

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**FACULDADE DE FARMÁCIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS (PPGCF)**

**DETERMINAÇÃO DA TOXICIDADE IN VITRO DA**  
**N-SUCCINIL FENILEFRINA E DA N-FORMIL DESLORATADINA**

**Fernanda Battisti**

**Prof. Dr. Pedro Eduardo Fröhlich**

Porto Alegre, 2020.



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS (PPGCF)

DETERMINAÇÃO DA TOXICIDADE IN VITRO DA  
N-SUCCINIL FENILEFRINA E DA N-FORMIL DESLORATADINA

Dissertação apresentada por  
**Fernanda Battisti** para obtenção  
do TÍTULO DE MESTRE em  
Ciências Farmacêuticas.

**Orientador: Prof. Dr. Pedro Eduardo Fröhlich**

Porto Alegre, 2020.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado Acadêmico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada no dia 29.05.2020, pela Banca Examinadora constituída, por:

Profa. Dr. Pâmela Lukasewicz  
Pós Doutor em Ciências Farmacêuticas  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dr. Renata Pereira Limberguer  
Professor Associado – Faculdade de Farmácia  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dr. Simone Cristina Baggio Gnoatto  
Professor Associado – Faculdade de Farmácia  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Battisti, Fernanda  
Determinação da Toxicidade In vitro da N-(succinil)  
fenilefrina e da N-(formil) desloratadina. / Fernanda  
Battisti. -- 2020.  
92 f.  
Orientador: Pedro Eduardo Froehlich.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de  
Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre,  
BR-RS, 2020.

1. N-(succinil) fenilefrina. 2. N-(formil)  
desloratadina. 3. VERO. 4. Astroglial C6. 5. HepG2. I.  
Froehlich, Pedro Eduardo, orient. II. Título.

Este trabalho foi desenvolvido sob a orientação do Prof. Dr. Pedro Eduardo Fröhlich e colaboração da Prof. Dra. Aline Rigon Zimmer no Laboratório de Química Farmacêutica e no Laboratório de Físicoquímica e Síntese Orgânica do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da UFRGS.



## RESUMO

O uso indiscriminado de medicamentos sem prescrição é uma realidade em todo o mundo. O fato desses medicamentos serem de venda livre, não significa que os mesmos não apresentam riscos. Muitos deles apresentam incompatibilidades em suas formulações e acabam formando produtos de degradação durante a sua vida útil, como é o caso de alguns antigripais e dos comprimidos de desloratadina. A população que consome esses medicamentos sequer sabe que podem estar prejudicando a sua saúde. Este trabalho tem o objetivo de avaliar o potencial citotóxico dos produtos de degradação já relatados em literatura, N-(succinil) fenilefrina e N-(formil) desloratadina. O primeiro advém da incompatibilidade entre o ativo fenilefrina, muito utilizado em antigripais, e sais de maleato também sempre presentes nessas formulações. A N-(formil) desloratadina, por sua vez, é formada pela incompatibilidade entre ao ativo desloratadina, anti-histamínico de segunda geração, com açúcares redutores, nesse caso a lactose, presente na maioria das formulações de desloratadina comprimidos disponíveis no mercado. Para testar a toxicidade dos produtos de degradação, primeiramente, os mesmos foram formados através de estresse térmico úmido nas misturas binárias incompatíveis, e também, nos produtos acabados encontrados à venda nas farmácias. Após a formação e quantificação dessas impurezas através de cromatografia líquida de alta eficiência, os mesmos foram incubados nas células da linhagem VERO, C6 astroglial e HepG2 por 24 horas. A N-(succinil) fenilefrina não apresentou indícios de toxicidades em nenhuma linhagem celular nas concentrações testadas. A N-(formil) desloratadina apresentou potencial citotoxicidade para a linhagem HepG2 das linhagens celulares testadas. Os resultados mostraram a importância de realizar estudos de toxicidade, inclusive em medicamentos muito comuns disponíveis em todo o mundo que podem não ter informações suficientes para apoiar seu uso seguro.

**Palavras chaves:** N-(succinil) fenilefrina, N-(formil) desloratadina, astroglial C6, VERO e HepG2.



## ABSTRACT

The indiscriminate use of over-the-counter medications is a reality worldwide. The fact that these drugs are over-the-counter does not mean that they may not offer any risk. Many of them have incompatibilities in their formulations and end up forming degradation products during their useful life, as is the case with some flu medicines and desloratadine tablets. The people that consumes these drugs does not even know that they may be harming their health. This work aims to study the cytotoxic potential of degradation products already reported in the literature, N- (Succinyl) phenylephrine and N- (formyl) desloratadine. The first comes from the incompatibility between the active phenylephrine, widely used in anti-flu, and maleate salts also always present in these formulations. N- (formyl) desloratadine, in turn, is formed by the incompatibility between the active pharmaceutical ingredient, desloratadine, a second generation antihistamine, with reducing sugars, in this case lactose, present in most of the formulations of desloratadine tablets available on the market. To test the toxicity of the degradation products, first, they were formed through wet thermal stress in incompatible binary mixtures, and also, in the finished products found for sale in pharmacies. After the formation and quantification of these impurities through high performance liquid chromatography, they were incubated in VERO, C6 astroglial and HepG2 cell lineages for 24 hours. N- (succinyl) phenylephrine showed no evidence of toxicity in any cell line at the concentrations tested. N- (formyl) desloratadine showed potential cytotoxicity for the HepG2 strain at the concentration tested. The results showed the importance of performing toxicity studies as well as some very common medicines available worldwide may not have sufficient information to support their safe use.

**Key words:** N- (Succinyl) phenylephrine, N- (formyl) desloratadine, astroglial C6, VERO e HepG2.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Estrutura molecular da fenilefrina.....	31
Figura 2- Estrutura molecular do ácido maléico.....	31
Figura 3- Possíveis estruturas da N-succinil fenilefrina (Adaptado de MARÍN et al., 2005). .	32
Figura 4 - Possível estrutura da N-succinil fenilefrina segundo Wong e colaboradores (2006) (Adaptado de WONG et al., 2006).....	32
Figura 5 - Estrutura molecular da desloratadina. ....	33
Figura 6 - Formação da N-(formil)-desloratadina na presença de lactose (Adaptado de BISSA et al., 2013). ....	34
Figura 7 - Cromatogramas obtidos no teste de seletividade (sobrepostos).....	44
Figura 8 - Cromatograma obtido da análise por cromatografia líquida de alta eficiência da amostra da mistura de cloridrato de fenilefrina e maleato de clorfeniramina controle (FCc).	45
Figura 9 - Cromatograma obtido da análise por cromatografia líquida de alta eficiência da amostra da mistura de cloridrato de fenilefrina e maleato de clorfeniramina exposta (FCe).	46
Figura 10 - Cromatograma obtido da análise por cromatografia líquida de alta eficiência da amostra de produto acabado controle (FC <sub>PAC</sub> ).....	47
Figura 11 - Cromatograma obtido da análise por cromatografia líquida de alta eficiência da amostra de produto acabado exposto (FC <sub>PAE</sub> ).....	47
Figura 12 - Curva de viabilidade celular após tratamento com cloridrato de fenilefrina, maleato de clorfeniramina e paracetamol isolados após 24 h de exposição em linhagem celular VERO. ....	48
Figura 13 - Curva de viabilidade celular após tratamento com misturas binárias de cloridrato de fenilefrina e maleato de clorfeniramina controle (FCc) e cloridrato de fenilefrina e maleato de clorfeniramina exposto (FCe) após 24 h de exposição em linhagem celular VERO.....	49
Figura 14 - Curva de viabilidade celular após tratamento com a mistura Produto Acabado Controle (FC <sub>PAC</sub> ) e ao Produto Acabado Exposto (FC <sub>PAE</sub> ) após 24 h de exposição em linhagem celular VERO. ....	49
Figura 15 - Curva de viabilidade celular após tratamento com cloridrato de fenilefrina, maleato de clorfeniramina e paracetamol isolados após 24 h de exposição em linhagem celular C6 astroglial.....	51
Figura 16 - Curva de viabilidade celular após tratamento com mistura binária de cloridrato de fenilefrina e maleato de clorfeniramina controle (FCc) e mistura binária de cloridrato de fenilefrina e maleato de clorfeniramina exposto (FCe) após 24 h de exposição em linhagem celular C6 astroglial.....	52

Figura 17 -Curva de viabilidade celular após tratamento com a mistura FCPAC e FCPAE após 24 h de exposição em linhagem celular C6 astroglial. ....	52
Figura 18 - Curva de viabilidade celular após tratamento com cloridrato de fenilefrina, maleato de clorfeniramina e paracetamol isolados após 24 h de exposição em linhagem celular HepG2. ....	54
Figura 19 - Curva de viabilidade celular após tratamento com misturas binárias de cloridrato de fenilefrina e maleato de clorfeniramina controle (FCc) e cloridrato de fenilefrina e maleato de clorfeniramina exposto (FCe) 24 h de exposição em linhagem celular HepG2. ....	55
Figura 20 - Curva de viabilidade celular após tratamento com o produto acabado FC <sub>PAC</sub> e FC <sub>PAE</sub> após 24 h de exposição em linhagem celular HepG2.....	55
Figura 21 - Cromatograma obtido da análise por cromatografia líquida de alta eficiência da solução padrão diluído (0,002 mg/mL) para cálculo dos produtos de degradação.....	65
Figura 22 - Cromatograma obtido da análise por cromatografia líquida de alta eficiência da amostra da mistura de desloratadina e lactose (0,2 mg/mL) controle (DLc). ....	65
Figura 23 - Cromatograma obtido da análise por cromatografia líquida de alta eficiência da amostra da mistura de desloratadina e lactose (0,2 mg/mL) exposta (DLe). ....	65
Figura 24 - Cromatograma obtido da análise por cromatografia líquida de alta eficiência da amostra de produto acabado controle (0,2 mg/mL de desloratadina) (DL <sub>PAC</sub> ).....	66
Figura 25 - Cromatograma obtido da análise por cromatografia líquida de alta eficiência da amostra de produto acabado exposto (0,2 mg/mL de desloratadina) (DL <sub>PAE</sub> ). ....	67
Figura 26- Curva de viabilidade celular após tratamento com desloratadina isolada após 24 h de exposição em linhagem celular VERO.....	68
Figura 27 - Curva de viabilidade celular após tratamento com a mistura desloratadina + lactose controle (DLc) e desloratadina + lactose exposta (DLe) após 24 h de exposição em linhagem celular VERO. ....	68
Figura 28- Curva de viabilidade celular após tratamento com o produto acabado controle (DL <sub>pac</sub> ) e com o produto acabado exposto (DL <sub>pae</sub> ) após 24 h de exposição em linhagem celular VERO. ....	69
Figura 29 - Curva de viabilidade celular após tratamento com desloratadina isolada após 24 h de exposição em linhagem celular C6 astroglial. ....	71
Figura 30 - Curva de viabilidade celular após tratamento com a mistura DLc e DLe após 24 h de exposição em linhagem celular C6 astroglial. ....	71
Figura 31 - Curva de viabilidade celular após tratamento com a mistura DL <sub>pac</sub> e DL <sub>pae</sub> após 24 h de exposição em linhagem celular C6 astroglial. ....	72
Figura 32 - Curva de viabilidade celular após tratamento com desloratadina isolada após 24 h de exposição em linhagem celular HepG2. ....	73

Figura 33 - Curva de viabilidade celular após tratamento com desloratadina e lactose após 24 h de exposição em linhagem celular HepG2 .....74

Figura 34 - Curva de viabilidade celular após tratamento com a mistura DLpac e DLpae após 24 h de exposição em linhagem celular HepG2.....75



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1-Limites de produtos de degradação estabelecidos pela RDC 53, 2015 (ANVISA).	36
Tabela 2- Condições cromatográficas para o método analítico de quantificação do produto de degradação N-Succinil fenilefrina. ....	41
Tabela 3- IC50 do paracetamol, cloridrato de fenilefrina e maleato de clorfeniramina em linhagem celular VERO. ....	48
Tabela 4- IC50 das misturas binárias Controle (FCc) e Exposta (FCe) e para o Produto Acabado Controle (FCPAC) e Exposto (FCPAE) em linhagem celular VERO. ....	50
Tabela 5- IC50 do paracetamol, cloridrato de fenilefrina e maleato de clorfeniramina em linhagem celular C6 astroglial.....	51
Tabela 6- IC50 das misturas FCc e FCe e do produto acabado controle (FC <sub>PAC</sub> ) e Exposto (FC <sub>PAE</sub> ) em linhagem celular C6 astroglial. ....	53
Tabela 7- IC50 do paracetamol, cloridrato de fenilefrina e maleato de clorfeniramina em linhagem celular HepG2. ....	54
Tabela 8- IC50 das misturas FCc e FCe e do produto acabado controle (FC <sub>PAC</sub> ) e Exposto (FC <sub>PAE</sub> ) em linhagem celular HepG2.....	56
Tabela 9- Condições cromatográficas para o método analítico de quantificação do produto de degradação N-(formil) desloratadina. ....	62
Tabela 10- IC50 da desloratadina isolada, das misturas binárias Controle (DLpac) e Exposta (DLpae) e para o produto acabado controle (DLpac) e exposto (DLpae) em linhagem celular VERO.....	69
Tabela 11- IC50 da desloratadina isolada, das misturas desloratadina + lactose controle (DLc) e desloratadina + lactose exposta (DLe) e do produto acabado controle (DLpac) e exposto (DLpae) em linhagem celular C6 astroglial.....	72
Tabela 12- IC50 da desloratadina isolada, das misturas desloratadina + lactose controle (DLc) e desloratadina + lactose exposto (DLe) e do produto acabado controle (DLpac) e exposto (DLpae) em linhagem celular HepG2. ....	75



## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

ANOVA – Análise de Variância

ANVISA – Agência de Vigilância Sanitária

BCRJ - Banco de Células do Rio de Janeiro

CEUA - Comissões de Ética de Uso de Animais em Pesquisa

CLAE – Cromatografia líquida de alta eficiência

CLAE-DAD – Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada com detector de arranjos de diodos.

DMEM - Dulbecco's Modified Eagle's medium

DMSO – dimetil sulfóxido

DLc – Amostra da mistura desloratadina e lactose controle

DLe – Amostra da mistura de desloratadina lactose expo

DL<sub>PAC</sub> - Amostra de produto acabado (antialérgico) controle

DL<sub>PAE</sub> - Amostra de produto acabado (antialérgico) exposto

EMP – Erro médio padrão

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético

FCc - Amostra da mistura de cloridrato de fenilefrina e maleato de clorfeniramina controle

FCe - Amostra da mistura de cloridrato de fenilefrina e maleato de clorfeniramina controle

FC<sub>PAC</sub> - Amostra de produto acabado (antigripal) controle

FC<sub>PAE</sub> - Amostra de produto acabado (antigripal) exposto

MTT - Ensaio de brometo de metiltiazolildifenil-tetrazólio

SFB – Soro fetal bovino

SRB – Ensaio da sulforodamina B

USP – United States Pharmacopeia



## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	21
2. OBJETIVOS .....	25
2.1. Objetivo geral.....	25
2.2. Objetivos específicos .....	25
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	27
3.1. Matérias-primas e especialidades farmacêuticas.....	27
3.2. Preparo das amostras.....	27
3.3. Quantificação dos produtos de degradação.....	27
3.4. Cultivo Celular .....	27
3.4.1. Preparação das soluções e determinação da viabilidade celular .....	28
3.4.2. Ensaio de <i>Redução</i> de <i>sais</i> tetrazólio (MTT).....	28
3.4.3. Análise estatística .....	28
3.4.4. Células de C6 astroglial .....	28
3.4.5. Células VERO.....	29
3.4.6. Células HepG2 .....	29
4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	31
4.1. N-(succinil) fenilefrina.....	31
4.2. N-(formil) desloratadina .....	32
4.3. Legislação de Produtos de Degradação.....	35
4.4. Cultivo Celular .....	37
5. CAPÍTULO 1 – Avaliação do Potencial Toxicológico da N-(succinil) fenilefrina in vitro em linhagens celulares C6 astroglial, VERO e HepG2. ....	39
5.1. INTRODUÇÃO .....	39
5.2. MATERIAL E MÉTODOS .....	40
5.2.1. Materiais .....	40
5.2.2. Métodos .....	40
5.2.3. Testes in vitro.....	42
5.2.4. Preparação das soluções e determinação da viabilidade celular .....	43
5.2.5. Ensaio de <i>Redução</i> de <i>sais</i> tetrazólio (MTT).....	43
5.2.6. Análise estatística .....	44
5.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	44
5.3.1. Validação Parcial do Método Analítico .....	44
5.3.2. Resultados Analíticos .....	45
5.3.3. Testes in vitro.....	48
5.3.3.1. Avaliação da citotoxicidade em linhagem celular VERO .....	48
5.3.3.2. Avaliação da citotoxicidade em linhagem celular C6 astroglial .....	50
5.3.3.3. Avaliação da citotoxicidade em linhagem celular HepG2.....	53
5.4. CONCLUSÃO .....	57
6. CAPÍTULO 2 – Avaliação do Potencial Toxicológico da N-(formil) desloratadina in vitro em linhagens celulares C6 astroglial, VERO e HepG2. ....	59
6.1. INTRODUÇÃO .....	59

6.2.	MATERIAL E MÉTODOS .....	61
6.2.1	Materiais .....	61
6.2.2	Métodos .....	61
6.2.3	Cultivo celular .....	63
6.2.4	Preparação das soluções e determinação da viabilidade celular .....	63
6.2.5	Ensaio de <i>Redução de sais</i> tetrazólio (MTT).....	63
6.2.6	Análise estatística .....	64
6.3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	64
6.3.1	Seletividade do Método Analítico .....	64
6.3.2	Resultados Analíticos .....	64
6.3.3	Testes in vitro.....	67
6.3.3.1	Avaliação da citotoxicidade em linhagem celular VERO .....	67
6.3.3.2	Avaliação da citotoxicidade em linhagem celular C6 astrogliol .....	70
6.3.3.3	Avaliação da citotoxicidade em linhagem celular HepG2.....	73
6.4.	CONCLUSÕES .....	76
7.	DISCUSSÃO GERAL .....	77
8.	CONCLUSÃO .....	78
9.	REFERÊNCIAS.....	79
10.	DADOS SUPLEMENTARES.....	83
10.1.	Resultados Adicionais Antigripal .....	83
10.2.	Resultados Adicionais Desloratadina .....	90

## 1. INTRODUÇÃO

A automedicação é um problema de saúde pública que vem crescendo ao longo dos anos e se tornando cada vez mais grave devido a facilidade de acesso à medicamentos em farmácias comerciais. Esta é uma prática comum, vivenciada por civilizações de todos os tempos, com características peculiares a cada época e a cada região (ARRAIS, 1997). A facilidade de comprar um medicamento por conta própria para resolver um problema de saúde ao invés de procurar um serviço de saúde para avaliar a origem do mesmo, é cada vez mais comum. Sabe-se que o fato de o sistema de saúde público não ser de fácil acesso, assim como existir muitas pessoas desprovidas de recursos para procurar um serviço de saúde particular contribui muito com esse tipo de atitude da população em geral (NAVES, 2010).

Em contraste com medicamentos prescritos e ilícitos, aquelas disponíveis para os indivíduos comprarem legalmente sem receita médica têm sido muitas vezes percebidas pelo público como relativamente seguras, mas foi reconhecido que os medicamentos sem prescrição têm tanto potencial para causar danos como benefícios (COOPER, 2013). Além disso, o uso indiscriminado destes pode atrasar ou mesmo mascarar o diagnóstico, com aumento de riscos e efeitos adversos e de auto tratamento realizados quando ajuda médica deveria ter sido procurada (WAZAIFY, 2015).

O uso crescente de medicamentos de venda livre para tosse e resfriado são um fenômeno mundial. A venda desses produtos é de aproximadamente US \$ 3,5 bilhões anuais nos Estados Unidos (DART, 2009). A maioria dos antigripais possuem combinações de analgésico, anti-inflamatório, descongestionante nasal, anti-histamínico e/ou antitussígeno (CARR, 2006).

Os antigripais possuem uma enorme diversidade de combinações e diferentes dosagens. Porém, uma incompatibilidade entre a fenilefrina e o sal maleato, que são amplamente utilizados nessas formulações, é relatada em alguns estudos (MARÍN, 2005; WONG, 2006). Essa incompatibilidade é responsável pela formação de um produto de degradação chamado N-(succinil) fenilefrina produzido (ou formado) quando os produtos são expostos a alta temperatura e umidade (MARÍN, 2005; WONG, 2006). Não há relatos na literatura avaliando a toxicidade desse produto, sendo assim não se sabe do potencial tóxico desse produto para a saúde da população.

A rinite alérgica é uma doença comum que afeta até 50 milhões de americanos e até 30% da população na Europa (GEHA, 2001). Os anti-histamínicos H1 de primeira geração obtidos sem receita médica são a forma mais frequente de automedicação para doenças alérgicas, tosse e resfriado e insônia, mesmo tendo efeitos indesejados e potencialmente perigosos que não são conhecidos pelo público em geral (CHURCH, 2010). Com o aumento

da prevalência da doença e para melhorar a qualidade de vida das pessoas, o uso de anti-histamínicos sem prescrição para tratar diferentes tipos de alergias é uma realidade no nosso país. Esses medicamentos possuem uma grande variedade de diferentes classes utilizados indiscriminadamente ao redor do mundo. Dentre eles está a desloratadina, que é um anti-histamínico de segunda geração com longa duração e não sedativo, pois não penetra ou penetra minimamente a barreira hemato-encefálica com atividade seletiva pelos receptores antagonistas H<sup>1</sup> (CHURCH, 2010; PATEL, 2012). O fato de causar menos sonolência também faz com que desloratadina seja apreciada pelos usuários de anti-histamínicos.

Os medicamentos, com o ativo desloratadina, também possuem incompatibilidade relatada na literatura com um excipiente extensamente utilizado em formulações farmacêuticas, a lactose (JEGANATHAN, 2010). Em uma rápida pesquisa em bulas de especialidades comercializadas contendo desloratadina, observou-se que a maioria apresenta a lactose como um dos excipientes. Essa incompatibilidade também forma um produto de degradação (JEGANATHAN, 2010). Na literatura, não foram encontrados estudos avaliando se a ingestão desse produto de degradação é seguro.

Contudo, as pressões para trocar os modelos animais tradicionais para novas tecnologias surgem de várias preocupações, incluindo: a necessidade de avaliar um grande número de produtos químicos anteriormente não testados e novos produtos, a previsibilidade limitada de testes tradicionais para efeitos na saúde humana, duração e custos das abordagens atuais e considerações de bem-estar animal (BASKETTER, 2012). Há uma forte defesa da redução de testes *in vivo* e, sempre que possível, métodos alternativos são claramente preferidos aos testes *in vivo* convencionais quando estão disponíveis (LILIENBLUM, 2008).

Portanto, não há dúvida que a fenilefrina e a desloratadina possuem grandes benefícios para os seus usuários, porém fica caracterizada a existência de produtos de degradação da fenilefrina e desloratadina na presença de sais de maleato e açúcares redutores, respectivamente. Apesar do exposto anteriormente, não há estudos toxicológicos na literatura que atestem a segurança do consumo dessas impurezas que podem ser formadas durante a vida útil desses produtos.

Em face do grande número de usuários é importante que se invista em estudos de segurança para que se conheça com mais propriedade esses produtos de degradação, que muitas pessoas podem estar ingerindo sem ter conhecimento. Por isso, esse trabalho se justifica para trazer dados relevantes de segurança toxicológica desses medicamentos largamente utilizados pela população em geral. Nesse contexto, o presente estudo visa avaliar

a toxicidade dessas impurezas em modelos in vitro de células C6 astrogial, VERO e HepG2, a fim de avaliar uma possível neurotoxicidade, nefrotoxicidade e hepatotoxicidade.

O presente trabalho está estruturado em introdução, objetivos, justificativa, material e métodos, revisão, seguido por dois capítulos, que são propostas de artigos, discussão geral, conclusões e referências. O capítulo 1 refere-se ao artigo que irá ser submetido à revista científica ***Journal of Analytical Toxicology*** relacionado aos estudos de toxicidade in vitro do produto de degradação N-(succinil) fenilefrina, o documento está dividido em introdução, material e métodos, resultados e discussão e conclusão. Da mesma forma, o capítulo 2 se refere ao artigo que também irá ser submetido ao periódico ***Journal of Analytical Toxicology*** com os resultados obtidos para o estudo da toxicidade in vitro da N-(formil) desloratadina contendo a mesma formatação do capítulo 1.



## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo geral**

Avaliar a toxicidade in vitro da N-(succinil) fenilefrina, produto de degradação originado pela incompatibilidade do fármaco fenilefrina com sais de maleato e da N-(formil) desloratadina, o produto de degradação da reação entre a desloratadina com açúcares redutores, em misturas binárias e medicamentos disponíveis no mercado.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Avaliar a nefrototoxicidade dos produtos de degradação das misturas binárias e das formulações através de testes in vitro utilizando linhagem de células VERO;
- Avaliar a hepatotoxicidade dos produtos de degradação das misturas binárias e das formulações através de testes in vitro utilizando linhagem celular HepG2;
- Avaliar a neurotoxicidade dos produtos de degradação das misturas binárias e das formulações através de testes in vitro utilizando linhagem celular C6 astrogial;
- Avaliação dos métodos analíticos para a quantificação dos produtos de degradação.



### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1. Matérias-primas e especialidades farmacêuticas**

Cloridrato de fenilefrina, maleato de clorfeniramina e a desloratadina matérias-primas, bem como formulações contendo estes fármacos foram adquiridas no mercado ou obtidos de doações.

