

SÂMIA ROCHA DE OLIVEIRA MELO

**PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO: REGULAMENTAÇÃO SANITÁRIA E  
PROPOSTA DE MONOGRAFIA PARA QUALIFICAÇÃO**

BRASÍLIA, 2012

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

SÂMIA ROCHA DE OLIVEIRA MELO

PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO: REGULAMENTAÇÃO SANITÁRIA E PROPOSTA  
DE MONOGRAFIA PARA QUALIFICAÇÃO

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Alberto Simeoni

Co-Orientadora: Profa. Dra. Dâmaris Silveira

BRASÍLIA

2012

SÂMIA ROCHA DE OLIVEIRA MELO

PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO: REGULAMENTAÇÃO SANITÁRIA E PROPOSTA  
DE MONOGRAFIA PARA QUALIFICAÇÃO

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Aprovado em 15 de março de 2012.

BANCA EXAMINADORA

\_\_\_\_\_ (presidente)

Prof. Dr. Luiz Alberto Simeoni (UNB)

\_\_\_\_\_

Dra. Camila Fracalossi Redigueri (ANVISA)

\_\_\_\_\_

Prof. Dr. Maurício Homem de Mello (UnB)

\_\_\_\_\_

Prof. Dra. Maria de Fátima Borin (UnB)

Dedico esse trabalho a saúde pública e aqueles que buscam continuamente a  
qualidade e segurança dos medicamentos.

## AGRADECIMENTOS

Aos amigos, à família e todos aqueles que apoiaram e proporcionaram a construção desse trabalho.

*“Existem conhecimentos conhecidos; existem coisas que sabemos que conhecemos. Nós também sabemos que existem conhecimentos desconhecidos, ou seja, sabemos que há algumas coisas que nós não conhecemos. Mas também há desconhecimentos desconhecidos - aqueles que não conhecemos e não sabemos. A ausência da evidência não é evidência da ausência” (Donald Rumsfeld).*

## RESUMO

Produtos de degradação: regulamentação sanitária e proposta de monografia para qualificação/ Sâmia Rocha de Oliveira Melo, Brasília, 2012, 114 p.

Os produtos de degradação são impurezas resultantes da degradação do ativo farmacêutico ou excipientes de uma formulação e podem surgir durante o armazenamento do medicamento, diante de situações de estresse, resultantes dos efeitos da luz, temperatura, pH, umidade e transporte. Podem, também, ser originados das características inerentes ao fármaco, da reação com os excipientes ou devido ao contato com a embalagem primária. Esses produtos de degradação podem provocar a ineficácia terapêutica e até mesmo eventos adversos a depender de seu perfil toxicológico. Diante da presença de produtos de degradação em quantidade significativa no fármaco ou medicamento é necessário realizar a sua qualificação. Prevenir ou minimizar a formação de produtos de degradação significativos em fármacos ou formas farmacêuticas pode ser uma estratégia mais econômica que qualificar os produtos formados. A qualificação de um produto de degradação pode ser realizada por meio de dados de literatura científica ou por meio de dados experimentais (estudos toxicológicos) que confirmem os níveis seguros das mesmas. No entanto, a qualificação de um produto de degradação normalmente é onerosa, pois envolve na maioria das vezes a necessidade da caracterização, síntese da impureza de degradação e condução de ensaios toxicológicos. Neste sentido, os esforços devem ser concentrados em minimizar e até mesmo eliminar as impurezas de degradação ou buscar a qualificação mediante dados literários. Este trabalho buscou a qualificação da impureza “furfural” originária da degradação do ativo farmacêutico ácido ascórbico, por meio da construção de um modelo de monografia de qualificação de produtos de degradação, validado com a pesquisa de dados literários dessa impureza.

Palavras-chave: produtos de degradação, qualificação, ácido ascórbico, furfural, regulamentação.

## ABSTRACT

Degradation products: Health regulation and model of monograph to qualification/  
Sâmia Rocha de Oliveira Melo, Brasília, 2012, 114 p.

Degradation products are impurities resulting from the degradation of active pharmaceutical ingredients or excipients of a formulation and can occur during the storage of the drug, in situations of stress, as a result from the effects of light, temperature, pH, moisture and transportation. They can also be derived from inherent characteristics of the drug, the reaction with excipients, or due to contact with the primary packaging. These degradation products can cause treatment inefficiency and, depending on its toxicological profile, adverse events. Given the presence of degradation products in significant amount is necessary to perform a qualification to the drug or medicine. To prevent or minimize the formation of significant degradation products in drugs and pharmaceutical formulas might be a more economical way to classify the products formed. The classification of a degradation product can be performed using data from scientific literature or through experimental data (toxicological studies) that confirms its safety levels. However, the qualification of a degradation product is, normally, too expensive, once it implicates the need for the characterization and synthesis of degradation impurities and running toxicity tests. In this way, efforts should be concentrated to minimize and even eliminate impurities, degradation or seek qualification through literary data. The aim of the present study is to qualify the "furfural" impurity originated from the degradation of the active pharmaceutical ascorbic acid, by building a guidebook of qualification of degradation products, validated with data search through the literature.

Keywords: degradation products, qualification, ascorbic acid, furfural, monograph model.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Árvore decisória para produtos de degradação em medicamentos	48
Figura 2 - Árvore decisória para produtos de degradação genotóxicos em medicamentos	51
Figura 3 - Classes terapêuticas das especialidades farmacêuticas contendo ácido ascórbico que em algum momento obtiveram registro na Anvisa	99
Figura 4 - Formas farmacêuticas dos medicamentos contendo ácido ascórbico que em algum momento obtiveram registro na Anvisa.	100

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Classificação carcinogênica de compostos químicos segundo a IARC	25
Quadro 2- Classificação de impureza segundo o PhRMA	26
Quadro 3 - Limites para notificação, identificação e qualificação dos produtos de degradação presentes em medicamentos	46
Quadro 4 – Comparativo entre os guias adotado pelas diferentes autoridades sanitárias que abordam o tema “degradação”	55

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>13</b>
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b>	<b>15</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>16</b>
3.1	GERAL	16
3.2	ESPECÍFICOS	16
<b>4</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b>	<b>17</b>
4.1	PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO E PERFIL DE IMPUREZAS	17
4.2	ESTABILIDADE E MÉTODOS INDICADORES DE ESTABILIDADE	18
4.3	OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS DE DEGRADAÇÃO E ESTUDOS DE ESTRESSE	19
	<b>4.3.1 Algumas condições que geram a degradação de ativos e formas farmacêuticas</b>	<b>20</b>
4.4	TÉCNICAS DE IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO	222
4.5	QUALIFICAÇÃO DE IMPUREZAS DE DEGRADAÇÃO	23
	<b>4.5.1 Impurezas genotóxicas, carcinogênicas e mutagênicas</b>	<b>24</b>
	<b>4.5.2 Classificação de compostos carcinogênicos</b>	<b>25</b>
	<b>4.5.3 Ensaios toxicológicos utilizados na qualificação de produtos de degradação</b>	<b>26</b>
4.5.3.1	Ensaios de ecotoxicidade	27
4.5.3.2	Toxicidade aguda	27
4.5.3.3	Toxicidade sub-aguda	28
4.5.3.4	Toxicidade sub-crônica (curta duração)	28
4.5.3.5	Toxicidade crônica (longo prazo)	29
4.5.3.6	Testes de tolerância local	29

4.5.3.6.1	<i>Teste de irritação cutânea</i>	29
4.5.3.6.2	<i>Teste de irritação ocular</i>	30
4.5.3.6.3	<i>Teste de sensibilização dérmica</i>	30
4.5.3.7	Carcinogênese	31
4.5.3.8	Ensaio de teratogenicidade e toxicidade reprodutiva	31
4.5.3.9	Ensaio de mutagênese	32
4.5.3.9.1	<i>Ensaio de mutação bacteriana (Teste de Ames)</i>	32
4.5.3.9.2	<i>Teste de aberração cromossômica in vitro</i>	34
4.5.3.9.3	<i>Teste de mutação genética in vitro de linfoma TK de Rato</i>	35
4.5.3.9.4	<i>Teste de micronúcleo em eritrócitos de mamíferos in vivo</i>	36
4.5.3.10	Ensaio cometa	37
<b>4.5.4</b>	<b>Limitações dos Ensaio de Genotoxicidade</b>	<b>37</b>
4.6	ESTRUTURAS-ALERTA DE GENOTOXICIDADE E PROGRAMAS COMPUTACIONAIS E BASE DE DADOS UTILIZADOS NA PESQUISA E IDENTIFICAÇÃO	38
<b>5</b>	<b>MÉTODOS</b>	<b>41</b>
5.1	DESCRIÇÃO DAS PRINCIPAIS NORMAS E GUIAS NACIONAIS E INTERNACIONAIS QUE AVALIAM PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO	41
5.2	ELABORAÇÃO DE MONOGRAFIA PARA SISTEMATIZAÇÃO DE INFORMAÇÕES EM DEGRADAÇÃO	42
5.3	ELABORAÇÃO DE MONOGRAFIA PARA O ATIVO FARMACÊUTICO ÁCIDO ASCÓRBICO	42
5.4	LEVANTAMENTO DE FORMAS FARMACÊUTICAS REGISTRADAS COM O ATIVO ÁCIDO ASCÓRBICO NA AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA	43
<b>6</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>45</b>
6.1	NORMAS E GUIAS NACIONAIS E INTERNACIONAIS QUE AVALIAM PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO	45
6.1.1	<b>Guias utilizados autoridades sanitárias da Comunidade Europeia, Canadá, Estados Unidos, Austrália e Japão</b>	<b>45</b>

6.1.1.1	Guia do <i>International Conference on Harmonisation (ICH)</i>	45
6.1.1.2	Guia de impurezas genotóxicas da Comunidade Europeia	49
<b>6.1.2</b>	<b>Guia de estabilidade da Entidade Asiática</b>	<b>52</b>
<b>6.1.3</b>	<b>Guia de estabilidade da Organização Mundial de Saúde</b>	<b>52</b>
<b>6.1.4</b>	<b>Guia de estabilidade do <i>Cooperation Council for The Arab States of the Gulf</i></b>	<b>53</b>
<b>6.1.5</b>	<b>Guia de estabilidade da África do Sul</b>	<b>53</b>
<b>6.1.6</b>	<b>Guia de estabilidade da Agência Nacional de Vigilância Sanitária</b>	<b>54</b>
6.2	MODELO DE MONOGRAFIA PARA SISTEMATIZAÇÃO DE INFORMAÇÕES SOBRE PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO	56
6.3	PROPOSTA DE MODELO DE MONOGRAFIA PARA PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO	57
6.4	MONOGRAFIA PARA PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO DO ÁCIDO ÁSCORBICO E VALIDAÇÃO DO MODELO	60
6.5	LEVANTAMENTO DE FORMAS FARMACÊUTICAS REGISTRADAS COM O ATIVO ÁCIDO ASCÓRBICO	99
<b>7</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	<b>101</b>
<b>8</b>	<b>CONCLUSÃO</b>	<b>105</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A segurança e a eficácia dos medicamentos são requisitos essenciais para o sucesso de um tratamento. A segurança é determinada pelo seu perfil farmacológico bem como pelos efeitos adversos causados pelas impurezas existentes nos lotes do fármaco e nas formas farmacêuticas. As impurezas presentes no fármaco e medicamento geralmente possuem efeitos farmacológicos ou toxicológicos indesejados que devem ser considerados em relação aos benefícios obtidos com a administração da medicação. O monitoramento e controle das impurezas são importantes para a garantia da qualidade e segurança de um medicamento (1).

O conceito de impureza a define como algo de qualidade ou estado impuro, substância que adultera ou contamina, ou como coisa impura ou contaminada. A impureza também pode ser definida como uma substância de interesse misturada ou impregnada em outra substância estranha ou de qualidade inferior. Estas definições em conjunto, geram uma definição mais concisa de impureza, que seria qualquer material que afete a pureza de um material de interesse, como por exemplo, a do ativo farmacêutico (2). As impurezas podem ser de origem inorgânica ou orgânica. As impurezas inorgânicas podem ser os catalisadores, metais pesados, resíduos e outros materiais empregados na síntese do ativo. Já as impurezas de origem orgânica podem ser intermediários, subprodutos, substâncias relacionadas e produtos de degradação (3).

Os produtos de degradação são impurezas orgânicas originárias da decomposição do material de interesse ou do ativo farmacêutico e também incluem os produtos resultantes da degradação de outros compostos que possam estar presentes, como os excipientes de uma formulação (2). Essa dissertação irá tratar dos produtos de degradação oriundos da decomposição do ativo farmacêutico.

A decomposição do ativo normalmente ocorre devido a sua interação com os excipientes da formulação, material de embalagem, devido ao envelhecimento, ou das condições de armazenamento e transporte que podem provocar estresse do ativo farmacêutico e iniciar sua degradação (4). O produto de degradação formado pode provocar ineficácia terapêutica e até mesmo eventos adversos nos pacientes a depender de sua atividade toxicológica.

Muitas empresas empregam estudos de estresse com a finalidade de prever os possíveis produtos de degradação que podem surgir em um medicamento, bem como os prováveis mecanismos envolvidos. Esses estudos apresentam utilidade durante o desenvolvimento da formulação, pois auxiliam na seleção adequada do material de embalagem primária e excipientes mais compatíveis com o fármaco para o desenvolvido da forma farmacêutica pretendida. Os estudos auxiliam, também, no desenvolvimento do método analítico indicador de estabilidade a ser empregado (5).

Diante da presença de produtos de degradação em quantidade significativa no fármaco e medicamento é necessário realizar a sua qualificação. Prevenir ou minimizar a formação de produtos de degradação significativos pode ser uma estratégia mais econômica que qualificar os produtos formados (6). Um produto de degradação pode ser qualificado por meio de dados literários que demonstrem sua inocuidade ou atividade toxicológica ou mediante a condução de ensaios toxicológicos. No entanto, a qualificação irá envolver na maioria das vezes a necessidade da síntese e caracterização dos produtos de degradação bem como a condução de ensaios toxicológicos e de genotoxicidade.

Nesse sentido, a proposta desse trabalho é de apresentar alguns guias adotados pelas agências regulatórias do mundo sobre o assunto “produtos de degradação”, bem como propor um modelo de monografia para um produto de degradação, a fim de qualificá-lo mediante dados literários. Para validar esse modelo, foi escolhido o ativo farmacêutico ácido ascórbico, e seu produto de degradação furfural, para qual se buscou em literatura informações toxicológicas relevantes a fim de subsidiar sua qualificação.

## 2 JUSTIFICATIVA

A necessidade de conhecimento sobre o produto farmacêutico objeto de registro, produtos de degradação formados e as respectivas rotas de degradação, e a relevância toxicológica dos produtos de degradações justifica a elaboração de monografias sobre o assunto “produtos de degradação”. A elaboração dessas monografias constitui relevância sanitária, por orientar a avaliação das impurezas de degradação que surgem ao longo do período de estabilidade dos ativos e formas farmacêuticas.

Conhecer tais produtos é importante, pois permite definir estratégias para prevenir, eliminar ou reduzir a sua formação, garantindo a qualidade e segurança do produto farmacêutico.

Atualmente as principais monografias de ativos e formas farmacêuticas existentes nos compêndios oficiais adotados pelas diferentes autoridades sanitárias no mundo não contemplam um modelo que possa ser aplicável para produtos de degradação. Contudo, uma monografia para produtos de degradação pode representar uma ferramenta útil na etapa de avaliação da segurança de um medicamento.

Tal monografia deve contemplar, de forma mais completa possível, informações sobre as características físico-químicas, síntese, origem, bem como dados sobre a toxicidade do produto de degradação originado de um determinado ativo farmacêutico. Dessa forma, a monografia torna-se útil como auxílio na qualificação do produto de degradação.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 GERAL

Elaborar uma proposta de modelo de monografia para qualificação de produtos de degradação.

#### 3.2 ESPECÍFICOS

- Comparar a legislação Brasileira vigente que trata sobre o tema produtos de degradação, com a legislação equivalente internacional;
- Levantar as formas farmacêuticas, classes terapêuticas contendo o ativo ácido ascórbico, que em algum momento apresentaram registro na ANVISA;
- Elaborar monografia para o produto de degradação “furfural” originado do insumo farmacêutico ácido ascórbico (vitamina C).

## 4 REVISÃO DE LITERATURA

### 4.1 PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO E PERFIL DE IMPUREZAS

Os produtos de degradação são impurezas resultantes de alterações químicas que surgem durante o armazenamento do medicamento, devido aos efeitos da luz, temperatura, pH, umidade e das características inerentes ao fármaco, da reação com os excipientes ou devido ao contato com a embalagem primária (7). São impurezas de origem orgânica, resultantes do processo de síntese, estocagem, fabricação da forma farmacêutica; ou ainda, subprodutos originados do envelhecimento do fármaco (3).

A presença de traços de impurezas em medicamentos ou nos fármacos é inevitável. No entanto, esses níveis devem ser monitorados, pois impurezas podem, em alguns casos, reduzir a eficácia dos ativos farmacêuticos, bem como aumentar a possibilidade da ocorrência de efeitos adversos interferindo na segurança do ativo de interesse. Em alguns casos, impurezas podem ser teratogênicas, mutagênicas ou carcinogênicas, colocando em risco a saúde humana. Sendo assim, é necessária a determinação do perfil das impurezas presentes no ativo farmacêutico (3).

