

Estudo de produtos de degradação de dipirona injetável em análise de estabilidade: um relato de caso

Study of injectable dipyrrone degradation products in stability analysis: a case report

Rafaela de Queiroz Apolinário

Universidade Evangélica de Goiás – UniEvangélica Anápolis – Goiás

Janaína Andréa Moscatto

Universidade Evangélica de Goiás – UniEvangélica Anápolis – Goiás

DOI: 10.47573/aya.5379.2.78.31

RESUMO

A dipirona é um dos fármacos mais utilizados no Brasil, sendo um medicamento seguro, com bom custo benefício e seguro, com base nas diretrizes da Organização Mundial da Saúde. Contudo, para garantir sua eficácia, é necessário que o produto deve ter suas características preservada. Dessa forma, este estudo teve como objetivo investigar os produtos obtidos a partir da degradação de dipirona injetável. A metodologia utilizada consiste em um estudo de estabilidade de uma amostra de dipirona injetável 500mg/mL feito realizado em um Laboratório de Controle de Qualidade Físico-Químico de uma Indústria Farmacêutica em Goiás. A partir dos resultados, foi possível observar que a amostra de dipirona utilizada não atendeu do procedimento operacional padrão (2,5%) para a soma de impurezas. Contudo, a partir do teste de citotoxicidade, notou-se que os produtos gerados não apresentam efeitos mutagênicos. Ao final foi determinado um novo protocolo de operação padrão com o aumento da soma total de impurezas para 3,3% já que este não gera produtos mutagênicos.

Palavras-chave: estabilidade. dipirona. degradação.

ABSTRACT

Dipyrone is one of the most used drugs in Brazil, being a safe, cost-effective and safe drug, based on the guidelines of the World Health Organization. However, to ensure its effectiveness, it is necessary that the product must have its characteristics preserved. Thus, this study aimed to investigate the products obtained from the degradation of injectable dipyrone. The methodology used consists of a stability study of a 500mg/mL injectable dipyrone sample carried out in a Physical-Chemical Quality Control Laboratory of a Pharmaceutical Industry in Goiás. From the results, it was possible to observe that the dipyrone sample used did not meet the standard operating procedure (2.5%) for the sum of impurities. However, from the cytotoxicity test, it was noted that the products generated do not show mutagenic effects. At the end, a new standard operation protocol was determined with the increase of the total sum of impurities to 3.3% since it does not generate mutagenic products.

Keywords: stability. dipyrone. degradation.

INTRODUÇÃO

A priori é importante salientar que a Dipirona Sódica é um fármaco que pertence à família das pirazolonas, sendo o analgésico antipirético mais utilizado no Brasil. Possui uma excelente ação antipirética e analgésica, é disponibilizada em comprimidos via oral, líquidas e injetáveis. (RODRIGUES *et al*, 2021).

Cabe destacar ainda que a dipirona injetável possui uma ação rápida de 30 a 60 minutos, sendo ela um AINE (anti-inflamatório não esteroide), indicada para dores de intensidades leves a medianas, pode ser administrada com outros tipos de medicamentos, considerada como opioide, que em associação pode ser benéfica ao paciente (ROMEU; GORCZAK; VALANDRO, 2019).

De forma geral, esse medicamento apresenta grande importância na prática clínica no

Brasil, pois atende à definição da Organização Mundial da Saúde (OMS) para medicamentos essenciais como aqueles que atendam às necessidades prioritárias da população com eficácia, segurança e custo-efetividade e por isso é colocada como medicamento essencial nas formas de solução oral e injetável na Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (RENAME) (POIANI; SCHMIDT; MARTINEZ, 2020).

Tal importância clínica é válida se o medicamento for eficaz, com a conservação das suas características. Por esta razão, durante um tempo determinado, são realizados estudos de estabilidade, cujos resultados devem estar dentro dos limites especificados (BRASIL, 2019).

A estabilidade pode ser definida como a capacidade de um produto em manter suas propriedades e características químicas, físicas e microbiológicas dentro dos limites especificados, por todo seu período de armazenamento. Os estudos de estabilidade fornecem informações necessárias para avaliar a segurança e eficácia dos medicamentos (ARANTES, 2018).

