

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Faculdade de Farmácia

Disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia

IMPUREZAS FARMACÊUTICAS: ANÁLISE DO CONTEXTO NACIONAL E
INTERNACIONAL

Sarah Chagas Campanharo

Porto Alegre

2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
Faculdade de Farmácia
Disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia

IMPUREZAS FARMACÊUTICAS: ANÁLISE DO CONTEXTO NACIONAL E
INTERNACIONAL

Sarah Chagas Campanharo

Prof. Dr. Martin Steppe
Orientador

Me. Camila Ferrazza Alves Giordani
Co-orientadora

Porto Alegre
2016

AGRADECIMENTOS

Ao prof. Dr. Martin Steppe pela orientação tanto no trabalho quanto em todos os anos de iniciação científica, pela paciência, dedicação e pelo exemplo de profissional.

À Me. Camila Giordani pela orientação, pelo auxílio no trabalho e pela amizade.

À todos os meus colegas de laboratório: Mariana, Joanna, Letícia, Rafaela, Idamir, Nathalie, Natália, Lívia, Caren, Júlia, Elisa, Andressa, Fernanda, Jéssica, Sendy e Márcio pelo apoio, pelo convívio e pela amizade.

Aos professores do grupo de pesquisa do Laboratório de Controle de Qualidade Farmacêutico, Prof.^a Dr^a. Elfrides, Prof.^a Dr^a Nádia, Prof.^a Dr^a Cássia e Prof. Dr. Tércio pelo auxílio, amizade e convivência.

Aos meus pais Sidnei e Nilza, aos meus irmãos Diego e Daniel e aos meus tios Juarez e Nanci pelo apoio e incentivo durante toda a faculdade.

Aos meus amigos, em especial à Tatiane, Liliane, Lizielli, Sílvia, Paula, Eduardo e Pedro, pela companhia, convivência e por serem grandes amigos.

À banca examinadora pela disponibilidade e pelas contribuições.

RESUMO

É crescente a preocupação das agências regulatórias com a determinação de impurezas nos produtos farmacêuticos. Estas podem ser originadas por diferentes processos, como durante a síntese ou extração do princípio ativo e durante o armazenamento, sendo inevitável a sua presença em medicamentos. A qualificação e a avaliação de impurezas são imprescindíveis para garantir que a segurança e a eficácia dos medicamentos não sejam afetadas. Órgãos como o ICH, o FDA e a ANVISA definiram limites e requisitos de pureza, reforçando a necessidade de identificação e qualificação. Metodologias analíticas seletivas e sensíveis, como a cromatografia e a espectroscopia, são amplamente utilizadas na determinação de impurezas, permitindo a separação e a elucidação estrutural dessas substâncias. Após a confirmação da substância, ensaios toxicológicos devem ser realizados para verificar qualquer atividade biológica indesejada. Devido à importância da segurança e eficácia no tratamento medicamentoso, este trabalho apresenta uma revisão de aspectos relacionados às impurezas, sua determinação e avaliação. Para tanto, realizou-se uma revisão da literatura utilizando as bases de dados Scopus, ScienceDirect, Pubmed, Springer e Web of Science. É evidente o crescimento das pesquisas na área, principalmente em países como os Estados Unidos, a China e a Índia. Os estudos realizados sobre impurezas farmacêuticas são essenciais para o controle de qualidade dos produtos farmacêuticos e para a segurança do paciente em tratamento.

Palavras-chave: Impurezas farmacêuticas; determinação de impurezas; identificação de impurezas; perfil de impurezas.

ABSTRACT

There is a growing concern of regulatory agencies with the determination of impurities in pharmaceuticals. These can be caused by different processes, such as the synthesis or extraction of the active ingredient and during storage, and their presence in medicines is inevitable. The qualification and evaluation of impurities are essential to ensure that the safety and efficacy of medicinal products are not affected. Entities such as ICH, FDA and ANVISA defined limits and purity requirements, reinforcing the need for identification and qualification. Selective and sensitive analytical methods, such as chromatography and spectroscopy, are widely used in determination of impurities, allowing the separation and structural elucidation of these substances. After confirming the substance, toxicological tests should be performed to check for any unwanted biological activity. Owing to the importance of safety and efficacy of drug treatment, this work presents a review of aspects related to impurities, their determination and evaluation. For this, we carried out a literature review using Scopus, ScienceDirect, Pubmed, Web of Science and Springer databases. Clearly there is a growth of research in the area, specially in countries as United States, China and India. Studies of pharmaceutical impurities are essential for the quality control of pharmaceuticals and to patient safety in treatment.

Keywords: *Pharmaceutical impurities; determination of impurities; identification of impurities; impurity profiling.*

LISTAGEM DE TABELAS

Tabela 1: Diretrizes de qualidade para impurezas.....	24
Tabela 2: Limites de impurezas no fármaco.....	25
Tabela 3: Limites de produtos de degradação.....	26
Tabela 4: Limites para solventes da classe 1 em produtos farmacêuticos.....	27
Tabela 5: Limites para solventes da classe 2 em produtos farmacêuticos.....	28
Tabela 6: Limites para metais individuais, catalisadores e reagentes.....	33
Tabela 7: Classificação de impurezas a respeito do potencial mutagênico e carcinogênico.....	53

LISTAGEM DE FIGURAS

Figura 1: Fluxograma para desenvolvimento de método analítico.....	36
Figura 2: Total de publicações por país ou território de origem.....	45
Figura 3: Publicações por parcerias.....	46
Figura 4: Número de publicações por ano.....	47
Figura 5: Tipos de publicações.....	48
Figura 6: Número de publicações por ano e por fonte.....	49

LISTAGEM DE ABREVIATURAS

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

BP – *British Pharmacopoeia*

CG – Cromatografia Gasosa

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

DSS-GF AAS - *Direct Current Plasma Optical Emission Spectrometry*

EC – Eletroforese Capilar

ee – Excesso Enantiomérico

EM – Espectrometria de Massas

EMA – *European Medicines Agency*

FAAS - *Flame Atomic Absorption Spectrometry*

FDA – *Food and Drug Administration*

ICH – *The International Council for Harmonisation*

IV – Infravermelho

PDA – *Photodiode array*

PDE – *Permitted Daily Exposure*

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

TOF – *Time-of-flight*

TTC - *Threshold of Toxicological Concern*

UPLC – *Ultra Performance Liquid Chromatograph*

USP – *United States Pharmacopoeia*

UV – Ultravioleta

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
2. OBJETIVOS.....	15
2.1 Geral.....	15
2.2 Específicos.....	15
3. METODOLOGIA.....	16
4. REVISÃO DA LITERATURA.....	17
4.1 Fontes de impurezas farmacêuticas.....	17
4.2 Classificação de impurezas.....	21
4.3 Especificações para impurezas.....	23
4.3.1 Solventes Residuais.....	27
4.3.2 Impurezas Enantioméricas.....	30
4.3.3 Impurezas Elementares.....	31
4.3.4 Impurezas Genotóxicas e Cancerígenas.....	33
4.4 Técnicas analíticas para determinação de impurezas.....	35
4.4.1 Métodos espectroscópicos.....	36
4.4.2 Métodos de separação.....	39
4.4.3 Métodos acoplados.....	42
4.5 Indicadores e dados de pesquisas e publicações em impurezas farmacêuticas.....	43
4.6 Ensaio e testes toxicológicos para avaliação de impurezas.....	49
5. CONCLUSÕES.....	54
6. REFERÊNCIAS.....	55

1. INTRODUÇÃO

Uma impureza farmacêutica é definida como qualquer substância presente no insumo farmacêutico ou no produto acabado que não seja o insumo farmacêutico ativo e nem os excipientes, afetando a pureza do produto (ANVISA). Essas substâncias podem ser originadas durante a síntese do fármaco, durante o processo de formulação, devido a interações que ocorrem entre os componentes da fórmula e também durante o armazenamento (ROY, 2002).

A presença de impurezas, mesmo em baixas concentrações, pode levar a alterações na eficácia do tratamento, na segurança e na toxicidade dos medicamentos, representando um dos fatores decisivos na qualidade do produto e na segurança do consumidor. Durante o processo de desenvolvimento de fármacos, bem como em produtos acabados, é necessário um monitoramento para a determinação dessas substâncias (BALASUBRAHMANYAM, 2012; MISRA, 2011).

Aos poucos, os níveis admissíveis de impurezas estão sendo adicionados às farmacopéias, como na Farmacopeia Britânica (British Pharmacopoeia, BP) e na Farmacopeia dos Estados Unidos (United States Pharmacopoeia, USP). Guias, especificações e regulamentações também foram estabelecidas por agências regulatórias, como o *European Medicines Agency* (EMA), o *Food and Drug Administration* (FDA) e o *International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use* (ICH) (ROY, 2002; TEGELI, 2011). De acordo com o ICH, o perfil de impurezas é definido como “uma descrição das impurezas identificadas e não identificadas presentes em um novo fármaco”, enquanto a determinação de impurezas “são atividades de análises destinadas à detecção, identificação ou elucidação estrutural e determinação quantitativa de impurezas orgânicas e inorgânicas e solventes residuais de medicamentos” (ICH tópico Q3A).

As impurezas inorgânicas e solventes residuais são de fácil identificação, possuem efeitos fisiológicos e toxicidade conhecidos e estão presentes em quantidades limitadas. Porém, as substâncias orgânicas relacionadas têm um número quase ilimitado e estruturas variadas, cuja toxicidade não é conhecida e difícil predição. Logo, a segurança de um medicamento não depende apenas de propriedades toxicológicas e farmacológicas relacionadas ao fármaco, mas também do perfil toxicológico e efeitos adversos devido às impurezas contidas no produto. Especialmente quando o fármaco é preparado por síntese em múltiplos passos, diversos fatores influenciam a formação de impurezas, como a rota de reação, as condições da síntese, a pureza

do material de partida, armazenamento e os métodos de isolamento e purificação (GOROG, 2003; JAIN, 2013).

Representando um desafio para as indústrias, o isolamento, a caracterização de impurezas e um rigoroso controle de qualidade surgem como requisitos obrigatórios para estabelecer a segurança biológica e a eficácia dos medicamentos (MISRA, 2011; NAGPAL, 2011). Para isso, metodologias analíticas são desenvolvidas com o uso de técnicas de separação como a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), cromatografia gasosa (CG) e eletroforese capilar (EC) e técnicas espectroscópicas como a espectrometria de massas (EM), infravermelho (IV) e ressonância magnética nuclear (RMN) (GOROG, 2003). Recentes avanços nas tecnologias de separação melhoram a capacidade de separação, a reprodutibilidade do método e aceleram a velocidade das análises de amostras (OLSEN, 2006). Nos últimos anos, a avaliação do perfil de impurezas farmacêuticas, sua identificação, elucidação estrutural e determinação quantitativa constituem uma das maiores preocupações no desenvolvimento de fármacos e um dos mais importantes campos de pesquisa em análises farmacêuticas (GOROG, 2008). Tendo em vista a relevância do tema, a necessidade de atualização de dados e a reduzida quantidade de publicações em nível nacional, o presente trabalho teve como objetivo reunir informações sobre impurezas farmacêuticas, suas diferentes fontes, classificações, especificações, toxicidade e os diferentes métodos analíticos capazes de determiná-las.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Este trabalho tem como objetivo revisar e investigar as técnicas analíticas e ensaios toxicológicos utilizados na determinação de impurezas farmacêuticas.

2.2 Específicos

- Comentar sobre impurezas farmacêuticas, suas fontes e classificações.
- Apresentar as metodologias analíticas mais aplicadas para a determinação de impurezas, suas vantagens e desvantagens.
- Demonstrar a crescente importância do desenvolvimento de metodologias analíticas pela avaliação de indicadores e dados de publicações.
- Exemplificar ensaios e testes que podem ser utilizados para a avaliação toxicológica de impurezas farmacêuticas.

3. METODOLOGIA

Para o desenvolvimento desta revisão da literatura, foram pesquisadas as palavras: “*drug impurities*”, “*impurity profiling*”, “*pharmaceutical analysis*”, “*pharmaceutical impurities*”, “*drug quality control*”, “*drug analysis*” e “*impurities in active pharmaceutical ingredients*” nas bases de dados: Scopus, ScienceDirect, Pubmed, Springer e Web of Science. Artigos científicos, artigos de revisão e capítulos de livros foram selecionados por relevância, com preferência para aqueles com maior número de citações e por ano, priorizando os mais recentes. As informações foram analisadas, selecionadas e utilizadas na construção da revisão. Para o levantamento de indicadores de dados relacionados às publicações nessa área, utilizou-se a base de dados Scopus, onde foi pesquisada a palavra-chave “*drug impurities*” e a partir da análise dos resultados encontrados foram gerados os gráficos apresentados neste trabalho.

4. REVISÃO DA LITERATURA

4.1 Fontes de impurezas farmacêuticas

As impurezas farmacêuticas podem ser originadas a partir de diferentes fontes, como as matérias-primas envolvidas, as etapas da síntese do fármaco e o processo de formulação. Estas podem estar relacionadas com a estereoquímica da molécula, com os grupos funcionais, com a capacidade de cristalização, com a ocorrência de interações entre a substância ativa e os excipientes da formulação, bem como podem ser geradas devido às condições ambientes e o tempo de armazenamento (ASHU, 2012; NAGPAL, 2011; RAMA RAO, 2010). A maior fonte de impurezas é o processo de síntese, onde intermediários e subprodutos são formados nas reações e carregados com o fármaco para o produto farmacêutico. (AHUJA, 2001).

É possível prever algumas impurezas que podem estar presentes em uma substância, mas para isso deve-se primeiramente conhecer as matérias-primas utilizadas, o processo de fabricação e a estabilidade dos componentes da formulação. Distintas rotas de síntese geram diferentes intermediários, por isso estudos devem ser realizados de modo a minimizar a síntese de impurezas ou prover etapas adicionais de purificação. Contudo, as impurezas também podem surgir devido ao armazenamento inadequado e contaminação física, sendo relacionadas com a forma farmacêutica. Por exemplo, as soluções e suspensões são mais propensas à degradação devido à hidrólise e reações químicas com solventes, diferentemente de cápsulas e comprimidos, nos quais essas reações ocorrem apenas quando a água ou outro solvente foi utilizado em alguma etapa da produção. A água contribui com suas próprias impurezas e seguidamente tem a capacidade de favorecer reações de hidrólise e catálise metálicas. As substâncias que são sensíveis à luz e à oxidação podem sofrer degradação caso as condições de armazenamento e outras precauções não sejam seguidas (AHUJA, 2006; GOEL, 2007).

As matérias-primas e os intermediários são as impurezas mais comumente encontradas em produtos farmacêuticos. Apesar do contato com solventes, é possível encontrar matérias-primas que não reagiram presentes no produto final, além de impurezas contidas nas matérias-primas. Portanto, para aumentar a qualidade do produto farmacêutico, ações como a seleção, o armazenamento, o manuseio e o controle dessas substâncias devem ser realizados adequadamente (BALASUBRAHMANYAM, 2012; PRABU, 2010).

As impurezas originadas na síntese representam um problema desafiador para a química analítica, principalmente quando não são fáceis de prever, pois dificultam o desenvolvimento da metodologia. Apenas um cuidado extremo em cada etapa do processo pode evitar que essas

sejam encontradas nos medicamentos (AHUJA, 2007). Durante a síntese de uma molécula podem ser gerados intermediários, subprodutos, produtos de transformação, produtos de interação e produtos relacionados. Os intermediários são os compostos gerados em cada etapa reacional da síntese, sendo que podem não reagir completamente na etapa subsequente. Os subprodutos são substâncias não planejadas, gerados juntos com o produto final da síntese, como por exemplo na síntese do paracetamol a partir do intermediário p-aminofenol é possível a formação de paracetamol diacetilado como um subproduto (ALSANTE, 2007; AYRE, 2011). Os produtos de transformação podem ser preditos ou não, pois são originados pela transformação de um intermediário ou subproduto. Os produtos de interação são formados pela reação entre dois ou mais intermediários e podem ser gerados intencionalmente. Os produtos relacionados possuem semelhança na estrutura química com o fármaco, contudo essa semelhança não garante uma atividade biológica similar. Outras impurezas relacionadas ao processo de produção são os reagentes e catalisadores utilizados nas reações de síntese orgânica (ASHU, 2012; BALASUBRAHMANYAM, 2012; BARI, 2007; PRABU, 2010; RAMA RAO, 2010).

