



# Estudo de degradação forçada e avaliação da especificidade do método analítico para determinação de teor em atenolol comprimidos

Natália Cristina Cardoso Freitas<sup>1,\*</sup>; Andréia Peraro Nascimento<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Pós Graduando em Análise Química e Controle de Qualidade, Centro Universitário de Lavras.

<sup>2</sup> Docente curso de Pós-graduação em Análise Química e Controle de Qualidade, Centro Universitário de Lavras.

## RESUMO

No presente trabalho foi realizado estudo de degradação forçada do medicamento atenolol, pertencente à classe dos betabloqueadores, para avaliação da especificidade da metodologia analítica utilizada. O medicamento foi submetido às condições de estresse: termólise, hidrólise, hidrólise ácida, hidrólise básica, oxidação, fotólise e exposição a íons metálicos. O método empregado foi o descrito na Farmacopeia Brasileira 5<sup>ed</sup> para determinação do teor em comprimidos de atenolol. Este método consiste na aplicação da cromatografia líquida de alta eficiência, utilizando coluna C18 Phenomenex, de 250 mm x 4,6 mm e tamanho de partícula 5 µm, mantida a 25 °C. A fase móvel foi constituída de solução de heptanossulfonato de sódio e fosfato de sódio dibásico anidro pH 3,0, metanol e dibutilamina (70:30:2). O fluxo do eluente foi de 0,6 mL/min. A detecção foi realizada por UV-DAD em comprimento de onda de 226 nm. Foram observados sete produtos de degradação, sendo que nenhum produto de degradação apresentou mesmo tempo de retenção do ativo, bem como não houve sobreposição de picos. Deste modo, pode-se afirmar que a metodologia analítica demonstrou ser específica, indicativa de estabilidade e validável para a determinação de teor em Atenolol em comprimidos.

*Palavras-Chave:* Atenolol. Estudo de degradação forçada. Estabilidade.

## INTRODUÇÃO

A estabilidade de produtos farmacêuticos depende de fatores ambientais como temperatura, umidade e luz, e de outros relacionados ao próprio produto como propriedades físicas e químicas de substâncias ativas e excipientes farmacêuticos, forma farmacêutica e sua composição, processo de fabricação, tipo e propriedades dos materiais de embalagem (Brasil, 2005). Testes de estabilidade em produtos farmacêuticos produzem evidências sobre como a qualidade do produto varia com o tempo sob a influência destes fatores permitindo, assim, a determinação do prazo de validade e as recomendações de armazenamento (ICH, 2003).

No Brasil, os estudos de estabilidade de medicamentos devem ser conduzidos de acordo com a RE nº1/2005, na qual é prevista, dentre outros testes, a quantificação de produtos de degradação e o método analítico correspondente. Em consonância com esta resolução, a RE nº899/2003, que define parâmetros para a validação analítica, estabelece a necessidade de submeter os medicamentos a condições de estresse para que haja degradação do produto, quando as impurezas não forem conhecidas e/ou estiverem comercialmente disponível. A fim de definir procedimentos para a realização dos ensaios de degradação, a ANVISA publicou em 2008 o Informe Técnico nº1/2008, que se encontra em revisão sob a forma da Consulta Pública nº11/2012 (Brasil, 2005; Silva et al., 2009).

A preocupação com impurezas e produtos de degradação em fármacos e excipientes tem sido uma constante para o setor farmacêutico por tal motivo, como citado por Singh e colaboradores em um artigo de revisão, os estudos acerca destes compostos têm aumentado significativamente. Há legislações sobre o assunto em vários países, assim como o desenvolvimento de instrumentação analítica capaz avaliar a presença de impurezas a nível de traços também encontra-se em ascensão. (Singh et al., 2012).

Nos ensaios de degradação forçada, o medicamento deve ser submetido às condições de estresse: termólise, hidrólise, hidrólise ácida, hidrólise básica, oxidação, fotólise e exposição a íons metálicos, a fim de gerar produtos de degradação em quantidade suficiente para se

desenvolver e validar a metodologia analítica utilizada para a quantificação do teor do fármaco e dos produtos de degradação. O estudo deve ser executado em substâncias padrão, amostra e placebo do medicamento, além do diluente utilizado nas preparações, a fim de eliminar qualquer interferência nos resultados que possa ser interpretada como impureza. Os resultados destes ensaios são utilizados pelas indústrias farmacêuticas, principalmente, para avaliação da especificidade do método analítico, conforme estabelecido na RE nº899/2003 (Brasil, 2012).