#### **3.2. Preparo das amostras**

As amostras (matérias-primas e formulações) foram expostas a temperatura de 60 °C e 75% de umidade relativa para avaliar a formação dos produtos de degradação de interesse.

Para o antigripal foi exposto a mistura binária (1:1) contendo o ativo maleato de clorfeniramina e o ativo cloridrato de fenilefrina, que são incompatíveis, visando a formação do produto de degradação N-(succinil) fenilefrina. Também foi exposto o produto acabado adquirido no mercado com o intuito de avaliar se a mistura dos ativos com os excipientes pode potencializar ou minimizar a formação do produto de degradação.

A desloratadina também será testada com a mistura binária (1:1) incompatível, o ativo desloratadina e o excipiente lactose, com a intenção de formar o produto de degradação N-(formil) desloratadina. Assim como o antigripal, será exposto também o produto final para ser comparado aos resultados da mistura binária com o produto na sua formulação completa.

#### **3.3. Quantificação dos produtos de degradação**

Para quantificar a formação das impurezas foram utilizados um método da literatura e um método farmacopeico. O método escolhido para a quantificação do produto de degradação N-(succinil) fenilefrina é adaptado de Wong e colaboradores (2006). Já para a quantificação da N-(formil) desloratadina será utilizado o método farmacopeico da USP 42 (2019).

#### **3.4. Cultivo Celular**

Todos os experimentos foram realizados três vezes em triplicata (3x3) e os dados analisados estatisticamente usando o software Prism (GraphPad Software, Estados Unidos, Versão 7.0).

A viabilidade celular será determinada pelo método de MTT. O brometo de MTT é um sal de tetrazólio solúvel em água, que através da clivagem do anel de tetrazólico pela succinato desidrogenase dentro das mitocôndrias é convertido em formazan, que possui a coloração violeta (MOSMANN, *et al.*, 1983). O produto formazan é impermeável às

membranas celulares e, portanto, acumula-se em células saudáveis. A coloração produzida nessa reação é medida por densidade óptica, sendo diretamente proporcional ao número de células viáveis na placa (MOSMANN, *et al.*, 1983). Os resultados serão expressos em termos de EC<sub>50</sub> (efeito citotóxico para 50% das células).

#### **3.4.1 Preparação das soluções e determinação da viabilidade celular**

Todos os compostos foram dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO) e meio de cultura obtendo-se uma concentração final de DMSO de 0,5%. As células da linhagem C6 astrogliial, VERO e Hep-G2 ( $2 \times 10^4$  células/poço) foram semeadas em placas de 96 poços e incubadas por 24 h. Após esse período, as células foram submetidas ao contato com as amostras, nas concentrações entre 50-500  $\mu\text{M}$  por um período de 24 h. A viabilidade celular foi verificada pelo ensaio de brometo de metiltiazolildifenil-tetrazólio (MTT). Foi utilizado o controle contendo apenas o meio de cultura e o controle do veículo (DMSO a 0,5% em meio de cultura). Para determinação da concentração citotóxica para 50 % das células (IC<sub>50</sub>) de cada composto testado foi utilizada análise de regressão não linear com auxílio do software GraphPad Prism 7.0.

#### **3.4.2 Ensaio de *Redução de sais* tetrazólio (MTT)**

A viabilidade das células foi avaliada em placas de 96 poços, após um período de 24 h de incubação, sendo o meio de cultura retirado e, em seguida, adicionado 100  $\mu\text{L}$  de 0,5 mg/mL de MTT a cada poço. As placas foram incubadas por 1 h a 37°C, o MTT foi removido e o produto formado foi lido em 570 e 630 nm em espectrofotômetro de microplacas (Spectramax 190-Molecular Devices, com software ROM SPECTRAMax M2e versão 2.1.35). Foram realizados três experimentos independentes foram realizados em triplicata para cada ensaio ( $n = 3$ ). Os resultados foram expressos como a porcentagem de células viáveis em comparação com o controle do veículo (0,5% DMSO).

#### **3.4.3 Análise estatística**

Os dados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM), e a significância estatística foi determinada pela Análise de Variância (ANOVA,  $p < 0,05$ ), seguida do pós-teste de Dunnett para comparações múltiplas. O programa utilizado para essas análises foi o GraphPad Prism 7.0.

#### **3.4.4 Células de C6 astrogliial**

Células de passagem tardia, obtida da American Type Culture Collection (Rockville, MA, EUA), serão cultivadas de acordo com um procedimento descrito por Santos e colaboradores (2006). Serão semeadas em frascos de 75 cm<sup>2</sup> e cultivadas em meio DMEM suplementado com 5% soro fetal bovino (SFB), mistura de antibióticos (1% de penicilina (100 U/ml) e estreptomicina (10 mg/ml)) e antifúngicos (0,1% de anfotericina B (250 µg/ml)). As células foram mantidas em uma temperatura de 37 °C, em umidade relativa mínima de 95% e uma atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. A substituição do meio é realizada a cada dois ou três dias, de acordo com a observação em microscópio, da confluência de cerca de 80 a 90% das células.

Previamente a cada tratamento as células serão tripsinizadas com uma solução de 0,05% tripsina/EDTA e incubadas por 5 min a 37 °C. Em seguida, será adicionado meio DMEM com 10% de SFB, inativando a ação da tripsina, e centrifugado por 5 min a 1500 rpm. O sobrenadante será descartado e o pellet formado ressuspenso em meio. Em seguida, será realizada a contagem do número de células viáveis em câmara de Neubauer pelo método de exclusão com Trypan Blue. A densidade celular utilizada nos tratamentos será de 2,0 x 10<sup>4</sup> células/poço, em placas de 96 poços. Após 24 h de incubação o meio foi retirado e as células foram submetidas às condições experimentais de tratamento.

#### **3.4.5 Células VERO**

As células VERO foram adquiridas do BCRJ (Banco de Células do Rio de Janeiro) e seu cultivo será de acordo com as especificações do provedor. As células serão semeadas em frascos de 75 cm<sup>2</sup>, cultivadas em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) suplementadas com 10% de soro fetal bovino (SFB) e mistura de antibióticos e antifúngicos 0,1% de anfotericina B (250 µg/ml) e 1% de penicilina (100 UI/ml)/estreptomicina (10 mg/ml). As mesmas serão mantidas a temperatura de 37 °C, em uma atmosfera umidificada e com 5% de CO<sub>2</sub>. A substituição do meio será realizada de acordo com a necessidade das células, conforme a observação em microscópio da confluência de cerca de 80 a 90% das células.

Será seguido o mesmo procedimento de plaqueamento das células já descrito anteriormente.

#### **3.4.6 Células HepG2**

As células foram adquiridas do BCRJ (Banco de Células do Rio de Janeiro) e seu cultivo será de acordo com as especificações do provedor. As células serão semeadas em

frascos de cultivo de 75 cm<sup>2</sup> com meio DMEM suplementado com 10% de SFB e mistura de antibióticos e antifúngicos 0,1% de anfotericina B (250 µg/ml) e 1% de penicilina (100 UI/ml)/estreptomicina (10 mg/ml). As células são mantidas a uma temperatura de 37 °C, em uma atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Após atingir uma confluência de 80% - 90% as células foram ressuspensas em meio de cultura e realiza-se a contagem do número de células viáveis em câmara de Neubauer, pelo método de exclusão com Trypan Blue. O plaqueamento é realizado em placas de 96 poços, na densidade de 2,0 x 10<sup>4</sup> células/poço. Após 24 h de incubação o meio foi retirado e as células foram submetidas as condições experimentais de tratamento.

## 4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 4.1. N-(succinil) fenilefrina

A fenilefrina é uma amina simpatomimética que atua predominantemente nos receptores  $\alpha$ -adrenérgicos. É usada principalmente para tratar congestão nasal (DRUG BANK, 2019). Apresenta-se como um sólido cristalino, de cor branca, com faixa de fusão de 140°C a 145°C, sendo muito solúvel em água. Na sua fórmula estrutural Figura 1 é possível observar a presença dos grupos fenol (pKa 9,07), álcool (pKa 14,24) e amina secundária (pKa 9,69) (CHEMICALIZE, 2019).

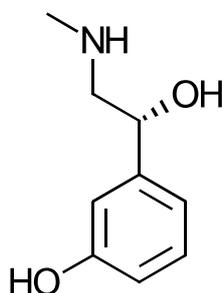


Figura 1- Estrutura molecular da fenilefrina

As formulações de antigripais mais comuns presentes no mercado contêm paracetamol, cloridrato de fenilefrina e o maleato de clorfeniramina, ou maleato de carbinoxamina ou maleato de bronfeniramina. O ácido maléico (Figura 2), frequentemente usado para formar sais com fármacos básicos, é um ácido dicarboxílico  $\alpha,\beta$ -insaturado, que na presença de uma amina primária ou secundária forma o sal maleato (LI, 2012).

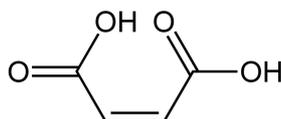


Figura 2- Estrutura molecular do ácido maléico

Normalmente, quando se pensa em incompatibilidade de formulações de medicamentos, se considera a incompatibilidade entre o ativo principal e o adjuvante. Porém, em alguns antigripais a incompatibilidade pode ser entre os ativos da formulação.

Medicamentos que contêm o cloridrato fenilefrina e o sal maleato podem formar um produto originado entre o sal e a amina secundária da fenilefrina, por uma reação de adição nucleofílica (MARÍN, 2005; WONG, 2006).

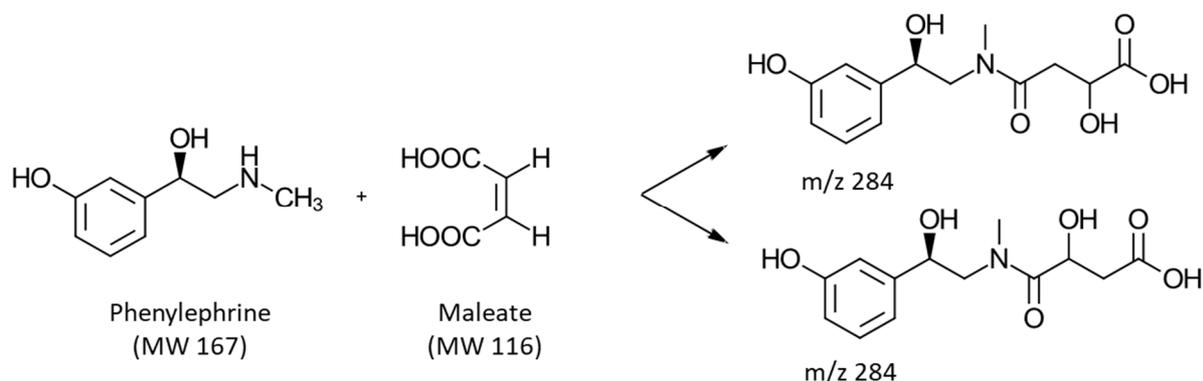


Figura 3- Possíveis estruturas da N-succinil fenilefrina (Adaptado de MARÍN et al., 2005).

A Figura 3 demonstra as possíveis estruturas formadas com a reação do maleato com a fenilefrina (MARÍN, 2005). Wong e colaboradores (2006) sugerem uma outra estrutura que difere nos substituintes da cadeia carbônica conforme Figura 4, mas que também possui MM = 284 (WONG, 2006).

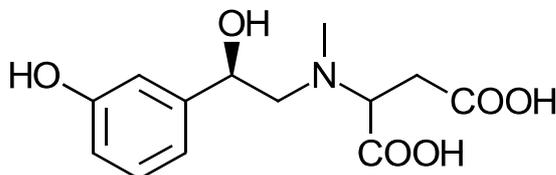


Figura 4 - Possível estrutura da N-succinil fenilefrina segundo Wong e colaboradores (2006) (Adaptado de WONG et al., 2006).

Apesar da estrutura dessa impureza já ter sido elucidada como descrito anteriormente, a N-(succinil) fenilefrina parece nunca ter sido testada quando a sua toxicidade, pois não foram encontrados estudos na literatura. Portanto, se faz necessário que estudos sejam feitos para que segurança da sua ingestão seja determinada.

#### 4.2. N-(formil) desloratadina

A desloratadina é o metabólito ativo da loratadina, que é utilizada no tratamento de rinite alérgica, urticária e inflamação (KHAPRA, 2011; AINUROFIQ 2017). Essa molécula possui uma potência de ação maior que o seu precursor loratadina (GEHA, 2001; MURDOCH, 2003). Apresenta-se como um sólido cristalino, de cor branca, com faixa de fusão de 150 a 151 °C, sendo fracamente solúvel em água, mas solúvel em etanol e propilenoglicol (BISSA, 2013).

Sua fórmula estrutural é mostrada na Figura 19, onde é possível observar a presença dos grupos piridina (pKa 4,3) e piperidina (pKa 9,7) (BISSA, 2013; CHEMICALIZE, 2019)., característicos dessa classe de medicamentos.

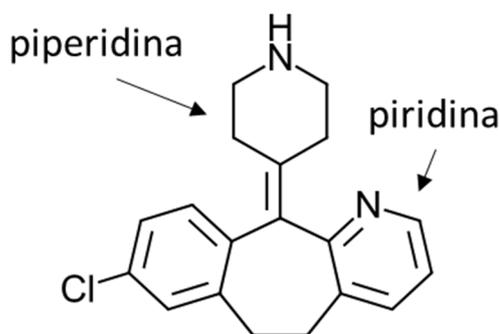


Figura 5 - Estrutura molecular da desloratadina.

Avaliando-se a fórmula estrutural da desloratadina e de acordo com as referências bibliográficas pesquisadas, é possível prever quais os grupamentos podem estar mais susceptíveis a reações de degradação. A desloratadina possui uma amina secundária da piperidina e a amina secundária aromática da piridina onde ocorrem a maioria das reações que envolvem esta substância (LI, 2012), já que o átomo de nitrogênio possui um par de elétrons livres podendo sofrer ataques nucleofílicos (CLAYDEN, 2015). Lembrando que a amina secundária aromática é menos reativa do que a amina secundária não aromática (LI, 2012), é possível inferir que a reação mais provável de acontecer será a reação com a amina secundária da piperidina.

A literatura traz muitas informações sobre a incompatibilidade de fármacos contendo grupamento amino primário ou secundário quando associados com açúcares redutores ou outros aditivos que contenham o grupo carbonila, denominada Reação de Maillard (MATOS, 2013; NARANG, 2015), sendo o caso das formulações encontradas no mercado com o ativo desloratadina, principalmente nas formulações sólidas. Após a avaliação de bulas disponíveis online de formulações contendo desloratadina, foi observado em várias delas a presença de lactose. A lactose é um açúcar redutor, portanto um excipiente que dependendo de como o medicamento é armazenado pode gerar uma impureza devido a reação de Maillard (KHAPRA, 2005; KHAPRA, 2011).

A N-(formil)-desloratadina foi relatada como o principal produto de degradação deste fármaco decorrente deste tipo de reação com excipientes de caráter ácido como ácido esteárico, povidona, crospovidona, lactose anidra ou hidratada e benzoato de sódio (KHAPRA, 2005).

Em sua página, a Farmacopeia Americana (<https://www.usp.org>) apresenta em sua lista de substâncias químicas de referência a N-(formil)-desloratadina como “composto relacionado F” (<https://static.usp.org/pdf/EN/referenceStandards/certificates/1173064-R082U0.pdf>).

As etapas da reação de Maillard para formação do produto de degradação da desloratadina podem ser descritas conforme ilustrado na Figura 6 para a reação do grupo amino presente na estrutura do fármaco com um composto contendo um grupo redutor.

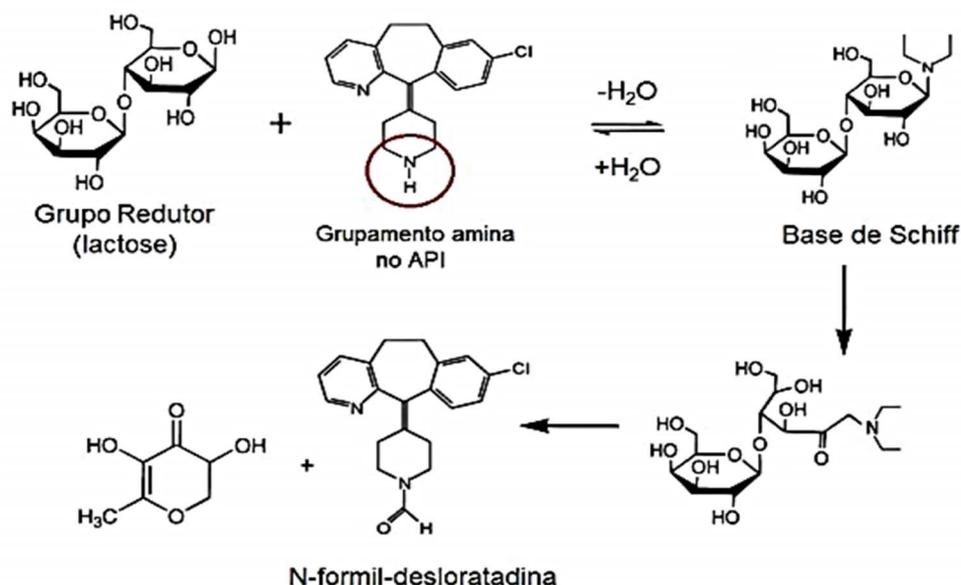


Figura 6 - Formação da N-(formil)-desloratadina na presença de lactose (Adaptado de BISSA et al., 2013).

A reação de Maillard foi primeiro relatada por Louis Maillard, há mais de 80 anos, ao observar que algumas amins e carboidratos reagem para produzir pigmentos marrons (KUMAR, 1994; HOTHHA, 2016). O primeiro produto dessa reação é uma glicosamina simples, que prontamente sofre o rearranjo de Amadori para produzir 1-amino-1-desoxi-2-cetose. Os carboidratos não redutores, como manitol, sacarose e trealose não estão sujeitos a reações de Maillard. Embora os primeiros cientistas acreditassem que apenas os compostos aromáticos primários seriam capazes de sofrer essa reação, pesquisas subsequentes mostraram que quase todas as amins, aromáticas ou alifáticas, são suscetíveis a essa reação (HOTHHA, 2016). A desloratadina também sofre reação de Maillard, mas não é uma reação exclusiva dessa molécula, principalmente, porque ela ocorre com o grupamento amina que é muito comum dentre os fármacos.

Os produtos de degradação formados por reação de Maillard também foram observados em outros produtos farmacêuticos contendo lactose e grupos amino, como cloridrato de fluoxetina, aminofilina, amlodipino, aciclovir e baclofeno (EL-ZAHER, 2014).

Wirth e colaboradores (1998) descreveram a reação entre a amina secundária presente na molécula da fluoxetina com a lactose presente em formulações disponíveis no mercado, sendo a temperatura, a água e a quantidade do excipiente os influenciadores da reação. Essa reação resulta em um produto de degradação chamado N-(formil) fluoxetina.

O salbutamol e a terbutalina também apresentam a reação de Maillard na presença de lactose. El-Zaher e colaboradores (2014) fizeram um levantamento de formulações presentes no mercado revelando que a maioria traz como adjuvante principal a lactose. E constatou que como ambas as moléculas possuem aminas secundárias elas também formam um produto de degradação advindo dessa rota de degradação.

Os excipientes são incluídos nas formulações para auxiliar na fabricação, administração ou absorção dos fármacos. Embora considerados farmacologicamente inertes, os excipientes podem ter grupos funcionais que interagem diretamente com estes, por vezes formando produtos de degradação (FATHIMA, 2011; HOTHHA, 2016).

O impacto dessas reações na estabilidade dos produtos farmacêuticos necessita de investigação. Uma vez que a exposição a temperatura e umidade não são inerentes apenas ao estudo de estabilidade dos medicamentos, mas também ao mal armazenamento desses produtos com os consumidores finais.

#### **4.3. Legislação de Produtos de Degradação**

Com a publicação da RDC58 em 2013 (ANVISA), sendo substituída pela RDC 53 no ano de 2015 (ANVISA), a legislação brasileira começou a exigir o controle de produtos de degradação em medicamentos. A agência reguladora dos Estados Unidos (Food and Drug Administration-FDA) e outras agências em todo o mundo também exigem controle de impurezas em substâncias e produtos farmacêuticos em níveis recomendados pela Conferência Internacional de Harmonização (ICH) (RAHMAN, 2006). A Farmacopeia Britânica (BP) e a farmacopeia americana (USP) também incorporaram níveis permitidos de impurezas presentes nas matérias primas e formulações. Os limites estabelecidos pela legislação brasileira seguem a Tabela 1 que traz valores iguais aos encontrados pelo guia do ICH Q3B (R2), 2006.

Tabela 1-Limites de produtos de degradação estabelecidos pela RDC 53, 2015 (ANVISA).

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

Quando ingerimos um medicamento a nossa principal preocupação é saber se ele irá ser eficaz no tratamento da condição para a qual tomamos. No entanto, a realidade é que a segurança, qualidade e controle da qualidade dos medicamentos são tão importantes para as empresas farmacêuticas e autoridades reguladoras quanto a eficácia de um medicamento. (HUMFREY, 2007). Por isso, é primordial que haja o controle dessas impurezas que possam ser formadas durante a vida útil de um medicamento.

Embora o uso de produtos farmacêuticos seja sempre um equilíbrio de riscos e benefícios, o mesmo não se aplica às impurezas nos produtos farmacêuticos, pois impurezas apresentam apenas risco (JACOBSON-KRAM, 2007). Essas substâncias, na maioria das vezes, devem sempre ser reduzidas aos níveis mais baixos, reconhece-se que elas nem sempre podem ser reduzidas a zero e as especificações para impurezas precisam ser estabelecidas (JACOBSON-KRAM, 2007). Nas diretrizes que abrangem substâncias e produtos medicamentosos, os limiares de impurezas são listados nos quais devem ser notificados, identificados e qualificados (JACOBSON-KRAM, 2007; RDC53, 2015). Onde Limite de Notificação significa que quando o produto de degradação apresentar um valor acima do especificado ele deverá ser reportado no(s) estudo(s) de estabilidade, Limite de Identificação significa que quando a impureza atingir um valor acima do especificado e esse produto de degradação tem sua estrutura desconhecida, o mesmo deverá ter sua estrutura química identificada e Limite de Qualificação valor acima do qual um produto de degradação deverá ser qualificado (RDC53, 2015). Qualificado aqui significa que as impurezas devem ser estabelecidas como seguras no valor ou acima dos níveis presentes em uma substância ou produto acabado através de testes toxicológicos. Para substâncias medicamentosas, isso normalmente é feito testando lotes de medicamentos contendo as impurezas em níveis

adequados na toxicologia pré-clínica. Estudos durante o desenvolvimento de medicamentos que avaliam a toxicidade das impurezas presentes no produto final (JACOBSON-KRAM, 2007). Essas avaliações de toxicidade incluem muitos modelos de experimentação animal.

#### 4.4. Cultivo Celular

Com o passar dos anos, o número de animais utilizados na ciência aumentou com o avanço do desenvolvimento e pesquisa em tecnologia médica. Todos os anos, milhões de animais experimentais são usados em todo o mundo. Contudo, com o desenvolvimento científico e tecnológico, aliado às crescentes preocupações relacionadas ao campo da bioética, impõe-se cada vez mais a busca por métodos alternativos ao uso de animais para a avaliação de toxicidade de substâncias químicas. Por isso, várias alternativas ao teste em animais foram propostas para superar as desvantagens associadas a experimentos com animais e evitar procedimentos antiéticos. Nesse contexto, a cultura de células tornou-se um dos principais modelos de avaliação toxicológica, especialmente com o aumento do rigor para o uso de animais imposto pelas Comissões de Ética de Uso de Animais em Pesquisa (CEUA) (DOKE, 2013; ALVES; GUIMARÃES, 2014).

De modo geral, existem dois tipos de cultivo celular: primário ou de linhagens celulares. O cultivo primário, que ocorre a partir do crescimento de células provenientes de fragmentos de tecido, normal ou tumoral, de origem humana ou animal. Essas células possuem as características do tecido de origem e podem crescer em cultura por um determinado período. Já as linhagens celulares são células que ainda guardam características do tecido de origem, porém possuem alta proliferação, uma vez que passaram pelo processo de imortalização celular (ALVES; GUIMARÃES, 2014). Algumas células podem perder as características genéticas e fenotípicas do tecido de origem quando submetidas a muitas passagens em cultura *in vitro* (BRAGANHOL et al., 2009).

A linhagem celular VERO é uma linhagem de células fibroblásticas aderentes, oriundas de rim de macaco-verde africano (*Cercopithecus aethiops*). Elas são homólogas às células do corpo humano, são facilmente cultivadas e já reconhecidas na literatura como uma importante ferramenta para avaliação de nefrotoxicidade *in vitro* (FRANÇA et al., 2014; PEROPADRE et al., 2011; LIAO, 2010; FREIRE, 2005). Não há relatos na literatura da determinação da toxicidade da substância N-(succinil) fenilefrina, nem como do ativo cloridrato de fenilefrina.

As células gliais C6 são de uma linhagem celular astrogliar proveniente de ratos e amplamente utilizada para avaliar a toxicidade de medicamentos *in vitro* (BERNARDI, 2008;

EL-BACHA, 2001; DUAN, 2013). Não existem relatos de avaliação da citotoxicidade da N-(succinil) fenilefrina nesta linhagem, e nem mesmo do ativo fenilefrina.