Os ativos farmacêuticos são moléculas complexas com diversos grupos funcionais que podem sofrer reações múltiplas, simultâneas ou em sequência. A estabilidade de moléculas orgânicas como os fármacos segue muitas regras dos mecanismos clássicos de reação da química orgânica, onde cada princípio governa uma única transformação. Deste modo, a degradação de fármacos é uma área complexa e os estudos de previsão de produtos oriundos deste processo ainda estão no início (ALSANTE, 2013). Os chamados produtos de degradação são compostos gerados durante a degradação ou decomposição, causada por fatores externos, como luz e calor e também pelo envelhecimento e armazenamento da formulação (AHUJA, 2007). Os produtos de degradação hipotéticos podem ser previstos com simulação computacional ou em pesquisas na literatura. Os produtos de degradação potenciais são observados em testes de degradação forçada e os produtos de degradação reais são formados em tempo real ou em estudos de estabilidade acelerada. A degradação forçada é uma ferramenta muito útil para a determinação do perfil de impurezas de um produto farmacêutico, provendo melhores previsões em relação às simulações computacionais (ALSANTE, 2013). Esses estudos fornecem dados que auxiliam na identificação dos degradados, na elaboração da rota de degradação e nos estudos de estabilidade intrínseca da molécula, além de possibilitar o desenvolvimento de métodos indicativos de estabilidade (JAIN, 2013). Condições de estresse como exposição à altas temperaturas, fotoirradiação, oxidação, hidrólise ácida e alcalina

fornecem quase todos os produtos de degradação, porém ainda há um número significativo de substâncias não previstas. Não há um protocolo único e eficiente para a realização dos testes, visto que a degradação depende da susceptibilidade do fármaco, todavia algumas condições iniciais são aceitas e geralmente testadas, como a hidrólise ácida e alcalina (ALSANTE, 2013; MAGGIO, 2014). Frequentemente os produtos de degradação resultam de reações entre o insumo farmacêutico ativo com impurezas reativas de excipientes usados na formulação, sendo que muitas envolvem hidrólise, oxidação ou outras reações específicas. Mesmo em traços, as impurezas reativas em excipientes também influenciam na segurança e na eficácia do medicamento, principalmente quando um fármaco é muito potente e usado em baixa dose, aumentando a razão excipiente/fármaco (WU, 2011). Algumas das impurezas reativas mais comuns são aldeídos e açúcares redutores, peróxidos, nitratos, nitritos, metais e solventes, que podem ser introduzidas durante o processo de produção de excipientes ou geradas durante o armazenamento ou uso (ALSANTE, 2013; BLESSY, 2013).

Tendo em vista que a maioria dos fármacos possui centros quirais, e geralmente um dos isômeros é o real responsável pela atividade, enquanto que sua antípoda é uma impureza quiral, a estereoquímica da molécula também deve ser estudada. Impurezas relacionadas com a estereoquímica apresentam estrutura química similar ao ativo farmacêutico, porém com outra orientação espacial. Uma determinada forma enantiomérica pode apresentar diferenças na eficácia farmacológica, no índice terapêutico e no perfil de reações adversas. O isômero óptico indesejado é considerado uma impureza quiral do produto farmacêutico (ROY, 2002; NAGPAL, 2011). O estereoisomerismo pode acontecer em moléculas com alguma dessas características: um ou mais centros quirais; estrutura terciária em forma de hélice, como acontece com algumas proteínas; assimetria topológica; quiralidade planar; quiralidade axial e quiralidade torcional. O número de isômeros aumenta com o número de centros quirais na molécula e todos os centros quirais devem ser identificados e a razão entre os estereoisômeros devem ser definidas. (AHUJA, 2001). Fármacos que contêm apenas um centro quiral ou mais são preferencialmente desenvolvidos como apenas um enantiômero ou isômero ao invés de racematos ou misturas de diastereoisômeros. Estudos pré-clínicos de cada enantiômero ou do racemato são realizados para que seja possível a escolha do isômero mais adequado. Devem ser determinados limites e especificações para o controle da pureza enantiomérica ou estereoquímica, de acordo com os testes toxicológicos e a experiência clínica (ARGENTINE, 2007). Um dos parâmetros que podem ser avaliados é o excesso enantiomérico (ee), que é uma medida de pureza utilizada para compostos quirais e reflete o grau em que uma amostra contém

um enantiômero em maior quantidade em relação ao outro. Assim, uma mistura racêmica tem um ee de 0% e um enantiômero puro tem um ee de 100% (IUPAC). Os métodos analíticos para a determinação dessas impurezas exigem uma metodologia modificada, que seja capaz de discriminá-las, visto que enantiômeros possuem propriedades físico-químicas idênticas (ARGENTINE, 2007; ZANITTI, 2010).

Outro fator que contribui na geração de impurezas é a cristalização, que pode causar diferentes efeitos nas propriedades de estado sólido de um produto farmacêutico. É possível que um fármaco cristalino possua mais de um polimorfo, que diferem entre si nas suas propriedades físicas, como solubilidade, forma de cristal, densidade, ponto de fusão, pressão de vapor e propriedades óticas e elétricas, além de influenciar o comportamento do fármaco no organismo. Os grupos funcionais das moléculas podem ser responsáveis pela degradação de uma entidade química ou também podem sofrer algumas reações que geram produtos de degradação. Por exemplo, fármacos que contêm um grupamento éster são susceptíveis à hidrólise, principalmente os que apresentam forma de dosagem líquida. A natureza da estrutura do cristal também pode influenciar outras propriedades como a condutividade, a dureza e a cor do cristal, a difusividade, a razão de dissolução, a entalpia de transição, a capacidade calorífica, a higroscopicidade, o calor latente ou de fusão, as propriedades de sublimação ou fusão, o diagrama de fases, as taxas de reação, o índice de refração, a tensão superficial, a viscosidade e o volume (AHUJA, 2006; NAGPAL, 2011; BALASUBRAHMANYAM, 2012).

Mais um item preponderante é a presença de solventes nos insumos e produtos farmacêuticos. A água, por ser o solvente mais encontrado em produtos farmacêuticos, muitas vezes não é considerada uma impureza, entretanto a água proveniente do ambiente pode afetar a estabilidade dos produtos, causando reações de hidrólise de grupos susceptíveis. Até mesmo em formulações não aquosas, a água pode estar presente em quantidade suficiente para levar a degradação do fármaco. Os outros solventes, chamados de impurezas orgânicas voláteis, geralmente são determinados por métodos especificados em compêndios, e sua concentração deve ser controlada seguindo as especificações das guias. Essas substâncias são indesejáveis devido a sua capacidade de modificar propriedades e características físico-químicas de alguns compostos, como a cristalinidade, que pode acabar afetando as propriedades de dissolução, o odor e a cor de produtos farmacêuticos, além de prejudicar a saúde humana (AHUJA, 2001; RAMA RAO, 2010). Em geral, as exigências de qualidade e pureza para a produção de solventes e outras matérias-primas são muito menores do que para a produção de um fármaco, por isso esses componentes podem conter desde vestígios a quantidades significativas de

impurezas, que podem reagir com outros produtos químicos utilizados e por sua vez, afetar a pureza do fármaco (AHUJA, 2006; BARI, 2007).

A garantia e o controle de qualidade de insumos farmacêuticos ativos e excipientes são questões muito importantes no âmbito das análises farmacêuticas e o objetivo é prevenir danos e prejuízos ao paciente e à terapia medicamentosa (MAGGIO, 2011).

4.2 Classificação de impurezas

A classificação das impurezas está destacada em especificações nas guias normativas, disponibilizadas por diferentes agências regulatórias como o FDA (*Food and Drug Administration*, EUA), o ICH (*The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use*) e o EMEA (*European Medicines Agency*). As impurezas podem estar presentes no fármaco, nos excipientes ou no produto acabado. De acordo com o ICH, 2006, as impurezas são classificadas nas seguintes categorias:

- impurezas orgânicas (processamento e fármaco-relacionada);
- impurezas inorgânicas (reagentes, ligantes e catalisadores);
- solventes residuais (solventes voláteis).

As impurezas orgânicas podem surgir durante o processo de síntese e/ou de armazenamento da substância e incluem matérias-primas, subprodutos, intermediários, produtos de degradação, reagentes e catalisadores. Uma avaliação científica das reações químicas envolvidas na síntese contribui para determinar o perfil de impurezas de um fármaco, visto que é possível definir as substâncias esperadas com base nas reações químicas e condições de síntese.

As impurezas inorgânicas podem resultar do processo de produção, são normalmente conhecidas e identificadas e incluem reagentes, catalisadores, metais pesados ou outros metais residuais, sais inorgânicos e outros materiais, como por exemplo, auxiliares de filtração e carvão vegetal. Podem ser detectadas e quantificadas por métodos farmacopéicos, como análises potenciométricas ou outros métodos adequados, como a espectrometria de absorção atômica com chama (*Flame Atomic Absorption Spectrometry*, FAAS) e a espectrometria de absorção atômica em forno de grafite (*Direct Current Plasma Optical Emission Spectrometry*, DSS-GF AAS).

Os solventes residuais são líquidos orgânicos ou inorgânicos utilizados como veículos para a preparação de soluções ou suspensões e geralmente possuem toxicidade conhecida,

possibilitando o uso de controles adequados. A diretriz recomenda a utilização de solventes menos tóxicos e descreve níveis considerados toxicologicamente aceitáveis para alguns solventes residuais. Os solventes não são completamente removidos e a seleção apropriada é importante para a síntese, pois determina características como a forma do cristal, a pureza e a solubilidade. Uma avaliação do possível risco para a saúde humana foi realizada para os solventes mais comumente utilizados, permitindo a classificação em quatro classes:

- Classe 1: solventes a serem evitados. São conhecidos como carcinogênicos em humanos ou fortemente suspeitos de serem carcinogênicos em humanos e perigosos para o meio ambiente.
- Classe 2: solventes a serem limitados. São carcinogênicos em animais, mas não genotóxicos. Podem causar outra toxicidade irreversível, como neurotoxicidade ou teratogenicidade e também outras toxicidades significativas, porém reversíveis.
- Classe 3: solventes com baixo potencial tóxico. Possuem baixo potencial tóxico para o homem, sem necessidade de limites de exposição. O valor de exposição diária permitido é de 50 mg ou mais.
- Classe 4: solventes que não possuem informações sobre avaliação toxicológica.

Por outro lado, a Farmacopéia dos Estados Unidos (*United States Pharmacopoeia*, USP) classifica as impurezas em três seções:

1. Impurezas orgânicas: podem surgir durante o processo de fabricação e ou de armazenamento do fármaco. Podem ser identificadas ou não identificadas, voláteis ou não voláteis, e podem incluir matérias-primas, subprodutos, intermediários, produtos de degradação, reagentes, ligantes, catalisadores e solventes residuais.
2. Impurezas inorgânicas: podem resultar do processo de fabricação, geralmente são conhecidas e identificadas e podem incluir reagentes, ligantes, catalisadores, metais pesados ou outros metais residuais, sais inorgânicos ou outros materiais como auxiliares de filtração e carvão vegetal.
3. Impurezas orgânicas voláteis: solventes residuais, definidos como produtos químicos orgânicos voláteis que são usados ou gerados na produção de fármacos ou excipientes ou na preparação do medicamento (USP 37, Residual Solvents; VENKATESAN, 2014).

A agência *Food and Drug Administration* (FDA, EUA), disponibiliza uma guia “*Guidance for Industry ANDAs: Impurities in Drug Substances*”, onde fornece informações a respeito da notificação, identificação e qualificação de impurezas produzidas por síntese química, além de orientar o estabelecimento de critérios de aceitação para impurezas em

substâncias medicamentosas. Neste guia é recomendado que nas especificações do fármaco seja incluída uma lista com as impurezas, que devem ser classificadas em impurezas orgânicas, solventes residuais ou impurezas inorgânicas, da mesma forma que o ICH orienta.

4.3 Especificações para impurezas

A necessidade de monitoramento e controle de impurezas farmacêuticas está baseada em razões éticas e econômicas bem como em questões de segurança e eficácia. O ICH uniu esforços de agências regulatórias e representantes industriais de diversos países como na União Europeia, Japão e Estados Unidos para que diferentes regiões tenham os mesmos requisitos (VENKATESAN, 2014). As impurezas são controladas principalmente no âmbito das diretrizes do ICH, FDA e EMEA e estão apresentadas na tabela 1.

Tabela 1: Principais diretrizes de qualidade para impurezas disponibilizadas pelo ICH, FDA e EMEA.

Diretriz	Agência/ano
Q3A – <i>Impurities in New Drug Substances</i> Aborda aspectos químicos e de segurança de impurezas definindo os limites para reporte, identificação e qualificação.	ICH 2006
Q3B – <i>Impurities in New Drug Products</i> Fornece aconselhamento a respeito das impurezas em produtos que contenham substâncias químicas medicamentosas novas. Trata de produtos de degradação da substância ativa ou resultantes da interação entre o fármaco e excipientes ou componentes do material de embalagem primários.	ICH 2006
Q3C – <i>Impurities: Guideline for Residual Solvents</i> Recomenda o uso de solventes menos tóxicos na produção de fármacos e define limites para solventes residuais ou impurezas orgânicas voláteis nos produtos farmacêuticos.	ICH 2011
Q3D – <i>Guideline for Elemental Impurities</i> Fornece uma política global para limitar impurezas metálicas qualitativa e quantitativamente em medicamentos e insumos.	ICH 2014
ANDAs: Impurities in Drug Substances Orienta a respeito das informações sobre a química, produção e controle na notificação, identificação e qualificação de impurezas em fármacos. Também fornece recomendações para o estabelecimento de critérios de aceitação de impurezas em substâncias medicamentosas.	FDA 2010
<i>Genotoxic and Carcinogenic Impurities in Drug Substances and Products</i> Disponibiliza recomendações em como avaliar a segurança de impurezas genotóxicas e carcinogênicas durante o desenvolvimento clínico e também fornece indicações de limites de exposição para essas impurezas.	FDA 2008
<i>Guideline on the Limits of Genotoxic Impurities</i> Descreve de forma geral como proceder com impurezas genotóxicas em novos fármacos.	EMA 2006
<i>Guideline on the Specification Limits for Residues of Metal Catalysts or Reagents</i>	EMA 2008
<i>Guideline for Residual Solvents</i>	EMA 2015

De acordo com as guias do ICH, devem ser incluídas especificações para cada impureza ou produto de degradação identificado e não identificado (abaixo do limite de identificação) e também o total de impurezas e produtos de degradação. Os limites para a notificação e o controle das impurezas são propostos com base na dose máxima diária do insumo farmacêutico ativo presente no produto. Na tabela 2 são apresentados os limites de notificação, de identificação e de qualificação. O limite de notificação é o limite máximo no qual uma impureza não precisa ser reportada; o limite de identificação é o limite máximo no qual uma impureza não necessita ser identificada estruturalmente; o limite de qualificação é o limite máximo no qual uma impureza não necessita de qualificação.

Qualquer impureza encontrada acima da quantidade do limite de notificação bem como as impurezas totais encontradas devem ser relatadas por procedimentos analíticos adequados. As impurezas totais representam a soma de todas as impurezas em concentração maior do que a especificada no limite de notificação. (ICH, *Quality guideline* Q3A, 2006).