Os estudos de estabilidade são classificados em acelerado, de longa duração e de acompanhamento. O primeiro deles, possui finalidade de acelerar a degradação química e/ou mudanças físicas de um produto farmacêutico através da exposição do medicamento a condições de estresse, como luz, temperatura, calor, umidade, entre outras. Tem como objetivo determinar o prazo de validade provisório e condições de armazenamento (BRASIL, 2019).

O estudo de estabilidade de longa duração tem como finalidade permitir a verificação das características físicas, químicas e microbiológicas de um produto farmacêutico para estabelecer ou confirmar o prazo de validade e recomendar as condições de armazenamento do produto. Todavia, diferente do estudo acelerado, o de longa duração é projetado a condições de temperatura e umidade menos elevadas (BRASIL, 2012).

No que se refere ao estudo de estabilidade de acompanhamento, este é realizado após o início da comercialização do produto, com intuito de verificar a manutenção das características físicas, químicas, biológicas e microbiológicas previstas nos estudos de longa duração. Apresenta-se como principal objetivo verificar se não foi introduzida nenhuma mudança na formulação ou no processo de fabricação que possa afetar a estabilidade do produto, logo tem como objetivo monitorar e confirmar o prazo de validade para o medicamento ou IFA (BRASIL, 2019).

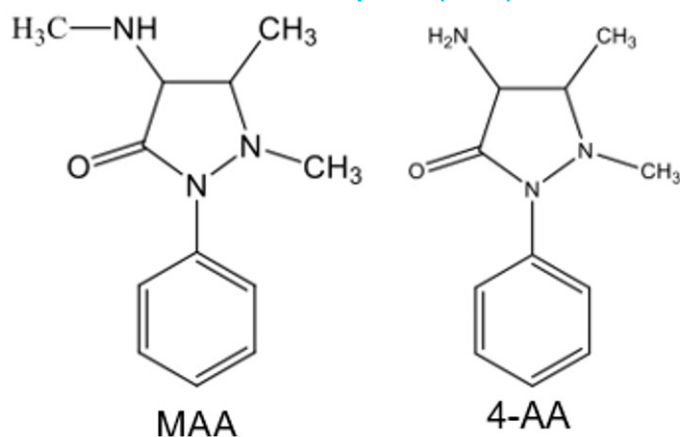
Partindo-se dessa premissa, cabe salientar acerca dos produtos de degradação, estes são compostos originários da degradação do princípio ativo ou excipientes da formulação. Tais podem surgir durante o armazenamento do medicamento ou quando expostos a condições de estresse (ARANTES, 2018).

A degradação consiste em um conjunto de produtos de degradação que se dá através dos insumos farmacêuticos ou através de medicamentos que são expostos à diversas situações como, por exemplo, a temperatura, pH, tempo, umidade e oxidação. Este método é utilizado para estabelecer a segurança biológica e a avaliação de dados que atestam a segurança das impurezas de forma individual ou específicas. Por meio dos estudos de estabilidade, é possível monitorar a formação de produtos de degradação, os quais podem ser responsáveis pela inatividade terapêutica ou toxicidade do medicamento. (BRASIL, 2019).

A perda de estabilidade pode acarretar a perda da potência, alterando a concentração do fármaco, por conseguinte reduzindo a dose terapêutica destinada ao paciente, além de formar

produtos de degradação que podem ser tóxicos (BRASIL, 2015). Os compostos 4-metilaminoantipirina (MAA) e 4-aminoantipirina (4-AA), mostrados na Figura 1, são os dois principais produtos de degradação em soluções injetáveis de Dipirona. O efeito analgésico da Dipirona se refere a interação desses dois compostos (FREITAS, 2018).

Figura 1 – Estrutura da 4-metilaminoantipirina (MAA) e 4-aminoantipirina (4-AA).



Fonte: Adaptado de Freitas (2018).

