



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E NATURAIS DO PONTAL
CURSO DE GRADUAÇÃO EM QUÍMICA



FABIO ROBERTO FOGAÇA FILHO

**ESTUDO DE DEGRADAÇÃO FORÇADA DO CLORIDRATO DE
RANITIDINA PARA AVALIAÇÃO DA GERAÇÃO DE NITROSAMINAS**

Ituiutaba/MG

2025

FABIO ROBERTO FOGAÇA FILHO

**ESTUDO DE DEGRADAÇÃO FORÇADA DO CLORIDRATO DE RANITIDINA PARA
AVALIAÇÃO DA GERAÇÃO DE NITROSAMINAS**

Trabalho de conclusão de curso apresentada à
Comissão Avaliadora como parte das exigências
do Curso de Graduação em Química:
Bacharelado, do Instituto de Ciências Exatas e
Naturais do Pontal da Universidade Federal de
Uberlândia.

Orientador: Prof. Dr. Anizio Marcio de Faria

Ituiutaba/MG

2025

ESTUDO DE DEGRADAÇÃO FORÇADA DO CLORIDRATO DE RANITIDINA PARA AVALIAÇÃO DA GERAÇÃO DE NITROSAMINAS

Trabalho de conclusão de curso apresentada à Comissão Avaliadora como parte das exigências do Curso de Graduação em Química: Bacharelado, do Instituto de Ciências Exatas e Naturais do Pontal da Universidade Federal de Uberlândia.

Ituiutaba, 30 de abril de 2025

COMISSÃO AVALIADORA

Prof. Dr. André Luiz dos Santos

Dr. Marcos Vinícius Ferreira (ICENP/UFU)

Prof. Dr. Anizio Marcio de Faria
Orientador

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todas as pessoas que estiveram ao meu redor durante os anos de graduação. Sem as companhias que tive pelo percurso, aguentar a distância e as responsabilidades que estudar longe de casa traz não seria possível.

Aos meus pais, meus avós e minha irmã que sempre estiveram comigo, mesmo com as poucas visitas semestrais, regadas de carinho e amor incondicional a cada retorno. Esses momentos foram essenciais para meu desenvolvimento pessoal e acadêmico dentro da universidade. Mãe e pai, muito obrigado por se sacrificarem tanto para investirem em meus estudos e pelos ensinamentos que formaram a pessoa que sou hoje. O seu sonho de um filho na universidade pública se tornou o nosso, mãe, e não acabará comigo. A Malu ainda lhe dará muito orgulho e pode ter certeza que seus netos também terão consigo a consciência que você depositou em nós de como a educação é essencial e libertadora.

A todos os meus familiares por todo o suporte recebido, pelas risadas e conversas que me ajudaram a atravessar esse caminho desconhecido.

Às amigas que fiz nesse período de graduação, amigos e amigas que conheci pelo curso da Química, pela UFU e, em especial, aos meus companheiros de república, pessoas incríveis que levarei para o resto da vida.

Aos meus mais antigos e novos amigos da minha cidade, São José do Rio Preto/SP, que mesmo após anos de distância ainda estão comigo, compartilhando dos mesmos ideais e objetivos. Acredito que seja um pouco deselegante citar cada um nominalmente, pois posso acabar esquecendo alguém que também tanto me importa. Sendo assim, queria dizer que cada um de vocês me inspira em ser uma pessoa melhor de maneiras diferentes, seja academicamente, no trabalho, nas dialéticas ou mesmo nas relações pessoais. São anos de reciprocidade, conselhos, muitas risadas e apoio recebidos. Alguns dizem que as mudanças do tempo acabam interferindo nas amizades, mas prefiro acreditar que ele apenas as amadurece e fortalece.

Ao Prof. Dr. Anizio, não só pelas ótimas aulas ministradas, que despertaram meu interesse e gosto pela cromatografia, mas também por toda paciência e carinho com todos os ensinamentos e as pertinentes dúvidas (muitas vezes repetidas) durante a realização da pesquisa, sempre se atentando a ajudar no que fosse possível. Agradecê-lo principalmente pela confiança depositada em mim para a realização desse trabalho, me mostrou uma outra área da universidade que não havia absorvido ainda durante a graduação, de como o ambiente da pesquisa é um trabalho digno, difícil, mas também acolhedor e recompensador.

Gostaria de expressar minha profunda gratidão ao Dr. Allyson que foi fundamental para meu desenvolvimento dentro do laboratório, me ajudou muito em várias dúvidas e necessárias lições, foram as broncas e puxões de orelha que me auxiliaram (e muito) para a conclusão dessa pesquisa. Também, gostaria de agradecer ao Dr. Marcos por ter aceitado o convite para compor minha banca para defesa deste trabalho e por todas as orientações e ajudas que forneceu durante os anos de graduação em diferentes corredores da universidade, independente do curso, você sempre se mostrou disposto a nos ajudar no que fosse preciso.

Por fim, deixo meus agradecimentos finais a todos os professores do ICENP por todo o conhecimento compartilhado, em especial; ao Prof. Dr. José Gonçalves, que nos primeiros meses ainda no curso de licenciatura, abriu meus olhos para a ciência além dos laboratórios, mostrando que o ensino é um campo tão rico e transformador quanto a pesquisa; e ao Prof. Dr. Gilberto, meus agradecimentos vão muito além do escopo da química. Nossas trocas de ideias sobre a realidade me mostraram que, para ser um bom profissional, é essencial não apenas dominar a literatura, mas também compreender as questões sociais presentes em nosso cotidiano. Você me inspira como homem preto: sua trajetória na pesquisa, sua simplicidade e humildade ao lecionar em um meio acadêmico majoritariamente branco são exemplos que levarei para o resto da vida; e ao Prof. Dr. André, obrigado por sempre me instigar durante suas aulas a buscar não apenas o domínio do conteúdo, como também a compreensão das questões do mundo ao nosso redor. Suas perguntas repentinas me tiravam da zona de conforto, me obrigando a formular respostas bem mais adequadas. Dando jus assim a ideia de que muitos escritores e teóricos defendem, de que a fala é uma ferramenta essencial para a organização do pensamento e não apenas um método de comunicação.

Agradeço, ainda, a todos os demais professores que fizeram parte da minha formação, contribuindo, direta ou indiretamente, para minha trajetória acadêmica e pessoal. Cada ensinamento recebido foi essencial para que eu concluísse essa etapa da minha vida.

Agradeço à Universidade Federal de Uberlândia e à Financiadora de Estudos e Projetos pela estrutura para desenvolvimento do projeto através da disponibilização dos equipamentos (FINEP 01.13.0371.00) e dos espaços do Laboratório de Pesquisas em Materiais de Separação e Cromatografia (FINEP 01.11.0135.00).

EPÍGRAFE

*“Ó meu corpo, faça sempre de mim um homem
que questiona!”*

Frantz Fanon

RESUMO

A administração de medicamentos foi um marco na história, permitindo que enfermidades até então mortíferas se tornassem tratáveis. A indústria farmacêutica é um dos maiores setores da economia global. No Brasil, segundo a ANVISA, a venda de medicamentos gera mais de 130 bilhões de reais ao ano. Esse cenário implica em uma produção em larga escala para o consumo, tornando essencial a rigorosa verificação da qualidade e segurança de medicamentos para garantir que esses não representem riscos à saúde. Recentemente, estudos indicaram a formação de N-nitrosodimetilamina (NDMA), composto potencialmente tóxico, em medicamentos com o insumo farmacêutico ativo (IFA) de cloridrato de ranitidina. A proibição da comercialização foi em escala mundial, o episódio revelou a necessidade de um maior controle na produção. Considerando a possibilidade de formação desses compostos com potencial carcinogênico, no presente trabalho, foi realizado um estudo de degradação forçada do medicamento ranitidina, utilizada para tratamentos de úlceras gástricas, para avaliação dos produtos de degradação gerados e da potencial geração de NDMA. O medicamento foi submetido às condições de estresse: termólise, hidrólise ácida, hidrólise básica, oxidação e fotólise. O método empregado foi baseado no guia de degradação da ANVISA, Resolução nº 4/2015, para avaliar a geração de nitrosaminas, em especial, a NDMA. A análise cromatográfica foi feita por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), utilizando coluna C18 e fase móvel composta por ACN:H₂O com eluição gradiente e detecção realizada por detector por arranjo de diodos a 228 nm. Os ensaios de degradação forçada levaram à formação de sete produtos de degradação (PDs) da ranitidina. Sob condições mais extremas (tempo prolongado e/ou maiores concentrações dos agentes degradantes) observou-se a completa degradação do fármaco. Destes PDs formados, destacou-se a formação do composto tóxico NDMA, observado especificamente nas degradações hidrolíticas sob aquecimento. A confirmação da identidade da NDMA foi realizada mediante a comparação com análise do padrão analítico do NDMA, nas mesmas condições de análise. A identificação dos PDs da ranitidina foi efetuada através da análise do perfil cromatográfico e comparação com cromatogramas da ranitidina e seus subprodutos publicados na literatura. Assim, a degradação forçada da ranitidina demonstrou ser eficiente e útil para avaliar a potencial geração de produtos tóxicos a partir da degradação do cloridrato de ranitidina.

Palavras-chave: Nitrosaminas, Degradação Forçada, NDMA, CLAE-DAD, Ranitidina.

ABSTRACT

The administration of medications was a turning point in history, allowing previously deadly diseases to become treatable. The pharmaceutical industry is one of the largest sectors of the global economy. According to ANVISA, the sale of medications generates more than 130 billion reais per year in Brazil. This scenario implies large-scale production for consumption, making it essential to rigorously verify the quality and safety of medications to ensure that they do not pose health risks. Recently, studies indicated the formation of N-nitrosodimethylamine (NDMA), a potentially toxic compound, in medicines with the active pharmaceutical ingredient (API) ranitidine hydrochloride. The ban on marketing was worldwide, and the episode revealed the need for greater control over production. Considering the possibility of formation of these compounds with carcinogenic potential, in the present study, a forced degradation study of the drug ranitidine, used to treat gastric ulcers, was carried out to evaluate the degradation products generated and the potential generation of NDMA. The drug was subjected to stress conditions: thermolysis, acid hydrolysis, basic hydrolysis, oxidation, and photolysis. The method used was based on the ANVISA degradation guide, Resolution No. 4/2015, to evaluate the generation of nitrosamines, especially NDMA. Chromatographic analysis was performed by high-performance liquid chromatography (HPLC), using a C₁₈ column and mobile phase composed of ACN:H₂O with gradient elution and detection performed by a diode array detector at 228 nm. Forced degradation tests led to the formation of seven ranitidine degradation products (DPs). Under more extreme conditions (prolonged time and/or higher concentrations of degrading agents), complete degradation of the drug was observed. Of these DPs formed, the formation of the toxic compound NDMA stood out, observed specifically in hydrolytic degradations under heating. Confirmation of the identity of NDMA was performed by comparison with analysis of the analytical standard of NDMA, under the same analysis conditions. Ranitidine DPs were identified through chromatographic profile analysis and comparison with the ranitidine chromatograms and byproducts published in the literature. Thus, the forced degradation of ranitidine proved efficient and valuable in evaluating the potential generation of toxic products from the degradation of ranitidine hydrochloride.

Keywords: Nitrosamines, Forced Degradation, NDMA, HPLC-DAD, Ranitidine.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. TIPOS DE ESTABILIDADES COM SUA DESCRIÇÃO E FATORES PRINCIPAIS DEFINIDOS PELA FARMACOPEIA NORTE-AMERICANA (USP, 2012).	18
TABELA 2. PORCENTAGEM, FORMA DE EXCREÇÃO E METABÓLITOS FORMADOS PELA RANITIDINA.	22
TABELA 3. DESCRIÇÃO DO MÉTODO GRADIENTE UTILIZADO PARA ANÁLISE CROMATOGRÁFICA	39
TABELA 4. PORCENTAGENS DE DEGRADAÇÃO DA RANITIDINA NAS CONDIÇÕES DE DEGRADAÇÃO FORÇADA: HIDRÓLISES ÁCIDA E BÁSICA, OXIDAÇÃO EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES, TERMÓLISE E FOTÓLISE.	55

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1. ESTRUTURA QUÍMICA DO CLORIDRATO DE RANITIDINA. _____	21
FIGURA 2. ESTRUTURA QUÍMICA DA N-NITROSODIMETILAMINA. _____	22
FIGURA 3. ESTRUTURAS QUÍMICAS DAS N-NITROSAMINAS MAIS TÓXICAS, DO PONTO DE VISTA ALIMENTAR. _____	23
FIGURA 4. MECANISMO REACIONAL PROPOSTO PARA A FORMAÇÃO DE NDMA A PARTIR DA REAÇÃO INTERMOLECULAR DA RANITIDINA. _____	25
FIGURA 5. ESTRUTURAS QUÍMICAS DO CLORIDRATO DE RANITIDINA E DAS IMPUREZAS A, B, C, D, E, F, G, H, I, J E K _____	27
FIGURA 6. ESTUDO DE DEGRADAÇÃO FORÇADA DO PÓ REAGENTE DE RANITIDINA ARMAZENADO EM FRASCOS DE VIDRO HERMETICAMENTE FECHADOS, TAMPADOS E EXPOSTOS AO AMBIENTE (ABERTOS) A 60 °C/50 % DE UR. _____	28
FIGURA 7. CROMATOGRAMAS DA ELUIÇÃO DA MISTURA PADRÃO DE RANI E NDMA, EMPREGANDO FASES MÓVEIS (A) MeOH:H ₂ O (50:50, v/v) E (B) ACN:H ₂ O (50:50, v/v); COLUNA C ₁₈ ; VAZÃO DA FASE MÓVEL 1,0 mL MIN ⁻¹ ; DETECÇÃO DAD A 228 NM; INJEÇÃO 10 µL. _____	36
FIGURA 8. CROMATOGRAMA DA ELUIÇÃO DA MISTURA PADRÃO DE RANI E NDMA, EMPREGANDO FASE MÓVEL ACN:H ₂ O (50:50, v/v); COLUNA HILIC; VAZÃO DA FASE MÓVEL 1,0 mL MIN ⁻¹ ; DETECÇÃO DAD A 228 NM; INJEÇÃO 10 µL DA MISTURA. _____	37
FIGURA 9. CROMATOGRAMA DA ELUIÇÃO DA MISTURA PADRÃO DE RANI E NDMA, EMPREGANDO FASE MÓVEL ACN:H ₂ O (30:70, v/v); COLUNA C ₁₈ ; VAZÃO DA FASE MÓVEL 1,0 mL MIN ⁻¹ ; DETECÇÃO DAD A 228 NM; INJEÇÃO 10 µL DA MISTURA. _____	38
FIGURA 10. CROMATOGRAMA DA ELUIÇÃO DAS SOLUÇÕES PADRÃO DE RANI E NDMA, EMPREGANDO FASE MÓVEL ACN:H ₂ O NO MODO GRADIENTE, CONFORME TABELA 3; COLUNA C ₁₈ ; VAZÃO DA FASE MÓVEL 1,0 mL MIN ⁻¹ ; DETECÇÃO DAD A 228 NM (NDMA) E A 320 NM (RANI). _____	39
FIGURA 11. ESPECTROS DE ABSORÇÃO UV DAS SOLUÇÕES PADRÃO DE (A) RANI E (B) NDMA A 25 µg L ⁻¹ . _____	40
FIGURA 12. CROMATOGRAMA DA ELUIÇÃO DE UMA AMOSTRA DILUÍDA DE RANIVET DE 8 MG, EMPREGANDO FASE MÓVEL ACN:H ₂ O NO MODO GRADIENTE; COLUNA C ₁₈ ; VAZÃO DA FASE MÓVEL 1,0 mL MIN ⁻¹ ; DETECÇÃO DAD 228 NM. _____	41
FIGURA 13. CROMATOGRAMA DA SOLUÇÃO APÓS EXPOSIÇÃO DE UMA AMOSTRA DE RANIVET 4 MG A 55 °C POR 72 H. CONDIÇÕES DE ANÁLISE, VIDE CROMATOGRAMA DA FIG. 11. _____	42

- FIGURA 14. CROMATOGRAMA DA SOLUÇÃO APÓS EXPOSIÇÃO DE UMA AMOSTRA DE RANIVET 8 MG DILUÍDA EM ACETONITRILA À RADIAÇÃO UV A 365 NM POR 24 H A 25 °C. CONDIÇÕES DE ANÁLISE, VIDE CROMATOGRAMA DA FIG. 11. _____ 43
- FIGURA 15. CROMATOGRAMAS DAS SOLUÇÕES OBTIDAS APÓS DEGRADAÇÃO EM MEIO BÁSICO DE RANIVET 80 MG POR 12 H A 25 °C. CONCENTRAÇÃO DA SOLUÇÃO DE NaOH (A) 0,5 mol L⁻¹, (B) 1,0 mol L⁻¹ E (C) 2,0 mol L⁻¹. CONDIÇÕES DE ANÁLISE, VIDE CROMATOGRAMA DA FIG. 11. _____ 44
- FIGURA 16. ESTRUTURAS QUÍMICAS DOS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO INFERIDOS NOS CROMATOGRAMAS DAS SOLUÇÕES DEGRADADAS DE RANIVET. (A) (Z)-N,N-BIS {2-[(5-[(DIMETILAMINO)METIL]FURAN-2-IL}METIL)SULFANIL]ETIL}-2-NITROETENO-1,1-DIAMINA; (B) 2-[(5-[(DIMETILAMINO)METIL]FURAN-2-IL}METIL)SULFANIL]ETANAMINA; (C) (Z)-N-{2-[(5-[(DIMETILAMINO)METIL]FURAN-2-IL}METIL)SULFINIL]ETIL}-N'-METIL-2-NITROETENO-1,1-DIAMINA; (D) {5-[(DIMETILAMINO)METIL]FURAN-2-IL}METANOL; (E) ((2E)-2-(HIDROXIIMINO)-N-METIL-5,6-DIIDRO-2H-1,4-TIAZIN-3-AMINA). _____ 45
- FIGURA 17. CROMATOGRAMAS DAS SOLUÇÕES OBTIDAS APÓS DEGRADAÇÃO EM MEIO ÁCIDO DE RANIVET 8 MG POR 12 H A 25 °C. CONCENTRAÇÃO DA SOLUÇÃO DE HCl (A) 0,5 mol L⁻¹, (B) 1,0 mol L⁻¹ E (C) 2,0 mol L⁻¹. CONDIÇÕES DE ANÁLISE, VIDE CROMATOGRAMA DA FIG. 11. _____ 46
- FIGURA 18. CROMATOGRAMAS DAS SOLUÇÕES OBTIDAS APÓS DEGRADAÇÃO EM MEIO OXIDATIVO DE RANIVET 8 MG POR 5 H A 25 °C. CONCENTRAÇÃO DA SOLUÇÃO DE H₂O₂ (A) 3,0 % v/v, (B) 7,5 % v/v E (C) 15,0 % v/v. CONDIÇÕES DE ANÁLISE, VIDE CROMATOGRAMA DA FIG. 11. _____ 47
- FIGURA 19. CROMATOGRAMAS DAS SOLUÇÕES OBTIDAS APÓS DEGRADAÇÃO EM MEIO OXIDATIVO DE RANIVET 8 MG POR 12 H A 25 °C. CONCENTRAÇÃO DA SOLUÇÃO DE H₂O₂ (A) 3,0 % v/v, (B) 7,5 % v/v E (C) 15,0 % v/v. CONDIÇÕES DE ANÁLISE, VIDE CROMATOGRAMA DA FIG. 11. _____ 49
- FIGURA 20. CROMATOGRAMAS DAS SOLUÇÕES OBTIDAS APÓS DEGRADAÇÃO EM MEIO ÁCIDO DE RANIVET 8 MG POR 0,5 H A 75 °C. CONCENTRAÇÃO DA SOLUÇÃO DE HCl (A) 0,5 mol L⁻¹, (B) 1,0 mol L⁻¹ E (C) 2,0 mol L⁻¹. CONDIÇÕES DE ANÁLISE, FIG. 11. _____ 50
- FIGURA 21. CROMATOGRAMAS DAS SOLUÇÕES DE DEGRADAÇÃO EM MEIO ÁCIDO DE RANIVET 8 MG POR 0,5 H A 75 °C EM HCl 2,0 mol L⁻¹ E PADRÃO DE NDMA A 25 µg mL⁻¹. CONDIÇÕES DE ANÁLISE, VIDE CROMATOGRAMA DA FIG. 11. _____ 51
- FIGURA 22. CROMATOGRAMAS DAS SOLUÇÕES OBTIDAS APÓS DEGRADAÇÃO EM MEIO BÁSICO DE RANIVET 8 MG POR 0,5 H A 75 °C. CONCENTRAÇÃO DA SOLUÇÃO DE NaOH (A) 0,5 mol L⁻¹, (B) 1,0 mol L⁻¹ E (C) 2,0 mol L⁻¹. CONDIÇÕES DE ANÁLISE, VIDE CROMATOGRAMA DA FIG. 11. _____ 52
- FIGURA 23. CROMATOGRAMAS DAS SOLUÇÕES DE DEGRADAÇÃO EM MEIO ÁCIDO DE RANIVET 8 MG POR 0,5 H A 75 °C EM HCl 2,0 mol L⁻¹ E PADRÃO DE NDMA A 25 µg mL⁻¹. CONDIÇÕES DE ANÁLISE, VIDE CROMATOGRAMA DA FIG. 11. _____ 53