Tabela 2: Limites de notificação, identificação e qualificação de impurezas no fármaco, conforme o ICH, 2006.

Dose máxima diária	Limite de notificação	Limite de identificação	Limite de qualificação
≤ 2g/dia	0,05%	0,10% ou 1,0 mg por dia (o que for menor)	0,15% ou 1,0 mg por dia (o que for menor)
≥ 2g/dia	0,03%	0,05%	0,05%

De acordo com os limites estabelecidos, no estudo de um fármaco que apresenta dose máxima diária igual a 100 mg, por exemplo, deve-se notificar a presença de qualquer impureza em quantidade superior a 0,05 mg, deve identificar essa substância caso a quantidade seja maior que 0,10 mg ou 1,0 mg por dia e qualificar a partir de 0,15 mg ou 1,0 mg por dia.

Outros limites de notificação, identificação e qualificação são estabelecidos para impurezas na forma de produtos de degradação, apresentados na tabela 3. Neste caso, se um fármaco que apresenta dose diária máxima de 350 mg, por exemplo, apresentar produtos de degradação em quantidade superior a 0,35 mg, estes devem ser notificados, e se superiores a 0,7 mg devem ser identificados e qualificados.

No Brasil, a Anvisa publicou em 2013 a RDC 58 que estabelece parâmetros para a verificação de produtos de degradação em medicamentos, para a notificação, identificação e qualificação desses produtos e para a elaboração do perfil de degradação. Esta resolução é válida para substâncias ativas sintéticas e semissintéticas novas, genéricas e similares, também para renovações de registro de alterações pós-registro. Os limites são os mesmos estabelecidos pelo ICH.

Tabela 3: Limites de notificação, identificação e qualificação de produtos de degradação em novos medicamentos, ICH, 2006.

Limites de notificação	
Dose máxima diária¹	Limites²
≤ 1 g	0,1%
> 1 g	0,05%
Limites de identificação	
Dose máxima diária	Limites
< 1 mg	1,0% ou 5 μ g ITD, o que for menor
1 mg – 10 mg	0,5% ou 20 μ g ITD, o que for menor
> 10 mg – 2 g	0,2% ou 2 mg ITD, o que for menor
> 2 g	0,10%
Limites de qualificação	
Dose máxima diária	Limites
< 10 mg	1,0% ou 50 μ g ITD, o que for menor
10 mg – 100 mg	0,5% ou 200 μ g ITD, o que for menor
> 100 mg – 2 g	0,2% ou 3 mg ITD, o que for menor
> 2 g	0,15%

¹ Quantidade máxima do insumo farmacêutico ativo administrado por dia.

² Os limites dos produtos de degradação são expressos como a percentagem do insumo farmacêutico ativo ou como a ingestão total diária (ITD) de um produto de degradação.

4.3.1 Solventes Residuais

As orientações da guia Q3C do ICH e a 467 da USP 37 são específicas para solventes residuais em insumos farmacêuticos e medicamentos. A recomendação prioriza o uso de solventes menos tóxicos e descreve os níveis que podem ser aceitos toxicologicamente. A tabela 4 apresenta os limites dos solventes da classe 1, que não deveriam ser utilizados para a produção de fármacos, excipientes ou medicamentos pois possuem efeitos tóxicos ou são prejudiciais ao meio ambiente. Porém, se o uso dos solventes dessa classe é inevitável na síntese de um fármaco promissor para alguma doença com poucas alternativas terapêuticas, o uso pode ser justificado e os níveis devem estar de acordo com o especificado.

Tabela 4: Limites para solventes da classe 1 em produtos farmacêuticos, conforme o ICH, 2011.

Solvente	Concentração limite (ppm)	Motivo
Benzeno	2	Carcinogênico
Tetracloroeto de carbono	4	Tóxico e perigoso para o ambiente
1,2-dicloroetano	5	Tóxico
1,1-dicloroetano	8	Tóxico
1,1,1-tricloroetano	1500	Perigoso para o ambiente

Os solventes da classe 2 são os que devem ser limitados devido à sua toxicidade intrínseca, como por exemplo a acetonitrila, hexano e metanol. Os limites para esta classe são mostrados na tabela 5.

Tabela 5: Limites de exposição diária e concentração para solventes da classe 2 em produtos farmacêuticos, conforme o ICH, 2011.

Solvente	Exposição diária permitida (mg/dia)	Concentração limite (ppm)
Acetonitrila	4,1	410
Clorobenzeno	3,6	360
Clorofórmio	0,6	60
Cumeno	0,7	70
Ciclohexano	38	3880
1,2-dicloroetano	18,7	1870
Diclorometano	6,0	600
1,2-Dimetoxietano	1,0	100
N,N-Dimetilacetamida	10,9	1090
N,N-Dimetilformamida	8,8	880
1,4-Dioxano	3,8	380
2-Etoxietanol	1,6	160
Etilenoglicol	6,2	620
Formamida	2,2	220
Hexano	2,9	290
Metanol	30,0	3000
2-Metoxietanol	0,5	50
Metilbutilcetona	0,5	50
Metilciclohexano	11,8	1180
N-Metilpirrolidona	5,3	530
Nitrometano	0,5	50
Piridina	2,0	200
Sulfolano	1,6	160
Tetrahidrofurano	7,2	720
Tetralina	1,0	100
Tolueno	8,9	890
1,1,2-Tricloroetano	0,8	80
Xileno*	21,7	2170

* o xileno geralmente é composto por 60% m-xileno, 14% p-xileno, 9% o-xileno com 17% de etilbenzeno.

Os solventes da classe 3, indicados na lista abaixo, são os que apresentam menor toxicidade e menor risco de causar danos à saúde humana. Nenhum deles é conhecido como perigoso para a saúde nos níveis em que são normalmente encontrados nos medicamentos, porém, esses dados se referem à estudos de curto prazo, sendo que muitos solventes desta classe não possuem estudos de toxicidade e carcinogenicidade à longo prazo.

Solventes da classe 3:

1. Ácido acético	14. Heptano
2. Acetona	15. Isobutil acetato
3. Anisol	16. Isopropil acetato
4. 1-Butanol	17. Metil acetato
5. 2-Butanol	18. 3-Metil-1-butanol
6. Butil acetato	19. Metiletil cetona
7. terc-Butilmetil éter	20. Metilisobutil cetona
8. Dimetilsulfóxido	21. 2-Metil-1-propanol
9. Etanol	22. Pentano
10. Etil acetato	23. 1-Pentanol
11. Etil éter	24. 1-Propanol
12. Etil formato	25. 2-Propanol
13. Ácido fórmico	26. Propil acetato

Os solventes pertencentes à classe 4 não possuem estudos toxicológicos suficientes e caso sejam encontrados níveis residuais de algum deles em produtos farmacêuticos, devem ser justificados. Esses solventes estão listados abaixo.

Solventes da classe 4:

1. 1,1-Dietoxipropano	6. Metilisopropil cetona
2. 1,1-Dimetoximetano	7. Metiltetrahidrofurano
3. 2,2-Dimetoxipropano	8. Éter de petróleo
4. Isooctano	9. Ácido tricloroacético
5. Isopropil eter	10. Ácido trifluoroacético

Na maioria das vezes os métodos utilizados para a determinação de solventes residuais são baseados em técnicas cromatográficas como a cromatografia gasosa, mas também podem ser utilizados outros métodos descritos em farmacopéias caso sejam viáveis e ainda é possível utilizar métodos alternativos, não farmacopéicos, desde que apropriados e validados (ICH, 2011).

4.3.2 Impurezas Enantioméricas

Os fármacos sintéticos muitas vezes são comercializados na forma de racematos devido à dificuldade em realizar sínteses assimétricas ou enantiosseletivas ou pela resolução incompleta dos enantiômeros do racemato. Enquanto um isômero pode apresentar o efeito terapêutico desejado, seu antípodo pode ser inativo, causar efeitos farmacológicos distintos, ou até mesmo causar efeitos adversos indesejados, como por exemplo o caso da talidomida. A atividade terapêutica sedativa da talidomida era devida ao enantiômero R-(+) e apenas depois de muitos recém-nascidos nascerem com malformações que se descobriu que o enantiômero S-(+) era teratogênico. Nas diretrizes do ICH não há nenhuma orientação a respeito das impurezas enantioméricas, mas algumas farmacopéias como a Farmacopéia Britânica, as consideram como impurezas comuns.

De acordo com o EMEA, quando um fármaco é predominantemente um enantiômero, pode ser extremamente difícil quantificar o outro enantiômero, e por isso este não é qualificado e identificado de acordo com os limites dados pelas guias do ICH. Porém, a recomendação lançada por esta agência é que as impurezas enantioméricas sejam tratadas de acordo com os princípios estabelecidos nas guias do ICH da mesma forma que as outras impurezas. Sendo assim, para fármacos quirais que são desenvolvidos como um único enantiômero, o controle do antípodo deve ser considerado, no entanto, as limitações técnicas podem dificultar a aplicação dos mesmos limites de quantificação e qualificação. Ademais, deveria conter na especificação do fármaco uma determinação enantiosseletiva, realizada por método apropriado ou combinação de métodos capazes de controlar a impureza enantiomérica. Assim, o teste de identificação de um fármaco desenvolvido como um único enantiômero também deveria permitir a distinção dos dois enantiômeros e a respectiva mistura racêmica. Deve-se, também, realizar o controle de outros enantiômeros que podem ser formados como produtos de degradação, a menos que a racemização seja insignificante durante a produção ou armazenamento do produto. Nos casos em que a racemização é insignificante, um teste aquiral pode ser suficiente, porém quando é necessário controlar a presença do enantiômero oposto,

deve ser usada uma análise quiral ou uma combinação de um teste aquiral e um método validado para controlar a presença do outro enantiômero (EMEA, 2006).

4.3.3 Impurezas Elementares

As impurezas elementares podem surgir de resíduos de reações de catálises que são comumente utilizadas em síntese, também podem surgir a partir de interações com os materiais que entram em contato com os excipientes ou com o produto, podem ser incluídas através da água e do sistema de fechamento de containers. Algumas medidas podem ser tomadas para diminuir o risco de contaminação por essas impurezas, como por exemplo, basear-se em requisitos farmacopéicos de pureza da água e durante todo o processo seguir as boas práticas.

Para avaliar a segurança de impurezas elementares é calculado o valor de exposição diária permitida para cada impureza (*Permitted Daily Exposure – PDE*). Os valores de PDEs são estabelecidos para vias de administração oral, parenteral e inalatória, e para determinar esses valores alguns fatores são considerados na avaliação de risco, como o estado de oxidação suscetível do elemento, a exposição humana e dados de segurança, estudos animais mais relevantes e a via de administração. A avaliação de risco geralmente é realizada a partir da identificação de fontes conhecidas e potenciais de cada impureza elementar, pela determinação do nível de uma impureza elementar presente em particular e pela identificação da necessidade de controles adicionais. Ferramentas que auxiliam na avaliação de riscos estão descritas nas guias Q8 e Q9 do ICH.

Os elementos são divididos em três classes de acordo com a sua toxicidade e a probabilidade de ocorrência no medicamento, conforme a guia Q3D do ICH, 2014:

- Classe 1: Elementos tóxicos para humanos que são limitados ou não usados em produtos farmacêuticos: As, Cd, Hg e Pb. Esses elementos requerem uma avaliação de risco.
- Classe 2: Elementos considerados como tóxicos para os humanos dependendo da via de administração. São divididos em subclasses 2A e 2B.

2A: Co, Ni e V. Possuem relativamente alta probabilidade de ocorrerem em medicamentos e exigem avaliação de risco em todas as fontes potenciais de impurezas elementares e vias de administração.

2B: Ag, Au, Ir, Os, Pd, Pt, Rh, Ru, Se e Tl. São elementos que possuem uma probabilidade reduzida de serem encontrados em produtos farmacêuticos devido a sua baixa abundância e baixo potencial de serem co-isolados com outros componentes.

Podem ser excluídos da avaliação de risco a menos que sejam intencionalmente adicionados durante a produção do fármaco, dos excipientes ou durante a formulação.

- Classe 3: Apresentam relativa baixa toxicidade por administração oral (alto limite de exposição diária, geralmente maior que 500 µg/dia) e não é necessário realizar uma avaliação de risco para via, a não ser que sejam adicionados propositalmente. Porém pode ser necessário considerar uma avaliação de risco por inalação e administração parenteral, a menos que o limite de exposição diária específico permitido pela via seja acima de 500 µg/dia. Caso não sejam adicionados intencionalmente em formas farmacêuticas de administração oral, é dispensável realizar uma avaliação de riscos. Os elementos são: Ba, Cr, Cu, Li, Mo, Sb e Sn.
- Outros elementos: Algumas impurezas elementares não possuem PDE definido e caso estejam presentes no medicamento devem seguir outros guias ou regulamentações regionais.

Em alguns casos podem ser aceitos níveis mais altos do que os estabelecidos no PDE, como por exemplo em situações em que há um longo intervalo entre doses, doses intermitentes e indicações específicas para doenças raras (ICH, Q3D, 2014).

Na guia sobre limites de especificação para resíduos de metal, catalisadores ou metais reagentes publicada pelo EMEA, os metais são divididos em três classes:

- Classe 1: metais com problemas significantes de segurança. Incluem os metais conhecidos ou suspeitos de causar câncer em humanos ou outro tipo de toxicidade.
- Classe 2: metais com poucos problemas de segurança. Incluem metais com baixo potencial tóxico para humanos, geralmente bem tolerados em casos de exposição por produtos farmacêuticos. Alguns podem estar presentes em forma de traços, pois são requeridos nutricionalmente e também são encontrados em alimentos e suplementos.
- Classe 3: metais com mínimos problemas de segurança. Incluem metais com toxicidade insignificante e com perfil de segurança bem estabelecido. Geralmente são bem tolerados em níveis maiores do que aqueles encontrados em medicamentos.

Na tabela 6 são apresentadas as PDEs aceitas e as concentrações limites para quatorze metais residuais por via oral, parenteral e/ou inalatória. Nesta tabela os metais da classe 1 estão divididos em classe 1A (platinóides, metais individuais), 1B (platinóides, total de metais lisados) e 1C (metais individuais com problemas significantes de segurança).

Tabela 6: Limites para metais individuais, catalisadores e reagentes de acordo com as vias de exposição, conforme o EMEA, 2008.

Classificação	Exposição oral		Exposição Parenteral		Exposição Inalatória
	PDE (µg/dia)	Concentração (ppm)	PDE (µg/dia)	Concentração (ppm)	PDE (µg/dia)
Classe 1A: Pt, Pd	100	10	10	1	Pt: 70*
Classe 1B: Ir, Rh, Ru, Os	100**	10**	10**	1**	-
Classe 1C: Mo, Ni, Cr, V	250	25	25	2.5	Ni: 100 Cr (VI): 10
Classe 2: Cu, Mn	2500	250	250	25	-
Classe 3: Fe, Zn	13000	1300	1300	130	-

* Pt como ácido hexacloroplatínico.

** Limite de subclasse: a quantidade total de metais listados não deve exceder o limite indicado.

Métodos apropriados, validados e específicos devem ser usados na determinação de cada metal residual em suas variadas formas, visto que os metais podem estar em formas diferentes do que a forma original utilizada como catalisador ou reagente. Procedimentos harmonizados para a determinação de metais residuais estão descritos nas farmacopeias e podem ser usados. Se estiverem presentes apenas metais da classe 2 ou da classe 3, podem ser utilizados métodos não específicos (EMEA, 2008).

