimento de embalagens e prazo de validade. Após realizar o estudo de degradação forçada, é possível determinar a susceptibilidade de um composto em sofrer reações adversas pela interferência do ambiente<sup>6</sup>.

Os testes de estresse geram informações que levam a identificação das rotas de degradação bem como a formação de perfis de produtos de degradação desconhecidos na amostra. Dessa forma, auxiliam na validação de métodos

indicativos de estabilidade para o IFA, com especificidade e seletividade adequada<sup>7,8</sup>.

O estudo de degradação forçada é realizado sob os requisitos de órgãos de regulamentação que trazem as condições de estresse que o medicamento deve ser exposto diretamente. O procedimento começa na pesquisa bibliográfica prévia onde é possível adquirir informações sobre a reatividade de grupos funcionais da molécula que são mais suscetíveis à degradação, excipientes a serem evitados na formulação e impurezas de síntese.<sup>9,10</sup>

O processo segue com a exposição do fármaco a soluções de diferentes pH, onde pode ocorrer as hidrólises ácida ou básica, a soluções oxidativas, a ambientes com altas temperaturas, umidade, com incidência de radiação ultravioleta e na presença de íons de metais de transição<sup>11</sup>.

As condições específicas para o prosseguimento dos estudos de degradação forçada não são bem definidas pela literatura. As concentrações de agentes degradantes a serem utilizados, o tempo de exposição e a melhor forma de realizar os testes apresentam variações a cada trabalho.<sup>9</sup>

No guia original de teste de estabilidade dos medicamentos, a Organização Mundial da Saúde (OMS) em 1996 listou as condições para esse estudo<sup>12</sup>. Em um único lote da substância, deve-se testar o efeito das temperaturas em incrementos de 10 °C, comumente variadas de 40 a 80 °C, tanto para IFA sólido quanto para líquidos. O efeito da umidade é observado submetendo o fármaco a 75% ou mais de umidade relativa.<sup>13</sup>

O teste também deve avaliar a suscetibilidade da substância farmacológica à hidrólise em uma ampla faixa de valores de pH quando em solução ou suspensão, utilizando soluções 0,1 mol L<sup>-1</sup> de HCl ou NaOH. Para os testes em condições oxidantes, o reagente utilizado é o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, em concentrações que variam desde 0,1% até 5,0% v/v, neutro e em temperatura ambiente<sup>13,14</sup>.

O teste de fotoestabilidade deve ser parte integrante do teste de estresse. No entanto, pode não ser necessário examinar especificamente determinados

produtos de degradação, caso tenha sido demonstrado que eles não são formados em condições de armazenamento acelerado ou de longo prazo. Os resultados desses estudos farão parte integrante das informações fornecidas às autoridades reguladoras. Geralmente esse teste é realizado por exposição do fármaco à luz UV visível em comprimentos entre 380 a 800 nm sem ultrapassar o limite de 6 milhões de lux/hora com  $200 \text{ Wh m}^{-2}$  de potência<sup>15</sup>.

Nas últimas décadas, o avanço da tecnologia possibilitou o desenvolvimento de técnicas analíticas mais modernas e a combinação delas. A técnica mais utilizada nos métodos indicativos de estabilidade é a da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) acoplada com detector de Arranjo de Fotodiodo (DAD), com detector de espectroscopia UV ou de massas (MS). A eficiência da separação cromatográfica pode ser medida pelos parâmetros de resolução, pureza do pico, assimetria e eficiência da coluna.<sup>16-19</sup>

## 1.2 - Legislação

Os estudos de degradação forçada há muitos anos são reconhecidos pela indústria farmacêutica como uma parte importante do processo de desenvolvimento de medicamentos. Entretanto, esse procedimento se tornou um requerimento regulamentar formal somente com o lançamento de um conjunto de diretrizes pela Conferência Internacional para Harmonização (ICH, do inglês International Conference on Harmonization) em 1993, onde está presente o guia Q1A com o título “*Stability Testing of New Drug Substances and Products*”. Neste documento, os termos gerais da degradação forçada são definidos para que possam ser aplicados para o desenvolvimento de métodos analíticos que indiquem a estabilidade durante a fase clínica.<sup>20, 21</sup>

Atualmente no Brasil, normas também foram estabelecidas para a regulamentação do processo de desenvolvimento e comercialização produtos farmacêuticos. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) definiu os

testes de degradação forçada nos fármacos com a publicação da Resolução da Diretoria Colegiada - RDC N° 45 em de 09 de agosto de 2012. Com essa resolução foi exigido relatórios do estudo de estabilidade juntamente com o resultado da quantificação de produtos de degradação e o método analítico correspondente<sup>22</sup>.

Em 2013 a ANVISA publicou a RDC n° 58 no dia 20 de dezembro, onde parâmetros foram estabelecidos pela primeira vez no país para a notificação, identificação e qualificação dos produtos de degradação em medicamentos com substâncias ativas sintéticas e semissintéticas, classificados como novos, genéricos ou similares<sup>23</sup>.

A atualização mais recente da legislação vigente foi com a RDC n° 53 emitida no dia 4 de dezembro de 2015. Nela está incluída a ordem de elaboração do perfil de degradação ao longo do prazo de validade do fármaco a ser comercializado onde as rotas de degradação devem ser completamente caracterizadas em conjunto com a elucidação estrutural das impurezas.<sup>24</sup>

Além disso, a resolução dispõe os limites para a notificação, identificação e qualificação dos produtos de degradação do princípio ativo como especificado na Tabela 1<sup>24</sup>. A dose máxima diária é a quantidade máxima de fármaco administrada por dia e os limites dos produtos de degradação são expressos como a porcentagem do insumo farmacêutico ativo ou como a administração total diária (ATD) de um produto de degradação.<sup>25</sup>

Uma vez que o consumo de uma grande quantidade de substância medicamentosa também significaria exposição a níveis mais elevados de impurezas, as tolerâncias são menores quando a exposição máxima diária é superior a 2 g do IFA.<sup>26</sup>



TABELA 1 - Limites de notificação, identificação e qualificação de produtos de degradação em novos medicamentos.

<b>Limites de notificação</b>	
<b>Dose máxima diária<sup>1</sup></b>	<b>Limites<sup>2</sup></b>
<b>≤ 1 g</b>	0,1%
<b>&gt; 1 g</b>	0,05%
<b>Limites de identificação</b>	
<b>Dose máxima diária</b>	<b>Limites</b>
<b>&lt; 1 mg</b>	1,0% ou 5 µg ATD, o que for menor
<b>1 mg – 10 mg</b>	0,5% ou 20 µg ATD, o que for menor
<b>&gt; 10 mg – 2 g</b>	0,2% ou 2 mg ATD, o que for menor
<b>&gt; 2 g</b>	0,10%
<b>Limites de qualificação</b>	
<b>Dose máxima diária</b>	<b>Limites</b>
<b>&lt; 10 mg</b>	1,0% ou 50 µg ATD, o que for menor
<b>10 mg – 100 mg</b>	0,5% ou 200 µg ATD, o que for menor
<b>&gt; 100 mg – 2 g</b>	0,2% ou 3 mg ATD, o que for menor
<b>&gt; 2g</b>	0,15%

A RDC nº 53 também esclarece que nesse estudo, o objetivo não é degradar completamente o IFA, e sim causar uma degradação em extensão suficiente a fim de permitir a avaliação da formação de produtos de degradação. A diminuição da área do pico principal deve ser superior a 10% e inferior a um valor de 30% para que evitar o comprometimento dos testes pela degradação completa da amostra e a ocorrência de produtos secundários.

Por isso, as condições dos testes que incluem a temperatura, concentração ou magnitude do agente degradante e o tempo de exposição devem ser ajustadas de

acordo com a molécula em questão, principalmente quando o IFA é especialmente suscetível a um fator de estresse específico<sup>10,13</sup>.

Na ausência de produtos de degradação ou na obtenção de valores inferiores a 10%, o IFA é considerado estável sob a condição de estresse e deve se apresentar uma justificativa técnica sobre o ocorrido<sup>10,13</sup>.

Após todo o procedimento, os resultados são utilizados para auxiliar no desenvolvimento e validação da metodologia de análise dos produtos de degradação formados. Por fim, a análise crítica do perfil de degradação do medicamento examina a pureza cromatográfica do pico do IFA no medicamento finalizado.

### **1.3 - Analitos estudados**

Para a realização do estudo de deconvolução dos espectros diretamente de soluções de degradação forçada foram escolhidos quatro fármacos: ácido acetilsalicílico, levocetirizina, tansulosina e ticagrelor.

### **1.4 - Ácido acetilsalicílico**

Conhecido comercialmente como Aspirina<sup>®</sup>, o ácido acetilsalicílico ou ácido 2-(acetiloxi)-benzóico, cuja estrutura é representada pela Figura 1, é um dos anti-inflamatórios não esteroidais mais conhecidos. Tem um pKa de 3,5, é ligeiramente solúvel em água, mas bastante solúvel em álcoois, clorofórmio e éter.<sup>27</sup>

Por ser um inibidor não seletivo da ciclooxigenase pela acetilação do resíduo de serina, esse fármaco é comumente usado como analgésico, antipirético e anti-inflamatório, por aliviar os sintomas da cefaleia, odontalgia, dor de garganta relacionada a resfriados, dismenorreia, mialgia, lombalgia e dor artrítica de pequena intensidade.<sup>28</sup> Além disso, possui efeito diluente do sangue que previne

a agregação plaquetária reduzindo o risco de ataques cardíacos e acidentes vasculares cerebrais.<sup>29</sup>

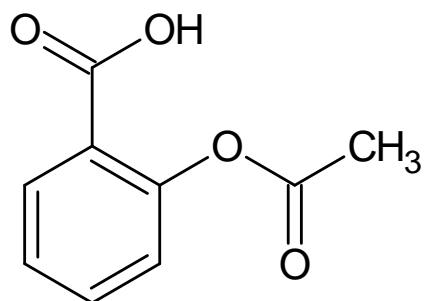
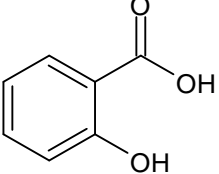


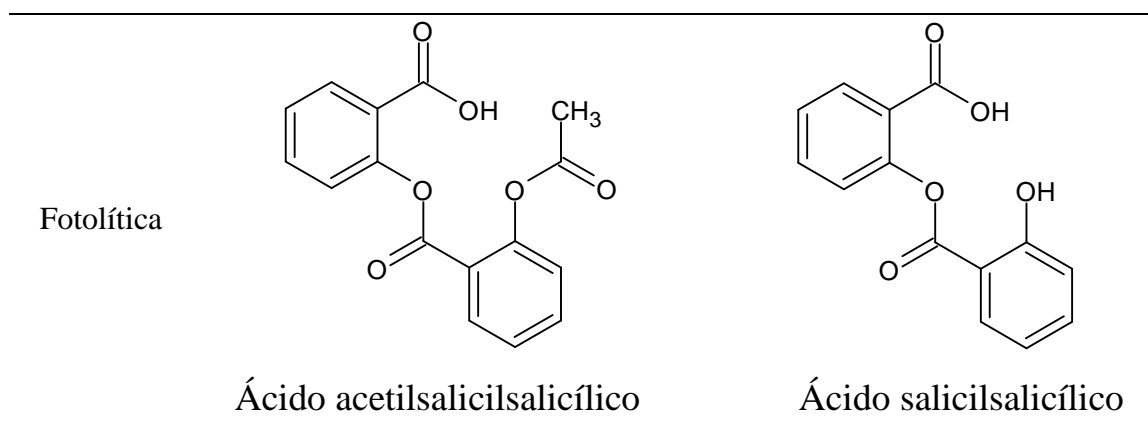
FIGURA 1 - Fórmula estrutural do ácido acetil salicílico.

No entanto, o AAS tem uma desvantagem importante em relação à saúde humana. É facilmente hidrolisado em ácido salicílico em ambientes ácidos, como no estômago. O ácido salicílico promove uma série de efeitos perigosos no corpo humano, incluindo úlceras gastrointestinais, zumbido e síndrome de Reye.<sup>30,31</sup>

A literatura indica que o ácido salicílico aparece como produto nas degradações em meio hidrolítico, oxidativo e fotolítico e os ácidos acetilsalicílico e salicilsalicílico são os principais produtos de degradação do fármaco em meio fotolítico. Suas estruturas químicas são dadas na Tabela 2.<sup>32,33</sup>

TABELA 2 - Estruturas dos produtos de degradação do Ácido Acetilsalicílico gerados no estudo de degradação forçada.

Condição de estresse	Produtos de degradação
Hidrolítica e oxidativa	 Ácido salicílico



Informações acerca das impurezas orgânicas (materiais de partida, intermediários de síntese, subproduto de reação e produtos de degradação) estão presentes em compêndios oficiais que definem as especificações para o controle de qualidade de medicamentos e insumos para saúde. Na monografia apresentada pela Farmacopéia Européia (EP, do inglês, *European Pharmacopeia*), encontra-se as seis impurezas da matéria prima do AAS como mostrado na Figura 2.

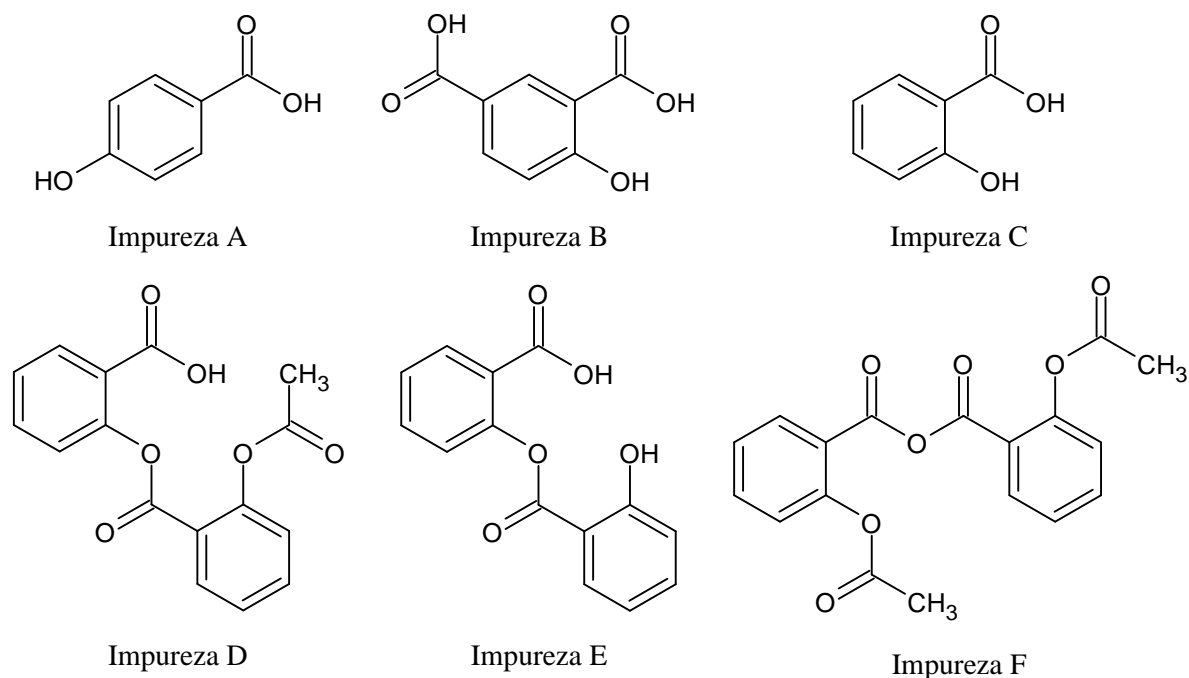


FIGURA 2 - As seis impurezas do AAS mencionadas na EP.

## 1.5 - Levocetirizina

A Levocetirizina (LEV) ou ácido (R)-2-[4-[(4-clorofenil)fenilmetil]1-piperazinil]etoxi]acético, identificado como o enantiômero ativo da mistura racêmica de cloridrato de cetirizina, tem sua estrutura representada pela Figura 3.<sup>34,35</sup>

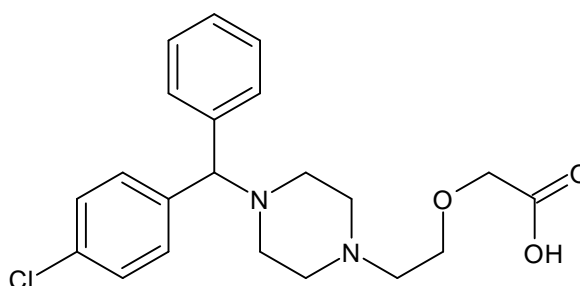


FIGURA 3 - Fórmula estrutural da Levocetirizina.

É um potente anti-histamínico  $H_1$  de baixa metabolização hepática que age como bloqueador competitivo dos receptores dessa amina biogênica. Por isso, é seguro e eficaz no tratamento dos sintomas associados a enfermidades alérgicas, como rinite alérgica sazonal (incluindo os sintomas oculares), rinite alérgica perene e urticária crônica idiopática.<sup>36</sup>

Em um estudo, uma comparação foi feita entre a levocetirizina e outros anti-histamínicos populares como ebastina, fexofenadina, loratadina, mizolastina e o fármaco apresentou superioridade em potência e eficácia em sua ação.<sup>36</sup> Outro estudo mostra que a droga proporcionou efeitos anti-inflamatórios que são observados em concentrações clinicamente relevantes que podem potencializar seu benefício terapêutico.<sup>37,38</sup>

Na Farmacopeia dos Estados Unidos (USP, do inglês, *United States Pharmacopoeia*), duas impurezas de processo, apresentadas na Figura 4, foram

reportadas apenas para fim de identificação devido a esses compostos serem controlados no IFA.

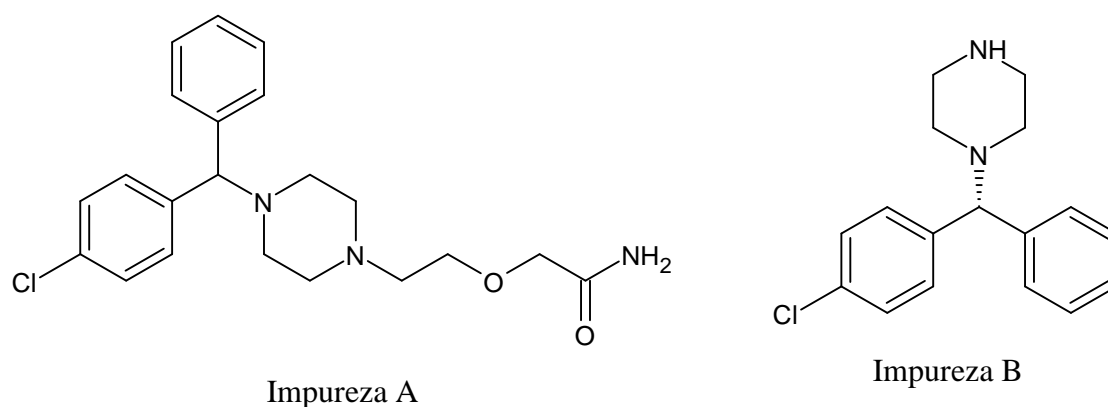


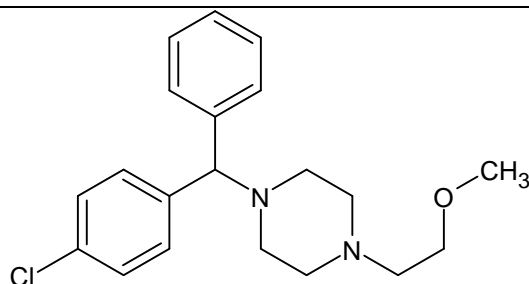
FIGURA 4 - Impurezas encontradas no compêndio USP.