O conhecimento de tais produtos de degradação e, por conseguinte a identificação de indícios de toxicidade/ ineficácia ou não, é fundamental para âmbito industrial antes da liberação para comercialização do produto principalmente no quesito; custos. Deste modo, os ensaios de estabilidade realizados com métodos qualitativos e quantitativos garantem a qualidade e eficácia do medicamento durante seu prazo de validade no mercado.

O objetivo deste trabalho foi apresentar, na forma de relato de caso, a identificação, o relato e discussão acerca dos produtos de degradação gerados durante um estudo de estabilidade longa duração do produto Dipirona Injetável de uma Indústria Farmacêutica do Distrito Agroindustrial de Anápolis (DAIA).

MATERIAIS E MÉTODOS

O presente estudo consistiu em um relato de caso, a partir de um estudo de estabilidade de longa duração, com enfoque na pesquisa de substâncias de degradação, do produto Dipirona Injetável 500mg/mL, realizado no Laboratório de Controle de Qualidade Físico-Químico de uma Indústria Farmacêutica, situada no Distrito Agroindustrial de Anápolis (DAIA), que consentiu em fornecer os dados de forma anônima. O experimento foi realizado com autorização devida do gestor da área.

Os dados obtidos foram compilados e avaliados para discussão frente às legislações específicas, como a Resolução da Diretoria Colegiada – RDC n° 318/2019 e Resolução da Diretoria Colegiada RDC n° 45/2012 da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) e de literatura científica especializada disponível em bancos de dados como Scielo, Medline, LILACs, utilizando descritores como; estudos em estabilidade, produtos de degradação e Dipirona Sódica, no período de 2020.

Para realização do estudo de estabilidade foram necessários equipamentos calibrados e validados. Para realização da análise foi necessário seguir detalhadamente o procedimento

operacional padrão interno. Os resultados obtidos foram registrados em planilhas.

Protocolo industrial de estudo de estabilidade

A priori é importante salientar os reagentes e equipamentos utilizados para realização das análises segue então um protocolo de análise industrial. A Tabela 1 especifica o fabricante e grau de pureza dos reagentes utilizados e a tabela 2, os equipamentos.

Tabela 1- Reagente, fabricante e grau de pureza dos reagentes utilizados na análise.

Reagentes	Fabricante	Pureza
Fosfato de Potássio Monobásico	J.T.Baker	99,5%
Trietilamina	Anidrol	99,0 %
Ácido Fosfórico	Neon	85%
Metanol	J.T.Baker	-

Fonte: Autora (2022).

Tabela 2- Marca e modelo dos equipamentos utilizados.

Equipamento	Marca	Modelo
Balança analítica	Mettler Toledo	XPS205
HPLC	Anidrol	1260
Coluna	Inertsil	ODS-3 250x4,6mm 5µm
Ultrasson	Elmasonic	S 150

Fonte: Autora (2022).

Preparo das soluções

Preparação da Solução Tampão 0,05 M PH 6,2

Pesar 6,9 g de Fosfato de Potássio Monobásico em 800 mL de água purificada. Ajustar o PH com trietilamina para 6,8. Posteriormente ajustar o pH com ácido fosfórico para 6,2. Completar o volume para 1000 mL com água purificada, homogeneizar e filtrar.

Preparação da solução padrão diluída

A princípio ambientar todas as vidrarias com metanol antes do uso. Pesar, analiticamente, o equivalente a 14,6 mg de 4-metilaminoantipirina HCl (equivalente a 12,5 mg de 4 -metilaminoantipirina). Transferir para um balão volumétrico de 100 mL, adicionar 30 mL de metanol e levar ao ultrassom por 10 minutos até a solubilização completa. Esfriar a temperatura ambiente e completar o volume com metanol, homogeneizar. Em seguida, transferir volumetricamente 5 mL dessa solução para um balão volumétrico de 50 mL, completar o volume com metanol e homogeneizar. Filtrar em membrana PVDF 0,45 µm e transferir para um vial âmbar apropriado. (Cp= 0,0125 mg/ mL de 4-metilaminoantipirina).

Preparação da solução padrão de confirmação

Proceder conforme preparação da solução padrão diluído. (Cp= 0,0125 mg/ mL de 4-metilaminoantipirina).