A HepG2 é uma linhagem celular de hepatoma humano amplamente utilizadas em estudos in vitro como alternativa ao uso da cultura primária de hepatócitos (DONATO, TOLOSA, 2015). Essas células são altamente diferenciadas e exibem muitas das características genótípicas de células hepáticas normais. Sendo assim, a linhagem HepG2 pode ser utilizada para triagem da hepatotoxicidade de fármacos e seus produtos relacionados (GERETS et al., 2012). As células HepG2 possuem baixos níveis de expressão basal do complexo enzimático citocromo P450 (CYP). No entanto, alguns estudos mostram que as células HepG2 podem ser induzidas a expressar as isoformas CYP1A2, CYP2B6 e CYP3A4 de forma semelhante a hepatócitos humanos (CHOI et al., 2015; DONATO, TOLOSA, 2015; GERETS et al., 2012).

## **5. CAPÍTULO 1 – Avaliação do Potencial Toxicológico da N-(succinil) fenilefrina in vitro em linhagens celulares C6 astroglial, VERO e HepG2.**

Nota 1: Artigo a ser submetido ao periódico *Journal of Analytical Toxicology*.

### **5.1. INTRODUÇÃO**

Diferentes preparações farmacêuticas para a gripe comum contêm paracetamol, cloridrato de fenilefrina e maleato de clorfeniramina. A formação de um produto de degradação foi evidenciada, e essa impureza advém da reação da fenilefrina e sais de maleato (MARÍN, 2005; WONG, 2006). Essa substância foi caracterizada como a N-(succinil) fenilefrina, com massa molecular de 284 MM (MARÍN, 2005; WONG, 2006). Porém, apesar de antigripais serem muito consumidos pela população em geral, na literatura não foram encontrados dados que trazem a segurança da ingestão dessa impureza. Uma vez que ela pode ser formada apenas com o armazenamento inadequado do medicamento é imprescindível que estudos sejam realizados para que haja dados de segurança do consumo da N-(succinil) fenilefrina.

Inicialmente serão realizados os testes de toxicidade com as matérias primas isoladas, com o objetivo de descartar qualquer interferência nos testes com o produto de degradação. Para a obtenção da impureza, as misturas binárias cloridrato de fenilefrina e maleato de clorfeniramina (1:1) e o produto acabado serão expostos durante dez dias a temperatura de 60 °C e umidade aproximada de 75% umidade relativa. Após a exposição, as amostras expostas e os controles (não expostos) serão submetidos a análise por CLAE-DAD para verificar a degradação da fenilefrina nas amostras expostas frente às amostras controles, assim como quantificar o produto de degradação formado nas amostras expostas (semi-quantitativo).

A metodologia analítica utilizada será o método relatado por Wong e colaboradores (2006), com adaptações. Com o intuito de atestar a eficiência do método ao qual ele se propõe, será realizada uma validação parcial avaliando-se os parâmetros seletividade, linearidade e precisão do método utilizado para quantificar o cloridrato de fenilefrina e o produto de degradação N-(succinil) fenilefrina.

Os testes de citotoxicidade serão realizados em linhagens celulares (VERO, C6 astroglial e HepG2).

Dentro deste contexto, e a impossibilidade de avaliarmos o produto de degradação isolado, a proposta principal deste estudo foi avaliar a citotoxicidade induzida pelas misturas de cloridrato de fenilefrina-maleato de clorfeniramina com o produto de degradação N-(succinil) fenilefrina e uma forma farmacêutica contendo a combinação mais comum de ativos encontrada no mercado brasileiro, nas linhagens celulares VERO, C6 astroglial e HepG2.

O objetivo principal desse trabalho é testar a citotoxicidade do produto de degradação com estrutura elucidada pelos trabalhos mencionados, N-(succinil) fenilefrina. Portanto, avaliar o potencial citotóxico de amostras degradadas contendo N-(succinil) fenilefrina, nas linhagens celulares VERO, C6 astroglial e HepG2.

## **5.2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **5.2.1 Materiais**

Para os experimentos serão utilizadas as matérias primas paracetamol, cloridrato de fenilefrina, maleato de clorfeniramina e um produto acabado. Esses materiais foram adquiridos no mercado ou por doação. O produto acabado que será testado é composto de 4 mg de cloridrato de fenilefrina, 4 mg de maleato de clorfeniramina e 400 mg paracetamol, mais os excipientes da formulação em cápsulas.

A matéria prima de cloridrato de fenilefrina (Fabricante: HISOAR, Índia, Lote: P-581-CN20141001, Teor:100,0%) foi usada como um padrão de trabalho para a quantificação da N-(succinil) fenilefrina, visto que ambas as substâncias possuírem absorções muito próximas. Os reagentes utilizados foram acetonitrila grau CLAE (MERCK, Darmstadt, Alemanha), perclorato de sódio (VETEC, Rio de Janeiro, Brasil) e ácido fosfórico (MERCK, Darmstadt, Alemanha). A água ultrapura foi obtida usando sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA). Também foram utilizadas as matérias primas maleato de clorfeniramina (Fabricante: KONGO CHEMICAL, Japão, Lote: 8Y010, Teor: 99,7%) e paracetamol (Fabricante: MEGHMANI, Índia, Lote: 1711PN2310, Teor: 100,3%) nos testes in vitro.

### **5.2.2 Métodos**

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é uma técnica muito utilizada para a quantificação desse tipo de analito. A técnica permite a separação de diversos compostos presentes em uma amostra e possibilita a identificação e quantificação de todos os compostos. Para a quantificação do produto de degradação formado, N-(succinil) fenilefrina, foi utilizada a metodologia analítica descrita por Wong e colaboradores (2006). O método descrito é capaz de quantificar o produto de degradação N-(succinil) fenilefrina frente aos demais componentes da formulação.

As soluções foram preparadas na concentração de 0,08 mg/mL de cloridrato de fenilefrina e maleato de clorfeniramina em água purificada:metanol (70:30).

Tabela 2- Condições cromatográficas para o método analítico de quantificação do produto de degradação N-Succinil fenilefrina.

Método:	Adaptado de Wong (2006).		
Sistema Cromatográfico:	Cromatografia líquida de alta eficiência do fabricante Shimadzu com detector de arranjo de Diodos (DAD) (SPD-M10A), bomba quaternária (LC-20AT), injetor automático (SIL-20A), forno para coluna (CTO-20A) e controlador (DGU-20A).		
Coluna:	Zorbax SB-CN 250 X 4,6 mm 5,0um – Agilent		
Detecção:	215 nm		
Fase Móvel:	Canal A: Sol. Aquosa contendo 0,1% de ácido perclórico e 100mM de perclorato de sódio Canal B: Acetonitrila		
Sistema Gradiente ou proporção de fase móvel:	<i>Tempo (min)</i>	<i>Fase Móvel A (%)</i>	<i>Acetonitrila B (%)</i>
	0 → 4,0,0	94,0	6,0
	4,0 → 16,0	94,0 → 10,0	6,0 → 90,0
	16,0 → 17,0	10,0 → 94,0	90,0 → 6,0
	17,0 → 20,0	94,0	6,0
Diluyente:	H2O: Metanol (70:30)		
Fluxo (mL/min):	1,0 mL/min		
Volume de Injeção:	10 µL		
Temperatura de Coluna:	25°C		
Tempo de corrida:	20 min		

Para validação, foram determinados os seguintes critérios: especificidade /seletividade, linearidade e precisão.

A especificidade do método foi determinada preparando as soluções com as substâncias paracetamol (8,00 mg/mL), cloridrato de fenilefrina (0,08 mg/mL) e maleato de clorfeniramina (0,08 mg/mL) isoladas e também uma amostra do produto acabado, na mesma concentração dos ativos isolados, e do diluente para verificar se há interferência nos tempos de retenção. Também foi verificado o índice de pureza do ativo fenilefrina e do produto de degradação N-(succinil) fenilefrina ao qual se tem interesse de quantificar.

A faixa de concentração a ser utilizada para o estudo de linearidade é selecionada conforme Resolução da ANVISA vigente (RDC166, 2017) e Conferência Internacional sobre Harmonização (ICH, 2005). A faixa de concentração analisada quando se trata de impurezas é do LQ até 120% do limite permitido para essa impureza, que no caso do presente trabalho seria 0,1% até 0,6%, considerando a concentração de fenilefrina na amostra analisada.

Contudo, no nosso estudo a quantidade de impureza formada nos testes de degradação ultrapassou o limite recomendado pelo ICH e pela RDC 53/2015. Por isso, a curva da linearidade testada foi do limite de quantificação (0,1%) até 15% da concentração de fenilefrina na amostra, pois os valores encontrados foram em torno de 10% de produto de degradação. As concentrações escolhidas para o teste foram: 0,1%, 0,2%, 0,5%, 5,0% e 15,0%. A concentração de 0,1% contempla o Limite de Notificação, a concentração de 0,2% o Limite de Identificação e a concentração de 0,5% o Limite de Qualificação (RDC53, 2015).

Para avaliar a precisão foi realizado o teste de repetibilidade e precisão intermediária. Este parâmetro será verificado por 6 determinações, na concentração teórica de 0,08 mg/mL de fenilefrina, com a amostra exposta por cinco dias a temperatura 60 °C e umidade em torno de 75% UR. O critério de aceitação utilizado será de o desvio padrão relativo ser menor ou igual a 2%. Para a avaliação da precisão intermediária, serão analisadas 6 determinações em segundo dia e o critério de aceitação utilizado será de o desvio padrão relativo ser menor ou igual a 2% para as doze determinações, considerando no cálculo as amostras do dia 1 e dia 2. Os cálculos do produto de degradação N-(succinil) fenilefrina será efetuado a partir da equação da reta obtida no teste de linearidade.

Para os testes *in vitro* com o cloridrato de fenilefrina, maleato de clorfeniramina e paracetamol isolados foram testadas as concentrações de 4,18 a 83,6 µg/mL de fenilefrina, 6,87 a 137,39 µg/mL de clorfeniramina e 3,78 a 78,58 µg/mL de paracetamol, ou seja, no máximo 500µM, nos três tipos de linhagem celular. Para as misturas binárias contendo o cloridrato de fenilefrina e maleato de clorfeniramina controle as concentrações testadas foram, respectivamente, as concentrações equivalentes de fenilefrina de 7,5 a 250,0 µg/mL. Na mistura contendo o cloridrato de fenilefrina e maleato de clorfeniramina exposto (10 dias a 60 °C e 90 de umidade relativa, UR) com o produto de degradação N-(succinil) fenilefrina as concentrações de trabalho foram as mesmas do não exposto. As concentrações estabelecidas para o produto acabado exposto e não exposto foram 0,13 a 4,35 µg/mL de fenilefrina, também é importante salientar que no produto acabado exposto há a presença de N-(succinil) fenilefrina. O fato de o produto acabado possuir uma dosagem muito alta de paracetamol impossibilitou a realização do teste na mesma concentração da mistura binária.

As misturas de cloridrato de fenilefrina e maleato de clorfeniramina não expostos foram preparadas nas proporções (1:1). Da mesma forma as misturas expostas foram preparadas nessa proporção.

### **5.2.3 Testes *in vitro***

A linhagem celular de glioblastoma C6 de passagem tardia foi obtida da *American Type Culture Collection* (ATCC, Rockville, MD). Já as linhagens celulares VERO (renal sadia)

e Hep-G2 (hepatocarcinoma) foram adquiridas do Banco de células do Rio de Janeiro (BCRJ). A linhagem C6 cultivadas em *Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) low* suplementada com 5% de soro fetal bovino (SFB). As linhagens VERO e Hep-G2 foram cultivadas com *DMEM high* e suplementadas com 10% de SFB. Todos os meios de cultivo foram suplementados com 0,1% de anfotericina B (250 µg/mL) e 1% de penicilina (100 U/mL)/estreptomicina (10 mg/mL). As células foram mantidas em incubadora de CO<sub>2</sub> (Panasonic Healthcare Co., COM-170 AIC, EUA) com umidade relativa de 95% e 5% de CO<sub>2</sub>.

Células em crescimento exponencial foram retiradas das garrafas de cultura usando 0,05% de tripsina/ etilenodiaminatetracético (EDTA) e semeadas em placas de cultura na densidade celular padronizada neste trabalho. Após 24 h de incubação o meio foi retirado e as células foram submetidas as condições experimentais de tratamento.

#### **5.2.4 Preparação das soluções e determinação da viabilidade celular**

Todos os compostos foram dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO) e meio de cultura produzindo uma concentração final de DMSO de 0,5%. As células da linhagem C6 astrogliar, VERO e Hep-G2 (2,0 x10<sup>4</sup> células/poço) foram semeadas em placas de 96 poços e incubadas por 24 h. Após esse período, as células foram submetidas ao contato com as amostras, nas concentrações entre 50-500 µM por um período de 24 h. A viabilidade celular foi verificada pelo ensaio de brometo de metiltiazolildifenil-tetrazólio (MTT). Foi utilizado o controle contendo apenas o meio de cultura e o controle do veículo (DMSO a 0,5% em meio de cultura). Para determinação da concentração citotóxica para 50 % das células (IC<sub>50</sub>) de cada composto testado foi utilizada análise de regressão não linear com auxílio do software GraphPad Prism 7.0.

#### **5.2.5 Ensaio de Redução de sais tetrazólio (MTT)**

A viabilidade das células foi avaliada em placas de 96 poços, após um período de 24 h de incubação, sendo o meio de cultura retirado e, em seguida, adicionado 100 µL de 0,5 mg/mL de MTT a cada poço. As placas foram incubadas por 1 h a 37 °C, o MTT foi removido e o produto formado foi lido em 570 e 630 nm em espectrofotômetro de microplacas (Spectramax 190-Molecular Devices, com software ROM SPECTRAMax M2e versão 2.1.35). Pelo menos três experimentos independentes foram realizados em triplicata para cada ensaio (n = 3). Os resultados foram expressos como a porcentagem de células viáveis em comparação com o controle do veículo (0,5% DMSO).

### 5.2.6 Análise estatística

Os dados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM), e a significância estatística foi determinada pela Análise de Variância (ANOVA,  $p < 0,05$ ), seguida do pós-teste de Dunnett para comparações múltiplas. O programa utilizado para essas análises foi o GraphPad Prism 7.0.

## 5.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.3.1 Validação Parcial do Método Analítico

Para avaliar se o método é adequado para a quantificação do produto de degradação N-(succinil) fenilefrina e do ativo cloridrato de fenilefrina foi realizada uma validação parcial. Os testes realizados foram a seletividade, linearidade e precisão.

Conforme pode ser observado na Figura 7, nos cromatogramas da Solução Diluente não se observaram interferências nos tempos de retenção apresentados pelos ativos no respectivo comprimento de onda analisado. No cromatograma da amostra de Produto Acabado, os tempos de retenção dos ativos foram semelhantes aos encontrados para as respectivas substâncias isoladas. O Produto de degradação N-(succinil) fenilefrina presente na amostra de produto acabado evidencia que o mesmo não interfere na separação, identificação e quantificação dos ativos. Deste modo, o método apresenta-se seletivo para identificação dos ativos no produto acabado a partir da comparação dos tempos de retenção dos ativos no cromatograma da amostra com o das substâncias isoladas.

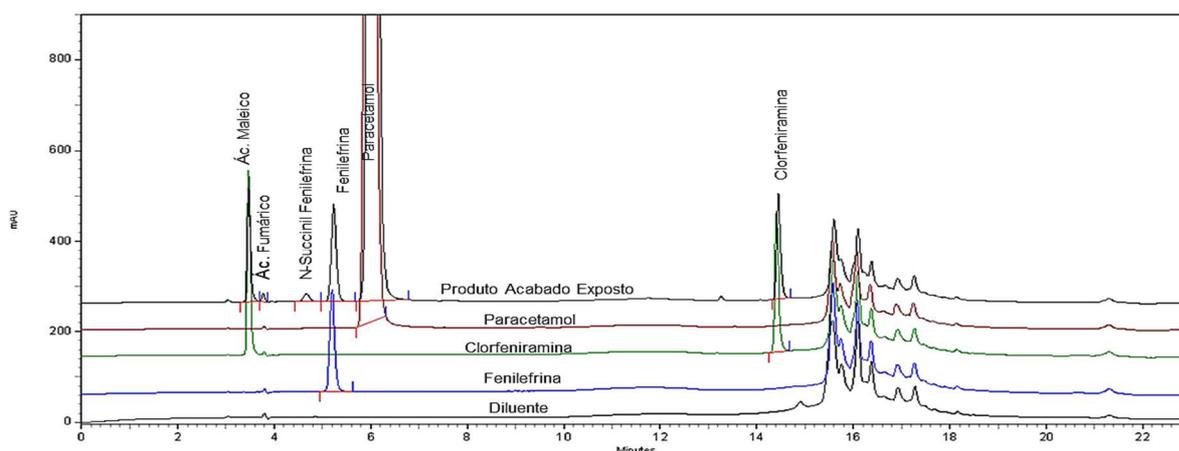


Figura 7 - Cromatogramas obtidos no teste de seletividade (sobrepastos).

Os índices de pureza de pico do ativo fenilefrina e do produto de degradação N-(succinil) fenilefrina obtidos foram de 1,00, caracterizando que os picos estão puros.

O índice de correlação encontrado para a curva de linearidade foi de 0,99993, portanto o método pode ser considerado linear para a faixa de concentração testada.

No teste de repetibilidade encontrou-se uma média no teor do produto de degradação de 6,62% com um DPR (%) de 1,23, considerando as seis amostras analisadas no primeiro dia. O resultado de precisão intermediária foi de uma média no teor do produto de degradação de 6,65% com um DPR (%) de 1,46 considerando as 12 amostras, seis do primeiro dia mais as seis do segundo dia. Portanto, de acordo com a análise dos resultados obtidos nos testes de repetibilidade e de precisão intermediária, e em comparação com os critérios de aceitação mencionados pode-se concluir que o método é preciso para quantificar ao produto de degradação N-(succinil) fenilefrina.

### 5.3.2 Resultados Analíticos

Através dos resultados obtidos na análise das misturas binárias controle e exposta observamos que houve uma queda no teor de fenilefrina quando relacionado ao controle de 10,37%, gerando a formação do produto de degradação N-(succinil) fenilefrina de 10,04%.

As Figuras 8 e 9 representam os cromatogramas obtidos durante a análise por cromatografia líquida de alta eficiência das misturas de cloridrato de fenilefrina e maleato de clorfeniramina controle e exposta.

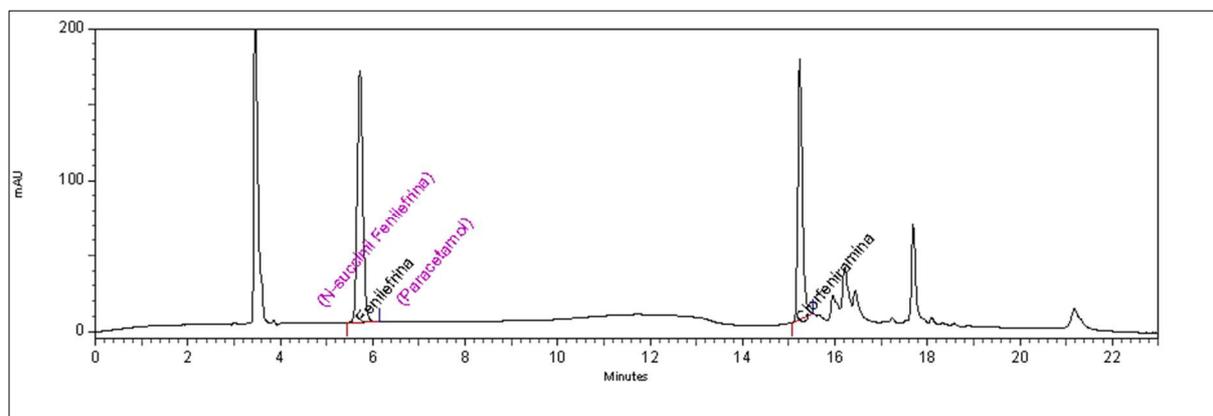


Figura 8 - Cromatograma obtido da análise por cromatografia líquida de alta eficiência da amostra da mistura de cloridrato de fenilefrina e maleato de clorfeniramina controle (FCc).

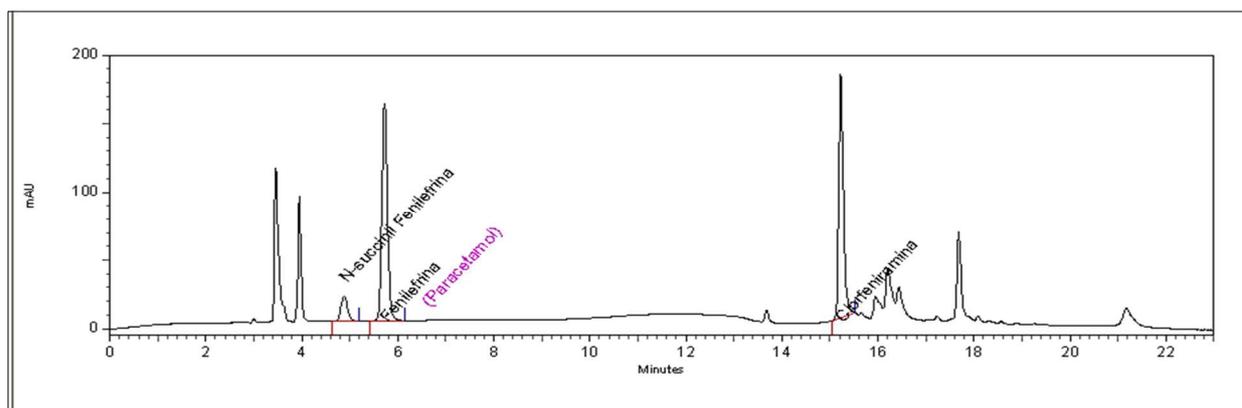


Figura 9 - Cromatograma obtido da análise por cromatografia líquida de alta eficiência da amostra da mistura de cloridrato de fenilefrina e maleato de clorfeniramina exposta (FCe).

No cromatograma da Figura 8 é possível observar a presença apenas dos picos referentes ao ativo cloridrato de fenilefrina e maleato de clorfeniramina. Já na Figura 9, além dos picos mencionados, observa-se o pico do produto de degradação N-(succinil) fenilefrina, no tempo de retenção em torno de 4,8 min, e o pico do ácido fumárico (isômero do ácido maleico), em torno de 4 min. O surgimento do pico do produto de degradação N-(succinil) fenilefrina se deve pela incompatibilidade entre os dois ativos quando estes expostos a temperatura e umidade mencionada anteriormente nesse trabalho.

Através dos resultados analíticos obtidos para o produto acabado controle e exposto foi possível observar que houve uma queda no teor de fenilefrina, quando relacionado ao controle, de 10,5 %, gerando a formação do produto de degradação N-(succinil) fenilefrina em concentração de 9,7 %. Também é possível observar que mesmo o controle já apresentava uma pequena quantidade de produto de degradação, mesmo não exposto, isso se deve provavelmente por causa da validade do produto já estar próximo do vencimento e ao possível mal armazenamento desse produto.

As Figuras 08 e 09 representam os cromatogramas obtidos durante a análise por cromatografia líquida de alta eficiência das amostras de produto acabado controle (FC<sub>PAC</sub>) e produto acabado exposto (FC<sub>PAE</sub>).

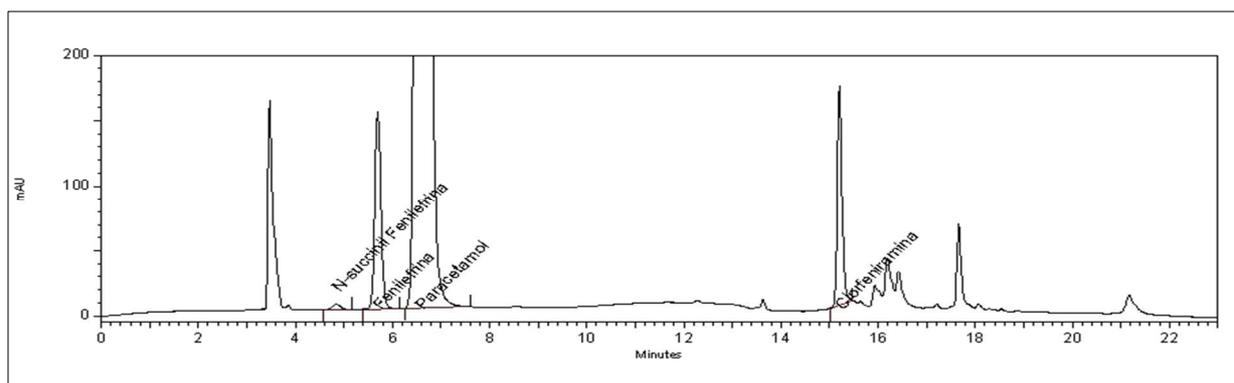


Figura 10 - Cromatograma obtido da análise por cromatografia líquida de alta eficiência da amostra de produto acabado controle (FC<sub>PAC</sub>).