Vários estudos de degradação forçada da LEV foram relatados durante o desenvolvimento de métodos analíticos por HPLC<sup>39-45</sup> ou espectrofotométricos<sup>46</sup>, sendo que, na maior parte dos casos os produtos de degradação não foram caracterizados ou não foram caracterizados adequadamente.

Gunjal *et al.* caracterizou os possíveis produtos de degradação do fármaco sob condições de estresse de acordo com os guias da ICH utilizando as técnicas de HPLC e LC-MS para estabelecer um método indicativo de estabilidade validado. Nesses testes constatou-se que o IFA gera dois produtos de degradação diferentes cujas estruturas são encontradas na Tabela 3.<sup>47</sup>

TABELA 3 - Estruturas dos produtos de degradação da Levocetirizina gerados no estudo de degradação forçada.

Condição de estresse	Produtos de degradação
Hidrolítica e fotolítica	



## 1.6 - Tansulosina

Cloridrato de Tansulosina (TAN), quimicamente conhecido como 5-[(2R)-2-[[2-(2-etoxifenoxi)etil]amino]propil]-2-metoxibenzenossulfonamida, um pó branco à branco amarelado, ligeiramente solúvel em água, solúvel em metanol e clorofórmio. Com a estrutura molecular apresentada na Figura 5, seu uso é indicado para o tratamento dos sintomas do trato urinário inferior associados à hiperplasia prostática benigna (HPB).<sup>48,49</sup>

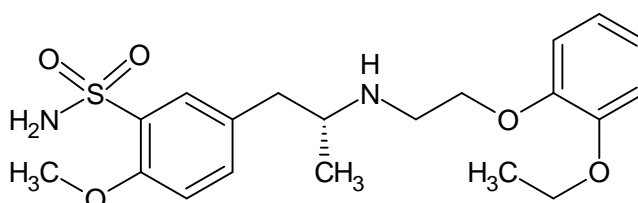


FIGURA 5 - Fórmula estrutural da Tansulosina.

A Tansulosina é um antagonista dos receptores alfa-1 adrenérgicos. Por promover o relaxamento da musculatura lisa da próstata e da uretra, alivia sintomas urinários obstrutivos e aumenta o fluxo urinário máximo. Esse fármaco também abranda os sintomas irritativos, nos quais a instabilidade da bexiga tem um papel importante.<sup>50</sup> A importância farmacêutica da TAM levou ao desenvolvimento de vários estudos para a determinação do medicamento juntamente à separação de seus produtos de degradação.<sup>49,51-56</sup>

O desenvolvimento de métodos analíticos levou a determinação de nove impurezas relacionadas a matéria prima da TAN e incluídas na monografia da EP. Suas estruturas são listadas na Figura 6.

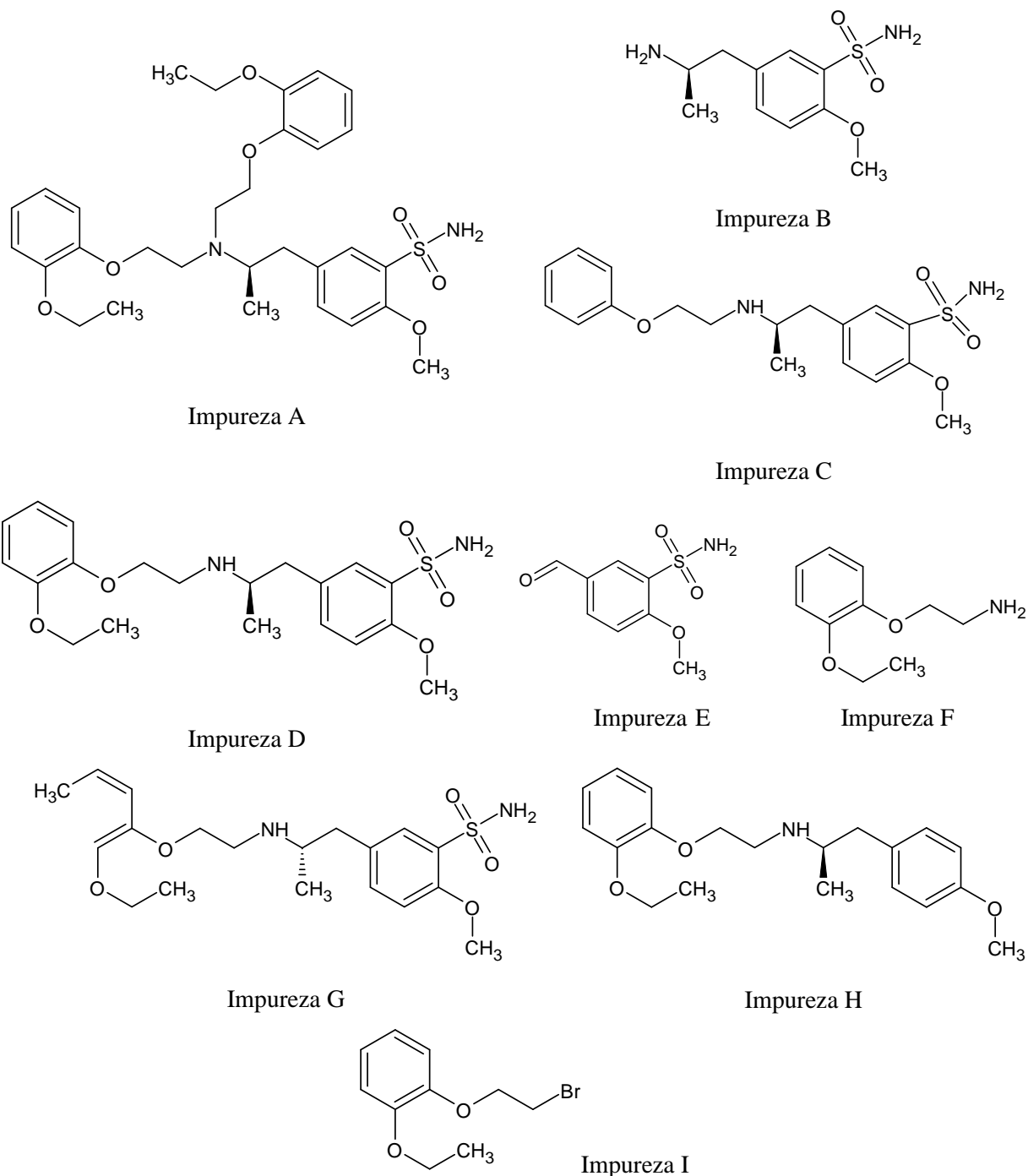


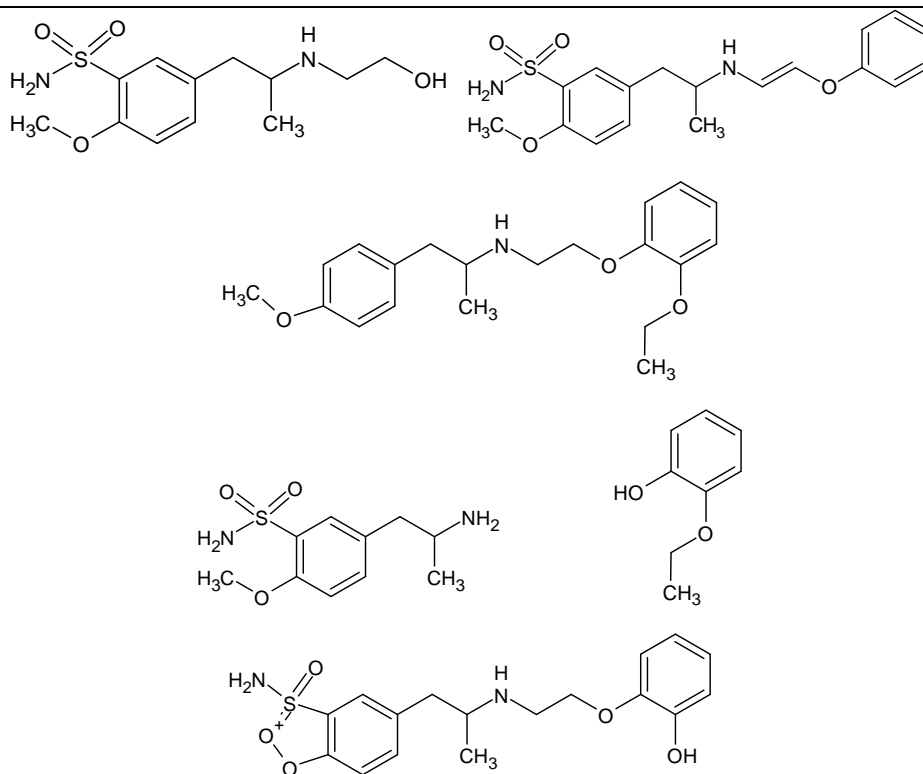
FIGURA 6 - Impurezas da TAN mencionadas na EP.



A identificação e caracterização dos produtos de degradação do fármaco sob condições univariadas de estresse foi reportada por Namdev *et al* usando a técnica de LC-ESI-MS/MS. Nos testes constatou-se que o IFA se degrada significativamente sob condições fotolíticas, oxidativas e de hidrólise ácida e básica, gerando doze principais produtos de degradação que estão esquematizados na Tabela 4.<sup>57,58</sup>

TABELA 4 - Estruturas dos produtos de degradação da Tansulosina gerados no estudo de degradação forçada.

Condição de estresse	Produtos de degradação
Hidrolítica	
Oxidativa	



Fotolítica

## 1.7 - Ticagrelor

O Ticagrelor (TCG), ou ((1S,2S,3R,5S) -3-[7-[ (1R,2S) -2-(3,4-Difluorofenil)ciclopropilamino]-5-(propiltio)-3H-[1,2,3] triazol [4,5-d]pirimidin-3-il]-5-(2-hidroxietoxi)ciclopentano-1,2-diol), tem sua fórmula estrutural representada na Figura 7. Comercializado com o nome Brilinta, é um medicamento indicado para a prevenção de eventos cardiovasculares caracterizados por trombose, desempenhando um papel de antiplaquetário de uso oral.<sup>59</sup>

Com um rápido início de ação, o TCG inibe diretamente os receptores de difosfato de adenosina (ADP) que impedem a transdução de sinal e acúmulo de plaquetas sem necessitar de ativação hepática. Isso reduz a possibilidade de morte cardiovascular, infarto do miocárdio e acidente vascular cerebral, em pacientes com síndromes coronárias agudas (SCA).<sup>60</sup>

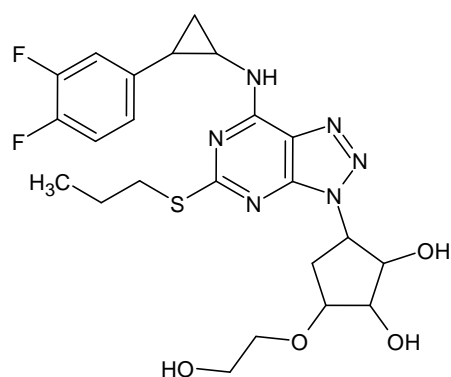
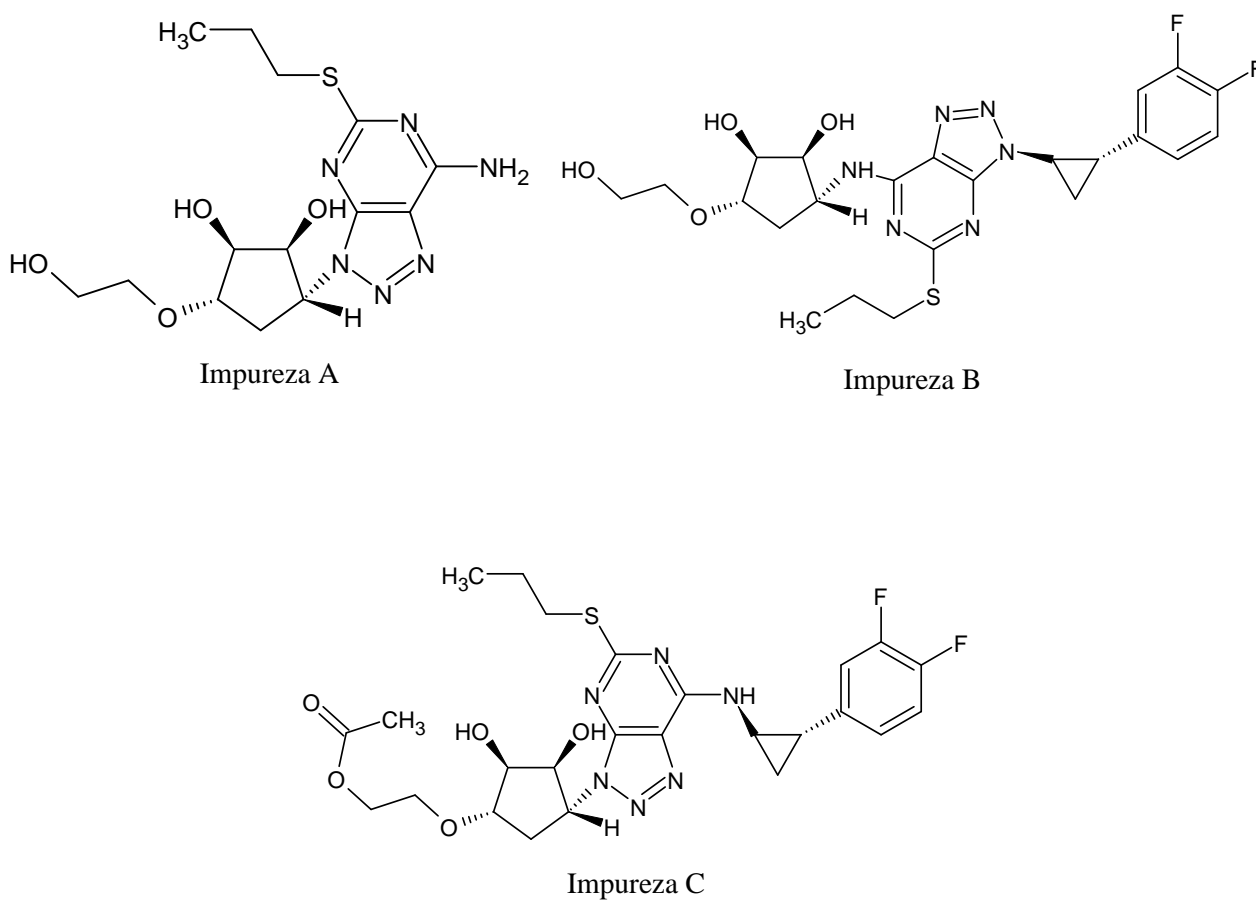


FIGURA 7 - Fórmula estrutural do Ticagrelor.

Nas monografias dos compêndios mundiais, métodos cromatográficos foram descritos para a análise do comprimido e a partir deles foram encontradas quatro impurezas que devem ser monitoradas segundo a EP. As estruturas das impurezas foram elucidadas dispostas na Figura 8.



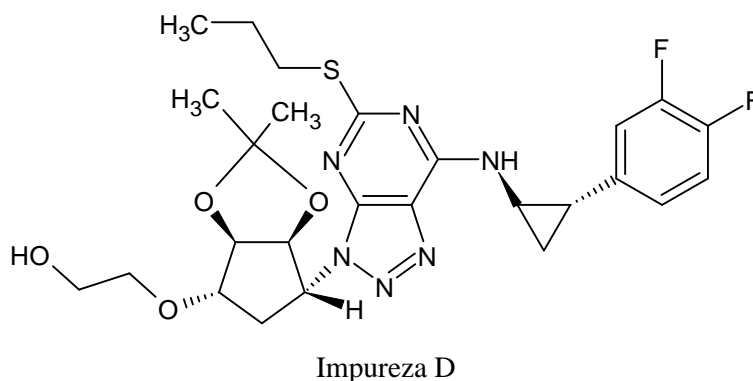


FIGURA 8 - Impurezas do TCG segundo a EP.

A literatura apresenta poucas informações sobre a estabilidade e comportamento de degradação do fármaco. Alguns métodos indicadores de estabilidade por HPLC foram desenvolvidos para sua determinação na presença de impurezas ou produtos de degradação, mas a elucidação estrutural foi descrita por Yayé *et al.* em 2014.<sup>61-67</sup>

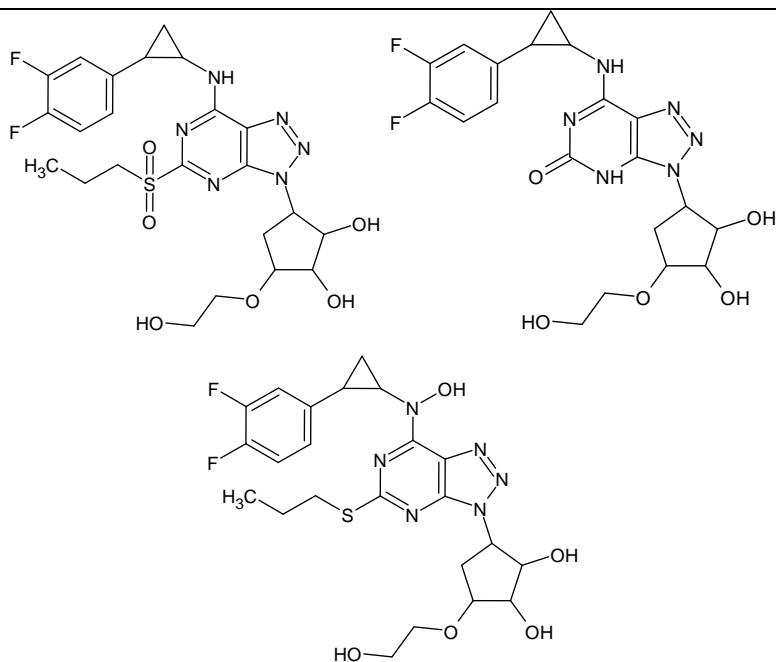
Os autores utilizaram cromatografia líquida de alta eficiência hifenada a espectrometria de massa de alta resolução em múltiplos estágios (HPLC-MS<sup>n</sup>). Foram identificados seis produtos de degradação provenientes de processos fotolíticos, e outros três resultantes de oxidação. As estruturas dos produtos de degradação estão dispostas na Tabela 5.<sup>67</sup>

TABELA 5 - Estruturas dos produtos de degradação de Ticagrelor gerados no estudo de degradação forçada.

Condição de estresse	Produtos de degradação
Fotólítica	

---

Oxidativa



---

## 1.8 - Análise Multivariada

Para o monitoramento dos ensaios de degradação forçada, o método analítico mais utilizado é a cromatografia com detecção na região do UV-Vis (HPLC-UV), uma técnica seletiva de extrema importância na área. Porém a separação física das espécies para posterior detecção cromatográfica é um processo que consome tempo e recursos.<sup>68</sup>

A espectroscopia UV-Vis é bastante utilizada para o monitoramento de reações químicas devido a sua simplicidade e eficiência na obtenção de uma grande quantidade de informações. Cada espectro contém informações complexas que descrevem a absorvidade dos grupos cromóforos presentes na amostra, e a alteração dos valores de concentração em relação ao tempo é marcada pelo aumento ou diminuição de bandas de absorção.<sup>69</sup>

Muitas vezes as mudanças dos espectros podem ser pequenas, não seletivas ou pode haver sobreposição. Como uma alternativa para tornar esse procedimento menos custoso, a espectroscopia UV-Vis aliada a métodos quimiométricos de análise multivariada como a análise de componentes principais (PCA) e a

resolução multivariada de curvas com quadrados mínimos alternados (MCR-ALS), podem proporcionar a identificação das condições ideais de degradação de maneira direta, simples e rápida. Os algoritmos desenvolvidos são aplicados no monitoramento de processos avaliando mudanças espectrais.<sup>70</sup>

Análises multivariadas são métodos que utilizam simultaneamente todas as variáveis na interpretação do conjunto de dados. Com ela é possível conhecer os sistemas químicos estudados devido ao poder de extrair o máximo de informação química relevante, além da possibilidade de planejar ou selecionar procedimentos experimentais otimizados.<sup>70</sup>

A espectroscopia UV-Vis em conjunto com análise multivariada tem sido amplamente utilizada para o monitoramento do comportamento de reações como a degradação alcalina do fármaco cromoglicato dissódico<sup>71</sup>, a fotodegradação da nimesulida<sup>72</sup>, nitrendipino e felodipino<sup>73</sup>, o processo de ozonização fotocatalítica de uma mistura de metildopa, ácido nalidíxico e famontidina<sup>74</sup>. Além do processo autooxidativo de azeite extra virgem<sup>75</sup>, a identificação e diferenciação de espécies de cúrcuma<sup>76</sup> e detecção de adulteração de óleos<sup>77</sup>. Essa metodologia possibilitou a obtenção da concentração e perfis espectrais dos compostos químicos que foram envolvidos no processo.