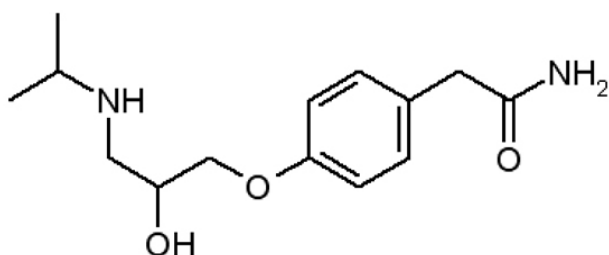


Figura 1. Estrutura molecular do atenolol.

O atenolol, 4-[-2-Hidroxi-3-[(1-metiletil)amino]propoxi]benzoacetamida (Figura1), é um bloqueador  $\beta$ 1 seletivo. Seu uso é indicado no tratamento da hipertensão arterial, angina pectoris, arritmias cardíacas e também como coadjuvante no tratamento da estenose subaórtica hipertrófica (Farmacopeia, 2010; P.R. Vade-Mécum, 2003).

Poucos trabalhos em alusão a estudos de estabilidade e de degradação em atenolol são encontrados na literatura. Andrisano et al., realizaram estudos de fotoestabilidade em formulações comerciais, e Kumar et al. desenvolveram estudos a fim de prever o modo como os excipientes influenciam na degradação do atenolol. Nenhum destes estudos, no entanto, faz uma abordagem ampla, envolvendo as diversas condições de degradação estudadas em medicamentos.

O presente trabalho teve como objetivo investigar a degradação do medicamento Atenolol na forma farmacêutica comprimido, por meio de ensaios de degradação forçada, bem como avaliar a especificidade do método analítico para determinação de teor do medicamento, de acordo com a Resolução nº899/2003 da ANVISA.

## MATERIAL E MÉTODOS

A metodologia analítica empregada nas análises foi a descrita na Farmacopeia Brasileira 5ª edição para Atenolol comprimidos, tendo sido co-validada para os parâmetros de adequabilidade do sistema, exatidão, precisão, linearidade, robustez, além do estudo de especificidade. Todos os ensaios de co-validação foram conduzidos conforme requisitos da RE nº899/2003, compreendendo uma faixa de concentração de 80 a 120%.

### Substâncias químicas e reagentes

Os reagentes utilizados foram de pureza grau analítico ou grau cromatográfico e água ultra purificada Milli-Q®. Foi utilizado padrão primário de atenolol com 99,6% de pureza declarada (F. Bras.). Como placebo foi utilizado o pó da formulação testada, contendo todos os excipientes, sendo eles: amidoglicolato de sódio, estearato de magnésio, laurilsulfato de sódio, carbonato de magnésio e celulose microcristalina.

### Condições cromatográficas

Utilizou-se um cromatógrafo líquido de alta eficiência da Merck-Hitachi, com detector UV-DAD, gerenciado pelo software Ezchrom Elite. Empregou-se uma coluna C18 Phenomenex, de 250 mm x 4,6 mm e tamanho de partícula 5  $\mu$ m, mantida a 25 °C. A fase móvel foi constituída de solução de heptanossulfonato de sódio e fosfato de sódio dibásico anidro pH 3,0, metanol e dibutilamina (70:30:2). O fluxo do eluente foi de 0,6 mL/min. O volume de amostra injetado foi de 10  $\mu$ L. A detecção foi realizada por UV-DAD em comprimento de onda de 226 nm.