O perfil de impurezas é a descrição de impurezas presentes em um novo fármaco. Esse perfil pode ser estabelecido a partir das atividades analíticas envolvidas na detecção, identificação, elucidação das estruturas e determinação quantitativa das impurezas orgânicas e inorgânicas em lotes de fármaco e formulações farmacêuticas. A definição desse perfil é de extrema importância em todas as fases da pesquisa e fabricação do fármaco (7-8)

Sob o ponto de vista da metodologia analítica, a distinção entre o perfil de degradação e o perfil de impureza não é significativa; contudo, as estratégias empregadas no desenvolvimento de métodos para definir e estudar o perfil de degradação são muito diferentes das estratégias análogas utilizadas para o estudo das impurezas relacionadas ao processo produtivo (9).

O perfil de impurezas é de extrema importância em todas as fases da pesquisa e fabricação do fármaco. O responsável pela fabricação do fármaco deve conhecer o perfil das impurezas do lote do ativo utilizado no desenvolvimento das

formulações a fim de diferenciar as impurezas de síntese dos produtos de degradação para que assim possa desenvolver um método analítico indicador de estabilidade (8).

#### 4.2 ESTABILIDADE E MÉTODOS INDICADORES DE ESTABILIDADE

Uma determinada especialidade farmacêutica e/ou matéria-prima deve manter, durante o período de estocagem e uso, as mesmas condições e padrão de qualidade que apresentavam no momento de sua fabricação (10). Assim, estabilidade pode ser definida como o período no qual a especialidade farmacêutica e/ou a matéria prima mantêm suas características dentro dos limites especificados.

O estudo de estabilidade é um procedimento de rotina realizado no ativo e na forma farmacêutica e pode ser acelerado, de longa duração e de acompanhamento. O estudo de estabilidade *acelerado* (em temperaturas e/ou umidade elevada) é projetado para acelerar a degradação química e/ou mudanças físicas no produto, a fim de simular condições drásticas de armazenamento. O estudo de estabilidade *de longa duração* é projetado em condições de temperatura e umidade menos elevadas que os estudos de estabilidade acelerada, sendo utilizados para estabelecer ou confirmar o prazo de validade e recomendar as condições de armazenamento do produto (10-11). Por sua vez, os estudos de estabilidade de *acompanhamento* são realizados a fim de garantir se o medicamento mantém o padrão de qualidade verificado nos estudos de estabilidade de longa duração (10).

Para acompanhar os resultados provenientes dos estudos de estabilidade em medicamentos é necessária a utilização de um método indicador de estabilidade. O método indicador de estabilidade pode ser de natureza específica ou seletiva. O método *específico* é aquele que produz resposta para um único analito (12-14). O método *seletivo* é aquele capaz de mensurar o analito particular sem a interferência dos outros componentes da matriz, ou seja, produz resposta para vários analitos, mas pode distinguir a resposta do analito de interesse da de outros componentes presentes (12).

Para desenvolver um método indicador de estabilidade é necessário realizar um estudo crítico da estrutura química objeto de avaliação; das possíveis rotas de

degradação; coletar informações sobre as propriedades físico-químicas do ativo como o pKa, a solubilidade, e outros, a fim de selecionar técnicas de separação e detectores adequados. Se faz necessário, ainda, obter os produtos de degradação; realizar estudos preliminares de separação nas amostras estressadas com a metodologia de análise determinada; desenvolver o método indicador de estabilidade; identificar e caracterizar os produtos de degradação, definir padrões desses produtos; e validar o método indicador de estabilidade (12).

#### 4.3 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS DE DEGRADAÇÃO E ESTUDOS DE ESTRESSE

O conhecimento das estruturas químicas constituintes dos compostos objeto de avaliação é importante na determinação das possíveis rotas de degradação. Para obtenção de informações relacionadas aos produtos de degradação podem ser utilizados softwares que auxiliam na previsão de reações orgânicas que ocorrem com o medicamento na presença de determinados reagentes, materiais de partida e das condições específicas de degradação.

O CAMEO (*Computer-Assisted Mechanistic Evaluation of Organic Reactions*) é um programa capaz de cobrir uma série de condições de degradação (básicas\nucleofílicas, ácidas\xoxidativas, óxido\redução, fotoquímicas) e mecanismos que delineam essas reações (15). Outra ferramenta consiste no “*Drug degradation database*”, Pharma D3, base de dados de degradação que contempla mais de 300 ativos farmacêuticos e rotas de degradação, ferramenta útil nessa avaliação (16).

Uma forma de preparar a amostra objeto de estudo quanto à degradação é prever todos os compostos que se espera estar presente antes de sua formulação. Em alguns casos o produto de degradação pode ocorrer na ordem inversa da síntese do ativo e a escolha de um ou mais precursores do ativo farmacêutico pode ser útil para a inclusão na mistura dos compostos a serem testados. Outras fontes de produtos de degradação são os lotes que foram reprovados em sua síntese, bem como a solução mãe formada nas etapas de purificação. Além dessas fontes é

possível obter amostras de produtos de degradação a partir de ensaios de estresse(17).

Os estudos de estresse são testes realizados sobre o ativo ou forma farmacêutica em condições extremas com o intuito de avaliar seu comportamento químico e prever as possíveis vias de degradação (10). Esses estudos fazem parte do desenvolvimento estratégico e permitem demonstrar a robustez das técnicas analíticas em avaliar a estabilidade do ativo e da forma farmacêutica; determinar as transformações estruturais desses compostos; detectar potenciais produtos de degradação; facilitar o aprimoramento de formulações e processos em paralelo aos estudos de estabilidade acelerada conduzidos; determinar as condições acidentais de exposição que podem ser deletérias para os produtos; bem como ajudar no estabelecimento de parâmetros específicos indicadores de estabilidade (18).

Nem sempre todos os produtos de degradação formados nos ensaios de estresse são verificados nos estudos de estabilidade conduzidos com o ativo farmacêutico. Muitas vezes, o estudo de estresse gera uma série de produtos de degradações, sendo difícil adotar um método indicativo de estabilidade seletivo (19).

#### **4.3.1 Algumas condições que geram a degradação de ativos e formas farmacêuticas**

A dimensão do teste de estresse utilizado para o fármaco e para a forma farmacêutica irá depender das suas características intrínsecas. Para o medicamento, o planejamento deverá ser baseado nas propriedades do fármaco e dos excipientes utilizados na formulação. O estudo de estresse inclui os efeitos causados pela variação da temperatura (alguns compostos degradam diante de temperaturas muito elevadas), radiação visível e ultravioleta; umidade (importante no caso de compostos higroscópicos); interação entre o ativo farmacêutico e excipientes da formulação; hidrólise; oxidação, fotólise; reações com o material de embalagem (3)

Não existe um padrão determinado para a realização dos estudos de degradação (10), a extensão da degradação obtida não é um parâmetro fixo e o ideal é que seja obtida degradação de extensão superior a 10%; que permita avaliar

a formação dos produtos de degradação (20). Seguem algumas das condições que geram a degradação de medicamentos e fármacos e que podem ser aplicadas nos estudos de estresse :

#### a) Hidrólise

As reações de hidrólise ocorrem na presença da água e sua intensidade irá depender da concentração de espécies catalíticas (geralmente ácidos ou bases) (21). As reações de hidrólise são afetadas pelo pH, sais tamponantes, força iônica, solventes e outros aditivos, tais como agentes complexantes, surfactantes e até mesmo excipientes (22).

#### b) Oxidação

A oxidação envolve a remoção de um átomo eletropositivo, radical ou elétron, ou a adição de um átomo eletronegativo ou radical (10). Essas reações envolvem a formação de radicais seguidas por uma fase de propagação e de finalização (22). As reações mais comuns são as de autooxidação (3).

#### c) Fotólise

A degradação fotolítica é aquela que resulta da exposição à luz ultravioleta (UV) ou visível e é iniciada após absorção da radiação eletromagnética. A absorção pode ocorrer em ondas curtas ou longas na faixa do UV e o período de exposição pode ser de horas a meses (19, 22). Normalmente ocorre a clivagem fotolítica e foto oxidação que envolvem a geração de um radical livre intermediário que degrada o produto (3, 21).

#### d) Degradação Térmica

As reações de degradação termolítica são aquelas que geralmente ocorrem devido à exposição ao calor ou a temperaturas elevadas (3). Sendo assim, qualquer mecanismo de degradação que é desencadeado por temperaturas elevadas pode ser considerado relacionado à via de degradação termolítica. Algumas reações de

hidrólise/desidratação, isomerização/epimerização, decarboxilação, polimerização e rearranjos encontram-se associadas a essa via de degradação (22).

#### 4.4 TÉCNICAS DE IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO

Diversas técnicas analíticas podem ser empregadas na identificação de um produto de degradação por meio da utilização de um mecanismo ortogonal. O mecanismo ortogonal envolve a aplicação de várias técnicas associadas que apresentam diferentes mecanismos de separação e seletividade a fim de garantir a fiel detecção do produto de degradação, minimizando, dessa forma, a possibilidade de resultados falsos (23).

Diante da necessidade de identificação do produto de degradação é necessário avaliar se esse representa alguma substância química conhecida e se há padrões dessa substância disponíveis. Uma vez constatada a inexistência de padrões químicos dessa impureza é necessária a obtenção de amostras suficiente desse produtos de degradação para efetuar os testes de isolamento e caracterização. Amostras de produtos de degradação podem ser obtidas a partir da submissão do ativo farmacêutico aos testes de estresse (6).

Diversos métodos que envolvem o emprego de técnicas cromatográficas e não cromatográficas podem ser utilizados no isolamento das impurezas de degradação. Entre os principais métodos utilizados podem ser citados método de extração em fase sólida, métodos de extração líquido-líquido, método de extração acelerada por solventes, método de extração com fluido super-crítico, coluna cromatográfica aberta (CC), cromatografia flash, cromatografia em camada delgada (CCD), cromatografia gasosa (CG), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), cromatografia em fluido supercrítico, eletroforese capilar (EC), ressonância paramagnética eletrônica (RPE), espectroscopia ultravioleta (UV), análise gravimétrica, cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM), espectroscopia no Infravermelho, espectroscopia de fluorescência. Após o isolamento dos produtos de degradação podem ser utilizadas técnicas de

caracterização que incluem a espectrometria de massa, espectrometria de ressonância magnética nuclear (RMN), espectrometria RAMAN entre outras (24).

Para avaliar impurezas em medicamentos é necessário possuir um procedimento analítico que seja capaz de separá-las umas das outras bem como quantificá-las. A melhor forma de caracterizar o lote de um fármaco é determinar sua pureza. As técnicas mais empregadas para avaliação da pureza dos medicamentos entre os anos de 1995-2001 foram o CLAE (53%), CG-EM (2%), cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao espectrômetro de massas (CLAE-EM) (8%), cromatografia micelar eletrocínética capilar (CMEC) (3%), CG (7%), cromatografia em camada delgada de elevada performance (CCDAE) (9%), EC (18%) (1).

#### 4.5 QUALIFICAÇÃO DE IMPUREZAS DE DEGRADAÇÃO

A qualificação de um produto de degradação é um procedimento que visa estabelecer a segurança da impureza avaliada em um ativo ou forma farmacêutica. Um produto de degradação é considerado qualificado quando se encontra presente no medicamento comercializado (sendo ele oriundo da forma farmacêutica ou não) em concentrações comparáveis àquelas que foram avaliadas em estudos clínicos que garantiram a segurança desse medicamento; em situações em que a quantidade encontrada é justificada por literatura científica; ou quando os níveis e critérios de aceitação propostos para impurezas foram adequadamente avaliados em ensaios toxicológicos (7, 25)

Os ensaios toxicológicos geralmente são constituídos por uma bateria de testes que incluem o ensaio para mutação gênica (ensaio de AMES), ensaio *in vitro* para avaliar danos cromossômicos (análise de metáfase) ou ensaio do linfoma de timidina quinase (TK) de camundongo, ensaios *in vivo* em eritrócitos de mamíferos e ensaios toxicológicos de doses repetidas de 14 a 90 dias (geralmente estudos de 28 dias com ratos) (26). Esses ensaios são úteis na avaliação da existência de impurezas de degradação que apresentam toxicidade significativa e/ou mutagenicidade, carcinogenicidade, genotoxicidade.

#### 4.5.1 Impurezas genotóxicas, carcinogênicas e mutagênicas

Impurezas genotóxicas (agente genotóxico) são substâncias químicas capazes de causar danos diretos ou indiretos ao ácido desoxirribonucleico (DNA), ou cromossomos provocando alterações na expressão genética (26). Normalmente as toxinas que causam danos ao DNA contêm grupos eletrofílicos (tais como os agentes alquilantes, epóxidos, dióis e etc) e podem ser encontradas em impurezas com perfil genotóxico (27). Esses compostos podem formar ligações covalentes com o DNA resultando na formação de adutos de DNA, estruturas que provocam danos ao material genético (28).

A genotoxicidade envolve danos físicos ou químicos sobre o material genético das células e pode implicar em mutagênese e em carcinogênese. Os agentes genotóxicos podem gerar uma dose resposta linear, ou seja, os danos provocados no DNA podem ser menores na presença de baixas concentrações de agentes genotóxicos e maiores na presença de concentrações mais elevadas (27).

Os termos genotóxico e mutagênese são freqüentemente utilizados como sinônimos; no entanto, existe uma leve distinção entre eles: enquanto “genotóxico” refere-se a qualquer dano mensurável ao DNA (diretos e indiretos), o termo “mutagênico” se refere a mudanças hereditárias na seqüência do DNA ou informações contidas em células somáticas e germinativas. Essas mudanças hereditárias são importantes no processo de carcinogênese (26).

Quanto aos carcinogênicos, podem ser classificados como: aqueles que causam danos diretos ao DNA por meio de seus metabólitos (carcinogênicos genotóxicos); aqueles que causam danos indiretos aumentando a susceptibilidade às mudanças genéticas, como por exemplo, estimulando a proliferação celular ou mediando processos inflamatórios (carcinogênicos não genotóxicos). Uma vez danificado o DNA, há três processos que podem ocorrer na célula: a morte celular pelo erro em si ou pela ativação da apoptose; o reconhecimento e reparo do dano; ou, mais raramente, a transmissão do dano para as células descendentes por falhas nos outros mecanismos(28).

#### 4.5.2 Classificação de compostos carcinogênicos

Os compostos podem ser classificados em 5 categorias quanto à carcinogenicidade segundo a *International Agency for Research on Cancer* (IARC) (quadro 1). Uma classificação é adotada pelo *Pharmaceutical Research and Manufacturing of America* (PhRMA) para as impurezas presentes em produtos farmacêuticos. O PhRMA estabelece 5 categorias para classificação de impurezas (Quadro 2) (17, 29-30).

Quadro 1 - Classificação carcinogênica de compostos químicos segundo a IARC.

CLASSIFICAÇÃO IARC	
GRUPO 1 Reconhecidamente cancerígenos em humanos	Evidências suficientes de carcinogenicidade em humanos e animais
GRUPO 2 A Provavelmente cancerígenos em humanos	Limitada evidência de carcinogenicidade em humanos e evidências suficientes de carcinogenicidade em animais
GRUPO 2B Possivelmente cancerígeno para humanos	Esta categoria é usada mais comumente quando a evidência de carcinogenicidade é limitada em humanos e em experimentos com animais
GRUPO 3 Condições não classificáveis quanto à carcinogenicidade em humanos	Esta categoria é usada mais comumente quando a evidência de carcinogenicidade é inadequada em humanos e inadequada ou limitada em experimentos com animais
GRUPO 4	O agente, mistura ou circunstância de exposição provavelmente não é carcinogênico para humanos

Fonte: IARC, 2011 (31)

Quadro 2- Classificação de impureza segundo o PhRMA.

CLASSIFICAÇÃO PhRMA	
Classe 1	Impurezas conhecidas pelo seu potencial genotóxico (mutagênico) e carcinogênico
Classe 2	Impurezas conhecidas por sua genotoxicidade (mutagenicidade), mas com potencial carcinogênico desconhecido
Classe 3	Impurezas genotóxicas com estrutura química alerta não relacionada à estrutura química do princípio ativo, ou seja, impurezas que possuem ao menos uma estrutura de alerta para mutagenicidade e carcinogenicidade, mas evidências experimentais insuficientes para dar suporte a este alerta
Classe 4	Impurezas com estrutura química alerta relacionada ao princípio ativo. Uma vez qualificado o princípio ativo, as impurezas também estarão qualificadas pelo mesmo teste realizado para princípio ativo
Classe 5	Impurezas que não apresentam estruturas químicas alertas ou que apresentem evidência suficiente para exclusão da genotoxicidade

Fonte: Dolan et al., 2005; Dobo *et al.*, 2006, Müller *et al.*, 2006 (17, 29-30)

#### 4.5.3 Ensaio toxicológicos utilizados na qualificação de produtos de degradação

Os principais ensaios de toxicidade são planejados para avaliar os efeitos tóxicos que uma substância química produz e fornecer dados que possam ser utilizados para avaliação do risco do uso dessas substâncias pelo homem, estabelecendo limites de segurança na exposição a esses agentes químicos (32).

Os estudos toxicológicos que podem ser utilizados na qualificação de impureza de degradação são os de toxicidade aguda; toxicidade sub-aguda, toxicidade sub-crônica; toxicidade crônica, mutagênese e carcinogênese, reprodução e teratogênese, e testes de tolerância local. Além desses, existem também os ensaios de ecotoxicidade que mensuram o risco do composto para o ecossistema e saúde ambiental e humana (33).