O algoritmo MCR-ALS é dividido em três etapas: a determinação do número de componentes principais, a estimativa das matrizes de espectros e concentração das espécies puras e a otimização iterativa por mínimos quadrados alternados.<sup>78</sup>

## 1.9 - PCA

Informações adicionais sobre o sistema por meio de espectros adquiridos durante a degradação podem ser previamente obtidas para auxiliar o processo de resolução espectral via algoritmo. Na aplicação do método quimiométrico MCR-ALS, é fundamental a análise do posto da matriz. O posto da matriz é caracterizado pelo número de componentes que causam variabilidade no conjunto

de dados, ou seja, pelo número de espécies espectrometricamente ativas na solução analisada.<sup>79</sup>

Análises exploratórias não supervisionadas são ferramentas úteis e bastante utilizadas nesse sistema para a estimativa do posto. A Análise de Componentes Principais (PCA, do inglês, *Principal Component Analysis*), visa descrever a porcentagem de variância explicada da matriz de dados. Nessa etapa é possível extrair informações gráficas a partir de uma tabela de dados experimentais que expressam a similaridade entre amostras e as variáveis que explicam esse comportamento.<sup>80</sup>

Na PCA, dados obtidos a partir de experimento são dispostos em uma matriz que é decomposta em duas outras matrizes denominadas *scores* e *loadings* onde novos eixos ortogonais, chamados de componentes principais (PC), surgem através de combinações lineares das variáveis originais, de forma que seu arranjo represente melhor a distribuição dos dados. Os *scores* permitem a visualização da localização que cada amostra assume no novo espaço. Os *loadings* mostram quais variáveis continham mais informações em cada PC e foram responsáveis pela separação e determinação dos grupos.<sup>81</sup>

O número de PCs necessário para a descrição adequada do sistema analisado é equivalente ao número do posto da matriz em questão e pode-se assumir que é o mesmo número de espécies contribuintes para o cálculo de MCR.

## 1.10 - MCR-ALS

Dentro do grupo de análises multivariadas, encontra-se a Resolução Multivariada de Curvas (MCR, do inglês, *Multivariate Curve Resolution*) que é um método de processamento de sinais analíticos que tem o intuito de resolver mistura de sinais espectrais. A deconvolução de espectros sobrepostos é feita para a separação dos perfis espectrais puros, possibilitando a obtenção dos perfis de concentração relativa de cada um dos componentes da amostra.<sup>82</sup>



O MCR recupera informações misturadas provenientes de uma técnica instrumental cujo sinal analítico deve obedecer a uma relação semelhante à lei de Beer-Lambert. A partir de uma matriz de dados  $\mathbf{D}$  ( $r \times c$ ), onde as  $r$  linhas representam o número de espectros do experimento e as  $c$  colunas são o conjunto de respostas instrumentais medidas a cada comprimento de onda.<sup>83</sup>

Assim como na PCA, o método promove a decomposição bilinear em duas outras matrizes, que gera informações das espécies puras como mostra a Figura 9. De acordo com a Equação 1.1, o procedimento resulta em uma matriz  $\mathbf{C}$  ( $r \times n$ ) correspondente a um perfil de concentrações relativas, e uma matriz  $\mathbf{S}$  ( $n \times c$ ) referente aos espectros puros das  $n$  espécies. A matriz  $\mathbf{E}$  expressa o ruído ou erro experimental.<sup>83</sup>

$$\mathbf{D} = \mathbf{C}\mathbf{S}^T + \mathbf{E}$$

Equação 1.1

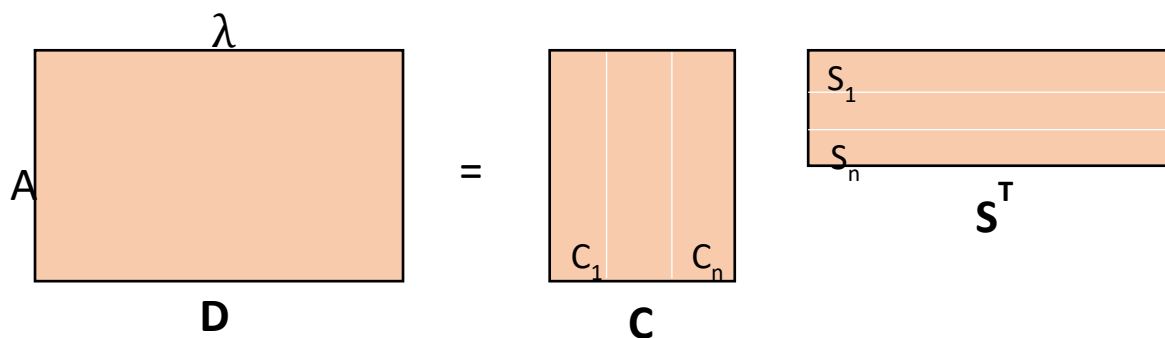


FIGURA 9 - Representação esquemática do MCR.

Antes do processo de otimização, é feita uma estimativa inicial dos espectros ou das concentrações dos componentes puros presentes no sistema. Essa informação pode ser embasada no conhecimento prévio de espécies em solução ou por métodos auxiliares como a aproximação da variável pura. Um dos métodos cabíveis para esse procedimento é o PURE onde a coluna ou linha mais representativa do conjunto de dados é selecionada.<sup>79</sup>

O último passo da análise multivariada consiste na otimização através do algoritmo iterativo de Quadrados Mínimos Alternados (ALS, do inglês,

Alternating Least Squares) sob restrições. Essa etapa permite a recuperação de perfis de concentração individuais, sinais de espécies que melhor explicam a variância dos dados observados e as fontes de variações químicas.<sup>78</sup>

Com os valores das estimativas iniciais, as matrizes  $\mathbf{C}$  e  $\mathbf{S}^T$  são calculadas por mínimos quadrados e a otimização ocorre até que a convergência seja alcançada. A conclusão da otimização e sua qualidade são definidos pelo número máximo de iterações e por figuras de mérito como a falta de ajuste (%LOF, do inglês, *Lack of Fit*) onde baixos valores são requisitados e a variância explicada ( $R^2$ ) que deve ter seu valor próximo a 1. As equações 1.2 e 1.3 mostram como esses parâmetros são calculados onde  $e_{ij}$  é um elemento da matriz de resíduos  $E$  e  $d_{ij}$  o elemento correspondente da matriz original  $D$ , sendo  $i$  a linha que o termo ocupa e  $j$  sua coluna.<sup>78,79</sup>

$$\% LOF = 100 \sqrt{\frac{\sum_{i,j} e_{ij}^2}{\sum_{i,j} d_{ij}^2}} \quad \text{Equação 1.2}$$

$$R^2 = 100 \left( 1 - \frac{\sum_{i,j} e_{ij}^2}{\sum_{i,j} d_{ij}^2} \right) \quad \text{Equação 1.3}$$

Um obstáculo a ser enfrentado no processo de resolução de curvas é o aparecimento de ambiguidades. Esse fenômeno ocorre devido à possibilidade de se obter mais de uma resposta que descreva o sistema nas combinações lineares. Para solucionar esse problema, se torna fundamental o uso de restrições que consistem em informações químicas ou matemáticas presentes no conjunto de dados que são introduzidas no processo de otimização do MCR-ALS. Comumente são utilizadas as restrições de não-negatividade e igualdade, nas quais os perfis são forçados a assumir valores positivos e informações de conhecimento prévio como espectros puros, são aplicadas, respectivamente.<sup>78</sup>

O uso de técnicas espectrofotométricas em estudos de degradação forçada permite a verificação da estabilidade e da cinética de degradação, porém alguns

desafios ainda se fazem presentes como a dificuldade de detecção de mudança espectral (em alguns casos, por perda de grupos cromóforos), sinal de absorbância dos excipientes e a concentração do ativo no momento da leitura. No entanto, quando em conjunto com ferramentas quimiométricas, como o MCR-ALS, apesar de sua complexidade, proporciona vantagens consideráveis para essa investigação.<sup>84</sup>

## **2 - OBJETIVOS**

### **2.1 - Objetivo geral**

O objetivo geral do trabalho foi encontrar as condições ideais de degradação de maneira direta por UV-Vis através de PCA e MCR, para verificar a condição onde o ativo degrada de 10 % a 30 %.

### **2.2 - Objetivos específicos**

- Encontrar as condições ideais de degradação de maneira direta por UV-Vis através do MCR-ALS;
- Fazer a deconvolução matemática dos espectros para verificar a condição onde o ativo degrada na faixa de 10 % a 30 %;
- Avaliar o espectro do produto de degradação.

### **3 - METODOLOGIA EXPERIMENTAL**

#### **3.1 - Reagentes e Soluções**

As soluções utilizadas nos ensaios de degradação forçada foram preparadas utilizando água ultrapura obtida no sistema Mili-Q (Milipore). Utilizou-se ácido clorídrico (HCl - pureza 99,9%) para primeiramente preparar a solução de 1 mol L<sup>-1</sup> e por meio de diluição, as demais soluções ácidas de 0,1 e 0,01 mol L<sup>-1</sup>. Para as soluções básicas, utilizou-se hidróxido de sódio (NaOH) no preparo das soluções de 0,01, 0,1 e 1 mol L<sup>-1</sup>. Para o preparo das soluções oxidativas, peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 30 % v/v foi utilizado para a obtenção das soluções de 1 %, 3 % e 5 % por meio de diluição. O tampão de fosfato utilizado nos ensaios no pH 6,0 foi preparado com o uso de fosfato monopotássico (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) e fosfato dissódico (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>).

Os medicamentos Ácido Acetilsalicílico 500 mg (Aspirina<sup>®</sup>, Bayer), Dicloridrato de Levocetirizina 5 mg (genérico, Eurofarma), Cloridrato de Tansulosina 0,4 mg (genérico, GeoLab) e Ticagrelor 90 mg (Brilinta<sup>®</sup>, AstraZeneca) foram obtidos em farmácias locais na cidade de São Carlos. Para a solubilização dos mesmos, etanol foi utilizado.

#### **3.2 - Instrumentação**

As soluções degradantes e tampão foram preparados com o auxílio de uma balança analítica do modelo Shimadzu AUW220D com cinco casas decimais para a pesagem, um pHmetro modelo Digimed DM20 foi empregado nas medidas de pH e um agitador magnético Ika C-MAG HS 7 para a homogeneização das soluções.

Um espectrofotômetro monofeixe na região UV-Vis modelo BEL UV-M51 foi utilizado para a obtenção dos espectros das soluções resultantes dos ensaios

de degradação forçada, tendo como suporte de amostra cubetas de quartzo de 1,0 cm. A aquisição de dados foi realizada por meio do software UV-Professional 2.

### **3.3 - Testes de Degradação Forçada**

Os experimentos foram realizados em tubos de ensaio transparentes onde uma fração dos comprimidos de cada fármaco foi colocada em contato com 2 mL de solução degradante ácida, básica e oxidativa. No caso da degradação fotolítica, os tubos foram colocados em uma câmara escura na presença de radiação UV proveniente de uma lâmpada UV com comprimento de onda dominante de 364 nm.

Essas soluções foram deixadas em repouso, ao abrigo de luz externa e em temperatura ambiente nos tempos de 0h, 1h, 24h e 48h. Posteriormente, as soluções a serem analisadas, foram transferidas para um balão de 25 mL. Nas degradações ácidas ou básicas houve a neutralização do pH com adição de 2 mL de solução básica ou ácida, respectivamente, e nas demais soluções de degradação foram adicionados 2 mL de água. Adicionou-se 6 mL de solução tampão fosfato ( $\text{HPO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ ) para que todas as amostras apresentassem o mesmo pH e o volume foi completado com etanol. Em seguida, as soluções foram diluídas para serem lidas no espectrofotômetro UV-Vis, onde foram feitas varreduras por comprimento de onda na faixa de 200 a 400 nm com incremento de 2 nm que resultaram em espectros de absorbância.

### **3.4 - Quimiometria**

Os espectros foram importados diretamente para o Matlab (Mathworks – 7.11.0 R2010b) onde foram organizados em uma matriz de dados **X**, sendo que as linhas continham informações sobre cada amostra analisada na ordem do meio degradante menos agressivo pra o mais agressivo e na ordem crescente dos

tempos de reação. As colunas foram dispostas no sentido de trazerem informações sobre as medidas de absorvância em cada comprimento de onda no intervalo de varredura espectrofotométrica. Utilizou-se a estratégia de matriz aumentada que consiste na adição dos espectros puros de componentes conhecidos na matriz de dados, no caso os espectros iniciais dos produtos sem degradação, a fim de facilitar a resolução da mistura de compostos.

As matrizes  $\mathbf{X}$  de dimensão 13 x 200 (amostras x comprimentos de onda), passaram pelo processo de pré-tratamento por meio do PLS\_Toolbox 5.2 onde a primeira derivada foi escolhida. Em seguida o número de variáveis consideradas na análise das amostras foi definido pela PCA. Por fim, os espectros mais puros foram encontrados pela rotina PURE sendo os cálculos por MCR-ALS executados com as restrições de não-negatividade para concentração e igualdade para o espectro conhecido, a fim de auxiliar na resolução do algoritmo.

## 4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 - Ácido acetilsalicílico

A Figura 10 mostra os espectros obtidos a partir das soluções de ensaios de degradação forçada da AAS em meio ácido com soluções de ácido clorídrico a  $1 \text{ mol L}^{-1}$ ,  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  e  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ .

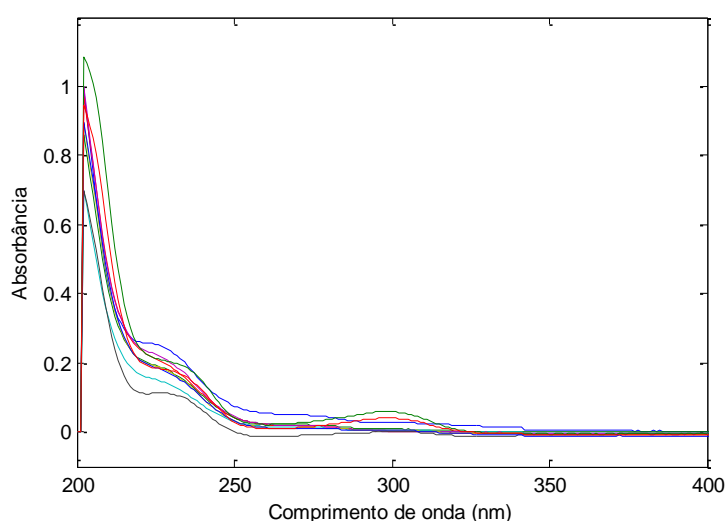


FIGURA 10 - Espectros de absorvância do Ácido Acetilsalicílico obtidos a partir de soluções de ensaios de degradação forçada em meio ácido.

Com os dados espectrais tratados com a primeira derivada, o número de espécies químicas espectrofotometricamente ativas no sistema, o posto da matriz, foi estabelecido como dois por meio da PCA. Em seguida foi necessária a estimativa inicial dos espectros puros dessas espécies para gerar a resolução de curva multivariada com as estimativas dos perfis de concentração relativa e os perfis espectrais para a degradação do AAS em meio ácido. Os gráficos resultantes do método quimiométrico MCR-ALS estão representados pela Figura 11 (a).



A Figura 11 (b) mostra a porcentagem estimada de degradação do AAS a cada experimento onde o primeiro é a solução do fármaco puro, os experimentos 2, 3 e 4 ocorreram em presença de HCl 0,01 mol L<sup>-1</sup>, os experimentos 5, 6 e 7 em HCl 0,1 mol L<sup>-1</sup> e os experimentos 8, 9 e 10 em HCl 1 mol L<sup>-1</sup>, todos nos tempos de 1h, 24h e 48h.

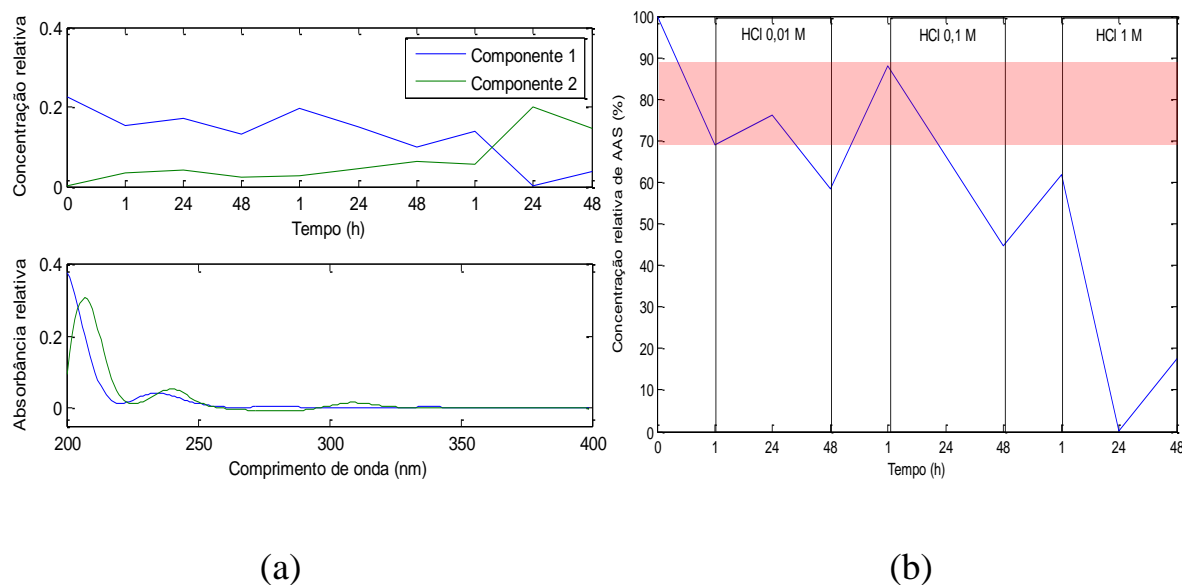


FIGURA 11 - Resultados da resolução MCR-ALS. (a) Perfis espectrais puros e perfis de concentração relativa dos componentes da mistura; (b) Gráfico da concentração relativa do AAS em meio ácido.

Os resultados obtidos apresentaram uma falta de ajuste em relação à matriz de 2,01 % e a porcentagem de variância explicada ( $R^2$ ) igual a 99,97 %, indicando que o modelo gerou uma boa estimativa dos perfis espectrais e de concentração dos analitos em solução.

O perfil de concentração relativa para o analito em questão mostrou que nas soluções 0,01 e 0,1 mol/l de HCl no tempo de 1h, a estimativa da porcentagem de degradação do fármaco em relação à presença da amostra inicial em meio ácido atingiu um valor mínimo de 10 % e máximo de 30 %.