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ACN	Acetonitrila
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
DAD	Detector por arranjo de diodos
DMA	Dimetilamina
EMA	<i>European Medicines Agency</i>
ETE	Estação de tratamento de esgoto
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
HILIC	<i>hydrophilic interaction liquid chromatography</i>
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
ICH	<i>International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use</i>
IFA	Insumo Farmacêutico Ativo
NDMA	N-nitrosodimetilamina
OMS	Organização Mundial de Saúde
PD	Produtos de degradação
RANI	Cloridrato de Ranitidina
UE	União Europeia
UR	Umidade relativa
USP	<i>United States Pharmacopeia</i>
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 ÓRGÃOS REGULADORES DA QUALIDADE DOS MEDICAMENTOS	16
1.1.1 ANVISA	16
1.1.2 ICH	17
1.2 ESTABILIDADE DOS MEDICAMENTOS	17
1.3 ENSAIOS DE ESTABILIDADE DE FÁRMACOS	19
1.3.1 Estudo de degradação forçada	19
1.4 CLORIDRATO DE RANITIDINA	20
1.5 N-NITROSODIMETILAMINA (NDMA)	22
1.6 FORMAÇÃO DE NDMA A PARTIR DO CLORIDRATO DE RANITIDINA	25
2 OBJETIVOS	30
3 EXPERIMENTAL	31
3.1 MATERIAIS, SOLVENTES E PADRÕES	31
3.2 PROCESSAMENTO DO MEDICAMENTO DE CLORIDRATO DE RANITIDINA	31
3.3 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO ANALÍTICO POR CLAE-DAD	32
3.4 PREPARO DAS SOLUÇÕES PARA O ESTUDO DA DEGRADAÇÃO FORÇADA	32
3.5 ESTUDO DE DEGRADAÇÃO FORÇADA DO CLORIDRATO DE RANITIDINA	33
3.5.1 Degradação induzida por ácido	33
3.5.2 Degradação induzida por base	33
3.5.3 Degradação induzida por peróxido de hidrogênio	34
3.5.4 Degradação térmica e fotolítica	34
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
4.1 PREPARO DAS AMOSTRAS DE COMPRIMIDOS RANIVET	35
4.2 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO DE ANÁLISE POR CLAE-DAD	35
4.2.1 Modo de eluição por gradiente	38
4.3 ESTUDO DA DEGRADAÇÃO FORÇADA DE COMPRIMIDOS DE RANIVET	40
4.3.1 Termólise	41

4.3.2 Degradação a partir da radiação UV a 365 nm	42
4.3.3 Degradação em meio básico	43
4.3.4 Degradação em meio ácido	46
4.3.5 Degradação em meio oxidativo	47
4.3.6 Formação de NDMA a partir da ranitidina em condições de estresse sob aquecimento	50
4.4 AVALIAÇÃO DOS MÉTODOS DE DEGRADAÇÃO PARA A GERAÇÃO DE IMPUREZAS	54
5 CONCLUSÕES	56
REFERÊNCIAS	58

1 INTRODUÇÃO

Desde a aurora da humanidade houve abundantes métodos para o tratamento de severas doenças físicas ou mesmo mentais. No contexto das sociedades primitivas, em que a religião era o único método de explicação do desconhecido, doenças e suas respectivas curas eram oriundas de forças divinas, não relacionadas ao corpo (SILVA, 2014). Embasados em suas crenças, essas culturas primitivas exploravam as paisagens botânicas que as cercavam, identificando e utilizando plantas, fungos e até animais com propriedades medicinais como seus medicamentos. Acredita-se que os primeiros registros do uso de plantas medicinais na cura provêm do livro Pen Ts'ao, de 2800 a.C., no qual o imperador mitológico “ShenNung” descrevia diversas plantas da China e como poderiam ser utilizadas no tratamento de várias moléstias (ALMEIDA, 2011). A utilização e vantagem das drogas de origem vegetal é fato desde as mais antigas civilizações. Os Egípcios eram um dos povos mais famosos pelos seus conhecimentos medicinais, sempre atrelados à sua religião. Junto ao seu deus Imhotep (deus da cura) e sob sua proteção, eles desenvolveram fórmulas, procedimentos cirúrgicos e registraram tudo em papiros, como o "Papiro de Ebers", "Aqui começa o livro da produção dos remédios para todas as partes do corpo humano..." (ALMEIDA, 2011).

A história dos primeiros medicamentos reflete a transição de curas naturais para formulações mais refinadas, marcando o início da farmacologia como disciplina científica. Porém, somente por volta do século XIX que foi proposto o primeiro tratado de toxicologia, junto a criação dos primeiros laboratórios farmacêuticos, dando início à moderna farmacologia (CRF/SP, 2024). Na França e Alemanha, assente as pesquisas desenvolvidas, formou-se um conceito fundamental em farmacologia, de que o organismo humano possuía receptores para as drogas, mesmo não compreendendo intrinsecamente os motivos (BITTENCOURT *et al.*, 2013). Ao início do século seguinte, o governo federal dos Estados Unidos desenvolveu a primeira agência de proteção ao consumidor a FDA (*Food and Drug Administration*) com a função de regularizar o registro e determinar os critérios de qualidade dos medicamentos comercializados a população (BITTENCOURT *et al.*, 2013). Na década de 1940 houve uma inserção massiva de novos fármacos à população, o que possibilitou a cura de enfermidades que até o momento eram fatais. A produção em escala industrial, a intensa propaganda e o avanço nas pesquisas de novos fármacos geraram uma nova crença da sociedade em relação aos poderes dos medicamentos.

Todavia, a popularização dos novos medicamentos trouxe consigo a possibilidade de reações adversas. Aliada à elevada automedicação – muitas vezes feita sem acompanhamento médico profissional –, persiste uma falta de clareza quanto ao funcionamento e às contraindicações

desses fármacos. Complementar a tais fatos, possíveis complicações na própria produção farmacêutica tornaram-se pauta. Alguns episódios de reações adversas fomentaram a conscientização da necessidade de quantificar e prevenir os efeitos indesejáveis provocados por medicamentos.

No ano de 2018, um episódio a nível mundial revelou uma falha no controle de impurezas na indústria farmacêutica, que resultou na presença de compostos potencialmente tóxicos, N-nitrosaminas foram detectadas como impurezas em vários medicamentos (AGLIO *et al.*, 2022). A FDA inicialmente acreditava que a formação de nitrosaminas, no caso dos medicamentos da família dos sartanas, estava limitada ao processo de fabricação da substância ativa. No entanto, em 2019, a agência foi alertada sobre níveis elevados de N-nitrosodimetilamina (NDMA) na ranitidina. Conforme novas análises foram surgindo, ficou evidente que os níveis de NDMA na substância ativa e nos produtos farmacêuticos de ranitidina poderiam aumentar após a fabricação, especialmente em temperaturas de armazenamento mais altas (FDA, 2019). Essa descoberta levantou dúvidas sobre o potencial de surgimento de NDMA durante o transporte e preocupações sobre o aumento de sua concentração com o vencimento do prazo de validade dos medicamentos (HARMON, 2023).

A estabilidade de produtos farmacêuticos pode ser influenciada por diversos fatores ambientais, sendo essencial o controle e armazenamento adequado para assegurar a segurança e eficácia dos medicamentos. Para avaliar a estabilidade dos produtos farmacêuticos são realizados diversos estudos de degradação, dentre eles os de degradação forçada, os quais envolvem a exposição do Insumo Farmacêutico Ativo (IFA) e do produto finalizado a condições de estresse. Esses estudos têm como objetivo simular a formação de produtos de degradação (PD) que podem ocorrer ao longo do ciclo de vida do medicamento, utilizando condições controladas que incluem fatores como temperatura elevada, luz, umidade, hidrólise ácida ou básica e oxidação. Por meio desses testes, é possível obter evidências sobre como a qualidade do produto varia ao longo do tempo sob a influência desses fatores, permitindo a determinação do prazo de validade as condições de armazenamento adequadas (ICH, 2003).

A realização dos estudos de degradação forçada deve seguir as diretrizes estabelecidas pelos órgãos regulatórios competentes. No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) é o órgão responsável por regulamentar e supervisionar esses processos, garantindo que os medicamentos comercializados atendam aos padrões de qualidade, segurança e eficácia exigidos.

1.1 Órgãos reguladores da qualidade dos medicamentos

Os parâmetros de qualidade dos medicamentos no Brasil são estabelecidos pela Resolução RDC nº53, 04 de dezembro de 2015: notificação, identificação e qualificação de produtos de degradação em medicamentos com substâncias ativas sintéticas e semissintéticas, definida e publicada pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) (BRASIL, 2015). As últimas atualizações da RDC nº53/2015 foram feitas no início do ano de 2025 pela RDC nº964. Além dessas, outros documentos de referência como o guia publicado pelo ICH (*International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use*) também são utilizados para a qualificação de impurezas e produtos de degradação em medicamentos sintéticos é o (ICH, 2003; BRASIL, 2015). No Ocidente, destacam-se importantes órgãos reguladores, como a FDA (*Food and Drug Administration*), dos Estados Unidos, e a EMA (*European Medicines Agency*), da União Europeia. Ambas são referências globais no controle de qualidade, segurança e eficácia de medicamentos, além de desempenharem um papel central no âmbito do ICH. Juntas, essas agências estabelecem padrões rigorosos para aprovação de novos tratamentos e lideram iniciativas de harmonização regulatória por meio do ICH, facilitando o desenvolvimento e a padronização de testes clínicos em escala internacional.

1.1.1 ANVISA

No Brasil, a ANVISA é a autoridade responsável pelo registro de medicamentos em todo o território. Conforme a Lei nº 5.991/1973, medicamento é definido como qualquer produto farmacêutico, tecnicamente desenvolvido ou elaborado, com finalidade profilática, curativa, paliativa ou diagnóstica. Assim, qualquer produto que apresente alegações terapêuticas, independentemente de sua origem (vegetal, animal, mineral ou sintética), é classificado como medicamento e deve ser registrado na ANVISA para que a fabricação e comercialização sejam autorizadas (BRASIL, 2018).

De acordo com o artigo 12 da Lei nº 6.360/1976, produtos sujeitos ao registro como medicamentos não podem ser industrializados, comercializados ou disponibilizados ao consumo antes de obterem a devida autorização junto à ANVISA. Para o registro e posterior comercialização de um medicamento, é imprescindível que a Agência analise a documentação administrativa e técnico-científica referente à qualidade, segurança e eficácia do produto.

Destaca-se que a ANVISA é considerada uma autoridade reguladora de referência, alinhada às melhores práticas internacionais. Essa atuação fortalece os padrões regulatórios e garante que

todos os medicamentos disponibilizados à população e aos profissionais de saúde atendam aos critérios de qualidade, segurança e eficácia, promovendo o uso terapêutico adequado e custo-efetivo (ANVISA, 2018).

1.1.2 ICH

A necessidade por uma regulamentação internacional foi reconhecida na década de 1980 pioneiramente pela Comunidade Europeia. Os Estados Unidos, Europa e Japão começaram a discutir as possibilidades de harmonização das normatizações dos parâmetros de qualidade dos medicamentos, mas foi somente em uma conferência organizada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) em 1989 para Autoridades de Regulamentação de Medicamentos que os planos começaram a serem discutidos (BRANCH, 2005; ICH, 2003).

O ICH foi criado em 1990 como uma iniciativa conjunta entre autoridades reguladoras e a indústria farmacêutica. Seu principal objetivo era harmonizar os requisitos técnicos para o registro de medicamentos, promovendo a eficiência no desenvolvimento e na aprovação de medicamentos de alta qualidade, seguros e eficazes em âmbito global. A ANVISA representa o Brasil no ICH e participa de suas reuniões e grupos de trabalhos (BRANCH, 2005).

O ICH desenvolve guias orientadores (*guidelines*) divididas em:

- Qualidade
- Segurança
- Eficácia
- Multidisciplinaridade

Estes guias são elaborados em colaboração das autoridades reguladoras de diferentes partes do mundo junto as maiores indústrias farmacêuticas.

1.2 Estabilidade dos medicamentos

A Farmacopeia Americana (USP, *United States Pharmacopeia*) descreve a estabilidade de um medicamento como o intervalo de tempo durante o qual um produto mantém, dentro de limites definidos, ao longo de todo o seu período de armazenamento e uso, as propriedades e características que possuía no momento de sua fabricação. A Tabela 1 descreve os tipos de estabilidades avaliados e os fatores que influenciam a desestabilização de um medicamento (BHANGARE *et al.*, 2022; USP, 2012).

Tabela 1. Tipos de estabilidades com sua descrição e fatores principais definidos pela Farmacopeia Norte-americana (USP, 2012).

Tipo de Estabilidade	Descrição	Fatores Principais
Química	Capacidade do fármaco em manter sua identidade molecular e conformação espacial. Envolve a resistência a reações químicas que possam alterar sua estrutura.	Temperatura, umidade, luz e pH
Física	Manutenção das propriedades físicas originais do fármaco, como aparência, sabor, uniformidade, dissolução e suspensão.	Vibrações, impactos, variações de temperatura e umidade
Toxicológica	Caracterizada pela possibilidade de decomposição do fármaco, resultando em produtos com toxicidade aumentada.	Derivados da substância ativa e excipientes.
Microbiológica	Refere-se à esterilidade ou resistência ao crescimento bacteriano do produto farmacêutico. Envolve a prevenção de contaminação microbiana.	Fatores similares à estabilidade toxicológica, como condições de armazenamento e embalagem.
Terapêutica	Garante que as alterações físicas, químicas, microbiológicas ou tecnológicas não afetem a ação farmacológica do produto. Mantém a eficácia terapêutica ao longo do tempo.	Modificações físicas, químicas, microbiológicas ou tecnológicas.

Fonte: Adaptado de (BHANGARE *et al.*, 2022).

Os estudos de estabilidade química representam a base para garantir a eficácia e segurança dos medicamentos durante todo seu ciclo de vida. A degradação das propriedades químicas pode comprometer não apenas a atividade terapêutica do fármaco, mas também desencadear alterações em suas demais características essenciais. A maioria dos medicamentos consiste em pequenas moléculas orgânicas, cuja estrutura e funcionalidade dependem de grupos funcionais específicos. Esses grupos podem estar suscetíveis às reações químicas, como oxidação e hidrólise, que podem levar à degradação do fármaco e, conseqüentemente, à perda de sua potência terapêutica e/ou levar à geração de produtos de degradação. O conhecimento dessas reações permite orientar o armazenamento adequado dos medicamentos, como o uso de frascos âmbar para proteger contra a luz ou a adição de antioxidantes nas formulações. Ademais, entender a estabilidade química de medicamentos torna-se essencial em situações práticas, como o tempo de uso do medicamento, as condições de armazenamento e a exposição a umidade e outras condições ambientais (SNAPE *et al.*, 2010).

1.3 Ensaios de estabilidade de fármacos

No decorrer da fabricação e ao longo do prazo de validade, os medicamentos estão sujeitos a reações químicas que inevitavelmente alteram a estrutura do fármaco ou dos demais componentes de formulação. Essas modificações resultam na geração de impurezas relacionadas. Os produtos de degradação formados, assim como quaisquer outras impurezas presentes no medicamento, devem ser rigorosamente investigados para garantir que suas concentrações não excedam níveis que comprometam a eficácia ou a segurança do uso do medicamento (COSTA *et al.*, 2018).

Devido à grande variabilidade climática, foi necessário criar subdivisões do planeta de acordo com as diferentes especificações de temperatura e umidade, para possibilitar a comercialização dos produtos em outras zonas climáticas. Para os ensaios de estabilidade de fármacos realizados no Brasil, de zona climática IV, as indústrias farmacêuticas seguem a RE nº 1/2005 da ANVISA que define três estudos:

- ✓ Estudo de Estabilidade Acelerada ou de Degradação Forçada: visa acelerar a degradação química e/ou mudanças físicas de um produto farmacêutico em condições forçadas de armazenamento. Os dados obtidos, juntamente com aqueles derivados dos estudos de longa duração, são usados para avaliar efeitos químicos e físicos prolongados em condições não aceleradas e para avaliar o impacto de curtas exposições a condições fora daquelas estabelecidas no rótulo do produto, que podem ocorrer durante o transporte e armazenagem.
- ✓ Estudo de Estabilidade de Longa Duração: visa verificar as características físicas, químicas, biológicas e microbiológicas de um produto farmacêutico durante e, opcionalmente, depois do prazo de validade esperado. Os resultados são usados para estabelecer ou confirmar o prazo de validade e recomendar as condições de armazenamento.
- ✓ Estudo de Estabilidade de Acompanhamento: visa verificar se o produto farmacêutico mantém suas características físicas, químicas, biológicas, e microbiológicas conforme os resultados obtidos nos estudos de estabilidade de longa duração.

1.3.1 Estudo de degradação forçada

O estudo de Estabilidade Acelerada ou de Degradação Forçada permite a geração de produtos de degradação através da exposição do insumo farmacêutico ativo e produto acabado às condições mais severas que um fármaco pode encontrar durante sua fabricação, armazenamento e

uso (BRASIL, 2015). Trata-se de um elemento essencial no processo de desenvolvimento de medicamentos, sendo reconhecido como uma ferramenta fundamental para a avaliação preliminar da estabilidade do produto. Isso é particularmente relevante quando as informações disponíveis sobre os potenciais produtos de degradação de um insumo farmacêutico ativo ou de um produto acabado são limitadas (COSTA *et al.*, 2018).