### Equipamentos utilizados nas condições de degradação

Alguns equipamentos foram utilizados como fonte de degradação ou para acelerar o processo degradação. Na condição de degradação de hidrólise as amostras foram expostas em Câmara Climática Mecalor, modelo EC/1,2/AR-URC, empregando as condições de 75% +/- 5% de umidade e 40,0°C +/- 2,0°C de temperatura. No estudo de fotólise utilizou-se a Câmara de Fotoestabilidade Mecalor, modelo EC/0,2/R-F, tendo sido as amostras expostas a um total 200W\*h/m<sup>2</sup> de radiação ultravioleta tipo A. Na condição termólise as amostras foram mantidas em Estufa Nova Ética, modelo 400- ND, a 60°C. E nas condições oxidação, hidrólise ácida, hidrólise básica e exposição a íons metálicas as amostras foram acondicionadas no Banho-Maria Nova Ética, modelo 314-6D, a 40°C.

### Solução Padrão Controle

Pesou-se 20,00 mg de padrão primário de Atenolol em balão volumétrico de 100 mL e completou-se o volume com fase móvel. Transferiu-se volumetricamente 5 mL dessa solução para balão volumétrico de 100 mL e completou-se com fase móvel, homogeneizou-se. Filtrou-se em membrana filtrante de 0,45 $\mu$ m.

### Solução Amostra Controle

Transferiu-se 10 comprimidos de Atenolol 100mg para balão volumétrico de 1000 mL, adicionou-se 500 mL de fase móvel e deixou em ultrassom por 15 minutos. O volume foi completado com fase móvel e homogeneizou-se. Transferiu-se 1 mL da solução obtida para balão volumétrico de 100 mL e completou-se o volume com fase móvel, homogeneizou-se. Filtrou-se em membrana filtrante 0,45 $\mu$ m.

### Solução Placebo Controle

Preparou-se conforme descrito para solução amostra controle utilizando-se, ao invés da amostra, quantidade proporcional de placebo do comprimido.

### Solução Diluente Controle

O diluente utilizado para as amostras na condição controle foi a fase móvel, portanto, injetou-se fase móvel como solução diluente controle.

### Preparo das amostras de degradação

As soluções das amostras degradadas foram preparadas conforme descrito para a condição controle, após período de exposição ao agente indutor, como

apresentado na Tabela 1. Para todas as condições de degradação também foram preparadas soluções padrão, amostra, placebo e diluente.

Para as condições oxidação, hidrólise ácida, hidrólise básica e exposição a íons metálicos, as soluções foram preparadas utilizando a fase móvel descrita acrescida do respectivo agente indutor – peróxido de hidrogênio, ácido clorídrico, hidróxido de sódio e sulfato de cobre – em seguida foram colocadas em banho-maria a 40°C por dois dias. Após este período, foi realizada a diluição e finalização da preparação das soluções, do mesmo modo que as soluções controle.

Para as condições termólise, hidrólise e fotólise, os comprimidos de atenolol testados foram expostos às fontes de degradação – estufa a 60°C, câmara climática a 75% de umidade e 40°C e câmara de fotoestabilidade com luz ultravioleta tipo A, respectivamente – fora da embalagem primária, por um período de sete dias. Em seguida, as soluções foram preparadas como descrito para a condição controle.

Tabela 1. Preparo das amostras para as condições de degradação.

ID	Condição de Degradação	Agente Indutor	Exposição	Diluente
1	Oxidação	H2O2 3%	2 dias em banho-maria a 40°C	Fase móvel com 3% de H2O2
2	Hidrólise Ácida	HCl 1M	2 dias em banho-maria a 40°C	Fase móvel com HCl 1M (pH 1,0)
3	Hidrólise Básica	NaOH 1M	2 dias em banho-maria a 40°C	Fase móvel com NaOH 1M (pH 12,0)
4	Fotólise	Luz ultravioleta	7 dias	Fase móvel
5	Termólise	Temperatura	60°C por 7 dias	Fase móvel
6	Hidrólise	Umidade	75% de umidade por 7 dias	Fase móvel
7	Exposição à íons metálicos	CuSO4 0,05M	2 dias em banho-maria a 40°C	Fase móvel com CuSO4 0,05M

## RESULTADOS

### Co-validação da metodologia analítica

Avaliou-se metodologia analítica para os parâmetros de validação: adequabilidade do sistema, exatidão, precisão, linearidade robustez, sendo os resultados apresentados na Tabela 2.

### Estudo de Degradação Forçada

Para avaliação dos possíveis produtos de degradação, analisou-se as amostras submetidas às condições de estresse: termólise, hidrólise, hidrólise ácida, hidrólise básica, oxidação, fotólise e exposição a íons metálicos. Foi observada a formação de 7 produtos de degradação.