#### 4.5.3.1 Ensaio de ecotoxicidade

Esses ensaios possibilitam o estabelecimento de limites permissíveis de várias substâncias químicas para se proteger a vida aquática e a realização da avaliação do impacto momentâneo sobre a biota dos corpos hídricos por meio da avaliação da concentração efetiva capaz de provocar efeitos biológicos em 50% do grupo dos animais testados ( $CE_{50}$ ). Os organismos utilizados nesses ensaios toxicológicos e para os processos de classificação de risco ambiental são escolhidos entre aqueles de importância significativa na cadeia trófica aquática (33)

#### 4.5.3.2 Toxicidade aguda

O teste de toxicidade aguda é definido pelos efeitos adversos que ocorrem após a administração oral ou dérmica de uma única dose de uma substância, ou doses múltiplas, no prazo de 24 horas, ou uma exposição por inalação de 4 horas. Sua avaliação tem sido tradicionalmente baseada na dose letal média ( $DL_{50}$ ), uma estimativa de dose de uma substância capaz de matar 50% dos animais testados. A espécie preferida para o teste oral e de inalação é o rato, e para fins dérmicos, o rato ou coelho (34).

Administração oral é o meio mais comumente empregado nos testes de toxicidade aguda sistêmica. Esses testes são conduzidos, no mínimo, em duas espécies de mamíferos, incluindo uma espécie não roedora e deve contemplar grupos iguais de machos e fêmeas. O período de observação dos efeitos após a administração da dosagem é de normalmente 14 dias (35).

Os principais objetivos desse estudo são de avaliar a toxicidade intrínseca do agente químico, avaliar a suscetibilidade das espécies, indentificar órgãos alvo e obter informações para o delineamento e seleção dos níveis de dosagem para estudos mais prolongados (toxicidade crônica) (32).

#### 4.5.3.3 Toxicidade sub-aguda

Esse teste é aplicado com o objetivo de se obter informações sobre a substância química avaliada após exposições repetidas, durante um período curto da vida da espécie utilizada como teste. Esse ensaio pode fornecer informações sobre efeitos tóxicos após exposição repetida por intervalo limitado, órgãos suscetíveis a esses efeitos, mortalidade, efeitos reversíveis ou irreversíveis, estimativa da concentração administrada na qual é observada a ausência de efeitos e serve de subsídio para a condução dos estudos de toxicidade crônica. Normalmente esses ensaios são realizados com diferentes concentrações da substância administrada e em um período de 14, 28 e 90 dias (36-37).

#### 4.5.3.4 Toxicidade sub-crônica (curta duração)

Esse teste é aplicado a fim de serem obtidas informações sobre o efeito da substância química após exposições repetidas. O tempo de exposição deste estudo é de 1 a 3 meses. Para esse estudo são usadas 3 doses experimentais (mínima, intermediária e máxima), sendo que a dose máxima não deve produzir um índice de letalidade acima de 10% (para que não inviabilize as avaliações histopatológicas e bioquímicas) (32). Esses ensaios têm por objetivos definir a toxicidade qualitativa (órgãos alvos e natureza dos efeitos) e quantitativa (dose na qual são observados os efeitos do agente químico e na qual nenhum efeito é observado); fornecer margens terapêuticas e precauções necessárias para a condução de estudos clínicos posteriores; e levantar dados sobre dosagens que serão aplicados nos estudos de toxicidade crônica (32, 38).

#### 4.5.3.5 Toxicidade crônica (longo prazo)

Este estudo envolve período de exposição mais longo (2 anos ou mais) e ocupa boa parte da vida do animal (39). Não tem por objetivo a determinação da letalidade e utiliza 3 níveis de dose que são administradas pela via de uso prescrita. Segue o protocolo dos testes subcrônicos; no entanto, visa verificar os efeitos tóxicos que não são resultados dos estudos de toxicidade subcrônica e tem por objetivo determinar o mecanismo de ação tóxica das substâncias químicas (32).

#### 4.5.3.6 Testes de tolerância local

Os testes de Tolerância Local são aqueles realizados nos locais que entrarão em contato com a droga e também em locais que poderão entrar em contato acidentalmente ou devido à exposição inevitável ao produto (35). Entre esses testes, podem-se citar os testes de tolerância para vias específicas de administração como a via dérmica (testes de irritação cutânea e sensibilização dérmica) e teste de irritação ocular.

##### *4.5.3.6.1 Teste de irritação cutânea*

Esse teste prevê a utilização de coelhos albinos, com a pele tricotomizada sendo normalmente realizado na pele intacta e na pele após abrasão. As áreas de aplicação são recobertas com gaze fixada com fita adesiva durante 24 horas e as leituras são realizadas após 24 e 72 horas a fim de verificar o grau de eritema, edema, descamação, formação de cicatriz e outras lesões (35).

Os testes *in vitro* utilizados para avaliação de irritação da pele abrangem o teste em membrana, ensaio de citotoxicidade em células SIRC (linhagem celular derivada de córnea de coelho), ensaio de difusão em ágar, teste de hemólise e

desnaturação protéica RBC (Red Blood Cell), teste de irritação elétrica transcutânea (TER) e teste de pele humana reconstruída (EPSKINTM) (40)

#### 4.5.3.6.2 *Teste de irritação ocular*

Esse teste utiliza no mínimo 6 animais, sendo a substância teste instilada no saco conjuntival inferior de um olho de cada animal, mantendo as pálpebras fechadas por um segundo e abrindo-as em seguida. Os olhos não são lavados, permitindo que o próprio lacrimejamento promova a remoção. Os olhos não tratados servem como controle, sendo ambos examinados nos tempos de 1 hora, 24 horas (momento em os olhos tratados são lavados com solução salina a 0,9%), 48 e 72 horas após a instilação. No caso de persistirem reações positivas, as avaliações poderão prosseguir, no geral até sete dias. As reações observadas em cada animal são quantificadas (40). Para o teste de tolerância ocular de dose repetida (normalmente realizado em coelhos com administração diária da substância durante quatro semanas), o desenho deve considerar os resultados da tolerância ocular de dose única (35).

Os ensaios *in vitro* normalmente utilizam o teste de membrana cório-alantoide do ovo de galinha (HET-CAM) e ensaio de permeabilidade e opacidade corneal bovina (BCOP) (40).

#### 4.5.3.6.3 *Teste de sensibilização dérmica*

No teste de sensibilização dérmica, a substância-teste é injetada intradermicamente como emulsão em solução aquosa de cloreto de sódio a 0,9%. Dois grupos de 20 cobaias são utilizados para cada substância-teste, sendo um deles como controle. A injeção intradérmica da amostra é aplicada na região dorsal tricotomizada, repetindo-se a mesma dose, na mesma região da primeira aplicação, a cada 2 dias até completar 10 injeções, ao longo de três semanas. No 35º dia o desafio final é feito no sítio de pele correspondente ao da primeira injeção.

Animais-controle são simultaneamente tratados somente com diluente, sendo este injetado intradermicamente (0,05 mL) para comparação dos resultados dos animais tratados com a substância-teste. Ao final do teste a incidência da resposta eritematosa é avaliada. Para os ensaios *in vitro* é utilizado o teste de RBC que fornece parâmetros referentes à relação entre a hemólise e oxidação da hemoglobina (40)

#### 4.5.3.7 Carcinogênese

Os estudos de carcinogenicidade têm por objetivo identificar um carcinogênico potencial para animais e avaliar o risco em humanos, definindo a classificação carcinogênica do agente testado, a relação estrutura-atividade da substância química e riscos cancerígenos, bem como observar o possível desenvolvimento de lesões neoplásicas nos estudos de toxicidade de dose repetida e toxicidade em longo prazo (41).

Esse estudo é conduzido utilizando pelo menos duas espécies de animais de laboratório em grupos de no mínimo 50 animais de ambos os sexos que são submetidos à necropsia ao final do experimento. O estudo possui duração máxima de 130 semanas em ratos, 120 semanas em camundongos e 130 semanas em hamsters. No estudo são administradas no mínimo 2 doses da substância. Por meio desse ensaio é possível estabelecer a dose máxima tolerada (DMT), definida como aquela que não provoca no animal uma perda de peso superior a 10% e não induz mortalidade ou sinais clínicos de toxicidade (32).

#### 4.5.3.8 Ensaio de teratogenicidade e toxicidade reprodutiva

A toxicidade reprodutiva inclui os efeitos tóxicos de uma substância sobre a capacidade reprodutiva de um organismo e o desenvolvimento de sua prole (34). O objetivo dos estudos de toxicidade reprodutiva é revelar algum efeito de uma ou mais substâncias ativas na reprodução de mamíferos. Assim, investigações e

interpretações dos resultados devem ser relacionadas com outros dados farmacológicos e toxicológicos disponíveis, para determinar situações em que riscos potenciais para a reprodução humana são maiores, menores ou iguais àqueles relativos a outras manifestações toxicológicas (35).

A avaliação do efeito teratogênico de um composto químico é executada em 3 fases distintas. Na primeira fase é realizado o tratamento de animais machos e fêmeas por no mínimo 60 dias antes do acasalamento e depois para as fêmeas no período de lactação e gestação, realizando o sacrifício de metade do grupo de fêmeas na metade da gravidez a fim de avaliar anormalidades uterinas. Ao final dessa etapa são observados o número, sexo, peso corpóreo e anormalidades externas em todos os filhotes. Na segunda etapa são coletadas informações a partir da administração de doses diárias da substância química na dieta de animais fêmeas grávidas no período da organogênese. Os estudos da terceira fase avaliam os efeitos da substância sobre o desenvolvimento peri e pós natal sendo avaliado o desenvolvimento somático, neuromotor, sensorial e comportamental da prole (32).

#### 4.5.3.9 Ensaios de mutagênese

Os ensaios de mutagenicidade são responsáveis por avaliar a capacidade que as substâncias químicas apresentam de provocar modificações no material genético das células que são transmitidas às novas células durante a divisão. São empregados testes *in vitro* e *in vivo*. Os ensaios aplicados são: ensaio de mutação bacteriana (Teste de Ames), teste de aberração cromossômica *in vitro*, teste de mutação genética *in vitro* de linfoma TK de rato e teste de micronúcleo em eritrócitos de mamíferos *in vivo* e ensaio cometa.

##### 4.5.3.9.1 Ensaio de mutação bacteriana (Teste de Ames)

O ensaio de Ames é um teste de mutagenicidade capaz de detectar uma série de substâncias químicas que podem produzir danos genéticos que levam a

mutações gênicas (42-43). Para esse teste é recomendada a utilização de linhagens de *Salmonella typhimurium* para detectar mudanças nos sítios de guanina-citosina (G-C) como TA1535, TA1537 (ou TA97, ou TA97a), TA98 e TA100. Para detecção de pontos de mutação nos sítios de adenina-timina (A-T) devem ser utilizadas a *Salmonella typhimurium* TA 102, *Escherichia coli* WP2uvRA ou *Escherichia coli* WP2 uvRA( pkM/01) (35).

As cepas de bactérias utilizadas apresentam mutações preexistentes que tornam a bactéria incapaz de sintetizar o aminoácido histidina essencial para o crescimento e formação de colônias bacterianas. Novas mutações próximas aos genes já mutantes dessas bactérias podem restaurar a função genética da bactéria e permitir que a célula sintetize a histidina. Com isso, as células que sofreram mutações posteriores podem crescer na ausência de histidina e formar colônias. Dessa forma, esse teste é comumente conhecido como “ensaio de reversão” (43).

O ensaio consiste na exposição de cepas mutantes, incapazes de sintetizar histidina, ao agente químico avaliado; diante da mutação, essas colônias resgatariam o potencial de sintetizar o aminoácido histidina. Essas cepas bacterianas são dispostas em placas de ágar e glicose com um sistema metabólico de ativação (43), que consiste na fração microsomal de células hepáticas de rato com os fatores NADP (fosfato de nicotinamida adenina dinucleotídeo) e cofatores NADPH (fosfato reduzido de nicotinamida adenina dinucleotídeo) esse kit de ativação é denominado de Mix S9 (43).

Muitos agentes químicos não são carcinogênicos e mutagênicos, enquanto seus metabólitos são. Por isso, é necessária a utilização do Mix S9, uma vez que esse composto é capaz de metabolizar vários agentes químicos em metabólitos que reagem com o DNA, sendo também, necessário para o teste aplicado, uma vez que as bactérias não possuem essa capacidade metabólica (43).

O resultado final desse teste é a contagem de colônias e a expressão dos resultados em número de colônias revertidas por placa. Esse número é comparado com o controle negativo (colônias não tratadas com o agente químico) (43). A partir dos resultados obtidos, é avaliado o potencial mutagênico do agente químico testado, onde resultados positivos são verificados em placas que apresentaram um elevado índice de colônias revertidas.

#### 4.5.3.9.2 *Teste de aberração cromossômica in vitro*

O propósito do teste de aberração cromossômica *in vitro* é a capacidade de identificar agentes que causam alterações estruturais cromossômicas em células de mamífero. As alterações cromossômicas podem ser de dois tipos, no cromossomo ou na cromátide. As alterações cromossômicas são a causa de várias doenças genéticas em humanos e estão relacionadas à indução do câncer em humanos e em modelos experimentais animais (44).

Esse teste é utilizado para avaliar possíveis agentes mutagênicos e carcinogênicos em mamíferos. Muitos compostos que apresentam resultados positivos para esse teste são carcinogênicos em mamíferos e essa correlação é dependente do grupo químico a qual pertence à substância objeto de avaliação experimental (44).

Para este teste é utilizada cultura de células de mamíferos (fibroblastos de hamster chinês, linfócitos periféricos humanos ou de outros mamíferos) exposta à substância química a ser avaliada quanto à toxicidade. Após a exposição da cultura de células à substância química de interesse, as células são tratadas com um agente antimitótico (ex: colchicina), e posteriormente colhidas, coradas sendo verificadas microscopicamente alterações cromossômicas nas células em metáfase (44).

Um aumento no número de células poliploides pode indicar que a substância tem o potencial de interferir com os processos de mitose e de induzir alterações cromossômicas numérica; um aumento no número de células com cromossomos endoreduplicados pode indicar que a substância tem o potencial de inibir a progressão do ciclo celular (44).

No entanto, existem várias condições em que resultados positivos para alterações cromossômicas podem ser uma consequência das condições do ensaio ao invés do indicativo de clastogenicidade da substância química testada. Por isso é necessário avaliar o comportamento da substância química testada em outros ensaios de genotoxicidade antes de concluir que a substância, de fato, apresenta ou não perfil genotóxico (44).

#### 4.5.3.9.3 Teste de mutação genética *in vitro* de linfoma TK de Rato

O ensaio de mutação *in vitro* de linfoma de timidina quinase (TK) utiliza a linhagem de células L5178Y TK<sup>+/-</sup> 3.7.2.C do linfoma de rato e é capaz de detectar mutações no gene da timidina quinase. Esse teste é usado para avaliar alterações genéticas relacionadas ao surgimento do câncer, pois detecta mutações e eventos cromossômicos tais como deleções, translocações, recombinações mitóticas, conversões gênicas e aneuploidias (45).

Para melhor compreensão do teste, é necessário descrever o papel do nucleotídeo monofosfato de timidina (TMP) e da enzima timidina quinase. O TMP ocupa importante posição na replicação do DNA atuando como regulador de sua síntese; dessa forma, quando esse nucleotídeo é substituído por outro análogo letal de pirimidina, a célula morre. A enzima TK, por sua vez, é responsável pela fosforilação da timidina em TMP(45).

Células mutantes para o gene da TK são deficientes na enzima de timidina quinase e resistentes aos efeitos citostáticos da trifluorotimidina (TFT), um análogo letal de pirimidina. Essas células deficientes para a enzima TK são incapazes de metabolizar o TFT e com isso não sofrem seus efeitos tóxicos. Em células normais, que apresentam o gene da timidina quinase, e conseqüentemente a enzima TK, o TFT é metabolizado e provoca a inibição do metabolismo e da divisão celular levando a morte da célula. Dessa forma, enquanto as células normais são incapazes de se proliferar em presença do TFT, as células mutantes se multiplicam normalmente na presença desse composto (45).

No ensaio de mutação *in vitro* que utiliza a linhagem de células L5178Y (TK<sup>+/+</sup> ou TK<sup>+/-</sup>), as células são tratadas com o agente químico teste e após um período de exposição, essas células são colocadas em meio contendo o análogo letal TFT. Apenas as células mutantes TK<sup>-/-</sup> são capazes de sobreviver a essas condições e a mutagenicidade da substância química testada se torna evidente pelo aumento do número de células mutantes (46).

Para o teste, devem ser usados controles positivos e negativos na presença e na ausência do metabólito de ativação Mix S9. Ao final do experimento, são verificadas as culturas de células que expressaram o fenótipo mutante. Dados avaliados incluem determinação de citotoxicidade, eficiência de plaqueamento,

contagem de colônias e frequência de mutações em culturas de células tratadas e controle (45).

A toxicidade do agente teste é indicada por uma diminuição na eficiência de formação de colônias [onde a eficiência é definida pelo número de colônias/número de células plaqueadas %]. A mutagenicidade do agente testado será evidente pelo aumento na frequência de mutação, com base no número de mutantes e ajustado pela fração de células sobreviventes (45).

A formação de grande quantidade de pequenas colônias constitui um indício de quebras cromossômicas, ou seja, indicam a clastogenicidade do composto avaliado. Um agente teste que não produz um aumento estatisticamente significativo de mutantes será considerado não genotóxico.

#### 4.5.3.9.4 *Teste de micronúcleo em eritrócitos de mamíferos in vivo*

Micronúcleos são pequenos corpos contendo DNA e localizados no citoplasma, que aparecem na telófase e são resultantes de fragmentos cromossômicos acêntricos originados de quebras isocromatídicas, cromatídicas ou de disfunções do fuso mitótico. A incidência de micronúcleos serve como um índice de danos genéticos, pois surgem a partir de dois importantes tipos de danos genéticos (clastogênese e ruptura do eixo) (47).

