



**USP WORKSHOP
DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS
INDICATIVOS DE ESTABILIDADE**

BALANÇO DE MASSAS: DESAFIOS E SOLUÇÕES

Caroline Lima de Oliveira



Bacharel em química pela Universidade Estadual de São Paulo e mestre em química analítica pela Universidade de São Paulo.

Com mais de 10 anos de experiência na área de desenvolvimento e validação de metodologias analíticas e 7 anos dedicados aos estudos de perfil de degradação e atendimento a RDC 53/2015.

Atuei no Aché como especialista e supervisora de desenvolvimento analítico e atualmente sou coordenadora de desenvolvimento analítico na Blau farmacêutica.



AGENDA

Balanço de massas: desafios e soluções

- ✓ Definição do conceito
- ✓ Tipos de cálculos
- ✓ Justificativa técnica a partir da interpretação dos resultados obtidos
- ✓ Relatório de perfil de degradação e a discussão de balanço de massas
- ✓ Principais motivos de indeferimento pela ANVISA no tema RDC 53/2017
- ✓ Estudos de caso

- ❑ Balanço de massas: Definição do conceito

Guia 4/2015

Balanço de massas (BM): processo de adição do teor e dos níveis de produtos de degradação encontrados para avaliar a proximidade da soma deles a 100% do valor inicial de teor, com a devida consideração da margem de precisão e exatidão analítica.

Em linhas gerais: o valor de queda de teor do ativo deveria ser igual o valor de formação de produtos de degradação!

☐ Balanço de massas: Tipos de cálculo

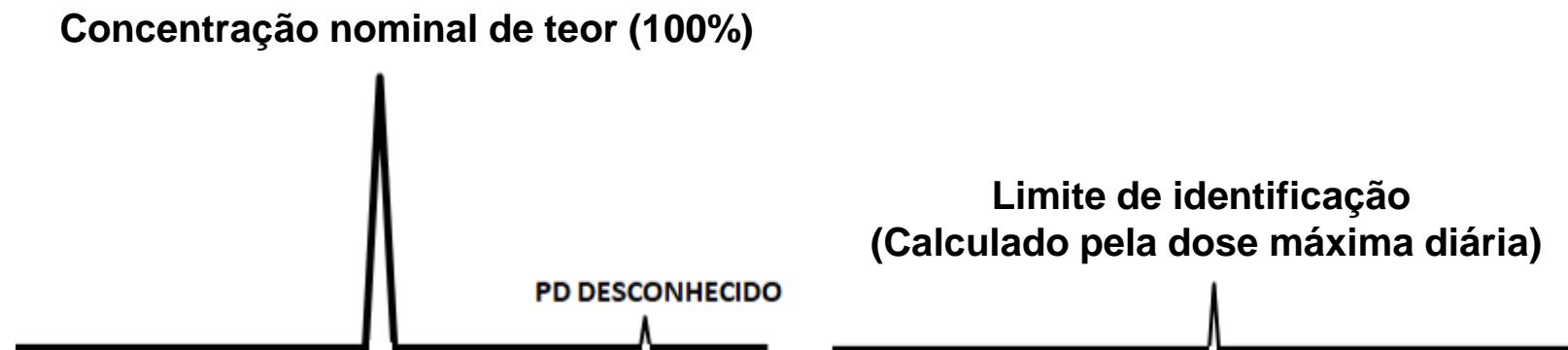
- **Com a aplicação dos métodos de teor e de impurezas validados pelas diretrizes da RDC 166/2017 as amostras de IFA e produto e placebo (se houver) expostas às condições de degradação forçada, avalia-se:**
- **Queda de teor** → Normalização de área ou por quantificação por padrão?
- **Crescimento de produtos de degradação** → Normalização de área (%área) ou quantificação contra padrão do ativo no limite de identificação?

QUANTIFICAÇÃO POR PADRÃO É O IDEAL E ESPERADO PELA ANVISA!

❑ Balanço de massas: Como calcular?

Quantificação por padrão – calibração → **IDEAL**

- **Queda do teor:** Quantificação com o padrão a 100% - Calibração;
- **Crescimento de impurezas:** Quantificação das impurezas contra padrão do ativo no limite de identificação.