A Tabela 3 apresenta os produtos de degradação formados em cada uma das condições e seus respectivos tempos de retenção e área média nas preparações padrão e amostra.

Para as preparações controle não foi detectado nenhum outro pico além do referente ao ativo – Atenolol (Figura 2), assim como para a condição de exposição à íons metálicos não houve formação de produto de degradação (Figura 3)

Tabela 2. Resultados obtidos para os parâmetros de co-validação.

Parâmetro	Critério de Aceitação	Resultado obtido		
Adequabilidade do sistema	- DPR área: no máximo 2%	- DPR área: 0,439%		
	- DPR tempo de retenção: < 2%	- DPR tempo retenção: 0,014%		
	- Pratos teórico: > 5.000	- Pratos teórico: 11.176		
	- Assimetria: 0,8 - 2,0	- Assimetria: 1.0973		
Robustez	- diferença entre a solução recém preparada e a solução após 24 de preparo: < 2,0%.	0,14%		
Precisão - repetibilidade	DPR < 2,0%	1º Dia	2º Dia	
		0,38%	0,47%	
Precisão intermediária	DPR < 4,0%	0,44%		
Linearidade	- Coeficiente (r) > 0,99 - Teste de F < 4,240	r = 0,998516 F = 1.23838e+004		
Exatidão	- Recuperação média e valores individuais: 98,0 a 102,0%	Média 99,68%	Mínimo 98,51%	Máximo 100,82%

Tabela 3. Degradação do atenolol nas condições: termólise, hidrólise, hidrólise ácida, hidrólise básica, oxidação, fotólise e exposição a íons metálicos.

Condição	Produto de degradação	Padrão		Amostra	
		Tempo de retenção (min)	Área média	Tempo de retenção (min)	Área Média
Oxidação	Impureza 1	---	---	0,563	224973
	Impureza 2	---	---	6,653	14485
	Impureza 3	---	---	7,437	2482
	Impureza 4	8,624	1540	8,607	13920
Hidrólise Ácida	Impureza 1	---	---	0,687	290907
	Impureza 1	---	---	0,627	315501
Hidrólise Básica	Impureza 5	4,218	8568	3,607	5209
	Impureza 6	6,142	3416	6,193	1689
Fotólise	Impureza 7	4,611	2901	4,703	1210
Termólise	Impureza 6	6,184	2360	6,173	2103
Hidrólise	Impureza 6	6,180	2169	6,167	2651
Exposição a íons metálicos	Nenhuma impureza detectada	---	---	---	---

Nota - Área média do Padrão Controle: 1316099

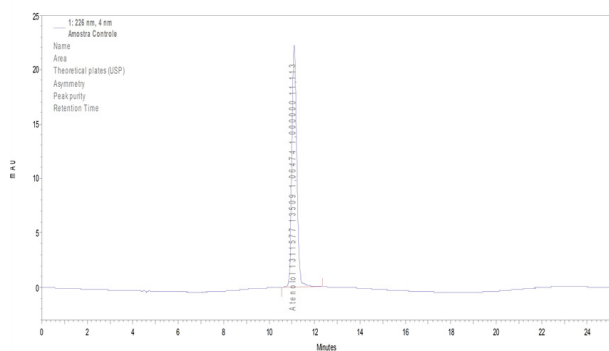


Figura 2. Cromatograma da solução amostra de atenolol na condição controle.

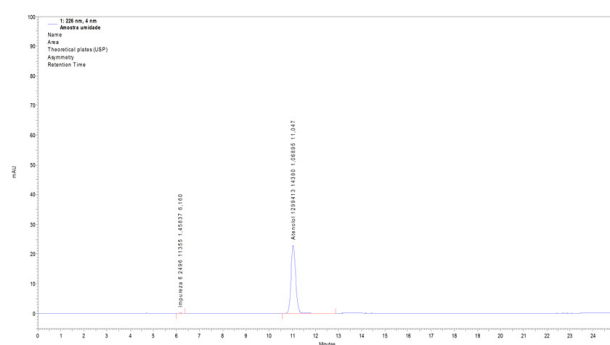


Figura 6. Cromatograma da solução amostra de atenolol na condição hidrólise.