Praticamente, todos os agentes clastogênicos induzem a formação de micronúcleos. Logo, esse teste tem sido amplamente utilizado na triagem de agentes químicos que causam esse tipo de dano. O teste de micronúcleo em eritrócitos de mamíferos é utilizado para detecção de agressões induzidas pelo agente químico testado sobre os cromossomas ou no aparelho mitótico de eritroblastos, onde um aumento na frequência de micronúcleos nos eritroblastos é uma forte indicação do dano provocado (47).

Neste teste, os animais (ratos, camundongos) são expostos ao agente químico teste administrado pela rota apropriada e sacrificados posteriormente. Para alvo de avaliação da ação do agente químico testado, pode ser utilizada a medula óssea dos animais ou o sangue periférico. Para cada análise são utilizados controles positivos (animais tratados com agente químicos mutagênicos) e controles negativos

(animais tratados com solventes e ou veículos). Os controles positivos são aqueles capazes de levar a formação de micronúcleos *in vivo* em níveis estatisticamente significativos (47).

Um resultado positivo no teste do micronúcleo indica que a substância provoca danos nos cromossomos ou no aparelho mitótico dos eritroblastos do agente químico teste, ao passo que um resultado negativo demonstra o contrário (47).

#### 4.5.3.10 Ensaio cometa

Esse ensaio permite identificar lesões e detectar os efeitos do reparo no DNA em células individualizadas de mamíferos. Nesse teste, as células são submetidas a uma corrente elétrica que proporciona a migração dos segmentos de DNA livres, resultantes de quebras, para fora do núcleo. Após a eletroforese, as células que apresentam um núcleo redondo são identificadas como normais, sem dano detectável no DNA e as células lesadas são identificadas visualmente por uma espécie de cauda, similar a um cometa, formada pelos fragmentos de DNA (48)

#### 4.5.4 Limitações dos Ensaio de Genotoxicidade

Um único teste não é capaz de detectar todas as substâncias de relevância genotóxica, por possuírem limitações específicas de cada teste. No teste *in vitro* de Ames, os agentes químicos quando testados em doses elevadas e tóxicas podem induzir ao “falso positivo”, ao passo que uma dose distante do limiar tóxico pode levar à ausência de detecção de um agente genotóxico. Para avaliar a genotoxicidade de um composto não citotóxico, a concentração utilizada é de 5 mg/placa e 10 mM para culturas de células bacterianas e de mamíferos, respectivamente; no entanto, nem sempre essa concentração será suficiente para detectar uma agente genotóxico (49).

Algumas situações podem exigir alterações na bateria de testes de genotoxicidade realizados. Essas situações são aplicadas para compostos muito

tóxicos onde é necessário realizar os ensaios *in vitro* em células de mamífero de duas categorias distintas, sendo que os parâmetros a serem avaliados incluem mutação gênica e danos cromossômicos; para compostos que apresentam alertas estruturais para genotoxicidade e que apresentaram resultados negativos na bateria de testes genotóxicos, devem ser realizados ensaios adicionais com protocolos modificados; para compostos que não possuem absorção sistêmica e com isso não estão disponíveis no tecido de interesse devem ser realizados apenas os ensaios *in vitro*, o que deve incluir o teste de mutação gênica bacteriana e dois ensaios *in vitro* em células de mamífero de categorias distintas, e com dois parâmetros de avaliação para genotoxicidade e para compostos químicos estruturalmente únicos e completamente novos que são introduzidos em um ativo farmacêutico e que não são objeto de ensaio de carcinogenicidade crônica em roedores, é necessário realizar testes adicionais de genotoxicidade *in vitro* e *in vivo* (49).

#### 4.6 ESTRUTURAS-ALERTA DE GENOTOXICIDADE E PROGRAMAS COMPUTACIONAIS E BASE DE DADOS UTILIZADOS NA PESQUISA E IDENTIFICAÇÃO.

As estruturas-alerta para genotoxicidade podem ser avaliadas por meio de diversos programas computacionais. A maioria das companhias farmacêuticas utiliza esses programas juntamente com outros ensaios próprios para prever a genotoxicidade de uma série de compostos (50).

Esses programas que utilizam ferramentas de toxicologia para avaliar os efeitos tóxicos de compostos muito antes de sintetizá-los e ou testá-los são conhecidos por técnicas "*in silico*". Vários programas que utilizam dessa técnica estão disponíveis no mercado como pode ser avaliado no trabalho de Muster *et. al.*, 2008 (51).

Entre os programas descritos, os mais usados são:

*Deductive Estimation of Risk from Existing Knowledge* (DEREK) - Esse programa foi criado pela Empresa Lhasa Ltd e permite estimar se um agente reativo ao DNA, ou

seja, um agente genotóxico, mutagênico, ou provocador de danos cromossomais está presente na estrutura do agente testado. O DEREK reconhece as estruturas alerta para genotoxicidade presentes no agente testado, o tipo de ensaio utilizado para avaliar esse alerta (ensaio de mutagenicidade em bactérias, ensaios citogenéticos *in vitro*) e fornece as referências bibliográficas sobre o assunto (51).

*Multiple Computer Automated Structure Evaluation (MCASE)* - O modelo organizacional é baseado em dados de mutagenicidade bacteriana realizada sobre 2032 compostos e o atual modelo se baseia na avaliação de dados de 3000 compostos incluindo dados avaliados em *Drosophilas*. Esse programa é capaz de dissociar moléculas do agente testado em 2-10 fragmentos e avaliar a força de associação desses fragmentos, comparando-os com fragmentos semelhantes existentes em sua base de dados que apresentam uma determinada pontuação mutagênica. O programa gera uma previsão quantitativa de mutagenicidade. Esse programa tem o mesmo princípio de funcionamento que o programa *Computer Automated Structure Evaluation for Toxicology (CASETUX)* (51).

*Toxicity Prediction by Komputer Assisted Technology (TOPKAT)* - Esse programa utiliza descritores específicos ao invés de estruturas químicas para prever a mutagenicidade dos compostos químicos testados. O TOPKAT é um programa que possui dados obtidos a partir do teste de mutagenicidade em bactérias e avalia a similaridade entre a molécula teste com as moléculas existentes em seu banco de dados, excluindo aquelas que não apresentam evidências significativas para mutagenicidade (51).

*Quantitative structure-activity relationship (QSAR)* - Os modelos QSAR utilizam logaritmos a fim de alcançar um valor preditivo para genotoxicidade. A maioria dos programas QSAR utiliza dados obtidos a partir de ensaios em bactérias; no entanto, existem também modelos preditivos que utilizam dados obtidos a partir de testes de aberração cromossômica (51).

A maioria dos métodos é utilizada de forma conjunta a fim de aumentar a especificidade na avaliação da genotoxicidade dos agentes testados. Exemplificando, os programas CASETUX, TOPKAT e DEREK apresentam

especificidade de 78 a 82% quando usados de forma isolada, mas de 92 a 100% quando utilizados em conjunto (50).

Além desses programas, existem bases de dados úteis na avaliação dos produtos de degradação. As propriedades genotóxicas e carcinogênicas de várias substâncias podem ser encontradas também em bases de dados como Toxicological data Network (TOXNET) (52), Nacional Institute for Occupational Safety & Health (NIOSH) (53), GES-TIS (54), Discovery Gate (Symx) e Pharmapendium (54-55).

## 5 MÉTODOS

Para a condução deste trabalho foi realizada nesse trabalho uma abordagem qualitativa exploratória descritiva ou comparativa por meio da técnica de análise documental que se procedeu da seguinte forma:

### 5.1 DESCRIÇÃO DAS PRINCIPAIS NORMAS E GUIAS NACIONAIS E INTERNACIONAIS QUE AVALIAM PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO

Essa etapa inicial da pesquisa englobou um estudo documental dos guias e normas regulatórias adotados por agências reguladoras internacionais representativas, que contemplam o assunto “produtos de degradação”, a saber: Organização Mundial de Saúde (OMS), Comunidade Europeia, representados pela *European Medicines Agency* (EMA); Estados Unidos da América, representados pela autoridade sanitária *Food and Drug Administration* (FDA); autoridade sanitária do Canadá (*HEALTH CANADA*); autoridade sanitária australiana, representada pela *Therapeutic Goods Administration* (TGA); bloco econômico dos países Asiáticos (ASEAN); países dos estados árabes do Golfo, representados pelo *Cooperation Council for The Arab States of the Gulf* (GCC); Brasil, representado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA); autoridade Sanitária da África do Sul, representada pelo *Medicine Control Council* (MCC).

Após a definição das agências, foram selecionadas, a título ilustrativo, as normas desses grupos que apresentavam o tema “estabilidade de ativos e formas farmacêuticas”, com ênfase no tópico “degradação”, bem como os guias e normas que abordavam o tema “segurança” aplicável às “impurezas de degradação”, a fim de demonstrar a abordagem dessa temática no universo global de regulação.

## 5.2 ELABORAÇÃO DE MONOGRAFIA PARA SISTEMATIZAÇÃO DE INFORMAÇÕES EM DEGRADAÇÃO

Nessa fase, propositiva, as informações coletadas sobre a abordagem regulatória aplicada para produtos descritos no item anterior e informações descritas na literatura sobre o tema “degradação” foram utilizadas na elaboração de um modelo de monografia para sistematização de informações sobre produtos de degradação.

Para tal, foi realizado um estudo exploratório com a técnica de avaliação documental. Foi realizada uma revisão dos guias e normas que contemplavam o assunto “degradação”, em guias do ICH, ANVISA, EMA e FDA. Além desses guias, outros itens necessários para a construção do modelo de monografia foram pesquisados na literatura científica.

## 5.3 ELABORAÇÃO DE MONOGRAFIA PARA O ATIVO FARMACÊUTICO ÁCIDO ASCÓRBICO

Para validação do modelo proposto, foi elaborada uma monografia para o ativo farmacêutico “ácido ascórbico” ou “vitamina C”. Esse ativo foi escolhido em função do seu uso disseminado em todos os estratos da população, desde neonatos, grávidas a idosos (55); por estar presente em uma série de formas farmacêuticas que são comercializadas sem restrição médica; por ser utilizado na prática de automedicação, e por ser considerado, de forma geral, “inócuo (56).

Para preenchimento das informações solicitadas no modelo, foi feita a análise de dados provenientes de fontes primárias (periódicos, livros publicados na área específica, farmacopeias oficiais no Brasil, legislações regulatórias) e secundárias (como o Medline-Pubmed, Science Direct, Scifinder, Micromedex, Toxnet, Google acadêmico, bases de dados Drug Degradation Database, ChemIdplus Advanced e; bases regulatórias de agências reguladoras).

Os termos utilizados nas buscas foram “vitamina c”, “ácido ascórbico”, “degradação vitamina C”, “degradação ácido ascórbico”, “produtos de degradação

vitamina C”, “produtos de degradação ácido ascórbico”, “estabilidade vitamina C”, “estabilidade ácido ascórbico”. Após a definição dos produtos de degradação encontrados para esse ativo, foi selecionado, para fins de preenchimento das informações de segurança, aquele que foi considerado um produtos de degradação expressivo, ou seja, entre os diversos produtos de degradação formados em um ensaio de estresse específico, este seria o produto de degradação presente em maior quantidade, que apresentaria dados toxicológicos reportados e relevância toxicológica (dose letal significativa, evidências de mutagenicidade e/ou carcinogenicidade e ou teratogenicidade). Dessa forma, dentre os produtos de degradações avaliados para o ácido ascórbico, foi considerado o furfural como objeto de escolha para a validação da proposta de monografia. Para o preenchimento das informações de segurança e eficácia foi utilizado o seguinte sistema de pesquisa: “furfural + toxicologia” ou apenas “furfural”. A pesquisa foi realizada utilizando os termos chaves em português e em inglês.

Todos os artigos utilizados foram obtidos por revisão realizada nas bases de dados citadas. Quando esses artigos encontravam-se indisponíveis, eram adquiridos por meio de sistema de fotocópia legal, conforme os sistemas normativos de bibliotecas. Os poucos artigos que não puderam ser obtidos na íntegra foram citados apenas quanto ao conteúdo dos seus resumos obtidos na revisão. Todos os livros avaliados foram obtidos na íntegra e encontram-se na lista de referências.

A proposta de monografia foi submetida a um avaliador externo, ocupante do cargo público de especialista em Regulação e Vigilância Sanitária da área responsável por registros de medicamento da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, a fim de verificar a aplicabilidade da mesma e a fim de apontar possíveis campos necessários a serem incluídos na mesma. Não foi sugerida a inclusão de nenhum campo adicional.

#### 5.4 LEVANTAMENTO DE FORMAS FARMACÊUTICAS REGISTRADAS COM O ATIVO ÁCIDO ASCÓRBICO NA AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA

Para a condução dessa etapa, foram realizadas pesquisa e análise documental exploratória retrospectiva, utilizando abordagem qualitativa, com

levantamento dos medicamentos registrados contendo o princípio ativo “ácido ascórbico”. O estudo foi realizado com dados primários obtidos no site eletrônico da Anvisa (<http://www.anvisa.gov.br>) , por meio do tópico “consulta de produtos”, posteriormente “consulta de banco de dados”, “medicamentos e homoderivados”, “consulta com dados atualizados até 25/03/2002”. O formulário disponível para consulta intitulado “*critérios para consulta*”, teve o campo “*princípio ativo*” preenchido com o nome do insumo pesquisado “ *ácido ascórbico*” e “ *ácido ascórbico 90%*”.

A coleta de dados sobre medicamentos registrados contendo o ácido ascórbico na condição apresentou data de corte de dezembro de 2011. A amostra foi composta de todos os medicamentos que em algum momento obtiveram registro até essa data, independente da vigência desses registros. Esses medicamentos foram classificados quanto à forma farmacêutica e classe terapêutica.

## 6 RESULTADOS

### 6.1 NORMAS E GUIAS NACIONAIS E INTERNACIONAIS QUE AVALIAM PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO

As cópias de guias e legislações que abordam o tema “produtos de degradação” foram obtidas das agências OMS; EMA, FDA, HEALTH CANADA, TGA [representados pelos guias do *International Conference on Harmonisation (ICH)*]; ASEAN; GCC; ANVISA e MCC.

#### 6.1.1 Guias utilizados autoridades sanitárias da Comunidade Europeia, Canadá, Estados Unidos, Austrália e Japão

##### 6.1.1.1 Guia do *International Conference on Harmonisation (ICH)*

Dentre os guias existentes destacam-se os do ICH Q3B (R2) (7), que aborda diretamente o assunto produtos de degradação em medicamentos, e o ICH Q3A (R2) (57) que aborda produtos de degradação em fármacos. Temática relacionada é contemplada de forma complementar nos guias Q1A (R2) (58), que trata da estabilidade em fármacos e medicamentos; Q1B, que aborda a fotoestabilidade em fármacos e medicamentos (59); Q1C que aborda a estabilidade em novas dosagens; e Q1E (60), que contempla a avaliação de dados de estabilidade em fármacos e medicamentos existentes.

Esses guias são adotados, pelas autoridades sanitárias EMA, HEALTH CANADA, TGA, FDA e é referência para os guias das autoridades sanitária ASEAN, GCC, MCC.

Os guias Q3A(R2) e Q3B(R2), que tratam da avaliação de impurezas em fármacos e formas farmacêuticas, respectivamente, definem o termo “impurezas” como qualquer componente presente na forma farmacêutica ou fármaco que seja quimicamente distinto do princípio ativo ou de qualquer excipiente (no caso de

formas farmacêuticas). Esses guias preconizam que a depender da quantidade do ativo a ser consumido em fármacos ou formas farmacêuticas, devem ser observados os limites para a notificação, a identificação e de qualificação das impurezas presentes (26).

O limite de notificação é aquele no qual qualquer valor acima da dose máxima diária para um determinado produto de degradação deverá ser reportado, ao passo que o limite de identificação é aquele no qual o valor acima da dose máxima diária recomendada para um produto de degradação gera a necessidade da sua identificação e o limite de qualificação é o valor acima da dose máxima diária para um produto de degradação no qual ele deverá ser qualificado (7). O Quadro 3 traz os limites adotados para notificação, identificação e qualificação de impurezas em medicamentos:

Quadro 3 - Limites para notificação, identificação e qualificação dos produtos de degradação presentes em medicamentos:

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

Onde:

<sup>1</sup>Quantidade máxima do fármaco administrado por dia.

<sup>2</sup>Limites dos produtos de degradação são expressos como a percentagem do fármaco ou como a ingestão total diária (ITD) de um produto de degradação.

<sup>3</sup>Limites acima dos valores definidos deverão ser justificados cientificamente.

Fonte: Adaptado de ICH, 2006 (7).

Quando uma impureza alcança níveis consideráveis no medicamento ou fármaco, a ponto de configurar a necessidade de qualificação, é de responsabilidade da equipe de desenvolvimento da empresa farmacêutica estabelecer um limite considerado seguro para a concentração da impureza presente. O guia do ICH Q3 A (R2) considera que uma impureza é considerada qualificada quando presente em um determinado fármaco que foi adequadamente testado em estudos clínicos, garantindo sua segurança (26).

Diretrizes semelhantes são estabelecidas pelo guia do ICH Q3 B (R2) que aborda conceitos e limites para as impurezas presentes em medicamentos denominadas produtos de degradação. Estes produtos de degradação são resultantes da degradação do princípio ativo ou da reação deste com excipientes e de materiais de embalagem. O guia, no entanto, não trata de impurezas resultantes da degradação dos excipientes, produtos biofarmacêuticos, de origem animal, produtos de fermentação, fitoterápicos, peptídeos, radiofármacos, oligonucleotídeos, produtos em desenvolvimento utilizados em ensaios clínicos, impurezas enantioméricas e formas polimórficas (26). Este guia também não se aplica para a avaliação de impurezas genotóxicas ou carcinogênicas (61).