- ☐ Balanço de massas: Como calcular?



$$\text{QUEDA DE TEOR DO FÁRMACO} = \sum \% \text{ PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO}$$



**BALANÇO DE MASSAS
ABSOLUTO**

X

**BALANÇO DE MASSAS
RELATIVO**

Para 15% de queda de teor e 8% de produtos de degradação formados:

BALANÇO DE MASSAS ABSOLUTO = 100 - % DEGRADAÇÃO DO FÁRMACO + % PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO FORMADOS

$$\text{EX: } 100 - 15 + 8 = 93\%$$

BALANÇO DE MASSAS RELATIVO = % PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO FORMADOS / % DEGRADAÇÃO DO FÁRMACO X 100

$$\text{EX: } 8/15 \times 100 = 53,3\%$$

- ❑ Balanço de massas (BM): Como justificar tecnicamente **DEFICIT de BM ou BM POSITIVO** a partir da interpretação dos resultados obtidos?

1º ponto ser questionado: Metodologia de preparo de amostra

- Existem problemas de solubilidade do IFA e/ou do produto?
- Existem problemas de solubilidade dos produtos de degradação (PDs) formados?
- O preparo da amostra controle (sem estresse) está muito distinto ao do ensaio de degradação forçada?
- O problema foi observado apenas para o produto?
- Placebo interfere na recuperação dos PDs? Mudança de aspecto prejudica a recuperação do ativo e PDs?
- Há instabilidade dos PDs e do ativo em solução diluente?
- É necessário um diluente específico para avaliar os PDs formados?
- Ensaio secos também estão sem BM aceitável?

- ❑ Balanço de massas: Como justificar tecnicamente **DEFICIT de BM ou BM POSITIVO** a partir da interpretação dos resultados obtidos?

2º ponto ser questionado: Quando o problema pode ser o método?

- O que houve com o sinal analítico do ativo e seus PDS?
- As impurezas podem não estar sendo eluídas pela coluna escolhida?
- Impurezas saem no vzero? Redesenvolvimento?
- Há coeluição com o IFA? Possível para amostras com picos do ativo saturados! Temos pureza de pico?
- Possibilidade de modificação do grupo cromóforo: desvio de fator resposta de determinado PD?
- Degradação secundária? → Controlar a degradação para obter apenas 10%;

- ❑ Balanço de massas: Como justificar tecnicamente **DEFICIT de BM ou BM POSITIVO** a partir da interpretação dos resultados obtidos?

2º ponto ser questionado: Quando o problema pode ser o método?

- Comparou-se o espectro de UV de cada impureza com o do(s) IFA(s), verificando se houve alteração dos máximos de absorção UV e na relação entre esse máximo e algum outro comprimento de onda de baixa absorbância?
- Possibilidade de destruição do grupo cromóforo e conseqüente não detecção de determinada impureza? → Análise em outro comprimento de onda ou uso de técnicas ortogonais (LC-MS/MS, GC/MS, RMN (Apenas para a MP));
- Perda por volatilização? Uso de frascos headspace e avaliação pela técnica de GC/MS;

- ❑ Balanço de massas: Justificativa técnica

Quando o BM se apresentar abaixo ou acima de 100%?

Após as investigações citadas, obtidas as respostas que não condenem o método:

Justificativa técnica é factível e embasada para a ausência de BM adequado!

☐ Balanço de massas: Justificativa técnica

- **Com toda a análise crítica dos resultados realizadas, as possíveis justificativas:**