4.3.4 Impurezas Genotóxicas e Cancerígenas

As impurezas genotóxicas e cancerígenas são substâncias capazes de induzir mutações genéticas, como quebras de cromossomos e rearranjos, que podem levar ao câncer. Consequentemente, seria inadequado utilizar os mesmos limites definidos para as demais impurezas, visto que exposições de baixos níveis a impurezas genotóxicas ou cancerígenas são preocupantes e podem causar danos significativos (FDA, 2008). De acordo com o EMEA,

compostos genotóxicos danificam o DNA em qualquer nível de exposição, podendo contribuir para o desenvolvimento do câncer. Sendo assim, para substâncias genotóxicas e carcinogênicas não existe um limiar descrito, pois qualquer nível de exposição apresenta um risco. Além disso, muitos compostos não apresentam uma relação linear entre a exposição e os efeitos, pois a maioria dos mecanismos de proteção consegue ser efetivo em baixas doses. Porém, é preciso definir um nível de exposição com risco aceitável para essas substâncias, e para determinar esses níveis deve-se levar em consideração os mecanismos de ação e a relação dose-resposta. As impurezas com potencial genotóxico podem ser identificadas a partir do uso de dados disponíveis sobre genotoxicidade e também pelo estudo de sua estrutura química, sendo possível verificar a presença de “alertas estruturais” que estão relacionados à genotoxicidade. Caso a estrutura da substância apresente um alerta estrutural, devem ser realizados testes de genotoxicidade adicionais. De acordo com o guia intitulado “*Guideline on the limits of genotoxic impurities*”, publicado pelo EMEA em 2006, os compostos genotóxicos são classificados em duas classes:

- Classe 1: Compostos genotóxicos com evidência experimental suficiente para um mecanismo limiar.

Esta classe inclui compostos que causam interações com o fuso de divisão celular, inibição da topoisomerase e inibição da síntese de DNA, sobrecarga de mecanismos de defesa, sobrecarga metabólica e perturbações fisiológicas, demonstradas como não-lineares. Os níveis de exposição aceitáveis são estabelecidos a partir de procedimentos para o cálculo da PDE.

- Classe 2: Compostos genotóxicos sem evidência experimental suficiente para um mecanismo limiar.

A aceitabilidade de impurezas genotóxicas para as quais não há um mecanismo limiar identificado deve incluir avaliações farmacêuticas e toxicológicas, controlando os níveis para que fiquem o mais baixo o possível nos casos que não se pode evitar a presença. As avaliações farmacêuticas estão relacionadas com a estratégia e a tecnologia de formulação, processos químicos, perfil da substância ativa e de todas as substâncias químicas envolvidas, inclusive reagentes e intermediários. Caso exista alguma alternativa para não deixar resíduos potencialmente genotóxicos ou carcinógenos no produto final, esta deve ser utilizada, como por exemplo rotas de síntese alternativas, diferentes matérias-primas ou diferentes formulações. Se a presença da impureza for inevitável, devem ser realizados esforços técnicos como purificações com o intuito de reduzir a concentração desses resíduos no produto final. A detecção e/ou a quantificação deve ser realizada por métodos analíticos.

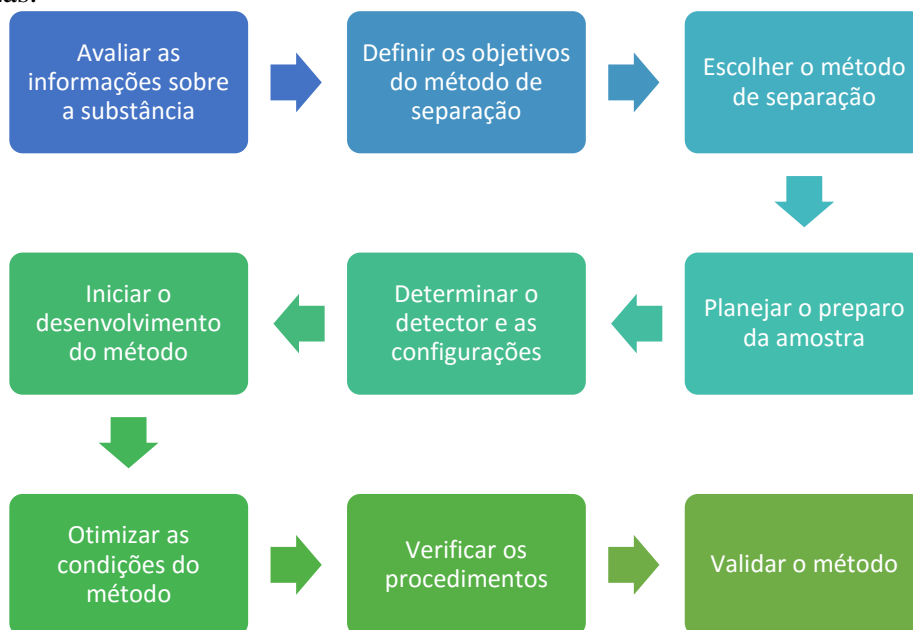
Um limite de risco toxicológico (*threshold of toxicological concern*, TTC) foi definido, com valor estimado em 1,5 µg/pessoa/dia, estabelecido através de análises de diversos compostos carcinogênicos e suas potências. Esse valor representa que não há risco de carcinogenicidade significativo ou outros efeitos tóxicos (MUNRO, 1999; KROES e KOZIANOWSKI, 2002). Esse nível de exposição diária, para a maioria dos carcinógenos, daria origem a menos de um em um milhão risco de câncer. No entanto, alguns grupos estruturais possuem maior potência e, portanto, um risco carcinogênico significativamente maior, mesmo em quantidades menores que o TTC, sendo excluídos desta abordagem (EMEA, 2006).

4.4 Técnicas analíticas para determinação de impurezas

A presença de impurezas em insumos e produtos farmacêuticos deve ser avaliada quali e quantitativamente e esse rigoroso controle de qualidade é muito importante no desenvolvimento de medicamentos, pois cada novo fármaco traz a necessidade de desenvolver novos métodos analíticos (ARGENTINE, 2007). Geralmente, impurezas orgânicas são analisadas a partir de técnicas cromatográficas devido a capacidade de alta resolução e a possibilidade de utilizar diferentes detectores que permitam a determinação precisa dessas substâncias. Como a maioria dos fármacos utilizados têm características polares e não-voláteis, a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em fase reversa é a técnica mais empregada para monitorar o fármaco e suas impurezas (FAUSTINO, 2007; LUNN, 2007; NG, 2007).

No início do desenvolvimento de um novo método analítico para determinar impurezas pode-se utilizar as condições de um método já existente para o princípio ativo e a partir desses parâmetros realizar a otimização (VAN GYSEGHEM, 2002). É importante compilar todos os dados possíveis sobre a substância que será analisada, pois a partir de suas características será desenvolvido o novo método analítico. A figura 1 apresenta um esquema com os passos para o desenvolvimento de um método analítico para determinação de impurezas e produtos de degradação.

Figura 1: Passos para o desenvolvimento de um método analítico para determinação de impurezas.



As impurezas genotóxicas geralmente estão presentes em quantidade traços nos fármacos ou medicamentos, podendo ser menores do que 0,01 – 0,03%. Um método analítico para determinar essas impurezas deve ter um limite de detecção de 1 – 5 ppm (0,0001 – 0,0005%), e requer não apenas alta sensibilidade analítica como também instrumentos seletivos. A determinação de impurezas genotóxicas é um desafio analítico visto que abordagens comuns como CLAE com detecção no ultravioleta (UV) e cromatografia gasosa (CG) com detector de ionização de chama (*flame-ionization detector*, FID) às vezes não são efetivas para níveis tão baixos de impurezas, assim pode ser necessário utilizar métodos acoplados com o espectrômetro de massas. A escolha do método de detecção é crucial para garantir que todos os componentes sejam detectados (D.HO, 2014; MATVEEVA, 2015).

4.4.1 Métodos espectroscópicos

A detecção de impurezas e produtos de degradação é o princípio da determinação do perfil de impurezas de um fármaco ou medicamento. Técnicas como ultravioleta, infravermelho (IV), espectrometria de massas (EM) e ressonância magnética nuclear (RMN) são as mais utilizadas para a caracterização de impurezas (BARI, 2007; GOROG, 2003).

Ultravioleta

No desenvolvimento de métodos apropriados para separar produtos de degradação ou outras impurezas do princípio ativo, é comum o emprego de detectores ultravioleta devido à sua conveniência e grande aplicabilidade. Esse tipo de detector quando usado em um único comprimento de onda provê uma seletividade mínima, porém, quando o equipamento possui um arranjo de fotodiodos (PDA, *photodiode array*), é capaz de monitorar vários comprimentos de onda simultaneamente. É possível fornecer uma indicação da pureza dos picos obtidos no cromatograma e também o espectro UV de cada substância, contribuindo com informações estruturais dos componentes. A principal desvantagem é que nem todas as moléculas possuem capacidade de absorção no UV, gerando sinais inadequados para análise. Além disso, no caso da determinação de impurezas, esta técnica apresenta baixa sensibilidade (AHUJA, 2007; GOROG, 2000; SIDDIQUI, 2013). Apesar das desvantagens, a espectrometria no UV ainda é bastante aplicada no campo de pesquisa de impurezas, produtos de degradação e controle qualidade, como no trabalho de Sowjanya e colaboradores, 2013, no qual um método indicativo de estabilidade para metoclopramida foi desenvolvido em UPLC (*Ultra Performance Liquid Chromatography*) com detecção no UV. Outro trabalho publicado em 2009, de Devi e Chandrasekhar, um método indicativo de estabilidade utilizando detector UV para os produtos de degradação do levofloxacino foi desenvolvido. Um outro exemplo é o trabalho de Nalwade e colaboradores, em 2012, no qual um método indicativo de estabilidade para determinação das impurezas no esomeprazol em comprimidos gastrorresistentes foi desenvolvido e validado utilizando a espectrometria no UV.

Infravermelho

A espectroscopia de infravermelho fornece informações sobre os grupos funcionais presentes na molécula. É importante na elucidação estrutural, complementando outras análises e também pode ser usada para quantificação, porém possui um baixo nível de detecção, o que é um problema frequentemente (AHUJA, 2007). Uma das grandes vantagens da espectroscopia de infravermelho é que é possível analisar líquidos, soluções, pastas, pós, filmes, fibras e gases, com técnicas de amostragem adequadas (STUART, 2005). Em 2003, Laniewski e colaboradores desenvolveram técnicas analíticas complementares para identificação de

impurezas desconhecidas em análises farmacêuticas, utilizando cromatografia gasosa, espectrometria de massas, emissão atômica e espectroscopia no infravermelho.

Ressonância Magnética Nuclear

A ressonância magnética nuclear é uma técnica que pode ser utilizada para uma variedade de aplicações, como no controle de qualidade de medicamentos, na identificação de fármacos, excipientes e impurezas, fornecendo informações estruturais e moleculares completas, incluindo conectividade de átomos, geometria espacial, conformação e estereoquímica. Como a assinatura espectral de cada composto é única, este método é altamente específico e adequado para elucidação e confirmação estrutural. As informações são fornecidas sem a necessidade do uso de padrões, e além disso é possível obter dados qualitativos de misturas complexas, sem separação prévia, que representam grandes vantagens principalmente durante o início do desenvolvimento do fármaco e quando não há a disponibilidade de padrões de impurezas (IGBAL, 2011; MAGGIO, 2014). A técnica por RMN representa um método não invasivo e não destrutivo, no qual a amostra é facilmente preparada e pode ser utilizada em seguida para outra análise, sendo que também é possível analisar amostras semissólidas e sólidas. Por ser não-seletivo, todos os compostos de baixo peso molecular de uma mistura são detectados simultaneamente em uma única análise e a intensidade de um sinal é diretamente proporcional ao número de núcleos correspondente. Contudo, para a quantificação absoluta é necessário um padrão de concentração conhecida que será o sinal de referência para a calibração, já que depois a concentração do analito é calculada pela comparação com as integrais do padrão e os números de núcleos que contribuíram para as respectivas ressonâncias (MALET-MARTINO, 2011). Apesar de ser um método robusto e reprodutível, uma mesma fonte pode produzir diferentes tamanhos sob diferentes condições, como o tamanho do tubo, o volume da amostra e sua composição. Como alternativas em métodos com objetivo quantitativo, pode-se utilizar um padrão externo ou adição de padrão. O padrão interno tem alguns requisitos como: ser solúvel no mesmo solvente aplicado ao analito, não interagir quimicamente com a amostra, possuir relaxamento longitudinal próximo ou menor do que o do analito, possuir peso molecular similar aos analitos e estar disponível em forma pura, quimicamente inerte, não higroscópico, não volátil, estável por longo período e possuir conteúdo definido. A RMN quantitativa é linear por uma longa faixa de concentração e parece ser mais robusta do que métodos de separação acoplados a detectores UV, fluorescência, entre outros. Porém é considerada um método menos sensível em relação a outras técnicas analíticas,

e também requer maior quantidade de amostra, na ordem de 10 mg, enquanto que a espectrometria de massas requer menos que 1 mg. Outra desvantagem é o alto custo e longo tempo de análise. (HOLZGRABE, 2010; VENKATESAN, 2014). O excesso enantiomérico pode ser determinado por vários métodos e um deles é a ressonância magnética nuclear em estado sólido, como proposto por Tadeusiak e colaboradores em 2008.

Espectrometria de Massas

A espectrometria de massas é um método estruturalmente sensível pois fornece a potencial massa molecular e submete íons específicos à fragmentação por colisão, indicando a massa de outras estruturas, resultantes da fragmentação. No entanto, há um risco ao utilizar o espectro de massas, por isso a inferência da estrutura não pode ser realizada apenas com esta técnica, é necessário complementá-la. O detector não é um detector universal, visto que classes inteiras de compostos não causam sinais adequados, como algumas moléculas aromáticas pequenas. A amplitude dos sinais gerados é diretamente proporcional a quantidade da substância analisada em um grande intervalo, possibilitando o uso quantitativo. Apesar de ser uma técnica destrutiva, uma pequena quantidade de amostra é suficiente para a análise. É possível detectar até centenas de analitos simultaneamente, em diversos tipos de matrizes, como soro, plasma, urina e saliva, em alta resolução (ALSANTE, 2001; DOMON, 2006; ZHANG, 2015). Vários trabalhos aplicam a espectrometria de massas tanto na elucidação estrutural como para a determinação de impurezas que não possuem grupos cromóforos para absorção no UV. A EM também é utilizada para a determinação de impurezas inorgânicas, como no caso da pesquisa de Rao e Talluri, 2007. A técnica EM-CLAE é bastante utilizada para isolamento e caracterização, como no trabalho de Kumar e colaboradores, para impurezas relacionadas ao processo da vildagliptina, publicado em 2016.

4.4.2 Métodos de separação

Os objetivos do desenvolvimento de um método de separação devem estar bem definidos para que se escolha o método mais adequado ao seu propósito. Os métodos de separação são úteis para análises quali e quantitativas e também para o isolamento de um composto purificado. Se o objetivo for uma análise quantitativa, deve-se avaliar fatores como o nível de precisão e exatidão necessário, o intervalo de concentração dos componentes e o tempo de análise desejado. Caso o propósito do método seja o isolamento de um composto

purificado, técnicas como a cromatografia gasosa e a eletroforese capilar podem ser difíceis de aplicar. A amostra também influencia na escolha da técnica de separação, bem como no modo de detecção, nos procedimentos de extração ou derivatização (se necessários), e as condições da separação, que dependendo do tipo do método podem danificar ou comprometer a amostra. O conhecimento de algumas propriedades físicas e químicas da amostra pode auxiliar no desenvolvimento do método, como: propriedades físico-químicas, número de componentes da mistura, estrutura química, grupos funcionais presentes, peso molecular, solubilidade, volatilidade, estabilidade frente à altas temperaturas, absorção no UV, atividade eletroquímica, etc. (OKAFO, 2003; ROBERTS, 2003).