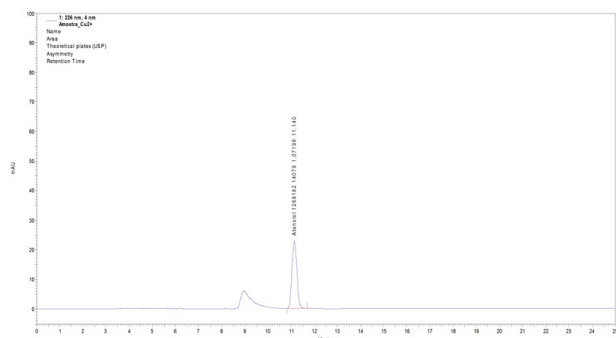


Figura 3. Cromatograma da solução amostra de atenolol na condição exposição à íons metálicos.

Já nas condições de estresse fotólise, termólise e hidrólise houve a formação de um produto de degradação em cada, como apresentado nas figuras 4, 5 e 6, respectivamente.

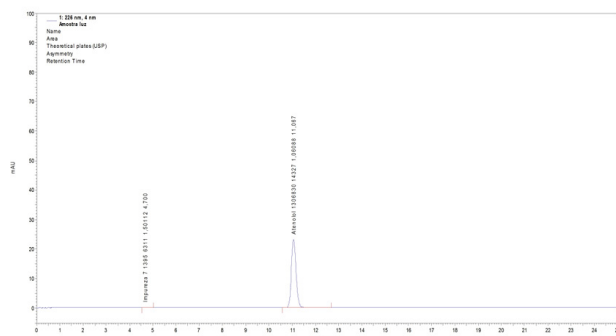


Figura 4. Cromatograma da solução amostra de atenolol na condição fotólise.

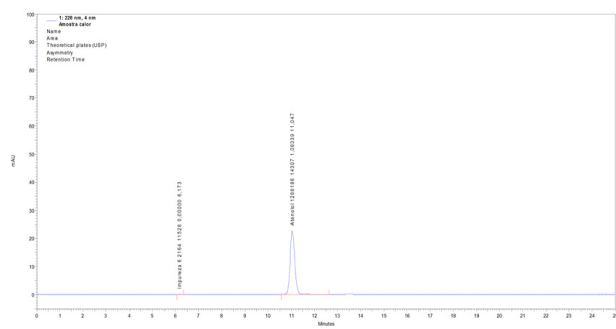


Figura 5. Cromatograma da solução amostra de atenolol na condição termólise.

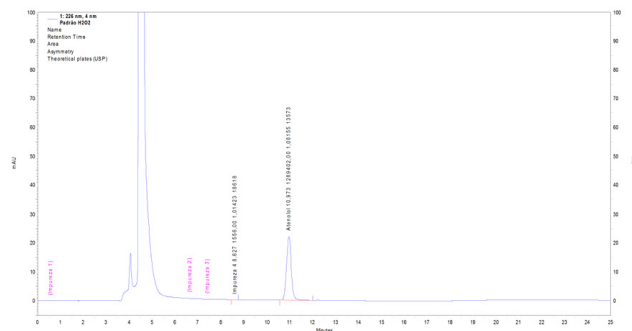


Figura 7a. Cromatograma da solução padrão de atenolol na condição oxidação.

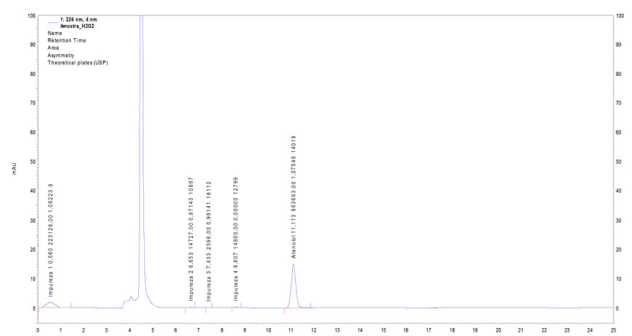


Figura 7b. Cromatograma da solução amostra de atenolol na condição oxidação.

Em nenhuma das condições testadas houve degradação nas preparações placebo e diluente ou qualquer outro pico com tempo de retenção igual ao do Atenolol.