Esse resultado, adquirido de maneira prática, mostra a condição dos testes de degradação forçada que atende os pré-requisitos das agências regulatórias. A

economia de tempo e recursos foi de fato alcançada se comparado com as circunstâncias do procedimento convencional realizado por meio da cromatografia líquida.

A Figura 12 mostra os espectros obtidos a partir das soluções de ensaios de degradação forçada do AAS em meio básico com o uso de soluções de hidróxido de sódio a  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ ,  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  e  $1 \text{ mol L}^{-1}$  respectivamente.

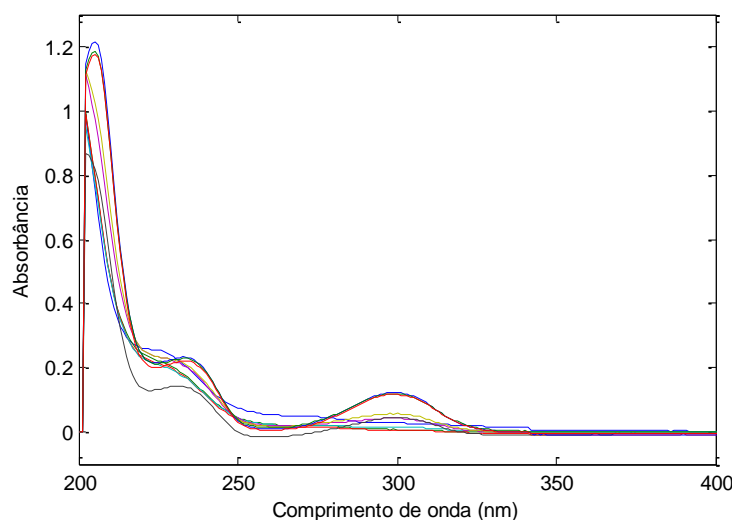


FIGURA 12 - Espectros de absorvância do Ácido Acetilsalicílico obtidos a partir de soluções de ensaios de degradação forçada em meio básico.

A resolução de curva multivariada gerou as estimativas dos perfis de concentração e os perfis espectrais obtidos matematicamente para a degradação em meio básico e esses dados estão representados pela Figura 13 (a). Na Figura 13 (b) é mostrada a porcentagem estimada de degradação do AAS a cada experimento onde o primeiro é a solução do medicamento puro, os experimentos 2, 3 e 4 ocorreram em NaOH  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ , os experimentos 5, 6 e 7 em NaOH  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  e os experimentos 8, 9 e 10 em NaOH  $1 \text{ mol L}^{-1}$ , todos nos tempos de 1h, 24h e 48h.

O modelo apresenta uma falta de ajuste em relação à matriz de 1,84 % e a porcentagem de variância explicada ( $R^2$ ) igual a 99,99%. E pode-se concluir que

o perfil de concentração relativo para o analito em meio básico com NaOH 0,01 mol L<sup>-1</sup> no tempo de 48h e em NaOH 0,1 mol L<sup>-1</sup> nos tempos de 1h e 24h, a estimativa atingiu a faixa de 10 % a 30 % de degradação requerida pelas normas regulatórias.

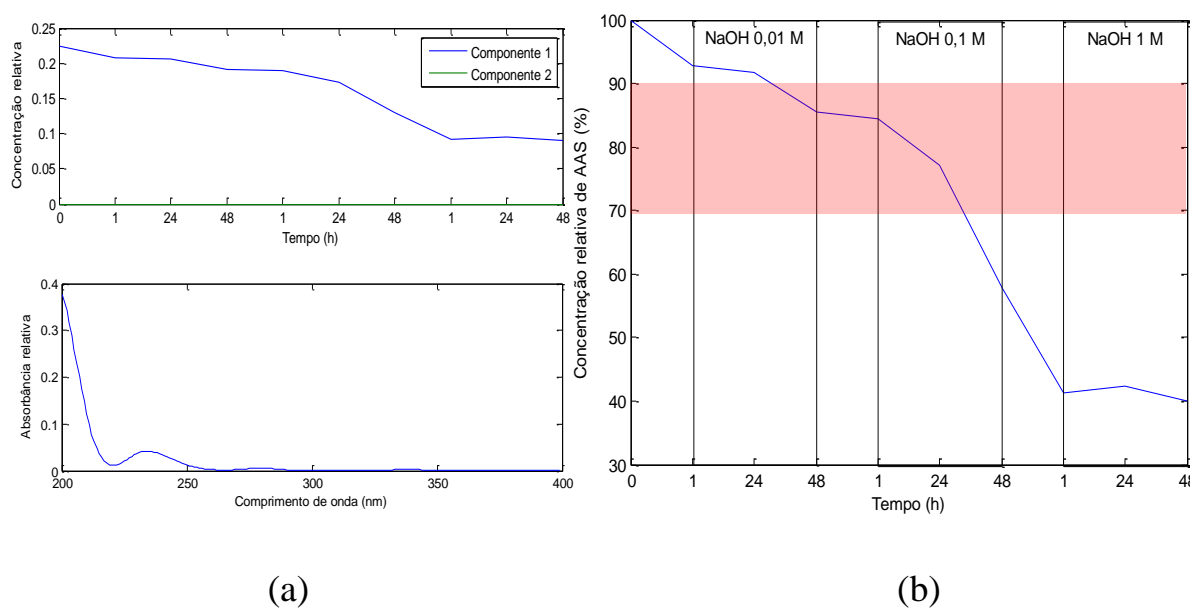


FIGURA 13 - Resultados da resolução MCR-ALS. (a) Perfis espectrais puros e perfis de concentração relativa dos componentes da mistura; (b) Gráfico da concentração relativa do AAS em meio básico.

A Figura 14 mostra os espectros obtidos a partir das soluções de ensaios de degradação forçada do AAS em meio oxidativo com peróxido de hidrogênio a 1 %, 3 % e 5 %. O posto da matriz foi estabelecido como três contribuintes presentes na amostra.

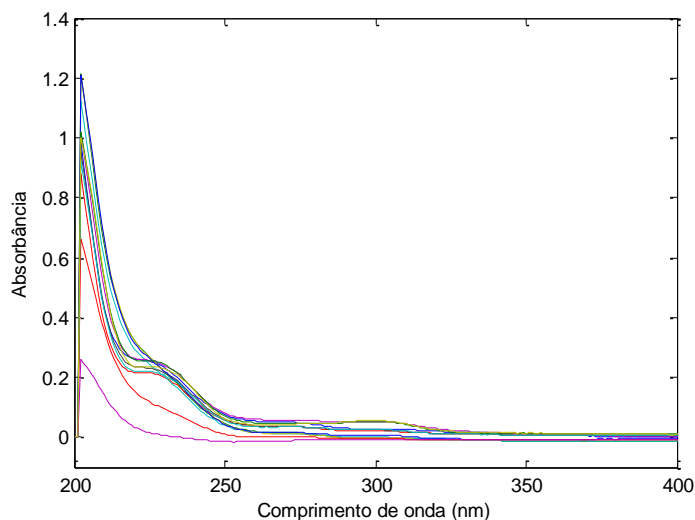


FIGURA 14 - Espectros de absorvância do Ácido Acetilsalicílico obtidos a partir de soluções de ensaios de degradação forçada em meio oxidativo.

A partir dos perfis de concentração obtidos através da MCR-ALS mostrados na Figura 15 (a), foi possível plotar o gráfico da porcentagem estimada de degradação do AAS em meio oxidativo a cada experimento como mostrado na Figura 15 (b). O primeiro experimento é a solução do fármaco puro, os experimentos 2, 3, 4 e 5 ocorreram em presença de peróxido de hidrogênio a 1 %, os experimentos 6, 7, 8 e 9 a 3 % e os experimentos 10, 11, 12 e 13 a 5 %, todos nos tempos de 0h, 1h, 24h e 48h, respectivamente.

Os resultados apresentaram uma falta de ajuste em relação à matriz de 1,33 %, e a porcentagem de variância explicada ( $R^2$ ) igual a 99,9823 %. O perfil de concentração relativa para o analito em meio oxidativo mostrou que no meio mais brando, peróxido de hidrogênio a 1 % no tempo de 1h, a estimativa da porcentagem de degradação atingiu a faixa de 10 % a 30 % requerida pelas normas regulatórias.

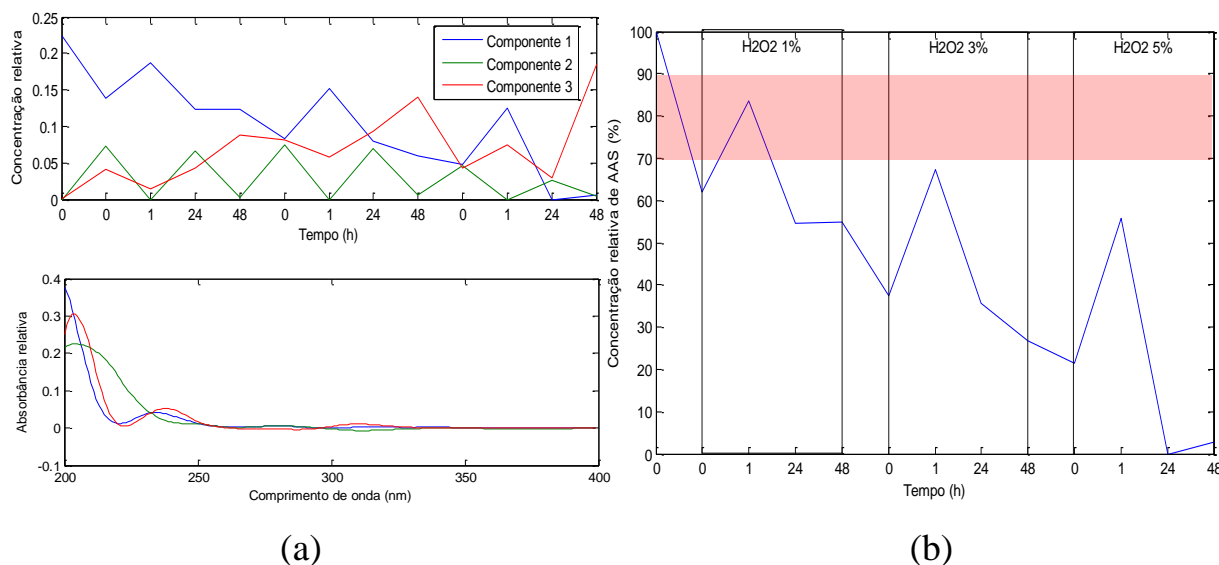


FIGURA 15 - Resultados da resolução MCR-ALS. (a) Perfis espectrais puros e perfis de concentração relativa dos componentes da mistura; (b) Gráfico da concentração relativa do AAS em meio oxidativo.

A Figura 16 mostra os espectros obtidos a partir das soluções de ensaios de degradação forçada do AAS em presença de radiação ultravioleta no comprimento de onda de 364 nm. O posto da matriz foi estabelecido como dois contribuintes presentes na amostra e a Figura 17 (a) representa os espectros recuperados juntamente com os perfis de concentração.

A Figura 17 (b) mostra graficamente a estimativa porcentagem de degradação do AAS a cada experimento onde o primeiro é a solução do fármaco puro e os seguintes em presença de radiação respectivamente nos tempos de 1h, 24h e 48h.

Os resultados obtidos apresentaram uma falta de ajuste em relação à matriz de 1,32 %, a porcentagem de variância explicada ( $R^2$ ) igual a 99,98 % e ao analisá-los observa-se que o perfil de concentração relativa para o analito perante a radiação ultravioleta não se mostrou conclusivo a respeito da porcentagem de degradação. Os espectros recuperados são semelhantes, indicando a estabilidade

do fármaco no meio em questão ou a semelhança entre o a molécula do ácido acetilsalicílico com seu produto de degradação.

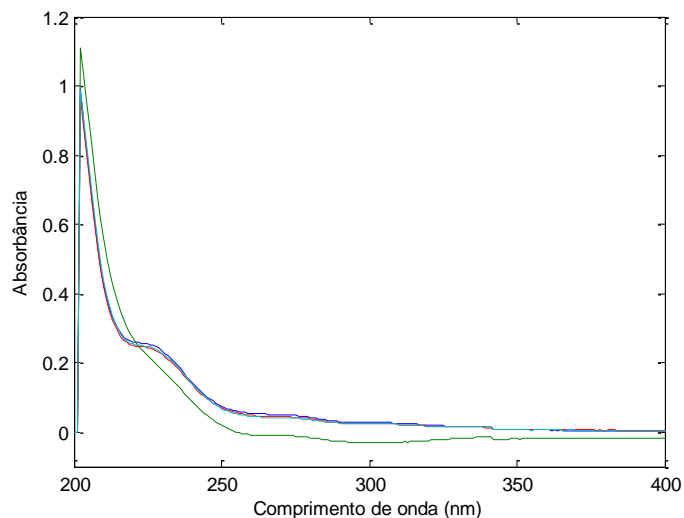


FIGURA 16 - Espectros de absorvância do Ácido Acetilsalicílico obtidos a partir de soluções de ensaios de degradação forçada em meio fotolítico.

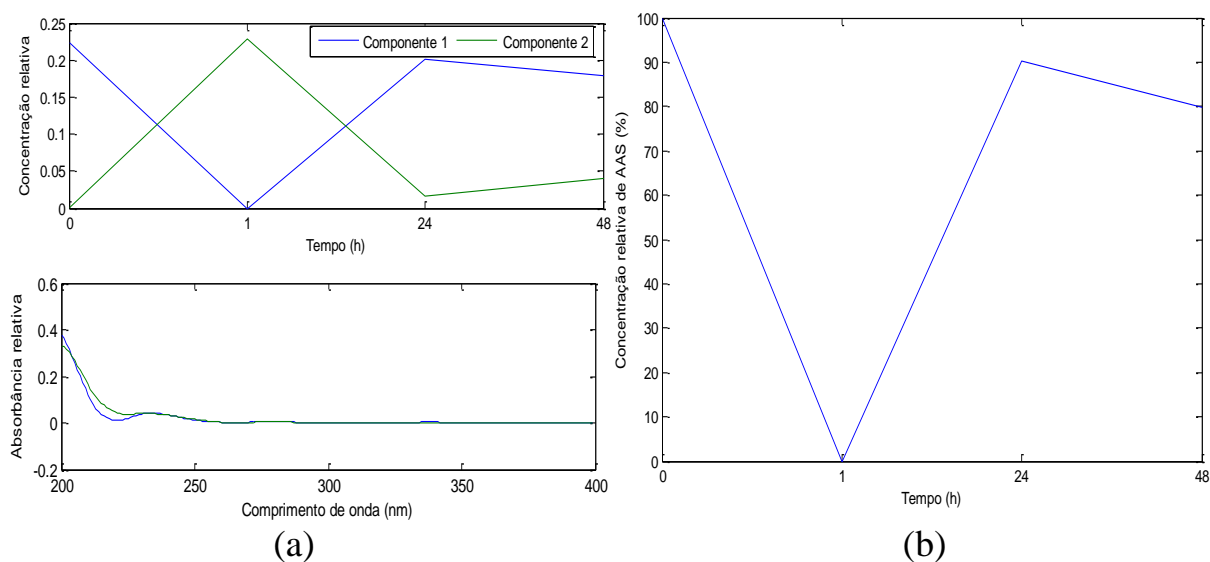


FIGURA 17 - Resultados da resolução MCR-ALS. (a) Perfis espectrais puros e perfis de concentração relativa dos componentes da mistura; (b) Gráfico da concentração relativa de AAS em meio fotolítico.

## 4.2 - Levocetirizina

Para o estudo de degradação forçada da levocetirizina, primeiro o fármaco foi colocado em contato com o meio ácido proveniente de soluções de ácido clorídrico a  $1 \text{ mol L}^{-1}$ ,  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  e  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$  e os espectros de absorvância obtidos são mostrados na Figura 18.

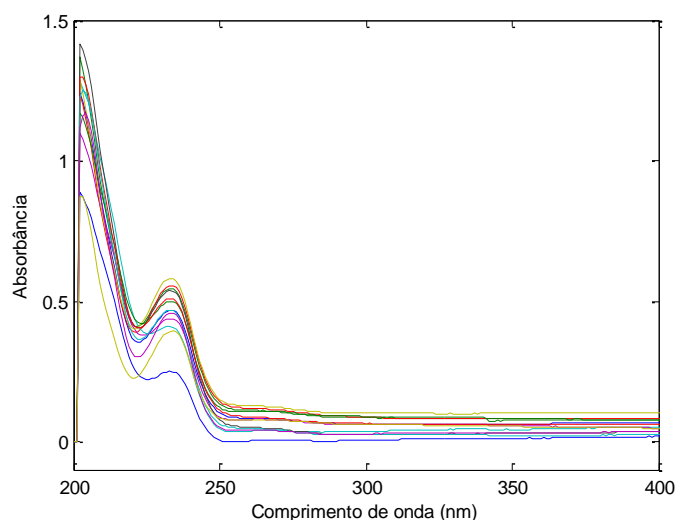


FIGURA 18 - Espectros de absorvância da Levocetirizina obtidos a partir de soluções de ensaios de degradação forçada em meio ácido.

Por meio da PCA, o posto da matriz foi estabelecido como três fontes de variação independentes presentes em solução. Para realizar os cálculos de MCR-ALS, as restrições de não-negatividade de concentração e de igualdade para o espectro inicial foram utilizadas de forma análoga ao estudo do fármaco anterior. Os resultados obtidos são mostrados na Figura 19 (a).

Foram realizados 13 experimentos sendo o primeiro a leitura de absorvância da solução do medicamento puro, os experimentos 2, 3, 4 e 5 ocorreram em presença de HCl  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ , os experimentos 6, 7, 8 e 9 em HCl  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  e os experimentos 10, 11, 12 e 13 em HCl  $1 \text{ mol L}^{-1}$  nos tempos de 0h, 1h, 24h e 48h, respectivamente. A partir desses dados, o gráfico de porcentagem de degradação estimada na Figura 19 (b).

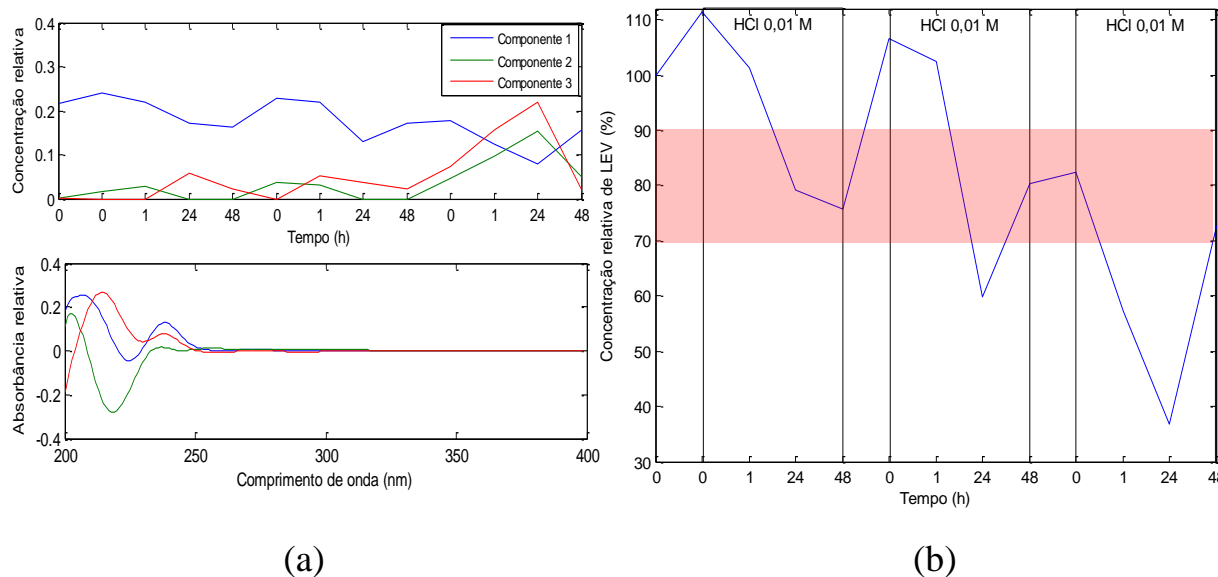


FIGURA 19 - Resultados da resolução MCR-ALS. (a) Perfis espectrais puros e perfis de concentração relativa dos componentes da mistura; (b) Gráfico da concentração relativa de LEV em meio ácido.