Assim como é feito para a qualificação de impurezas presentes no fármaco abordado pelo guia Q3A (R2), o guia Q3B (R2) também considera qualificado um produto de degradação quando este se encontra presente no medicamento comercializado em concentrações comparáveis àquelas que foram avaliadas em estudos clínicos que garantiram a segurança desse medicamento (7, 57).

Ambos os guias ICH Q3A (R2) e Q3B (R2) informam que, caso a concentração de impurezas no fármaco ou medicamento excedam os limites de qualificação, deve-se buscar reduzir sua concentração ou proceder a qualificação mediante dados de literatura científica ou através de dados experimentais (estudos toxicológicos) que confirmem os níveis seguros dessas (7, 57).

Para determinar o perfil de um produto de degradação pode ser necessária a avaliação de dados da literatura científica e, em muitas situações, a condução de estudos de segurança (quando o produto de degradação apresentar efeito farmacológico relevante) (6). A norma do ICH preconiza que pode não ser necessário examinar especificamente alguns produtos de degradação quando for demonstrado que eles não são formados nos estudos de estabilidade acelerados ou de longa duração (7). A Figura 1 mostra decisões a serem tomadas na existência de produtos de degradação em medicamentos.

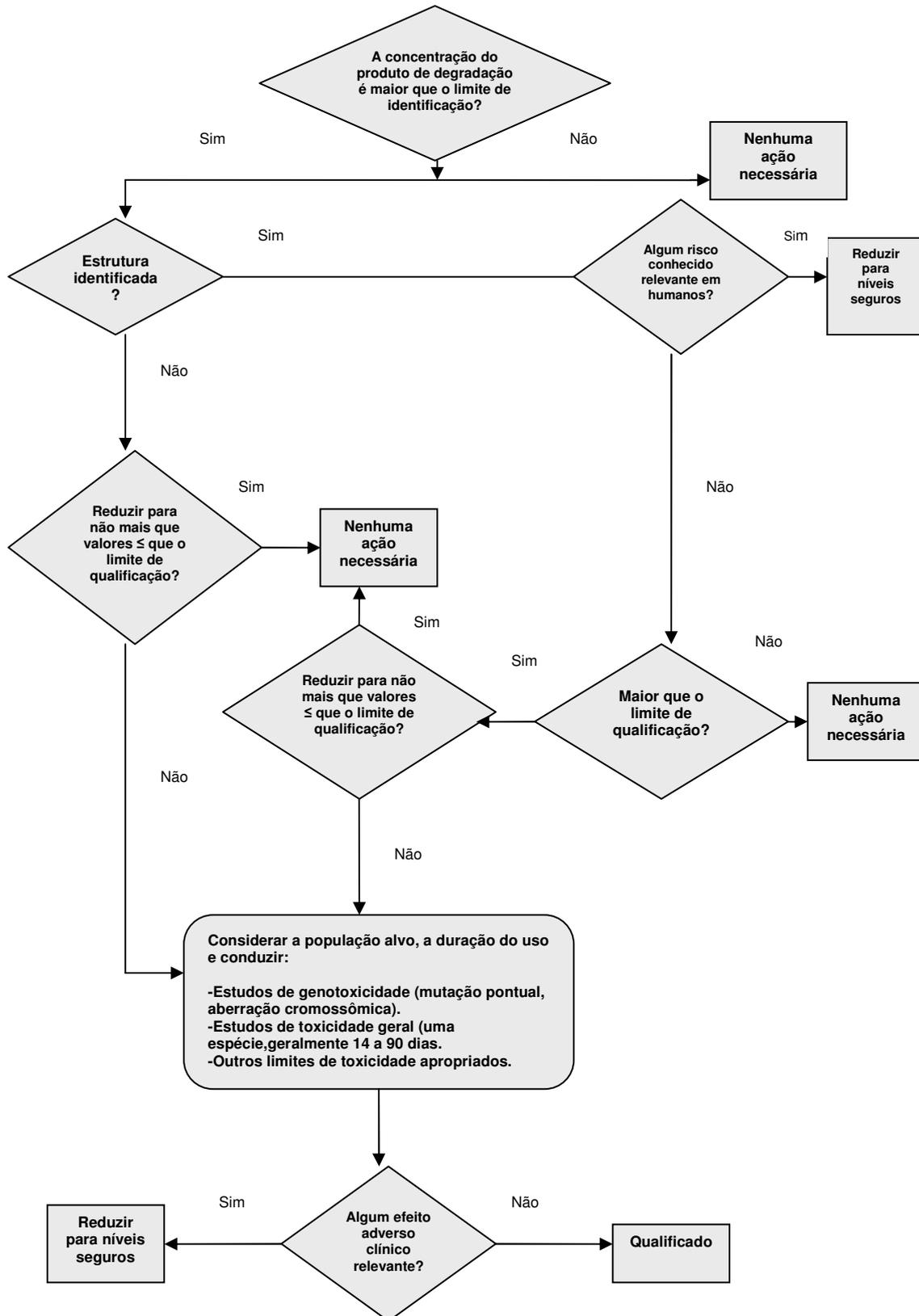


Figura 1- Árvore decisória para produtos de degradação em medicamentos.  
Fonte: Adaptado de ICH, 2006 (7).

### 6.1.1.2 Guia de impurezas genotóxicas da Comunidade Europeia

Diante da detecção de uma impureza de degradação de caráter genotóxico o Guia da EMA (62) considera os possíveis mecanismos de ação e sua relação dose resposta. Baseado nesse mecanismo, esses guias dividem as impurezas genotóxicas em duas classes: aquelas que apresentam evidência experimental para um mecanismo definido de genotoxicidade e aquelas que não a apresentam evidências suficientes.

Para as impurezas que apresentam evidência de mecanismo definido de genotoxicidade é possível estabelecer um nível de exposição para o qual existe risco de genotoxicidade bem como limites de exposição diária permitida (PDE) que é derivado do NOAEL (maior dose em que não se observa efeito tóxico) ou do LOAEL (maior dose em que um menor nível de efeito tóxico é observado) (63). Para aquelas que não apresentam evidências suficientes para um mecanismo definido de genotoxicidade é necessário realizar avaliações farmacêuticas e toxicológicas a fim de se estabelecer um nível de exposição. Em geral, a avaliação farmacêutica deve ser orientada por uma política de controle dos compostos para “valores mais baixos razoavelmente praticáveis (ALARP)”, quando não for possível evitá-los (62). Quando existir a possibilidade de evitá-los deverão ser adotadas ações como alteração da rota de síntese, materiais de partida, cuidados relacionados a fabricação e armazenamento entre outras medidas que garantam a eliminação de traços dessa impureza no produto final.

No entanto, nem sempre é possível realizar essa avaliação quantitativa para todas as substâncias e muito menos definir qual mecanismo de genotoxicidade é aplicável para as impurezas que estão sendo avaliadas. Neste sentido, o guia da EMA que aborda o limite de impurezas genotóxicas propôs o conceito de “limite de toxicidade de impurezas genotóxicas” (TTC) (62, 64).

O TTC é a dose ( $\mu\text{g}$  /dia) de uma substância química não conhecida na qual a probabilidade de incidência de um risco de neoplasia é considerado insignificante (62). O valor estimado para o TTC é de 0,5 ppb (equivalente a 1,5  $\mu\text{g}$  /pessoa/dia) ou (0,025  $\mu\text{g}$  /kg/dia) (17). Esse valor (0,5 ppb) corresponde a um risco de  $10^{-5}$  de se desenvolver câncer ao longo da vida para fármacos que apresentam algum benefício farmacológico associado ao tratamento e onde a exposição é intencional

(26) e corresponderia a um risco de  $10^{-6}$  para as demais situações, nos casos de substâncias químicas desconhecidas, mesmo que se descubra mais tarde que são carcinógenos e nos quais teoricamente não existe benefício farmacológico envolvido (62).

O valor de TTC foi obtido a partir da extrapolação linear de uma dose que é responsável por gerar 50% de incidência de tumores ( $TD_{50}$ ) à incidência de 1 em  $10^{-6}$  em modelos animais mais sensíveis e considerados como pior caso (62).

Valores de TTC superiores a  $1,5 \mu\text{g/pessoa/dia}$  dos compostos químicos podem ser aceitáveis em situações como exposição em curto prazo, para tratamentos nos quais a expectativa de vida é inferior a cinco anos ou quando a impureza é uma substância conhecida e a exposição humana é muito maior por outras fontes como a alimentação, por exemplo.

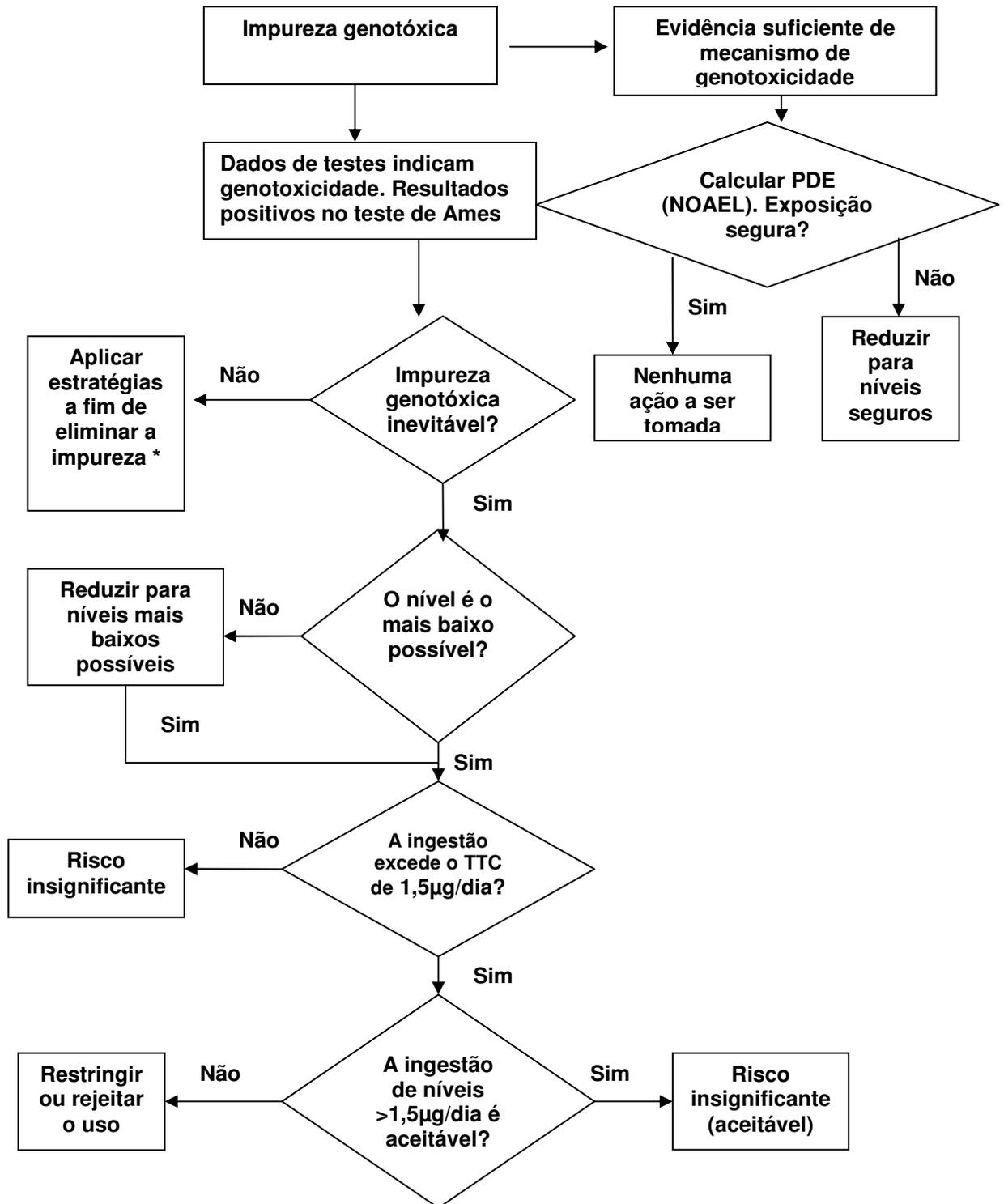


Figura 2 - Árvore decisória para produtos de degradação genotóxicos em medicamentos.

\* Alteração da rota de síntese, dos intermediários.

Fonte: Adaptado de CHMP, 2006 (62)

### **6.1.2 Guia de estabilidade da Entidade Asiática**

O guia de estabilidade da entidade Asiática exige a apresentação de resultados de degradação para as formas farmacêuticas como comprimido, cápsulas, emulsões, soluções orais e suspensões, pós para reconstituição, aerosóis nasais, sprays nasais, soluções tópicas e oftálmicas, supositórios, soluções parenterais de pequeno volume, soluções parenterais de grande volume, adesivos transdérmicos e produtos que necessitam de refrigeração. Esse mesmo guia preconiza que, diante de resultados de estabilidade que não apresentem variações de teor entre os lotes objeto de estudo, deverá ser apresentado o mecanismo de degradação existente, balanço de massas e dados que dêem suporte e justifiquem os resultados encontrados (65).

### **6.1.3 Guia de estabilidade da Organização Mundial de Saúde**

O guia proposto pela OMS que contempla as documentações necessárias para o registro de medicamentos genéricos, bem um anexo de estabilidade proposto para fármacos e medicamentos, também apresenta a necessidade da avaliação de produtos de degradação que possam surgir do ativo e forma farmacêutica. Esse guia determina a realização de estudos de estresse a fim de identificar possíveis produtos e rotas de degradação (66). Além disso, trazem como referência os guias do ICH Q3B (R2) e Q3A (R2).

O guia de estabilidade da WHO prevê que os estudos de estresse devem ser realizados em um lote de produto ativo farmacêutico e devem avaliar o efeito que a temperatura (incrementos de 10°C, exemplo 50°C, 60°C etc), umidade (75% ou mais), e quando apropriado, a oxidação, a hidrólise e a fotólise exercem sobre o lote do ativo. Esse estudo tem por objetivo provocar uma degradação de pequena extensão (10 a 30%) no ativo farmacêutico a fim de avaliar seu comportamento frente às condições de estresse testadas. Esse guia preconiza que o ativo será considerado estável caso não sofra degradação pelo prazo de 10 dias (66).

#### **6.1.4 Guia de estabilidade do *Cooperation Council for The Arab States of the Gulf***

O guia proposto pelo GCC também contempla os estudos de estresse tal qual previsto pelos guias do WHO e tem como referência os guias de estabilidade do ICH. Além disso, descreve a necessidade da avaliação do comportamento, ou seja, a natureza da degradação e o monitoramento dos produtos de degradação do ativo e formas farmacêuticas submetidas aos estudos de estabilidade. Esse guia considera significativa qualquer alteração de degradação que ultrapasse os critérios de aceitação definidos (67).

#### **6.1.5 Guia de estabilidade da África do Sul**

A autoridade sanitária MCC adota um guia de estabilidade que pressupõe a condução de estudos de estresse no ativo farmacêutico. Esses estudos devem ser conduzidos em condições mais drásticas que o estudo de estabilidade acelerado e também tem por objetivo fornecer informações sobre possíveis produtos e mecanismos de degradação. Esse estudo inclui o efeito que as variações de temperatura, umidade, oxidação, hidrólise e fotólise exercem sobre o ativo farmacêutico. Esse guia define que não é necessário conduzir estudos de estresse quando é demonstrado na prática que não há a formação de produtos de degradação para determinados ativos (68).

O guia preconiza também a necessidade de identificação de produtos de degradação que estejam acima de 0,1% nos lotes do ativo farmacêutico (68).

Diante da identificação de produtos de degradação acima desse valor ou que apresentem suspeita de toxicidade devem ser apresentadas informações adicionais sobre a estrutura química, informações sobre possíveis efeitos biológicos e a importância da concentração encontrada, procedimentos para isolamento e caracterização, mecanismos de formação incluindo a ordem da reação, propriedades físico-químicas, indicação da atividade farmacológica ou inatividade e perfil toxicológico. Quando a rota de degradação for desconhecida, devem ser

realizados um screening cromatográfico e outros testes necessários. Dados bem conhecidos sobre degradação de ativos farmacêuticos devem ser apresentados na submissão do registro e quando esses dados não existirem, devem ser incluídos na avaliação experimental apresentada sendo que a apresentação apenas de referências farmacopeicas não serão suficientes para satisfazer esse requerimento (68).

Esse guia traz a necessidade da condução de estudos de degradação nas demais formas farmacêuticas, quando relevantes e a apresentação do método cromatográfico ou outro analítico utilizado na avaliação do produto de degradação mesmo quando já tenha sido apresentado um método analítico para a avaliação de produtos de degradação no ativo farmacêutico (68).

#### **6.1.6 Guia de estabilidade da Agência Nacional de Vigilância Sanitária**

O guia adotado pela autoridade sanitária brasileira que contempla os estudos de estabilidade apresenta a necessidade da condução de estudos de degradação nas formas farmacêuticas submetidas à estabilidade ou da apresentação de justificativa da ausência desse teste (69). Além desse guia de estabilidade, está em aberto a Consulta Pública - CP nº11, de 23 de janeiro de 2012, sobre a proposta de Resolução da Diretoria Colegiada que estabelece parâmetros para a notificação, identificação e qualificação de produtos de degradação em medicamentos com princípios ativos sintéticos e semissintéticos, classificados como novos, genéricos e similares. Essa Consulta Pública apresenta texto normativo de caráter semelhante ao existente no Guia do ICH Q3B, trazendo limites para notificação, identificação e qualificação de produtos de degradação, bem como a necessidade da condução de ensaios de estresse tal como previsto no guia da OMS e avaliação crítica do perfil de degradação e pureza cromatográfica do ativo farmacêutico (70).