### Especificidade

Analisando-se os cromatogramas obtidos para as todas as condições testadas, observou-se que nenhum pico detectado, mesmo na ocorrência de degradação, apresentou absorção no tempo de retenção do pico do princípio ativo Atenolol.

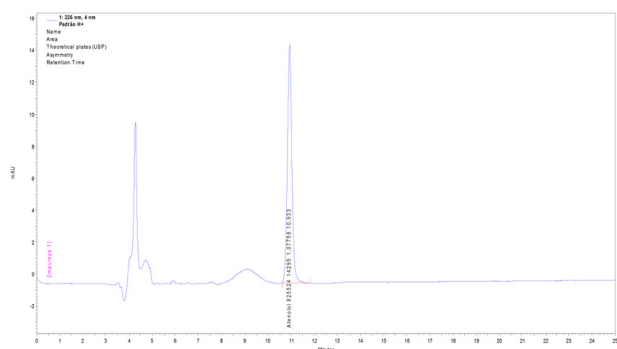


Figura 8a. Cromatograma da solução padrão de atenolol na condição hidrólise ácida.

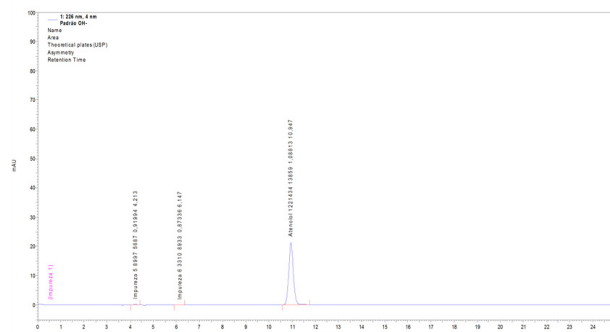


Figura 9a. Cromatograma da solução padrão de atenolol na condição hidrólise básica.

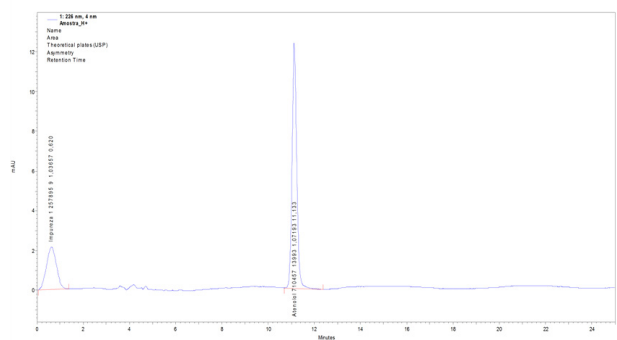


Figura 8b. Cromatograma da solução amostra de atenolol na condição hidrólise ácida.

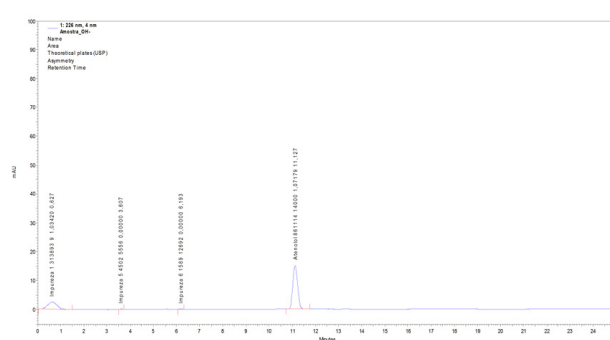
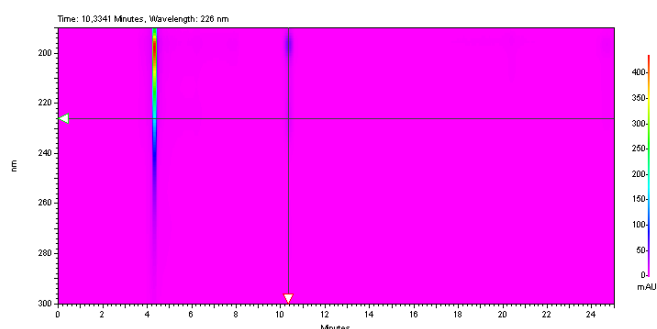


Figura 9b. Cromatograma da solução amostra de atenolol na condição hidrólise básica.