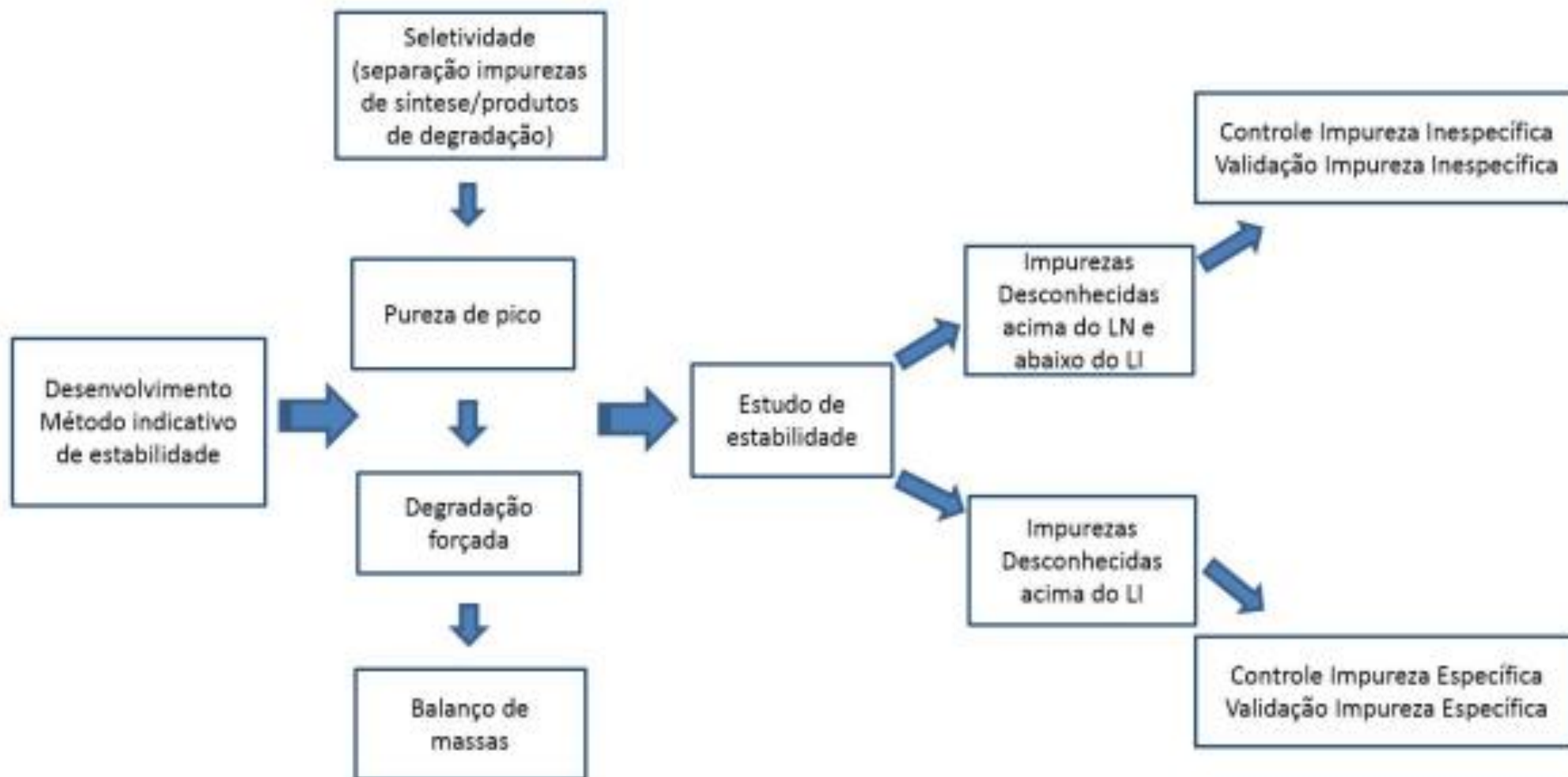
Sem uma técnica ortogonal:

Justificar pela hipótese de desvio de fator resposta analítica no DAD:

- **Para desconhecidas** → avaliar os espectros de absorção quando o software fornecer e comparar com o do ativo;
- **Para conhecidas** → Quantificação contra padrão da impureza;
- Mais de um comprimento de onda? Como calcular o BM?
- PDs de ativos associados de difícil discriminação?

☐ Balanço de massas: Justificativa técnica

- **Com toda a análise crítica realizada dos resultados obtidos, as possíveis justificativas:**
- Inviabilidade do uso de desvio de fator resposta analítica no DAD → **Perdas de cromóforos;**
- Uso de técnica ortogonal com adaptação do método para que o perfil cromatográfico seja o mesmo independente do detector: MS; CAD; LS, entre outros;
- Preparar a amostra de estresse para análise em outros detectores;
- Apresentar os novos cromatogramas mostrando a presença de pico não observado por DAD;
- Aplicação do método nas amostras de estabilidade → **Há a necessidade de 2 técnicas na avaliação de estabilidade real?**



Fluxograma de desenvolvimento de método indicativo de estabilidade.