Cromatografia Gasosa

Vários métodos para solventes residuais ou impurezas orgânicas voláteis estão descritos nas farmacopéias e na maioria das vezes são determinados por cromatografia gasosa (CG). A CG, no formato capilar, é uma técnica mais rápida e com resolução mais elevada do que a CL, porém a CG possui uma limitação na aplicação de compostos, que devem ser voláteis e termicamente estáveis. São necessárias precauções para que componentes não voláteis da amostra sejam impedidos de entrar no sistema. O uso da técnica de amostragem *headspace* na cromatografia gasosa pode ajudar a resolver este problema, já que esta abordagem minimiza a quantidade de componentes não-voláteis da matriz que podem ser introduzidas no sistema, pois amostra apenas os componentes gasosos. Diminuindo o efeito da matriz, é possível diminuir a interferência de fundo e aumentar a sensibilidade do método. (D.HO, 2014; HOLM, 2015; RASMUSSEN, 2001). A CG também tem desempenhado um papel importante na investigação de compostos quirais, pois possui uma excelente capacidade de separação de isômeros, sendo útil para a determinação do excesso enantiomérico (ZHANG, 1998). Ho e colaboradores desenvolveram um método capaz de determinar traços de impurezas genotóxicas usando CG com amostragem *headspace*, em 2014 (HO, 2014).

Cromatografia líquida de alta eficiência

A cromatografia líquida de alta eficiência é a técnica mais utilizada para analisar compostos farmacêuticos pois estes não precisam ser voláteis ou derivatizados, como no caso da cromatografia gasosa, e assim evita-se que a substância seja exposta à altas temperaturas e uma possível degradação. A especificidade da CLAE é excelente e a precisão e a exatidão são

atingidas se testes de adequabilidade do sistema forem realizados. As aplicações desta técnica são muito eficazes pela possibilidade de utilizar uma variedade de detectores como fluorescência, espectrometria de massas, eletrométrica, etc. (AHUJA, 2003). Avanços tecnológicos foram necessários em parte pela necessidade de separar cada vez mais variedades de substâncias, obter maiores vazões sem perder a resolução entre picos, aumentar a eficiência, melhorar a forma e a simetria dos picos e o principal desafio que é detectar e quantificar baixos níveis de impurezas (OKAFO, 2003; ROBERTS, 2003). Esses avanços contribuem para a melhoria da especificidade, da sensibilidade e da robustez dos métodos analíticos no âmbito de impurezas, entre eles:

- Desenvolvimento contínuo de novas tecnologias e novos materiais de colunas, na química, design e dimensões;
- Novos equipamentos, como o cromatógrafo líquido de ultra performance;
- Novas abordagens cromatográficas, como a interação hidrofílica (HILIC) para impurezas mais polares;
- Diferentes técnicas de preparo de amostras;
- Uso de técnicas acopladas, como CLAE-EM/EM;
- Aperfeiçoamento de sistemas de detecção, como o espectrômetro de massas. (HOLM, 2015)

A CLAE pode ser utilizada de vários modos, cada um com as características necessárias para separar compostos diferentes. A CLAE em fase reversa é uma das mais utilizadas pois muitos fármacos são bases orgânicas fracas e a separação é bastante influenciada por fatores como o pH da fase móvel e a força iônica. Neste modo, a fase estacionária é mais apolar do que a fase móvel e a coluna geralmente é composta por sílica modificada por derivatização com alquil (C2 à C18), fenil, ciano e grupamentos amino. A fase aquosa normalmente é uma mistura de soluções aquosas ou tampões miscíveis com solventes orgânicos como metanol e acetonitrila. A fase estacionária pode influenciar em parâmetros como pratos teóricos, características de retenção e resolução, críticos para o desenvolvimento de métodos reprodutíveis e robustos (SNYDER, 1997).

A CLAE é largamente utilizada para o controle de qualidade de formulações farmacêuticas e fármacos, que precisam de métodos indicativos de estabilidade. Este campo teve uma propagação enorme e rápida que nenhum outro método teve na história das análises farmacêuticas (GOROG, 2007). Por exemplo, em 2010, um método indicativo de estabilidade

foi desenvolvido em fase reversa por Srinivasu e colaboradores para acetazolamida na presença de seus produtos de degradação e de suas impurezas relacionadas ao processo. Em 2004, para determinar traços de impurezas do fármaco acetaminofeno, Kamberi e colaboradores desenvolveram e validaram um método sensível por CLAE.

Eletroforese Capilar

A eletroforese capilar (EC) é uma técnica relativamente nova, mas importante na análise de compostos farmacêuticos, biopolímeros e íons inorgânicos. A EC é geralmente mais eficiente, visto que uma análise pode ser realizada em poucos minutos. A amostra é injetada em quantidades muito pequenas, geralmente com o uso de soluções aquosas, evitando o uso de solventes orgânicos. Diferentes modos podem ser utilizados, como a eletroforese capilar de zona e micelar, aplicadas à testes de pureza e também em bioanálises de fármacos (SIDDIQUI, 2013). A EC é efetiva em situações em que há pouca quantidade de amostra disponível e quando alta resolução é um fator crucial. No entanto, a reprodutibilidade é relativamente menor do que a dos outros métodos, o que torna difícil a aplicação desta técnica, além da baixa sensibilidade, o que prejudica o uso para determinação de impurezas (AHUJA, 2001). Aproximadamente 40% dos fármacos é utilizado na forma de mistura racêmica. O desenvolvimento de métodos para a separação quiral e determinação de impurezas quirais é um campo em que a EC é considerada excelente, devido a sua alta eficiência, rápida estabilização do sistema, uso de seletores quirais apropriados e possibilidade de utilizar métodos diretos e indiretos. (DEEB, 2008; ORLANDINI, 2015). Definitivamente o detector mais utilizado em EC é o UV, mas outros detectores sensíveis como a fluorescência, EM, Raman, amperometria, condutividade, radioquímico e RMN são utilizados, embora menos comumente (OKAFO, 2003; ROBERTS, 2003). Recentemente, um método foi desenvolvido por Orlandini e colaboradores para determinação de impurezas enantioméricas de levosulpiride (ORLANDINI, 2015).

4.4.3 Métodos acoplados

Diversos métodos analíticos são utilizados para detectar impurezas e cada um possui sensibilidade e capacidades distintas, porém para conseguir aumentar a sensibilidade dos métodos para 1 – 5 ppm ou menor, o ideal é utilizar a espectrometria de massas acoplado a outro método analítico (MATVEEVA, 2015).

A primeira técnica acoplada a ser utilizada foi a CG-EM, muito útil para analitos voláteis e com estabilidade térmica, como compostos orgânicos voláteis e solventes residuais (SINGH, 2012). Esse método fornece informações sobre a pureza e pistas para identificação dos componentes de uma mistura, sendo utilizado em conjunto com outras técnicas para a caracterização e elucidação estrutural de impurezas, como a RMN (DING, 2008; VALERO, 2003). Ainda assim, é uma técnica menos utilizada para caracterização de impurezas relevantes. Algaza e colaboradores propuseram uma estratégia através da derivatização *in situ* das amostras para análise em CG-EM-headspace, para a determinação de agentes genotóxicos residuais em ingredientes farmacêuticos ativos (ALGAZA, 2007). Quando usada com a EM em *tandem* (EM/EM), a impureza isolada por CG é investigada com alta resolução e detalhes são fornecidos para melhor compreensão do íon molecular e das estruturas resultantes da fragmentação (PAN, 2011; HOLM, 2015).

Devido à elevada sensibilidade e seletividade da CLAE acoplada com espectrometria de massas (CLAE-EM), esta técnica se tornou predominante nos bioensaios, estudos farmacocinéticos e metabólicos, assim como na elucidação de estruturas de impurezas e produtos de degradação (GOROG, 2007; ZHANG, 2015). Thomas e colaboradores realizaram a identificação e a elucidação estrutural de uma impureza desconhecida do fármaco carbamazepina por CLAE-EM, em 2011. A CLAE-EM e suas variantes apresentam o mais rápido e maior avanço para um conjunto de instrumentos disponíveis, como: CLAE-EM (*single Quad*), CLAE-EM-EM (*triple quad*), CLAE-TOF, CLAE-EM-TOF (Q-TOF), CLAE-FTICR (*Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance*), que são usados em combinação para promover os dados necessários da caracterização estrutural. A tecnologia do tempo-de-voô (TOF, *time-of-flight*) trouxe uma considerável melhoria na resolução e precisão dos espectrômetros de massas, devido à capacidade de fornecer a massa exata com 4 a 6 casas decimais, colaborando na determinação de composições elementares exatas (SINGH,2012).

4.5 Indicadores e dados de pesquisas e publicações em impurezas farmacêuticas

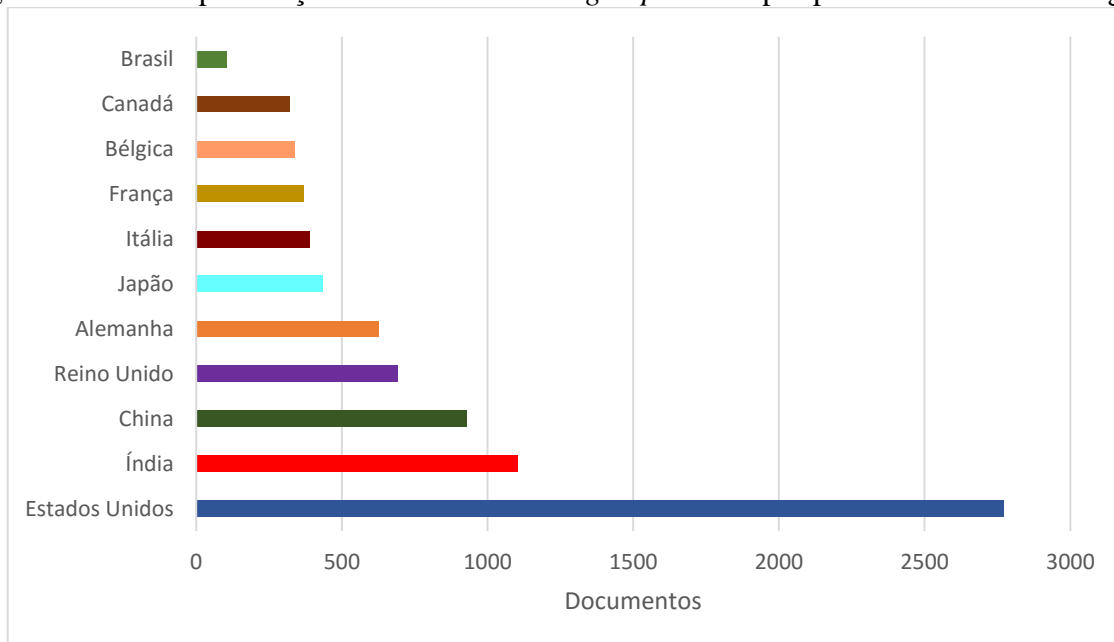
No começo dos anos 2000, a preocupação com a preparação, a produção, a validade e a estabilidade de medicamentos e insumos farmacêuticos levaram à construção de guias normativas para o desenvolvimento de estudos de estabilidade. O ICH publicou a diretriz Q1A, que fornece recomendações nos protocolos de testes de estabilidade, como temperatura, umidade e tempo de duração, conforme a zona climática de realização dos testes. A ANVISA igualmente anunciou um guia para a realização de estudos de estabilidade, a resolução 506 de

2002, que distingue os estudos de estabilidade acelerada e de longa duração e especifica os procedimentos que devem ser seguidos. Na sequência, guias sobre validação de metodologias analíticas foram divulgadas para discutir as características que devem ser consideradas durante a validação e apresentar recomendações para que o procedimento analítico possa demonstrar que sua adequação à finalidade pretendida. Em 2006, o ICH publicou as guias Q3A e Q3B, destinadas a orientar a qualificação de impurezas em novos fármacos e em novos medicamentos, além de incluir aspectos químicos como a classificação e a identificação de impurezas e aspectos de segurança. Em 2010, o FDA desenvolveu um guia para a indústria “*ANDAs: Impurities in Drug Products*”, que contém informações a respeito da notificação, identificação e qualificação de impurezas que são classificadas como produtos de degradação, bem como orientações para o estabelecimento de critérios de aceitação para esses produtos. Enquanto isso, no Brasil, a ANVISA, através do informe técnico em 2008, especificou as condições para os estudos de degradação forçada e os limites dos produtos de degradação. Contudo, apenas em 2013 a agência publicou a resolução 58, que trata dos parâmetros para notificação, identificação e qualificação de produtos de degradação. Em 2015 foi lançada uma guia com procedimentos e especificações com o objetivo de auxiliar na obtenção do perfil de degradação em medicamentos. Em fevereiro deste ano foi liberada uma consulta pública para uma proposta de resolução que dispõe sobre a validação de métodos analíticos de ensaios biológicos, microbiológicos, imunológicos, de identificação, quantitativos para a determinação de impurezas, ensaios limite para o controle de impurezas, ensaios quantitativos para a determinação de insumos farmacêuticos em amostras de matérias-primas ou de medicamentos em todas as suas fases de produção e além disso, outras providências. Devido ao recente início da participação do Brasil em assuntos relacionados às impurezas, existem poucas contribuições e pesquisas na área, que foram realizadas seguindo as orientações e recomendações internacionais.

Com o auxílio da base de dados Scopus, foi possível realizar um levantamento sobre publicações com o termo “*drug impurities*” e analisar, de diferentes formas, os mais de 10.000 resultados encontrados. Uma das formas é indicada na figura 2, que relaciona o número de documentos publicados por país, comparando os dez países que possuem o maior número de publicações e o Brasil. Os Estados Unidos possuem o maior número de publicações e de pesquisas nessa área, somando 2773 publicações com o termo “*drug impurities*”, seguido pela Índia (1102 publicações), China (927), Reino Unido (690), Alemanha (625), Japão (435), Itália (391), França (370), Bélgica (337) e Canadá (320). Como mencionado anteriormente, o Brasil

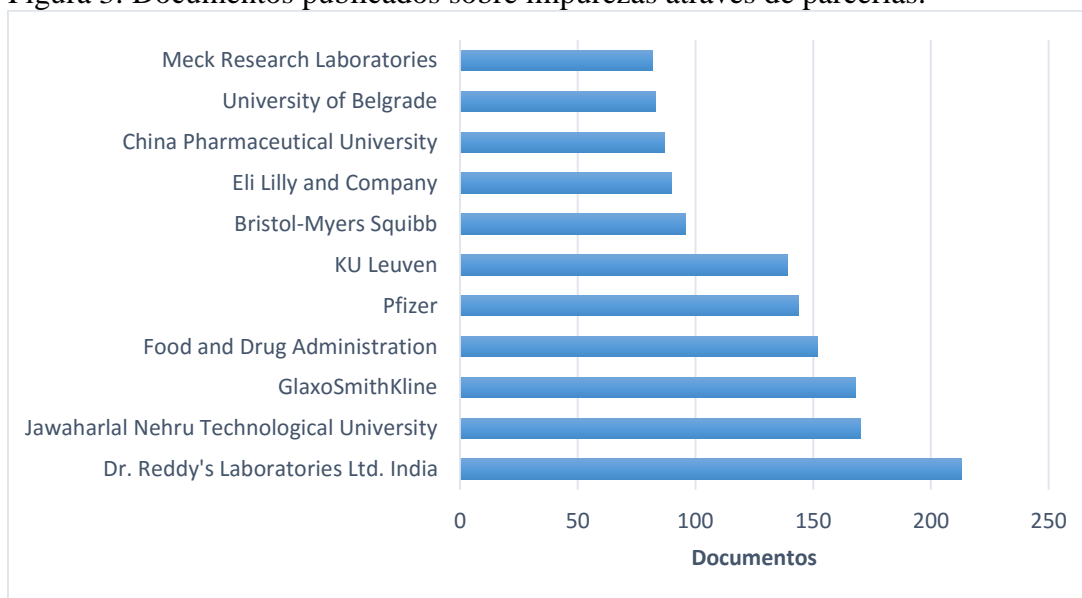
ainda carece de estudos nesse contexto, visto que possui apenas 105 publicações encontradas com esse termo.