O modelo gerou uma porcentagem de variância explicada ( $R^2$ ) igual a 99,44% e uma falta de ajuste em relação à matriz com um aumento do valor de 7,45 %. O perfil de concentração relativa para o analito em meio ácido mostrou que os experimentos no meio em que se utilizou HCl 0,01 mol L<sup>-1</sup> nos tempos de 24h e 48h atingiram a faixa de 10 % a 30 % de degradação requerida pelas normas regulatórias.

Os estudos da LEV em meio básico geraram os dados de absorbância contidos no gráfico da Figura 20. Para a análise da MCR-ALS, o posto da matriz foi estabelecido como dois e o procedimento prosseguiu de forma semelhante ao anterior.

O tratamento quimiométrico resultou nos perfis de concentração e espectrais na Figura 21 (a) e por consequência foi possível estimar a degradação da LEV em meio básico a cada experimento como mostrado na Figura 21 (b).



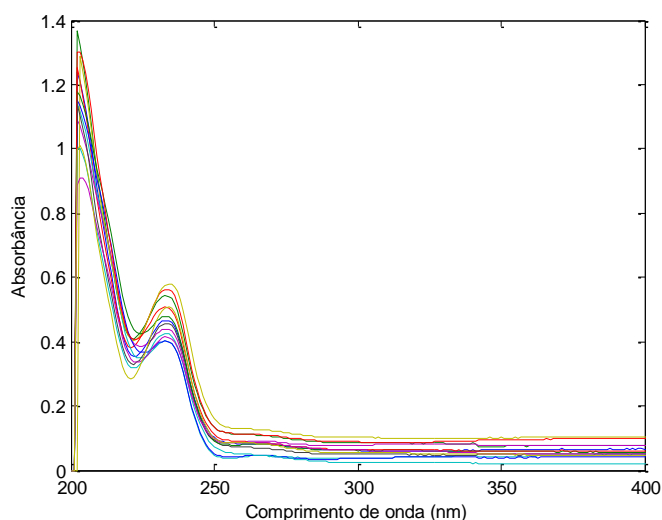


FIGURA 20 - Espectros de absorvância da Levocetirizina obtidos a partir de soluções de ensaios de degradação forçada em meio básico.

Foram feitos 13 experimentos, no primeiro experimento obteve-se o espectro da solução do fármaco puro, nos experimentos 2, 3, 4 e 5 o fármaco foi colocado em NaOH  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ , os experimentos 6, 7, 8 e 9 em NaOH  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  e os experimentos 10, 11, 12 e 13 em NaOH  $1 \text{ mol L}^{-1}$ , todos nos tempos de 0h, 1h, 24h e 48h.

O modelo gerou uma falta de ajuste em relação à matriz de 12,48 % e a porcentagem de variância explicada ( $R^2$ ) igual a 98,44 %. O perfil de concentração relativo para o analito em meio básico no experimento estima que o analito degrada entre 10 e 30 % com NaOH a  $0,01$  e  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , no tempo intermediário entre 1h e 24h.

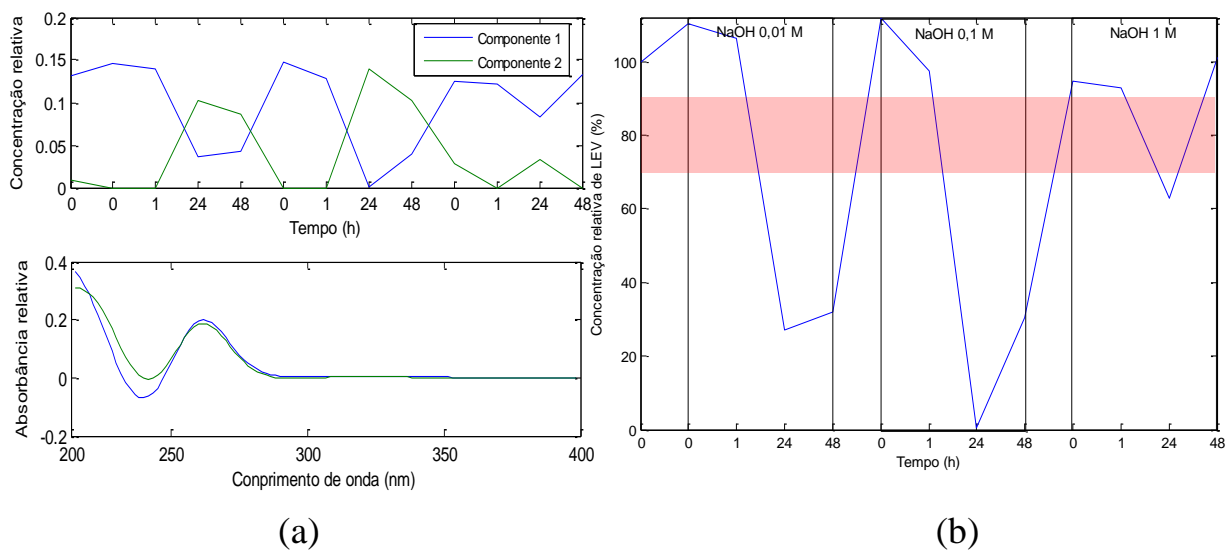


FIGURA 21 - Resultados da resolução MCR-ALS. (a) Perfis espectrais puros e perfis de concentração relativa dos componentes da mistura; (b) Gráfico da concentração relativa de LEV em meio básico.

Os espectros de absorvância da LEV em meio oxidativo em diferentes tempos estão apresentados na Figura 22. O posto da matriz foi calculado e estabelecido que haviam quatro espécies ativas presentes na amostra.

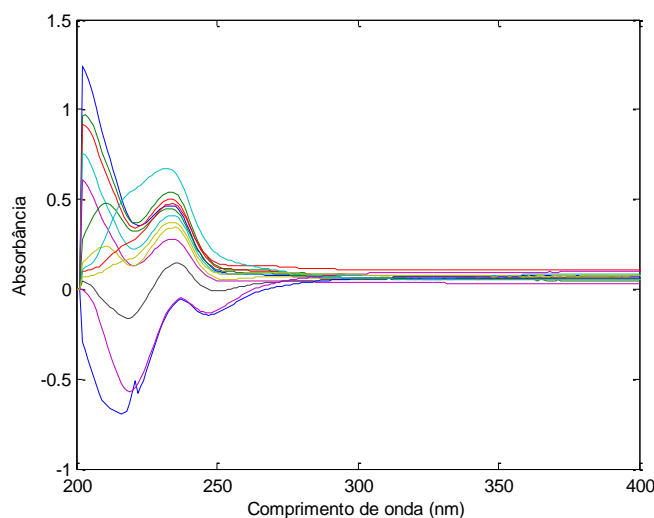


FIGURA 22 - Espectros de absorvância da Levocetirizina obtidos a partir de soluções de ensaios de degradação forçada em meio oxidativo.

Os espectros puros e os perfis de concentração foram obtidos e mostrados na Figura 23 (a). O gráfico que mostra a estimativa de degradação da LEV em meio oxidativo foi plotado e mostrado na Figura 23 (b). O primeiro experimento é a solução do fármaco puro, os experimentos 2, 3, 4 e 5 ocorreram em presença de peróxido de hidrogênio a 1 %, os experimentos 6, 7, 8 e 9 a 3 % e os experimentos 10, 11, 12 e 13 a 5 %, todos nos tempos de 0h, 1h, 24h e 48h, respectivamente.

Os resultados apresentaram uma falta de ajuste em relação à matriz de 3,32 %, e a porcentagem de variância explicada ( $R^2$ ) igual a 99,89 %. O perfil de concentração relativa para o analito em meio oxidativo mostrou que no meio mais brando, peróxido de hidrogênio a 1 % no tempo de 1h, a porcentagem de degradação foi estimada na faixa de 10 % a 30 % exigida pela regulamentação.

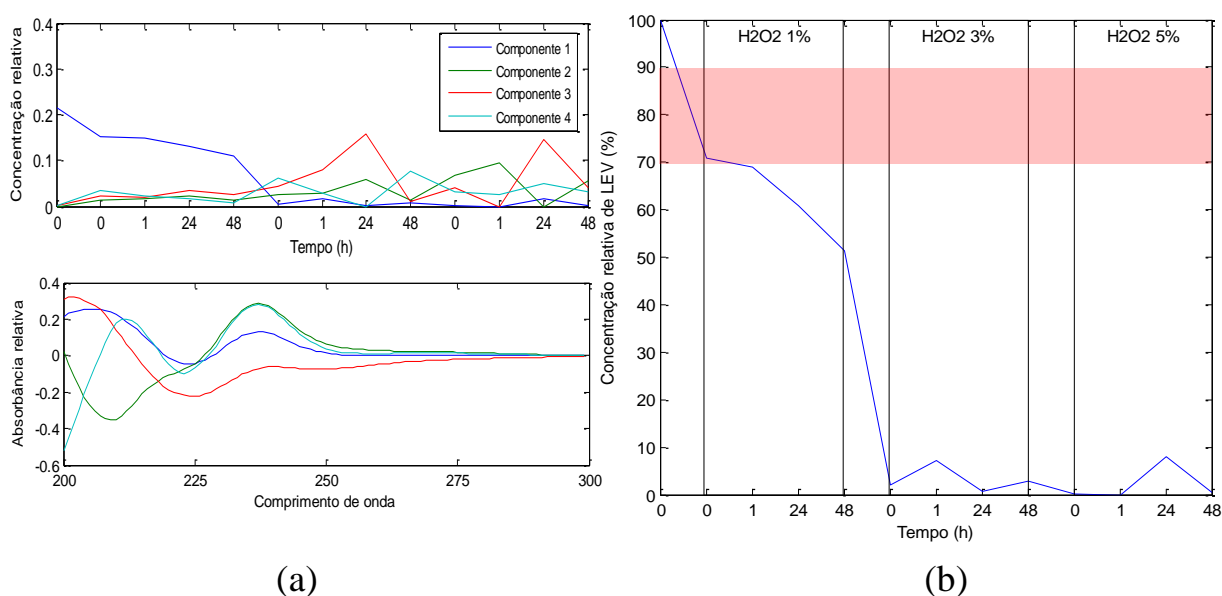


FIGURA 23 - Resultados da resolução MCR-ALS. (a) Perfis espectrais puros e perfis de concentração relativa dos componentes da mistura; (b) Gráfico da concentração relativa da LEV em meio oxidativo.

A Figura 24 mostra os espectros obtidos a partir das soluções de ensaios de degradação forçada da LEV em presença de radiação ultravioleta no comprimento de onda de 364 nm. O posto da matriz foi estabelecido como dois contribuintes presentes na amostra e a Figura 25 (a) representa os espectros recuperados juntamente com os perfis de concentração.

A Figura 25 (b) apresenta a estimativa da porcentagem de degradação da LEV a cada experimento onde o primeiro é a solução do fármaco puro e os seguintes em presença de radiação respectivamente nos tempos de 1h, 24h e 48h.

Os resultados obtidos apresentaram uma falta de ajuste em relação à matriz de 3,12 %, a porcentagem de variância explicada ( $R^2$ ) igual a 99,90 % e ao analisá-los observa-se que o perfil de concentração relativa para o analito perante a radiação ultravioleta não se mostrou conclusivo a respeito da porcentagem de degradação.

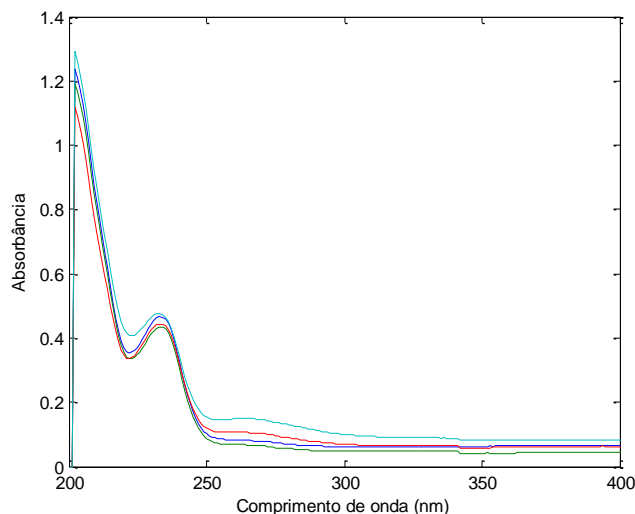


FIGURA 24 - Espectros de absorvância da Levocetirizina obtidos a partir de soluções de ensaios de degradação forçada em meio fotolítico.

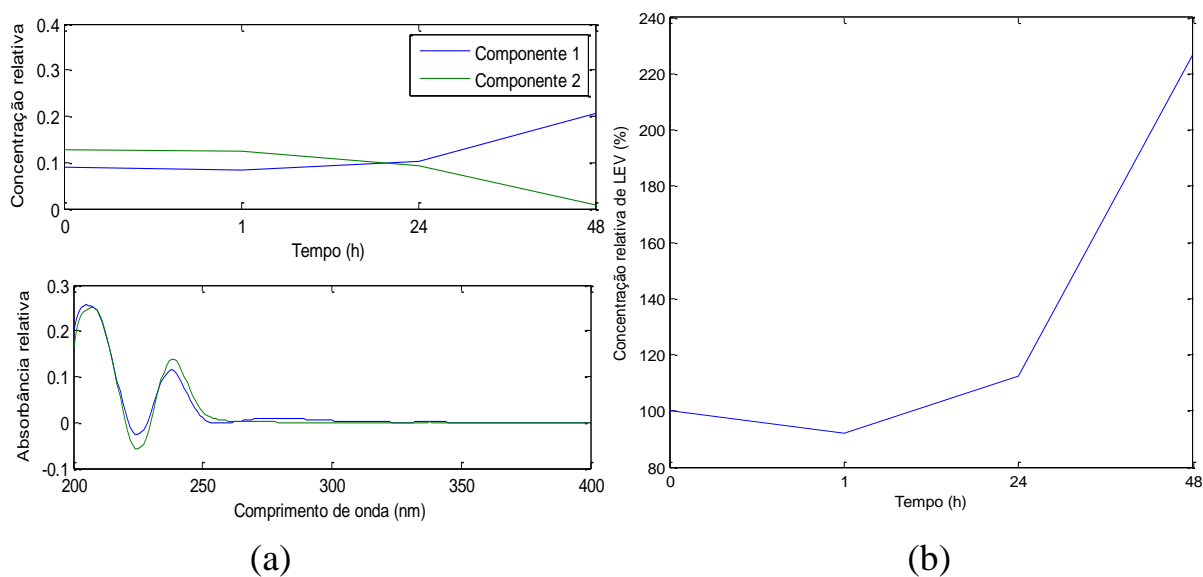


FIGURA 25 - Resultados da resolução MCR-ALS. (a) Perfis espectrais puros e perfis de concentração relativa dos componentes da mistura; (b) Gráfico da concentração relativa de LEV em meio fotolítico.

### 4.3 - Tansulosina

A Figura 26 mostra os espectros obtidos a partir das soluções de ensaios de degradação forçada de TAN em ácido clorídrico a  $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ ,  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  e  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ .

Na etapa da PCA, o posto da matriz foi estabelecido como quatro fontes de variação independentes presentes em solução. Nos cálculos de MCR-ALS, as restrições de não negatividade e de igualdade foram utilizadas e os resultados obtidos são mostrados na Figura 27 (a).

Foram feitos 13 experimentos sendo o primeiro é a leitura de absorbância da solução do fármaco puro, os experimentos 2, 3, 4 e 5 ocorreram em presença de HCl  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ , os experimentos 6, 7, 8 e 9 em HCl  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  e os

experimentos 10, 11, 12 e 13 em HCl 1 mol L<sup>-1</sup> nos tempos de 0h, 1h, 24h e 48h, respectivamente. Com desses dados, o gráfico de porcentagem de degradação estimada foi plotado na Figura 27 (b).

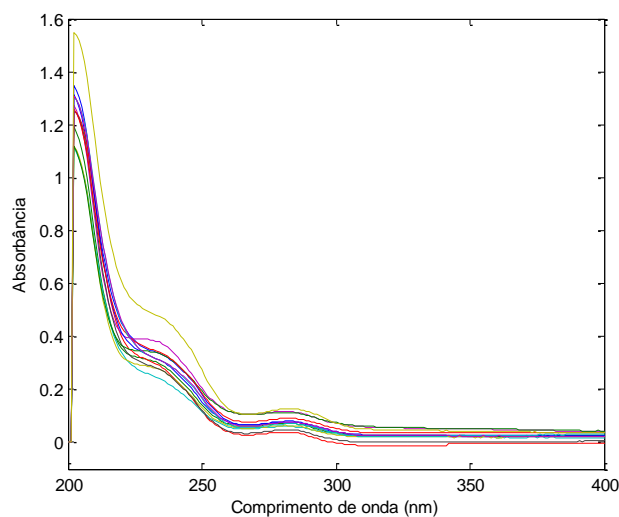


FIGURA 26 - Espectros de absorvância da Tansulosina obtidos a partir de soluções de ensaios de degradação forçada em meio ácido.

Os resultados obtidos apresentaram uma falta de ajuste em relação à matriz de 7,69 % e a porcentagem de variância explicada ( $R^2$ ) igual a 99,41 %, indicando que o modelo gerou uma boa estimativa dos perfis espectrais e de concentração dos analitos em solução de forma significativamente explicativa.

O perfil de concentração relativa para o analito em questão estimou que nos tempos iniciais de cada solução degradante ácida a porcentagem de degradação do fármaco atingiu o valor mínimo de 10 % em relação ao fármaco puro.

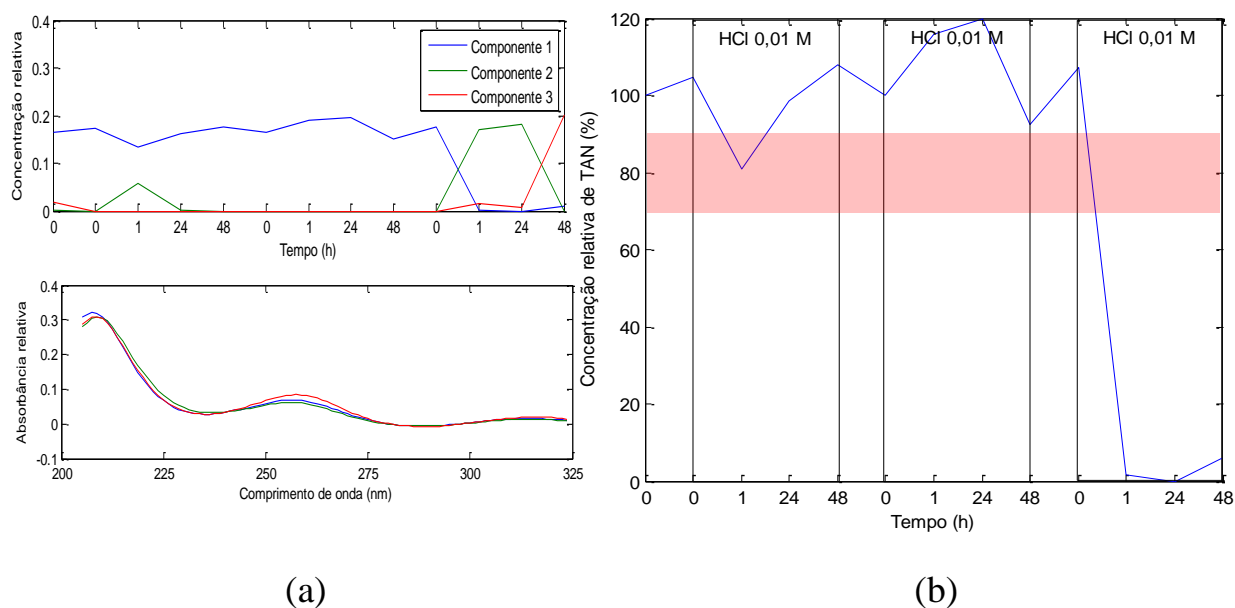


FIGURA 27 - Resultados da resolução MCR-ALS. (a) Perfis de concentração e espectros dos componentes mais puros da TAN; (b) Gráfico da concentração relativa de TAN em meio ácido.