Sobreposição de espectros do padrão de atenolol na condição controle e amostra na condição peróxido

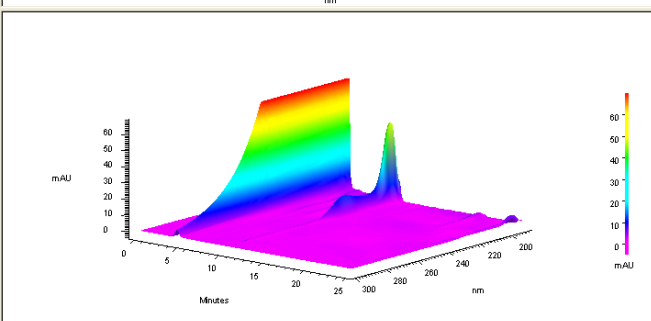
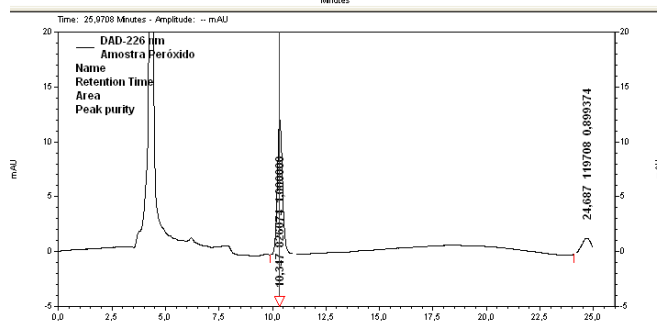
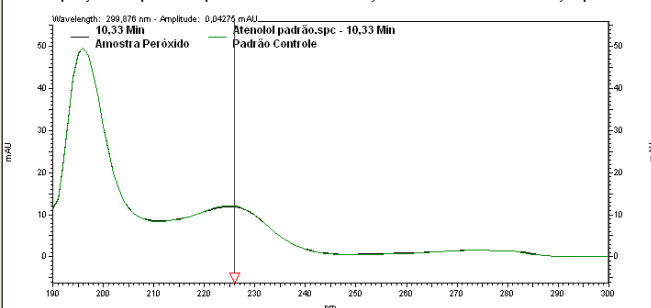


Figura 10. Pureza cromatográfica da solução amostra de atenolol na condição oxidação.

A pureza dos picos foi observada utilizando-se o detector DAD e em todas as condições analisadas foi descartada a possibilidade de sobreposição de picos, sendo que o pico relativo ao Atenolol apresentou pureza cromatográfica de 1,000000 (Figura 10).

## DISCUSSÃO

Os resultados obtidos durante a co-validação, apresentados na Tabela 2, demonstram que o método é indicativo de estabilidade e está validado para determinação de teor em Atenolol comprimidos.

As condições de estresse empregadas no estudo de degradação forçada mostraram-se eficientes, sendo que o medicamento foi inerte apenas a degradação por íons metálicos.

Os resultados obtidos para as condições de degradação forçada termólise, fotólise e umidade evidenciam a necessidade de uma avaliação criteriosa durante os estudos de estabilidade acelerada e de longa duração do produto, no que diz respeito às condições de armazenamento e embalagem, já que este demonstra ser sensível aos fatores ambientais temperatura, umidade e luz. É importante frisar, no entanto, que o estudo de degradação forçada é conduzido em condições extremas e, portanto, não é conclusivo para tais características, tal como demonstrado em estudo realizado por Andrisano et al. (1999), no qual preparações padrão submetidas a fotodegradação apresentaram diversos produtos de degradação, ao passo que a formulação comercial não. Desta forma, a estabilidade do medicamento e suas especificações devem ser determinadas nos estudos conduzidos nas condições estabelecidas pela RE nº1/2005, sendo os resultados de degradação apenas preditivos.