Preparação da solução amostra

Transferir 1mL da amostra (equivalente a 500 mg Dipirona Sódica Monohidratada) para um balão de 100mL. Adicionar 30 mL de metanol, agitar vigorosamente para homogeneização completa. Posteriormente completar o volume com metanol, homogeneizar. Transferir volumetricamente 2 mL dessa solução para um balão de 20 mL, completar o volume com metanol e homogeneizar. Filtrar em membrana PVDF 0,45 µm e transferir para um vial âmbar apropriado. (Ca= 0,5 mg/ mL de Dipirona Sódica Monohidratada)

Condições Cromatográficas

Na Tabela 3 estão listadas as condições cromatográficas utilizadas. Na tabela 4 pode se observar a preparação da fase móvel por meio do gradiente.

Tabela 3 - Condições cromatográficas do método

Condições Cromatográficas	
Fluxo	1,5 mL /min
Temperatura	25°C
Comprimento de onda	245 nm
Tempo de rotação	Entre 7,5 a 9,1 minutos para dipirona. Entre 9,9 e 11,6 minutos para 4- metilaminoantipirina
Tempo de corrida	Aproximadamente 15 minutos

Fonte: Autora (2022).

Tabela 4 - Gradiente

Tempo (minutos)	% Solução Tampão Fosfato 0,05M PH 6,2	%Metanol
0	70	30
3	70	30
8	50	50
9,5	40	60
12	70	30
15	70	30

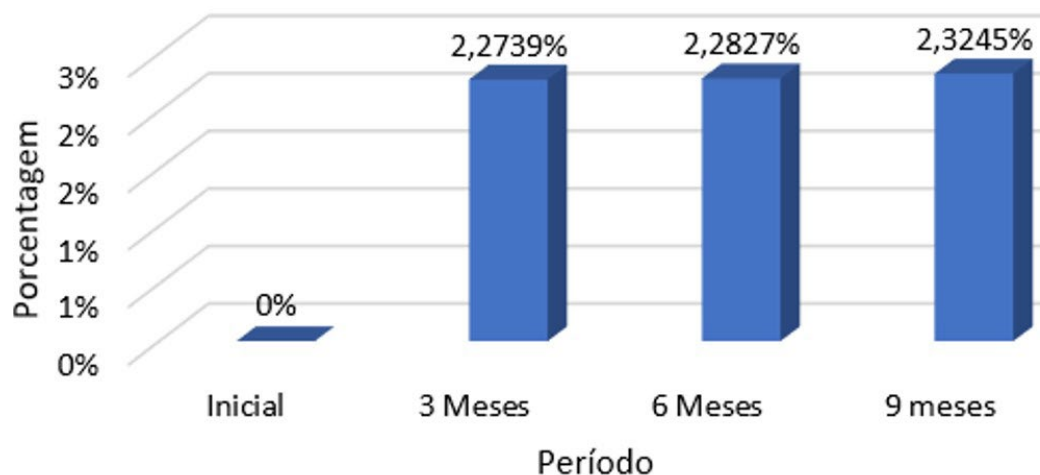
Fonte: Autora (2022).

RESULTADOS

A priori é importante salientar que para a realização de análises de medicamentos deve-se obrigatoriamente seguir a regulamentação dos compêndios, seja farmacopeia brasileira, americana ou europeia. Cabe destacar ainda, que no caso de a indústria optar por um padrão operacional interno, é necessário que todo procedimento seja registrado e validado.

O teste de produtos de degradação tem por objetivo monitorar a formação de produtos de degradação, os quais podem ser responsáveis pela inatividade terapêutica ou toxicidade do medicamento. Por esta razão atentou-se as normas seguidas para execução do estudo de estabilidade. No gráfico apresentado na Figura 2 pode-se observar os resultados encontrados.