Figura 2: Total de publicações com o termo “*drug impurities*” por país ou território de origem.



O papel predominante dos Estados Unidos em relação aos outros países pode ser devido ao investimento realizado em pesquisas, universidades e em indústrias farmacêuticas. Entre as quinze maiores empresas farmacêuticas do mundo, ranking publicado pela revista Forbes Brasil em 2015, oito pertencem aos Estados Unidos: Johnson & Johnson (primeiro lugar), Pfizer (segundo lugar), Merck & Company (quarto lugar), Amgen (nono lugar), McKesson (décimo lugar), Gilead Sciences (décimo primeiro lugar), Abbott Laboratories (décimo quarto lugar) e em décimo quinto lugar, Eli Lilly & Company. Aliada à tecnologia na produção e desenvolvimento de fármacos existente nos Estados Unidos, quinze universidades de farmácia e farmacologia estão entre as cinquenta melhores do mundo, entre elas Harvard University (primeiro lugar), University of North Carolina (décimo lugar), Yale University (décimo primeiro lugar) e University of Califórnia, San Diego (décimo terceiro lugar), de acordo com o QS World University Rankings by Subject 2016 – Pharmacy & Pharmacology. Muitas pesquisas também são realizadas através de parcerias entre empresas farmacêuticas, universidades e laboratórios, como indicado na figura 3.

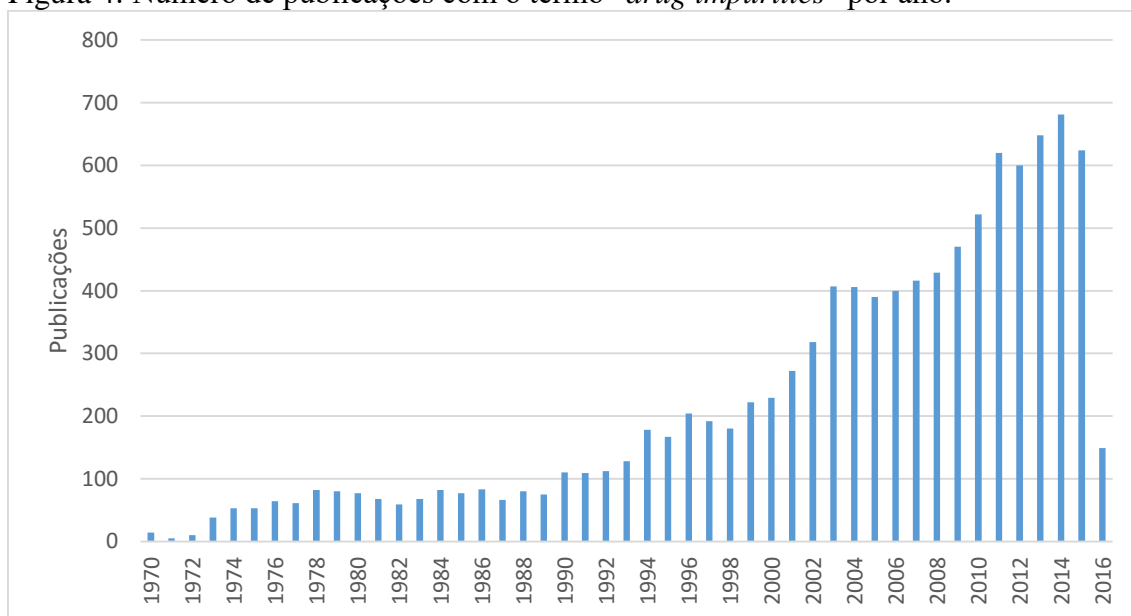
Figura 3: Documentos publicados sobre impurezas através de parcerias.



Neste gráfico são apresentadas as parcerias com maiores números de documentos publicados ao longo dos anos. Dr. Reddy's Laboratories Ltd, na Índia, já contribuiu em 213 publicações, a Universidade Tecnológica de Jawaharlal Nehru, também na Índia, conta com 170 publicações, e a multinacional britânica GlaxoSmithKline com 168. Em seguida a americana Pfizer (144 publicações), a Universidade Católica Leuven, na Bélgica (139), a companhia americana Bristol-Myers Squibb (96), Eli Lilly and Company (90), Universidade Farmacêutica da China (87), Universidade de Belgrado, na Sérvia (83) e Laboratórios Merck (82). As parcerias são úteis no compartilhamento de conhecimentos e de tecnologias, onde cada instituição colabora com sua especialidade, qualificando a produção e melhorando o atendimento dos produtos farmacêuticos.

Na figura 4 são apontados os números de publicações encontradas com o termo “*drug impurities*” por ano, iniciando no ano de 1970 com 14 trabalhos publicados. Os anos que apresentaram os maiores números de publicações foram 2014 (681), 2013 (648), 2015 (624), 2011 (620) e 2012 (600 publicações). Existe ainda um aumento nas publicações a partir do ano 2002, quando diretrizes sobre produtos de degradação surgiram para auxiliar esses estudos e outro aumento a partir do ano de 2008, quando as guias do ICH sobre impurezas já estavam disponíveis com a finalidade de orientar os estudos de identificação e qualificação de impurezas farmacêuticas.

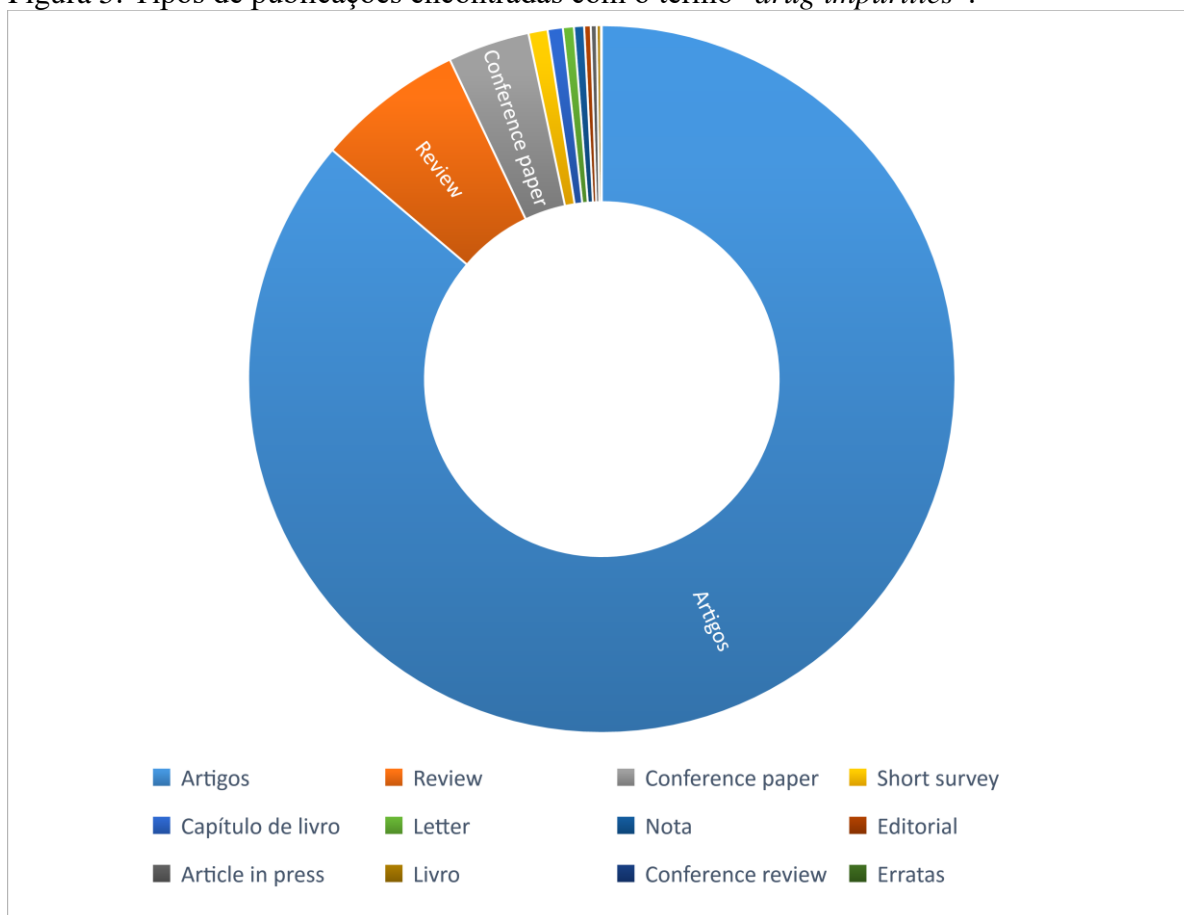
Figura 4: Número de publicações com o termo “*drug impurities*” por ano.



O crescente número de pesquisas nesta área é provavelmente devido aos esforços das agências regulatórias em incorporar limites para a notificação, identificação e qualificação de impurezas, evidenciando a influência que estas podem apresentar na segurança e na eficácia do tratamento farmacológico. Portanto, nas últimas décadas foi dada uma maior atenção para a qualidade dos produtos farmacêuticos, através de estudos, desenvolvimento de metodologias analíticas e da realização de rigorosas análises de controle de qualidade. Hoje em dia o conhecimento das impurezas presentes em insumos farmacêuticos e medicamentos é um requisito obrigatório, pois ao determinar o perfil de impurezas pode-se obter dados cruciais sobre a toxicidade e a segurança do produto.

Os tipos de publicações encontradas a partir da pesquisa realizada na base de dados Scopus incluem artigos originais, artigos de revisão, *conference paper*, *short survey*, capítulos de livro, *letter*, notas, editoriais, *article in press*, livros, *conference review* e erratas. No total de 10378 publicações, 86,20% são em formato de artigo, correspondendo a 8946 artigos publicados. Em seguida, artigos de revisão representam 6,7% (698 publicações), *Conference paper* somando 3,70% (388 publicações), *short survey* representam 0,9% (91 publicações), capítulos de livros somam 0,7% (72 publicações), as categorias *letter* e notas representam 0,5% cada (52 e 48 publicações, respectivamente), editorial e *article in press* representam 0,3% cada (31 e 28 publicações, respectivamente), livros que representam 0,2% (20 publicações) e *conference review* e erratas (2 publicações cada). Esses dados são indicados no gráfico da figura 5.

Figura 5: Tipos de publicações encontradas com o termo “drug impurities”.

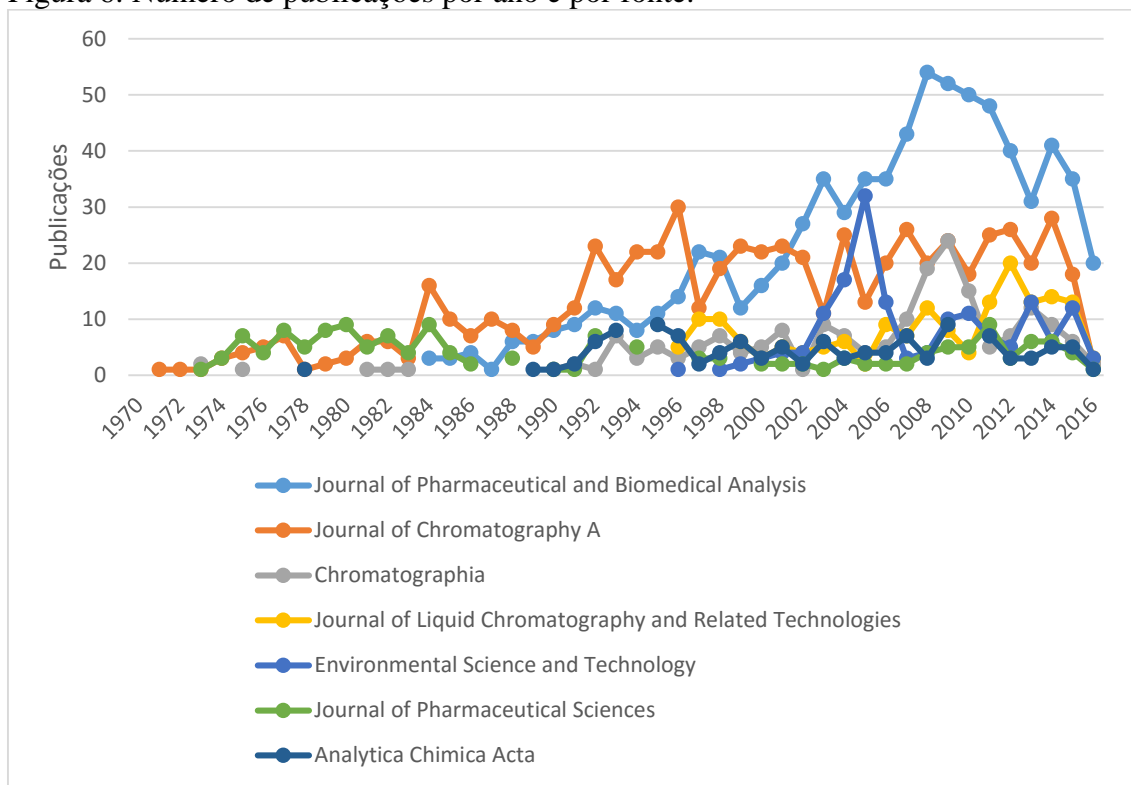


As pesquisas científicas visam gerar o avanço da ciência, com o objetivo de encontrar respostas para um determinado problema ou hipótese, através da utilização de uma metodologia adequada. A importância de um determinado tema pode ser demonstrada pelo aumento das publicações científicas nessa área. Os artigos são a principal forma de comunicar os resultados de uma pesquisa, por isso devem ser originais, instrutivos, sucintos e apresentar relevância. Os principais objetivos de uma revista além da divulgação dos resultados obtidos pelos pesquisadores, estão relacionados com o impacto que as publicações vão causar.

Foram avaliadas as publicações de sete periódicos com o maior número de publicações a partir dos anos 70 que apresentam o termo “drug impurities”. O gráfico pode ser observado na figura 6. No total, o *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* possui 762 publicações com o termo, enquanto que o *Journal of Chromatography A* conta com 630, o periódico *Chromatographia* com 192, o *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies* com 172, o periódico *Environmental Science and Technology* com 162, o *Journal of Pharmaceutical Sciences* conta com 161 e por fim, o periódico *Analytica Chimica Acta* possui 117 documentos publicados. Nota-se que os primeiros documentos na área surgiram nos

anos 70 e houve um grande aumento a partir dos anos 90, antes das guias regulatórias serem publicadas. A partir de 2003 as pesquisas aumentaram novamente, sendo que foi o período em que as guias começaram a ser disponibilizadas.

Figura 6: Número de publicações por ano e por fonte.



Apesar da grande relevância do assunto para a segurança e a eficácia dos tratamentos medicamentosos, ainda há campo para expandir e aprofundar o conhecimento em impurezas farmacêuticas. Contudo, com as resoluções e guias disponíveis e com os esforços de agências em harmonizar e enfatizar a importância dessas recomendações, pode-se perceber um aumento da preocupação e do interesse de empresas e pesquisadores com o tema.

4.6 Ensaios e testes toxicológicos para avaliação de impurezas

A qualificação é o processo de obtenção e avaliação de dados para estabelecer a segurança biológica de uma impureza ou de um perfil de impurezas. Uma impureza que foi testada adequadamente em testes de segurança ou ensaios clínicos é considerada qualificada, assim como as impurezas que são também metabólitos do fármaco. (*Quality guideline Q3A*, ICH). Alguns programas podem ser utilizados na previsão de toxicidade de uma impureza ou

de um perfil de impurezas. Esses programas são baseados nas relações estrutura-atividade, mas os resultados geralmente não são considerados conclusivos para fins de qualificação (BASAK, 2007).