☐ Relatório de perfil de degradação e a discussão de balanço de massas

- **Discutir cada ensaio de estresse separadamente:**

- Comparação do perfil do IFA isolado e quando presente no produto acabado;
- Em caso de mais de um fabricante de matéria prima, avaliar o perfil cromatográfico e discutir sobre a semelhança ou não entre os fabricantes.
- Avaliar criticamente se houve ou não o favorecimento da degradação quando há interação do IFA com os excipientes no produto acabado;
- Se houverem impurezas conhecidas, sinalizá-las na discussão.
- Discutir se os produtos de degradação encontrados no estresse foram observados nas amostras de estabilidade acelerada, longa duração ou aceleradíssima → Degradação potencial versus a degradação real;
- Discutir mecanismos de degradação, se possível.

❑ Relatório de perfil de degradação e a discussão de balanço de massas

- Tabela comparando a porcentagem de degradação do(s) IFA(s) com a porcentagem de aumento de impurezas;
- Discussão sobre o balanço de massas;
 - Quedas inferiores a 10% do seu ativo em endpoint aplicado;
 - Justificativas técnicas para déficit de balanço de massas;
 - Uso de ortogonalidade.

Com um estudo bem conduzido e o balanço de massas bem explicado tecnicamente:

O perfil de degradação real e qualquer desvio de qualidade do produto deve ser detectado pelo MIE e sua origem rastreável (degradação forçada).

Principais motivos de indeferimentos pela ANVISA



Webinar com a Gerência de Avaliação da Qualidade de Medicamentos Sintéticos
Principais motivos de exigência e indeferimento relacionados à qualidade.

Realização:

Agência Nacional de Vigilância Sanitária

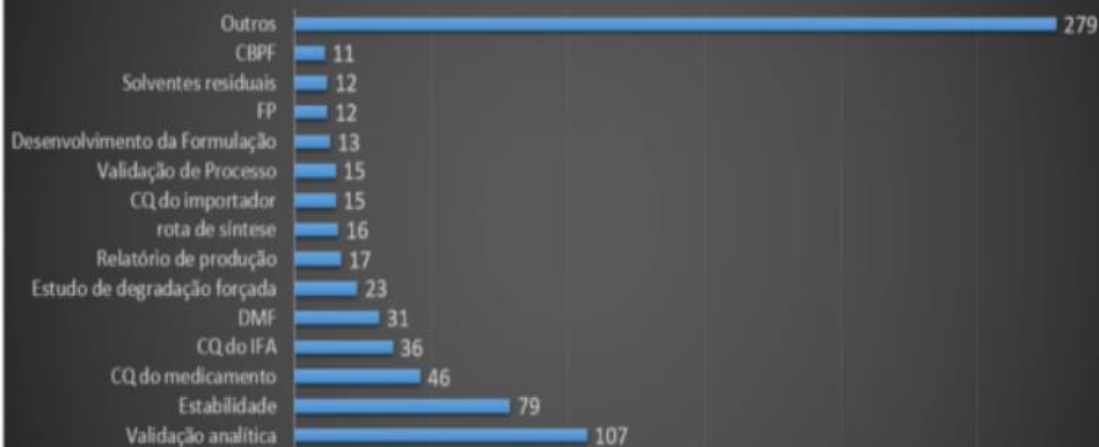
Coordenação de Gestão da Transparência e Acesso à Informação - CGTIA
Gerência-Geral de Conhecimento, Inovação e Pesquisa - GGCIPI

Gerência de Avaliação da Qualidade de Medicamentos Sintéticos - GGQMED
Gerência-Geral de Medicamentos e Produtos Biológicos - GGMB