O perfil de degradação é um mapeamento completo das substâncias que se formam quando um fármaco ativo ou um medicamento é submetido a condições que aceleram sua decomposição, como altas temperaturas, pH extremos ou umidade elevada. Essas substâncias, chamadas de produtos de degradação, podem surgir em função do tempo de exposição a essas condições (BRASIL, 2015).

Tal estudo permite o desenvolvimento de métodos indicativos de estabilidade com especificidade e seletividade adequada, bem como fornecer informações acerca das possíveis rotas de degradação de um determinado produto (BRASIL, 2015).

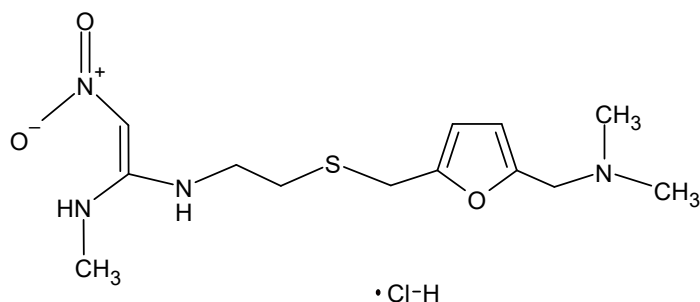
1.4 Cloridrato de ranitidina

Popularmente conhecida pelo nome original comercial Zantac, a ranitidina foi primeiramente desenvolvida pela *Glaxo Holdings Ltd.*, empresa biofarmacêutica, e aprovada pela FDA (*Food and Drug Administration*) para tratamento de curto prazo de uma condição comundo de úlceras gástricas (FDA, 2019). Em poucos anos de seu lançamento, por volta de 1988, o Zantac se tornou um dos primeiros medicamentos a ultrapassar US\$ 1 bilhão em vendas anuais. Em 1997, com a expiração da patente da *Glaxo*, tornou-se possível a produção de versões genéricas da droga por empresas concorrentes (CBC NEWS, 2019).

Dotado de alta seletividade e rápido início de ação, o cloridrato de ranitidina é um antagonista seletivo dos receptores histamínicos H₂. Os receptores H₂ são proteínas localizadas principalmente nas células parietais do estômago, esses são ativados pela histamina, um neurotransmissor que, ao se ligar aos receptores, estimulam a secreção do ácido gástrico. O medicamento age de forma competitiva e seletiva bloqueando os receptores H₂, inibindo os efeitos da histamina. Apresentando uma ação prolongada, uma única dose de 150 mg da ranitidina, é capaz de suprimir eficazmente a secreção ácida do estômago por até doze horas (BULA EMS, [s.d.]). Estudos controlados por placebo demonstram a eficácia da ranitidina 150 mg duas vezes ao dia no aumento da taxa de cicatrização de úlceras gástricas. A taxa de cicatrização com ranitidina variou de 59 a 76 % após 3 a 4 semanas de tratamento, enquanto com placebo, a taxa de cicatrização foi de 23 a 44 % (BROGDEN *et al.*, 1982). Em outros ensaios de curto e longo prazo no tratamento

de úlceras pépticas, e em pacientes tratados por períodos mais prolongados, a ranitidina na dose de 100 a 150 mg duas vezes ao dia mostrou-se bem tolerada. Efeitos adversos, como erupção cutânea, dor de cabeça e tontura, foram reportados em um total de 3 % dos pacientes (BROGDEN *et al.*, 1982). A estrutura química da ranitidina está apresentada na Figura 1.

Figura 1. Estrutura química do cloridrato de ranitidina.



Fonte: Próprio autor.

Em 2018, a comunidade farmacêutica global foi confrontada com um grave problema de controle de qualidade quando a detecção de N-nitrosaminas - impurezas potencialmente carcinogênicas classificadas como "Grupo de Preocupação" (*Cohort of Concern*) - foi reportada em medicamentos da classe das Sartanas (anti-hipertensivos) e, posteriormente, na Metformina (hipoglicemiante) (AGLIO *et al.*, 2022). Esse episódio revelou falhas críticas nos processos de fabricação de substâncias ativas, particularmente na formação de nitrosaminas como subprodutos de síntese. As investigações regulatórias subsequentes estabeleceram critérios rigorosos para limites aceitáveis de nitrosaminas, considerando tanto a exposição diária tolerável quanto a dose terapêutica máxima de cada medicamento. O escândalo levou a uma revisão ampla dos processos farmacêuticos, resultando em 2019 na descoberta de N-nitrosodimetilamina (NDMA) em outros fármacos, incluindo a nizatidina e, mais significativamente, em diversos lotes de ranitidina (FDA, 2019). Testes realizados pela agência norte-americana detectaram níveis variáveis, porém inaceitáveis, de NDMA em formulações de ranitidina de diferentes fabricantes, culminando no *recall* (recolhimento em massa) global desses medicamentos em setembro de 2019 (YOKOO *et al.*, 2021).

Através dos dados apresentados na Tabela 2, evidenciam-se características relevantes sobre o perfil de metabolização e excreção do cloridrato de ranitidina, aspectos que corroboram sua importância em estudos de degradação forçada e avaliação de produtos secundários, como nitrosaminas.

Tabela 2. Porcentagem, forma de excreção e metabólitos formados pela Ranitidina.

	Forma inalterada (%)	Metabólitos		
Ranitidina	69 ± 6	N-óxido	S-óxido	desmetil ranitidina

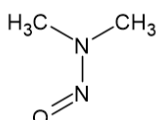
Fonte: Adaptado de (QUINTÃO, 2017).

Cerca de 70 % da ranitidina administrada é excretada de forma inalterada, conforme Tabela 2, o que reflete em uma alta estabilidade do fármaco no organismo, destacando sua dependência do sistema renal para eliminação e sugerindo que, grande parte do fármaco, é eliminada diretamente pelo organismo sem transformação, chegando ao ambiente, principalmente por meio de esgoto e estações de tratamento de águas. Em efluentes de várias ETEs (estação de tratamento de esgoto) na Itália, a ranitidina foi encontrada em concentrações com valores médios de 288,2 ng L⁻¹ (QUINTÃO, 2017). Tais concentrações elevadas em águas residuais poderiam explicar os importantes potenciais de formação de NDMA nessas águas. A presença de um conjunto de aminas terciárias e quaternárias que atuam como precursores de NDMA (por exemplo, agrotóxicos, produtos farmacêuticos e produtos de higiene pessoal) também poderia contribuir para os rendimentos gerais de NDMA observados em águas residuais (LE ROUX, 2012). Em torno de 30 % do medicamento é metabolizado, dando origem a alguns derivados como o N-óxido, um metabólito que levanta preocupações quanto à formação de compostos tóxicos, como as nitrosaminas, durante ou após seu metabolismo. Essas informações são essenciais para compreender os mecanismos de formação de subprodutos tóxicos, tanto *in vivo* quanto em condições simuladas de degradação, como em processos oxidativos avançados, reforçando o interesse no estudo da ranitidina frente à sua potencial contribuição para a geração de nitrosaminas em diferentes contextos.

1.5 N-nitrosodimetilamina (NDMA)

Os compostos N-nitrosados, como a N-nitrosodimetilamina evidenciada na Figura 2, são amplamente reconhecidos por suas propriedades teratogênicas, mutagênicas e carcinogênicas, constituindo uma série ameaça à saúde humana.

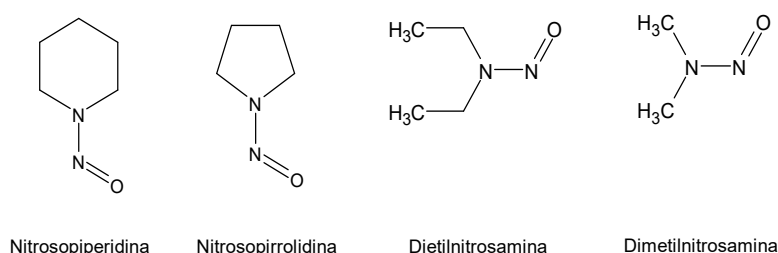
Figura 2. Estrutura química da N-nitrosodimetilamina.



Fonte: Próprio autor.

Embora a formação das N-nitrosaminas seja de grande diversidade de estrutura, as mais significativas, do ponto de vista de toxicologia alimentar, são as dialquilnitrosaminas, nitrosaminas cíclicas e acilalquil-nitrosaminas (ou nitrosamidas), evidenciadas na Figura 3. A presença de nitrosaminas em alimentos pode ser encarada como um típico problema ambiental, uma vez que compostos amplamente utilizados tanto na indústria alimentícia quanto na de fertilizantes e agrotóxicos, como nitratos, nitritos e diferentes aminas, são empregados para a conservação e produção de diversos produtos. O nitrato, por exemplo, é frequentemente adicionado em combinação com o nitrito em alimentos, atuando como conservantes, já que ele se reduz gradualmente em nitrito funcionando como uma reserva desse composto (ANTÓN *et al.*, 2001). A principal preocupação relacionada à presença de nitratos em alimentos e água potável está associada a dois aspectos: **efeitos toxicológicos**, decorrentes do consumo excessivo de nitratos na dieta; **formação endógena de compostos N-nitrosados**, como as nitrosaminas, que podem ocorrer no organismo humano a partir da reação entre nitritos e aminas, especialmente em condições ácidas, como no estômago.

Figura 3. Estruturas químicas das N-nitrosaminas mais tóxicas, do ponto de vista alimentar.



Fonte: Próprio autor.

As nitrosaminas, frequentemente desconhecidas e em concentrações de partes por bilhão, vêm, ao longo dos anos, exercendo sua ação carcinogênica e mutagênica em diversas espécies animais, incluindo o ser humano. A situação se agrava quando se constata que essa classe de compostos está presente em várias matrizes, podendo também ser formada de maneira endógena (*in vivo*) (SANCHES FILHO, 2002).

A formação endógena de compostos N-nitrosos inicia-se quando os nitratos são reduzidos a nitritos por microrganismos na cavidade oral. Esses nitritos, por sua vez, são transformados em óxido nítrico no estômago devido às condições presentes. Em circunstâncias específicas, como na gastrite crônica, os nitritos podem ser oxidados no estômago, originando agentes nitrosantes (como N_2O_3 e N_2O_4), os quais podem reagir para formar compostos N-nitrosos. Os compostos N-nitrosos

exógenos têm sido identificados em estudos clínicos como agentes causadores de tumores (SANCHES FILHO, 2002).

Para a população em geral, a principal via de exposição à NDMA ocorre por meio de sua produção endógena. Fontes exógenas de NDMA, às quais a população pode estar exposta, incluem alimentos, bebidas maltadas, água, fumaça de cigarro e, em menor escala, produtos de borracha, itens de higiene pessoal, cosméticos e agrotóxicos. Além da exposição de inúmeras pessoas por meio do uso de medicamentos contaminados antes de seu recolhimento do mercado farmacêutico.

A NDMA é gerada de forma endógena por meio de dois processos principais: a nitrosação catalisada por ácido, que ocorre principalmente no estômago, e a nitrosação biologicamente catalisada, que acontece em variados locais como a cavidade oral, intestino, fígado, sangue e bexiga. A velocidade da nitrosação ácida depende do pKa dos precursores de aminas no estômago, enquanto a nitrosação biologicamente catalisada é afetada pela concentração de aminoácidos que competem pelo nitrito (HRUDEY *et al.*, 2013). Acredita-se que a nitrosação sistêmica (biologicamente catalisada) seja a principal responsável pela produção endógena de NDMA, superando a nitrosação ácida, exceto em casos de ingestão dietética muito elevada de precursores de aminas e nitratos (HRUDEY *et al.*, 2013).

A exposição a NDMA tem sido associada a lesões hepáticas graves, em estudos realizados em animais, incluindo necrose hemorrágica, fibrose e cirrose. Os estudos sugerem ainda que a exposição oral pode causar mortalidade fetal ou neonatal. Além disso, a NDMA é reconhecida por seu potencial carcinogênico, estando associada a um maior risco de câncer gástrico, hepático, de bexiga e próstata em humanos, além da indução de tumores no fígado, pulmões, rins e testículos em modelos animais.

A NDMA é a dialquinitrosamina mais simples e um subproduto de diversas indústrias, sendo anteriormente utilizada na fabricação de produtos químicos e borracha (CANADA, 1999). Compostos N-nitrosos induzem câncer em diversas espécies animais, incluindo primatas, e os tumores observados são semelhantes aos humanos. Evidências experimentais e epidemiológicas indicam que esses compostos representam um risco para o desenvolvimento de cânceres como os de esôfago, estômago e nasofaringe em humanos (TRICKER; PREUSSMANN, 1991). Com base nesses achados, a Agência Internacional para Pesquisa sobre Câncer (IARC, *International Agency for Research on Cancer*) classificou a NDMA como "provavelmente carcinogênica para humanos" (Grupo 2A), ressaltando que, para fins práticos, deve ser considerada carcinogênica para humanos.

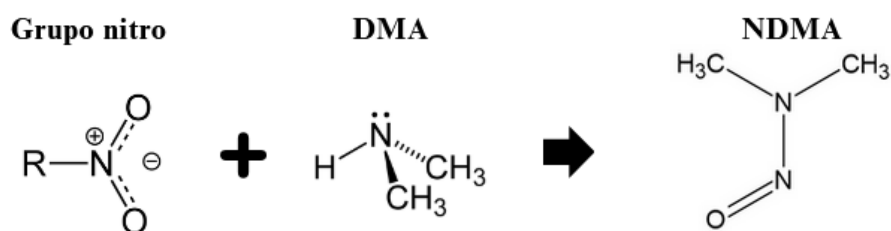
1.6 Formação de NDMA a partir do cloridrato de ranitidina

Análises realizadas pela agência de medicina europeia em lotes de ranitidina na UE (União Europeia) detectaram níveis de NDMA que geram preocupação. Os estudos *in vitro* indicaram que a NDMA pode ser formada a partir da ranitidina em meio ácido na presença de nitrito, sugerindo uma possível via de formação *in vivo*. Ademais, a NDMA pode ser gerada durante procedimentos analíticos que empregam temperaturas elevadas. Resultados preliminares evidenciam a presença de NDMA em alguns lotes, com indícios de que a dimetilamina (DMA) liberada da ranitidina, ao reagir com nitrito, pode produzir NDMA (EMA, 2020).

Outros diversos estudos têm sido publicados ao longo dos anos com o objetivo de elucidar os possíveis mecanismos predominantes para a formação de NDMA no medicamento à base de ranitidina. Até o momento, não há um método definitivo que descreva como esse composto é gerado, o que reforça a necessidade de uma avaliação crítica desses estudos para uma melhor compreensão dos possíveis mecanismos de formação envolvidos.

Um dos mais abrangentes estudos sobre a geração de NDMA foi conduzido por King *et al.* (2020). Os autores demonstraram que a NDMA é formada no IFA de ranitidina devido a uma reação de degradação intermolecular que ocorre sem a participação de impurezas externas, Figura 4. Os dados descartaram a possibilidade de uma reação intramolecular e comprovaram que o grupo nitro de uma molécula de ranitidina reage, em última instância, com o grupo dimetilamina (DMA) de outra molécula de ranitidina. (KING *et al.*, 2020).

Figura 4. Mecanismo reacional proposto para a formação de NDMA a partir da reação intermolecular da Ranitidina.



Fonte: Adaptado de (KING *et al.*, 2020).

Por meio de uma análise de dados de diferentes formulações de ranitidina produzidas entre 2010 e 2019, eles observaram um aumento gradual nos níveis de NDMA ao longo do tempo de exposição às condições de armazenamento. Após estudos de estabilidade acelerada observaram como tanto o aumento da temperatura quanto da umidade relativa (UR) aceleraram a taxa de formação de NDMA, os lotes foram armazenados por até 21 dias em temperaturas entre 50 e 80

°C e UR entre 10 e 80 %. A NDMA não havia sido detectada em lotes recém-fabricados, indicando que ela não é formada como uma impureza sintética durante o processo de fabricação nem introduzida como contaminante (KING *et al.*, 2020).

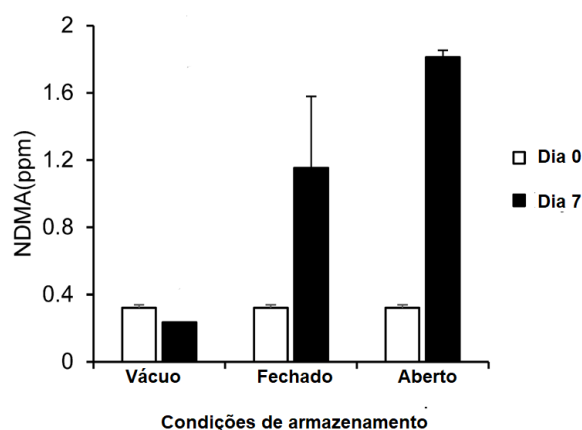
Segundo os pesquisadores, a taxa de formação de NDMA na ranitidina está diretamente associada à sua morfologia cristalina. Os lotes analisados apresentaram variações significativas nos resultados, sendo que os cristais colunares, formados quando a cristalização não envolve uma fase oleosa, exibiram a menor taxa de formação de NDMA. Essas diferenças sugerem que variações nas propriedades superficiais dos cristais podem facilitar a interação com a água, acelerando a degradação e, conseqüentemente, a formação de NDMA (KING *et al.*, 2020). Mesmo diante a abrangente pesquisa, nenhum mecanismo de reação foi possível de ser proposto para descrever como a DMA ou o íon nitrito poderiam ser clivados da ranitidina, nem como a formação da nova ligação N-NO ocorre para gerar a NDMA (HARMON, 2023).

Durante a produção de medicamentos, é comum a geração de impurezas a partir dos próprios IFAs, seja por degradação, reações secundárias ou interações durante o processo de fabricação. As principais agências reguladoras, como a Anvisa (Brasil), FDA (Estados Unidos) e EMA (*European Medicines Agency*), catalogam e classificam essas impurezas com base em sua toxicidade e limite de aceitação, garantindo a segurança e a qualidade dos fármacos comercializados. A Farmacopeia Europeia (Ph. Eur.) e a Farmacopeia dos Estados Unidos (USP) listam 11 impurezas potenciais (A–K) que podem ser formadas durante a síntese e o armazenamento do cloridrato de ranitidina (YOKOO *et al.*, 2021), suas estruturas químicas estão apresentadas na Figura 5. O estudo conduzido por King *et al.* comprova que a formação de NDMA ocorre por meio da degradação entre as moléculas de ranitidina, ainda que o mecanismo exato desse processo não esteja completamente elucidado. Nesse contexto, a detecção de NDMA durante a estocagem do fármaco sugere que outras impurezas também podem contribuir para a geração dessa nitrosamina.

químicas do fármaco e da formulação) quanto extrínsecos (relacionados às condições ambientais). Dentre os fatores externos, destacam-se as condições de armazenamento, com ênfase na exposição simultânea à umidade, oxigênio atmosférico e elevação de temperatura.

Testes de estresse conduzidos com a ranitidina (RANI) em diferentes condições de condicionamento, incluindo recipientes abertos, fechados e selados a vácuo, demonstraram resultados significativos. Foi observado que as amostras armazenadas em embalagens hermeticamente seladas a vácuo apresentaram menor formação de NDMA quando comparadas às mantidas em frascos simplesmente fechados ou expostos ao ambiente (ABE *et al.*, 2020). Esses achados, ilustrados na Figura 6, comprovam que a formação da nitrosamina ocorre de forma mais acentuada quando o fármaco está sujeito à combinação de fatores considerados extremos, como exposição atmosférica (umidade e oxigênio) e condições elevadas de temperatura.