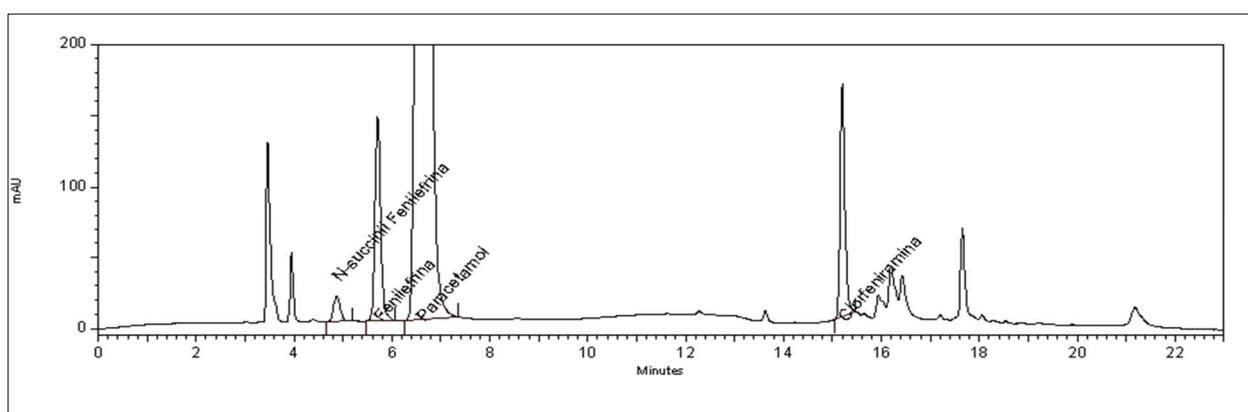


Figura 11 - Cromatograma obtido da análise por cromatografia líquida de alta eficiência da amostra de produto acabado exposto (FC<sub>PAE</sub>).

No cromatogramas da Figura 10 é possível observar a presença dos picos referentes aos ativos da formulação cloridrato de fenilefrina, maleato de clorfeniramina, paracetamol e um pequeno pico do produto de degradação N-(succinil) fenilefrina. Já na Figura 11, além dos picos mencionados observa-se o pico do produto de degradação N-(succinil) fenilefrina em tamanho maior no tempo de retenção em torno de 4,8 min e também ao pico correspondente ao isômero do ácido maleico, ácido fumárico. O crescimento do pico do produto de degradação N-(succinil) fenilefrina se deve a exposição dos ativos incompatíveis a degradação forçada térmica úmida.

O método utilizado se mostrou adequado para o objetivo proposto que foi quantificar a degradação do ativo cloridrato de fenilefrina e caracterizar a formação do seu produto de degradação N-(succinil) fenilefrina.

### 5.3.3 Testes in vitro

#### 5.3.3.1 Avaliação da citotoxicidade em linhagem celular VERO

Na Figura 12 são apresentados os resultados de viabilidade celular obtidos após exposição de 24 h da linhagem celular VERO ao cloridrato de fenilefrina, ao maleato de clorfeniramina e ao paracetamol isolados.

O IC50 obtido para cada substância está descrito na Tabela 3.

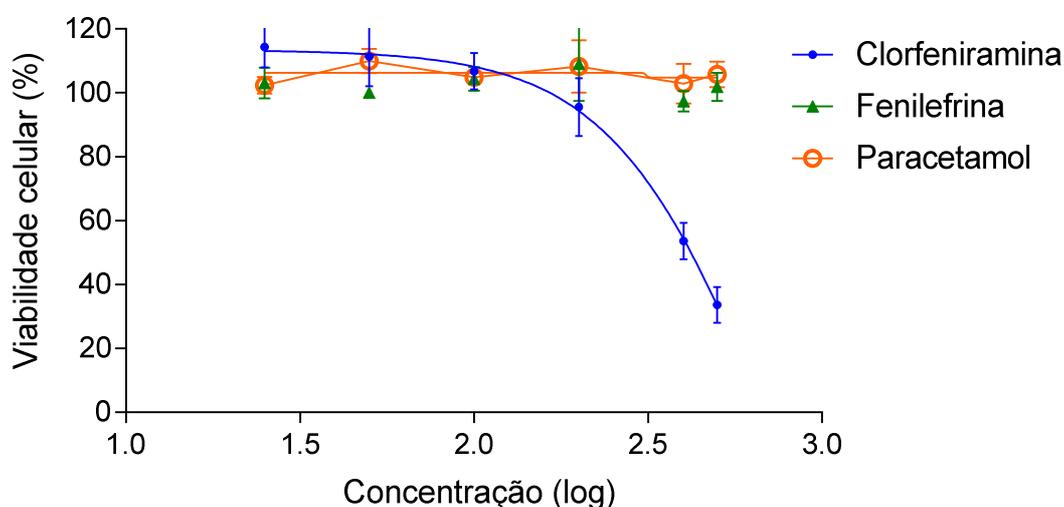


Figura 12 - Curva de viabilidade celular após tratamento com cloridrato de fenilefrina, maleato de clorfeniramina e paracetamol isolados após 24 h de exposição em linhagem celular VERO.

Tabela 3- IC50 do paracetamol, cloridrato de fenilefrina e maleato de clorfeniramina em linhagem celular VERO.

Substância	IC 50 $\mu\text{g/mL} \pm \text{EPM}^*$
<b>Paracetamol</b>	>75,6 $\mu\text{g/mL}$
<b>Fenilefrina</b>	>83,6 $\mu\text{g/mL}$
<b>Clorfeniramina</b>	107,6 $\pm$ 4,7 $\mu\text{g/mL}$

\*Os resultados foram expressos em média  $\pm$  erro padrão da média

Os resultados mostram que o ativo paracetamol possui IC 50 maior que 75,6  $\mu\text{g/mL}$ , o cloridrato de fenilefrina possui IC 50 maior do que 83,6  $\mu\text{g/mL}$ , concentrações máximas testadas para estes ativos. Contudo, ao avaliar a citotoxicidade do ativo maleato de clorfeniramina observou-se uma diminuição na viabilidade celular a partir da concentração 107,6  $\pm$  4,7  $\mu\text{g/mL}$ , sendo que a concentração máxima testada para ele foi de 137,39  $\mu\text{g/mL}$ .

Estes resultados serão muito importantes para avaliar a interferência desses ativos nas misturas que serão testadas subsequentemente.

Na Figura 13 são apresentados os resultados de viabilidade celular obtidos após exposição de 24 h da linhagem celular VERO à mistura binária de cloridrato de fenilefrina e maleato de clorfeniramina controle (FCc) e mistura binária de cloridrato de fenilefrina e maleato de clorfeniramina exposto (FCe).

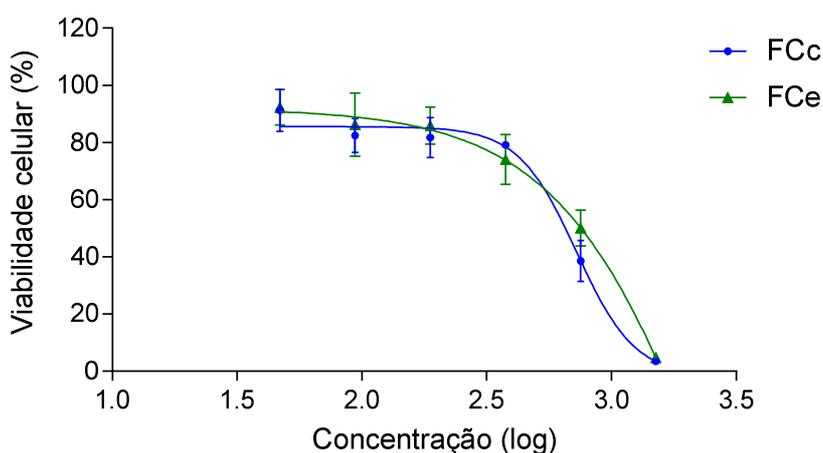


Figura 13 - Curva de viabilidade celular após tratamento com misturas binárias de cloridrato de fenilefrina e maleato de clorfeniramina controle (FCc) e cloridrato de fenilefrina e maleato de clorfeniramina exposto (FCe) após 24 h de exposição em linhagem celular VERO.

Na Figura 14 são apresentados os resultados de viabilidade celular obtidos após exposição de 24 h da linhagem celular VERO ao Produto Acabado Controle (FC<sub>PAC</sub>) e ao Produto Acabado Exposto (FC<sub>PAE</sub>).

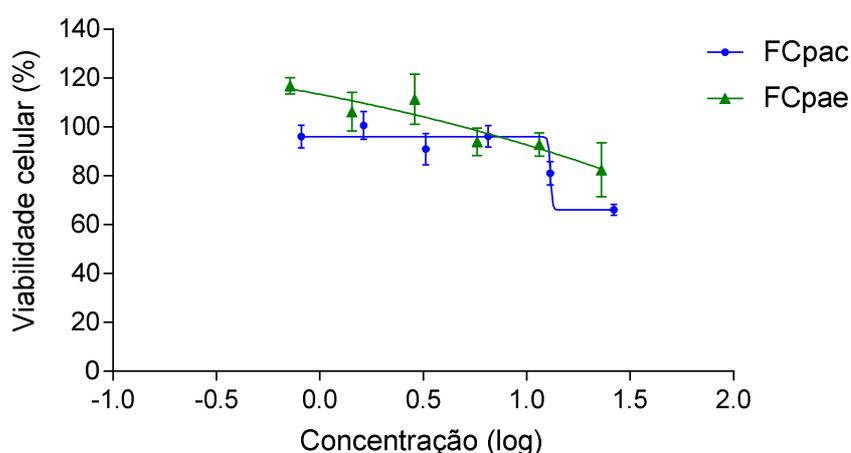


Figura 14 - Curva de viabilidade celular após tratamento com a mistura *Produto Acabado Controle* (FC<sub>PAC</sub>) e ao *Produto Acabado Exposto* (FC<sub>PAE</sub>) após 24 h de exposição em linhagem celular VERO.

O IC50 obtido para as misturas e o produto acabado está descrito na Tabela 4.

Tabela 4- IC50 das misturas binárias Controle (FCc) e Exposta (FCe) e para o Produto Acabado Controle (FCPAC) e Exposto (FCPAE) em linhagem celular VERO.

<b>Amostra</b>	<b>IC 50 µg/mL ± EPM*</b>
<b>Fenil+Clor Controle (FCc)</b>	125,0 ± 5 µg/mL
<b>Fenil+Clor Exposto (FCe)**</b>	104,0 ± 12 µg/mL (fenilefrina)
	26,0 ± 3 µg/mL (N-(succinil) fenilefrina)
<b>Produto Acabado Controle (FC<sub>PAC</sub>)</b>	> 4,2 µg/mL
<b>Produto Acabado Exposto (FC<sub>PAE</sub>)***</b>	> 3,9 µg/mL (fenilefrina)
	> 0,44 µg/mL (N-(succinil) fenilefrina)

\*Os resultados foram expressos em média ± erro padrão da média

\*\* A mistura contém 10,0% de N-(succinil) fenilefrina.

\*\*\* A mistura contém 9,7% de N-(succinil) fenilefrina.

Os experimentos realizados comparando os valores de IC50 das misturas binárias de cloridrato de fenilefrina e maleato de clorfeniramina controle e expostas foi encontrado um valor de  $p > 0,05$  demonstrando que estatisticamente não há diferença significativa nos resultados de citotoxicidade para as células da linhagem VERO. Isso nos remete a conclusão de que a impureza N-(succinil) fenilefrina quando na concentração de até 10,0% de fenilefrina da formulação não possui toxicidade para essa linhagem de células na concentração testada. Da mesma forma, pode-se concluir para o produto acabado controle e exposto, uma vez que quando comparados os valores de IC 50 para as duas amostras foi encontrado, da mesma forma, um  $p > 0,05$  indicando que não houve diminuição significativa na viabilidade celular relacionando o exposto ao controle. Portanto, a impureza presente no produto acabado exposto na concentração de 9,7% relacionada a dose de fenilefrina no produto, tampouco apresentou indícios de citotoxicidade para a linhagem de células VERO.

Não existem estudos na literatura mostrando a citotoxicidade da impureza N-(succinil) fenilefrina in vitro em linhagens de origem renal. Os resultados apresentados neste trabalho apontam que a impureza não possui toxicidade nas concentrações avaliadas na linhagem celular VERO.

### 5.3.3.2 Avaliação da citotoxicidade em linhagem celular C6 astrogliol

Na Figura 15 são apresentados os resultados de viabilidade celular obtidos após exposição de 24 h da linhagem celular C6 astrogliol ao cloridrato de fenilefrina, ao maleato de clorfeniramina e ao paracetamol isolados.

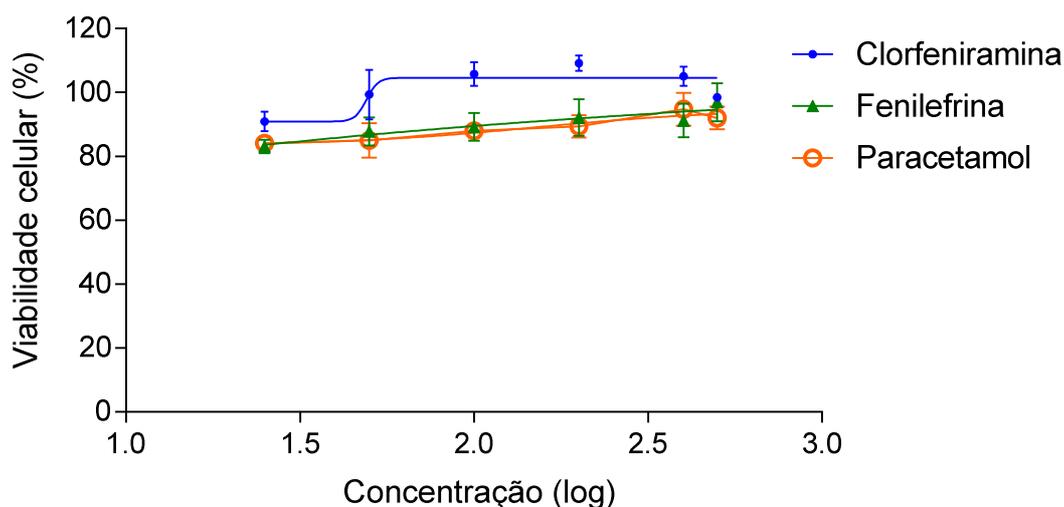


Figura 15 - Curva de viabilidade celular após tratamento com cloridrato de fenilefrina, maleato de clorfeniramina e paracetamol isolados após 24 h de exposição em linhagem celular C6 astrogliar.

O IC50 obtido para cada substância está descrito na Tabela 5.

Tabela 5- IC50 do paracetamol, cloridrato de fenilefrina e maleato de clorfeniramina em linhagem celular C6 astrogliar.

Substância	IC 50 $\mu\text{g/mL} \pm \text{EPM}^*$
<b>Paracetamol</b>	>75,6 $\mu\text{g/mL}$
<b>Fenilefrina</b>	>83,6 $\mu\text{g/mL}$
<b>Clorfeniramina</b>	> 137,4 $\mu\text{g/mL}$

\*Os resultados foram expressos em média  $\pm$  erro padrão da média

Os resultados dos experimentos demonstram que ambos os ativos não exerceram um efeito citotóxico nas células C6 astrogliais nas concentrações testadas.

Na Figura 16 são apresentados os resultados de viabilidade celular obtidos após exposição de 24 h da linhagem celular C6 astrogliar à mistura binária de cloridrato de fenilefrina e maleato de clorfeniramina controle (FCc) e mistura binária de cloridrato de fenilefrina e maleato de clorfeniramina exposto (FCe).

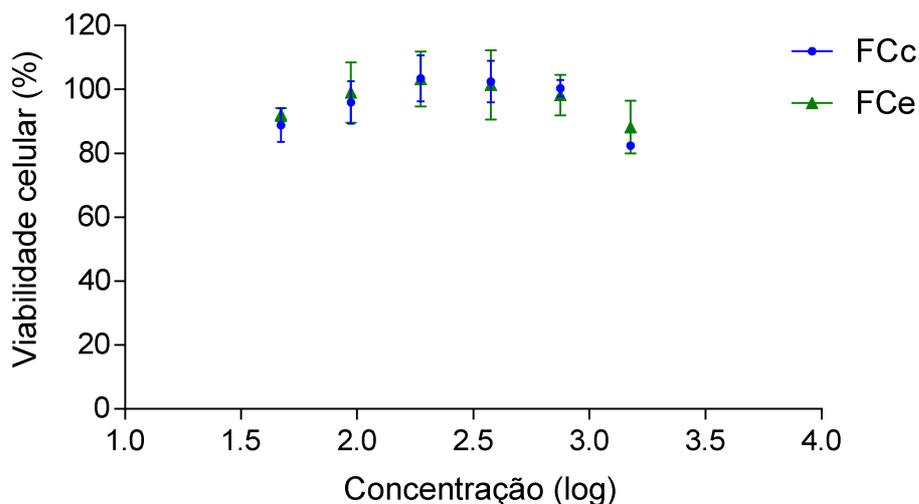


Figura 16 - Curva de viabilidade celular após tratamento com mistura binária de cloridrato de fenilefrina e maleato de clorfeniramina controle (FCc) e mistura binária de cloridrato de fenilefrina e maleato de clorfeniramina exposto (FCe) após 24 h de exposição em linhagem celular C6 astroglial.

Na Figura 17 são apresentados os resultados de viabilidade celular obtidos após exposição de 24 h da linhagem celular C6 astroglial ao Produto Acabado Controle (FC<sub>PAC</sub>) e ao Produto Acabado Exposto (FC<sub>PAE</sub>).

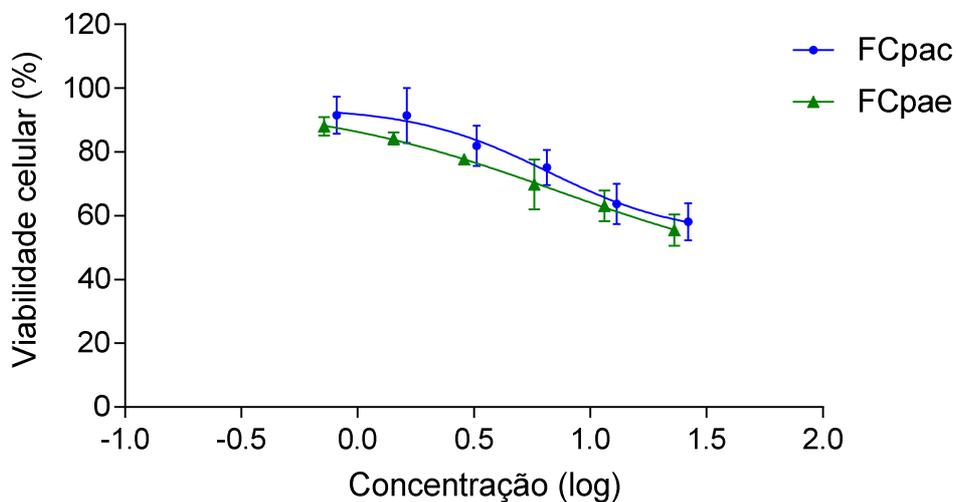


Figura 17 -Curva de viabilidade celular após tratamento com a mistura FCPAC e FCPAE após 24 h de exposição em linhagem celular C6 astroglial.

O IC<sub>50</sub> obtido para as misturas e o produto acabado está descrito na Tabela 6.

Tabela 6- IC50 das misturas FCc e Fce e do produto acabado controle (FC<sub>PAC</sub>) e Exposto (FC<sub>PAE</sub>) em linhagem celular C6 astrogliial.

<b>Amostra</b>	<b>IC 50 µg/mL ± EPM*</b>
<b>Fenil+Clor Controle (FCc)</b>	> 250,0 µg/mL (fenilefrina)
<b>Fenil+Clor Exposto (Fce)**</b>	> 200,0 µg/mL (fenilefrina) > 50,0 µg/mL (N-(succinil) fenilefrina)
<b>Produto Acabado Controle (FC<sub>PAC</sub>)</b>	> 4,2 µg/mL (fenilefrina)
<b>Produto Acabado Exposto (FC<sub>PAE</sub>)***</b>	> 3,9 µg/mL (fenilefrina) > 0,44 µg/mL (N-(succinil) fenilefrina)

\*Os resultados foram expressos em média ± erro padrão da média

\*\* A mistura contém 10,0% de N-(succinil) fenilefrina.

\*\*\* A mistura contém 9,7% de N-(succinil) fenilefrina.

Na linhagem celular C6 astrogliial as amostras, nas concentrações testadas, podem-se observar que não houve redução significativa na viabilidade celular, quando comparado com as amostras controles ( $p > 0,05$ ). As misturas e o produto acabado mesmo na presença da impureza N-(succinil) fenilefrina na concentração em torno de 10% mostrou não haver toxicidade, pois as amostras controles e expostas apresentaram o mesmo resultado. Estes resultados mostram que a impureza N-(succinil) fenilefrina mesmo na presença da sua matriz não é danosa para o sistema neuronal. As observações indicam que a misturas testadas não possuem interação nas células astrogliiais.

Na literatura não foram encontrados estudos anteriormente realizados com a molécula N-(succinil) fenilefrina em células C6 astrogliiais. Nem mesmo foram encontrados estudos com os demais ativos da formulação testados.

### 5.3.3.3 Avaliação da citotoxicidade em linhagem celular HepG2

Na Figura 18 são apresentados os resultados de viabilidade celular obtidos após exposição de 24 h da linhagem celular HepG2 ao cloridrato de fenilefrina, ao maleato de clorfeniramina e ao paracetamol isolados.

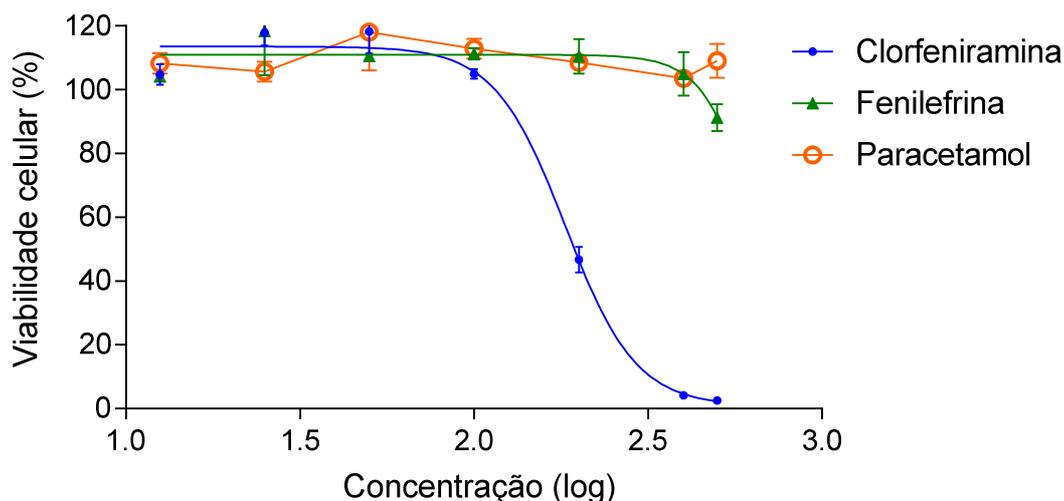


Figura 18 - Curva de viabilidade celular após tratamento com cloridrato de fenilefrina, maleato de clorfeniramina e paracetamol isolados após 24 h de exposição em linhagem celular HepG2.

O IC50 obtido para cada substância está descrito na Tabela 7.

Tabela 7- IC50 do paracetamol, cloridrato de fenilefrina e maleato de clorfeniramina em linhagem celular HepG2.

Substância	IC 50 $\mu\text{g/mL} \pm \text{EPM}^*$
<b>Paracetamol</b>	>75,6 $\mu\text{g/mL}$
<b>Fenilefrina</b>	>83,6 $\mu\text{g/mL}$
<b>Clorfeniramina</b>	50,3 $\pm$ 1,4 $\mu\text{g/mL}$

\*Os resultados foram expressos em média  $\pm$  erro padrão da média

Os resultados mostram que os ativos paracetamol e cloridrato de fenilefrina possuem IC 50 maior do que as concentrações testadas. Ao avaliar a citotoxicidade do ativo maleato de clorfeniramina observou-se uma diminuição na viabilidade celular significativa, a partir da concentração de 50,3  $\pm$  1,4  $\mu\text{g/mL}$ , a concentração máxima testada foi de 137,5  $\mu\text{g/mL}$ . O objetivo do estudo não é avaliar a toxicidade do ativo maleato de clorfeniramina, porém esse resultado é muito importante para verificar a interferência desse ativo nos demais testes.

Na Figura 19 são apresentados os resultados de viabilidade celular obtidos após exposição de 24 h da linhagem celular HepG2 à mistura binária de cloridrato de fenilefrina e maleato de clorfeniramina controle (FCc) e mistura binária de cloridrato de fenilefrina e maleato de clorfeniramina exposto (FCe).

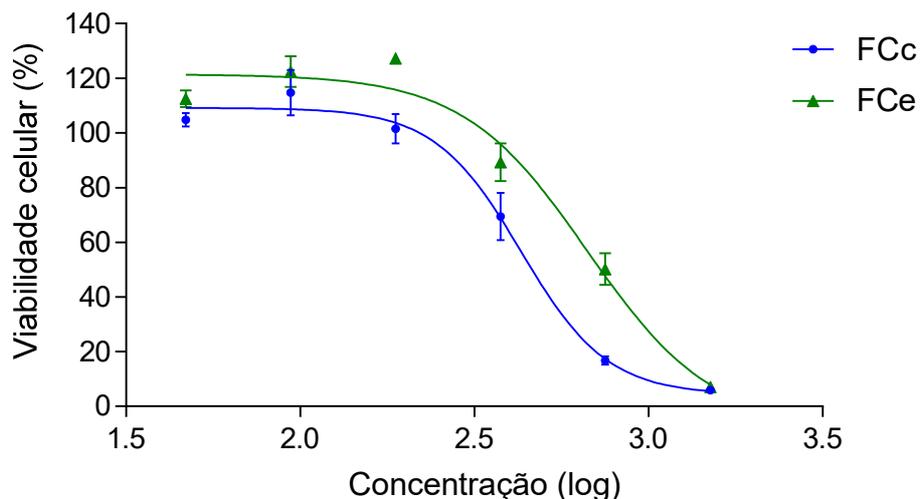


Figura 19 - Curva de viabilidade celular após tratamento com misturas binárias de cloridrato de fenilefrina e maleato de clorfeniramina controle (FCc) e cloridrato de fenilefrina e maleato de clorfeniramina exposto (FCe) 24 h de exposição em linhagem celular HepG2.