As impurezas genotóxicas representam um risco pois são capazes de causar mutações genéticas que podem levar ao câncer. Caso a impureza apresente uma estrutura química com grupos funcionais que caracterizam uma substância genotóxica, deve-se avaliar a segurança biológica.

De acordo com a ANVISA, para estudos de genotoxicidade há duas opções de baterias de testes a serem realizados para detectar o potencial das substâncias de causar mutações gênicas e alterações cromossômicas.

- Opção 1: deve ser realizado um teste para mutação gênica em bactérias; um teste citogenético para avaliação de dano cromossômico ou um teste *in vitro* de mutação gênica em células tk de linfoma de camundongo; e um teste *in vivo* para genotoxicidade, geralmente um teste de dano cromossômico em células hematopoiéticas de roedores.
- Opção 2: deve ser realizado um teste para mutação genica em bactérias; uma avaliação de genotoxicidade *in vivo* em dois tecidos, geralmente um teste de micronúcleo em células hematopoiéticas de roedores e um segundo ensaio *in vivo*.

A ANVISA lista algumas recomendações para a realização dos testes, a fim de padronizar os experimentos e facilitar a comparação, que são abordadas abaixo:

- Para a realização de testes de mutação gênica em bactérias, é recomendado o uso de certas linhagens de *Salmonella*.
- Ensaio *in vitro* devem ser realizados sempre em duas condições: na presença e na ausência de uma ativação metabólica.
- Em teste de micronúcleos *in vivo* recomenda-se a utilização de roedores de apenas um sexo, preferência machos, isso se não houver dados que indiquem a discrepância de toxicidade entre os sexos.
- Realizar testes em via de administração similar às preconizadas para uso humano, quando aplicável.
- A dosagem máxima recomendada para bactérias para o teste de AMES é de 5mg/placa, caso não houverem outras limitações. Em células de mamíferos, as concentrações

máximas são de 1,0 mM ou 0,5 mg/mL, o que for menor, caso não houverem outras limitações.

- Em testes *in vivo*, os protocolos variam conforme a duração do teste.

Nos testes são avaliados os potenciais danos ao DNA que podem ser observados como mutações gênicas e alterações cromossômicas, que podem estar relacionadas ao desenvolvimento de câncer. Os testes que apresentam resultados positivos representam compostos potencialmente mutagênicos e carcinogênicos para humanos. O teste de AMES é um teste *in vitro* para identificar substâncias capazes de induzir mutações gênicas, realizado em bactérias, que é recomendado pela ANVISA. Caso o teste de AMES apresente um resultado positivo, a impureza é genotóxica e seu limite deve ser reduzido para um valor menor que o TTC, que é de 1,5 µg/dia, ou então devem ser realizados testes *in vivo*. Se o AMES for negativo, a impureza não é genotóxica.

As impurezas carcinogênicas podem causar o desenvolvimento de tumores como consequência da exposição. No documento intitulado “Guia para condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos” da ANVISA, redigido de acordo com a guia M7 do ICH (ICH, 2014) é recomendado que se realize um estudo de longo prazo em roedor e um estudo de curto e médio prazo em roedores *in vivo* ou modelos de carcinogenicidade usando transgênicos ou roedores neonatais ou um estudo a longo prazo de carcinogenicidade em uma segunda espécie de roedores.

Para a seleção do modelo animal, deve-se considerar a farmacologia, a toxicidade em doses repetidas, o metabolismo, a toxicocinética e a via de administração para que as espécies selecionadas sejam adequadas. Os testes devem ser realizados pela mesma via de administração quando possível e para a escolha da dosagem deve-se considerar a toxicidade, a farmacocinética, a comparação da área sob a curva em animais e humanos, a saturação da absorção, a farmacodinâmica, a dose máxima possível, a dose limite, a dose terapêutica humana e a resposta farmacodinâmica em humanos. Os estudos de longo prazo têm duração de 24 meses em ratos e no mínimo 18 meses em camundongos e hamsters.

Os animais devem ser avaliados para morbidade ou mortalidade e acompanhamento do desenvolvimento de tumores. Devem ser submetidos à necropsia completa e detalhada e os tecidos devem ser preservados, como todas as lesões macroscópicas, glândula adrenal, aorta, cérebro e seções, entre outros. Se os testes *in vivo* de carcinogênese forem positivos, a impureza

é carcinogênica e seu limite deverá ser reduzido para um valor menor que o TTC, que é 1,5 µg/dia para cada impureza e 1,5 µg/dia no total de impurezas caso estas tenham estrutura relacionada.

De acordo com o documento “Guideline on the limits of genotoxic impurities” publicado pelo EMEA, na maioria dos casos de avaliação toxicológica de impurezas genotóxicas são utilizados dados de estudos *in vitro* com a impureza, como o teste de AMES e o teste de aberração cromossômica, visto que estão mais disponíveis e assim são estabelecidos para determinar os níveis de ingestão aceitáveis. O limite de concentração em ppm de impurezas genotóxicas em fármacos pode ser calculado com base no TTC e na dose diária esperada. Porém, os dados de testes de carcinogenicidade e genotoxicidade negativos em níveis baixos não são suficientes para definir os limites aceitáveis para uma impureza, pois têm pouca sensibilidade.

Na guia “*Assessment and control of DNA reactive (mutagenic) impurities in pharmaceutical to limit potential carcinogenic risk guidance for industry*”, do FDA, também baseado na guia M7 do ICH, é dito que a avaliação de risco envolve análises e pesquisas sobre carcinogenicidade e mutagenicidade em bactérias para classificar as impurezas nas classes 1, 2 ou 5, de acordo com a tabela 7.

Tabela 7: Classificação de impurezas a respeito do potencial mutagênico e carcinogênico e ações de controle resultantes (ICH, 2015).

Classe	Definição	Ação de controle
1	Agentes mutagênicos cancerígenos conhecidos.	Controle no limite aceitável específico ou abaixo
2	Agentes mutagênicos com potencial carcinogênico desconhecido (positivo para mutagenicidade em bactérias, sem dados de carcinogenicidade em roedores).	Controle no limite aceitável ou abaixo (TTC apropriado)
3	Presença de alerta estrutural, não relacionado com a estrutura da substância medicamentosa ativa, sem dados de mutagenicidade.	Controle no limite aceitável (TTC apropriado) ou abaixo ou conduzir testes de mutagenicidade em bactérias. Se não mutagênico = classe 5 Se mutagênico = classe 2
4	Presença de alerta estrutural, mesmo alerta da substância medicamentosa ativa ou em compostos relacionados à ela (por exemplo, intermediários do processo) que foram testados e são não mutagênicos.	Tratar como impureza não mutagênica.
5	Sem alerta estrutural ou alerta estrutural com dados suficientes para demonstrar falta de mutagenicidade ou carcinogenicidade.	Tratar como impureza não mutagênica.

Se não houver dados disponíveis, deve-se primeiramente realizar uma avaliação da relação estrutura-atividade que possa predizer mutagenicidade ou carcinogenicidade e depois proceder aos testes *in vitro* e *in vivo*.

Quando uma impureza é caracterizada em uma das classes 1, 2 ou 3, é importante desenvolver uma estratégia de controle que assegure que o nível dessa impureza no fármaco ou no produto farmacêutico está abaixo do limite aceitável. É necessário um conhecimento da química da molécula associado ao processo de fabricação do produto e conhecer a estabilidade do fármaco e do produto para desenvolver os controles apropriados.

5. CONCLUSÕES

Há um interesse crescente nas impurezas presentes em substâncias e produtos farmacêuticos evidenciado pelo empenho de várias agências regulatórias em definir limites e especificações e nos estudos científicos publicados. Determinar o perfil de impurezas inclui identificação, elucidação estrutural e determinação quantitativa de impurezas e produtos de degradação em insumos e formulações farmacêuticas. O estudo do perfil de impurezas é fundamental para definir o potencial tóxico de substâncias que podem ser prejudiciais à saúde, além de diminuir a segurança e a eficácia da terapia medicamentosa.

As impurezas devem ser identificadas, determinadas e controladas por métodos seletivos, sendo que há uma variedade de técnicas cromatográficas e espectroscópicas disponíveis que podem ser utilizadas isoladamente ou em combinação.

É evidente o crescimento das pesquisas e publicações sobre impurezas farmacêuticas, principalmente no cenário internacional. O Brasil tem aumentado sua atenção a respeito do tema, visto que está atualizando suas normativas de acordo com as guias e regulamentações internacionais sobre o desenvolvimento desses estudos e novas resoluções estão sendo redigidas para auxiliar as pesquisas nesse campo.

6. REFERÊNCIAS

AHUJA, S. Assuring quality of drugs by monitoring impurities. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 59, p. 3-11, 2007.

AHUJA, S.; ALSANTE, K.M. Handbook of isolation and characterization of impurities in pharmaceutical, v. 5. Separation Science and Technology, San Diego: Academic Press, 2003. 431 p.

AHUJA, S.; SCYPINSKI, S. *Handbook of modern pharmaceutical analysis*, v. 3, San Diego: Academic Press. 587 p.

ALGAZA, R.; RYAN, R.W.; WORTH, K.T.; LIPCZYNSKI, A.M.; SZUCS, R. Szucs. A generic approach for the determination of residues of alkylating agents in active pharmaceutical ingredients by in situ derivatization-headspace gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, n. 45, p. 472-479, 2007.

ALSANTE, K. M.; ANDO, A.; BROWN, R.; ENSING, J.; HATAJIK, T. D.; KONG, W.; TSUDA, Y. The role of degradant profiling in active pharmaceutical ingredients and drug products. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 59, n. 1, p. 29-37, 2007.

ALSANTE, K.; HUYNH-BA, K.C.; BAERTSCHI, S.W.; REED, R.A.; LANDIS, M.S.; FURNESS, S.; OLSEN, B.; MOWERY, M.; RUSSO, K.; ISER, R.; STEPHENSON, G.A.; JANSEN, P. Recent trend in product development and regulatory issues on impurities in active pharmaceutical ingredient (API) and drug products. Part 2: safety considerations of impurities in pharmaceutical products and surveying the impurity landscape. *AAPS PharmSciTech*, v. 15, n. 1, p. 237-251, 2014.

ALSANTE, K.M.; HUYNH-BA, K.; BAERTSCHI, S.W.; REED, R.A.; LANDIS, M.S.; KLEINMAN, M.H.; FOTI, C.; RAO, V.M.; MEERS, P.; ABEND, A.; REYNOLDS, D.W.; JOSHI, B.K. Recent trend in product development and regulatory issues on impurities in active pharmaceutical ingredient (API) and drug products. Part 1: Predicting degradation related impurities and impurity considerations for pharmaceutical dosage forms. *AAPS PharmSciTech*, v. 15, n. 1, p. 198-212, 2014.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Gerência de Avaliação de Segurança e Eficácia – GESEF. Guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos, v. 2, 2013.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia para obtenção do perfil de degradação, identificação e qualificação de produtos de degradação em medicamentos, n. 4, v. 1, 2015.

ARGENTINE, M. D.; OWENS, P.; OLSEN, B. Strategies for the investigation and control of process-related impurities in drug substances. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 59, p. 12-28, 2007.

ASHU, S.; SALONI, K.; NARASIMHAN, B. Sources of impurities: a review. *International Journal of Pharmacy*, v. 3, n. 1, p. 57-59, 2012.

AYRE, A.; VARPE, D.; NAYAK, R.; VASA, N. Impurity profiling of pharmaceutical. *Advance Research in Pharmaceuticals and Biologicals*, v. 1, n. 2, p. 76-90, 2011.

BAERTSCHI, S.W. Analytical methodologies for discovering and profiling degradation-related impurities. *Trends in Analytical Chemistry*, v. 25, n.8, p. 758-767, 2006.

BAJAJ, S.; SINGLA, D.; SAKHUJA, N. Stability Testing of Pharmaceutical Products. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, v. 02, n. 03, p.129-138, 2012.

BAKSHI, M.; SINGH, S. Development of validated stability-indicating assay methods. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 28, p. 1011-1040, 2002.

BALASUBRAHMANYAM, E.; BHALME, M.; KUMAR, S.; RAO, S.; REDDY, K.; WADEKAR, K. Evaluating impurities in drugs: Part I of Part III. *Pharmaceutical Technology*, v. 36.2, p. 46, 2012.

BARI, S.B.; KADAM, R.B.; JAISWAL, S.Y.; SHIRKHEDKAR, A.A. Impurity profile: significance in active pharmaceutical ingredient. *Eurasian Journal of Analytical Chemistry*, v. 2, n. 1, p. 32-53, 2007.

BARTOS, D.; GOROG, S. Recent advances in the impurity profiling of drugs. *Current Pharmaceutical Analysis*, v. 4, p. 215-130, 2008.

BASAK, A.K.; RAW, A.S.; AL HAKIM, A.H.; FURNESS, S.; SAMAN, N.I.; GILL, D.S.; PATEL, H.B.; POWRS, R.F.; YU, L. Pharmaceutical impurities: regulatory perspective for abbreviated new drug applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 59, p. 64-72, 2007.

BLESSY, M.; PATEL, R.D.; PRAJAPATI, P.N.; AGRAWAL, K.Y. Development of forced degradation and stability indicating studies of drugs – a review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, n. 4, v. 3, p. 159-165, 2014.

BRASIL. Resolução da diretoria colegiada n. 58, de 20 de dezembro de 2013. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária estabelece parâmetros para a notificação, identificação e qualificação de produtos de degradação em medicamentos com substâncias ativas sintéticas e semissintéticas, classificados como novos, genéricos e similares e dá outras providências. p. 1-5, 2013.

CHANDRASEKHAR, S. Basis of the 'duplication' strategy for enhancing the enantiomeric excess in chiral resolutions: proof of the equivalence of rate and product ratios. *Research on Chemical Intermediates*, v. 31, n. 9, p. 779-783, 2005.

CHANKVETADZE, B. Enantioseparations by using capillary electrophoretic techniques, the story of 20 and a few more years. *Journal of Chromatography A*, v. 1168, p. 45-70, 2007.

DEEB, S.E.; HASEMANN, P.; WATZIG, H. Strategies in method development to quantify enantiomeric impurities using CE. *Electrophoresis*, v. 29, p. 3552-3562, 2008.

DEVI, L. M.; CHANDRASEKHAR, K.B. A validated stability-indicating RP-HPLC method for levofloxacin in the presence of degradation products, its process related impurities and identification of oxidative degradant. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 50, p. 710-717, 2009.

EL DEEBL, S.; HASEMANN, P.; HERMANN, W. Strategies in method development to quantify enantiomeric impurities using CE. *Electrophoresis*, v. 29, p. 3552–3562, 2008.

EMA, European Medicines Agency. Committee for medicinal products for human use (CHMP). Guideline on the specification limits for residues of metal catalysts or metal reagents, 2008.

EMA, European Medicines Agency. Committee for medicinal products for human use (CHMP). Guideline on the limits of genotoxic impurities, 2006.

GOROG, S.; BABJAK, M.; BALOGH, G.; CSEHI, A.; DRAVEEZ, F.; GAZDAG, M.; HORVÁTH, P.; LAUKÓ, A.; VARGA, K. Drug impurity profiling strategies. *Talanta*, v. 44, p. 1517 – 1526, 1997.

GOROG, S. Drug safety, drug quality, drug analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 48, p. 247-253, 2001.

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

GOROG, S. The importance and the challenges of impurity profiling in modern pharmaceutical analysis. *Trends in Analytical Chemistry*, v. 25, n. 8, p. 755- 757, 2006.