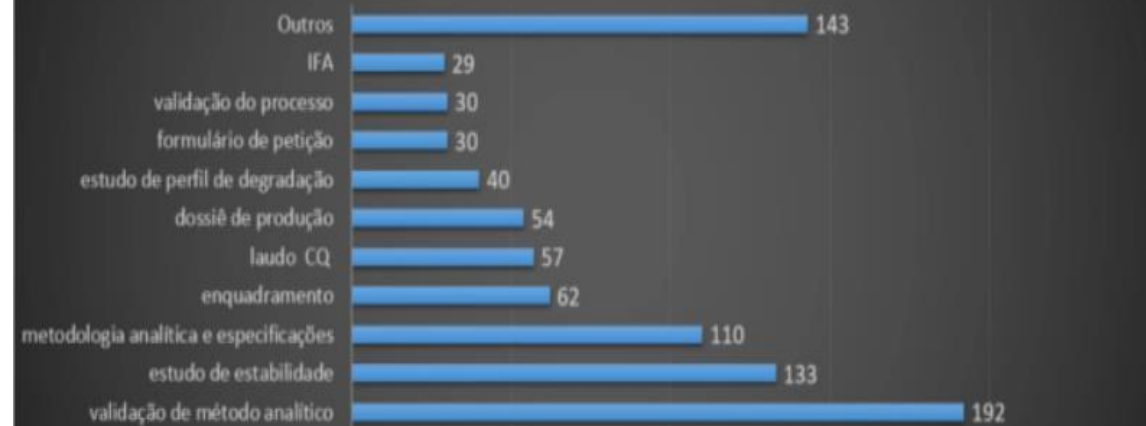
NUMEROS GERAIS – EXIGÊNCIAS E INDEFERIMENTOS (2019)

Exigências por motivo - registro



NUMEROS GERAIS – EXIGÊNCIAS E INDEFERIMENTOS (2019)

Exigências por motivo – pós-registro



❑ Principais motivos de indeferimentos pela ANVISA

1. Ausência de justificativa técnica embasada para desbalanço de massas (positivo e negativo).

2. Uso de justificativas genéricas sem foco direto na peculiaridade de cada molécula e sem uma previsão técnica de que uma degradação poderia de fato acontecer.

3. Falta de justificativa técnica para a não realização de alguma condição de degradação.

[HTTPS://WWW.GOV.BR/ANVISA/PT-BR/ASSUNTOS/NOTICIAS-ANVISA/2020/WEBINAR-DA-ANVISA-ABORDA-INDEFERIMENTO-DE-MEDICAMENTOS](https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/noticias-anvisa/2020/webinar-da-anvisa-aborda-indeferimento-de-medicamentos)



Webinar com a Gerência de Avaliação da Qualidade de Medicamentos Sintéticos
Principais motivos de exigência e indeferimento relacionados à qualidade.

Realização:

Agência Nacional de Vigilância Sanitária

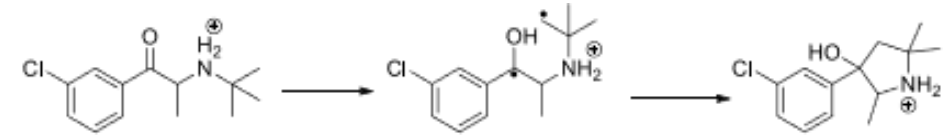
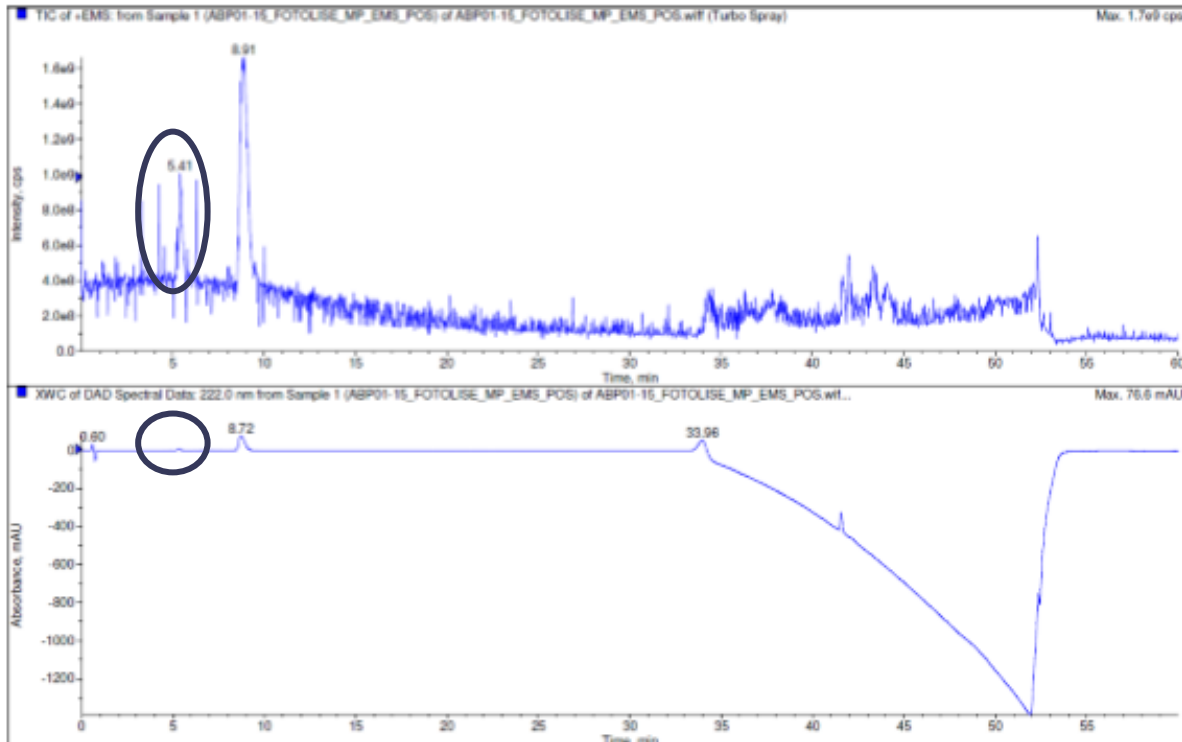
Coordenação de Gestão da Transparência e Acesso à Informação - CGTAI
Gerência-Geral de Conhecimento, Inovação e Pesquisa - GGCIP

Gerência de Avaliação da Qualidade de Medicamentos Sintéticos - GQMED
Gerência-Geral de Medicamentos e Produtos Biológicos - GGMED



BALANÇO DE MASSAS: DESAFIOS E SOLUÇÕES

Estudos de caso → Degradação em fotólise sem balanço de massas – Formação de uma PD com perda de cromóforo



Molécula C

PD de fotólise da Molécula C

A identificação do PD por massas e RMN explicou a falta de BM na condição de fotólise → Eliminação da conjugação → Redução da absorvidade → 1. FR diferente de 1; 2. Máximo de absorção diferente do ativo.

BALANÇO DE MASSAS: DESAFIOS E SOLUÇÕES

- Estudos de caso → Uso de 3 comprimentos de onda para apresentação de perfil de degradação de molécula C e definição de BM