Quadro 4 – Comparativo entre os guias adotado pelas diferentes autoridades sanitárias que abordam o tema “degradação”.

	<b>ICH</b>	<b>ASEAN</b>	<b>GCC</b>	<b>OMS</b>	<b>MCC</b>	<b>ANVISA</b>	<b>Referências</b>
Ensaio de estresse	✓	✓	✓	✓	✓	✓	(7, 26, 57-60, 65-70)
Definição de limites de notificação, identificação e qualificação para avaliação de produtos de degradação	✓	N/A	N/A	N/A	*	✓	

\* Esse Guia traz apenas limites para identificação dos produtos de degradação, mas preconiza a qualificação de produtos que apresentem suspeita de toxicidade

N/A- não se aplica

## 6.2 MODELO DE MONOGRAFIA PARA SISTEMATIZAÇÃO DE INFORMAÇÕES SOBRE PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO

Com base na literatura estudada, foi proposto o seguinte modelo:

## 6.3 PROPOSTA DE MODELO DE MONOGRAFIA PARA PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO

### PROPOSTA DE MODELO DE MONOGRAFIA

#### 1- IDENTIFICAÇÃO DO ATIVO FARMACÊUTICO

Nomenclatura IUPAC*	
Sinonímia	
Registro CAS*	
Fórmula	
Estrutura Química	
Peso molecular	
Propriedades físico-químicas	
Informações preliminares de segurança	

\* International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC)

\*Chemical Abstracts Service (CAS)

- a) Estabilidade
- b) Armazenamento
- c) Formas farmacêuticas disponíveis
- d) Indicações
- e) Via de administração
- f) Dose diária
- g) Posologia
- h) Contra indicação e grupos de risco
- i) Informações de controle de qualidade

#### 2- ROTAS DE DEGRADAÇÃO DO ATIVO FARMACÊUTICO

- a) Estabilidade

b) Condições de estresse avaliadas/ rotas de degradação

Preencher as condições de estresse e produtos de degradação formados a partir da degradação do ativo farmacêutico:

Condições de estresse	Produto de degradação	Referências

**3- IDENTIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO**

Nomenclatura IUPAC	
Sinonímia	
Registro CAS	
Fórmula	
Estrutura Química	
Peso molecular	
Propriedades físico-químicas	
Limites de segurança	
Informações preliminares de segurança	

**4- INFORMAÇÕES DE SEGURANÇA DOS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO**

**a) Ensaios Toxicológicos**

- i. Agudo
- ii. Sub- agudo
- iii. Crônico e sub- crônico
- iv. EC<sub>50</sub>
- v. Mutagenicidade e genotoxicidade
- vi. Sensibilização dérmica
- vii. Irritação cutânea
- viii. Irritação ocular

- ix. Efeitos sobre a reprodução
- x. Carcinogenicidade

Para cada estudo toxicológico preencher:

Ensaio	Modelo teste	Concentração teste	Efeitos Observados	Resultado	Referência

**b) Caracterização do risco para consumidores**

**5- INFORMAÇÕES GERAIS**

- a) Formas farmacêuticas com estudos de degradação descritos em literatura

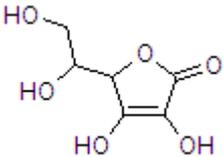
**6- LISTA DE REFERÊNCIAS CITADAS NA MONOGRAFIA.**

## 6.4 MONOGRAFIA PARA PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO DO ÁCIDO ÁSCORBICO E VALIDAÇÃO DO MODELO

### 1. IDENTIFICAÇÃO

a) Preencher para o ácido ascórbico:

Quadro 1 - Identificação do ácido ascórbico e propriedades físico-químicas.

Nomenclatura Iupac	(R)-3,4-di-hidroxi-5-((S)-1,2-di-hidroxietil) furan-2(5H)-ona	
Sinonímia	Ácido áscorbico, ácido treoascórbico, vitamina C, fator antiescorbúctico,	
Registro CAS	50-81-7	
Fórmula	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>6</sub>	
Estrutura química		
Peso molecular	176.12 g/mol	
Propriedades físico Químicas	Aspecto Estado físico	Cristalino
	pH	1,0 – 2,5 a 176 g/l a 25 °C
	Ponto/intervalo de fusão	190 – 194 °C
	Pka1	4,17 (20º)
	Pka2	11,57
	Hidrossolubilidade	176 g/l a 20 °C completamente solúvel
Informações preliminares de segurança	Não é uma substância ou mistura perigosa de acordo com o Sistema Global Harmonizado (SGH).	

Fonte: Sigma Aldrich, 2011 (1); Eitenmiller, 1999 (2).

a) Estabilidade

A vitamina C é facilmente oxidada em solução quando exposta ao ar, luz e em temperaturas elevadas desenvolvendo uma coloração amarelo-bronze. O escurecimento (mudança de cor) sinaliza a degradação. O ácido ascórbico é estável em ar seco, mas escurece quando exposto à luz (16).

b) Armazenamento

O ácido ascórbico deve ser armazenado em local fresco em recipiente hermeticamente fechado em lugar seco e bem ventilado. Apresenta sensibilidade à luz (3).

c) Formas farmacêuticas disponíveis

Comprimidos simples e revestidos, pastilhas, drágeas, comprimidos efervescentes, soluções e suspensões orais, soluções de uso tópico dermatológicas, xaropes, soluções injetáveis, drágeas, elixir, granulados, pó injetáveis, pó orais e efervescentes.

d) Indicações

O ácido ascórbico, popularmente conhecido como vitamina C participa de uma série de processos biológicos necessários ao organismo humano como a biossíntese de colágeno, carnitina e neurotransmissores. Possui origem sintética ou natural, sendo encontrado em frutas frescas e vegetais (4).

A deficiência em vitamina C provoca o escorbuto, síndrome caracterizada por fragilidade capilar, sangramento, anemia normocítica e macrocítica, lesões ósseas e na cartilagem. Sendo assim, essa vitamina é indicada no tratamento e prevenção dessa doença em adultos, crianças e idosos e possui evidências que demonstram a eficácia na reversão do escorbuto (5). Além da prevenção e tratamento do escorbuto, a vitamina C possui eficácia comprovada na redução da progressão de degeneração macular avançada ou da perda de visão (6).

A vitamina C é utilizada juntamente com a desferroxamina para potencializar a ação de quelagem de ferro em pacientes com acúmulo crônico desse íon. Em estados de deficiência desse íon, o ácido ascórbico é utilizado para aumentar a absorção do ferro no trato gastrointestinal (5). Vários outros benefícios são também atribuídos a vitamina C, como ação antioxidante, anti-aterogênica, anti-carcinogênica, imunomoduladora e auxiliar do sistema imunológico (4).

É relatada a utilização da vitamina C no tratamento da metaemoglobinemia; como acidificante da urina; como antioxidante em formulações farmacêuticas; no tratamento da tirosinemia tipo II; deficiência de glutatona sintetase; na doença de Alzheimer; na aterosclerose; câncer; trombocitopenia púrpura idiopática; desordens psiquiátricas; infertilidades; asma; tétano; osteogênese imperfeita; doença de Paget; abstinência de opioides e ação benéfica na defesa do aparelho respiratório (5). No entanto, alguns desses usos e benefícios atribuídos a vitamina C ainda carecem de estudos que comprovem sua eficácia (6).

Trabalhos conduzidos com a vitamina C que mostram seu papel nos mecanismos de defesa do aparelho respiratório, auxiliando na redução do tempo de duração dos resfriados, mas sem maiores benefícios na redução da incidência de resfriados através da profilaxia com o uso de altas doses (7-11).

e) Via de administração

Oral, injetável, tópica (5)

f) Dose diária

É indicada a administração diária de 30 a 100mg de vitamina C para adultos (5). Em geral, a ingestão diária recomendada é de 75 mg/dia e 90 mg/dia de vitamina C para mulheres e homens adultos, respectivamente. O limite máximo tolerável de ingestão da vitamina C é de 2 g/dia (7)

Quadro 2 - Ingestão diária recomendada da Vitamina C segundo faixa etária, gênero e estados fisiológicos.

Índices recomendados pelo <i>Food and Nutrition Board USA</i>		Índices recomendados <i>Food Standards Agency UK</i>
Idade/Grupo/Estado fisiológico	Vitamina C (mg/dia)	
<b>Neonatos</b>		
0-6 meses	40*	N/A
6-12 meses	50*	
<b>Crianças</b>		
1- 3 anos	15	30
4-8 anos	25	
9-10 anos	45	
11-13 anos	45	35
14 anos	65 e 75 (mulheres e homens)	
<b>Homens</b>		
18 anos	75	40
19-30 anos	90	
31-50 anos	90	
51-70 anos	90	
> 70 anos	90	
<b>Mulheres</b>		
18 anos	65	40
19-30 anos	75	
31-50 anos	75	
51-70 anos	75	
> 70 anos	75	
<b>Grávidas</b>		
14-18 anos	80	N/A
19-30 anos	85	
31-50 anos	85	
<b>Lactação</b>		
14-18 anos	115	N/A
19-30 anos	120	
31-50 anos	120	

Fonte: Food and Nutrition Board (8), Food Standards Agency (9).

\*UK(Reino Unido); USA (Estados Unidos da América)

\*N/A- não se aplica

g) Posologia

Quadro 3 - Posologia recomendável para o ácido ascórbico nas diferentes condições de saúde.

Posologia recomendada		Referências
Prevenção da deficiência de vitamina C	25 a 75mg ao dia	(5)
Tratamento do escorbuto	Em crianças: 1 mês a 4 anos- 125 a 250 mg diários dividido em 1 ou 2 doses; 4 a 12 anos- 250 a 500 mg diários dividido em 1 ou 2 doses; 12 a 18 anos- 500 a 1000 mg dividido em 1 ou 2 doses;	(10)
Tratamento do acúmulo crônico de ferro	100 ou 200 mg ao dia associados com a desferroxamina	(5)
Auxiliar do sistema imunológico	dose diária de 1g a 2g	(11)

h) Contra indicação e Grupos de Risco

A vitamina C é contra indicada em pacientes com insuficiência renal e hiperoxalúria aumentando a excreção de oxalato, derivado metabólico da vitamina C é contra indicada em pacientes com deficiência em Glucose-6-fosfato desidrogenase onde o risco de ocorrência de hemólise aumenta (5, 12).

i) Informações de controle de qualidade

Monografias do ácido ascórbico estão descritas nos compêndios oficiais como Farmacopeia americana USP, Farmacopeia Britânica, Farmacopeia Europeia e Farmacopeia Brasileira (3, 13-15) O quadro 6 mostra os testes de controle da qualidade exigidos para esse ativo e formas farmacêuticas que o contêm.

Quadro 4 - Ensaio de controle da qualidade existentes para o fármaco ácido ascórbico e formas farmacêuticas nas monografias oficiais da Farmacopeia Americana, Britânica, Europeia e Brasileira.

	Farmacopeia Americana	Farmacopeia Britânica e Farmacopeia Europeia	Farmacopeia Brasileira
Ácido ascórbico	Descrição, Identificação Rotação específica. Resíduos de combustão. Metais pesados. Doseamento	Testes de Caracterização (aparência, solubilidade, ponto de fusão). Identificação, Rotação óptica específica, determinação de cobre, ferro, metais pesados, cinzas sulfatadas. Determinação de impurezas 2- furaldeído; ácido oxálico; ácido d- sorbosônico; metil d- sorbosonato; (5R)-5-[(1R)-1,2-dihidroxietil]-3,4-dihidroxifuran-2(5H)-ona; (2R)-2-[(2R)-3,4-dihidroxí-5-oxo-2,5-dihidrofuran-2-il]-2-ácido hidróxi acético; metil (2R)-2-[(2R)-3,4-dihidroxí-5-oxo-2,5-dihidrofuran-2-il]-2-hidroxíacetato	Testes de Descrição, Identificação, doseamento. Ensaio de Pureza (pH, metais pesados, perda por dessecação e cinzas sulfatadas)
Ácido ascórbico comprimidos	Identificação Dissolução Uniformidade de doses. Doseamento.	Definição, Identificação. Desintegração, doseamento	Teste de Identificação. Determinação do peso, dureza, friabilidade, desintegração, uniformidade de doses. Testes de Dissolução e Doseamento
Ácido ascórbico solução oral	Identificação. Conteúdo de álcool. Doseamento	N/A	N/A
Ácido ascórbico injetável	Doseamento Identificação. Endotoxinas bacterianas. pH. Limite de oxalato. Outros	Definição, Caracterização. Identificação, Acidez. Determinação de ácido oxálico	Identificação, Doseamento Determinação do volume e pH. Ensaio de pureza (limite de oxalato). Testes de segurança biológica (esterilidade e endotoxinas bacterianas)

Fonte: Farmacopeia Brasileira, 2010; USP, 2011; BP, 2010; EP, 2009 (3, 13-15)

N/A- não se aplica

## 2 ROTAS DE DEGRADAÇÃO DO ATIVO FARMACÊUTICO

### b) Condições de estresse avaliadas

#### i. Degradação aeróbica

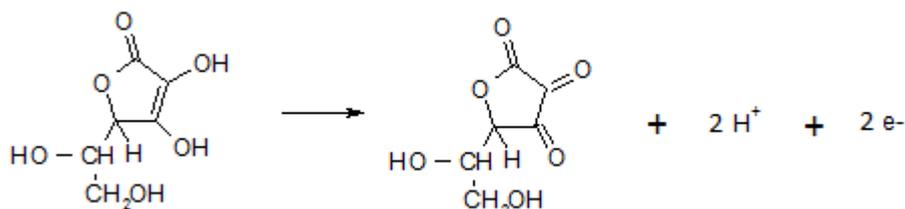
O ácido ascórbico é uma lactona insaturada (éster cíclico) que apresenta baixa estabilidade em solução aquosa à temperatura ambiente sendo rapidamente oxidado em ácido desidroascórbico. As reações de degradação em meio aquoso dependem de vários fatores como pH, temperatura e presença de oxigênio, sendo catalizada por íons metálicos, principalmente o  $\text{Cu}^{2+}$  e  $\text{Fe}^{3+}$  (17-19). O ácido ascórbico é sensível ao ar e a luz e deve ser mantido em um contêiner fechado e protegido da luz (3).

Em solução, a forte propriedade redutora da vitamina pode levar mudanças oxidativas rápidas e excessivas com a conversão no ácido deidroascórbico. A hidrólise irreversível do ácido desidroascórbico produz o ácido biologicamente inativo 2,3-diceto-L-gulônico (2). Essa reação ocorre de forma mais acelerada quando a vitamina encontra-se em solução básica (20)

O ácido ascórbico é um ácido fraco com  $\text{pK}_1$  próximo a 4,2, sendo assim ele é facilmente dissociável em valores acima desse pH. A estabilidade do ácido ascórbico pode ser melhorada com a redução do pH para valores abaixo de 2 (6).

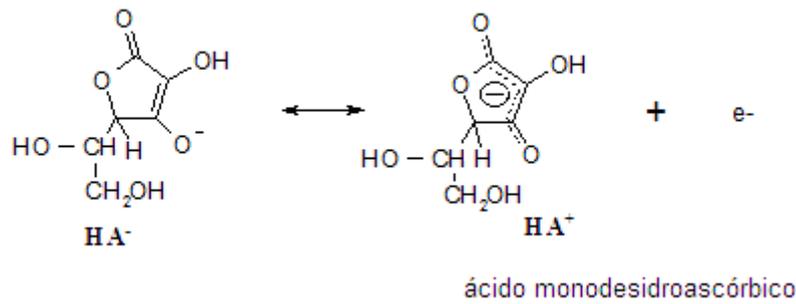
Normalmente a reação de oxidação do ácido ascórbico frequentemente envolve radicais livres e outras reações em cadeia. A reação mais comum é a de auto oxidação. A reação de oxidação do ácido ascórbico pelo íon  $\text{Cu}^{2+}$  inicialmente envolve a lenta oxidação do íon ascorbato pelo íon de cobre em uma semiquinona, que é rapidamente oxidada pelo oxigênio no ácido desidroascórbico (21). A reação se processa da seguinte forma:

1. Nos equilíbrios ácidos os ânions ( $\text{HA}^-$  e  $\text{A}^{2-}$ ) são estabilizados pela distribuição da carga através do sistema enona  $\text{O}1=\text{C}1-\text{C}2=\text{C}3-\text{O}3$ , sendo o hidrogênio mais ácido o do grupo hidroxil ligado ao C3.



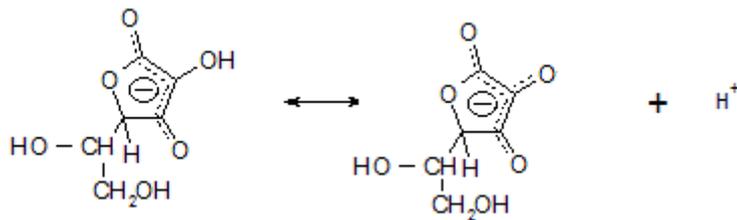
Fonte- Reação adaptada de Fornaro, 1998 (22).

2. A perda de um elétron leva à formação do radical *L*-ascorbato intermediário,  $\text{HA}^\cdot$ , também chamado ácido monodesidroascórbico ou ácido semidesidroascórbico.