Na Figura 20 são apresentados os resultados de viabilidade celular obtidos após exposição de 24 h da linhagem celular HepG2 ao Produto Acabado Controle (FC<sub>PAC</sub>) e ao Produto Acabado Exposto (FC<sub>PAE</sub>).

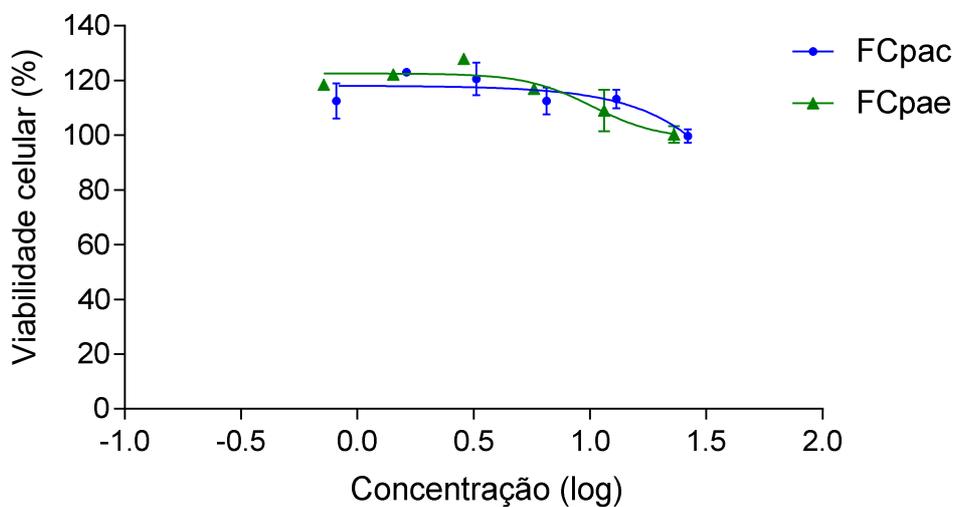


Figura 20 - Curva de viabilidade celular após tratamento com o produto acabado FC<sub>PAC</sub> e FC<sub>PAE</sub> após 24 h de exposição em linhagem celular HepG2.

O IC50 obtido para cada mistura o produto acabado está descrito na Tabela 8.

Tabela 8- IC50 das misturas FCc e Fce e do produto acabado controle (FC<sub>PAC</sub>) e Exposto (FC<sub>PAE</sub>) em linhagem celular HepG2.

<b>Amostra</b>	<b>IC 50 µg/mL ± EPM*</b>
<b>Fenil+Clor Controle (FCc)</b>	70,0 ± 5 µg/mL fenilefrina
<b>Fenil+Clor Exposto (Fce)**</b>	100,0 ± 4 µg/mL (fenilefrina)
	25,0 ± 1 µg/mL N-(succinil) fenilefrina
<b>Produto Acabado Controle (FC<sub>PAC</sub>)</b>	> 4,20 µg/mL
<b>Produto Acabado Exposto (FC<sub>PAE</sub>)***</b>	> 3,92 µg/mL (fenilefrina)
	> 0,435 µg/mL (N-(succinil) fenilefrina)

\*Os resultados foram expressos em média ± erro padrão da média

\*\* A mistura contém 10,0% de N-(succinil) fenilefrina.

\*\*\* A mistura contém 9,7% de N-(succinil) fenilefrina.

Na linhagem celular HepG2, as misturas binárias de cloridrato de fenilefrina e maleato de clorfeniramina apresentaram um resultado um pouco diferente do esperado, uma vez que o IC 50 do controle foi de uma concentração equivalente de 70,0 µg/mL de cloridrato de fenilefrina e de maleato de clorfeniramina, ou seja, mais baixo do que o IC 50 da mistura exposta que continha aproximadamente 100,0 µg/mL de cloridrato de fenilefrina, 25,0 µg/mL N-(succinil) fenilefrina e 125,0 µg/mL de maleato de clorfeniramina. Quando observamos o resultado obtido para as substâncias isoladas verificamos que a clorfeniramina apresentou um IC 50 de 50,0 µg/mL, menor do que o obtido na mistura. Isso permite que seja inferido que a fenilefrina presente na mistura que isoladamente apresentou um IC 50 maior do que 83,6 µg/mL tenha de alguma forma neutralizado um pouco os efeitos citotóxicos da clorfeniramina. Ao mesmo tempo, verificamos que a presença da fenilefrina mais o produto de degradação N-(succinil) fenilefrina na mistura binária exposta foi ainda mais benéfica, aumentando o IC 50 para ambas as substâncias. Como mencionado anteriormente, o intuito desse trabalho não é medir o quanto os ativos conhecidos são tóxicos e sim o seu produto de degradação. Os resultados aqui demonstrados, apesar de apresentarem um  $p < 0,05$ , entende-se que o resultado é positivo quando se quer avaliar a citotoxicidade da N-(succinil) fenilefrina, já que quando ela estava presente na amostra a viabilidade celular aumentou significativamente de maneira positiva.

Para o produto acabado o valor de  $p > 0,05$  encontrado quando comparamos o IC 50 do controle com a amostra exposta. O que significa que mesmo na presença da impureza N-(succinil) fenilefrina mostrou não ter toxicidade relevante quando comparada com o controle. Entende-se que nessas amostras a citotoxicidade apresentada pela clorfeniramina não foi expressada devido a concentração testada ter sido muito mais baixa do que nas demais amostras. A concentração no produto acabado foi diferente, pois a formulação possui uma proporção de ativo muito diferentes, enquanto em um peso médio (460,0 mg) há 400 mg de paracetamol, existe apenas 4 mg de cloridrato de fenilefrina e de maleato de clorfeniramina.

Não existem estudos na literatura mostrando a citotoxicidade da impureza N-(succinil) fenilefrina in vitro em linhagens de origem hepática. Os resultados apresentados neste trabalho apontam que a impureza não possui toxicidade nas concentrações avaliadas na linhagem celular HepG2.

#### **5.4. CONCLUSÃO**

A partir dos resultados encontrados neste estudo inédito foi possível verificar que a molécula N-(succinil) fenilefrina não apresentou citotoxicidade, nas concentrações testadas, para as linhagens celulares VERO, C6 astroglial e HepG2 nas misturas binárias, nem mesmo quando presente na formulação final. Esse estudo traz uma informação importante de segurança no uso de medicamentos antigripais de venda livre que muitas vezes são utilizados de maneira exacerbada pela população leiga. Dessa forma, o usuário que sem o conhecimento ingerir essa substância não terá a sua saúde prejudicada ficando provado que a substância não possui efeito tóxico sistêmico.



## **6. CAPÍTULO 2 – Avaliação do Potencial Toxicológico da N-(formil) desloratadina in vitro em linhagens celulares C6 astrogial, VERO e HepG2.**

Nota 2: Artigo a ser submetido ao periódico *Journal of Analytical Toxicology*.

### **6.1. INTRODUÇÃO**

A desloratadina é um dos muitos fármacos que possuem amina secundária em sua estrutura molecular (LI, 2012). Na literatura, existem muitas informações sobre a incompatibilidade de fármacos contendo grupamento amino primário ou secundário quando associados com açúcares redutores ou outros aditivos que contenham o grupo carbonila, denominada Reação de Maillard (MATOS, 2013; NARANG, 2015). Os comprimidos de desloratadina na maioria das vezes possuem açúcares redutores na sua composição, como é o caso da lactose. Por sua vez, essas formulações costumam apresentar uma impureza N-(formil) desloratadina relatado como o principal produto de degradação desse fármaco (KHAPRA, 2005). Estudos de toxicidade dessa impureza não foram encontrados na literatura. Portanto, é imprescindível que se invista em estudos que possam afirmar a segurança ou não da ingestão dessa impureza pelos usuários de antialérgico.

Por isso, objetivo principal desse trabalho é testar a citotoxicidade do produto de degradação N-(formil) desloratadina ou Composto Relacionado F (USP, 2019). Para os experimentos serão utilizadas a matéria prima desloratadina, o excipiente lactose e o produto acabado. Esses materiais foram adquiridos no mercado ou por doação. O produto acabado que será testado é composto de 5 mg de desloratadina mais os excipientes da formulação por comprimido.

Inicialmente serão realizados os testes de toxicidade com a matéria primas isolada com o objetivo de descartar qualquer interferência nos testes com o produto de degradação. Para a obtenção da impureza, as misturas binárias desloratadina e lactose (1:1) e o produto acabado serão expostos durante dez dias a temperatura de 60 °C e umidade aproximada de 75% de UR. Após a exposição as amostras expostas, assim como as amostras controles (não expostas) serão submetidas a análise por CLAE-DAD para verificar a queda de desloratadina nas amostras expostas frente as amostras controles, assim como quantificar o produto de degradação formado nas amostras expostas.

A metodologia analítica utilizada será o método de substâncias relatadas da farmacopeia americana (USP 42, 2019). Com o intuito de atestar a seletividade do método ao qual ele se propõe, será realizada a avaliação da pureza de pico do ativo desloratadina e do produto de degradação N-(formil) desloratadina.

Os testes de citotoxicidade serão realizados em linhagens celulares, os tipos celulares escolhidos foram as células VERO, C6 astrogliial e HepG2. Com o passar dos anos, o número de animais utilizados na ciência aumentou com o avanço do desenvolvimento e pesquisa em tecnologia médica. Todos os anos, milhões de animais experimentais são usados em todo o mundo. Contudo, com o desenvolvimento científico e tecnológico, aliado às crescentes preocupações relacionadas ao campo da bioética, impõe cada vez mais a busca por métodos alternativos ao uso de animais para a avaliação de toxicidade de substâncias químicas. Por isso, várias alternativas ao teste em animais foram propostas para superar as desvantagens associadas a experimentos com animais e evitar procedimentos antiéticos. Nesse contexto, a cultura de células tornou-se o principal modelo alternativo de avaliação toxicológica, especialmente com o aumento do rigor para o uso de animais imposto pelas Comissões de Ética de Uso de Animais em Pesquisa (CEUA) (DOKE, 2013; ALVES; GUIMARÃES, 2014).

De modo geral, existem dois tipos de cultivo celular. O cultivo primário, que ocorre a partir do crescimento de células provenientes de fragmentos de tecido, normal ou tumoral, de origem humana ou animal. Essas células possuem as características do tecido de origem e podem crescer em cultura por um determinado período. Já as culturas de linhagens celulares são células que ainda guardam características do tecido de origem, porém possuem alta proliferação, uma vez que passaram pelo processo de imortalização celular (ALVES; GUIMARÃES, 2014). Algumas células podem perder as características genéticas e fenotípicas do tecido de origem quando submetidas a muitas passagens em cultura in vitro (BRAGANHOL et al., 2009).

As células gliais C6 são uma linhagem celular astrogliial proveniente de ratos amplamente utilizada para avaliar a toxicidade de medicamentos in vitro (BERNARDI, 2008; EL-BACHA, 2001; DUAN, 2013). Não existem relatos de avaliação da citotoxicidade do N-(formil) desloratadina nesta linhagem, e nem mesmo da molécula de desloratadina.

A linhagem celular VERO é uma linhagem de células fibroblásticas aderentes, oriundas de rim de macaco-verde africano (*Cercopithecus aethiops*). Elas são homólogas células do corpo humano, são facilmente cultivadas e já bem estabelecidas na literatura como uma importante ferramenta para avaliação de nefrotoxicidade in vitro (FRANÇA et al., 2014; PEROPADRE et al., 2011, LIAO, 2010, FREIRE, 2005.). Não há relatos na literatura da determinação da toxicidade da substância N-(formil) desloratadina, nem como do ativo desloratadina.

A HepG2 é uma linhagem celular de hepatoma humano amplamente utilizadas em estudos in vitro como alternativa ao uso da cultura primária de hepatócitos (DONATO, TOLOSA, 2015). Essas células são altamente diferenciadas, mas exibem muitas das características genotípicas de células hepáticas normais. Sendo assim, a linhagem HepG2

pode ser utilizada para triagem da hepatotoxicidade de drogas (GERETS et al., 2012). As células HepG2 possuem baixos níveis de expressão basal do complexo enzimático citocromo P450 (CYP), no entanto, alguns estudos mostram que as células HepG2 podem ser induzidas à expressar as isoformas CYP1A2, CYP2B6 e CYP3A4 de forma semelhante a hepatócitos humanos (CHOI et al., 2015; DONATO, TOLOSA, 2015; GERETS et al., 2012).

Dentro deste contexto e a impossibilidade de avaliarmos o produto de degradação isolado, a proposta principal deste estudo é avaliar a citotoxicidade induzida pela mistura de desloratadina e lactose após a exposição, contendo o produto de degradação N-(formil) desloratadina e a forma farmacêutica mais comum encontrada no mercado brasileiro contendo toda a mistura mais o produto de degradação nas linhagens celulares VERO, C6 astrogliial e HepG2.

## **6.2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **6.2.1 Materiais**

A N-(formil) desloratadina (Fabricante: USP, Lote: R082U0, Teor: 99,0%) foi usada como um padrão de referência para a quantificação. A matéria prima desloratadina (Fabricante: CADILA HEALTHCARE, Índia, Lote: DLK9ATP02A, Teor: 99,7%) também foi utilizada nos testes e o excipiente lactose. Acetonitrila grau CLAE (MERCK, Darmstadt, Alemanha), Metanol grau CLAE (VETEC, Rio de Janeiro, Brasil), fosfato de potássio dibásico (SYNTH, São Paulo, Brasil) e ácido fosfórico (MERCK, Darmstadt, Alemanha). A água ultrapura foi obtida usando sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA).

### **6.2.2 Métodos**

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é uma técnica muito utilizada para a quantificação desse tipo de analito. A técnica permite a separação de diversos compostos presentes em uma amostra e possibilita a identificação e quantificação de todos os compostos. Para a quantificação do produto de degradação formado N-(formil) desloratadina foi utilizado a metodologia analítica descrita na monografia da farmacopeia americana USP 42 (2019) "*Desloratadine Tablets*". O método descrito é capaz de quantificar o produto de degradação N-(formil) desloratadina frente aos demais componentes da formulação.

Para quantificação da desloratadina foi preparada uma solução padrão na concentração de 0,2 mg/mL enquanto que a solução padrão de N-(formil) desloratadina para quantificação dos produtos de degradação foi preparada na concentração de 0,002 mg/mL, equivalente a 1% da concentração da amostra, conforme traz o método farmacopeico. As soluções amostra

foram preparadas na concentração final de 0,2 mg/mL de desloratadina. Todas as soluções foram preparadas utilizando diluente água purificada e metanol (10:90).

Tabela 9- Condições cromatográficas para o método analítico de quantificação do produto de degradação N-(formil) desloratadina.

Método:	Adaptado de USP 42 (2019).			
Sistema Cromatográfico:	Cromatografia líquida de alta eficiência do fabricante Shimadzu com detector de arranjo de Diodos (DAD) (SPD-M10A), bomba quaternária (LC-20AT), injetor automático (SIL-20A), forno para coluna (CTO-20A) e controlador (DGU-20A).			
Coluna:	BDS Hypersil C8 150 X 4,6 mm 3,0µm – Thermo			
Detecção:	241 nm			
Fase Móvel:	Canal A: 4,35g de fosfato de potássio dibásico pH 3,2 Canal B: Acetonitrila Canal C: Metanol			
Sistema Gradiente ou proporção de fase móvel:	<b>Tempo (min)</b>	<b>Fase Móvel A (%)</b>	<b>Acetonitrila B (%)</b>	<b>Metanol C (%)</b>
	0 → 12,0	70,0	15,0	15,0
	12,0 → 30,0	70,0 → 40,0	15,0 → 30,0	15,0 → 30,0
	30,0 → 45,0	40,0	30,0	30,0
	45,0 → 47,0	40,0 → 70,0	30,0 → 15,0	30,0 → 15,0
	47,0 → 55,0	70,0	15,0	15,0
Diluente:	Água purificada: Metanol (10:90)			
Fluxo (mL/min):	1,0 mL/min			
Volume de Injeção:	20 µL			
Temperatura de Coluna:	35 °C			
Tempo de corrida:	55 min			

A pureza de pico será verificada para comprovar a não interferência de outros compostos nos picos da desloratadina e do produto de degradação N-(formil) desloratadina.

Para os testes in vitro com a desloratadina foram testadas as concentrações de 0 a 50 µg/mL nos três tipos de linhagem celular. Para as misturas binárias contendo a desloratadina e a lactose controle e exposto, assim como para o produto acabado a faixa de concentração testada foi, respectivamente, as concentrações equivalentes de desloratadina de 0 a 50 µg/mL.

As misturas de desloratadina e lactose não expostas foram preparadas nas proporções (1:1). Da mesma forma as misturas expostas foram preparadas nessa proporção.

No produto acabado, foi exposto o equivalente a um peso médio da formulação contendo 5 mg de desloratadina e demais componentes da formulação que não são conhecidas as quantidades, dentre eles a lactose.

### **6.2.3 Cultivo celular**

A linhagem celular de C6 astrogliar de passagem tardia foi obtida da *American Type Culture Collection* (ATCC, Rockville, MD). Já as linhagens celulares VERO (renal sadia) e Hep-G2 (hepatocarcinoma) foram adquiridas do Banco de células do Rio de Janeiro (BCRJ). A linhagem C6 cultivadas em *Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) low* suplementada com 5% de soro fetal bovino (SFB). As linhagens VERO e Hep-G2 foram cultivadas com *DMEM high* e suplementadas com 10% de SFB. Todos os meios de cultivo foram suplementados com 0,1% de anfotericina B (250 µg/ml) e 1% de penicilina (100 U/ml)/estreptomicina (10 mg/ml). As células foram mantidas em incubadora de CO<sub>2</sub> (Panasonic Healthcare Co., EUA) com umidade relativa de 95% e 5% de CO<sub>2</sub>.

Células em crescimento exponencial foram retiradas das garrafas de cultura usando 0,05% de tripsina/ácido edético (EDTA) e semeadas em placas na densidade celular padronizada neste trabalho. Após 24 h de incubação o meio foi retirado e as células foram submetidas as condições experimentais de tratamento.

### **6.2.4 Preparação das soluções e determinação da viabilidade celular**

Todos os compostos foram dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO), HCl 2M e meio de cultura produzindo uma concentração final de DMSO de 0,33% e HCl 2M 0,16%. As células da linhagem C6 astrogliar, VERO e Hep-G2 (2x10<sup>4</sup> células/poço) foram semeadas em placas de 96 poços e incubadas por 24 h. Após esse período, as células foram submetidas ao contato com as amostras por um período de 24 h. A viabilidade celular foi verificada pelo ensaio de brometo de metiltiazolildifenil-tetrazólio (MTT). Foi utilizado o controle contendo apenas o meio de cultura e o controle do veículo (0,33% DMSO+0,16% de HCl 2M em meio de cultura). Para determinação da concentração citotóxica para 50 % das células (IC<sub>50</sub>) de cada composto testado foi utilizada análise de regressão não linear com auxílio do software GraphPad Prism 7.0.

### **6.2.5 Ensaio de Redução de sais tetrazólio (MTT)**

A viabilidade celular foi avaliada em placas de 96 poços, após um período de 24 h de incubação, sendo o meio de cultura retirado e, em seguida, adicionado 100 µL de 0,5 mg/mL de MTT a cada poço. As placas foram incubadas por 1 h a 37 °C, o MTT foi removido

e o produto formado foi lido em 570 e 630 nm em espectrofotômetro de microplacas (Spectramax 190- Molecular Devices, com software ROMTRAmx M2e versão 2.1.35). Pelo menos três experimentos independentes foram realizados em triplicata para cada ensaio (n = 3). Os resultados foram expressos como a porcentagem de células viáveis em comparação com o controle do veículo (0,33% DMSO+0,16% de HCl 2M).

#### **6.2.6 Análise estatística**

Os dados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM), e a significância estatística foi determinada pela Análise de Variância (ANOVA,  $p < 0,05$ ), seguida do pós-teste de Dunnett para comparações múltiplas. O programa utilizado para essas análises foi o *GraphPad Prism 7*.

### **6.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### **6.3.1 Seletividade do Método Analítico**

Foi avaliada a seletividade do método através da pureza de pico dos componentes de interesse, a desloratadina e a N-(formil) desloratadina. Os índices de pureza obtidos foram de 1,00 indicando que os picos estão puros.

#### **6.3.2 Resultados Analíticos**

Através dos resultados obtidos na análise das misturas binárias controle e exposta concluímos que houve uma queda no teor de desloratadina quando relacionado ao controle de 4,61% na mistura binária exposta, gerando a formação do produto de degradação N-(formil) desloratadina de 3,23 %.

A Figura 21 demonstra o cromatograma obtido para o padrão diluído utilizado para o cálculo das impurezas. As Figuras 22 e 23 representam os cromatogramas obtidos durante a análise por cromatografia líquida de alta eficiência das misturas de desloratadina e lactose controle e exposta.

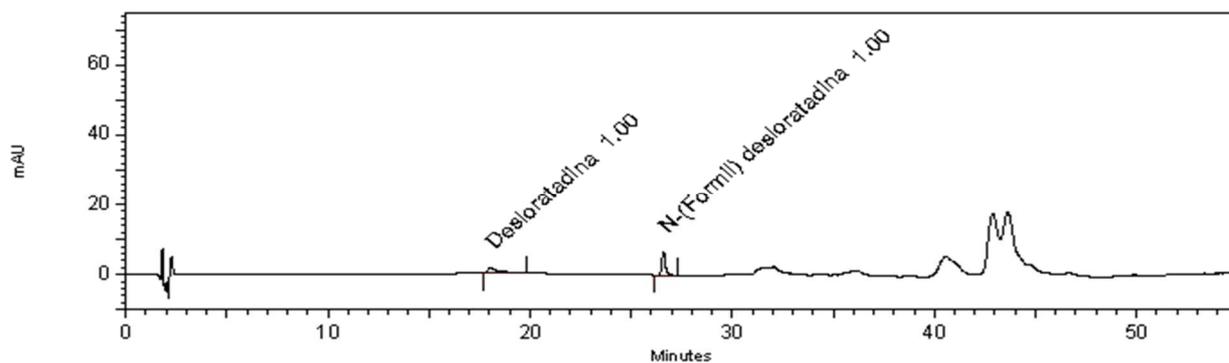


Figura 21 - Cromatograma obtido da análise por cromatografia líquida de alta eficiência da solução padrão diluído (0,002 mg/mL) para cálculo dos produtos de degradação.

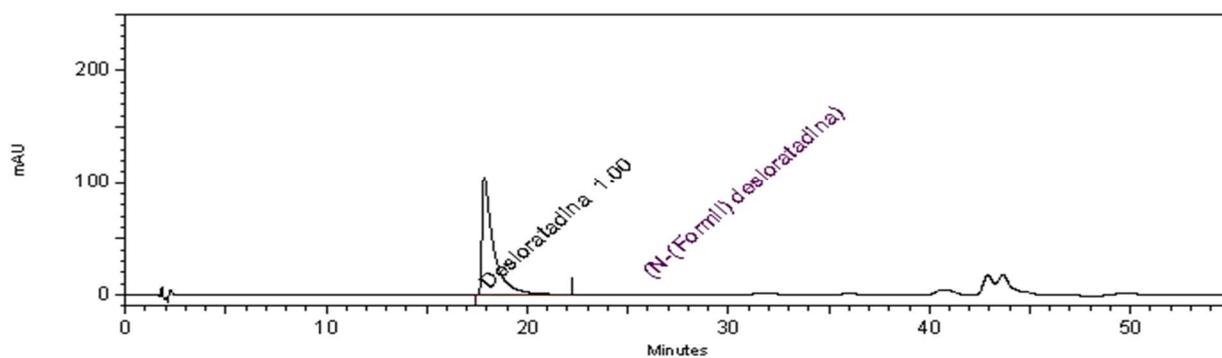


Figura 22 - Cromatograma obtido da análise por cromatografia líquida de alta eficiência da amostra da mistura de desloratadina e lactose (0,2 mg/mL) controle (DLc).

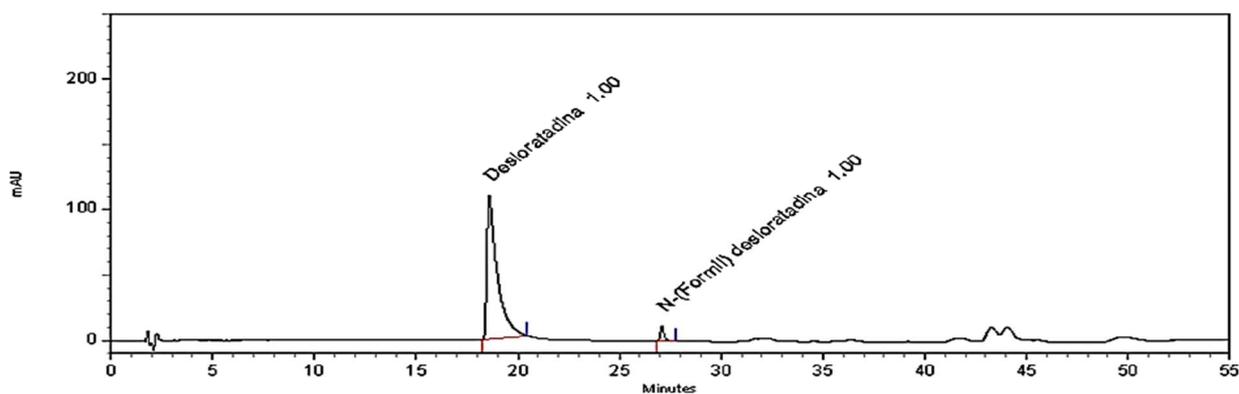


Figura 23 - Cromatograma obtido da análise por cromatografia líquida de alta eficiência da amostra da mistura de desloratadina e lactose (0,2 mg/mL) exposta (DLe).