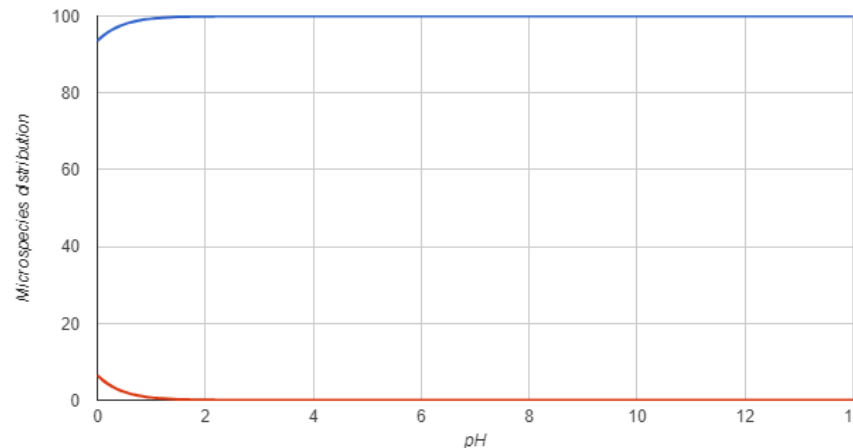
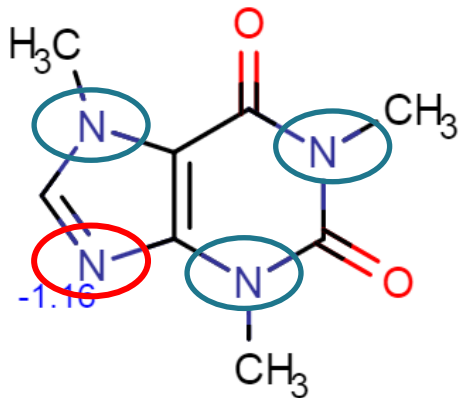
Condição	Degradação do fármaco (%)	Concentração de impurezas formadas												
		252nm										232nm	222nm	
		Imp. Desc. (TRR 0,11)	Imp. Desc. (TRR 0,14)	Imp. Desc. (TRR 0,20)	Imp. Desc. (TRR 0,22)	Imp. Desc. (TRR 0,39)	Imp. Desc. (TRR 0,51)	Imp. Desc. (TRR 0,65)	Imp. Desc. (TRR 0,81)	Imp. Desc. (TRR 0,86)	Imp. Desc. (TRR 1,18)	Ácido <i>m</i> -clorobenzoico (TRR 0,46)	Imp. Desc. (TRR 0,60)	
		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Fotólise	9,99	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,101	1,869	
Ácida	0,19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Básica	28,39	-	0,008	-	0,011	0,007	0,005	-	1,037	-	-	29,714	-	
Oxidativa	8,50	0,012	0,025	0,014	0,013	0,013	-	0,059	-	0,027	-	5,801	-	
Metal	0,07	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

Embora o comprimento de onda 252 nm seja o mais discriminativo de impurezas, não há fechamento de BM → Sempre avaliar os demais comprimentos

☐ Estudos de caso → Balanço de massas para cafeína em analgésico – Balanço de massas

Cafeína → base estrutural: xantina, com a diferença de possuir apenas aminas terciárias.

Estrutura química complexa, contendo bastante heteroátomos e funções orgânicas → poucos produtos de degradação relatados e previstos na literatura.



pKa: -1,16

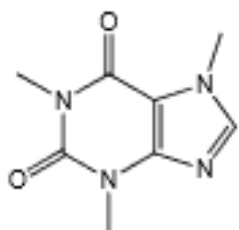
Log P: - 0,55

Extremamente solúvel em água independente do pH aplicado

Carater altamente básico

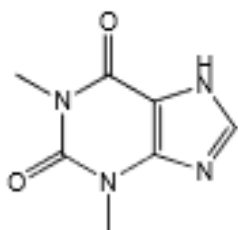
BALANÇO DE MASSAS: DESAFIOS E SOLUÇÕES

☐ Estudos de caso → Balanço de massas para cafeína em analgésico – Hidrólise Básica



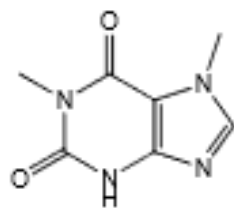
a) Cafeína

Fórmula química: $C_8H_{10}N_4O_2$
Peso molecular: 194,19 g/mol



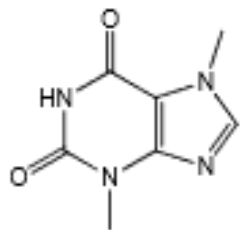
b) Impureza A (*theophylline*)

Fórmula química: $C_7H_8N_4O_2$
Peso molecular: 180,16 g/mol



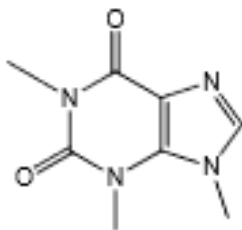
c) Impureza F

Fórmula química: $C_7H_8N_4O_2$
Peso molecular: 180,16 g/mol



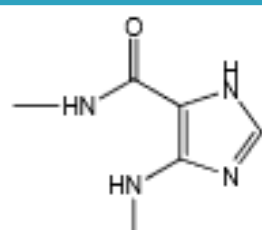
d) Impureza D (*theobromine*)