Figura 2 - Amostra do estudo de estabilidade de longa duração: Produtos de degradação



No estudo observou-se os seguintes resultados: na análise inicial obteve-se Nenhuma Impureza Detectada (NID), na análise de três meses encontrou-se 2,2739%, na terceira análise, a de seis meses o achado foi de 2,2827% e na de nove meses alcançou 2,3245%. Com base nesses valores, observa-se que a partir da análise de três meses as amostras apresentaram valores bem próximos ao limite da faixa especificada que de acordo com o procedimento operacional interno para avaliação é de não mais que 2,5 % para soma das impurezas.

Nesse caso, foi necessário realizar uma investigação para definir o problema específico, ou seja, verificar se esse resultado obtido se deveu a erro analítico de execução, problemas de variação de equipamentos ou, se realmente, essa alteração nos valores obtidos se referiram à degradação da amostra em estudo.

Deste modo, a princípio realizou-se um Protocolo de Medidas Investigativas (PMI). Esse protocolo é dividido em três partes: a primeira consiste em injetar o padrão anterior para avaliar a área do padrão, descartando uma possível variação de equipamento. A segunda consiste em uma nova filtragem da mesma amostra preparada na bancada e injetar novamente no mesmo equipamento, se a área confirmar, descarta-se uma possível variação por filtro. E no que se refere a terceira parte, essa consiste em realizar uma nova diluição da amostra, para verificar se o analista não pipetou de forma errônea. Cabe salientar que essas etapas são realizadas tanto nos padrões quanto nas amostras, ou seja, uma reinjeção de ambos, uma nova filtração e nova diluição.

Após a realização desses procedimentos, com o diagnóstico da causa aparente dessa alteração, realiza-se somente uma repetição do teste, caso contrário, é necessário realizar um reteste. No reteste, prepara-se um novo padrão para verificar se área está reproduzindo, o que irá descartar a possibilidade de um erro analítico. Posteriormente, prepara-se cinco amostras que são injetadas após padrão. Todos os resultados, tanto o inicial, quanto das cinco repetições são lançados em planilhas validadas e anexados ao laudo de investigação. Essa planilha faz a avaliação dos dados e traça um parâmetro onde confirma qual média será utilizada como resultado final. Deste modo, se a investigação concluir que a primeira análise está dentro do adequado, o resultado permanece, caso contrário, o resultado da investigação será baseado na média das cinco amostras.

No estudo de estabilidade em questão, essa investigação foi realizada a partir dos três meses até a análise de nove meses e observou-se que a porcentagem de impurezas estava

umentando. Sendo assim, foi necessário terceirizar uma análise com objetivo de avaliar o potencial mutagênico da amostra de dipirona monoidratada 500mg/mL Solução injetável. Foi realizado um teste preliminar de citotoxicidade para a determinação dos limites de concentração, citotoxicidade e solubilidade da substância utilizando-se o método de incorporação direta de placa, na ausência de ativação metabólica, com cepa TA 100 nas concentrações de 15, 50, 150, 500, 1500, 5000 µg/placa. O teste definitivo foi realizado na ausência e presença de um sistema de ativação metabólica (mistura S9).

Vale destacar que todas as concentrações foram testadas em triplicata na ausência e na presença de ativação metabólica. Os resultados encontrados em ambos os experimentos foram negativos para as cepas TA98, TA100, TA102, TA 1535, TA1537, logo, concluiu-se que esses produtos de degradação gerados na amostra de dipirona durante o estudo de estabilidade longa duração não apresentam efeito mutagênico nas condições descritas. Após obtenção desses resultados, foi necessário ajustar o procedimento operacional padrão aumentando a especificação das somas das impurezas para 3,3%, pois estes não apresentarem efeito mutagênico.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo de estabilidade longa duração de Dipirona Sódica injetável realizado no Laboratório de Controle de Qualidade Físico-Químico de uma Indústria Farmacêutica, situada no Distrito Agroindustrial de Anápolis (DAIA), não atendeu os requisitos estabelecidos pelo procedimento operacional padrão (2,5% para a soma de impurezas), todavia, após a realização da investigação e posterior terceirização do teste preliminar de citotoxicidade, observou-se que os produtos de degradações encontrados durante o estudo de estabilidade não apresentavam efeito mutagênico. Deste modo, foi realizada uma revisão do protocolo operacional padrão e aumentou-se a especificação para 3,3% (soma total de impurezas).