No cromatogramas da Figura 21 é possível observar a presença apenas dos picos referentes ao ativo desloratadina e ao padrão de N-(formil) desloratadina nas concentrações

mais baixas de 0,002 mg/mL. Já na Figura 22 apenas observa-se o pico referente à desloratadina, já que a lactose não tem absorção no comprimento de onda da análise. Na Figura 23 se observa, além da desloratadina, o pico do produto de degradação N-(formil) desloratadina no mesmo tempo de retenção do seu respectivo padrão, em torno de 27 min. O surgimento do pico do produto de degradação N-(formil) desloratadina se deve pela incompatibilidade entre o ativo desloratadina e o excipiente lactose que quando estes são expostos a temperatura e umidade, mencionada anteriormente nesse trabalho, formam a substância N-(formil) desloratadina.

Com os resultados obtidos para o produto acabado controle e exposto é possível verificar que houve uma queda no teor de desloratadina quando relacionado ao controle de 14,4 %, gerando a formação do produto de degradação N-(formil) desloratadina de 3,0 %. É possível observar que no produto acabado a queda da concentração da desloratadina é muito mais pronunciada quando comparada com a queda dela (4,6%) na mistura binária. Contudo a formação do produto de degradação N-(formil) desloratadina, que é o objetivo desse estudo, continuou praticamente a mesma. Observou-se a formação de um produto de degradação desconhecido de aproximadamente 10% de concentração em relação ao ativo desloratadina.

As Figuras 24 e 25 representam os cromatogramas obtidos durante a análise por cromatografia líquida de alta eficiência das amostras de produto acabado controle (DL<sub>PAC</sub>) e produto acabado exposto (DL<sub>PAE</sub>).

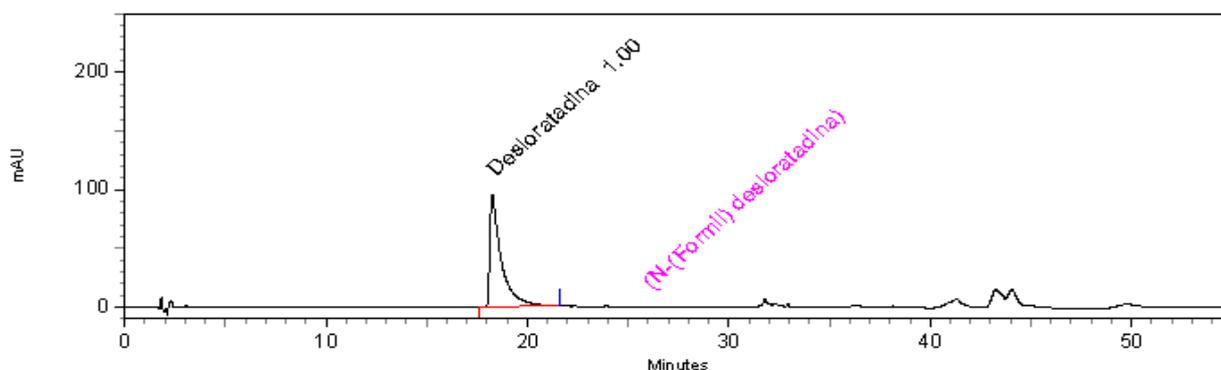


Figura 24 - Cromatograma obtido da análise por cromatografia líquida de alta eficiência da amostra de produto acabado controle (0,2 mg/mL de desloratadina) (DL<sub>PAC</sub>).

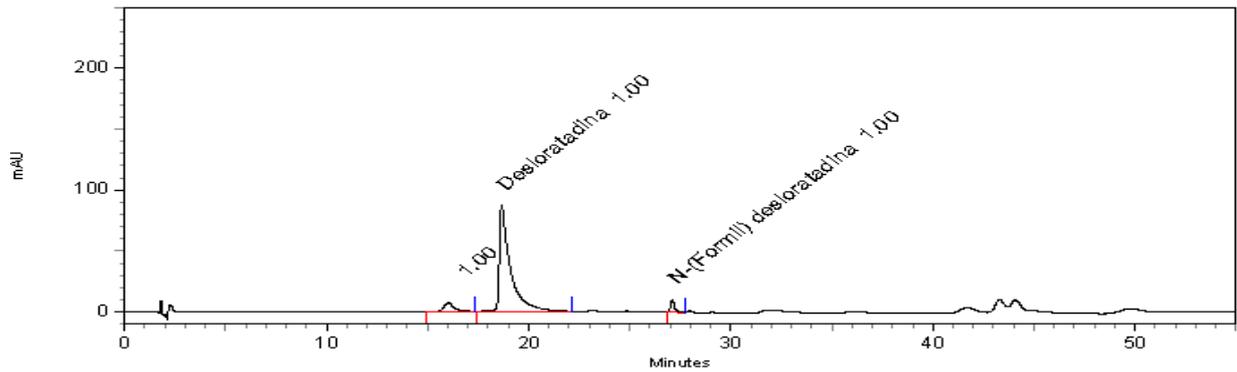


Figura 25 - Cromatograma obtido da análise por cromatografia líquida de alta eficiência da amostra de produto acabado exposto (0,2 mg/mL de desloratadina) (DL<sub>PAE</sub>).

No cromatogramas da Figura 24 é possível observar apenas a presença do pico referente ao ativo da formulação desloratadina. Contudo na Figura 25, além do pico mencionado observa-se o pico do produto de degradação N-(formil) desloratadina no tempo de retenção em torno de 27 min. A formação do pico do produto de degradação N-(formil) desloratadina se deve a exposição do ativo com o excipiente incompatível a degradação forçada térmica úmida. Como também, se observa um produto de degradação desconhecido no tempo de retenção em torno de 16 min.

O método utilizado se mostrou suficiente para o objetivo proposto que foi quantificar a degradação do ativo desloratadina e a formação do seu produto de degradação N-(formil) desloratadina. Portanto, os resultados obtidos foram satisfatórios.

### 6.3.3 Testes in vitro

#### 6.3.3.1 Avaliação da citotoxicidade em linhagem celular VERO

Na Figura 26 são apresentados os resultados de viabilidade celular obtidos após exposição de 24 h da linhagem celular VERO à desloratadina.

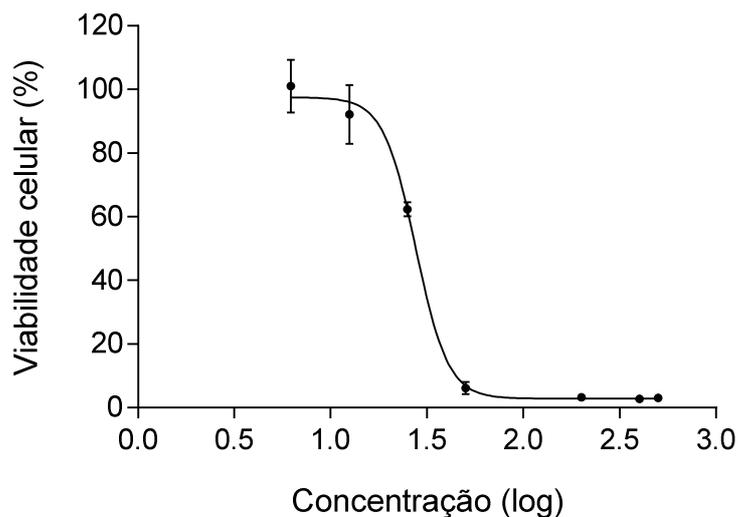


Figura 26- Curva de viabilidade celular após tratamento com desloratadina isolada após 24 h de exposição em linhagem celular VERO.

Na Figura 27 são apresentados os resultados de viabilidade celular obtidos após exposição de 24 h da linhagem celular VERO à mistura binária de desloratadina e lactose Controle (DLc) e mistura binária de desloratadina e lactose Exposto (DLe).

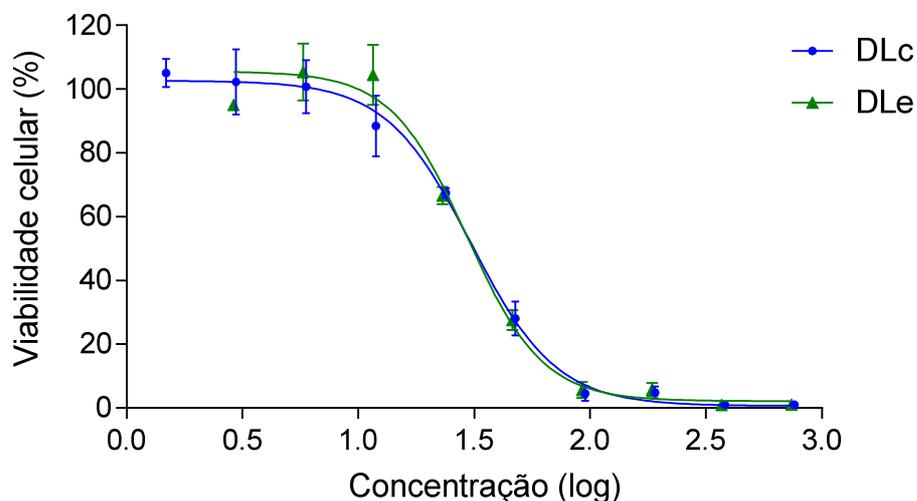


Figura 27 - Curva de viabilidade celular após tratamento com a mistura desloratadina + lactose controle (DLc) e desloratadina + lactose exposta (DLe) após 24 h de exposição em linhagem celular VERO.

Na Figura 28 são apresentados os resultados de viabilidade celular obtidos após exposição de 24 h da linhagem celular VERO ao Produto Acabado Controle (DL<sub>pac</sub>) e ao Produto Acabado Exposto (DL<sub>pae</sub>).

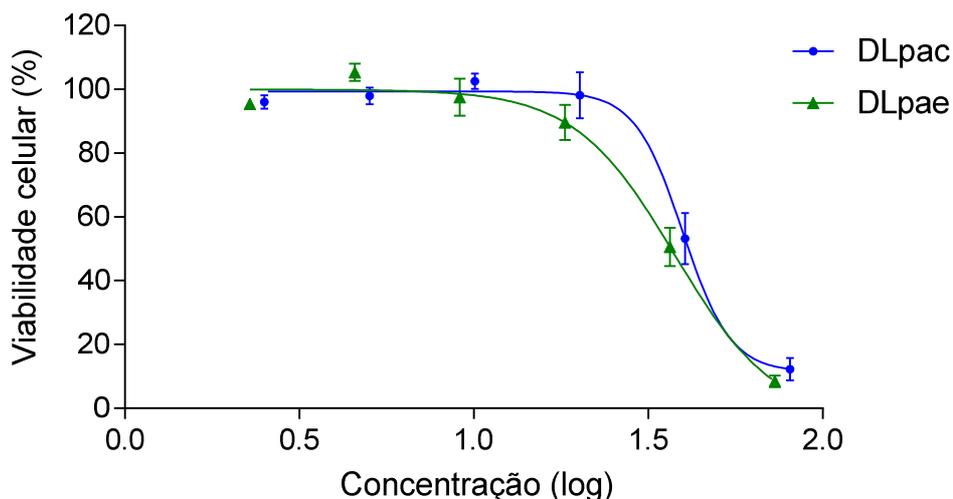


Figura 28- Curva de viabilidade celular após tratamento com o produto acabado controle (DLpac) e com o produto acabado exposto (DLpae) após 24 h de exposição em linhagem celular VERO.

O IC50 obtido para as misturas e o produto acabado está descrito na Tabela 10.

Tabela 10- IC50 da desloratadina isolada, das misturas binárias Controle (DLpac) e Exposta (DLpae) e para o produto acabado controle (DLpac) e exposto (DLpae) em linhagem celular VERO.

Amostra	IC 50 $\mu\text{g/mL} \pm \text{EPM}^*$
<b>Desloratadina</b>	8,70 $\pm$ 0,43 $\mu\text{g/mL}$ (desloratadina)
<b>Desloratadina + Lactose Controle (DLc)</b>	7,50 $\pm$ 2,00 $\mu\text{g/mL}$ (desloratadina)
<b>Desloratadina + Lactose Exposto (DLe)**</b>	11,20 $\pm$ 0,97 $\mu\text{g/mL}$ (desloratadina)
	0,35 $\pm$ 0,03 $\mu\text{g/mL}$ (N-(formil) desloratadina)
<b>Produto Acabado Controle (PLpac)</b>	11,30 $\pm$ 0,18 $\mu\text{g/mL}$ (desloratadina)
<b>Produto Acabado Exposto (DLpae)***</b>	11,00 $\pm$ 0,83 $\mu\text{g/mL}$ (desloratadina)
	0,34 $\pm$ 0,02 $\mu\text{g/mL}$ (N-(formil) desloratadina)

\*Os resultados foram expressos em média  $\pm$  erro padrão da média

\*\* A mistura contém 3,0% de N-(Formil) desloratadina.

\*\*\* A mistura contém 3,0% de N-(Formil) desloratadina.

Os resultados mostram que o ativo desloratadina possui IC 50 de 8,7  $\mu\text{g/mL}$ . Apesar de o estudo não ter como objetivo avaliar a citotoxicidade da desloratadina esse resultado contribuirá bastante para entendermos os resultados das misturas e do produto acabado.

Os experimentos realizados comparando os valores de IC50 das misturas binária controle e exposta demonstram que uma há pequena diferença nos resultados de citotoxicidade para as células da linhagem VERO. A amostra que contém a N-(formil)

desloratadina, substância que esse trabalho tem o objetivo de avaliar, apresentou um resultado de IC 50 maior do que a amostra controle que não possui a impureza. Além disso, quando se compara o resultado obtido da mistura binária com o resultado do ativo isolado, observa-se que ambos são praticamente iguais, indicando que há coerência nos resultados. Já o resultado para a mistura binária contendo o produto de degradação N-(formil) desloratadina, demonstra que a impureza diminui a toxicidade, pois o valor de IC 50 para a amostra exposta foi melhor do que o controle. Essa conclusão, ainda pode ser confirmada com o valor e p encontrado que foi de 0,18, ou seja,  $p > 0,05$ , indicando que a diferença dos resultados não foi significativa. Os valores encontrados para o IC 50 do produto acabado controle e exposto contendo a impureza N-(formil) desloratadina asseguram ainda mais a conclusão de que a impureza, que o presente trabalho objetiva avaliar, não possui nefrotoxicidade.

Portanto, conclui-se com os resultados obtidos nesse teste que a N-(formil) desloratadina quando na concentração de até 3% de desloratadina não possui indícios de citotoxicidade para a linhagem de células VERO, uma vez que o resultado e IC 50 obtido foi melhor para a amostra contendo a impureza daquela que não a contém. Da mesma forma pode-se concluir que a impureza presente no produto acabado exposto na concentração de 3,0% relacionada a dose de desloratadina, tampouco apresentou qualquer vestígio de citotoxicidade para a linhagem de células VERO, pois os valores de IC 50 foram os mesmos para a amostra de produto acabado controle e exposta, confirmando o resultado com o p-value calculado.

Na literatura, não foram encontrados estudos avaliando a citotoxicidade da impureza N-(formil) desloratadina in vitro em linhagens de origem renal. Portanto, os resultados aqui apresentados são inéditos.

### **6.3.3.2 Avaliação da citotoxicidade em linhagem celular C6 astrogial**

Na Figura 29 são apresentados os resultados de viabilidade celular obtidos após exposição de 24h da linhagem celular C6 astrogial à desloratadina isolada.

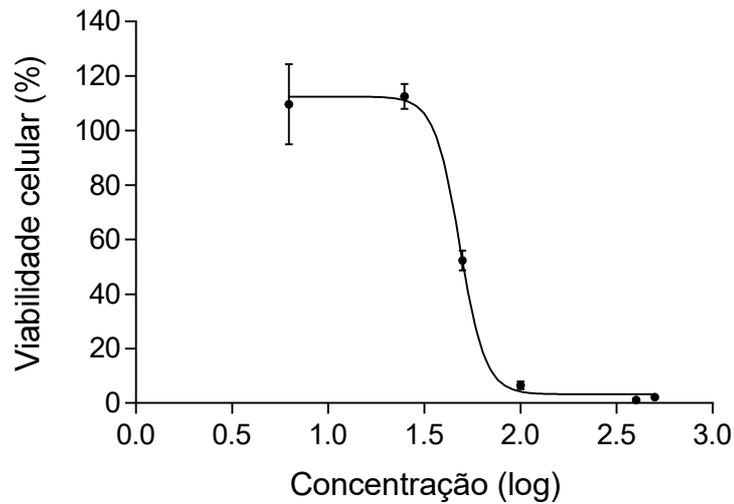


Figura 29 - Curva de viabilidade celular após tratamento com desloratadina isolada após 24 h de exposição em linhagem celular C6 astroglial.

Na Figura 30 são apresentados os resultados de viabilidade celular obtidos após exposição de 24 h da linhagem celular C6 astroglial à mistura binária de desloratadina e lactose controle (DLc) e mistura binária de desloratadina e lactose exposto (DLe).

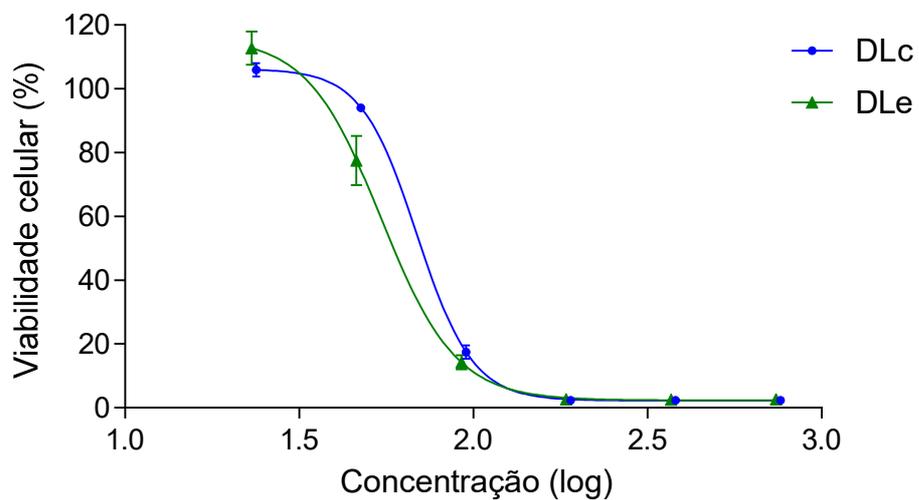


Figura 30 - Curva de viabilidade celular após tratamento com a mistura DLc e DLe após 24 h de exposição em linhagem celular C6 astroglial.

Na Figura 31 são apresentados os resultados de viabilidade celular obtidos após exposição de 24 h da linhagem celular C6 astroglial ao produto acabado controle (DLpac) e ao produto acabado exposto (DLpae).

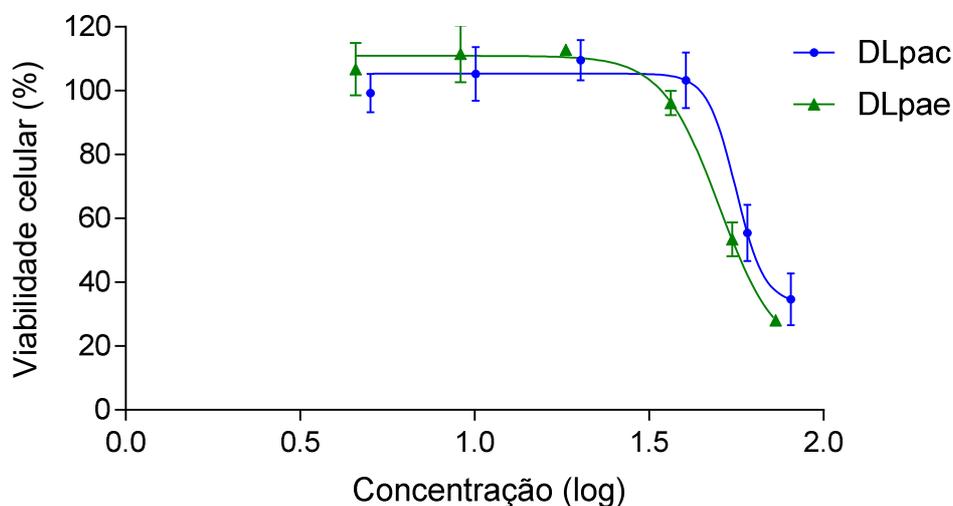


Figura 31 - Curva de viabilidade celular após tratamento com a mistura DLpac e DLpae após 24 h de exposição em linhagem celular C6 astroglial.

O IC50 obtido para as misturas e o produto acabado está descrito na Tabela 11.

Tabela 11- IC50 da desloratadina isolada, das misturas desloratadina + lactose controle (DLc) e desloratadina + lactose exposta (DLe) e do produto acabado controle (DLpac) e exposto (DLpae) em linhagem celular C6 astroglial.

Amostra	IC 50 $\mu\text{g/mL} \pm \text{EPM}^*$
<b>Desloratadina</b>	15,27 $\pm$ 0,18 $\mu\text{g/mL}$ (desloratadina)
<b>Desloratadina + Lactose Controle (DLc)</b>	23,00 $\pm$ 2,00 $\mu\text{g/mL}$ (desloratadina)
<b>Desloratadina + Lactose Exposto (DLe)**</b>	17,50 $\pm$ 1,45 $\mu\text{g/mL}$ (desloratadina)
	0,54 $\pm$ 0,04 $\mu\text{g/mL}$ (N-(formil) desloratadina)
<b>Produto Acabado Controle (PLpac)</b>	15,89 $\pm$ 0,98 $\mu\text{g/mL}$ (desloratadina)
<b>Produto Acabado Exposto (DLpae)***</b>	13,21 $\pm$ 1,76 $\mu\text{g/mL}$ (desloratadina)
	0,41 $\pm$ 0,05 $\mu\text{g/mL}$ (N-(formil) desloratadina)

\*Os resultados foram expressos em média  $\pm$  erro padrão da média

\*\* A mistura contém 3,0% de N-(Formil) desloratadina.

\*\*\* A mistura contém 3,0% de N-(Formil) desloratadina.

Os resultados dos experimentos demonstram que o ativo desloratadina isolado exerceu um efeito citotóxico nas células C6 astrogliais a partir da concentração de 15,27  $\mu\text{g/mL}$ .

Na linhagem celular C6 astrogliol as misturas binárias apresentaram um resultado com uma pequena diferença de valor do IC 50. A amostra DLc apresentou IC 50 de 23,00 enquanto que a amostra DLe que possui 3,0% de N-(formil) desloratadina em relação a concentração de desloratadina, apresentou o IC 50 de 17,50, ou seja menor que o controle. Os experimentos realizados comparando os valores de IC50 das misturas binárias de desloratadina e lactose controle e expostas foi encontrado um valor de  $p > 0,05$  (0,18) demonstrando que estatisticamente não há diferença significativa nos resultados de citotoxicidade para as células da linhagem C6 astrogliol. Esse resultado nos demonstra que não há toxicidade relevante da n-(formil) desloratadina nas células neuronais. O produto acabado da mesma forma na presença da impureza N-(formil) desloratadina na concentração em torno de 3%, amostra DLpae, mostrou não ter toxicidade relevante, pois as amostras controles e expostas apresentaram o mesmo resultado de IC 50, conforme pode ser observado na Tabela 11 e o resultado foi estatisticamente comprovado, obtendo-se  $p > 0,05$  quando foi comparado o resultado de IC 50 para amostra controle e exposta. Estes resultados mostram que a impureza N-(formil) desloratadina não é danosa para o sistema neuronal.

Na literatura não foram encontrados estudos anteriormente realizados com a molécula N-(formil) desloratadina em células C6 astrogliais.

### 6.3.3.3 Avaliação da citotoxicidade em linhagem celular HepG2

Na Figura 32 são apresentados os resultados de viabilidade celular obtidos após exposição de 24h da linhagem celular HepG2 à desloratadina isolada.

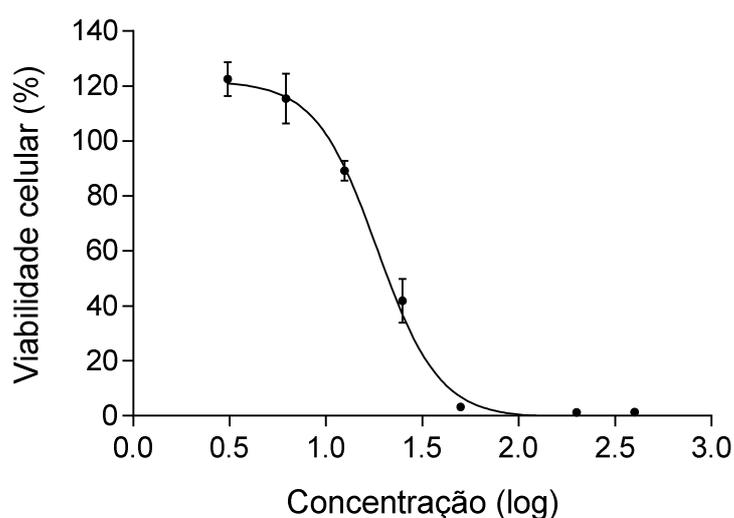


Figura 32 - Curva de viabilidade celular após tratamento com desloratadina isolada após 24 h de exposição em linhagem celular HepG2.