Figura 6. Estudo de degradação forçada do pó reagente de ranitidina armazenado em frascos de vidro hermeticamente fechados, tampados e expostos ao ambiente (abertos) a 60 °C/50 % de UR.



Fonte: Adaptado de (ABE *et al.*, 2020).

A exposição à atmosfera e a geração de nitrito proveniente da autodecomposição da ranitidina podem ter contribuído para a formação de NDMA durante o armazenamento. Embora não esteja completamente elucidado como exatamente os produtos de decomposição da ranitidina, incluindo o nitrito, participam das reações químicas que levam à formação de NDMA, a detecção desta nitrosamina em comprimidos de ranitidina durante o armazenamento torna necessária a implementação de medidas adicionais para controlar impurezas nitrosaminas relacionadas à estabilidade (ABE *et al.* 2020).

Neste trabalho, aborda-se a aplicação de um estudo de degradação forçada do cloridrato de ranitidina, considerando os fortes indícios de contaminação associados aos seus produtos de degradação, os quais apresentam alto potencial toxicológico para a saúde. Em virtude da proibição de comercialização de cloridrato de ranitidina no Brasil estabelecida pela Resolução-RE Nº 3.259,

de 26 de agosto de 2020, não foi possível a aquisição do medicamento. No entanto, o cloreto de ranitidina também apresentava uso veterinário e estava ainda disponível para comercialização em diferentes empresas especializadas. Assim, buscou-se investigar a formação de nitrosaminas a partir de ensaios de degradação forçada do cloridrato de ranitidina 80 mg para uso canino, empregando diferentes condições de estresse, como meio ácido, alcalino, irradiação UV, térmico e oxidante. Os produtos da degradação forçada foram analisados empregando-se a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência acoplado a um detector com arranjo de diodos para monitoramento da decomposição da ranitidina e a potencial formação de NDMA.

2 OBJETIVOS

O objetivo principal deste trabalho foi desenvolver uma metodologia para a avaliação da geração de N-nitrosodimetilamina (NDMA) e de outros produtos de degradação a partir de um estudo de degradação forçada do cloridrato de ranitidina por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjo de diodos.

Para alcançar o objetivo principal desta proposta, as seguintes etapas foram realizadas:

- ✓ Desenvolver um método de análise por cromatografia líquida de alta eficiência para identificar e quantificar a geração de nitrosaminas sem interferência de excipientes do medicamento;
- ✓ Realizar o estudo de degradação forçada do cloridrato de ranitidina com base no Guia sobre Estudos de Degradação Forçada em Medicamentos da ANVISA;
- ✓ Avaliar a geração de NDMA a partir de diferentes métodos de degradação forçada do cloridrato de ranitidina.

3 EXPERIMENTAL

3.1 Materiais, solventes e padrões

Os materiais, solventes e reagentes empregados para o estudo da degradação forçada do medicamento a base de cloridrato de ranitidina foram: Ranivet 80 mg (200 mg por comprimido), antiácido para cães e gatos (Coveli); acetonitrila grau cromatográfico 99,9 % (Êxodo Científica) e metanol grau cromatográfico 99,5 % (Êxodo Científica); NDMA, padrão analítico 99,9 % de pureza (Sigma-Aldrich). NaOH PA ACS micropérolas (Synth); HCl PA ACS 36 % (v/v) (Êxodo Científica); H₂O₂ PA 35% (ACS Reagent). Foram empregados equipamentos e materiais como: estufa (Biopar, modelo S150BA, Porto Alegre, Brasil); tubo Falcon de 15 mL; balança semi micro com precisão de 0,01 mg (Shimadzu, Kyoto, Japão); agitador vórtex (Kasvi, Pinhais, Brasil); centrífuga digital (Kasvi, modelo 4000); água ultrapurificada com resistividade maior que 18,2 MΩ cm em purificador MegaPurity modelo MEGA RO/UP (Rio de Janeiro, Brasil). Para a preparação da fase móvel, foram utilizadas membranas de Nylon® (Millipore®, Millford, CT, EUA) para filtração com porosidade de 0,22 µm e diâmetro de 45 mm; sistema de filtração de fase móvel; funil de placa sinterizada; bomba de vácuo (Prismatec, modelo 122 BCP, Itu, Brasil); kitassato de 500 mL, e; banho ultrassom (Quimis, Diadema, Brasil).

3.2 Processamento do medicamento de cloridrato de ranitidina

O cloridrato de ranitidina utilizado neste trabalho foi obtido a partir do medicamento veterinário RANIVET®. A princípio, considerando que cada comprimido possui 80 mg de Ranitidina e 200 mg de excipientes, cerca de 20 mg do medicamento (8 mg de ranitidina) foram pesados em balança analítica de 0,01 mg, após serem macerados com pistilo em grau de ágata para obtenção de um pó fino e homogêneo. A partir do produto completamente fragmentado, a devida armazenagem e identificação, prepararam-se diferentes soluções para início do estudo de degradação rápida.

Inicialmente, avaliou-se a solubilidade do comprimido. Cinco porções de 10 mg do cloridrato de ranitidina foram pesadas individualmente e transferidas para tubos de ensaio. A cada tubo, foi adicionado 1 mL de diferentes solventes: metanol, acetonitrila, água, etanol e acetona. Os tubos foram submetidos à agitação manual e, quando necessário, levados a um banho ultrassônico por 5 minutos. Posteriormente, avaliou-se visualmente uma notável dificuldade de solubilização

do fármaco devido a presença de diferentes excipientes no comprimido, um melhor desempenho na solubilização do fármaco foi observado para a acetonitrila e metanol.

3.3 Desenvolvimento do método analítico por CLAE-DAD

O método analítico presente neste trabalho foi desenvolvido em um cromatógrafo a líquido de alta eficiência da Waters[®], modelo Alliance com sistema quaternário de bombeamento e2695, equipado com detector por arranjo de diodos modelo 2998 PDA. O tratamento e processamento dos dados de análise foi realizado pelo software Empower3[®], a partir das separações das amostras sucedidas na coluna de aço inox Symmetry C₁₈ Column, 100 Å de porosidade, 5 µm de diâmetro de partícula, de 150 mm × 4,6 mm (marca Waters). Esta coluna apresenta fase estacionária constituída de C₁₈ quimicamente ligados monofuncionalmente em partículas de sílica de base desativada de alta pureza. Em relação à fase móvel, foi composta pela mistura acetonitrila:água (ACN:H₂O) no método de eluição gradiente. Tanto a água como a acetonitrila foram filtrados separadamente e colocadas em banho ultrassônico por 15 minutos, para remoção de gases dissolvidos, impedindo assim a formação de bolhas no sistema cromatográfico.

A análise foi realizada com detecção ultravioleta no comprimento de onda de 228 nm, comprimento de onda de máxima absorção da NDMA, conforme confirmado em literatura (MASADA *et al.*, 2019). Além disso, a varredura espectral (210-400 nm) foi habilitada durante a análise para confirmação do pico da NDMA e da ranitidina.

Para o desenvolvimento do método de análise, diferentes composições de fase móvel ACN:H₂O foram testadas no modo isocrático e no modo gradiente, de forma obter uma boa separação para os picos da NDMA e da ranitidina, dentro de um tempo de análise adequado.

3.4 Preparo das soluções para o estudo da degradação forçada

As soluções de hidróxido de sódio (NaOH), ácido clorídrico (HCl) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂) utilizadas nos experimentos foram preparadas conforme especificações técnicas, garantindo precisão na concentração e volume final. A solução de NaOH foi obtida pela dissolução de hidróxido de sódio sólido em água destilada. Para a solução de HCl utilizou-se de ácido clorídrico concentrado 36 % v/v e diluído quantitativamente em água destilada. Já a solução de peróxido de hidrogênio a 35% v/v foi preparada pela diluição do reagente H₂O₂ concentrado. Todas as soluções foram preparadas utilizando vidrarias devidamente calibradas e seguindo as normas de boas práticas laboratoriais.

3.5 Estudo de degradação forçada do cloridrato de ranitidina

Os ensaios presentes neste trabalho foram realizados com base no guia para estudos de degradação forçada em medicamentos e para a notificação, identificação e qualificação de produtos de degradação publicado e regulamentado pela ANVISA (ANVISA, 2015).

3.5.1 Degradação induzida por ácido

A princípio, 20 mg do comprimido macerado (contendo aproximadamente 8 mg de ranitidina) foram adicionados a béqueres previamente identificados, seguido da adição de 10 mL da solução de ácido clorídrico em concentrações de 0,5, 1,0 e 2,0 mol L⁻¹ em cada béquer devidamente identificado e em triplicata. Uma barra magnética foi inserida nos sistemas para agitação por 10 minutos. Após esse período, transferiu-se as soluções para tubos de ensaio (também identificados) e deixados em repouso à temperatura ambiente por 12 h. O procedimento foi repetido, alterando-se a condição de repouso, na qual a solução foi mantida em uma estufa a 75 °C por 0,5 h. Após a exposição da RANI ao meio ácido, as amostras foram neutralizadas com a adição gradual de aproximadamente 10 mL de solução de hidróxido de sódio em cada béquer. A concentração do hidróxido de sódio foi ajustada para corresponder às concentrações de ácido clorídrico previamente utilizadas, visando alcançar um pH final entre 5 e 8. As misturas foram homogeneizadas manualmente e alíquotas de 1,0 mL de cada amostra foram transferidas para *vials* apropriados para análise cromatográfica, após filtração com filtros Chromafil XTRA em teflon PTFE, diâmetro de 25mm e poro 0,45 µm, acoplados em uma seringa de 1 mL.

3.5.2 Degradação induzida por base

A etapa realizada em meio ácido foi replicada em condições básicas, ajustando-se os reagentes e parâmetros experimentais. Amostras de 20 mg de comprimido macerado (~8 mg de RANI) foram transferidas para béqueres contendo 10 mL da solução de hidróxido de sódio a 0,5; 1,0 e 2,0 mol L⁻¹. As soluções foram, então, transferidas para tubos de ensaio identificados e mantidas à temperatura ambiente por 12 h. O procedimento foi repetido utilizando condições térmicas controladas, mantendo as amostras em estufa a 75 °C por 0,5 h. Após os tempos de exposição, a neutralização foi conduzida com volumes correspondentes de solução de ácido

clorídrico a $2,0 \text{ mol L}^{-1}$, previamente calculados para equilibrar o pH das soluções. As misturas foram homogeneizadas manualmente, e alíquotas de 1,0 mL de cada amostra foram filtradas e transferidas para *vials* apropriados para análise cromatográfica.

3.5.3 Degradação induzida por peróxido de hidrogênio

A degradação realizada com peróxido de hidrogênio foi conduzida utilizando diferentes concentrações do agente oxidante. 20 mg do fármaco macerado foram adicionados em béqueres contendo soluções de peróxido de hidrogênio em concentrações de 3,0; 7,5 e 15,0 % (v/v). As soluções foram devidamente agitadas e transferidas para tubos de ensaio identificados e mantidas à temperatura ambiente por períodos de 12 h. O mesmo procedimento foi realizado para outras porções de 20 mg do fármaco, porém deixando as soluções em repouso por 5 h. Após os tempos de incubação, alíquotas de 1,0 mL de cada solução foram retiradas, filtradas e transferidas para frascos apropriados (*vials*), destinados à análise cromatográfica.

3.5.4 Degradação térmica e fotolítica

Para avaliar a degradação térmica da RANI, foram pesados 10 mg do comprimido macerado e adicionados em um vidro de relógio e submetidos à estufa a 55°C por um período de 72 horas. Após esse intervalo, o material foi dissolvido em 10 mL de acetonitrila para posterior análise. A degradação da RANI por fotólise foi investigada com cerca de 20 mg de comprimido macerados que foram adicionados a béqueres contendo 10 mL de acetonitrila, promovendo a dissolução do fármaco. A solução foi deixada sob exposição à luz ultravioleta por 24 h em uma caixa escura produzida em laboratório, empregando uma lâmpada UV com emissão em intensidade de 365 nm. Em seguida, alíquotas de 1,0 mL de cada solução foram filtradas e transferidas para *vials* para uso no cromatógrafo a líquido.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Preparo das amostras de comprimidos Ranivet

Os estudos de degradação forçada do cloridrato de ranitidina foram conduzidos conforme descrito na seção de Métodos, para tal, utilizou-se o medicamento Ranivet[®], cujos comprimidos continham cerca de 80 mg de ranitidina diluída e em torno de 200 mg de substâncias inativas (excipientes), como ligantes, desagregantes e outros aditivos (COVELI, s.d.). Em virtude da composição, a maceração dos comprimidos de ranitidina em pistilo de ágata tornou-se primordial para a análise, pois ela garantiu uma distribuição homogênea do princípio ativo no pó do comprimido, facilitando sua dissolução e gerando uma extração eficiente pelo solvente para a solução. Sem essa etapa, o acesso à ranitidina poderia não ser completo uma vez que a matriz sólida e altamente compactada do comprimido não seria dissolvida pelos solventes testados. A etapa seguinte consistiu na devida estocagem do pó finamente dividido para, em sequência, realizar a pesagem de 20 mg do produto macerado, o qual contém 8 mg do IFA.

Os ensaios de degradação forçada foram realizados diretamente no fármaco em pó e, quando necessário, após dissolução em ACN, solvente selecionado devido à sua comprovada eficiência de solubilização em testes preliminares. As soluções degradadas foram submetidas à filtração com filtros inertes de seringa, garantindo a remoção de excipientes particulados. Os resultados demonstraram eficácia no processo de degradação, com formação de pico cromatográfico bem resolvido e com tempo de retenção repetível do pico da RANI.

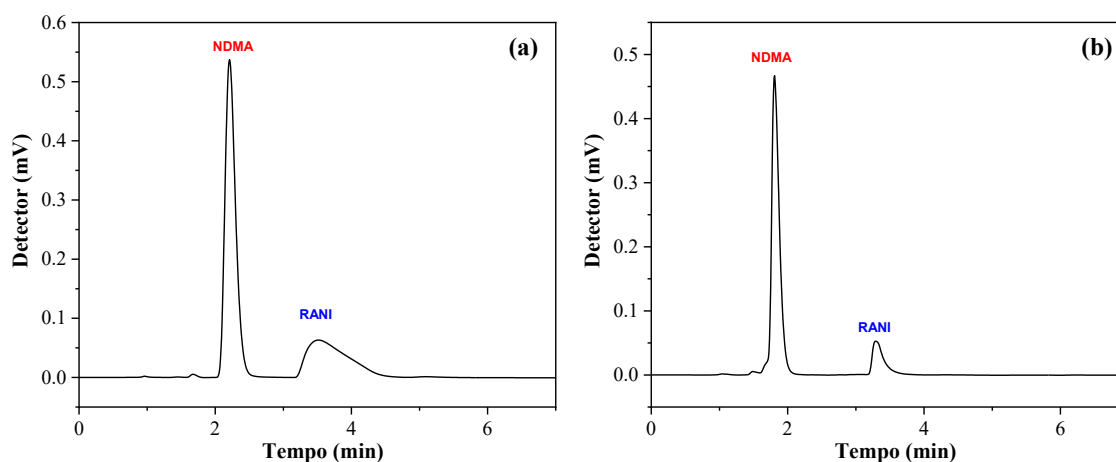
4.2 Desenvolvimento do método de análise por CLAE-DAD

A cromatografia líquida de alta eficiência com detector por arranjo de diodos é amplamente utilizada em análises qualitativas e quantitativas de compostos em misturas complexas. A combinação de CLAE-DAD possui a capacidade de medir a absorção de luz em diversas frequências, possibilitando a obtenção de espectros de absorção ao longo de todo o intervalo de comprimentos de onda durante a eluição dos componentes separados (CHURMS, 2005). Essa funcionalidade possibilita a identificação e a caracterização detalhada dos compostos gerados durante a degradação forçada da ranitidina, permitindo a correlação entre os comprimentos de onda de máxima absorção e os respectivos tempos de retenção. Para garantir que o equipamento cromatográfico entregasse os resultados esperados, com a devida separação e identificação dos

compostos analisados, foi necessário realizar uma série de testes sistemáticos, baseados em ajustes e otimizações da composição da fase móvel constituída de acetonitrila e água.

Inicialmente, os solventes que demonstraram maior eficiência na solubilização do comprimido (ACN e metanol) foram testados como fase móvel, em diferentes proporções, visando avaliar seu impacto na retenção e separação dos analitos. Esses ajustes foram conduzidos até que se alcançasse a condição mais eficiente para a separação do pico da ranitidina e do NDMA. A amostra padrão consistiu em uma mistura do padrão de NDMA a $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ e de solução de ranitidina a $25 \mu\text{g mL}^{-1}$. A princípio, a composição da fase móvel foi de 50 % de água e 50 % de metanol ou acetonitrila. As frações de cada solvente foram alteradas durante diferentes testes para melhorar a eficiência da separação. Concluiu-se após eluições em diferentes composições de metanol/acetonitrila e água, que acetonitrila apresentou melhor eficiência para eluição dos picos, resultando em picos mais finos e bem definidos para os dois compostos (Figura 7). A água foi selecionada como fase móvel inicial devido à sua alta polaridade, essencial para promover interações adequadas com compostos mais polares como a NDMA. Adicionalmente, a acetonitrila um solvente polar aprótico com força eluotrópica significativamente maior em comparação à água que desempenha um papel crítico nas análises (KOWALSKA *et al.*, 2018). Sua menor polaridade em comparação à água, associada à baixa reatividade com grupos amínicos (como os presentes em nitrosaminas), minimizou interferências químicas durante as etapas de separação e detecção. Além disso, a acetonitrila apresenta menor viscosidade comparada ao metanol, permitindo uma vazão da fase móvel com menor pressão de retorno.

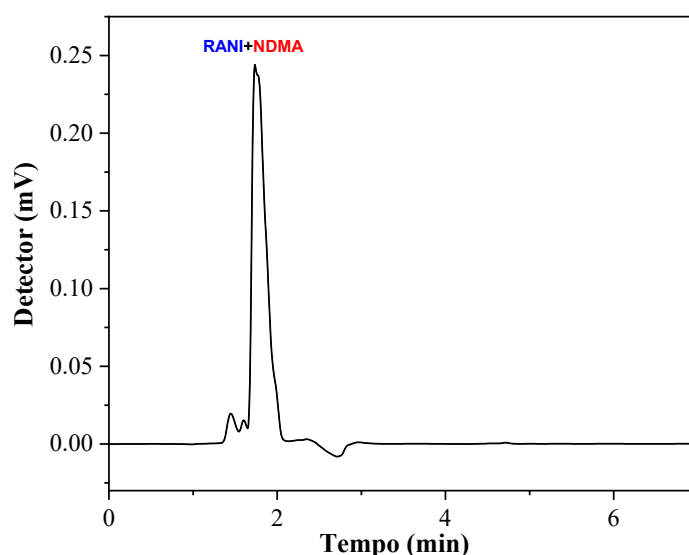
Figura 7. Cromatogramas da eluição da mistura padrão de RANI e NDMA, empregando fases móveis (a) MeOH:H₂O (50:50, v/v) e (b) ACN:H₂O (50:50, v/v); coluna C₁₈; vazão da fase móvel 1,0 mL min⁻¹; detecção DAD a 228 nm; injeção 10 μL .



Fonte: Próprio autor.