A ocorrência de produtos de degradação distintos para as preparações padrão e amostra nas condições de oxidação, hidrólise ácida e hidrólise básica, sugerem que as impurezas 1, 2, 3 e 4, apresentadas na Tabela 3, são decorrentes da interação entre o princípio ativo e os excipientes da formulação, já que não ocorrem no fármaco isolado (padrão). Um estudo realizado por Kumar et al. (2009) descreve a interação de Atenolol com diferentes excipientes e a decomposição química decorrente deste fenômeno e, tal como observado neste estudo, para a maioria dos casos a decomposição do princípio ativo é aumentada em cerca de 3% ou mais nas formulações comercialmente disponíveis. Dentre os excipientes citados neste estudo, dois – o amidoglicolato de sódio e a celulose microcristalina – estão presentes na formulação testada, de tal modo que a ocorrência destas impurezas também deve ser avaliada no estudo de estabilidade do produto.

A análise crítica dos dados obtidos no estudo de degradação, no que diz respeito à sobreposição e pureza dos picos observados, evidencia que a metodologia analítica empregada é específica para Atenolol.

## AGRADECIMENTOS

Às farmacêuticas Luana Silva e Graziela Mendes pela colaboração na realização das análises e no tratamento dos dados.

## ABSTRACT

*Forced degradation testing and assessment of specificity of analytical method for drug content of atenolol tablets*

**The  $\beta$ -blocker drug atenolol was subjected to forced degradation testing in this study, to assess the specificity of the analytical method used. The degradation conditions employed were: light, heat, humidity, acid/base hydrolysis, oxidation and exposure to metal ions. The analytical method was that described in the 5th edition of Farmacopeia Brasileira to determine the drug content of atenolol tablets. Breakdown products were detected by means of reversed-phase HPLC (column: C18, 250 mm x 4.6 mm, 5  $\mu$ m; mobile phase: aqueous solution of 1.1g sodium 1-heptanesulfonate and 0.71g anhydrous disodium phosphate (phosphoric acid to pH 3.0): methanol: dibutylamine 70:30:2, flowing at 0.6 mL/min), with UV-DAD at 226nm. Seven degradation products were observed; none of these showed the same retention time as the atenolol and there were no overlapping peaks. The analytical method was thus demonstrated to be specific, indicative of stability and validated for the content determination of atenolol tablets.**

*Keywords:* Atenolol. Forced degradation testing. Stability.

## REFERÊNCIAS

Andrisano V, Gotti R, Leoni A, Cavrini V. Photodegradation studies on Atenolol by liquid chromatography. *J Pharm Biomed Anal.* 1999;21(1999):851–857.

Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Anexo da Resolução – RE nº 899 de 29 de maio de 2003 – Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos.

Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 01 de 29 de Julho de 2005 – Guia para a realização de estudos de estabilidade.

Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Consulta Pública nº 11 de 23 de Janeiro de 2012.

Farmacopeia Brasileira 5ª edição, volume II. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 2010.

ICH International Conference on Harmonisation. Guidance for industry Q3B(R2): impurities in new drug products. Jun, 2006.

ICH International Conference on Harmonisation. Guidance for industry Q1A(R2): stability testing of new drug substances and products. Nov, 2003.

Kumar V, Shah RP, Malik S, Singh S. Compatibility of atenolol with excipients: LC–MS/TOF characterization of degradation/interaction products, and mechanisms of their formation. *J Pharm Biomed Anal.* 2009;49(2009):880–8.

P. R. Vade-mécum de medicamentos 2003-2004, 9. ed. São Paulo: Soriak, 2003.

Silva KER, Alves LDS, Soares MFR, Passos, RCS, Faria AR, Rolim Neto, PJ. Modelos de Avaliação da Estabilidade de Fármacos e Medicamentos para a Indústria Farmacêutica. Rev Ciênc Farm Básica Apl. [Internet] 2009 [citado 2012 set 05];30(2):129-135. Disponível em: [http://serv-bib.fcfar.unesp.br/seer/index.php/Cien\\_Farm/article/viewFile/868/798](http://serv-bib.fcfar.unesp.br/seer/index.php/Cien_Farm/article/viewFile/868/798).

Singh S, Handa T, Narayanam M, Sahu A, Junwal M, Shah RP. A critical review on the use of modern sophisticated hyphenated tools in the characterization of impurities and degradation products. J Pharm Biomed Anal. 2012;69(2012)148-73.

Recebido em 03 de dezembro de 2012.

Aceito em 26 de junho de 2013.