A Dipirona Sódica apresenta uma importância clínica significativa, e é largamente utilizada pelos brasileiros, logo, foi fundamental a realização do estudo de estabilidade para monitorar a formação de produtos de degradação, os quais poderiam ser responsáveis pela inatividade terapêutica ou toxicidade do medicamento.

Considerando os dados obtidos observou-se a relevância da realização do estudo de estabilidade, demonstrando que o estudo não é realizado apenas para determinar o prazo de validade do medicamento, mas sim, demonstrar o quanto as análises desses produtos de degradação são essenciais para garantir a eficácia e segurança do medicamento, e por quanto tempo esses medicamentos estariam seguros no mercado perante a influência de fatores como temperatura e umidade.

REFERÊNCIAS

ARANTES, P. C. Relevância da determinação de produtos de degradação em medicamentos no Brasil. Centro de Pós-Graduação, Pesquisa e Extensão Oswaldo Cruz. Disponível em: <http://revista.oswaldocruz.br/Content/pdf/Edicao_18_PaolaCristinaArantes.pdf>. Acesso: 21 mai. 2022.

BRASIL. Agência Nacional De Vigilância Sanitária (ANVISA). Guia para obtenção do perfil de degradação, e identificação e qualificação de produtos de degradação em medicamentos.

Guia n 04/2015- 01. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2738062/Perfil+e+produtos+de+degrada%C3%A7%C3%A3o+em+medicamentos.pdf/c18a4857-9a5c-4292-a1bf07af6cad6902?version=1.0>. Acesso: 20 mai.2022.

BRASIL. Agência nacional de vigilância sanitária (ANVISA). Resolução de diretoria colegiada - RDC Nº 53, de 4 de dezembro de 2015. Disponível em:http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/3295768/%281%29RDC_53_2015_COMP.pdf/d38f507d-745c-4f6b-a0a6-bd250f2e9892. Acesso: 20 mai. 2022.

BRASIL. Agência nacional de vigilância sanitária (ANVISA). Resolução de diretoria colegiada RDC Nº 45, de 9 de agosto de 2012. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33836/349509/RDC+452012+Estudos+de+Estabilidade+-+IFA.pdf/4f387099-3ffc-42c6-9afe-41b4f880e17d>. Acesso: 11 mai. 2022.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº318, de 06 de novembro de 2019. Estabelece os critérios para a realização de Estudos de Estabilidade de insumos farmacêuticos ativos e medicamentos, exceto biológicos, e dá outras providências. Brasília: Diário Oficial da União, 2019. Disponível em: <https://www.in.gov.br/web/dou/-/resolucao-rdc-n-318-de-6-de-novembro-de-2019-226513805>. Acesso: 21 mai. 2022.

FREITAS, Raquel Oliveira Nascimento de. Prospecção química e biológica de novos complexos de Cu²⁺ e Ag⁺ baseados em ligantes contendo o grupo farmacofórico 1,4-dioxo-butenil. 2018. 66 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Faculdade de Ciências Exatas e Tecnologia, Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, MS, 2018.

Painel Internacional de Avaliação da Segurança da Dipirona, Brasília, Brasil, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), 2001. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/divulga/informes/dipirona2.pdf> . Acesso em 20 out 2019.

POIANI, Lucas Curtolo; SCHMIDT, Charles; MARTINEZ, Luis Lopez. Análise de material publicitário, disponível na internet, sobre analgésicos à base de dipirona que são vendidos sem a necessidade de prescrição, e os riscos da automedicação. Arquivos Médicos dos Hospitais e da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo, p. 1 of 7-1 of 7, 2020.

RODRIGUES, B. T. F. *et al.* Estudo sobre a estabilidade do princípio ativo da dipirona sódica. Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research – BJSCR, v.36, n.1, pp.124-129, 2021.

ROMEU, Rogério; GORCZAK, Rochelle; VALANDRO, Marília Avila. Analgesia farmacológica em pequenos animais. PUBVET, v. 13, p. 150, 2019.