A Figura 28 mostra os espectros obtidos a partir das soluções de ensaios de degradação forçada da TAN em meio básico que consistiu em soluções de hidróxido de sódio em três diferentes concentrações:  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ ,  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  e  $1 \text{ mol L}^{-1}$ .

Para a análise da MCR-ALS, o posto da matriz foi estabelecido como três e o procedimento prosseguiu-se de forma semelhante ao anterior. A resolução de curva multivariada gerou as estimativas dos perfis de concentração e os perfis espectrais mais puros representados pela Figura 29 (a). Na Figura 29 (b) é mostrada a porcentagem de degradação da TAN a cada experimento onde o primeiro é a solução do fármaco puro, os experimentos 2, 3 e 4 ocorreram em presença de NaOH  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ , os experimentos 5, 6 e 7 em NaOH  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  e os experimentos 8, 9 e 10 em NaOH  $1 \text{ mol L}^{-1}$ , todos nos tempos de 1h, 24h e 48h.

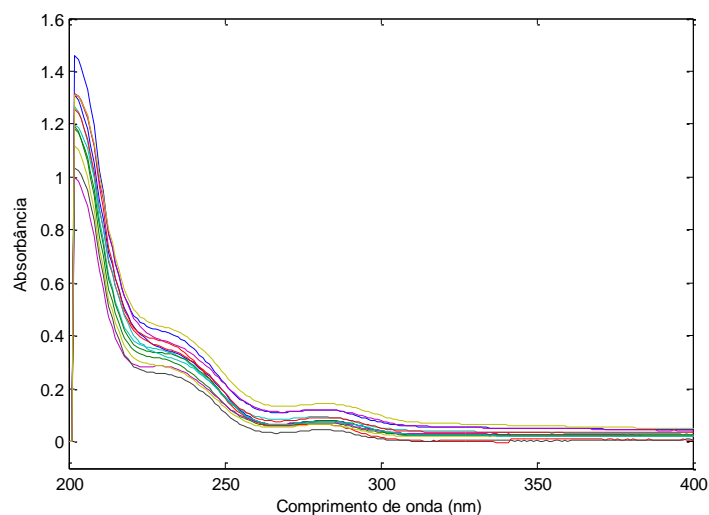


FIGURA 28 - Espectros de absorvância da Tansulosina obtidos a partir de soluções de ensaios de degradação forçada em meio básico.

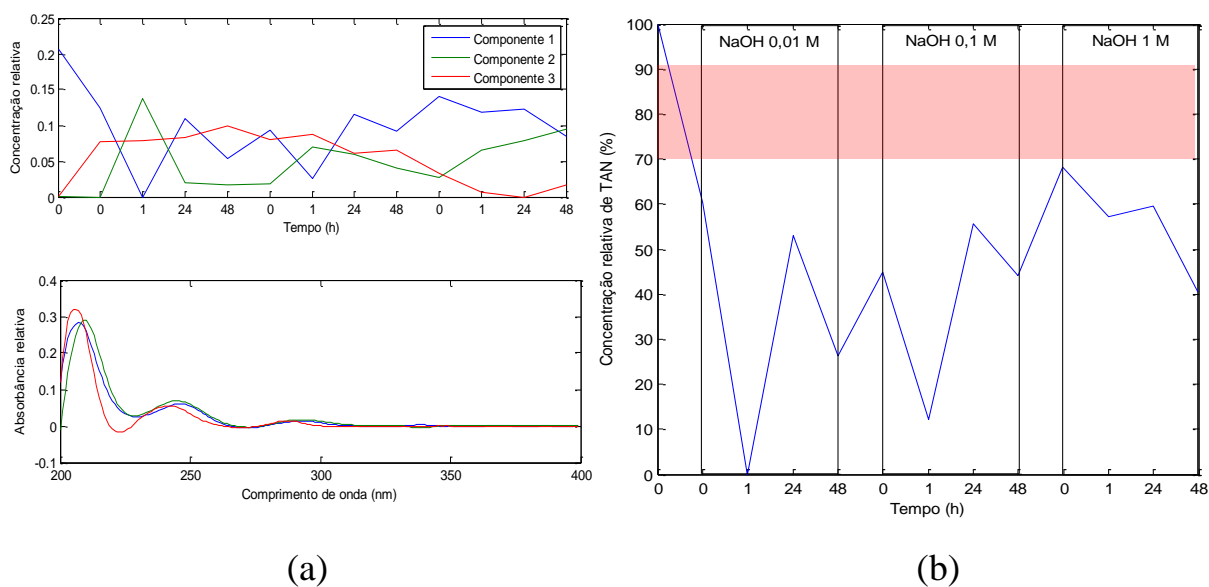


FIGURA 29 - Resultados da resolução MCR-ALS. (a) Perfis de concentração e espectros dos componentes mais puros da TAN; (b) Gráfico de concentração relativa de TAN em meio básico.



Com uma boa estimativa apresentando uma falta de ajuste em relação à matriz de 2,07 % e a porcentagem de variância explicada ( $R^2$ ) igual a 99,96 %, o modelo carrega a informação de que apenas no meio mais brando e no menor tempo de degradação a TAN atingiu a faixa de 10 % a 30 % exigida pela regulamentação.

Na Figura 30 os espectros obtidos a partir das soluções de ensaios de degradação forçada da TAN em meio oxidativo estão representados graficamente. A partir desses dados, o posto da matriz foi calculado e estabelecido como dois contribuintes presentes na amostra.

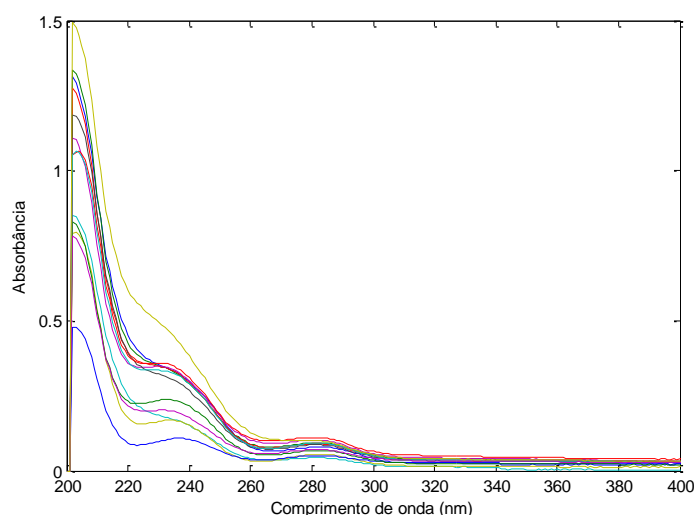


FIGURA 30 - Espectros de absorvância da Tansulosina obtidos a partir de soluções de ensaios de degradação forçada em meio oxidativo.

A partir dos perfis de concentração obtidos através da MCR-ALS mostrados na Figura 31 (a), o gráfico da porcentagem de degradação estimada da TAN em meio oxidativo a cada experimento foi plotado e mostrado na Figura 31 (b). O primeiro experimento é a solução do fármaco puro, os experimentos 2, 3, 4 e 5 ocorreram em presença de peróxido de hidrogênio a 1 %, os experimentos 6, 7, 8 e 9 a 3 % e os experimentos 10, 11, 12 e 13 a 5 %, todos nos tempos de 0h, 1h, 24h e 48h, respectivamente.

Os resultados apresentaram uma falta de ajuste em relação à matriz de 8,80 %, e a porcentagem de variância explicada ( $R^2$ ) igual a 99,23 %. O perfil de concentração relativa para o analito em meio oxidativo mostrou que, assim como nos experimentos em meio básico, a porcentagem de degradação foi estimada na faixa de 10 % a 30 % requerida pelas normas regulatórias apenas no meio mais brando e nos menores tempos.

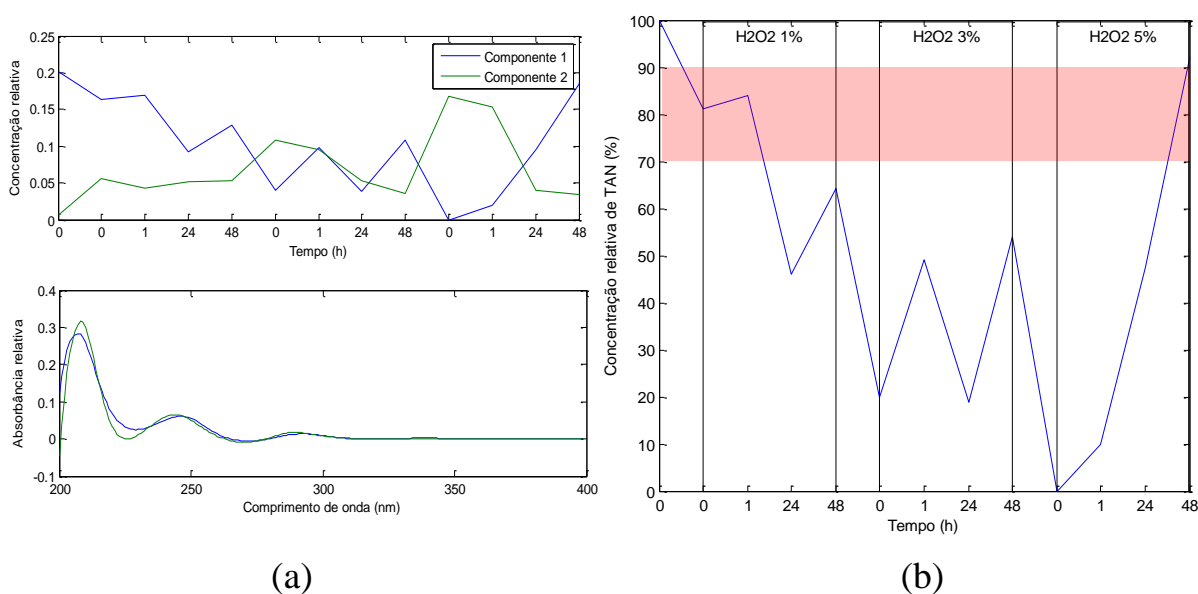


FIGURA 31 - Resultados da resolução MCR-ALS. (a) Perfis de concentração e espectros dos componentes mais puros da TAN; (b) Gráfico de concentração relativa da TAN em meio oxidativo.

A Figura 32 mostra os espectros obtidos a partir das soluções de ensaios de degradação forçada da TAN em presença de radiação ultravioleta no comprimento de onda de 364 nm. O posto da matriz foi estabelecido como dois contribuintes presentes na amostra e a Figura 33 (a) representa os espectros recuperados juntamente com os perfis de concentração.

A Figura 33 (b) mostra a porcentagem de degradação da TAN a cada experimento onde o primeiro é a solução do fármaco puro e os seguintes em presença de radiação respectivamente nos tempos de 1h, 24h e 48h.

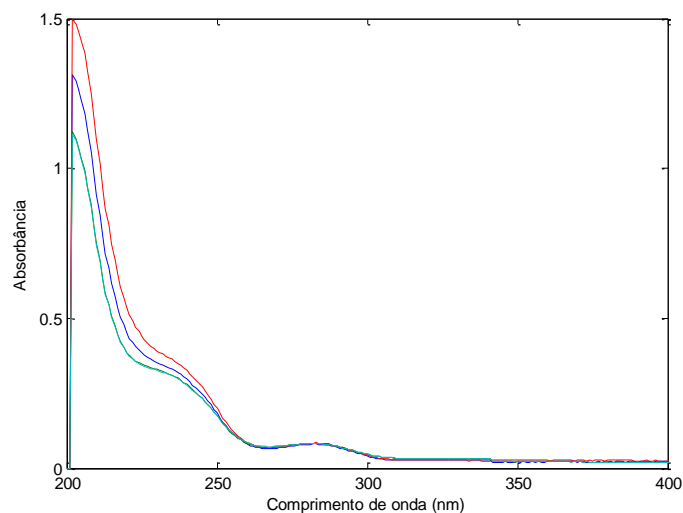


FIGURA 32 - Espectros de absorvância da Tansulosina obtidos a partir de soluções de ensaios de degradação forçada em meio fotolítico.

Os resultados obtidos apresentaram uma falta de ajuste em relação à matriz de 1,32 %, a porcentagem de variância explicada ( $R^2$ ) igual a 99,98 % e ao analisá-los observa-se que o perfil de concentração relativa para o analito perante a radiação ultravioleta se mostrou estável devido à semelhança dos espectros das espécies ativas.

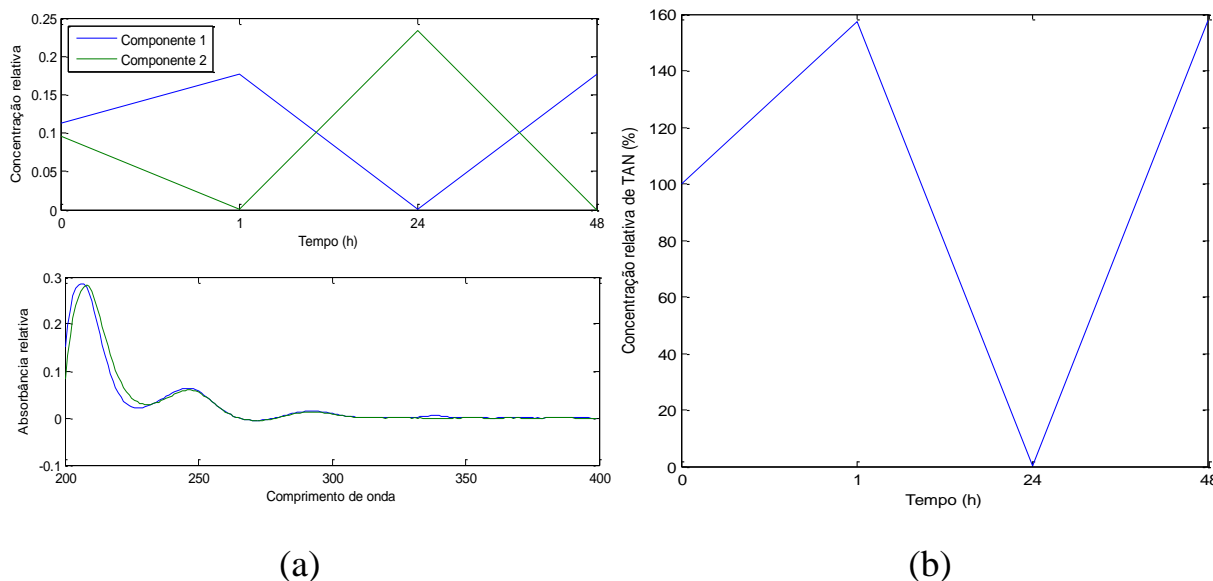


FIGURA 33 - Resultados da resolução MCR-ALS. (a) Perfis de concentração e espectros dos componentes mais puros da TAN; (b) Gráfico de concentração relativa de TAN em meio fotolítico.

#### 4.4 - Ticagrelor

A Figura 34 mostra os espectros obtidos a partir das soluções de ensaios de degradação forçada de TCG em meio ácido em soluções de ácido clorídrico a  $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ ,  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  e  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ .

Por meio da PCA, o posto da matriz foi estabelecido como duas fontes de variação independentes presentes em solução. Para realizar os cálculos de MCR-ALS, as restrições de não negatividade e de igualdade foram utilizadas de forma análoga ao estudo do fármaco anterior. Os resultados obtidos são mostrados na Figura 35 (a).

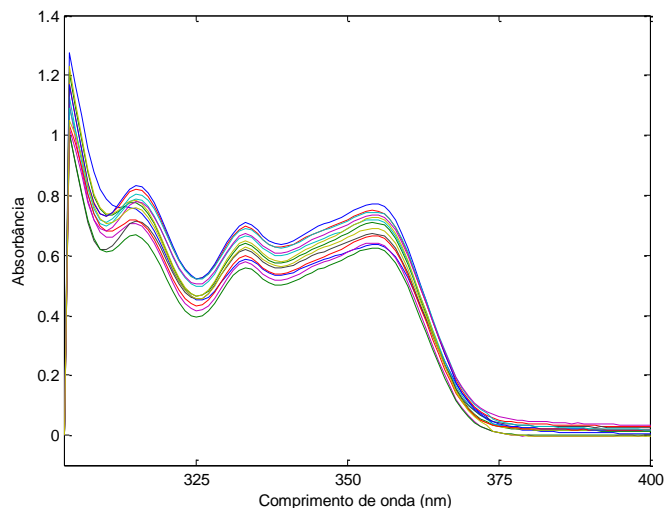


FIGURA 34 - Espectros de absorvância de Ticagrelor obtidos a partir de soluções de ensaios de degradação forçada em meio ácido.

Foram feitos 13 experimentos sendo o primeiro é a leitura de absorvância da solução do fármaco puro, os experimentos 2, 3, 4 e 5 ocorreram em presença de HCl  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ , os experimentos 6, 7, 8 e 9 em HCl  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  e os experimentos 10, 11, 12 e 13 em HCl  $1 \text{ mol L}^{-1}$  nos tempos de 0h, 1h, 24h e 48h, respectivamente. Com desses dados, a estimativa gráfica de porcentagem de degradação foi plotado na Figura 35 (b). Os resultados obtidos apresentaram uma falta de ajuste em relação à matriz de 6,49 % e a porcentagem de variância explicada ( $R^2$ ) igual a 99,02 %.

O perfil de concentração relativa para o analito em questão mostrou que no primeiro experimento que ocorreu em presença de HCl a  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$  no tempo inicial, a porcentagem de degradação do fármaco já atingiu a faixa estimada de 10 % a 30 % em relação ao fármaco puro.