Na Figura 33 são apresentados os resultados de viabilidade celular obtidos após exposição de 24 h da linhagem celular HepG2 à mistura binária de desloratadina e lactose controle (DLc) e mistura binária de desloratadina e lactose exposto (DLe).

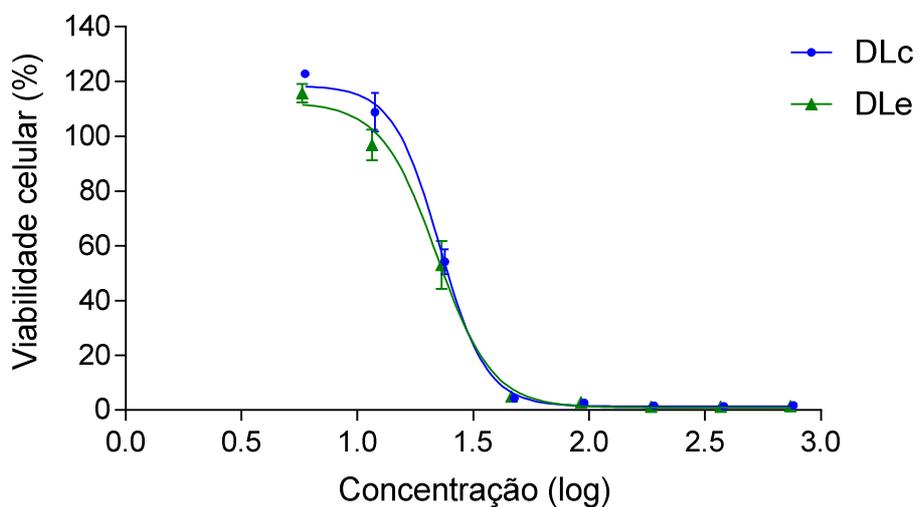


Figura 33 - Curva de viabilidade celular após tratamento com desloratadina e lactose após 24 h de exposição em linhagem celular HepG2

Na Figura 34 são apresentados os resultados de viabilidade celular obtidos após exposição de 24 h da linhagem celular HepG2 ao produto acabado controle (DLpac) ao produto acabado exposto (DLpae).

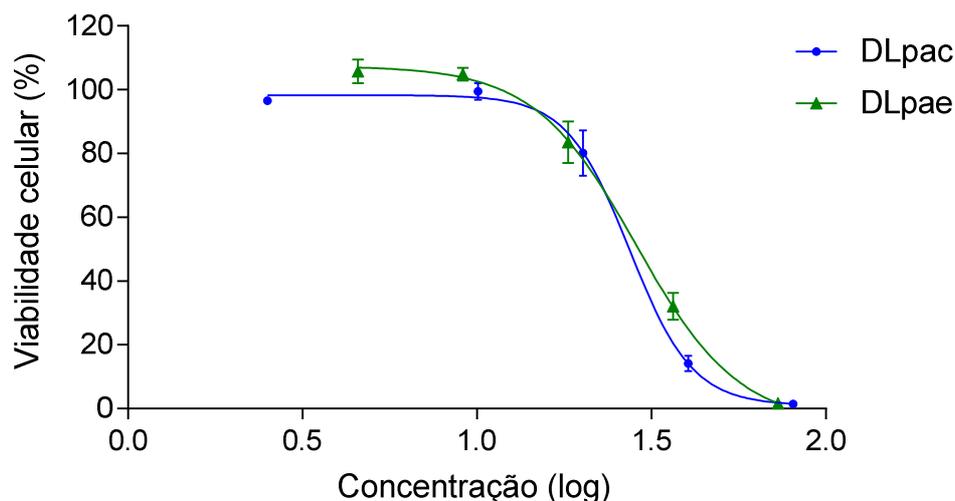


Figura 34 - Curva de viabilidade celular após tratamento com a mistura DLpac e DLpae após 24 h de exposição em linhagem celular HepG2.

O IC50 obtido para a desloratadina isolada, para as misturas binárias e o produto acabado está descrito na Tabela 12.

Tabela 12- IC50 da desloratadina isolada, das misturas desloratadina + lactose controle (DLc) e desloratadina + lactose exposto (DLe) e do produto acabado controle (DLpac) e exposto (DLpae) em linhagem celular HepG2.

Amostra	IC 50 $\mu\text{g/mL} \pm \text{EPM}^*$
<b>Desloratadina</b>	7,22 $\pm$ 0,65 $\mu\text{g/mL}$ (desloratadina)
<b>Desloratadina + Lactose Controle (DLc)</b>	9,00 $\pm$ 1,00 $\mu\text{g/mL}$ (desloratadina)
<b>Desloratadina + Lactose Exposto (DLe)**</b>	3,88 $\pm$ 0,97 $\mu\text{g/mL}$ (desloratadina)
	0,12 $\pm$ 0,03 $\mu\text{g/mL}$ (N-(formil) desloratadina)
<b>Produto Acabado Controle (PLpac)</b>	7,70 $\pm$ 0,45 $\mu\text{g/mL}$ (desloratadina)
<b>Produto Acabado Exposto (DLpae)***</b>	7,00 $\pm$ 0,44 $\mu\text{g/mL}$ (desloratadina)
	0,25 $\pm$ 0,01 $\mu\text{g/mL}$ (N-(formil) desloratadina)

\*Os resultados foram expressos em média  $\pm$  erro padrão da média

\*\* A mistura contém 3,0% de N-(Formil) desloratadina.

\*\*\* A mistura contém 3,0% de N-(Formil) desloratadina.

Os resultados mostram que o ativo desloratadina possuem IC 50 igual a 7,22  $\mu\text{g/mL}$  na linhagem celular HepG2. O objetivo do estudo, conforme mencionado anteriormente, não é avaliar a citotoxicidade desse ativo, porém esse resultado é muito importante para verificar a interferência do ativo nos demais testes.

Na linhagem celular HepG2 as misturas binárias apresentaram um resultado um pouco diferente para a amostra controle (DLc) IC 50 de 9,00  $\mu\text{g/mL}$  e para a amostra exposta (DLe)

IC50 de 3,88 µg/mL, o que demonstra que a amostra exposta contendo o produto de degradação N-(formil) desloratadina possui uma toxicidade maior quando comparada ao controle. Através da análise de variância esse resultado foi comprovado estatisticamente, uma vez que se obteve o  $p < 0,05$  (0,02), portanto a diferença apresentada nos valores de IC 50 é significativa. Isso permite afirmar a possibilidade dessa impureza apresentar citotoxicidade nas células HepG2. Contudo, para o produto acabado mesmo a impureza N-(formil) desloratadina presente na mistura não demonstrou qualquer indício de toxicidade para a linhagem de células em avaliação, pois os IC50 encontrados foram praticamente os mesmos 7,70 µg/mL para a amostra controle e 7,00 µg/mL para a amostra exposta. Esse resultado também foi desafiado estatisticamente através da análise de variância que demonstrou que pequena diferença de resultado não há diferença significativa, uma vez que o valor obtido foi de  $p > 0,05$ . Portanto, conclui-se que a impureza N-(formil) desloratadina possui potencial de toxicidade para a linhagem celular HepG2, porém quando no produto acabado em doses usuais ela não apresentou risco hepático na concentração testada.

#### **6.4. CONCLUSÕES**

A partir dos resultados apresentados podemos concluir que a molécula desloratadina por si só já apresenta características citotóxicas devido aos resultados apresentados quando a mesma foi avaliada isolada, os IC 50 obtidos foram muito baixos para ambas as linhagens celulares. Considerando que a citotoxicidade da N-(formil) desloratadina é o objetivo desse estudo, observou-se que ela apresentou valor de IC 50 significativamente citotóxico no cultivo celular HPG2 quando comparamos com a amostra controle, para as misturas binárias. No produto acabado esse resultado não reproduziu, demonstrando que a mesma não possui potencial hepatotóxico quando na presença dos demais excipientes da formulação. Mesmo assim, os dados da mistura binária exposta, corroboram com um indício de citotoxicidade para células hepáticas, apesar de não ter sido encontrados dados que comprovam esse resultado. No cultivo de células C6 astrogliol e linhagem VERO, os resultados foram negativos para citotoxicidade da N-(formil) desloratadina o que indica que mesmo quando a impureza estiver presente não há potencial citotóxico, os resultados foram negativos para citotoxicidade tanto nas misturas binária quanto no produto acabado. Portanto, com os resultados experimentais obtidos e nas concentrações testadas, neste trabalho, é possível identificar que há indícios de citotoxicidade da N-(formil) desloratadina apenas para as células hepáticas. Contudo, é necessário que mais estudos sejam feitos para comprovar esses primeiros resultados.

## 7. DISCUSSÃO GERAL

A presente dissertação explorou a técnica de cultura celular para avaliar a toxicidade dos produtos de degradação N-(succinil) fenilefrina e da N-(formil) desloratadina em misturas binárias e no produto acabado exposto a degradação térmica úmida. Os métodos *in vitro* foram utilizados para avaliar a toxicidade em diferentes linhagens celulares (C6 astrogial, VERO e HepG2) para se obter uma resposta ampla dos efeitos dessas substâncias.

A avaliação conjunta dos dados apresentados neste trabalho nos mostra uma visão geral que na cultura celular VERO, C6 astrogial e HepG2 *in vitro* a N-(succinil) fenilefrina não apresentou toxicidade em nenhuma das células testadas. Essa é uma informação muito importante, uma vez que a citotoxicidade foi determinada pela primeira vez, já que não foram encontradas informações de qualquer teste de toxicidade na literatura abordando esse produto de degradação. Além disso, verificou-se que mesmo o produto acabado não exposto, adquirido em farmácia comercial, havia 3% dessa impureza. Portanto, é imprescindível que estudos como esse sejam realizados para resguardar a saúde dos consumidores finais.

Os resultados encontrados para a N-(formil) desloratadina, que também são inéditos na literatura científica, demonstraram que a própria desloratadina se mostrou tóxica para as células, apresentando valores de IC 50 bem baixos. Não foram encontrados dados na literatura que demonstram essa toxicidade. Nas células hepáticas a N-(formil) desloratadina apresentou toxicidade na mistura binária, mas no produto acabado o mesmo não aconteceu, obtendo-se valores de IC 50 para o controle e exposto iguais, indicando que não há citotoxicidade. Como na mistura binária houve um resultado positivo para a hepatotoxicidade, entende-se que o produto de degradação, aparentemente, possui potencial efeitos maléficos sobre o fígado. Nas linhagens celulares C6 astrogial e VERO a N-(formil) desloratadina não demonstrou qualquer potencial de causar danos as células, obtendo-se IC 50 para os controle e amostras expostas, estatisticamente, iguais tanto para as misturas binárias, quanto para o produto acabado. Em relação a N-(formil) desloratadina é importante que mais testes sejam feitos para comprovar esses primeiros resultados demonstrados neste trabalho.

Portanto, no geral os resultados encontrados neste trabalho demonstram que quando os fármacos ingeridos em doses usuais e nos produtos acabados testados as impurezas não possuem potencial citotóxico para as células testadas. Uma vez que nenhum resultado de toxicidade testado para os produtos terminados foi positivo.

## 8. CONCLUSÃO

- ✓ O método utilizado para a avaliação do antigripal foi validado parcialmente demonstrando ser seletivo, linear, preciso e, por consequência, exato.
- ✓ O produto de degradação N-(succinil) fenilefrina não demonstrou neurotoxicidade nos estudos in vitro utilizando a linhagem celular C6 astroglial.
- ✓ O produto de degradação N-(succinil) fenilefrina não demonstrou nefrotoxicidade nos estudos in vitro utilizando a linhagem celular VERO.
- ✓ O produto de degradação N-(succinil) fenilefrina não demonstrou da hepatotoxicidade nos estudos in vitro utilizando a linhagem celular HepG2.
- ✓ Foi avaliada a seletividade do método farmacopeico utilizado nas análises de quantificação do antialérgico que demonstrou resultados satisfatórios.
- ✓ O produto de degradação N-(formil) desloratadina não demonstrou neurotoxicidade nos estudos in vitro utilizando a linhagem celular C6 astroglial.
- ✓ O produto de degradação N-(formil) desloratadina não demonstrou nefrotoxicidade nos estudos in vitro utilizando a linhagem celular VERO.
- ✓ O produto de degradação N-(formil) desloratadina demonstrou aumento significativo da hepatotoxicidade nas amostras de misturas binárias nos estudos in vitro utilizando a linhagem celular HepG2. Sendo o resultado negativo para o produto acabado contendo a mesma substância e avaliado nas mesmas células.

## 9. REFERÊNCIAS

- ALVES, E. A.; GUIMARÃES, A. C. R. Conceitos e Métodos para a Formação de Profissionais em Laboratórios de Saúde. Conceitos e Métodos para a Formação de Profissionais em Laboratórios de Saúde. v. 2; p. 215, 2015.
- AINUROFIQ A., MAULUDIN R., MUDHAKIR D., UMEDA D., SOEWANDHI S. N., PUTRA O. D., YONEMOCHI E. Improving mechanical properties of desloratadine via multicomponent crystal formation. *European Journal of Pharmaceutical*. v. 111; p. 65 – 72, 2017.
- ARRAIS P. S., COELHO H. L., BATISTA M. C., CARVALHO M.L., RIGUI R.E., ARNAU J. M. Perfil da automedicação no Brasil. *Revista de Saúde Pública*. v.31; p. 71-77, 1997.
- BASKETTER, D. A., CLEWELL, H., KIMBER, I., ROSSI, A., BLAAUBOER, B. J., BURRIER, R., HASIWA, N. A roadmap for the development of alternative (non-animal) methods for systemic toxicity testing-t4 report. *ALTEX-Alternatives to animal experimentation*, v. 29; p. 3 – 91, 2012.
- BERNARDI A., FROZZA R. L., JAGER E., FIGUERÓ F., BAVARESCO L., SALBEGO C. POHLMANN A. R., GUTERRES S.S, BATTASTINI A. M. O. Selective cytotoxicity of indomethacin and indomethacin ethyl ester-loaded nanocapsules against glioma cell lines: An in vitro study. *European Journal of Pharmacology*. v. 586; p. 24 – 34, 2008.
- BISSA, I.P.V. Estudos de Pré-formulação em formas farmacêuticas sólidas de uso oral para os fármacos Desloratadina e Etinilestradiol. 159 fls. Dissertação de Mestrado - Universidade de Alfenas, Alfenas – Minas Gerais, 2013.
- BRAGANHOL, E. et al. A comparative study of ectonucleotidase and P2 receptor mRNA profiles in C6 cell line cultures and C6 ex vivo glioma model. *Cell and Tissue Research*. v. 335; p. 331–340, 2009.
- BRASIL. Agência Nacional de vigilância Sanitária. Resolução RDC nº58, de 20 de dezembro de 2013. Estabelece parâmetros para a notificação, identificação e qualificação de produtos de degradação em medicamentos com substâncias ativas sintéticas e semissintéticas, classificados como novos, genéricos, similares, e dá outras providências. Brasília, DF.
- BRASIL. Agência Nacional de vigilância Sanitária. Resolução RDC nº53, de 04 de dezembro de 2015. Estabelece parâmetros para a notificação, identificação e qualificação de produtos de degradação em medicamentos com substâncias ativas sintéticas e semissintéticas, classificados como novos, genéricos e similares, e dá outras providências. Brasília, DF.
- BRASIL. Agência Nacional de vigilância Sanitária. Resolução RDC nº166, de 24 de julho de 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. Brasília, DF.
- CARR B. C. Efficacy, abuse, and toxicity of over-the-counter cough and cold medicines in the pediatric population. *Current Opinion in Pediatrics*. v. 18; p. 184 – 188, 2006.
- CHURCH M. K., MAURER M., SIMONS F. E. R., BINDSLEV-JENSEN C., VAN CAUWENBERGE P., BOUSQUET J., HOLTGATE S.T., ZUBERBIER T. Risk of first-generation H1-antihistamines: a GA2LEN position paper. *Allergy*. v. 65; p. 459 – 466, 2010.
- COOPER R. J. 'I can't be an addict. I am.' Over-the-counter medicine abuse: a qualitative study. *BMJ Open*. V. 3; p.1-7, 2013.

COOPER R. J. Over-the-counter medicine abuse – a review of the literature. *Journal of Substance Use*. V. 18; p. 82 - 107, 2013.

CHOI, J. M. et al. HepG2 cells as an in vitro model for evaluation of cytochrome P450 induction by xenobiotics. *Archives of Pharmacol Res.* v. 38; p. 691–704, 2015.

CLAYDEN, J. ed. al. *Organic Chemistry*. 2<sup>o</sup> Edição. New York: Oxford University Press, 2012.

DART R. C., PAUL I. M., BOND G. R., WINSTON D. C., MANOQUERRA A. S., PALMER R. B., KAUFFMAN R. E., BANNER W., GREEN J. L., RUMACK B. H. Pediatric Fatalities Associated With Over the Counter (Nonprescription) Cough and Cold Medications. *Annals of Emergency Medicine*. v. 53; p. 411 – 417, 2009.

DONATO, TOLOSA, G.-L. Culture and Functional Characterization of Human Hepatoma HepG2 Cells. *Protocols in In Vitro Hepatocyte Research, Methods in Molecular Biology*. v. 1250; p. 1–390, 2015.

DOKE S., DHAWALE S. C. Alternatives to animal testing: A review. *Saudi Pharmaceutical Journal*. v. 23; p. 223 – 229, 2015.

DUAN Y., ZHAO X., REN W., WHANG X., YU K., LI D., ZHANG X., ZHANG Q. Antitumor activity of dichloroacetate on C6 glioma cell: in vitro and in vivo evaluation. *Onco Targets and Therapy*. v. 6; p. 189 – 198, 2013.

EL-BACHÁ R. S., DAVAL J., KOZIEL V., NETTER P., MINN A. Toxic effects of apomorphine on rat cultured neurons and glial C6 cells, and protection with antioxidants. *Biochemical Pharmacology*. v. 66; p. 73 – 85, 2001.

EL-ZAHER A. A., FOUAD M. A., ELKADY E.F. Synthesis and Characterization of Maillard Reaction Products of Salbutamol and Terbutaline with Lactose and Development and Validation of an LC Method for the Determination of Salbutamol and Terbutaline in the Presence of These Impurities. *Analytical Chemistry Insights*. v. 9; p. 1 – 9, 2014.

Farmacopeia Americana USP 42. Acesso online <<https://www.uspnf.com/pt-br>>

FRANÇA, F. D. et al. Amphotericin B nephrotoxicity : Differential profile of PKC signaling in VERO and MDCK cell lines. *Current Topics in Toxicology*. v. 9; p. 15–19, 2014.

FREIRE P. F., LABRADOR V., PÉREZ MARTÍN J.M., HAZEN M.J. Cytotoxic effects in mammalian Vero cells exposed to pentachlorophenol. *Toxicology*. v. 210; p.37 – 44, 2005.

FATHIMA N., MAMATHA T., QURESHI H. K., ANITHA N., RAO J. V. Drug-excipient interaction and its importance in dosage form development. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. v. 6; p. 66 – 71, 2011.

GEHA R. S., MELTZER E. O. Desloratadine: A new, nonsedating, oral antihistamine. *The Journal of Allergy and Clinical Annals of Emergency Medicine*. v. 107; p. 751 – 762, 2001.

GERETS, H. H. J. et al. Characterization of primary human hepatocytes, HepG2 cells, and HepaRG cells at the mRNA level and CYP activity in response to inducers and their predictivity for the detection of human hepatotoxins. *Cell Biology and Toxicology*. v.28; p. 69–87, 2012.

HOTHA K. K., ROYCHOWDHURY S., SUBRAMANIAN V. Drug-Excipient Interactions: Case Studies and Overview of Drug Degradation Pathways. *American Journal of Analytical Chemistry*. v. 7; p. 107 – 140, 2016.

<<https://www.drugbank.ca/drugs/DB00388>> Acesso em 26 de maio de 2019.

<<https://chemicalize.com/#/calculation>> Acesso em 25 de maio de 2019.

<<https://chemicalize.com/#/calculation>> Acesso em 25 de maio de 2019.

HUMFREY, C. D. N. Recent Developments in the Risk Assessment of Potentially Genotoxic Impurities in Pharmaceutical Drug Substances. *Toxicological Sciences*. v. 100; p. 24 – 28, 2007.

International Conference on Harmonisation, ICH Q1A (R2) Stability testing of new drug substances and products, USA, 2003.

International Conference on Harmonisation, ICH Q 2 (R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, USA, 2005.

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

JEGANATHAN B, NADU T., GAT G., HUSSAIN J. Pharmaceutical composition comprising desloratadine. United States Patent US 2010/0303908 A1, 2010.

KHAPRA, P.; DHARMADHIKARI, N. Stable oral composition. World Intellectual Property Organization. WO 2005/065047 A2, 2005.

KHAPRA, P.; DHARMADHIKARI, N. Stable oral composition. United States Patent US 7,955,620 B2, 2011.

Kumar, V.; Banker, G. S. Maillard Reaction and Drug Stability. In *Maillard Reactions in Chemistry, Food, and Health*; Labuza, T. P., Reineccius, G. A., Monnier, V., O'Brien, J., Baynes, J., Eds.; Spec. Pub. 151; Royal Soc. Chem.: London. p. 20-27, 1994.

Li, M. *Organic Chemistry of drug degradation*. United Kingdom: Royal Society of Chemistry, 2012.

LIAO T., SHI Y., JIA J., WANG L. Sensitivity of Different Cytotoxic Responses of Vero Cells Exposed to Organic Chemical Pollutants and their Reliability in the Bio-toxicity Test of Trace Chemical Pollutants. *Biomedical And Environmental Sciences*. v. 23; p. 219 – 229, 2010.

LILIENBKUM, W., DEKANT, W., FOTH, H., GEBEL, T., HENGSTLER, J. G., KAHL, R., KRAMER, P. J., SCHWEINFURTH, H., WOLLIN, K. M. Alternative methods to safety studies in experimental animals: role in the risk assessment of chemicals under the new European Chemicals Legislation (REACH). *Archives Toxicology*. v. 82; p. 211 – 236, 2008.

MARÍN A., ESPADA A., VIDAL P., BARBAS C. Major Degradation Product Identified in Several Pharmaceutical Formulations against the Common Cold. *Analytical Chemistry*. v. 77; p. 471 – 477, 2005.

MATOS, A. P. Estudos de compatibilidade fármaco-excipiente e sua importância do desenvolvimento de formulações farmacêuticas. 80 fls. Dissertação de Pós-Graduação, Instituto de tecnologia em Fármacos, Rio de Janeiro, 2013.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods*, v. 65, n.1-2, p. 55-63, 1983.

MURDOCH D.; GOA K. L.; KEAM S. J. Desloratadine: An Update of its Efficacy in the Management of Allergic Disorders. *Adis Drug Evaluation*. v. 63; p. 2051 – 2077, 2003.

NARANG, S. A; BODDU, S.H.S. Excipients applications in formulation desing and drug delivery. Canada: Springer, 2015.

NAVES J. O. S, CASTRO L. L. C., CARVALHO C. M. S.; MERCHÁN-HAMANN E. Self-medication: a qualitative approach of its motivations. *Ciência e saúde coletiva*. v. 15; p. 1751-1762, 2010.

PATEL R. B., PATEL M. R., MEHTA J. B. Validation of stability indication high performance liquid chromatography method for estimation of Desloratadine in tablet formulation. *Arabian Jornal of Chemistry*. v. 10; p. 644 – 650, 2012.

PEROPADRE, A. et al. Cellular responses associated with dibucaine-induced phospholipidosis. *Chemical Research in Toxicology*. V. 24; p. 185–192, 2011.

RAHMAN N., AZMI S. N. H., WU H. The importance of impurity analysis in pharmaceutical products: an integrated approach. *Accreditation and Quality Assurance*. v. 11; p. 69 – 74, 2006.

WAZAIFY M., SHIELDS E., HUGHES C. M., MCELNAY J. C. Societal perspectives on over-the-counter (OTC) medicines. *Family Practice*. v. 22; p. 170–176, 2005.

WIRTH D. D, BAERTSCHI S. W., JOHNSON R. A., MAPLE S. R., MILLER M. S., HALLENBECK D. K., GREGG S. M. Maillard Reaction of Lactose and Fluoxetine Hydrochloride, a Secondary Amine. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. v. 87; p. 31 – 39, 1998.

WONG J., WISEMAN L., AL-MAMOON S., COOPER T., ZHANG L. K., CHAN T.-M. Major Degradation Product Identified in Several Pharmaceutical Formulations against the Common Cold. *Analytical Chemistry*, v. 78; p. 7891 – 7895, 2006.

## 10. DADOS SUPLEMENTARES

### 10.1. Resultados Adicionais Antigripal

Tabela 1: Amostras avaliadas na Seletividade qualitativa.

Amostra	Paracetamol	Cloridrato de Fenilefrina	Maleato de Clorfeniramina	Produto Acabado	Diluyente
01	-	-	-	-	Sim
02	-	Sim	-	-	Sim
03	-	-	Sim	-	Sim
04	Sim	-	-	-	Sim
05	-	-	-	Sim	Sim

#### Preparo das amostras

Amostra 01: Foi preparada uma mistura de água purificada:Metanol (70:30 v/v). Aguardou-se a solução retornar a temperatura ambiente antes de utilizá-la.