A coluna cromatográfica também foi avaliada nos estudos preliminares de separação da RANI e NDMA de acordo com as propriedades físico-químicas dos compostos em análise, sobretudo suas polaridades, ranitidina LogP 1,93 e NDMA LogP -0,57 (PUBCHEM, 2025). Esses valores de coeficiente de partição indicam que a ranitidina é um composto moderadamente polar enquanto a NDMA é altamente polar. Assim, inicialmente utilizou-se de uma coluna HILIC (*hydrophilic interaction liquid chromatography*) projetada para aumentar a retenção de compostos polares devido à sua fase estacionária altamente polar. Contudo, não foi possível alcançar a separação da RANI e da NDMA nessa coluna, uma vez que ambos os compostos eram eluídos muito rapidamente no início do cromatograma, Figura 8.

Figura 8. Cromatograma da eluição da mistura padrão de RANI e NDMA, empregando fase móvel ACN:H₂O (50:50, v/v); coluna HILIC; vazão da fase móvel 1,0 mL min⁻¹; detecção DAD a 228 nm; injeção 10 µL da mistura.

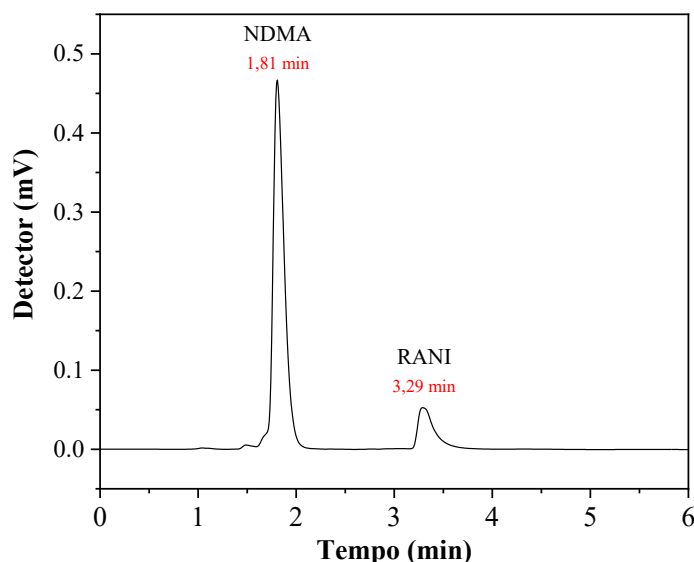


Fonte: Próprio autor.

Assim, utilizou-se uma coluna C₁₈, amplamente empregada em análises de compostos moderadamente polares devido à sua fase estacionária apolar, que interage bem com analitos de polaridades diversas. A coluna C₁₈ promoveu melhor separação dos dois compostos (Figura 9), contudo, verificou-se que a NDMA apresentou baixa retenção na fase estacionária (t_R 1,81 min), indicando que a nitrosamina analisada estava eluindo próximo ao tempo de volume morto (t_0) do sistema cromatográfico. Mesmo com maior porcentagem de água e sua substituição por uma solução aquosa de NH₄HCO₃ a pH 6,00 (para controle do pH) na composição da fase móvel a NDMA não ganhou retenção e o aumento da proporção de água resultava em picos da RANI menos eficientes, mais largos e assimétricos. Considerando que essa baixa retenção da NDMA na fase C₁₈ poderia provocar co-eluição com picos advindos da degradação da RANI. Assim, buscou-se

desenvolver um método de análise com eluição por gradiente da fase móvel, visando aumentar a retenção da NDMA e a eluição da RANI.

Figura 9. Cromatograma da eluição da mistura padrão de RANI e NDMA, empregando fase móvel ACN:H₂O (30:70, v/v); coluna C₁₈; vazão da fase móvel 1,0 mL min⁻¹; detecção DAD a 228 nm; injeção 10 µL da mistura.



Fonte: Próprio autor.

4.2.1 Modo de eluição por gradiente

Diante das limitações de separação observadas pelo método de análise no modo de eluição isocrático, optou-se por um método de eluição por gradiente, utilizando como componentes da fase móvel os solventes A (água) e C (acetonitrila). Após vários testes, o seguinte perfil de programação foi definido como fase móvel para separação da RANI e NDMA por CLAE-DAD, empregando coluna C₁₈:

- **Etapla inicial (0 a 6 min):** Composição isocrática 5:95 (C:A, v/v), visando a retenção adequada do NDMA.
- **Gradiente (6 a 10 min):** Transição de 5:95 para 100:0 (C:A), promovendo a eluição mais rápida da RANI por aumento da força eluotrópica.
- **Recondicionamento (10 a 12 min):** Retorno à composição inicial (5:95, C:A), garantindo a estabilização do sistema antes de uma nova injeção da amostra.

Tal estratégia foi desenvolvida com o objetivo de maximizar a eficiência cromatográfica de separação da RANI e NDMA, proporcionando uma resolução adequada entre os picos, impedindo co-eluições e assegurando a reprodutibilidade das análises. O reequilíbrio da coluna entre as corridas foi essencial para manter a estabilidade do método. Dessa forma, os analitos mais

polares foram eluídos inicialmente com a fase aquosa, enquanto os menos polares foram progressivamente separados à medida que a proporção de acetonitrila aumentava ao longo do gradiente. A composição gradiente para a separação da RANI e NDMA pode ser mais bem visualizada na Tabela 3.

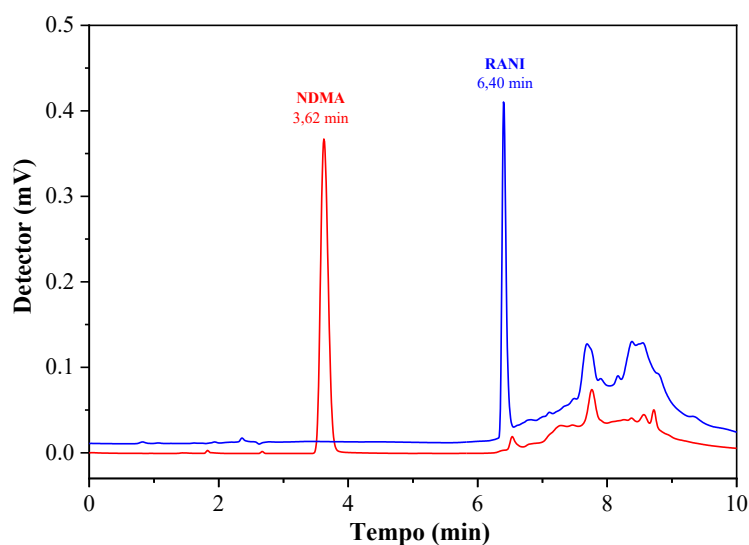
Tabela 3. Descrição do método gradiente utilizado para análise cromatográfica

Método gradiente			
Tempo (min)	Vazão (mL/min)	ÁGUA (%)	ACN (%)
0,0 – 6,0	1,0	95	5
6,0 – 10,0	1,0	0	100
10,0 – 12,0	1,0	95	5

Fonte: Próprio autor.

Com a implementação da eluição por gradiente otimizada, observou-se um aumento na distância entre os picos da NDMA e da RANI no cromatograma, bem como um significativo aumento no tempo de retenção dos analitos estudados. O sinal correspondente à NDMA dobrou, com um tempo de retenção de 3,62 minutos, enquanto o pico da RANI foi deslocado para um tempo maior de 6,40 minutos, porém eluindo mais simétrico e eficiente. Essas melhorias resultaram em uma análise mais adequada dos compostos de interesse. A Figura 10 apresenta uma comparação entre duas corridas com os padrões no método de gradiente definido. A sobreposição dos cromatogramas demonstra a excelente separação entre os compostos estudados.

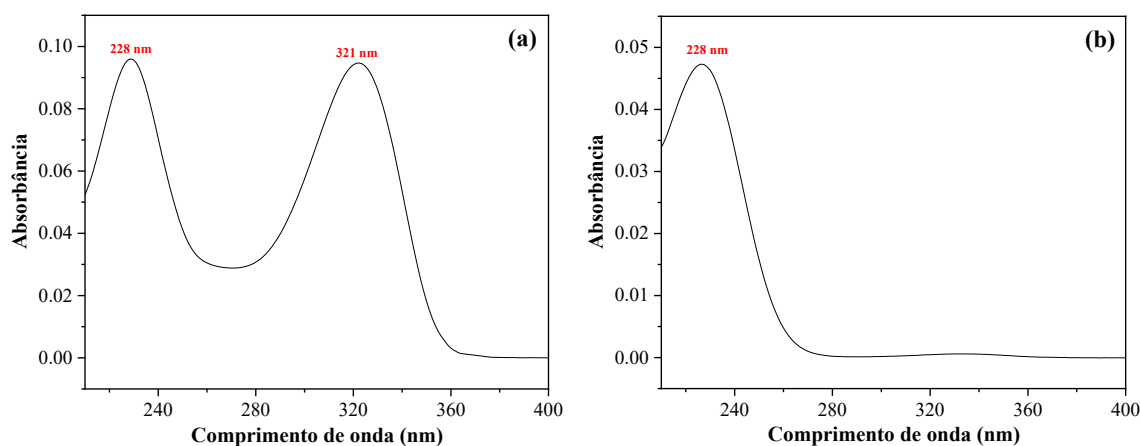
Figura 10. Cromatograma da eluição das soluções padrão de RANI e NDMA, empregando fase móvel ACN:H₂O no modo gradiente, conforme Tabela 3; coluna C₁₈; vazão da fase móvel 1,0 mL min⁻¹; detecção DAD a 228 nm (NDMA) e a 320 nm (RANI).



Fonte: Próprio autor.

Apesar de, na CLAE-DAD, não ser estritamente necessário saber previamente o comprimento de onda de máxima absorção (λ_{max}) do composto estudado, durante a análise foi possível realizar uma varredura em múltiplos comprimentos de onda, no caso entre 210 e 400 nm. Não obstante, utilizando soluções padrão de cada amostra foi possível observar e determinar seus respectivos λ_{max} : 228,6 nm para a solução padrão de NDMA e 320,0 nm para a solução padrão de ranitidina (Figura 11). Os espectros de absorção de ambos os compostos podem ser visualizado na Figura 11. O registro dos espectros de absorção UV da RANI e NDMA foram essenciais para posterior confirmação da identidade dos compostos nas amostras obtidas do estudo de degradação.

Figura 11. Espectros de absorção UV das soluções padrão de (a) RANI e (b) NDMA a 25 $\mu\text{g L}^{-1}$.



Fonte: Próprio autor.

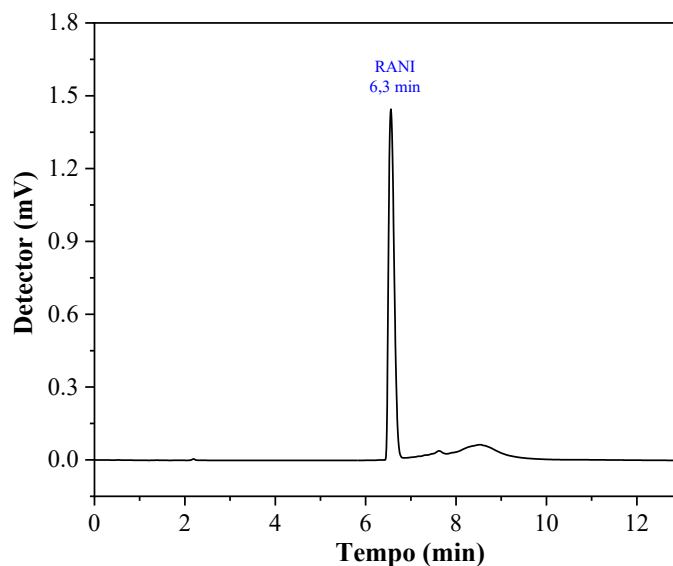
4.3 Estudo da degradação forçada de comprimidos de Ranivet

Os estudos de degradação forçada do cloridrato de ranitidina nos comprimidos de Ranivet® foram realizados perante as orientações do Guia nº 4, versão 1, de 04 de dezembro de 2015 da ANVISA (ANVISA, 2015). A variação nas concentrações das soluções de ácido, base e peróxido de hidrogênio foram realizadas a fim da avaliação da geração de nitrosaminas em diferentes níveis de concentração, observando assim, qual condição se destacava como a mais significativa para a geração dos produtos de degradação. Ademais, condições adicionais foram avaliadas como a elevação da temperatura no estudo de degradação, visando determinar a sua influência na geração de PDs.

Inicialmente foi realizada a análise da solução da amostra que foi submetida ao estudo de degradação, registrando o pico da ranitidina em 6,3 min, Figura 12. Pode-se observar também que

no cromatograma da amostra de Ranivet, o pico da ranitidina foi o único registrado, indicando que nenhum subproduto existia no início dos estudos de degradação.

Figura 12. Cromatograma da eluição de uma amostra diluída de Ranivet de 8 mg, empregando fase móvel ACN:H₂O no modo gradiente; coluna C₁₈; vazão da fase móvel 1,0 mL min⁻¹; detecção DAD 228 nm.

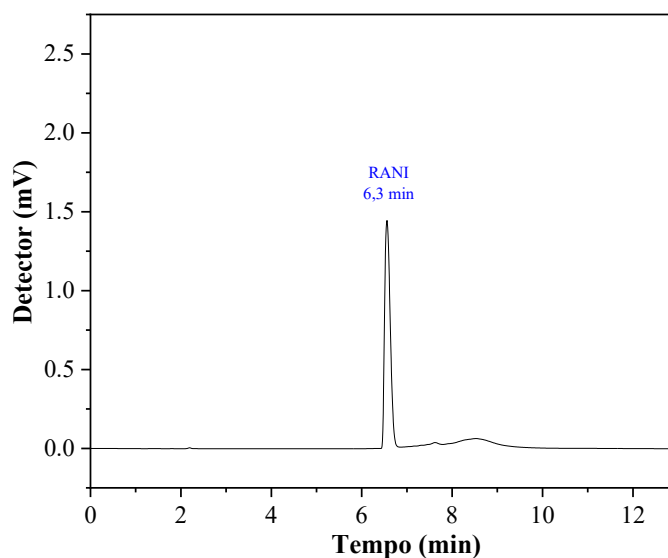


Fonte: Próprio autor.

4.3.1 Termólise

O primeiro estudo de degradação realizado foi o da termólise, avaliação do efeito da temperatura na geração de produtos de degradação da ranitidina. Na condição de exposição à temperatura acima da ambiente, 55 °C, não foi observada a formação de produtos de degradação da ranitidina (Figura 13). A análise do cromatograma indica que a degradação apenas por vias térmicas foi ineficiente para a formação de PD na temperatura estudada. A molécula de ranitidina manteve-se estável durante as 72 h de aquecimento à 55 °C, demonstrando estabilidade a temperaturas pouco superiores às condições ambientais.

Figura 13. Cromatograma da solução após exposição de uma amostra de Ranivet 4 mg a 55 °C por 72 h. Condições de análise, vide cromatograma da Fig. 11.



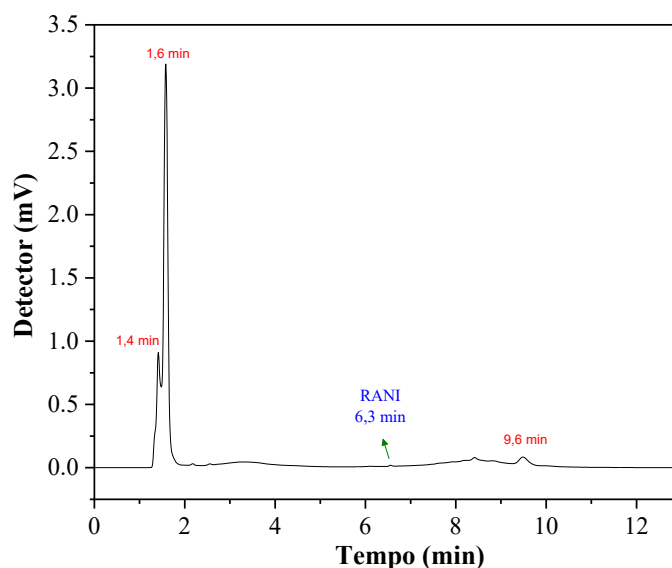
Fonte: Próprio autor.

Esse comportamento está em consonância com os dados reportados por Yokoo *et al.* (2021), os quais observaram que a formação de NDMA a partir da RANI só ocorreu em temperaturas significativamente mais elevadas. Em seus estudos, nenhuma das impurezas catalogadas (Figura 5), nem mesmo o cloridrato de ranitidina em sua forma intacta apresentou degradação relevante quando exposto a 50 °C. A detecção do pico associado a NDMA só foi possível após exposição a temperaturas superiores a 100 °C, mesmo que em um período inferior de exposição (1 h), reforçando a estabilidade térmica da molécula em condições moderadas e sua alta reatividade em condições extremas (YOKOO *et al.*, 2021).

4.3.2 Degradação a partir da radiação UV a 365 nm

A degradação fotolítica por exposição à radiação UV a 365 nm da solução da amostra de Ranivet 8 mg em acetonitrila foi realizada por um período de 24 h. A radiação ultravioleta, na presença de oxigênio, promove a formação de radicais livres, desencadeando reações de oxidação e/ou redução (ANVISA, 2015). O cromatograma da Figura 14 indica uma degradação eficiente da ranitidina, deixando apenas resíduos da espécie ativa do Ranivet e gerando três picos nos tempos de retenção de 1,4 min; 1,6 min e 9,6 min. Os produtos de degradação apresentaram intensidades elevadas indicando a conversão quase total da ranitidina nessas espécies.

Figura 14. Cromatograma da solução após exposição de uma amostra de Ranivet 8 mg diluída em acetonitrila à radiação UV a 365 nm por 24 h a 25 °C. Condições de análise, vide cromatograma da Fig. 11.



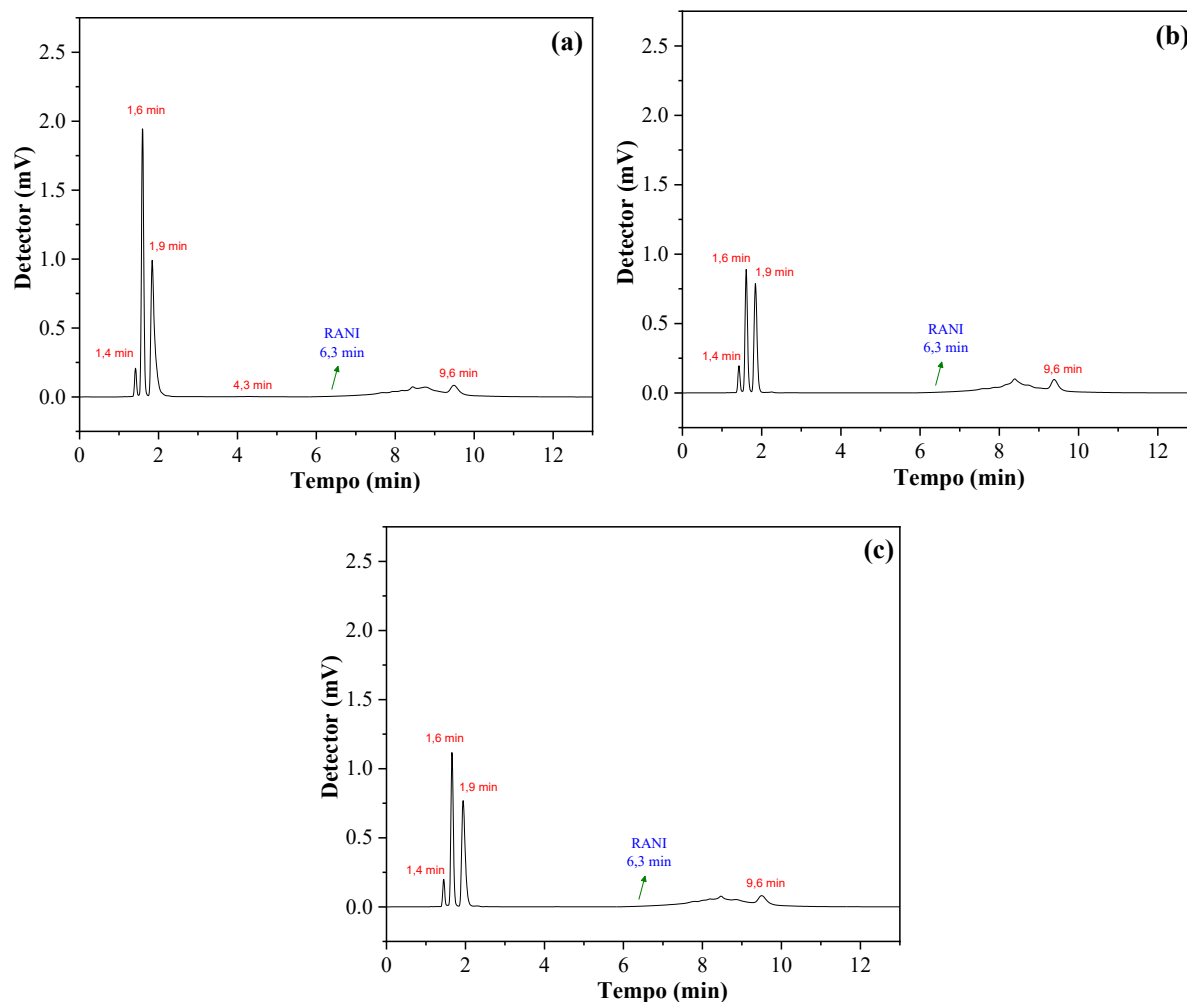
Fonte: Próprio autor.