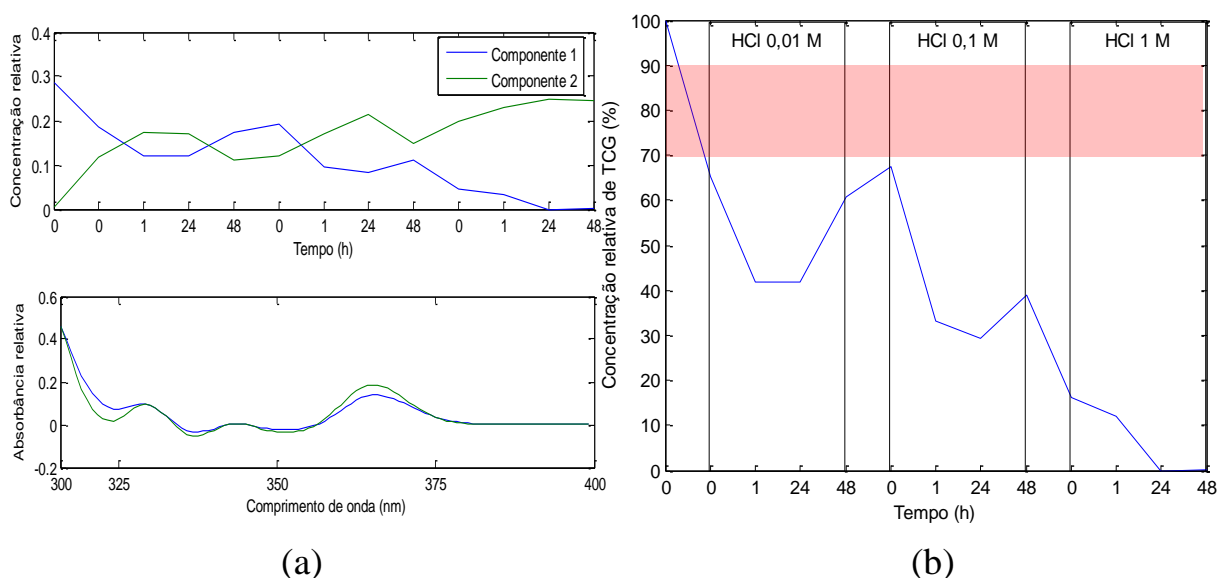


FIGURA 35 - Resultados da resolução MCR-ALS. (a) Perfis de concentração e espectros dos componentes mais puros da TCG; (b) Gráfico da concentração de TCG em meio ácido.

A Figura 36 mostra os espectros obtidos a partir das soluções de ensaios de degradação forçada do TCG em meio básico que consistiu em soluções de hidróxido de sódio em três diferentes concentrações:  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ ,  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  e  $1 \text{ mol L}^{-1}$ . E por meio da PCA, o posto da matriz foi estabelecido como dois.

A resolução de curva multivariada gerou as estimativas dos perfis de concentração e os perfis espectrais mais puros representados pela Figura 37 (a). Na Figura 37 (b) é mostrada a estimativa da porcentagem de degradação do TCG a cada experimento onde o primeiro é a solução do fármaco puro, os experimentos 2, 3, 4 e 5 ocorreram em NaOH  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ , os experimentos 6, 7, 8 e 9 em NaOH  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  e os experimentos 10, 11, 12 e 13 em NaOH  $1 \text{ mol L}^{-1}$ , todos nos tempos de inicial, 1h, 24h e 48h.

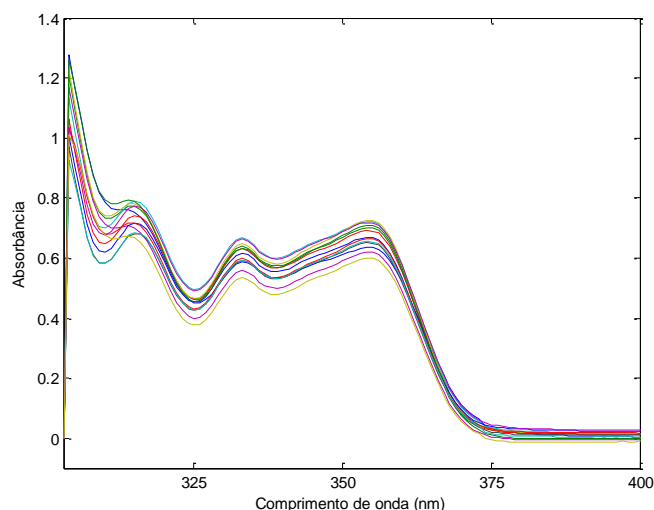


FIGURA 36 - Espectros de absorvância de Ticagrelor obtidos a partir de soluções de ensaios de degradação forçada em meio básico.

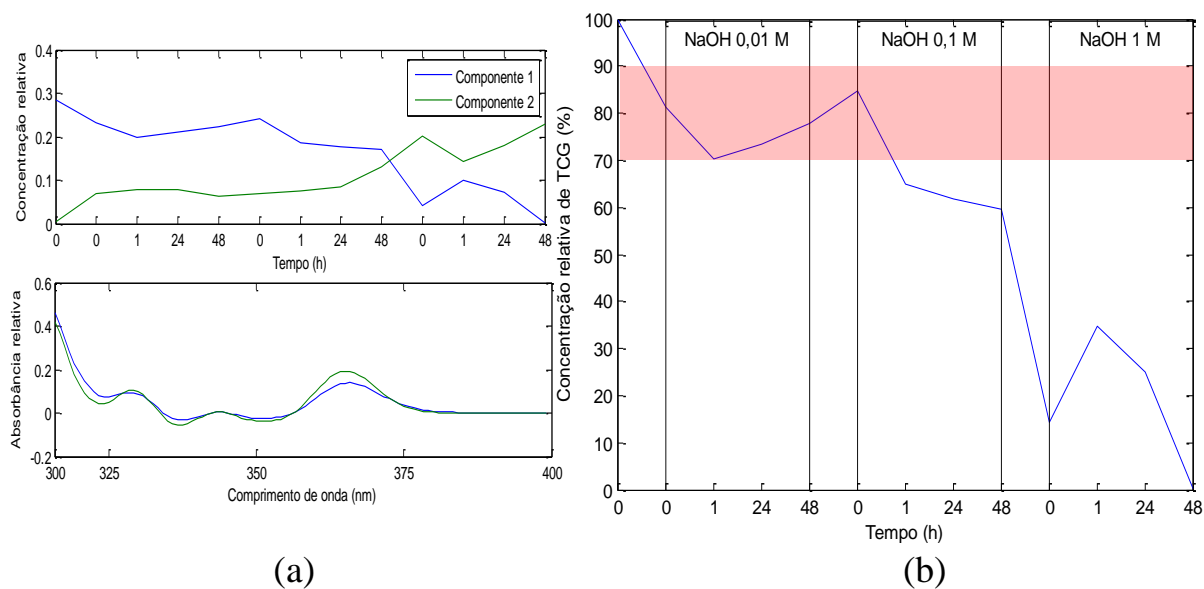


FIGURA 37 - Resultados da resolução MCR-ALS. (a) Perfis de concentração e espectral dos componentes mais puros da TCG; (b) Gráfico da concentração relativa de TCG em meio básico.

Com uma estimativa apresentando uma falta de ajuste em relação à matriz de 8,37 % e a porcentagem de variância explicada ( $R^2$ ) igual a 98,96 %, o modelo carrega a informação de que apenas no meio mais brando e nos menores tempos a degradação da TCG em meio básico atingiu a faixa de 10 % a 30 % exigida pela agências regulatórias.

A Figura 38 mostra os espectros obtidos a partir das soluções de ensaios de degradação forçada de TCG em meio oxidativo com peróxido de hidrogênio a 1 %, 3 % e 5 %. O posto da matriz foi estabelecido como dois contribuintes presentes na amostra.

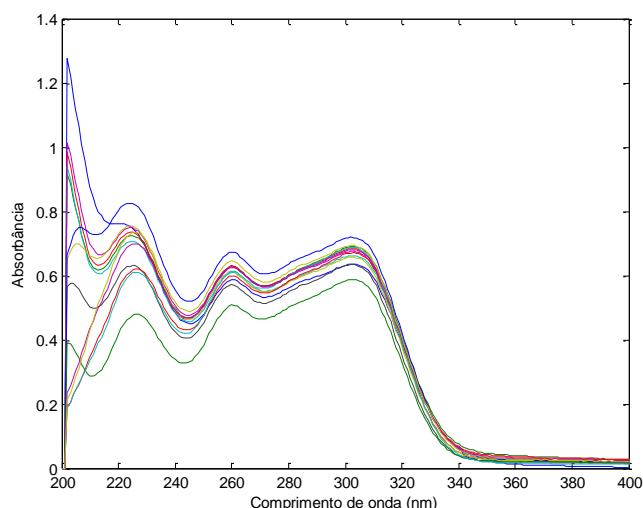


FIGURA 38 - Espectros de absorvância de Ticagrelor obtidos a partir de soluções de ensaios de degradação forçada em meio oxidativo.

A partir dos perfis de concentração obtidos através da MCR-ALS mostrados na Figura 39 (a), foi possível plotar o gráfico da porcentagem de degradação estimada do TCG em meio oxidativo a cada experimento como mostrado na Figura 39 (b). O primeiro experimento é a solução do fármaco puro, os experimentos 2, 3, 4 e 5 ocorreram em presença de peróxido de hidrogênio a 1 %, os experimentos 6, 7, 8 e 9 a 3 % e os experimentos 10, 11, 12 e 13 a 5 %, todos nos tempos de 0h, 1h, 24h e 48h, respectivamente.



Os resultados apresentaram uma falta de ajuste em relação à matriz de 16,88 %, e a porcentagem de variância explicada ( $R^2$ ) igual a 97,15 %. O perfil de concentração relativa para o analito em meio oxidativo mostrou que em presença de peróxido de hidrogênio a 1 % a porcentagem de degradação foi estimada na faixa de 10 % a 30 % requerida pelas normas regulatórias e em concentrações mais altas o fármaco degrada além do limite.

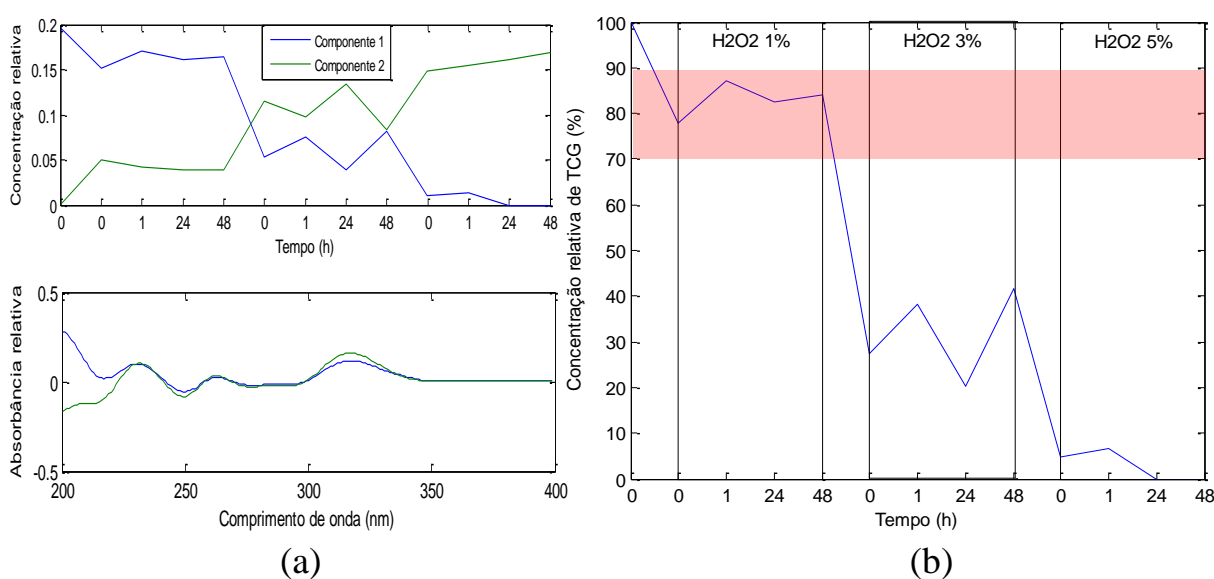


FIGURA 39 - Resultados da resolução MCR-ALS. (a) Perfis de concentração e espectros dos componentes mais puros da TCG; (b) Gráfico da concentração relativa de TCG em meio oxidativo.

A Figura 40 mostra os espectros obtidos a partir das soluções de ensaios de degradação forçada de TCG em presença de radiação ultravioleta no comprimento de onda de 364 nm. O posto da matriz foi estabelecido como dois contribuintes presentes na amostra e a Figura 41 (a) representa os espectros recuperados juntamente com os perfis de concentração.

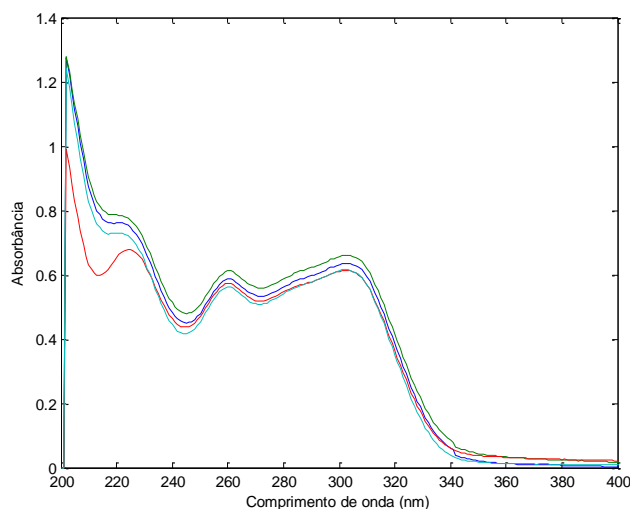


FIGURA 40 - Espectros de absorvância de Ticagrelor obtidos a partir de soluções de ensaios de degradação forçada em meio fotolítico.

A Figura 41 (b) apresenta a porcentagem de degradação estimada de TCG a cada experimento onde o primeiro é a solução do fármaco puro e os seguintes em presença de radiação respectivamente nos tempos de 1h, 24h e 48h.

Os resultados obtidos apresentaram uma falta de ajuste em relação à matriz de 2,98 %, a porcentagem de variância explicada ( $R^2$ ) igual a 99,91 % e ao analisá-los observa-se que o perfil de concentração relativa para o analito perante a radiação ultravioleta não se mostrou conclusivo a respeito da porcentagem de degradação.

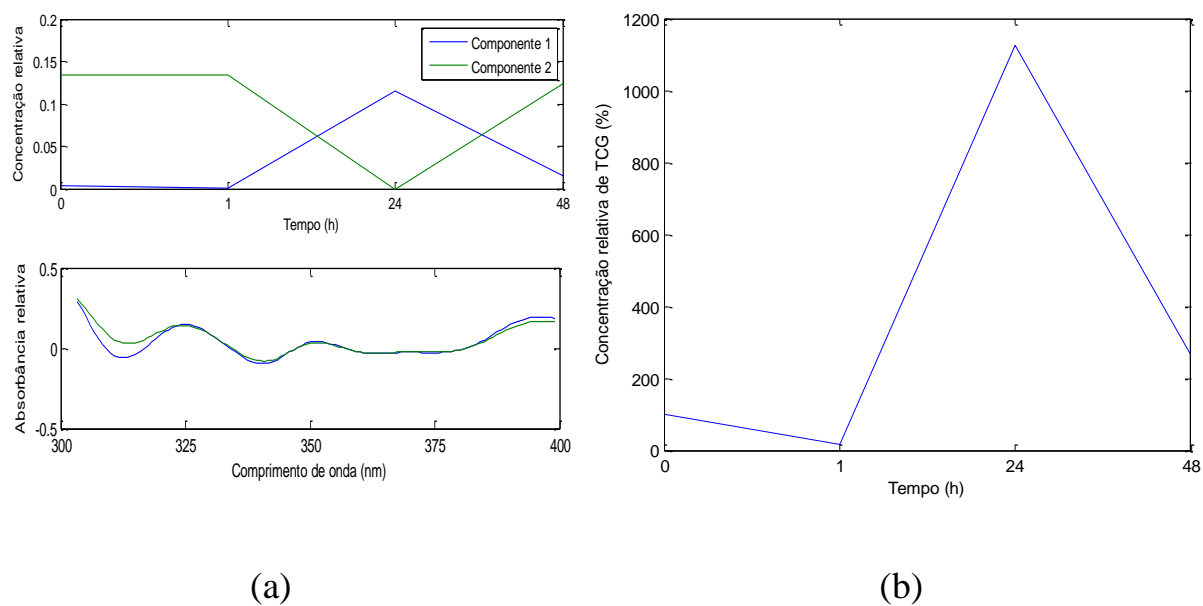


FIGURA 41 - Resultados da resolução MCR-ALS. (a) Perfis de concentração e espectros dos componentes mais puros da TCG; (b) Gráfico da concentração de TCG em meio fotolítico.

## 5 - CONCLUSÕES

Com o estudo de degradação forçada dos fármacos escolhidos, foi possível a obtenção de estimativa dos perfis puros espectrais e da concentração dos componentes presentes nas soluções dos testes de degradação forçada.

A metodologia de monitoramento da degradação usando UV-Vis e MCR-ALS se mostrou simples e eficiente para encontrar a condição favorável à degradação do fármaco no intervalo de 10% a 30%. Essa faixa de degradação é requerida pelos órgãos de regulamentação na etapa de validação dos métodos analíticos onde geralmente a cromatografia líquida é empregada. A técnica proposta mostra que em diversos casos é possível reduzir muito o consumo de reagentes, resíduos, tempo de máquina e de manuseio.

Para o AAS, o fármaco atingiu a degradação mínima de 10% no meio ácido com HCl 0,01 e 0,1 mol L<sup>-1</sup> por 1h, no meio básico com NaOH a 0,1 mol L<sup>-1</sup> por 1h. No meio oxidativo esse resultado foi alcançado com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 1% por 1h e no meio oxidativo permaneceu estável. No estudo da degradação da LEV no meio ácido, a condição favorável ocorreu na presença de HCl 0,01 mol L<sup>-1</sup> por 24h. No meio básico em NaOH 0,01 e 0,1 mol L<sup>-1</sup> entre 1h e 24h, no meio oxidativo com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 1% por 1h. A TAM e o TCG obtiveram uma degradação na faixa de 10 a 30% nos meios ácidos, básicos e oxidativos mais brandos e nos menores tempos. Nos meios fotolíticos não se obtiveram resultados conclusivos.

Portanto, pode-se concluir que a espectroscopia UV-Vis aliada ao MCR-ALS se mostrou uma alternativa promissora pela simplicidade, seletividade relativa e baixo custo. Essa metodologia pode ser aplicada nos testes de degradação forçada como forma de reconhecer de maneira rápida a condição em que os estudos irão prosseguir

## 6 - REFERÊNCIAS

1. JAIN, D. & BASNIWAL, P. K. "Forced degradation and impurity profiling: Recent trends in analytical perspectives". *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 86:11, 2013.
2. KOGAWA, A. & SALGADO, H. "Impurities and Forced Degradation Studies: A Review." *Curr. Pharm. Anal.*, 12 (1):18, 2016.
3. MAGGIO, R.M.; CALVO, N.L.; VIGNADUZZO, S.E. & KAUFMAN, T.S. "Pharmaceutical impurities and degradation products: Uses and applications of NMR techniques". *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 101:102, 2014.
4. PATEL, P.; SAHU, K.; KARTHIKEYAN, C.; MOORTHY, N.S.H.N. & TRIVEDI, P. "Study of forced degradation behaviour of eprosartan mesylate and development of validated stability indicating assay method by UPLC". *Lat. Am. J. Pharm.*, 30 (4): 667, 2011.
5. KLICK, S.; MUIJSELAAR, P.G.; WATERVAL, J.; EICHINGER, T.; KORN, C.; GERDING, T.K.; DEBETS, A.J.; SÄNGER-VAN DE GRIEND, C.; VAN DEN BELD, C.; SOMSEN, G.W. & DE JHONG, G. "Toward a generic approach for: Stress testing of drug substances and drug products". *Pharm. Technol.*, 29: 48, 2005.
6. RAWAT, T. & PANDLEY, I. "Forced degradation studies for drug substances and drug products- scientific and regulatory considerations". *J. Pharm. Sci. Res.*,7(5): 238, 2015.
7. BAERTSCHI, S. W. "Pharmaceutical stress testing". Indianapolis: Informa Healthcare., 468, 2005.
8. NAGESWARA RAO, R.; NARASA RAJU, A. & NARSIMHA, R." Isolation and characterization of process related impurities and degradation products of bicalutamide and development of RP-HPLC method for impurity profile study". *J. Pharm. Biomed. Anal.* 46 (3): 505, 2008.