Amostra 02: Pesou-se 16,46 mg de cloridrato de fenilefrina e transferiu-se para um balão volumétrico de 20 mL com auxílio da Solução Diluyente. Adicionou-se cerca de 15 mL da Solução Diluyente e colocou-se em banho de ultrassom durante 10 min até completa solubilização. Após o retorno a temperatura ambiente, completou-se o volume com a Solução Diluyente e homogeneizou-se. Foi transferido volumetricamente 1 mL da solução para balão volumétrico de 10 mL completou-se o volume com a solução diluyente e a solução foi homogeneizada.

Amostra 03: Pesou-se 17,01 mg de maleato de clorfeniramina e transferiu-se para um balão volumétrico de 20 mL com auxílio da Solução Diluyente. Adicionou-se cerca de 15 mL da Solução Diluyente e colocou-se em banho de ultrassom durante 10 min até completa solubilização. Após o retorno a temperatura ambiente, completou-se o volume com a Solução Diluyente e homogeneizou-se. Foi transferido volumetricamente 1 mL da solução para balão volumétrico de 10 mL completou-se o volume com a solução diluyente e a solução foi homogeneizada.

Amostra 04: Pesou-se 81,11 mg de paracetamol e transferiu-se para um balão volumétrico de 10 mL com auxílio da Solução Diluyente. Adicionou-se cerca de 7 mL da Solução Diluyente e colocou-se em banho de ultrassom durante 10 min até completa solubilização. Após o retorno a temperatura ambiente, completou-se o volume com a Solução Diluyente e homogeneizou-se.

Amostra 05: Pesou-se 462,40 mg de produto acabado (equivalente a um peso médio, contendo aproximadamente 4 mg de cloridrato de fenilefrina, 4 mg de maleato de clorfeniramina e 400 mg de paracetamol) e transferiu-se para um balão volumétrico de 50 mL com auxílio da Solução Diluyente. Adicionou-se cerca de 40 mL da Solução Diluyente e colocou-

se em banho de ultrassom durante 10 min até completa solubilização. Após o retorno temperatura ambiente, completou-se o volume com a Solução Diluente e homogeneizou-se. A solução foi filtrada para vial apropriado.

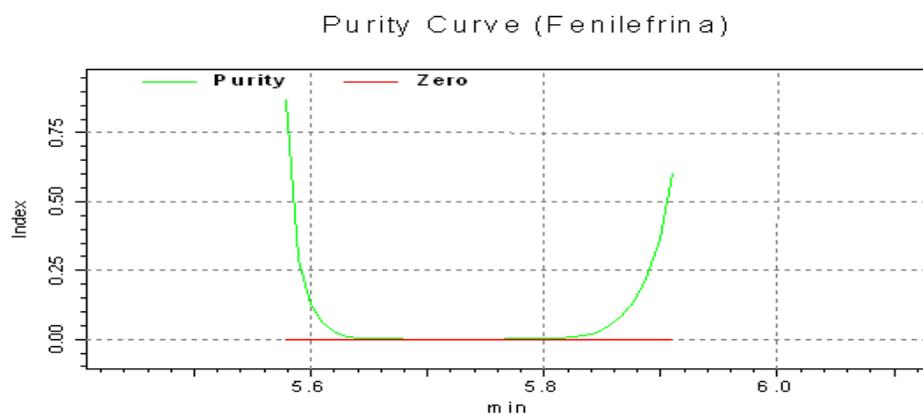


Figura 01: Gráfico de pureza de pico do ativo fenilefrina.

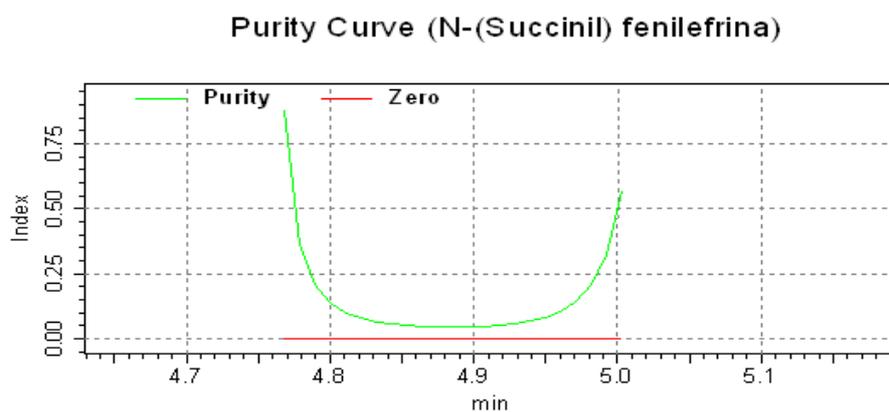


Figura 02: Gráfico de pureza de pico do produto de degradação N-(succinil) fenilefrina.

Nas Figuras 03 e 04 estão os espectros obtidos no detector do DAD durante a análise de seletividade para a fenilefrina e N-(Succinil) fenilefrina.

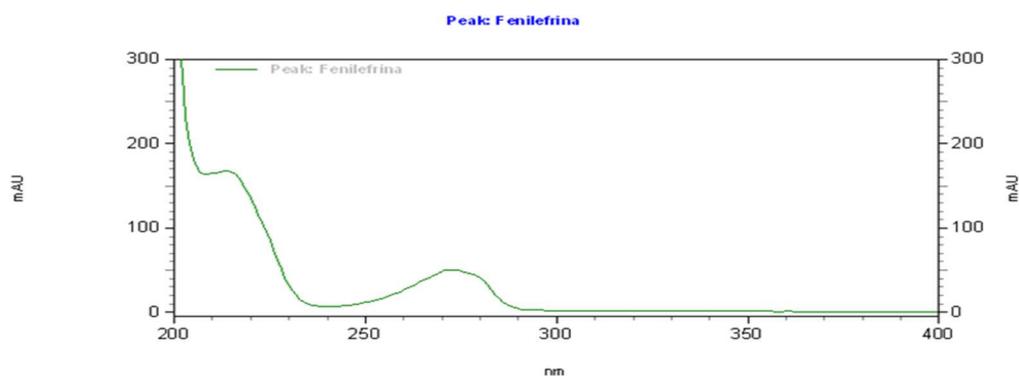


Figura 03: Espectro de absorbância fenilefrina.

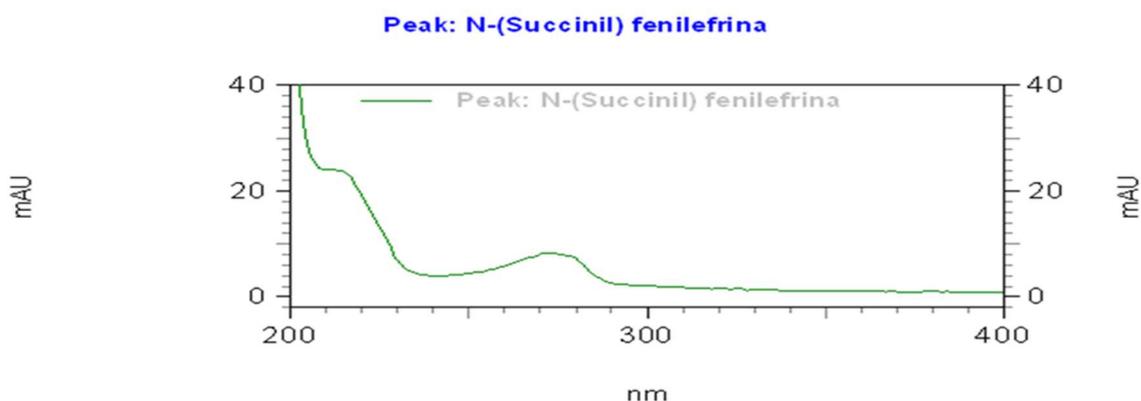


Figura 04: Espectro de absorvância N-(succinil) fenilefrina.

#### Linearidade

##### Preparo das Amostras:

Solução mãe de cloridrato de fenilefrina: Pesar exatamente cerca de 16,0 mg do padrão de cloridrato de fenilefrina e transferir para um balão volumétrico de 20 mL com auxílio da Solução Diluente. Adicionar 15 mL da Solução Diluente e colocar em banho de ultrassom durante 10 minutos até completa solubilização. Após o retorno a temperatura ambiente, completar o volume com a solução diluente e homogeneizar. Transferir volumetricamente 1 mL para balão volumétrico de 20 mL, completar com a Solução Diluente e homogeneizar. Foram realizadas três curvas.

Tabela 02: Preparo da Linearidade para Impurezas.

Nível (%)	Alíquota Utilizada da Sol. Estoque	Balão Volumétrico (mL)	Conc. Final de Cl. Fenilefrina (µg/mL)
0,1	0,1	50	0,08000 (LN) e (LQ)
0,2	0,2	50	0,16000 (LI)
0,5	0,5	50	0,40000 (L. Qualif.)
5,0	5,0	50	4,00000
15,0	3,0	10	12,00000

##### Resultados da Linearidade:

A representação gráfica da curva da linearidade está apresentada na Figura 05 abaixo.

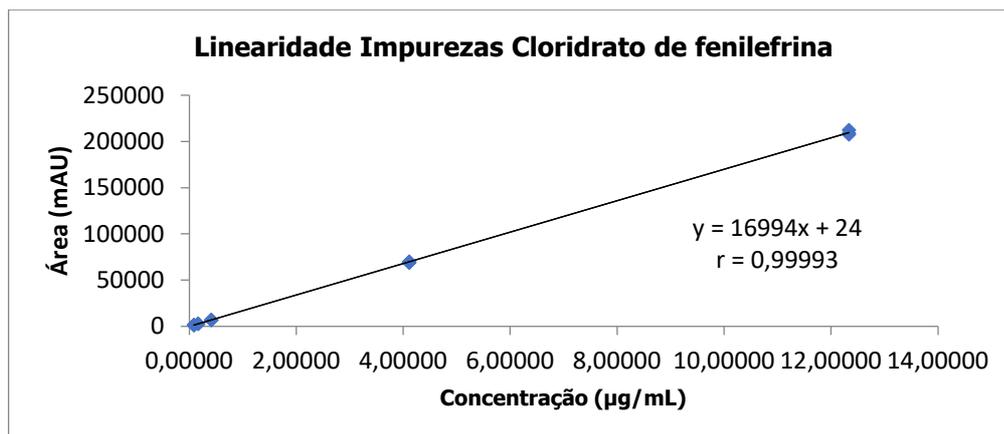


Figura 05. Curva de linearidade do cloridrato de fenilefrina.

Tabela 03: Resultados de área obtida em função da concentração da solução de fenilefrina.

<b>Dados do Cloridrato de Fenilefrina</b>					
Massa Pesada (mg):	16,46				
Teor (%):	99,9				
Concentração (%)	Concentração (µg/mL)	Curva	Área (mAU)	Área média	DPR
0,1	0,08222	1	1425		
		2	1474	1456	1,84
		3	1468		
0,2	0,16444	1	2988		
		2	3011	2973	1,57
		3	2921		
0,5	0,41109	1	7201		
		2	7063	7089	1,43
		3	7003		
5	4,11089	1	69409		
		2	70276	69490	1,08
		3	68786		
15	12,33266	1	208986		
		2	212396	209732	1,13
		3	207814		
<b>Coefficiente de correlação (r)</b>				<b>0,99993</b>	
<b>Intersecção com o eixo Y</b>				<b>24</b>	
<b>Coefficiente angular</b>				<b>16994</b>	

A partir dos dados apresentados na Tabela 03, foi realizada análise de regressão linear. Os resultados da análise de estatística de regressão estão apresentados na Tabela 04, respectivamente.

**Tabela 04:** Estatística de Regressão linear.

<i>Estatística de regressão</i>	
R múltiplo	0,999931785
R-Quadrado	0,999863575
R-quadrado ajustado	0,999853081
Erro padrão	1003,336358
Observações	15

ANOVA					
	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significação</i>
Regressão	1	95914322325	95914322325	95277,5021	1,63478E-26
Resíduo	13	13086890,01	1006683,847		
Total	14	95927409215			

Segundo a análise dos resultados obtidos no teste de curva analítica experimental, e em comparação com os critérios de aceitação mencionados pode-se concluir que o método é linear dentro do intervalo de 0,1% a 15,0% da concentração alvo de fenilefrina na amostra.

#### Precisão

#### Repetibilidade

Este parâmetro foi verificado por seis determinações do produto acabado considerando a concentração de 0,08 mg/mL de fenilefrina.

#### Preparo das amostras:

De um pool de 20 cápsulas, previamente homogeneizado em gral, pesar exatamente cerca de 460,0 mg de amostra e transferir para um balão volumétrico de 50 mL com auxílio da Solução Diluente. Adicionar cerca de 35 mL da Solução Diluente e colocar em banho de ultrassom durante 30 minutos ou até a completa solubilização. Após o retorno a temperatura ambiente, completar o volume com a Solução Diluente e homogeneizar. Filtrar uma alíquota para vial apropriado.

O cálculo do produto de degradação N-(succinil) fenilefrina será efetuado a partir da equação da reta obtida no teste de linearidade.

Os resultados para o teste de repetibilidade estão demonstrados na tabela 04.

Tabela 04: Resultados de repetibilidade do método para quantificação do produto de degradação N-(succinil) fenilefrina obtidos no Dia 1.

<b>Dados da Amostra - Dia 1</b>				
<b>Peso Médio (mg)</b>	<b>Amostra</b>	<b>Massa Pesada (mg)</b>	<b>Área (m.A.U.)</b>	<b>Concentração encontrada N-(Succinil) fenilefrina (µg/mL)</b>
460,00	1	454,87	114931	6,68621
	2	462,40	113556	6,71557
	3	461,02	111182	6,55552
	4	458,32	112945	6,62049
	5	461,89	112804	6,66373
	6	460,98	110290	6,50235
<b>Concentração Média=</b>			<b>6,62398</b>	
<b>DPR intra-dia =</b>			<b>1,23</b>	

De acordo com a análise dos resultados obtidos nos testes de repetibilidade, e em comparação com os critérios de aceitação mencionados conclui-se que o método é adequado para o objetivo proposto.

#### Precisão Intermediária

Este parâmetro foi verificado por seis determinações do produto acabado considerando a concentração de 0,08 mg/mL de fenilefrina.

#### Preparo das amostras:

De um pool de 20 cápsulas, previamente homogeneizado em gral, pesar exatamente cerca de 460,0 mg de amostra e transferir para um balão volumétrico de 50 mL com auxílio da Solução Diluente. Adicionar cerca de 35 mL da Solução Diluente e colocar em banho de ultrassom durante 30 minutos ou até a completa solubilização. Após o retorno a temperatura ambiente, completar o volume com a Solução Diluente e homogeneizar. Filtrar uma alíquota para vial apropriado.

O cálculo do produto de degradação N-(succinil) fenilefrina será efetuado a partir da equação da reta obtida no teste de linearidade.

Os resultados para o teste de repetibilidade do Dia 2 estão demonstrados na Tabela 05:

Tabela 05: Resultados de repetibilidade do método de quantificação para o produto de degradação N-(succinil) fenilefrina obtidos no Dia 2.

<b>Dados da Amostra - Dia 2</b>				
<b>Peso Médio (mg)</b>	<b>Amostra</b>	<b>Massa Pesada (mg)</b>	<b>Área (m.A.U.)</b>	<b>Concentração encontrada N-(Succinil) fenilefrina (µg/mL)</b>
460,00	1	459,12	114285	6,71075
	2	460,01	116579	6,85875
	3	458,02	111492	6,53102
	4	459,87	113183	6,65688
	5	460,05	111914	6,58480
	6	459,96	113551	6,67984
<b>Concentração Média=</b>				<b>6,67034</b>
<b>DPR intra-dia =</b>				<b>1,70</b>

Os resultados obtidos na repetibilidade (Dia 1) juntamente com o resultado de mais seis determinações realizadas em dia diferente (Dia 2) estão apresentados na Tabela 06. Os resultados encontrados para a precisão do método analítico demonstram que os valores encontrados de concentração do produto de degradação N-(succinil) fenilefrina apresentou DPR <2,00% nas seis determinações dos dois dias de análise, portanto estão de acordo como o limite aceitação estabelecido.

Tabela 06. Resultados de precisão intermediária do método de quantificação do produto de degradação da N-(succinil) fenilefrina obtidos em dias diferentes.

<b>Amostra</b>	<b>Resultados Encontrados Precisão Intermediária</b>	
	<b>Dia 1</b>	<b>Dia 2</b>
	<b>Concentração N-(Succinil) fenilefrina (µg/mL)</b>	<b>Concentração N-(Succinil) fenilefrina (µg/mL)</b>
1	6,68621	6,71075
2	6,71557	6,85875
3	6,55552	6,53102
4	6,62049	6,65688
5	6,66373	6,58480
6	6,50235	6,67984
<b>Concentração Média=</b>		<b>6,64716</b>
<b>DPR intra-dia =</b>		<b>1,46</b>

De acordo com a análise dos resultados obtidos nos testes de repetibilidade e de precisão intermediária, e em comparação com os critérios de aceitação mencionados pode-se concluir que o método é preciso para quantificar ao produto de degradação N-(succinil) fenilefrina.

Na Tabela 07 e 08 estão representados os resultados obtidos na quantificação da fenilefrina e da N-(Succinil) fenilefrina nas amostras expostas por dez dias em estufa térmica úmida.

Tabela 07: Resultados das análises por cromatografia de alta eficiência para as amostras de misturas binárias controle (FCc) e exposta (FCe).

<b>Concentração de Fenilefrina (mg/mL)</b>	<b>0,07975</b>		
Área MP Rep 1	1385422		
Área MP Rep 2	1389389		
Área MP Rep 3	1387605		
<b>Média</b>	<b>1387472</b>		
<b>DPR (%)</b>	<b>0,14</b>		
Mistura Binária Controle - Area Fenilefrina	Conc. Teórica (mg/mL)	Conc. Encontrada (mg/mL)	Conc. (%)*
<b>1380891</b>	0,07705	0,07937	<b>103,01</b>
Mistura Binária Exposta -Area Fenilefrina	Conc. Teórica (mg/mL)	Conc. Encontrada (mg/mL)	Conc. (%)*
<b>1271597</b>	0,078896	0,07309	<b>92,64</b>
Area N-(2-Succinil) Fenilefrina Formada	Conc. Encontrada (%)**		
<b>172947</b>	<b>10,04</b>		

\*Valor calculado frente a amostra de matéria prima.

\*\* Valor calculado frente a curva de linearidade.

Tabela 08: Resultados das análises por cromatografia de alta eficiência para as amostras de produto acabado controle (FC<sub>PAC</sub>) e exposto (FC<sub>PAE</sub>).

<b>Concentração de Fenilefrina (mg/mL)</b>	<b>0,07975</b>		
Área MP Rep 1	1385422		
Área MP Rep 2	1389389		
Área MP Rep 3	1387605		
<b>Média</b>	<b>1387472</b>		
<b>DPR (%)</b>	<b>0,14</b>		
Produto Acabado Controle - Area Fenilefrina	Conc. Teórica (mg/mL)	Conc. Encontrada (mg/mL)	Conc. (%)*
<b>1327511</b>	0,08008	0,07630	<b>95,28</b>
Area N-(2-Succinil) Fenilefrina Formada	Conc. Encontrada (%)**		
<b>45014</b>	<b>2,65</b>		
Produto Acabado Exposto -Area Fenilefrina	Conc. Teórica (mg/mL)	Conc. Encontrada (mg/mL)	Conc. (%)*
<b>1155352</b>	0,07836	0,06641	<b>84,75</b>
Area N-(2-Succinil) Fenilefrina Formada	Conc. Encontrada (%)**		
<b>167661</b>	<b>9,66</b>		

\*Valor calculado frente a amostra de matéria prima.

\*\* Valor calculado frente a curva de linearidade.

## 10.2. Resultados Adicionais Desloratadina

Nas Figuras 06 e 07, o espectro de pureza da desloratadina e da N-(formil) desloratadina obtidos durante o teste de seletividade.

### Purity Curve (Desloratadina)

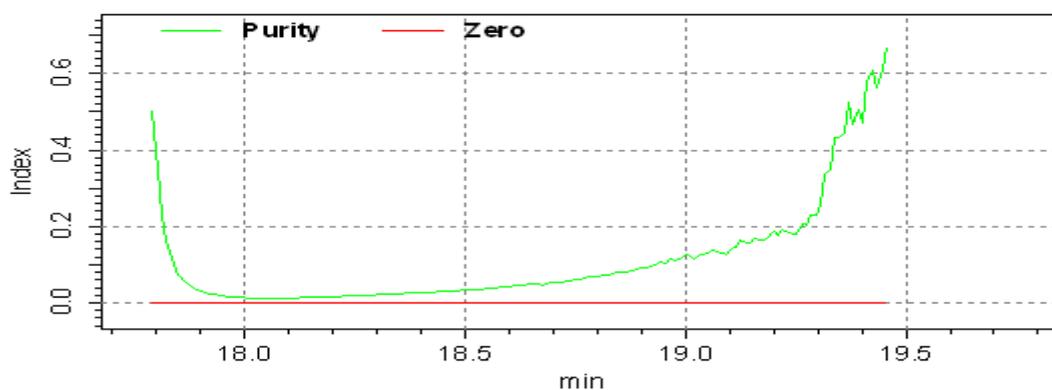


Figura 06: Representação gráfica da pureza do pico da desloratadina.

### Purity Curve (N-(Formil) desloratadina)

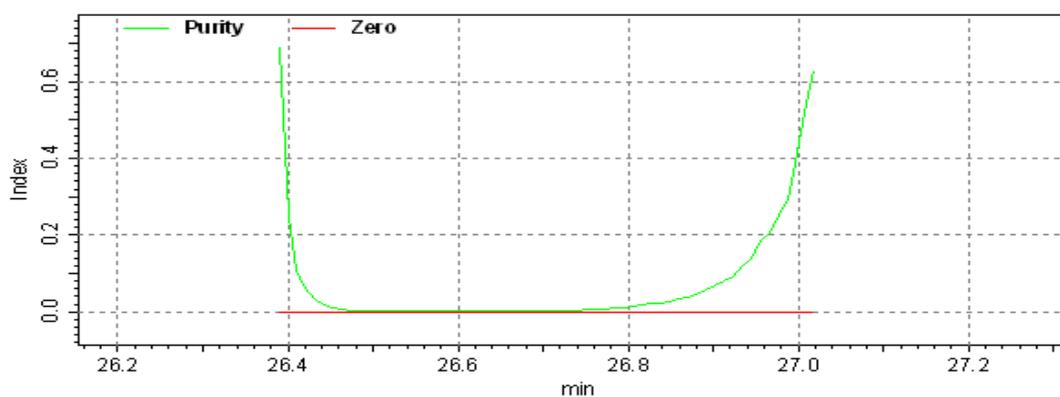


Figura 07: Representação gráfica da pureza do pico da N-(formil) desloratadina.

Na Tabela 09 e 10 estão representados os resultados obtidos na quantificação da desloratadina e da N-(formil) desloratadina nas amostras expostas por dez dias em estufa térmica úmida.

Tabela 09: Resultados das análises por cromatografia de alta eficiência para as amostras de misturas binárias controle (DLc) e exposta (DLe).

<b>Conc. Desloratadina (mg/mL)</b>	<b>0,20060</b>	<b>Conc. N-(Formil) desloratadina(mg/mL)</b>	<b>0,00199</b>
Área MP Rep 1	7860126	Área MP Rep 1	86264
Área MP Rep 2	7975286	Área MP Rep 2	84188
Área MP Rep 3	8097970	Área MP Rep 3	86379
<b>Média</b>	<b>7977794</b>	<b>Média</b>	<b>85610</b>
<b>DPR (%)</b>	<b>1,49</b>	<b>DPR (%)</b>	<b>1,44</b>
Mistura Binária Controle - Area Desloratadina			
<b>8093446</b>	Conc. Teórica (mg/mL)	Conc. Encontrada (mg/mL)	Conc. (%)
	0,20339	0,20350	<b>100,06</b>
Mistura Binária Exposta -Area Desloratadina			
<b>7626460</b>	Conc. Teórica (mg/mL)	Conc. Encontrada (mg/mL)	Conc. (%)
	0,20092	0,19176	<b>95,44</b>
Area N-(Formil) desloratadina Formada		Conc Encontrada (%)	
<b>278050</b>		<b>3,23</b>	

Tabela 10: Resultados das análises por cromatografia de alta eficiência para as amostras de produto acabado controle (DL<sub>PAC</sub>) e exposto (DL<sub>PAE</sub>).

<b>Conc. Desloratadina (mg/mL)</b>	<b>0,20060</b>	<b>Conc. N-(Formil) desloratadina(mg/mL)</b>	<b>0,00199</b>
Área MP Rep 1	7860126	Área MP Rep 1	86264
Área MP Rep 2	7975286	Área MP Rep 2	84188
Área MP Rep 3	8097970	Área MP Rep 3	86379
<b>Média</b>	<b>7977794</b>	<b>Média</b>	<b>85610</b>
<b>DPR (%)</b>	<b>1,49</b>	<b>DPR (%)</b>	<b>1,44</b>
Mistura Binária Controle - Area Desloratadina			
<b>7414964</b>	Conc. Teórica (mg/mL)	Conc. Encontrada (mg/mL)	Conc. (%)
	0,19133	0,18644	<b>97,45</b>
Mistura Binária Exposta -Area Desloratadina			
<b>6500488</b>	Conc. Teórica (mg/mL)	Conc. Encontrada (mg/mL)	Conc. (%)
	0,19678	0,16345	<b>83,06</b>
Area N-(Formil) desloratadina Formada		Conc Encontrada (%)	
<b>259972</b>		<b>3,02</b>	