Fórmula química: $C_7H_8N_4O_2$
Peso molecular: 180,16 g/mol



e) Isocafeína

Fórmula química: $C_8H_{10}N_4O_2$
Peso molecular: 194,19 g/mol

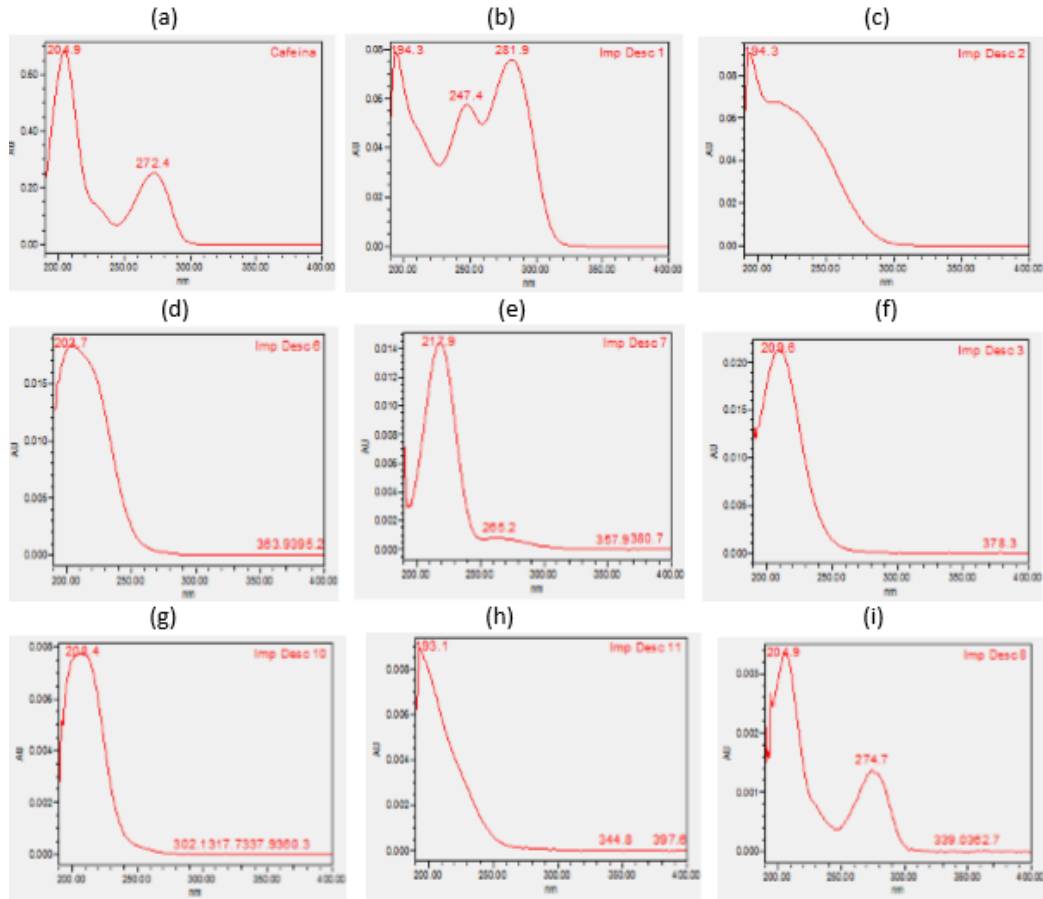


f) Impureza E (*cafedina*)

Fórmula química: $C_7H_{10}N_4O$
Peso molecular: 154,17 g/mol

- Cafeidina principal PD da cafeína sob hidrólise básica;
- As impurezas conhecidas apresentam estruturas semelhantes → **exceto para Impureza E (Cafeidina)**

Estudos de caso → Balanço de massas para cafeína em analgésico – Hidrólise Básica



- Sem Balanço de massas adequado na condição de hidrólise básica;
- Impurezas desconhecidas com máximos de absorção em em máximo distinto a cafeína → Justificativa de desvio de absortividade;
- Cafeidina: FR diferente de 1 → cálculo contra o padrão da impureza conhecida ou aplicando o FRR.

Para um adequado atendimento a RDC 53/2015 e um balanço de massas robusto:

Análise crítica sempre, seja ela experimental ou teórica!

MUITO OBRIGADA!!!

carol.lima.quimica@gmail.com

Sigam o @prosaanalitica no Instagram e no LinkedIn