Este ensaio resultou em uma elevada formação do composto registrado em 1,6 min, cuja geração foi favorecida pela clivagem de ligações químicas induzida pela radiação UV, por meio de reações de fotólise. Além disso, foram identificados outros dois picos em menor proporção, em 1,4 e 9,6 min. Outros estudos de degradação forçada não apresentaram dados sobre a exposição à radiação UV ou então foi realizado em outras condições totalmente distintas que inviabilizaram a comparação deste resultado e, consequentemente, a identificação preliminar desses picos (FLEMING; DONNELLY, 2018; YOKOO *et al.*, 2021; SHAIKH *et al.*, 2024).

4.3.3 Degradação em meio básico

As soluções obtidas após o estudo de degradação dos comprimidos de Ranivet em meio básico após 12 h à temperatura ambiente (~25 °C), foram analisadas por CLAE-DAD nas condições otimizadas de análise. Três diferentes concentrações de NaOH foram estudadas e os resultados estão registrados na Figura 15. Como podem ser vistos nos cromatogramas houve o aparecimento de pelo menos quatro picos registrados nos mesmos tempos de retenção de 1,4 min, 1,6 min, 1,9 min e 9,6 min com intensidades diferentes, porém sem um efeito significativo da concentração de NaOH. Estes resultados indicam que a ranitidina sofreu hidrólise básica, levando à formação de alguns PDs. É importante observar que três dos picos gerados nas soluções de degradação básica da ranitidina coincidem com o tempo de retenção dos picos gerados na degradação fotolítica por UV a 365 nm.

Figura 15. Cromatogramas das soluções obtidas após degradação em meio básico de Ranivet 80 mg por 12 h a 25 °C. Concentração da solução de NaOH (a) 0,5 mol L⁻¹, (b) 1,0 mol L⁻¹ e (c) 2,0 mol L⁻¹. Condições de análise, vide cromatograma da Fig. 11.

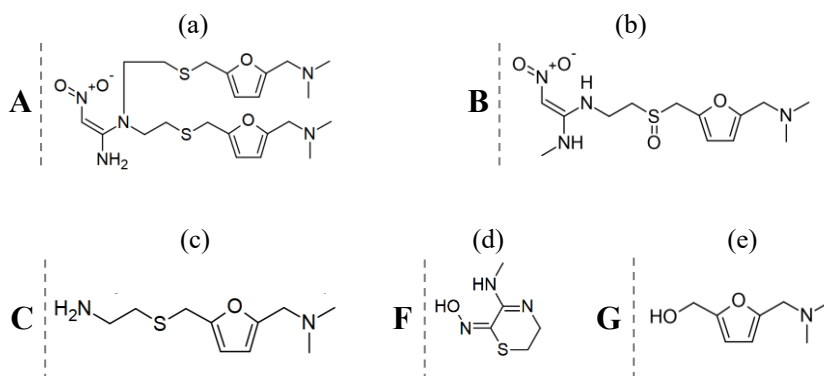


Fonte: Próprio autor.

Como as condições de análise se mantiveram constantes, o tempo de retenção dos compostos tendem a permanecer os mesmos nos cromatogramas. Assim, pelos cromatogramas da Figura 15, pode-se afirmar que houve uma decomposição quase total da ranitidina (t_R 6,3 min) e que não houve formação de NDMA (t_R 3,6 min) nos níveis de detecção do equipamento. Os demais picos registrados em 1,4 min; 1,6 min; 1,9 min e 9,6 min não puderam ter suas identidades confirmadas pela CLAE-DAD. No entanto, conforme visto anteriormente, a ranitidina pode conter impurezas conhecidas identificadas como A-K (Figura 5). Essas impurezas são provenientes da decomposição e rearranjo da molécula de ranitidina e foram devidamente identificadas a partir de análises cromatográficas combinadas a outras técnicas de identificação, bem como comparação com os padrões individuais dessas impurezas.

Assim, comparando o cromatograma obtido nesse estudo com aqueles obtidos por outros trabalhos que identificaram e confirmaram a identidade dos compostos e que empregaram condições de análise similares no modo de fase reversa da CLAE, isto é, empregando coluna C₁₈ e fase móvel acetonitrila:água, podemos inferir sobre a identidade dos picos. Analisando a ordem de eluição das impurezas da ranitidina obtidas pelos autores MUNRO; WALKER (2001), SHARMA *et al.* (2011); YOKOO *et al.* (2021) e GUERRIERI *et al.* (2007), empregando condições cromatográficas similares, os picos em 1,4 min, 1,6 min, 1,9 min, 2,1 min e 9,6 min podem ser associados às impurezas **F** (*{5-[(dimetilamino)metil]furan-2-il}metanol*), **G** (*(2E)-2-(hidroxiimino)-N-metil-5,6-diidro-2H-1,4-tiazin-3-amina*), **B** (*2-[(5-[(dimetilamino)metil]furan-2-il}metil)sulfanil]etanamina*) **C** (*(Z)-N-{2-[(5-[(dimetilamino)metil]furan-2-il}metil)sulfinil]etil}-N'-metil-2-nitroeteno-1,1-diamina*) e **A** (*(Z)-N,N-bis{2-[(5-[(dimetilamino)metil]furan-2-il}metil)sulfanil]etil}-2-nitroeteno-1,1-diamina*), respectivamente (Figura 16).

Figura 16. Estruturas químicas dos produtos de degradação inferidos nos cromatogramas das soluções degradadas de Ranivet. (a) (Z)-N,N-bis{2-[(5-[(dimetilamino)metil]furan-2-il}metil)sulfanil]etil}-2-nitroeteno-1,1-diamina; (b) 2-[(5-[(dimetilamino)metil]furan-2-il}metil)sulfanil]etanamina; (c) (Z)-N-{2-[(5-[(dimetilamino)metil]furan-2-il}metil)sulfinil]etil}-N'-metil-2-nitroeteno-1,1-diamina; (d) 5-[(dimetilamino)metil]furan-2-il}metanol; (e) ((2E)-2-(hidroxiimino)-N-metil-5,6-diidro-2H-1,4-tiazin-3-amina).



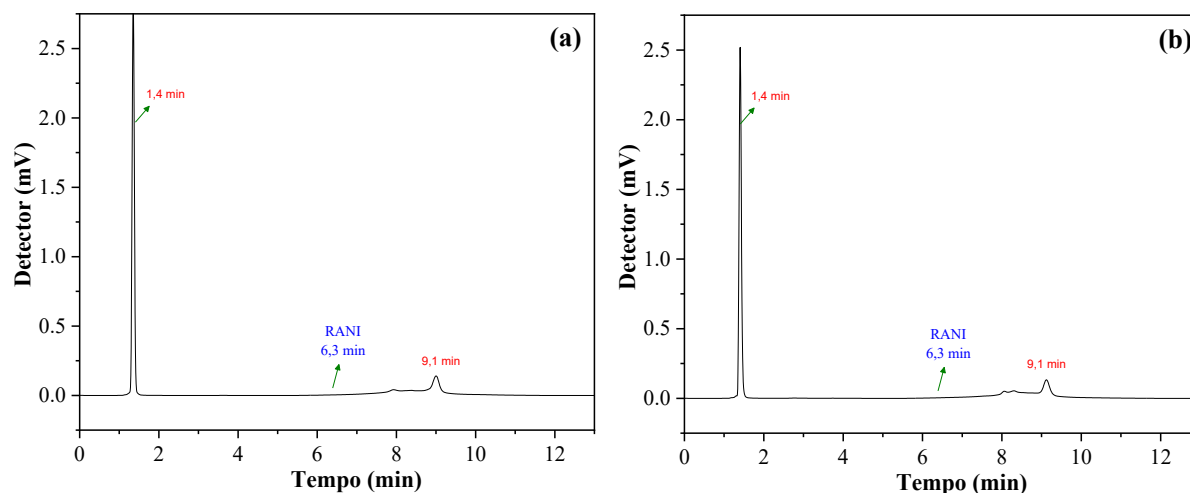
Fonte: Próprio autor.

A presença de produtos de degradação no tempo de 9,6 min indica um possível rearranjo da molécula de ranitidina durante o estudo de degradação gerando a impureza **A**, algo que é comumente encontrado em outros estudos (MUNRO; WALKER, 2001; SHARMA *et al.*, 2011; YOKOO *et al.*, 2021). Enquanto os PDs **B**, **C**, **F** e **G** indicam a decomposição da molécula da ranitidina.

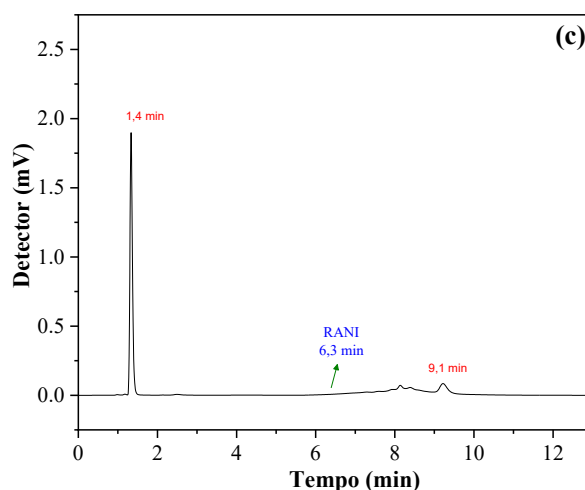
4.3.4 Degradação em meio ácido

Para as degradações realizadas em meio ácido por um período de exposição de 12 h não foram detectadas diferenças significativas entre os cromatogramas obtidos de diferentes concentrações de HCl para as amostras de Ranivet. A Figura 17 mostra um perfil cromatográfico bem similar de degradação para as três concentrações estudadas de HCl em que não se observam picos referentes à RANI (6,3 min) e tão pouco para a formação de NDMA (3,6 min). Sob essas condições de degradação foi observado um pico intenso em 1,4 min, sugerindo que seja a impureza **F** da ranitidina, o composto mais degradado do princípio ativo que pode ser registrado pelo detector DAD. Além disso, um novo composto foi observado ao final de ambas as corridas, por volta dos 9,1 minutos, que pode ser a impureza **A** que possivelmente se protonou em meio ácido perdendo um pouco de retenção na fase estacionária e reduzindo seu tempo de retenção. A impureza **F** (1,4 min) apresentou um aumento marcante na intensidade do pico nestas condições de degradação, indicando que a degradação hidrolítica ácida favoreceu preferencialmente esta via de decomposição da ranitidina, sendo mais intensa que a degradação básica, que resultou em outros produtos de degradação intermediários à ranitidina e impureza **F**.

Figura 17. Cromatogramas das soluções obtidas após degradação em meio ácido de Ranivet 8 mg por 12 h a 25 °C. Concentração da solução de HCl (a) 0,5 mol L⁻¹, (b) 1,0 mol L⁻¹ e (c) 2,0 mol L⁻¹. Condições de análise, vide cromatograma da Fig. 11.



Continuação da Figura 17

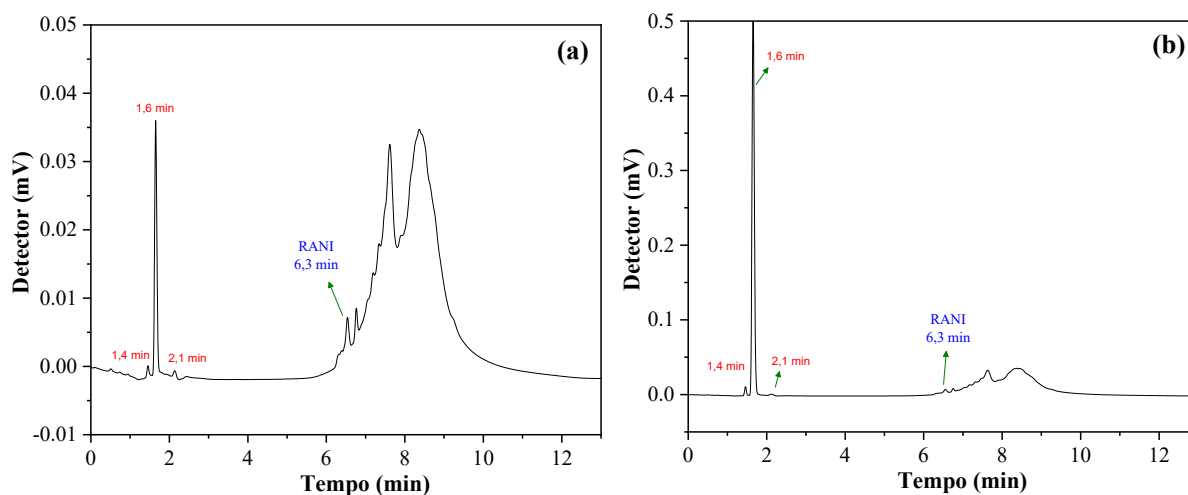


Fonte: Próprio autor.

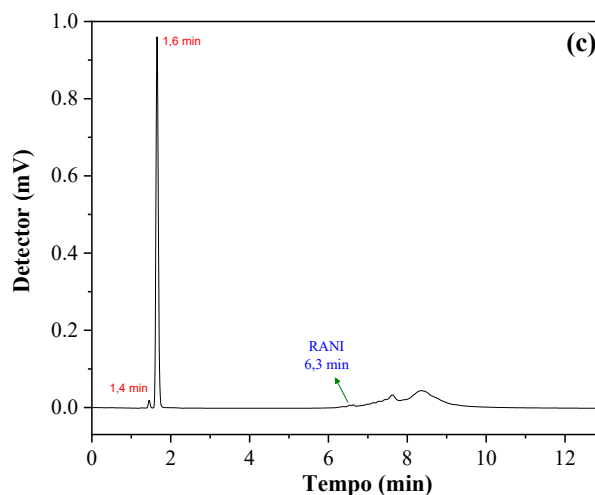
4.3.5 Degradação em meio oxidativo

Para as degradações com peróxido de hidrogênio após 5 horas houve o surgimento de picos com os mesmos tempos de retenção registrados anteriormente para a degradação em meio ácido, básico e radiação UV. Na Figura 18 observa-se que foram registrados picos nos tempos de 1,4 min, 1,6 min e 2,1 min, referentes às impurezas F, G e C, respectivamente, além de todos os cromatogramas registrarem pico em 6,3 min, indicando que a ranitidina não foi totalmente decomposta dentro do período estudado. Não houve registro de sinal no tempo de 3,6 min sob estas condições de degradação sugerindo que a NDMA não foi gerada dentro dos limites de detecção da CLAE-DAD.

Figura 18. Cromatogramas das soluções obtidas após degradação em meio oxidativo de Ranivet 8 mg por 5 h a 25 °C. Concentração da solução de H_2O_2 (a) 3,0 % v/v, (b) 7,5 % v/v e (c) 15,0 % v/v. Condições de análise, vide cromatograma da Fig. 11.



Continuação da Figura 18



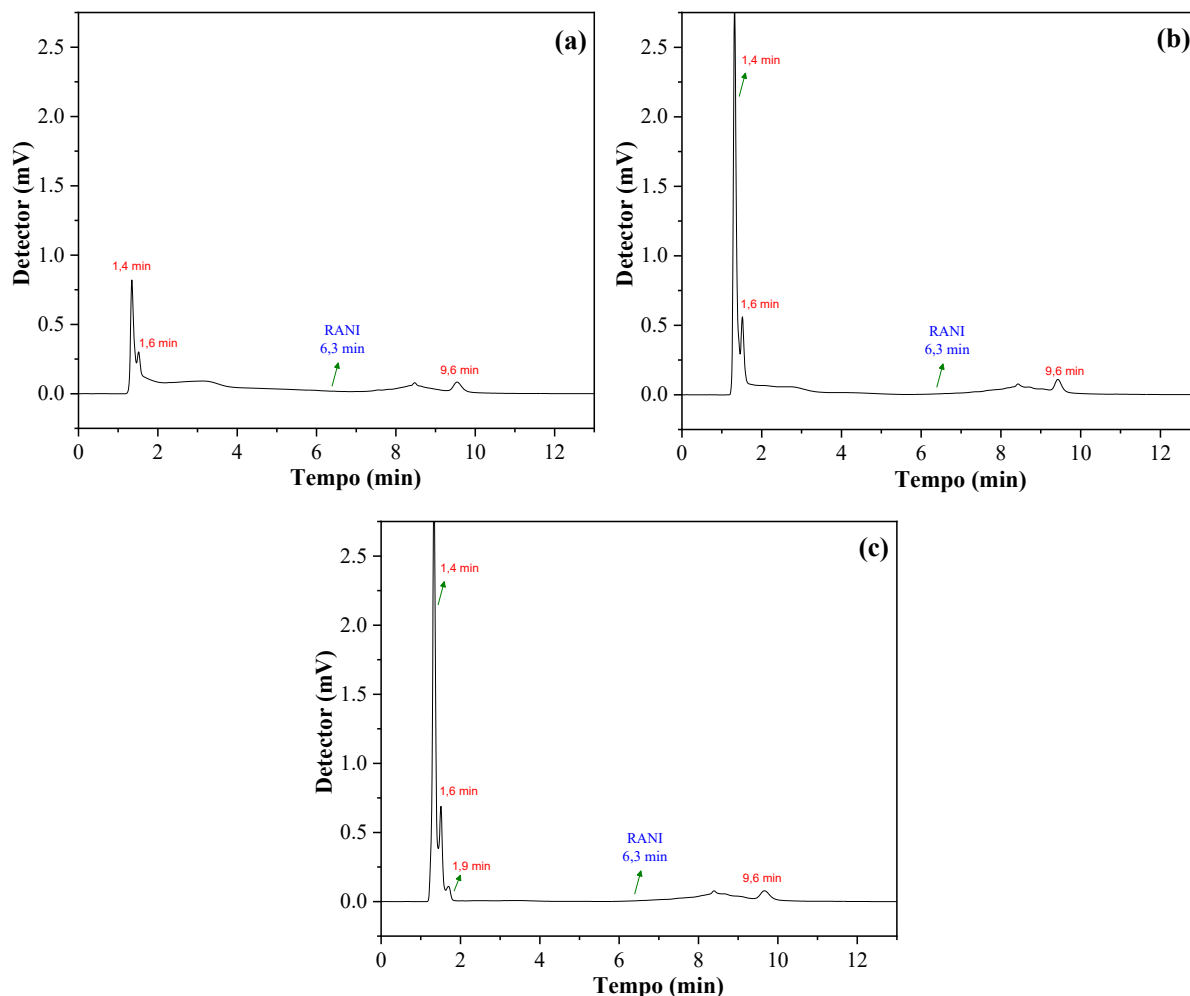
Fonte: Próprio autor.