GOROG, S. The changing face of pharmaceutical analysis. *Trends in Analytical Chemistry*, v. 26, n. 1, p. 12-17, 2007.

HO, T.D.; YEHL, P.M.; CHETWYN, N.P.; WANG, J.; ANDERSON, J.L.; ZHONG, Q. Determination of trace level genotoxic impurities in small molecule drug Substances using conventional headspace gas chromatography with contemporary ionic liquid diluents and electron capture detection. *Journal of Chromatography A*, v. 1361, p. 217-228, 2014.

HOLM, R.; ELDER, D.P. Analytical advances in pharmaceutical impurity profiling. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2015.

HOLZGRABE, U. Quantitative NMR spectroscopy in pharmaceutical applications. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, n. 57, p. 229–240, 2010.

HUANG, J.; DALI, M. Evaluation of integrated Raman-DSC technology in early pharmaceutical development: characterization of polymorphic systems. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 86, p. 92-99, 2013.

IGBAL, M.Y.; RAO, K.M.V.; SRIDHAR, G.; RAJU, P.; DESH-PANDE, G.R.; BABU, J.M. Characterization and relative response factor determination of process related impurity in naproxen by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, n. 56, p. 484–490, 2011.

IUPAC, International Union of Pure and Applied Chemistry. Compendium of Chemical Terminology, Gold Book, v. 2.3.3, 2014.

JACOBSON-KRAM, D.; MCGOVEM, T. Toxicological overview of impurities in pharmaceutical products. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 59, p. 38-42, 2007.

JAIN, D.; BASNIWAL, P.K. Review: Forced degradation and impurity profiling: Recent trends in analytical perspectives. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 86, p. 11–35, 2013.

KRAMBERI, M.; RILEY, C.M.; SHARON, X.M.; HUANG, C.W.C. A validated, sensitive HPLC method for the determination of trace impurities in acetaminophen drug substance. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, n. 34, p. 123-128, 2004.

KUMAR, N.; DEVINENI, S.R.; SINGH, G.; KADIRAPPA, A.; DUBEY, S.K.; KUMAR, P. Identification, isolation and characterization of potential process-related impurity and its degradation product in vildagliptin. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 119, p. 114-121, 2016.

L. DING, L.; WANG, X.; YANG, Z.; CHEN, Y.; The use of HPLC/MS, GC/MS, NMR, UV and IR to identify a degradation product of eperisone hydrochloride in the tablets. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, n. 46, p. 282–287, 2008.

LANIEWSKI, K.; WANNMAN, T.; HAGMAN, G. Gas chromatography with mass spectrometric, atomic emission and Fourier transform infrared spectroscopic detection as complementary analytical techniques for the identification of unknown impurities in pharmaceutical analysis. *Journal of Chromatography A*, v. 985, n. 1-2, p. 275-282, 2003.

LEE, D.C.; WEBB, M.L. *Pharmaceutical Analysis, Analytical Chemistry Series*. Blackwell Publishing, 2003. 384 p.

LEUNG, D.; OK KANG, S.; ANSLYN, E.V. Rapid determination of enantiomeric excess: a focus on optical approaches. *Chemical Society Reviews*, v. 41, p. 448-479, 2012.

LIU, D.Q.; SUN, M.; KORD, A.S. Recent advances in trace analysis of pharmaceutical genotoxic impurities. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 51, p. 999-1014, 2010.

LIU, Y.; HU, C.Q. Establishment of a knowledge base for identification of residual solvents in pharmaceuticals, *Analytica Chimica Acta*, n. 575, p. 246–254, 2006.

MAGGIO, R.; CALVO, N.; VIGNADUZZO, S.; KAUFMAN, T. Review: Pharmaceutical impurities and degradation products: Uses and applications of NMR techniques. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 101, p. 102–122, 2014.

MAHESWARANB, R. FDA perspectives: scientific considerations of forced degradation studies in ANDA submissions. *Pharmaceutical Technology*, n. 36, v. 5, p. 73–80, 2012.

MALET-MARTINO, M.; HOLZGRABE, U. NMR techniques in biomedical and pharmaceutical analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, n. 55, p. 1–15, 2011.

MATVEEVA, O.A.; KOVALEVAL, E.L. Structure of Chemical compounds, methods of analysis and process control: modern approaches to estimating the content of genotoxic impurities in drugs (a review). *Pharmaceutical Chemistry Journal*, v. 49, n. 11, 2016 (Russian Original v. 49, n. 11, November, 2015).

MCGOVEM, T; JACOBSON-KRAM, D. Regulation of genotoxic and carcinogenic impurities in drug substances and products. *Trends in Analytical Chemistry*, v. 25, n. 8, p. 790-795, 2006.

MISRA, B.; THAKUR, A.; MAHATA, P.P. Pharmaceutical impurities: a review. *International Journal of Pharmaceutical Chemistry*, v. 5, n.7, p. 232-329, 2015.

MULLER, L.; MAUTHE, R.J.; RILEY, C.M.; ANDINO, M.M.; DE ANTONIS, D.; BEELS, C.; DEGEORGE, J.; DE KNAEP, A.G.M.; ELLISON, D.; FAGERLAND, J.A.; FRANK, R.; FRITSCHER, B.; GALLOWAY, S.; HARPUR, E.; HUMFREY, C.D.N.; JACKS, A.S.; JAGOTA, N.; MACHINNON, J.; MOHAN, G.; NESS, D.K.; O'DONOVAN, M.R.; SMITH, M.D.; VUDATHALA, G.; YOTTI, L. A rationale for determining, testing and controlling specific impurities in pharmaceutical that possess potential for genotoxicity. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, v. 44, p. 198-211, 2006.

NAGPAL, S.; UPADHYAY, A.; BHARDWAJ, T.R.; THAKKAR, A. A Review on Need and Importance of Impurity Profiling. *Advanced Pharmaceutical Technology*, v. 1, n. 3, p. 302–310, 2010.

NALWADE, S.U; REDDY, V.R.; RAO, D.D., MORISETTI, N.K. A validated stability indicating ultra performance liquid chromatographic method for determination of impurities in esomeprazole magnesium gastro resistant tablets. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, n. 57, p. 109-114, 2012.

OLSEN, B.A.; CASTLE, B.C.; MYERS, D.P. Advances in HPLC technology for the determination of drug impurities. *Trends in Analytical Chemistry*, v. 25, n. 8, p. 796-805, 2006.

ORLANDINI, S.; PASQUINI, B.; DEL BUBBA, M.; PINZAUTI, S.; FURLANETTO, S. Quality by design in the chiral separation strategy for the determination of enantiomeric impurities: Development of a capillary electrophoresis method based on dual cyclodextrin systems for the analysis for levosulpiride. *Journal of Chromatography A*, v. 1380, p. 177-185, 2015.

PAN, C.; LIU, F.; JI, Q.; WANG, W.; DRINKWATER, D.; VIVILECCHIA, R. The use of LC/MS, CG/MS and LC/NMOR hyphenated techniques to identify a drug degradation product in pharmaceutical development. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 40, p. 581-590, 2006.

- PAVON, J.L.P.; DEL, M.; SANCHEZ, N.; PINTO, C.G.; LAESPADA, M.E.F.; CORDERO, B.M. Use of mass spectrometry methods as a strategy for detection and determination of residual solvents in pharmaceutical products. *Analytical Chemistry*, n. 78, p. 4901–4908, 2006.
- PAWALE, S.S.; SALEY, S.P.; MUNDHADA, D.R.; TILLOO, S.K. Impurity profile in bulk drugs and pharmaceutical preparation. *International Journal of Pharmaceutical and Chemical Sciences*, v. 1, n. 4, p. 1571 -1581, 2012.
- PILANIYA, K.; CHANDRAWANSHIL, H.K.; PILANIYA, U.; MANCHANDANI, P.; JAIN, P.; SINGH, N. Recent trends in the impurity profile of pharmaceutical. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research*, v. 1, n. 3, p. 302-310, 2010.
- PRABU, S.L.; SURIYAPRAKASH, T.N.K. Impurities and its importance in pharmacy. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, v.3, n.2, p. 66-71, 2010.
- RAMAN, N.; AZMI, S.N.H.; WU, H.; The importance of impurity analysis in pharmaceutical products: an integrated approach. *Accreditation and Quality Assurance*, v. 11, p. 69-74, 2006.
- RAMAN, V.V.S.S.; PRASAD, A.V.S.S., REDDY, K.R. Strategies for the identification, control and determination of genotoxic impurities in drug Substances: a pharmaceutical Industry perspective. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 55, p. 662-667, 2011.
- RAO, N. R.; NAGARAJU, V. An overview of the recent trends in development of HPLC methods for determination of impurities in drugs. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 33, p. 335-377, 2003.
- RAO, N.R.; KIRAN, M.S.S.; PRASANTHI, N.L. Pharmaceutical impurities: an overview. *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research*, v. 44, n. 3, p. 301-310, 2010.
- RAO, N.R.; TALLURI, K.M.V.N. An overview of recent applications of inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS) in determination of inorganic impurities in drugs and pharmaceuticals. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, n. 43, p. 1-13, 2007.
- RODRÍGUEZ, J.A.B.; DESIMONE, M.F.; IGLESIAS, S.L.; GIORGIERI, S.A.; DIAZ, L.E. Validation of a capillary electrophoresis method for the analysis of ibandronate related impurities. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 44, p. 305-308, 2007.
- ROY, J. Pharmaceutical Impurities: A Mini-Review. *International Journal of Pharmaceutical Chemistry*, v. 8, n.3, p. 1-8, 2002.
- SIDDIQUI, M.R.; ALOTHMAN, Z.A.; RAHMAN, N. Analytical techniques in pharmaceutical analysis: a review. *Arabian Journal of Chemistry*, article in press, 2013.
- SINGH, K.A.; PALLASTRELLI, M.B.; SANTORO, M.I.R.M. Direct chiral separation of third generation β -blockers through high performance liquid chromatography: a review. *Scientia Chromatographica*, v. 7, n. 1, p. 65-84, 2015.

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. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 69, p. 148– 173, 2012.

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 in Analytical Chemistry*, v. 49, p. 71-88, 2013.

SNYDER, L.R., KIRKLAND, J.J.; GLAJCH, J.L. Practical HPLC method development, 2 ed. Jon Wiley & Sons, 2012.

SOWJANYA, P.; SHANMUASUNDARAM, P.; NAIDU, P.; SINGAMSETTY, S.K. Novel validated stability-indicating UPLC method for the determination of Metoclopramide and its degradation impurities in API and pharmaceutical dosage form. *Journal of Pharmacy Research*, v. 6, p. 765-773, 2013.

SRINIVASU, P.; SUBBARAO, D.V.; VEGESNA, R.V.K.; BABU, K. S. A validated stability-indicating LC method for acetazolamide in the presence of degradation products and its process-related impurities. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 52, p. 142-148, 2010.

TADEUSIAK, E.J.; CIESIELSKI, W., OLEJNICZAK, S. Determination of enantiomeric excess of leucine by ¹³C CP-MAS solid-state NMR. *Applied Magnetic Resonance*, v. 35, p. 155-161, 2008.

TEGELI, V.S.; GAJELI, G.B.; CHOUGULE, G.K.; THORAT, Y.S., SHIVSHARAN, U.S., KUMBHAR, S.T. Significance of impurity profiling: a review. *International Journal of Drug Formulation and Research*, v. 2, n. 4, p. 174-195, 2011.

The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH). Topic Q3A: Impurities in new drug substances, p. 1-15, 2006.

The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH). Topic Q3B: Impurities in new drug products, p. 1-16, 2006.

The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH). Topic Q3C: Impurities: Guideline for residual solvents, p. 1-22, 2011.

The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH). Topic Q3D: Guideline for elemental impurities, p. 1-77, 2014.

The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH). Topic M7: Assessment and control of DNA reactive (mutagenic) impurities in pharmaceutical to limit potential carcinogenic risk, v. 4, p. 1-30, 2014.

THOMAS, S.; MATHELA, C.S.; AGARWAL, A.; KUMAR, P.S. Identification and structural elucidation of a new impurity in carbamazepine active pharmaceutical ingredient by liquid chromatography-tandem mass spectrometry and semi-preparative chromatographic isolation. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 56, n. 2, p. 423-428, 2011.

TOLKACHEVA, A.V., GRUSHEVSKAYA, L.N.; AVDYUNINA, N.I.; PYATIN, B.M.; PROKOFEVA, V.I.; GAEVAYA, L.M. Development and validation of a CG-FID method for quantitation of impurities in ketamine drug substance. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, v. 47, n. 6, p. 330-336, 2013.

U.S. Department of Health and Human Services, *Food and Drug Administration*, Center for Drug Evaluation and Research (CDER): Guidance for Industry ANDAs: Impurity in Drug Products, p. 1-10, 2010.

U.S. Department of Health and Human Services, *Food and Drug Administration*, Center for Drug Evaluation and Research (CDER): Guidance for Industry: genotoxic and carcinogenic impurities in drug substances and products: recommended approaches, p. 1-16, 2008.

UNITED States Pharmacopoeia. 37 ed. Chemical Testes, 467, residual solvents, p. 1-12, 2013.

VALERO, M; COSTA, S.M.B. Costa. Photodegradation of nabumetone in aqueous solutions. *Journal of Photochemistry Photobiology A*, n. 157, p. 93-101, 2004.

VAN GYSEGHEM, E., VAN HEMELRYCK, S., DASZYKOWSKI, M., QUESTIER, F., MASSART, D.L., VANDER, Y. Determining orthogonal chromatographic systems prior to the development of methods to characterise impurities in drug substances. *Journal of Chromatography A*, v. 988, n. 1, p. 77-93, 2003.

VENKATESAN, P.; VALLIAPPAN, K. Impurity profiling: theory and practice. *Journal of Pharmaceutical Science & Research*. v. 6, n. 7, p. 254-259, 2014.

WIRTH, D.D., OLSEN, B.A.; HALLENBECK, D.K.; LAKE, M.E.; PERRY, F.M. Screening methods for impurities in multi-sourced fluoxetine hydrochloride drug Substances and formulations. *Chromatographia*, v. 46, n. 9/10, p. 511-523, 1997.

WU, Y.; LEVONS, J.; NARANG, A.S.; RAGHAVAN, K.; RAO, M.V. Reactive impurities in excipients: profiling, identification and mitigation of drug-excipient incompatibility. *AAPS PharmSciTech Journal*, v. 12, n. 4, p. 1248-1263, 2011.

YAN, F.; LIU, J.; ZENG, X.; ZHANG, Y.; HANG, T. Stability profiling of anti-malarial drug piperazine phosphate and impurities by HPLC-UV, TOF-MS, ESI-MS and NMR. *Malaria Journal*, v. 13, n. 401, 2014.

ZANITTI, L.; FERRETTI, R.; GALLINELLA, B.; LA TORRE, F.; SANNA, M.L.; MOSCA, A.; CIRILLI, R. Direct HPLC enantioseparation of omeprazole and its chiral impurities: application on the determination of enantiomeric purity of esomeprazole magnesium trihydrate. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 52, p. 665-671, 2010.

ZAZA, S.; LUCINI, S.M.; SCIASCIA, F.; FERRONE, V.; CIFELLI, R.; CARLUCCI, G.; LOCATELLI, M. Recent advances in the separation and determination of impurities in pharmaceutical products. *Instrumentation Science & Technology*, v. 43, n. 2, p. 182-196, 2015.

ZHANG I, H.B.; ZHANG I; J.; FU, R.N., ZUO, X.B., LUI, H.E. High-resolution GC separation of alkyl lactate enantiomers and the determination of the enantiomeric excess of the optical isomers of alkyl lactates. *Chromatographia*, v.48, n. 3/4, 1998.

ZORAN M. Physico-chemical methods in drug discovery and development, IAPC Publishing, Croatia, n.p., 2012.