9. ANVISA. Medicamentos – Guia nº 4, versão 1, de 04 de dezembro de 2015. <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/centraisdeconteudo/publicacoes/medicamentos/publicacoes-sobre-medicamentos/perguntas-e-respostas-rdc-53-2015-e-guia-04-2015.pdf/view>.
10. ANVISA. Perguntas e respostas – Qualificação de impurezas, 1ª edição, de 18 de julho de 2019. <https://www.gov.br/anvisa/ptbr/centraisdeconteudo/publicacoes/medicamentos/publicacoes-sobre-medicamentos/perguntas-e-respostas-fluxo-de-analise-de-qualificacao-de-impurezas-e-produtos-de-degradacao-de-medicamentos-classificados-como-sinteticos-e-semisinteticos.pdf/view>.
11. BLESSY, M.; PATEL, R. D.; PRAJAPATI, P. N. & AGRAWAL, Y. K. “Development of forced degradation and stability indicating studies of drugs - A review”. *J. Pharm. Anal.*, 4 (3) :159, 2014.
12. WHO. *Expert Committee on Specification for Pharmaceutical Preparations, WHO Technical Report Series*, No. 863, Thirty Fourth Report, Annex 5 - Guidelines for stability testing of pharmaceutical products containing well established drug substances in conventional dosages forms, Geneva, Switzerland, 1996.
13. FDA. Guidance for Industry, INDs for Phase II and III Studies—Chemistry, Manufacturing, and Controls Information, Food and Drug Administration, 2003.
14. SINGH, S.; JUNWAL, M.; MODHE, G.; TIWARI, H.; KURMI, M.; PARASHAR, N. & SIDDURI, P. “Forced degradation studies to assess the stability of drugs and products”. *Trends Analyt. Chem.*, 49: 71, 2013.
15. BAKSHI, M. & SINGH, S. “Development of validated stability-indicating assay methods-critical review”. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 28(6): 1011, 2002.
16. HUYNH-BA, K. “Handbook of Stability Testing in Pharmaceutical Development: Regulations, Methodologies and Best Practices”. Nova York: Springer, 321, 2009.

17. SEHRAWAT, R.; MAITHANI, M. & SINGH, R. "Regulatory Aspects in Development of Stability-Indicating Methods: A Review". *Chromatographia*, 72: 1, 2010.
18. TANTAWY, M.; WESHAHY, S.A; WADIE M. & REZK, M.R. "Stability-indicating HPTLC method for the simultaneous detection and quantification of alfuzosin hydrochloride, solifenacin succi-nate along with four of their official impurities". *Microchem. J.*, 157, 2020.
19. SINGH, S.; HANDA, T.; NARAYANAM, M.; SAHU, A.; JUNWAL, M. & SHAH, R.P. "A critical review on the use of modern sophisticated hyphenated tools in the characterization of impurities and degradation products". *J Pharm Biomed Anal.*, 69:148, 2012.
20. ICH. Stability testing of new drug substances and products Q1A(R2). <https://database.ich.org/sites/default/files/Q1A%28R2%29Guideline.pdf> (2003).
21. ALCÂNTARA, F.C.; RESCIA, V.C.; SANTOS, M.A. & VALDUGA, C.J. "Testes de degradação forçada para fármacos e medicamentos". *Rev. Pesq. Inov. Farm.*, 5(1): 38, 2013.
22. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária Resolução - RDC N° 45, de 9 de agosto de 2012. [Internet]. Disponível em:<[http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2012/rdc0045\\_09\\_08\\_2012.html](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2012/rdc0045_09_08_2012.html)>. Acesso em: 15 out. 2019.
23. Brasil. Resolução RDC nº58, de 20 de dezembro de 2013. Aprova "Resolução para Regulamentação da Notificação, Identificação e Qualificação de Produtos de Degradação em Medicamentos". Órgão Emissor: ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária.
24. Brasil. Resolução RDC nº53, de 4 de dezembro de 2015. Aprova "Resolução para Regulamentação da Notificação, Identificação e Qualificação de Produtos de Degradação em Medicamentos". Órgão Emissor: ANVISA -

Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Poder Executivo, Pará, PA, Diário Oficial da União, 07 dezembro. 2015.

25. JADHAV, G. P.; KASTURE, V. S.; PAWAR, S. S.; VADGAONKAR, A. R.; LODHA, A. P.; TUSE, S. K.; KAJALE, H. R. & BORBANE, SANTOSH A. “Drug Impurity Profiling: A Scientific Approach”. *J. Pharm. Res.*, 8 (6): 696, 2014.
26. ICH Q3A(R2), 2006. Impurities in new drug substances. Step 4, Outubro 2006.
27. SCHRÖR, K. “Acetylsalicylic Acid”. Alemanha: John Wiley & Sons, 458, 2016.
28. ANVISA. Consultas - Bulário Eletrônico: Aspirina. <https://consultas.anvisa.gov.br/#/medicamentos/25351210118200770/>
29. KOWALSKA, M.; WOŹNIAK, M.; KIJEK, M.; MITROSZ, P.; SZAKIEL, J. & TUREK, P. “Management of Validation of HPLC Method for Determination of Acetylsalicylic Acid Impurities in a New Pharmaceutical Product”. *Sci. Rep.*, 12 (1): 1, 2022.
30. DO PRADO, T.M; CINCOTTO, F.H & MACHADO, S.A.S. “Spectroelectrochemical Study of Acetylsalicylic Acid in Neutral Medium and Its Quantification in Clinical and Environmental Samples”. *Eletrochem. Acta.*, 233: 105, 2017.
31. ERTOKUS, G. & TUGRUL, A. “Spectrophotometric Determination of Acetylsalicylic Acid, Paracetamol and Ascorbic Acid by Chemometric Methods.” *Chem. Chem. Technol.*, 12(3): 279, 2018.
32. VORA, D. N. & KADAV, A. A. “Validated Ultra HPLC Method for the Simultaneous Determination of Atorvastatin, Aspirin, and Their Degradation Products in Capsules”. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*, 31(18): 2821, 2008.



33. SHERIKAR, O. & MEHTA, P. “Comprehensive Assessment of Degradation Behavior of Aspirin and Atorvastatin Singly and in Combination by Using a Validated RP-HPLC Method”. *Sci. Pharm.*, 81 (1): 195, 2013.
34. HIDALGO, I. I. T. “Estudo de Estabilidade da Cetirizina em Preparações Farmacêuticas de Xarope e Comprimidos”. São Paulo, Programa Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos - USP, 2004. Tese doutorado, 219.
35. FERRER, M. “Pharmacokinetic evaluation of levocetirizine”. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 7(8): 1035, 2011.
36. ANVISA. Consultas - Bulário Eletrônico: Dicloridrato de Levocetirizina Eurofarma.  
<https://consultas.anvisa.gov.br/#/medicamentos/25351711337201409/?nomeProduto=levocetirizina> (2015).
37. WALSH, G. M. “Levocetirizine: An Update”. *Current Medicinal Chemistry*, 13(22): 2711, 2006.
38. MENZIES-GOW, A.; YING, S.; PHIPPS, S. & KAY, A.B. Interactions between eotaxin, histamine and mast cells in early microvascular events associated with eosinophil recruitment to the site of allergic skin reactions in humans. *Clin Exp Allergy*. 34: 1276, 2004.
39. JABERA, A. M. Y.; AL SHERIFEB, H. A., AL OMARIB, M. M. & BADWANB, A. A. “Determination of cetirizine dihydrochloride, related impurities and preservatives in oral solution and tablet dosage forms using HPLC”. *J. Pharm. Biomed.* 36: 341, 2004.
40. KUMAR, S.; JYOTHI, G. & RAO, S. “A validated stability-indicating and LC-MS compatible method for the determination of related substances and assay of montelukast sodium and levocetirizine HCL by U-HPLC in tablet dosage form”. *Indo. Am. J. Pharm*, 5(3): 1368, 2018.
41. PENTA, D. C. S. & SANKAR, D. G. “Forced degradation studies of combination of levocetirizine, ambroxol and monteleukast by validated RP-HPLC method” *Indo Am. J. Pharm. Res.*, 7(7), 2017.

42. JAYAPRAKASH, M.; PURANIK, S. B. & GOWRI, R. "Stability indicating RP-HPLC method for simultaneous determination of H1- Histamine receptor antagonist and mucolytic agent in marketed formulation". *Ijppr. Human.*, 17(4): 731, 2020.
43. HOMMOSS, R.; ELZEIN, H. & HAIDAR, S. "Determination of levocetirizine configurational stability in tablets using chiral HPLC method". *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.*, 3(2): 103, 2011.
44. BORGES, P. F.; LOZANO, P. P.; MONTOYA, E. G.; MIÑARRO, M.; TICÓ, J. R.; JO, E. & NEGRE, J. M. S. "Determination of stress-induced degradation products of cetirizine dihydrochloride by a stability-indicating RP-HPLC method". *J. Pharm. Sci.*, 22:82, 2014.
45. ALAANI, H. & ALASHKAR, I. "Development and Validation of Stability-Indicating RP-HPLC Method for the Analysis of Levocetirizine Dihydrochloride and Fexofenadine Hydrochloride in the Presence of Parabens in Liquid Dosage Forms". *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.*, 23(2): 64, 2013.
46. PATIL, G. B.; SONAWANE, J. K.; KHAN, Z. G. & PATIL, D. A. "Forced degradation study of different brands of levocetirizine dihydrochloride by UV-spectroscopy". *Int. J. Pharm. Chem. Anal.*, 7(2): 69, 2020.
47. GUNJAL, R. P.; RAJU, G.; BABU, A. R.; MALLIKARJUN, N.; SHASTRI, N. & SRINIVAS, R. "HPLC and LC-MS studies on stress degradation behavior of levocetirizine and development of a validated specific stability-indicating method". *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*, 34(12): 955, 2011.
48. CHAPPLE, C. R. & CHARTIER-KASTLER, E. "Pharmacokinetic profile of tamsulosin". *BJU Int.*, 98(2): 9, 2006.
49. BARI, S. B.; BAKHSHI, A. R.; JAIN, P. S. & SURANA, S. J. "Development and validation of stability-indicating HPTLC determination of tamsulosin in bulk and pharmaceutical dosage form". *Chromatogr. Res. Int.* 2011: 6, 2011.

50. ANVISA. Consultas - Bulário Eletrônico: Cloridrato de Tamsulosina (GeoLab).  
<https://consultas.anvisa.gov.br/#/medicamentos/25351687945201012/>  
(2012).
51. MONIR, H. H.; ALI, A. M.; REFAT, R. E. & ABBAS, S. S. “Chromatographic methods for determination of finasteride and tamsulosin hydrochloride and in presence of finasteride degradation product”. *Acta Chromatogr.*, 32(2): 95, 2020.
52. CHOUDHARI, V. P. & NIKALJE, A. P. G. “Stability-Indicating HPTLC method for the determination of tamsulosin in pharmaceutical dosage forms. *Chromatographia*, 11(12): 69, 2009.
53. SUDHA, T. & DHOMANE, J. “A validated RP-HPLC method for the determination of impurities in tamsulosin HCL”. *Int. J. Chem. Res.*, 2(4): 29, 2011.
54. REZK, M. R.; ABDEL-MOETY, E. M.; WADIE, M. & TANTAWY, M. A. “Stability assessment of tamsulosin and tadalafil co-formulated in capsules by two validated chromatographic methods”. *J. Sep. Sci.*, 44: 530, 2021.
55. KUMAR, G. S. & KUMAR, B. S. P. “Stability-Indicating RP-HPLC Method for Determination of Tamsulosin HCL in Pharmaceutical Dosage Form”. *J. Basic Clin. Pharm.*, 3(2): 255, 2012.
56. PATEL, D.B. & PATEL, N. J. “Validated stability indicating HPTLC method for the determination of Tamsulosin hydrochloride in pharmaceutical dosage forms”. *Int. J. Chem. Tech. Res.*, 2(1): 646, 2010.
57. NAMDEV, D.; BORKAR, R. M.; RAJU, B.; KALARIYA, P. D.; RAHANGDALE, V. T.; GANANADHAMU, S. & SRINIVAS R. “Identification of forced degradation products of tamsulosin using liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry”. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 88: 245, 2014.

58. CHAUDHARI, R.; MOHANRAJ, K. & SHIRSAT, V. “MS/MS and HPLC characterization of forced degradation products of dutasteride and tamsulosin hydrochloride”. *IJPSR*, 5(7): 2791, 2014.
59. ANVISA. Consultas - Bulário Eletrônico: Ticagrelor (EMS). <https://consultas.anvisa.gov.br/#/medicamentos/25351596035201605/> (2018).
60. FALCÃO, F. J. A.; CARVALHO, L.; CHAN, M.; ALVES, C. M. R.; CARVALHO, A. C. C. & CAIXETA, A. M. “Receptores plaquetários P2Y12: Importância na intervenção coronariana percutânea.” *Arq. Bras. Cardiol.* 101(3): 277, 2013.
61. BUENO, L. M.; MANOEL, J. W.; GIORDANI, C. F. A.; MENDEZ, A. S. L.; VOLPATO, N. M.; SCHAPOVAL, E. E. S.; STEPPE, M. & GARCIA, C. V. “HPLC method for simultaneous analysis of ticagrelor and its organic impurities and identification of two major photodegradation products”. *Eur. J. of Pharm. Sci.*, 97: 22, 2017.
62. WINGERT, N. R.; ELLWANGER, J. B.; BUENO, L. M.; GOBETTI, C.; GARCIA, C. V.; STEPPE, M. & SCHAPOVAL, E. E. S. “Application of Quality by Design to optimize a stability-indicating LC method for the determination of ticagrelor and its impurities”. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 118: 208, 2018.
63. AMBASANA, M. A.; KAPURIYA, N. P.; MANGTANI, K. M. & LADVA, K. D. “An improved assay method for the estimation of ticagrelor hydrochloride by reverse phase liquid chromatography”. *IJPSR*, 7(5): 2009, 2016.
64. OMAIMA, J.; SHYAMALA & SHARMA, J. V. C. “Development and validation of stability indicating UPLC method for the estimation of ticagrelor in bulk and its tablet dosage form”. *J. Drug Deliv. Ther.*, 9(1): 201, 2019.

65. KELEMEN, H.; HANCU, G. & PAPP, L. A. “Analytical methodologies for the determination of ticagrelor”. Wiley Biomedical Chromatography: Review. 2019.
66. GOBETTI, C., PEREIRA, R., MENDEZ, A. & GARCIA, C. Determination of the New Antiplatelet Agent Ticagrelor in Tablets by Stability-Indicating HPLC Method. *Curr. Pharm. Anal.* 10(4): 279, 2014.
67. YAY, H. S.; SECRÉTAN, P. H.; HENRIET, T.; BERNARD, M.; AMRANI, F.; AKROUT, W.; TILLEUL, P.; YAGOUBI, N. & DO, B. “Identification of the major degradation pathways of ticagrelor”. *J. Pharm. Biom. Anal.*, 105: 74, 2015.
68. PAIVA, J. C. “Monitoramento da degradação eletroquímica de fármacos em água usando anodos de diamante dopado com boro empregando espectroscopia uv/vis e resolução de curva multivariada”. UFV, Programa de Pós Graduação em Agroquímica, Dissertação de mestrado; Viçosa-MG, 2012.
69. PRAJAPATI, P. R.; RATHOD, D. N.; MODI, V. S. & BASURI, T. “Chemometrics and its Applications in UV Spectrophotometry”. *Int. J. Pharm. Chem. Anal.*, 3(1): 43, 2016.
70. VANDEGINSTE, B. G. M. “Chemical and mathematical resolution”. *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, 149: 118, 2015.
71. El Zahar, N. M.; Tadros, M. M. & Ayoub, B. M. “Development of advanced chemometric-assisted spectrophotometric methods for the determination of cromolyn sodium and its alkaline degradation products”. *Molecules*, 25: 5953, 2020.
72. HEMMATEENEJAD, B.; JAVIDNIA, K. & SAEIDI-BOROUJENI, M. “Spectrophotometric monitoring of nimesulide photodegradation by a combined hard–soft multivariate curve resolution-alternative least square method”. *J. Pharm. Bio. Anal.*, 47: 625, 2008.

73. JAVIDNIA, K.; HEMMATEENEJAD, B.; MIRI, R. & SAEIDI-BOROUJENI, M. “Application of a self-modeling curve resolution method for studying the photodegradation kinetics of nitrendipine and felodipine”. *J. Pharm. Bio. Anal.*, 46: 597, 2008.
74. FATHINIA, M.; KHATAEE, A.; NASERI, A. & ABER, S. “Monitoring simultaneous photocatalytic-ozonation of mixture of pharmaceuticals in the presence of immobilized TiO<sub>2</sub> nanoparticles using MCR-ALS: Identification of intermediates and multi-response optimization approach”. *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.*, 136: 1275, 2015.
75. GONÇALVES, T. R.; ROSA, L. N.; GONÇALVES, R. P.; TORQUATO, A. S.; MARÇO, P. H.; GOMES, S. T. M.; MATSUSHITA, M. & VALDERRAMA, P. “Monitoring the Oxidative Stability of Monovarietal Extra Virgin Olive Oils by UV–Vis Spectroscopy and MCR–ALS”. *Food Anal. Methods*, 11: 1936, 2018.
76. RAFI, M.; JANNAH, R.; HERYANTO, R.; KAUTSAR, A. & SEPTANINGSIH, D.A. “UV-Vis spectroscopy and chemometrics as a tool for identification and discrimination of four *Curcuma* species”. *Int. Food Res. J.*, 25(2): 643, 2018.
77. JIANG, L.; ZHENG, H. & LU, H. “Application of UV spectrometry and chemometric models for detecting olive oil-vegetable oil blends adulteration”. *J. Food Sci. Technol.*, 52(1): 479, 2015.
78. DE JUAN, A. & TAULER, R. “Resolving spectral mixtures with applications applications from Ultrafast Time-Resolved Spectroscopy to Super-Resolution Imaging - Chapter 2: Multivariate Curve Resolution-Alternating Least Squares for Spectroscopic Data”. 30: 1, 2016.
79. MARÇO, P. H.; VALDERRAMA, P; ALEXANDRINO, G. L.; POPPI, R. & TAULER, R. “Resolução multivariada de curvas com mínimos quadrados alternantes: descrição, funcionamento e aplicações”. *Quim. Nova*, 37(9): 1525, 2014.

80. VALDERRAMA, L.; PAIVA, V. B.; MARÇO, P. H. & VALDERRAMA, P. “Proposta experimental didática para o ensino de análise de componentes principais”. *Quim. Nova*, 39(2): 245, 2016.
81. FERREIRA, M. M. C. F. *Quimiometria: conceitos, métodos e aplicações*. Ed Unicamp, Campinas- SP, 2015.
82. GARRIDO, M.; RIUS F. X. & LARRECHI, M. S. “Multivariate curve resolution–alternating least squares (MCR-ALS) applied to spectroscopic data from monitoring chemical reactions processes”. *Anal. Bioanal. Chem.*, 390: 2059, 2008.
83. DE JUAN, A. & TAULER, R. “Chemometrics applied to unravel multicomponent processes and mixtures Revisiting latest trends in multivariate resolution”. *Anal. Chim. Acta.*, 500: 195, 2003.
84. ALVARENGA JR., B. R. & CARNEIRO, R. L. “Chemometrics approaches in forced degradation studies of pharmaceutical drugs”. *Molecules*, 3804: 24, 2019.