Diferentemente da degradação ácida, o composto de maior intensidade foi registrado, nos cromatogramas de degradação oxidativa com H_2O_2 (Figura 18), em 1,6 min referente à impureza **G** da ranitidina, similar ao que ocorreu na degradação básica. Além disso, a intensidade do pico em 1,6 min aumentou com o aumento da concentração de H_2O_2 . Outra diferença registrada na degradação oxidativa é a formação da impureza **C**, registrada em 2,1 min. A impureza **C** se refere a oxidação do enxofre na estrutura da ranitidina, condizente com outros resultados obtidos na literatura quando se emprega degradação oxidativa da ranitidina (SHARMA *et al.*, 2011).

Um estudo de degradação por um tempo um pouco maior, de 12 h, também foi realizado para verificar o perfil de degradação da ranitidina no medicamento Ranivet. A Figura 19 apresenta os cromatogramas obtidos após a exposição do Ranivet de 8 mg por 12 h a 25 °C sob três diferentes concentrações de soluções aquosas de H_2O_2 (3,0; 7,5 e 15,0 % v/v).

De acordo com a Figura 19, a degradação da ranitidina por 12 h em meio oxidativo se mostrou mais completa que aquela realizada por 5 h. Essa observação se dá em virtude de os picos dos PDs registrados nos cromatogramas serem encontrados em 1,4 min, 1,6 min, 1,9 min e 9,6 min, sugerindo que sejam as impurezas **F**, **G**, **B** e **A**, respectivamente. A maior intensidade se refere ao pico em 1,4 min, correspondente a um PD com maior grau de degradação, a impureza **F**. Além disso, observa-se a degradação completa da RANI, evidenciada pelo desaparecimento total de seu pico no cromatograma. Na concentração de H_2O_2 a 7,5% (Figura 19b), as intensidades observadas no perfil cromatográfico assemelham-se mais às de maior concentração, 15 % v/v. A impureza **C** (1,9 minutos), nessas condições, apresenta possível co-eluição com outros picos na região inicial do cromatograma, conforme evidenciado pelo significativo alargamento (*peak tailing*) após o sinal em 1,6 min.

Figura 19. Cromatogramas das soluções obtidas após degradação em meio oxidativo de Ranivet 8 mg por 12 h a 25 °C. Concentração da solução de H₂O₂ (a) 3,0 % v/v, (b) 7,5 % v/v e (c) 15,0 % v/v. Condições de análise, vide cromatograma da Fig. 11.



Fonte: Próprio autor.

Entretanto, nos ensaios com tempo estendido (12 h de exposição à sol. H₂O₂) foi possível identificar um pico em 9,6 min, que foi atribuído à impureza **A**, confirmando que sua formação é cineticamente favorecida em condições com maior tempo de exposição devido ao rearranjo de subprodutos de degradação da ranitidina (SHARMA *et al.*, 2011).

A degradação oxidativa, potencializada pelo agente oxidante (H₂O₂), de substâncias farmacêuticas ocorreu por mecanismos de transferência de elétrons, gerando espécies reativas como ânions e cátions intermediários. Grupos funcionais como aminas, sulfetos e fenóis são particularmente suscetíveis a esses processos oxidativos, levando à formação de N-óxidos, hidroxilaminas e sulfóxidos (BLESSY *et al.*, 2014). A detecção dos mesmos produtos de degradação em condições básicas, onde a degradação ocorre predominantemente por hidrólise, sugere que a oxidação pode ter gerado N-óxidos e S-óxidos, os quais posteriormente reagiram,

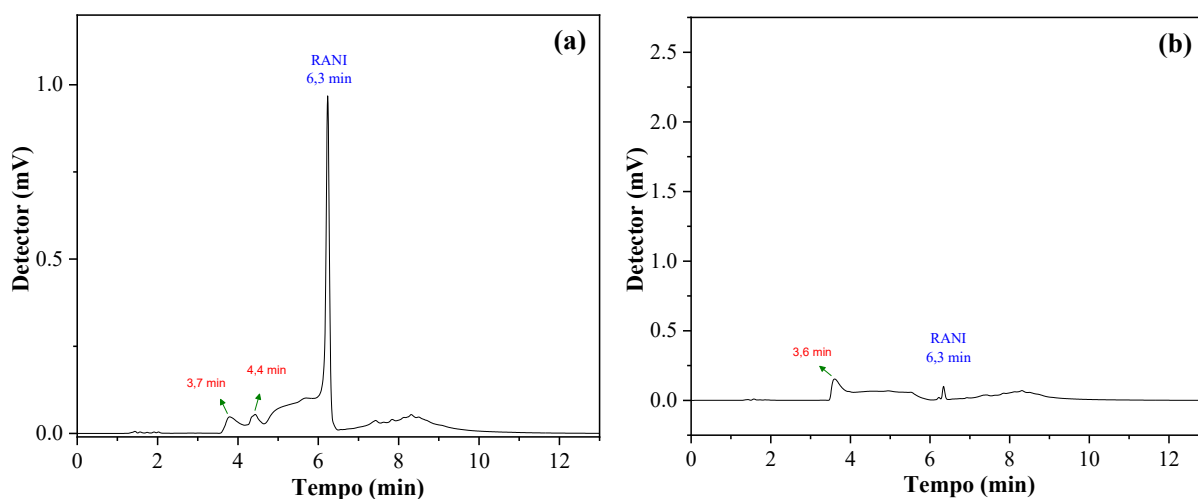
dando origem aos produtos de degradação observados na análise (SHAIKH *et al.*, 2024; SHARMA *et al.*, 2011).

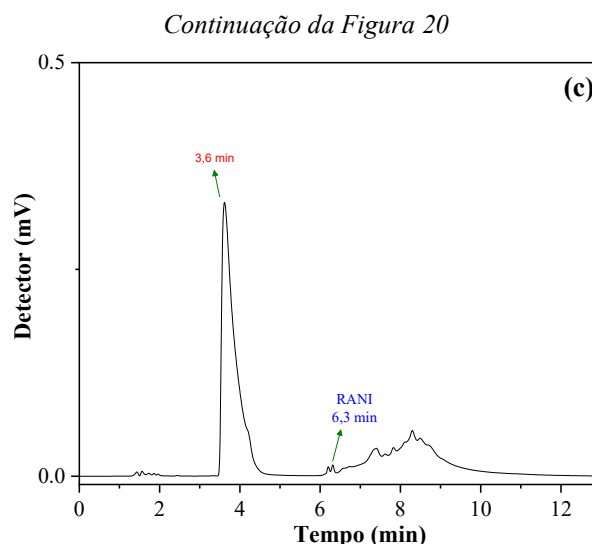
Notavelmente, mesmo sob diferentes condições diferentes de degradação (fotolítica, oxidativa, hidrolítica ácida e básica), observou-se a formação recorrente de um conjunto comum de produtos de degradação da ranitidina, indicando que o fármaco segue mecanismos preferenciais de decomposição. No entanto, as intensidades relativas dos picos variaram significativamente entre os ensaios, refletindo diferenças na cinética e seletividade das reações, as quais são fortemente influenciadas pelas condições do meio (pH, potência da radiação UV, concentração de agentes oxidantes, etc.). Esses dados demonstram que, embora os PDs registrados sejam comuns nos diferentes processos de degradação, as rotas de degradação são moduladas pelo tipo de estresse aplicado.

4.3.6 Formação de NDMA a partir da ranitidina em condições de estresse sob aquecimento

Um estudo complementar para a avaliação da degradação da ranitidina e possível formação de NDMA foi realizado em meio ácido e básico com aumento da temperatura, 75 °C, em um período mais curto de exposição, apenas 30 minutos. Nas condições de estresse por hidrólise ácida e básica sob aquecimento, observou-se a formação de um produto de degradação com o mesmo tempo de retenção que o da NDMA, conforme ilustrado nas Figuras 20 e 22. Esse produto eluiu por volta de 3,6 minutos em todos os ensaios realizados, em que foram variadas as concentrações de HCl e NaOH. Na Figura 20 estão apresentados os cromatogramas das soluções de degradação do comprimido Ranivet em meio ácido a 75 °C por 0,5 h em três diferentes concentrações de HCl.

Figura 20. Cromatogramas das soluções obtidas após degradação em meio ácido de Ranivet 8 mg por 0,5 h a 75 °C. Concentração da solução de HCl (a) 0,5 mol L⁻¹, (b) 1,0 mol L⁻¹ e (c) 2,0 mol L⁻¹. Condições de análise, Fig. 11.



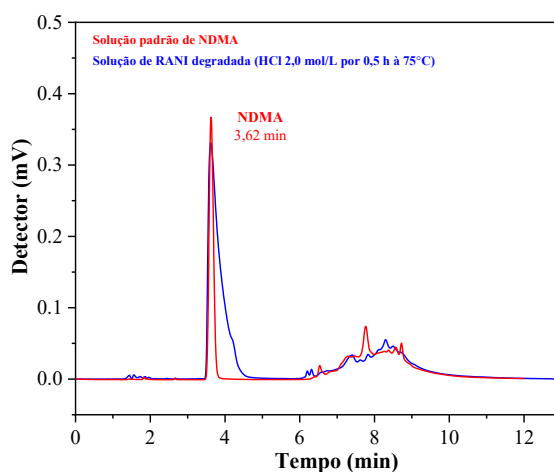


Fonte: Próprio autor.

Como pode ser observado na Figura 20, a degradação ácida rápida e sob aquecimento resultou em uma degradação incompleta da ranitidina (pico em 6,3 min), gerando um PD no tempo de retenção de 3,6 min, previamente atribuído à NDMA. Conforme aumentou a concentração de HCl aumentou a degradação da RANI até o completo desaparecimento do pico no cromatograma (Figura 20c) e aumentou intensidade do pico em 3,6 min.

A disponibilidade de um padrão de referência da NDMA permitiu, por meio da utilização das mesmas condições de análise, comparar os tempos de retenção do pico suspeito com o padrão. Dessa forma, foi possível comparar o perfil cromatográfico obtido após a degradação com o tempo de retenção do pico do padrão de NDMA, verificando assim a correspondência e confirmando a presença da NDMA, Figura 21.

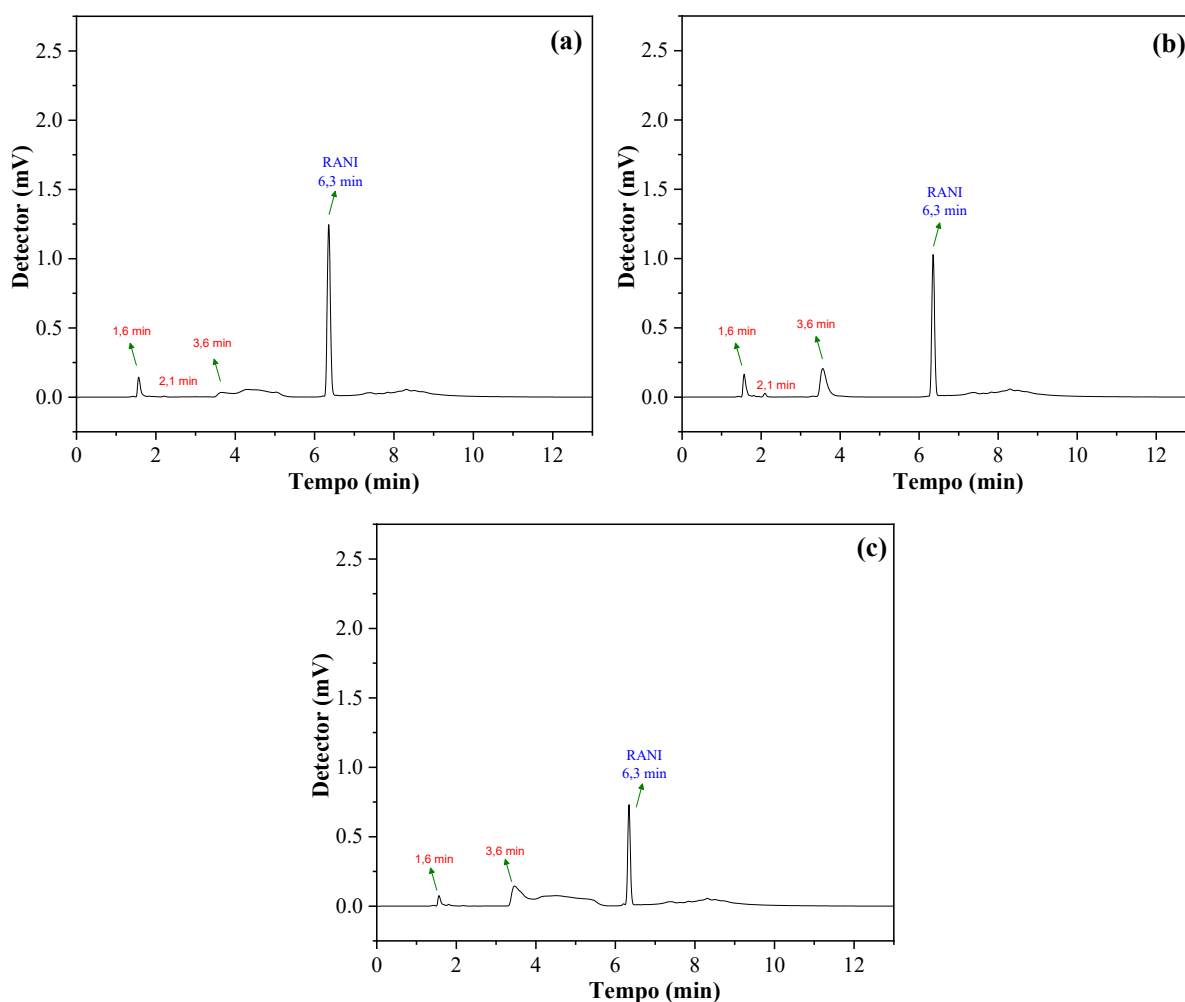
Figura 21. Cromatogramas das soluções de degradação em meio ácido de Ranivet 8 mg por 0,5 h a 75 °C em HCl 2,0 mol L⁻¹ e padrão de NDMA a 25 µg mL⁻¹. Condições de análise, vide cromatograma da Fig. 11.



Fonte: Próprio autor.

O estudo de degradação rápida do comprimido de Ranivet em meio básico a 75 °C foi avaliado em três diferentes concentrações de NaOH (0,5; 1,0 e 2,0 mol L⁻¹) e os cromatogramas das soluções de degradação obtidas estão apresentados na Figura 22. Como pode ser observado a RANI é parcialmente degradada, mesmo quando a concentração de NaOH se encontra em 2,0 mol L⁻¹, diferentemente do meio ácido em que a RANI é totalmente degradada. Além disso, em meio básico a 75 °C ocorre a formação de um pico em 3,6 min, atribuído à NDMA, além de outros PDs detectados em 1,6 min e 2,1 min, atribuídos às impurezas **G** e **C** da RANI.

Figura 22. Cromatogramas das soluções obtidas após degradação em meio básico de Ranivet 8 mg por 0,5 h a 75 °C. Concentração da solução de NaOH (a) 0,5 mol L⁻¹, (b) 1,0 mol L⁻¹ e (c) 2,0 mol L⁻¹. Condições de análise, vide cromatograma da Fig. 11.

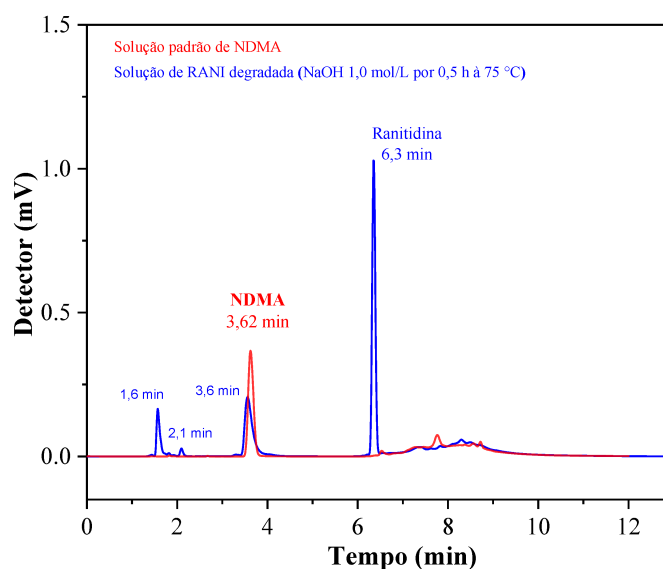


Fonte: Próprio autor.

Assim como realizado para a degradação em meio ácido sob aquecimento, foi realizada a sobreposição dos cromatogramas da solução degradada de Ranivet em meio básico a 2,0 mol L⁻¹ de NaOH e de uma solução padrão de NDMA a 25 µg mL⁻¹. A Figura 23 registra a sobreposição

dos cromatogramas e a perfeita correspondência dos picos do padrão e da substância gerada pela hidrólise básica da RANI em 3,6 min, sob condições de análise cromatográfica fixas. Essa correspondência reforça a indicação de que o composto formado corresponde à N-nitrosodimetilamina.

Figura 23. Cromatogramas das soluções de degradação em meio ácido de Ranivet 8 mg por 0,5 h a 75 °C em HCl 2,0 mol L⁻¹ e padrão de NDMA a 25 µg mL⁻¹. Condições de análise, vide cromatograma da Fig. 11.



Fonte: Próprio autor.

Os estudos de degradação forçada, corroborados pela literatura científica, demonstraram a influência crítica da temperatura na formação da N-nitrosodimetilamina. Os ensaios realizados evidenciaram a suscetibilidade da ranitidina à degradação por múltiplas vias (ácida e básica), com o aumento térmico atuando como um fator determinante na reatividade molecular e na consequente geração de NDMA. Esses resultados estão alinhados com estudos anteriores que demonstram que a ranitidina é suscetível à degradação em ambientes oxidativos e úmidos, levando à formação de NDMA como um dos principais produtos de sua degradação (KING *et al.*, 2020).

Estruturalmente, a ranitidina contém grupos funcionais nitro e aminas (secundárias e terciárias), que viabilizam potenciais mecanismos de formação de nitrosaminas. De acordo com Loeppky *et al.* (1994) e Aldawsari *et al.* (2021) a geração de nitrosaminas requer três elementos essenciais: um substrato nitrosável, agentes nitrosantes e condições reacionais específicas. O mecanismo proposto sugere que a clivagem térmica das ligações da molécula, ou de suas impurezas, libera a amina terciária, que atua como substrato nitrosável. Na presença de espécies nitrosantes, derivadas da decomposição do grupo nitro de outra molécula de ranitidina e sob condições de estresse térmico, combinadas às variações controladas de pH, a formação de NDMA

é favorecida. Essa correlação é claramente evidenciada nos perfis cromatográficos obtidos nos experimentos. Tais fatos confirmam os precedentes estudos e a proibição realizada a nível global, de que o fármaco ranitidina produz o composto tóxico NDMA.