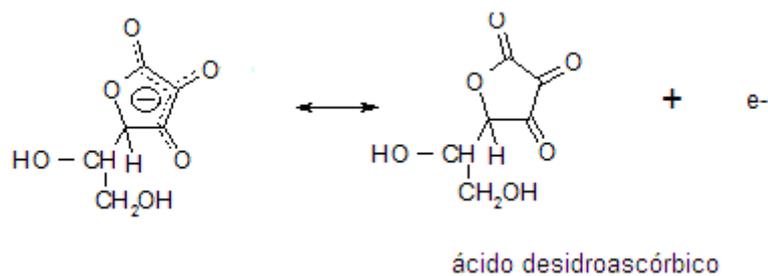
Fonte- Reação adaptada de Fornaro, 1998 (22)

3. A espécie HA se dissocia (pKa = -0,45) formando o radical A<sup>-</sup>



Fonte- Reação adaptada de Fornaro, 1998 (22).

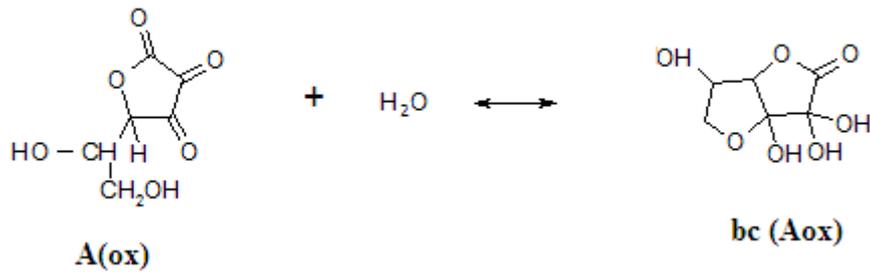
4. A perda do segundo elétron leva à formação do ácido desidroascórbico.



Fonte- Reação adaptada de Fornaro, 1998 (22).

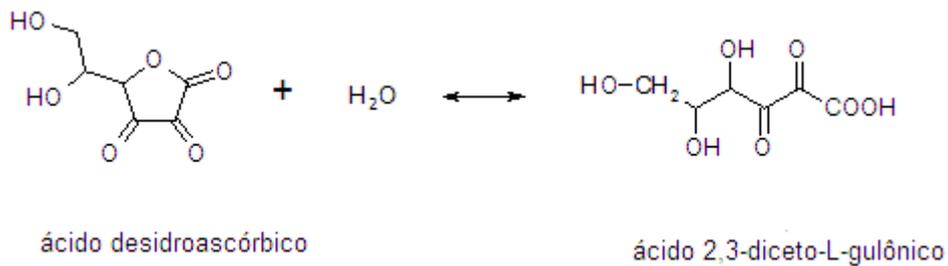
\* As reações que ocorrem de 2 a 4 são reversíveis com a formação de radicais livres intermediários. No total 2 elétrons e 2 prótons são perdidos.

5. Em meio aquoso é importante considerar que o ácido Ldesidroascórbico predomina (99%) na forma da espécie bicíclica hidratada, bc (Aox), apresentando uma constante de equilíbrio elevada 1.6,  $K = 6 \times 10^6$  mol/L.



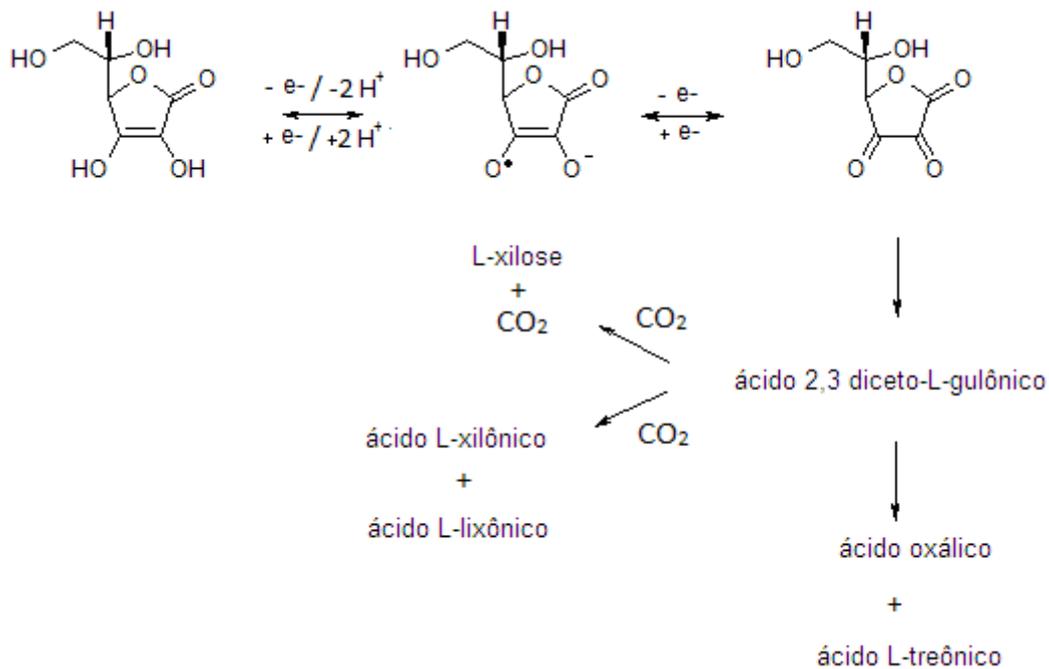
Fonte- Reação adaptada de Fornaro, 1998 (22).

A reação de decomposição do ácido desidroascórbico ocorre através da abertura do anel por hidrólise com a formação do ácido 2,3-diceto-*L*-gulônico (reação considerada irreversível).

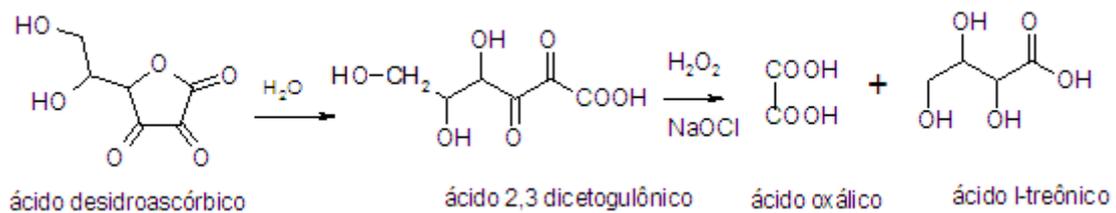


Fonte- Reação adaptada de Fornaro, 1998 (22)

O ácido 2,3 dicetogulônico diante da presença de agente oxidante (por exemplo, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ou NaOCl) sofre oxidação, levando à formação de ácido oxálico e ácido *L*-treônico (17, 23). Esses compostos são verificados também no organismo humano como os principais produtos de metabolismo do ácido ascórbico (4).



Fonte- Reação adaptado de Sheraz, 2009 (19)



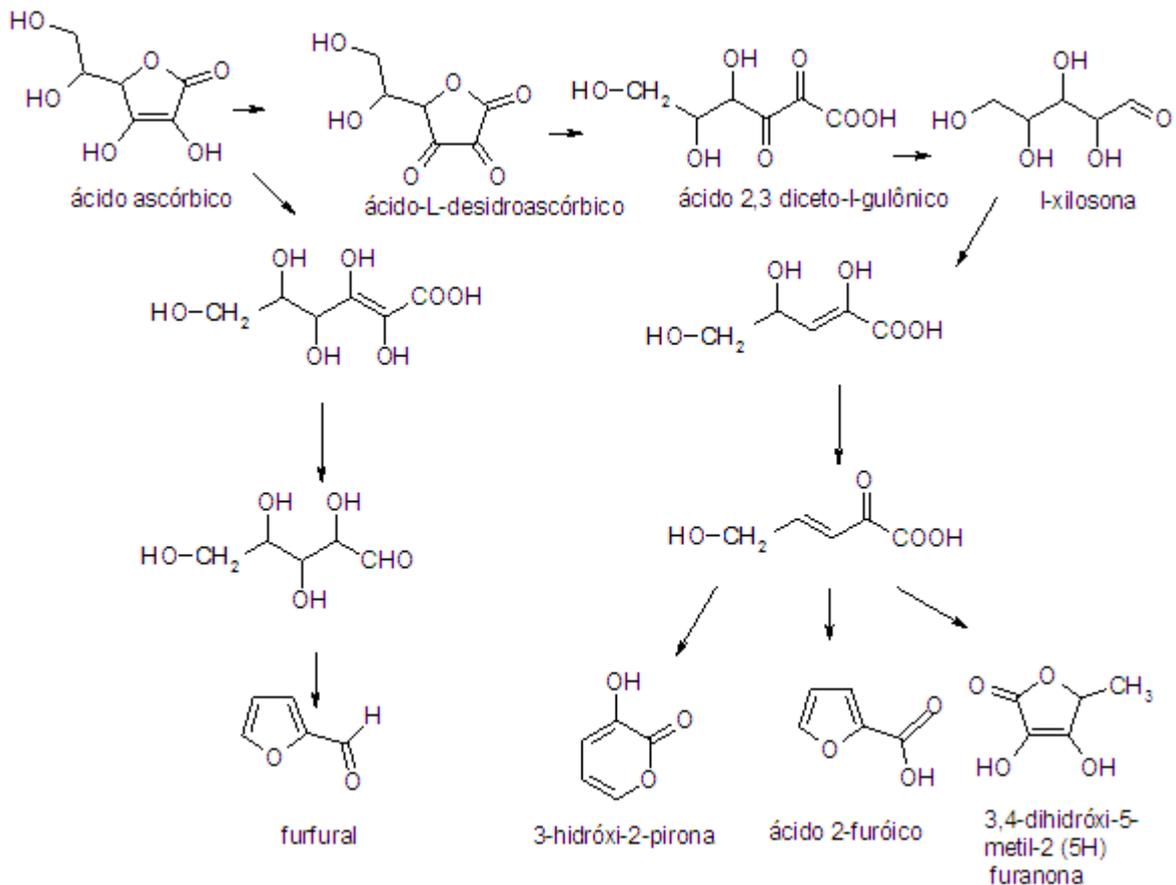
Fonte – Reação adaptada de Connors, 1986 (17).

## ii. Degradação anaeróbica

Em condições anaeróbicas, o ácido ascórbico sofre desidratação e hidrólise originando o furfural e o dióxido de carbono. A reação de desidratação em meio ácido é muito mais rápida do que em meio básico, em função da catálise realizada pelo íon de hidrogênio (17).

Em condições ácidas e anaeróbicas, uma molécula de furfural é produzida para cada molécula de ácido ascórbico (23). A taxa de degradação é máxima em pH 4,1, valor correspondente ao pKa do ácido ascórbico, em razão da formação de um complexo sal-ácido na solução (19).





Fonte: Reação adaptada de Yuan & Chen,1998; Sawamura,1994 (24-25).

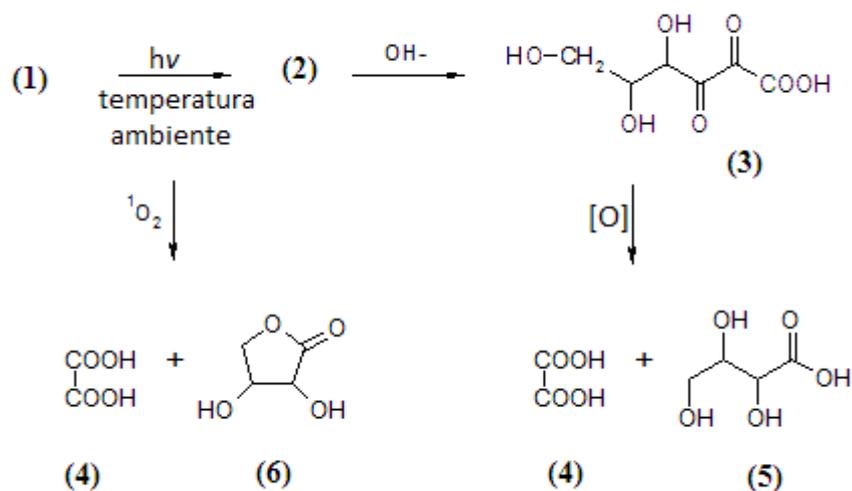
#### iv. Degradação por aquecimento

Em um trabalho conduzido por Tatum et al (1969) (26) foram identificados 15 produtos de degradação a partir da degradação por aquecimento do ácido ascórbico em meio aquoso . Entre os degradantes destacam-se: ácido acético, furfural, 2- acetilfurano, 2,2-difuril-metano, álcool furfurílico, gama-butirolactona, 2-5(H)-furanona, metil ciclopentenolona, 3-hidróxi-2-pirona, 2-hidróxi-acetil furano, ácido 2,5 diidrofuroico, desoxifuroin, ácido 2-furoico, furoin, furil. Esses autores sugeriram que os produtos de degradação formados poderiam ser oriundos da auto-condensação do furfural, maior produto de degradação formado nessa rota (26).

#### v. Fotodegradação

O ácido ascórbico em solução aquosa na presença de oxigênio e quando exposto à luz ultravioleta é oxidado em ácido desidroascórbico (27). A reação de degradação se processa conforme o exposto nos esquemas a seguir:

## Reação A



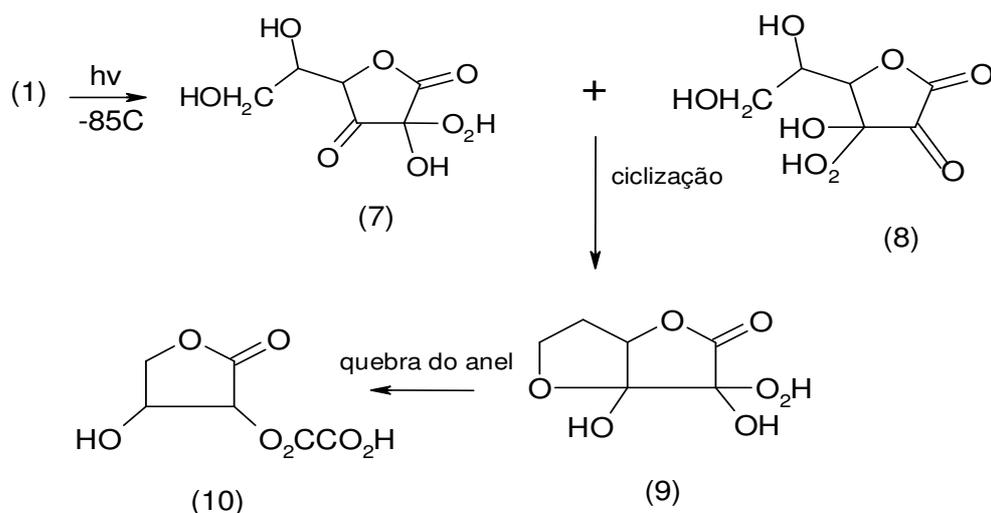
Fonte- Reação adaptada de Sheraz, 2009 (19).

Onde:

- (1) ácido ascórbico
- (2) ácido desidroascórbico
- (3) ácido 2,3 diceto-gulônico
- (4) ácido oxálico
- (5) ácido L-treônico
- (6) treonolactona

Em solução alcalina ou neutra o ácido ascórbico sofre oxidação química ou fotoquímica resultando no ácido desidroascórbico. O ácido desidroascórbico sofre saponificação do anel lactônico na influência da solução básica produzindo o ácido 2,3-diceto-gulônico. O ácido 2,3-diceto-gulônico oxida em ácido oxálico e em ácido L-treônico. Em temperatura ambiente o ácido ascórbico também sofre degradação fotoquímica na presença de oxigênio resultando em ácido oxálico e em treonolactona.

## Reação B



Fonte: Reação adaptada de Sheraz, 2009 (19).

Onde:

- (1) ácido ascórbico
- (7-8) hidroperóxidos de cetonas
- (9) hidroperoxi hemicetal
- (10) ácido treônico

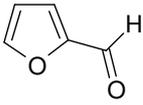
A foto oxigenação à baixa temperatura do ácido ascórbico origina uma mistura instável de hidroperóxidos de cetonas que originam o hidroperoxi hemicetal. O hidroperoxi hemicetal decompõe em aquecimento em éster de oxalato do ácido treônico (28).

Quadro 5 - Condições de estresse e produtos de degradação formados a partir da degradação do ácido ascórbico.

Condições de estresse	Produto de degradação	Referência
Aquecimento (em meio aquoso)	ácido acético, furfural, 2-acetilfurano, 2,2-difuryl-metano, álcool furfurílico, $\gamma$ -butirolactona, 2-5(h)-furanona, metil ciclopentenolona, 3-hidróxi-2-pirona, 2-hidróxi-acetil furano, ácido 2,5 diidrofuroico, desoxifuroin, ácido 2-furoico, furoin, furil	(26)
Solução ácida (em condições anaeróbicas)	furfural, ácido monodesidroascórbico	(17, 19, 23-25)
Solução ácida (condições aeróbicas)	ácido desidroascórbico, ácido dicetogulônico, ácido 2-furoico, 3-hidróxi-2-pirona, 3,4 diidroxil-5-metil-2-(5h)-furanona, l-xilosona	(24, 25)
Solução Básica (condições aeróbicas)	ácido 2,3 dicetogulônico, ácido oxálico ácido l-treônico	(19)
Exposição Fotolítica	ácido desidroascórbico, ácido 2,3-dicetogulônico, ácido oxálico, ácido l-treônico treonolactona, hidroperoxi hemicetal	(19, 27, 28)
Íons metálicos	ácido desidroascórbico	(17, 19, 21, 22)

### 3 IDENTIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO

Quadro 6 - Identificação e características físico-químicas do produto de degradação furfural.