A intensidade dos picos observados indica que a degradação da Ranitidina foi significativa, resultando na majoritária formação deste composto. Esse comportamento sugere que, em condições ácidas ou básicas sob temperaturas moderadamente elevadas, a formação de NDMA é amplamente favorecida, hipótese claramente evidenciada nos resultados anteriores, já que, nas demais condições de degradação avaliadas, não foram observados picos semelhantes, reforçando a ideia de que sua formação é potencializada pela combinação de fatores considerados extremos, como o aumento da temperatura e o pH da solução.

4.4 Avaliação dos métodos de degradação para a geração de impurezas

Ao analisar os cromatogramas obtidos para todas as condições de degradação forçada testadas, observou-se que nenhum pico detectado apresentou co-eluição com o pico da ranitidina e da nitrosamina (mesmo em casos de degradação total), indicando assim uma adequada seletividade para o método. A Tabela 5 permite uma visualização semiquantitativa das degradações realizadas, em que foram medidas as áreas de pico inicial (antes do teste) no cromatograma para a solução da ranitidina na amostra de Ranivet e nos cromatogramas das soluções degradadas. Na Tabela 5 observa-se que os testes de degradação forçada com períodos de exposição mais prolongados, variando de 5 a 24 h, resultaram na degradação praticamente completa da RANI. Já as degradações realizadas em apenas 0,5 h apresentaram uma degradação parcial do fármaco, levando à formação de NDMA.

Avalia-se que independentemente do tipo de ataque - nucleofílico (OH^-), eletrofílico (H^+) ou oxidante (H_2O_2) - os ensaios de degradação forçada demonstraram que o cloridrato de ranitidina apresenta baixíssima estabilidade nestas condições. Em todas as degradações realizadas, exceto em condições térmicas de temperatura ambiente, observou-se a formação de diversas impurezas, sendo que a geração de NDMA sob temperaturas elevadas em meios ácido ou básico, indica que esses produtos de degradação podem reagir entre si e/ou com a própria RANI para formar nitrosaminas, dependendo das condições do meio.

Tabela 4. Porcentagens de degradação da ranitidina nas condições de degradação forçada: hidrólises ácida e básica, oxidação em diferentes concentrações, termólise e fotólise.

Tratamentos	Área de pico RANI (u.a.)	% RANI remanescente	% RANI degradada
-	0,20659	100,00	-
HCl a 0,5 mol L ⁻¹ por 0,5 h e 75 °C	0,09526	46,11	53,89
HCl a 1,0 mol L ⁻¹ por 0,5 h e 75 °C	0,00622	3,01	96,99
HCl a 2,0 mol L ⁻¹ por 0,5 h e 75 °C	0,00051	0,25	99,75
NaOH a 0,5 mol L ⁻¹ por 0,5 h e 75 °C	0,11716	56,71	43,29
NaOH a 1,0 mol L ⁻¹ por 0,5 h e 75 °C	0,08437	40,84	59,16
NaOH a 2,0 mol L ⁻¹ por 0,5 h e 75 °C	0,05641	27,31	72,69
HCl a 0,5 mol L ⁻¹ por 12 h e 25 °C	3,04×10 ⁻⁵	0,01	99,99
HCl a 1,0 mol L ⁻¹ por 12 h e 25 °C	1,21×10 ⁻⁵	0,01	99,99
HCl a 2,0 mol L ⁻¹ por 12 h e 25 °C	0	0,00	100,00
NaOH a 0,5 mol L ⁻¹ por 12 h e 25 °C	0	0,00	100,00
NaOH a 1,0 mol L ⁻¹ por 12 h e 25 °C	0	0,00	100,00
NaOH a 2,0 mol L ⁻¹ por 2,0 h e 25 °C	0	0,00	100,00
H ₂ O ₂ a 3,0 % v/v por 5 h e 25 °C	3,84×10 ⁻⁴	0,19	99,81
H ₂ O ₂ a 7,5 % v/v por 5 h e 25 °C	3,77×10 ⁻⁴	0,18	99,82
H ₂ O ₂ a 15,0 % v/v por 5 h e 25 °C	1,50×10 ⁻⁴	0,07	99,93
H ₂ O ₂ a 3,0 % v/v por 12 h e 25 °C	8,66×10 ⁻⁵	0,04	99,96
H ₂ O ₂ a 3,0 % v/v por 12 h e 25 °C	3,22×10 ⁻⁵	0,02	99,98
H ₂ O ₂ a 3,0 % v/v por 12 h e 25 °C	1,48×10 ⁻⁵	0,01	99,99
Térmica a 55 °C por 12 h	0,20577	99,60	0,40
Radiação UV a 365 nm a 25 °C	5,40×10 ⁻⁵	0,03	99,97

5 CONCLUSÕES

Em vista dos resultados obtidos e apresentados neste trabalho, pode-se concluir que os ensaios de degradação forçada do cloridrato de ranitidina permitiram avaliar sua estabilidade frente a diferentes condições de estresse e identificar potenciais produtos de degradação. A aplicação dos métodos de degradação forçada para realização de estudos de degradação em medicamentos, demonstrou-se eficiente na indução da formação de impurezas e produtos de degradação, permitindo a avaliação da estabilidade do fármaco e a identificação de potenciais riscos associados à sua degradação.

Embora o método otimizado por CLAE tenha sido determinante para a detecção das impurezas formadas, a caracterização inequívoca desses produtos de degradação requereria técnicas analíticas complementares, como cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em tandem (LC-MS/MS, *liquid chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry*). Com base na correlação com estudos cromatográficos prévios envolvendo a ranitidina, foi possível propor identificações preliminares para os principais produtos de degradação observados. Os resultados indicam que os compostos formados neste estudo correspondem às impurezas já catalogadas pelas principais farmacopeias, sugerindo vias de degradação consistentes com a literatura. Sob condições extremas (neste caso, o aumento da temperatura combinado com meios ácidos ou básicos), estas impurezas podem sofrer reações secundárias, seja entre si ou com a própria ranitidina, potencializando a formação da N-nitrosodimetilamina.

Nesse contexto, as análises cromatográficas comparativas, utilizando o padrão de NDMA como referência, confirmaram a formação dessa nitrosamina como um produto de degradação da ranitidina sob condições específicas de estresse, após a degradação forçada do comprimido de Ranivet em soluções de HCl e NaOH sob aquecimento. A confirmação da presença de NDMA ressalta a necessidade de monitoramento rigoroso de nitrosaminas em medicamentos, dada sua potencial carcinogenicidade e os riscos associados à segurança do paciente e reforça a importância de controlar fatores ambientais durante o armazenamento e a manipulação do fármaco, uma vez que a exposição a essas condições pode desencadear reações químicas indesejadas, como a nitrosação de grupos amina presentes na estrutura da ranitidina.

Por fim, os cromatogramas obtidos nos estudos de degradação forçada sugerem que, para uma avaliação mais eficiente dos produtos de degradação, é recomendável a realização dos ensaios em concentrações elevadas de hidróxido de sódio. A condição com $2,0 \text{ mol L}^{-1}$ apresentou o perfil de degradação mais definido, evidenciado pela maior formação de produtos e melhor resolução no método analítico empregado. Adicionalmente, para a avaliação da formação de N-

nitrosodimetilamina fica necessária a introdução de condições críticas aos testes, como o uso de temperatura mais elevada combinada com condição de acidez ou basicidade do meio, a fim de favorecer sua geração e detecção.

REFERÊNCIAS

- ABE, YASUHIRO. et al. Temperature-Dependent Formation of N-Nitrosodimethylamine during the Storage of Ranitidine Reagent Powders and Tablets. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, Kawasaki, v. 68, p. 1–10, **2020**. Disponível em: <https://doi.org/10.1248/cpb.c20-00431>.
- AGLIO, T. C.; DINIZ, V.; MATOS, M. F. A. V.; ROSA, P. C. P.; RATH, S. N-nitrosaminas em medicamentos: um problema atual, uma realidade antiga. *Química Nova*, v. 45, n. 8, p. 959-976, **2022**. Disponível em: <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170894>.
- ALDAWSARI, F.S.; ALSHEHRI, Y.M.; ALGHAMDI, T.S. Contaminação por N-nitrosodimetilamina (NDMA) em produtos de ranitidina: uma revisão das recentes descobertas. *Journal of Food and Drug Analysis*, v. 29, 3, **2021**. Disponível em: <https://doi.org/10.38212/2224-6614.1133>.
- ALMEIDA, M. Z. Plantas medicinais: abordagem histórico-contemporânea. In: *Plantas Medicinais*. 3. ed. Salvador: EDUFBA, **2011**. p. 34–66. Disponível em: <https://books.scielo.org/id/xf7vy/pdf/almeida-9788523212162-03.pdf>.
- ANTÓN, A.; LIZASO, J. Nitritos, nitratos y nitrosaminas. Tres Cantos (Madrid): Fundación Ibérica para la Seguridad Alimentaria, **2001**. Disponível em: https://www.academia.edu/download/46280964/13181019_nitritos_nitratos.pdf.
- BHANGARE, D.; RAJPUT, N.; JADAV, T. et al. Systematic strategies for degradation kinetic study of pharmaceuticals: an issue of utmost importance concerning current stability analysis practices. *Journal of Analytical Science and Technology*, v. 13, n. 7, p. 1-18, **2022**. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s40543-022-00317-6>.
- BITTENCOURT, S. C.; CAPONI, S.; MALUF, S. Farmacologia no século XX: a ciência dos medicamentos a partir da análise do livro de Goodman e Gilman. *História, Ciências, Saúde – Manguinhos*, Rio de Janeiro, v. 20, n. 2, p. 499–519, abr./jun. **2013**. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/hcsm/a/bTpnNVqfFm97TwPqKDLHMwJ/?format=pdf&lang=pt>.
- BLESSY, M.; PATEL, R. D.; PRAJAPATI, P. N.; AGRAWAL, Y. K. Development of forced degradation and stability indicating studies of drugs—A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, v. 4, n. 3, p. 159-165, **2014**. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2013.09.003>.
- BRANCH, S. K. Guidelines from the International Conference on Harmonisation (ICH). *Regulatory Affairs*, v. 23, n. 3, p. 123-135, **2005**. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0731708505001561>.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Guia para obtenção do perfil de degradação, e identificação e qualificação de produtos de degradação em medicamentos. *Medicamentos - Guia nº 4*, versão 1. Brasília, DF: ANVISA, **2015**.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). *Registro de novos medicamentos: saiba o que é preciso*. Brasília, DF: ANVISA, **2018**. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/noticias-anvisa/2018/registro-de-novos-medicamentos-saiba-o-que-e-preciso>.

BROGDEN, R. N.; CARMINE, A. A.; HEEL, R. C. et al. Ranitidine: a review of its pharmacology and therapeutic use in peptic ulcer disease and other allied diseases. *Drugs*, v. 24, p. 267–303, **1982**. DOI: 10.2165/00003495-198224040-00002.

CANADÁ. *Priority substances list assessment report for N-nitrosodimethylamine (NDMA): Canadian Environmental Protection Act, 1999*. Environment Canada, [1999]. Disponível em: <https://www.canada.ca/en/health-canada/services/environmental-workplace-health/reports-publications/environmental-contaminants/canadian-environmental-protection-act-1999-priority-substances-list-assessment-report-nitrosodimethylamine-ndma.html>

CBC NEWS. Zantac: A timeline of the heartburn medication controversy. CBC News, 1 out. **2019**. Disponível em: <https://www.cbc.ca/news/health/zantac-heartburn-timeline-1.5330575>.

CHURMS, S. C. Carbohydrates | Sugars – chromatographic methods. In: WORSFOLD, P.; TOWNSHEND, A.; POOLE, C. (Ed.). *Encyclopedia of analytical science*. 2. ed. Amsterdam: Elsevier, **2005**. p. 414-427. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B0123693977000558>.

COSTA, G.N.; VIANA, G.M.; LIMA FILHO, U.F.; CABRAL, L.M. Diretrizes para elaboração de um protocolo e relatório de estudo de degradação forçada de medicamentos de acordo com a RDC 53/2015. Rio de Janeiro: GlaxoSmithKline do Brasil Ltda: Universidade Federal do Rio de Janeiro, **2018**. Disponível em: <https://doi.org/10.14450/2318-9312.v30.e3.a2018.pp194-202>

CRF-SP, Conselho Regional de Farmácia do Estado de São Paulo. História da farmácia. Belo Horizonte: Conselho Regional de Farmácia do Estado de Minas Gerais (CRF-MG), **2024**. Disponível em: https://www.crfmg.org.br/externo/institucional/historia_historia.pHp.

EMA - Agência Europeia de Medicamentos. *Ranitidine Article-31 referral: EMA confirms recommendation to suspend all ranitidine medicines in the EU*. EMA, **2020**. (EMA/666097/2020). Disponível em: https://www.ema.europa.eu/en/documents/referral/ranitidine-article-31-referral-ema-confirms-recommendation-suspend-all-ranitidine-medicines-eu_en.pdf.

FDA - United States Food and Drug Administration. Laboratory Tests | Ranitidine. Silver Spring: FDA, **2019**. Disponível em: <https://www.fda.gov/drugs/drug-safety-and-availability/laboratory-tests-ranitidine>.

FLEMING, K.; DONNELLY, R.F. Physical Compatibility and Chemical Stability of Injectable and Oral Ranitidine Solutions. *Hosp Pharm*. v. 54, p. 32-36, **2019**. <https://doi.org/10.1177/0018578718763085>

GUERRIERI, P.; SALAMEH, A.K.; TAYLOR, L.S. Effect of small levels of impurities on the water vapor sorption behavior of ranitidine HCl. *Pharm. Res.*, v. 24, p. 147-156, 2007. <https://doi.org/10.1007/s11095-006-9134-y>

HARMON, P. Ranitidine: a proposed mechanistic rationale for NDMA formation and a potential control strategy. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 112, n. 5, p. 1220-1224, maio **2023**. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2022.11.011>.

HRUDEY, S. E.; BULL, R. J.; COTRUVO, J. A. et al. Drinking water as a proportion of total human exposure to volatile N-nitrosamines. *Risk Analysis*, v. 33, n. 12, p. 2179-2208, **2013**. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/risa.12070>.

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

KING, F. J.; SEARLE, A. D.; URQUHART, M. W. Ranitidine—investigations into the root cause for the presence of *N*-nitroso-*N,N*-dimethylamine in ranitidine hydrochloride drug substances and associated drug products. *Organic Process Research & Development*, v. 24, n. 12, p. 2915-2926, **2020**. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.oprd.0c00462>.

KOWALSKA, A. et al. Experimental evaluation of solvent elution strength in reversed-phase thin-layer chromatography on RP2 and RP8 plates. *Journal of Chromatography A*, v. 1568, p. 177-186, **2018**. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0021967318309350>.

LE ROUX, Julien et al. NDMA formation by chloramination of ranitidine: kinetics and mechanism. *Environmental Science & Technology*, v. 46, n. 19, p. 11095–11103, **2012**. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/es3023094>.

LOEPPKY, R. N.; BAO, Y. T.; BAE, J.; YU, L.; SHEVLIN, G. Blocking nitrosamine formation. In: NITROSAMINES AND RELATED N-NITROSO COMPOUNDS. Washington, DC: American Chemical Society, v. 553, p. 52-65, **1994**.

MASADA, S.; TSUJI, G.; ARAI, R. et al. Rapid and efficient high-performance liquid chromatography analysis of N-nitrosodimethylamine impurity in valsartan drug substance and its products. *Scientific Reports*, v. 9, p. 1–8, **2019**. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-48344-5>.

MUNRO, J.S.; WALKER, T.A. Ranitidine hydrochloride: development of an isocratic stability-indicating high-performance liquid chromatographic separation. *J. Chromatogr. A*, v. 914, p. 13-21, **2001**. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)00540-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)00540-4)

PUBCHEM, National Center for Biotechnology Information. National Library of Medicine. Acesso em: Jan. **2025**. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>

QUINTÃO, F.J.O. Caracterização dos produtos de degradação dos fármacos metformina, enalapril, captopril e ranitidina, por espectrometria de massas de alta resolução e avaliação da toxicidade após processos oxidativos avançados e cloração. 2018. 176 f. Tese (Doutorado em Engenharia Ambiental) - Núcleo de Pesquisas e Pós-Graduação em Recursos Hídricos, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, **2018**. Disponível em: <http://www.repositorio.ufop.br/handle/123456789/10610>

SANCHES FILHO, P.J. Desenvolvimento de procedimentos para extração e determinação de nitrosaminas em alimentos. 2002. 245 f. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Química, Programa de Pós-Graduação em Química, Porto Alegre, **2002**. Disponível em: <http://hdl.handle.net/10183/17704>.

SHAIKH, T. J.; KHAN, M.; DEORE, H.; BADGUJAR, V. L.; SEHJAD, S.; AZEEM, S. A.; JUNED, P.; ROSHAN, S.; LOVHARE, R.; AATIF, S.; MUGNI DANISH, M.A.; YAHEEYA, M. Forced degradation study of developed and validated RP-HPLC method for determination of ondansetron and ranitidine in bulk and formulation. *Biochem. Cell. Arch.*, v. 24, p. 347-352, **2024**. <https://doi.org/10.51470/bca.2024.24.1.347>

SHARMA, N. et al. A Validated Stability-Indicating Liquid-Chromatographic Method for Ranitidine Hydrochloride in Liquid Oral Dosage Form. *Scientia Pharmaceutica*, v. 79, n. 2, p. 309-322, **2011**. Disponível em: <https://doi.org/10.3797/scipharm.1101-06>.

SILVA, C. L. F. Uso terapêutico e religioso das ervas. *Caminhos: Revista de Ciências da Religião*, Goiânia, v. 12, n. 1, p. 79-92, **2014**. Disponível em: <https://seer.pucgoias.edu.br/index.php/caminhos/article/view/3032>.

SNAPE, T. J.; ASTLES, A.; DAVIES, J. Understanding the chemical basis of drug stability and degradation. *The Pharmaceutical Journal*, 9 out. **2010**. Disponível em: <https://pharmaceutical-journal.com/article/ld/understanding-the-chemical-basis-of-drug-stability-and-degradation>.

TRICKER, A. R.; PREUSSMANN, R. Carcinogenic *N*-nitrosamines in the diet: occurrence, formation, mechanisms and carcinogenic potential. *Mutation Research*, v. 259, n. 3-4, p. 277-289, mar.-abr. **1991**. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0165-1218\(91\)90123-4](https://doi.org/10.1016/0165-1218(91)90123-4)

USP – United States Pharmacopeia. Validation of Compendia Procedures, USP 35-NF 30, The United States Pharmacopeial Convention, Rockville, USA (2012).

YOKOO, H.; YAMAMOTO, E.; MASADA, S.; UCHIYAMA, N.; TSUJI, G.; HAKAMATSUKA, T.; DEMIZU, Y.; IZUTSU, K. I.; GODA, Y. *N*-Nitrosodimethylamine (NDMA) formation from ranitidine impurities: possible root causes of the presence of NDMA in ranitidine hydrochloride. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, Tóquio, v. 69, n. 9, p. 872-876, **2021**. Disponível em: <https://doi.org/10.1248/cpb.c21-00289>.