Nomenclatura IUPAC	furano-2-carbaldeído	
Sinonímia	furfural, 2-furaldeído	
Registro CAS	98-01	
Fórmula	C <sub>5</sub> H <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	
Estrutura Química		
Peso molecular	96,08g/mol	
Propriedades físico Químicas	Aspecto Estado físico	Claro, líquido
	Cor	Castanho-claro
	Ponto/intervalo de fusão	-36 °C
	Ponto de ebulição inicial e intervalo de ebulição	-162 °C
	Ponto de fulgor	60 °C câmara fechada
	Limite de explosão, superior	19,3% (V)
	Limites de explosão, inferior	2,1% (V)
	Pressão de vapor	18,0 hPa a 55,0 °C e 2,3 hPa a 20,0 °C
	Densidade de vapor	3.32 (Ar=1.0)
	Densidade relativa	1,16 g/cm <sup>3</sup> a 25 °C
	Hidrossolubilidade	solúvel
Coeficiente de partição n-octanol/água	Log Pow 0,41	
Informações preliminares de segurança	Dose letal significativa, evidências de mutagenicidade e carcinogenicidade.	

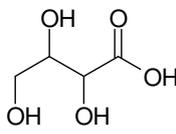
Fonte: Sigma Aldrich, 2011 (29).

Quadro 7 - Identificação e características físico-químicas do produto de degradação ácido oxálico.

Nomenclatura Iupac	ácido oxálico	
Sinonímia	ácido etanodioico	
Registro CAS	144-62-7	
Fórmula	C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	
Estrutura Química		
Peso molecular	90,03g/mol	
Propriedades físico Químicas	Aspecto Estado físico	Cristalino
	Cor	branco
	pH	1.3 a 9 g/L
	Ponto/intervalo de fusão	189,5 °C
	Ponto de ebulição inicial e intervalo de ebulição	157 °C a 1,013hPa
	Pressão de vapor	<0,01 hPa a 20 °C
Densidade relativa	1,900 g/cm <sup>3</sup> a 20 °C	
Informações preliminares de segurança	Dose letal significativa, evidências de teratogenicidade	

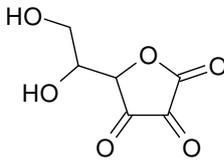
Fonte: Sigma Aldrich, 2011 (30).

Quadro 8 - Identificação e características físico-químicas do produto de degradação ácido l-treônico.

Nomenclatura IUPAC	ácido (2S,3R)-2,3,4-tri-hidróxi-butanoico	
Sinonímia	ácido l-treônico	
Registro CAS	70753-61-6	
Fórmula	C <sub>8</sub> H <sub>14</sub> CaO <sub>10</sub>	
Estrutura Química		
Peso molecular	310,27 g/mol	
Propriedades físico Químicas	Aspecto	pó
	Estado físico	
	Cor	bege
	Ponto/intervalo de fusão	>300 °C
	Densidade relativa	1,900 g/cm <sup>3</sup> a 20 °C
Informações preliminares de segurança	Dados toxicológicos indisponíveis	

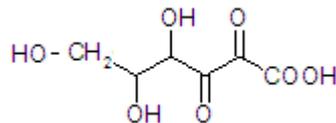
Fonte: Sigma Aldrich, 2011 (31).

Quadro 9 - Identificação e características físico-químicas do produto de degradação ácido desidroascórbico.

Nomenclatura IUPAC	(5R)-5-[(1S)-1,2-dihidroxietil] oxolane-2, 3,4-triona	
Sinonímia	ácido desidroascórbico	
Registro CAS	490-83-5	
Fórmula	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> O <sub>6</sub>	
Estrutura Química		
Peso molecular	174,11 g/mol	
Propriedades físico Químicas	Aspecto Estado físico	pó
	Cor	bege
	Ponto de fusão/ponto de congelamento	228 °C
Informações preliminares de segurança	Dados toxicológicos indisponíveis	

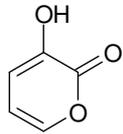
Fonte: Sigma Aldrich, 2011 (32).

Quadro 10 - Identificação e características físico-químicas do produto de degradação ácido 2,3 dicetogulônico.

Nomenclatura IUPAC	ácido 4,5,6-tri-hidroxi-2,3-dioxo-hexanoico
Sinonímia	ácido 2,3 dicetogulônico
Registro CAS	3409-57-2
Fórmula	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub>
Estrutura Química	
Peso molecular	192,124 g/mol
Informações preliminares de segurança	Dados toxicológicos indisponíveis

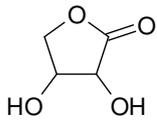
Fonte: ChEMbase (33).

Quadro 11 - Identificação e características físico-químicas do produto de degradação ácido 3-hidróxi-2-pirona.

Nomenclatura IUPAC	3-hidroxi-piran-2-ona	
Sinonímia	3-hidróxi-2-pirona	
Registro CAS	496-64-0	
Fórmula	C <sub>5</sub> H <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	
Estrutura Química		
Peso molecular	112,08 g/mol	
Propriedades físico Químicas	Ponto de fusão	98,3 °C
	Coeficiente de partição n-octanol/água	1,130
Informações preliminares de segurança	Dados toxicológicos indisponíveis	

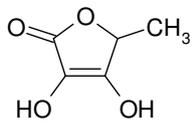
Fonte: ChemIdPlusAdvanced (34).

Quadro 12 - Identificação e características físico-químicas do produto de degradação ácido L-treonolactona.

Nomenclatura IUPAC	3,4-dihidroxi-oxolan-2-ona	
Sinonímia	L-treonolactona	
Registro CAS	21730-93-8	
Fórmula	C <sub>4</sub> H <sub>4</sub> O <sub>4</sub>	
Estrutura Química		
Peso molecular	118,09	
Informações preliminares de segurança	Dados toxicológicos indisponíveis	

Fonte-ChemicalBook, 2008 (35).

Quadro 13 - Identificação e características físico-químicas do produto de degradação 3,4 dihidroxi-5-metil-2-(5H)-furanona.

Nomenclatura	(2S)-4-hidroxi-2-(hidroximetil)-2H-furan-5-ona	
Sinonímia	3,4 dihidroxi-5-metil-2-(5H)-furanona	
Registro CAS	3566-57-2	
Fórmula	C <sub>5</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>	
Estrutura Química		
Peso molecular	130,1	
Informações preliminares de segurança	Dados toxicológicos indisponíveis	

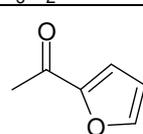
Fonte: ChemicalBook, 2008 (36).

Quadro 14- Identificação e características físico-químicas do produto de degradação ácido acético.

Nomenclatura IUPAC	ácido acético	
Sinonímia	ácido etanoico	
Registro CAS	64-19-7	
Fórmula	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	
Estrutura Química		
Peso molecular	60,05 g/mol	
Propriedades físico Químicas	Aspecto Estado físico	líquido
	Cor	incolor
	Odor	acre
	pH	2,4 a 60,05 g/l
	Ponto de fusão/ponto de congelamento	16,2°C
	Ponto de ebulição inicial e intervalo de ebulição	117-118°C
	Ponto de fulgor	40°C câmara fechada
	Limite de explosão, superior	19,9% (V)
	Limites de explosão, inferior	4% (V)
	Pressão de vapor	73.3 hPa a 50°C e 15.2 hPa a 20°C
	Densidade relativa	1,05 g/cm <sup>3</sup>
	Hidrossolubilidade	completamente miscível
	Coeficiente de partição n-octanol/água	Log Pow -0,17
Temperatura de autoignição	485°C	
Informações preliminares de segurança	Dose letal significativa	

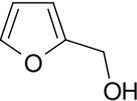
Fonte: Sigma Aldrich, 2011 (37).

Quadro 15 - Identificação e características físico-químicas do produto de degradação 2- acetil-furano.

Nomenclatura IUPAC	1-(furan-2-il) etanona	
Sinonímia	2- acetil-furano, 2-furil-metil- cetona	
Registro CAS	1192-62-7	
Fórmula	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub>	
Estrutura Química		
Peso molecular	110,11g/mol	
Propriedades físico Químicas	Aspecto Estado físico	Massa ou fragmentos solidificados
	Cor	Amarelo claro
	Ponto de ebulição inicial e intervalo de ebulição	67°C a 13 hPa
	Ponto de fulgor	71 °C câmara fechada
Informações preliminares de segurança	Dose letal significativa, evidências de mutagenicidade	

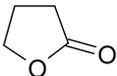
Fonte: Sigma Aldrich, 2011 (38).

Quadro 16 - Identificação e características físico-químicas do produto de degradação álcool furfurílico.

Nomenclatura IUPAC	furan-2-il metanol	
Sinonímia	álcool furfurílico, 5-hidroximetilfurano	
Registro CAS	98-00-0	
Fórmula	C <sub>5</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub>	
Estrutura Química		
Peso molecular	98,1g/mol	
Propriedades físico Químicas	Aspecto Estado físico	Claro, líquido
	Cor	incolor
	Ponto /intervalo de fusão	-29 °C
	Ponto de ebulição inicial e intervalo de ebulição	170 °C
	Ponto de fulgor	65 °C câmara fechada
	Limite de explosão, superior	16,3% (V)
	Limites de explosão, inferior	1,8% (V)
	Pressão de vapor	7.3 hPa a 55 °C e 0,7 hPa a 55 °C a 20 °C
	Densidade de vapor	3,39 (ar=1.0)
Densidade relativa	1,135 g/cm <sup>3</sup> a 25 °C	
Informações preliminares de segurança	Dose letal significativa, evidências de mutagenicidade, evidências de carcinogenicidade.	

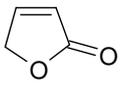
Fonte: Sigma Aldrich, 2011 (39).

Quadro 17 - Identificação e características físico-químicas do produto de degradação gama butirrolactona.

Nomenclatura IUPAC	oxalan-2-ona	
Sinonímia	gama butirrolactona	
Registro CAS	96-48-0	
Fórmula	C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub>	
Estrutura Química		
Peso molecular	86.089 g/mol	
Propriedades físico Químicas	Ponto de fusão	4.33E + 01 °C
	Ponto /intervalo de fusão	-29 °C
	Ponto de ebulição	204 °C
	Coefficiente de partição n-octanol/água (Log Pow)	-0,64
	Pressão de vapor	0,45 mm Hg a 20 °C
Informações preliminares de segurança	Dose letal significativa	

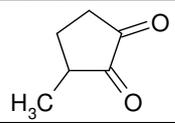
Fonte: ChemIdPlusAdvanced (40).

Quadro 18 - Identificação e características físico-químicas do produto de degradação 2-5(H)-furanona

Nomenclatura IUPAC	2-5(H)-furanona	
Sinonímia	gama crotonolactona	
Registro CAS	497-23-4	
Fórmula	C <sub>4</sub> H <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	
Estrutura Química		
Peso molecular	84,07g/mol	
Propriedades físico Químicas	Ponto /intervalo de fusão	4-5 °C
	Ponto de ebulição inicial e intervalo de ebulição	86-87 °C A 16 hPa
	Densidade relativa	1,185 g/ml a 25 °C
Informações preliminares de segurança	Evidências de carcinogenicidade.	

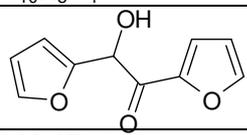
Fonte: ChemIdPlusAdvanced (41).

Quadro 19 - Identificação e características físico-químicas do produto de degradação metil ciclopentenolona.

Nomenclatura IUPAC	2-hidróxi-3-metil- 2 ciclopenten-1-ona	
Sinonímia	metil ciclopentenolona	
Registro CAS	765-70-8	
Fórmula	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	
Estrutura Química		
Peso molecular	112,13 g/mol	
Propriedades físico Químicas	Ponto /intervalo de fusão	104-108 °C
	Ponto de ebulição	204 °C
	Coeficiente de partição n-octanol/água (Log Pow)	-0,64
	Pressão de vapor	0,45 mm Hg a 20 °C
Informações preliminares de segurança	Dose letal significativa	

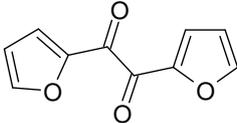
Fonte: Sigma Aldrich, 2011(42).

Quadro 20 - Identificação e características físico-químicas do produto de degradação furoin.

Nomenclatura IUPAC	1,2 bis (furan-2-il)-2-hidroxietanona	
Sinonímia	furoin	
Registro CAS	552-86-3	
Fórmula	C <sub>10</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>	
Estrutura Química		
Peso molecular	192,17 g/mol	
Propriedades físico Químicas	Ponto /intervalo de fusão	134-137 °C
	Ponto de ebulição	204 °C
	Coeficiente de partição n-octanol/água (Log Pow)	0,54
	Pressão de vapor	02,49 E-05 mm Hg
Informações preliminares de segurança	Dados toxicológicos indisponíveis	

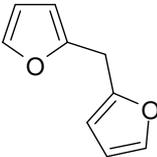
Fonte: Sigma Aldrich, 2011 (43).

Quadro 21 - Identificação e características físico-químicas do produto de degradação 2,2' furil.

Nomenclatura IUPAC	1,2-bis (furan-2-il)etano-1,2-diona	
Sinonímia	2,2-furil	
Registro CAS	492-94-4	
Fórmula	C <sub>10</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>	
Estrutura Química		
Peso molecular	192,15 g/mol	
Propriedades físico Químicas	Ponto /intervalo de fusão	163-165 °C
	Coeficiente de partição n-octanol/água (Log Pow)	1,24
	Pressão de vapor	9,55 E-09 mm Hg
Informações preliminares de segurança	Dados toxicológicos indisponíveis	

Fonte: ChemIDplusAdvanced (44)

Quadro 22 - Identificação e características físico-químicas do produto de degradação 2,2 difuril metano.

Nomenclatura IUPAC	2-(furan-2-il-metil) furano	
Sinonímia	2,2 difuril metano	
Registro CAS	1197-40-6	
Fórmula	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	
Estrutura Química		
Peso molecular	148,15 g/mol	
Informações preliminares de segurança	Dados toxicológicos indisponíveis	

Fonte: Chemical source Association, 2010 (45)

ácido 2,5 diidrofuroico; desoxifuroin; 2-hidróxi-acetil furano; hidroperoxihemicetal

2-hidróxi-acetil furano; ácido furoico

Dados não localizados.

#### 4 INFORMAÇÕES DE SEGURANÇA DOS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO

##### a) Ensaios Toxicológicos

## i. Agudo, incluindo DL50

Quadro 23 - Ensaios de toxicidade aguda do furfural.

Ensaio	Modelo teste	Efeitos observados	Resultado	Referência
Toxicidade aguda (oral)	Ratos	Sinais de toxicidade ou mortalidade no intervalo de 14 dias. Observações clínicas de toxicidade incluíram tremores, letargia, exoftalmia e na necropsia observou-se pulmões com hemorragia, edema e exudação de muco no intestino	DL <sub>50</sub> oral >102mg/kg	(46)
	Ratos	Administrou-se furfural em soluções aquosas de 50 mg/kg sendo sacrificado 8 animais a cada 6, 12, 24 e 48 horas após administração. O fígado dos animais tratados apresentou glóbulos eosinofílicos e um aumento de figuras mitóticas sem apresentar necrose zonal ou massiva.	Alterações hepáticas foram significativas após 6 horas de administração do furfural reduzindo em número nos demais tempos	(51)
	Ratos	letalidade	DL <sub>50</sub> variando de 50 a 149 mg/kg	(48-49)
	camundongos	letalidade	DL <sub>50</sub> variando de 400 a 500 mg/kg	(48)
	cachorros	letalidade	DL <sub>50</sub> variando de 650 a 950 mg/kg	(48)
	cobaías	letalidade	DL <sub>50</sub> 541 mg/kg	(48)
Toxicidade aguda (dérmica)	ratos	Aplicou-se concentrações de 145 ou 171 ou 2020 mg/kg/dia de furfural sobre 10% da superfície corporal dos animais, que permaneceu por estado oclusivo durante 24 horas. Verificou-se para os animais expostos sinais toxicológicos de letargia e sinais necroscópicos de congestão pulmonar, edema, aumento do fígado e distensão da bexiga urinária	DL <sub>50</sub> dérmico 192 mg/kg	(47)
	coelhos	letalidade	DL <sub>50</sub> >310 mg/kg	(50)
	cobaías	letalidade	DL <sub>50</sub> < 10000 mg/kg	(48)

\* concentração teste- não encontrada

## ii. Toxicidade por dose de repetição (sub-agudo)

Quadro 24 - Ensaio de toxicidade sub aguda do furfural.

Ensaio	Modelo teste	Concentração teste	Efeitos observados	Resultados	Referência
Sub agudo oral (dose de repetição)	ratos F344N	0, 15, 30, 60, 120 ou 240 mg/kg /dia durante 16 dias	Nenhum rato morreu com a ingestão da menor dosagem; o peso corporal dos ratos tratados ao final dos experimentos foi semelhante ao dos ratos controle (que receberam apenas o veículo). Ratos que receberam a maior dosagem de 240 mg/kg/dia apresentaram dificuldade para respirar e os que receberam a dosagem de 120 mg/kg/dia apresentaram inatividade	NOAEL de 120 mg/kg/dia e LOAEL de 240 mg/kg/dia para toxicidade oral	(54)
	camundongos B6C3F1	0, 25, 50, 100, 200 e 400 mg/kg/dia durante 16 dias	Não se observou anormalidades histopatológicas	NOAEL de 200 mg/kg/dia e LOAEL de 400 mg/kg/dia para toxicidade oral	(54)
	ratos Sprague Dawley	0, 30, 55, 100 mg/kg/dia de furfural durante 28 dias	Efeitos neurotóxicos e sistêmicos	NOAEL de 100 mg/kg/dia para efeitos neurotóxicos e sistêmicos.	(52)
	ratos Fischer 344	0,30,60,90,120 e 180 mg/kg/dia inicialmente por 14 dias e posteriormente por 90 dias	Na dose mais elevada verificou-se uma redução na atividade plasmática da alanina nas fêmeas que correspondeu a aumentos absolutos (111%) e relativos (115%) no peso do fígado desses animais	NOAEL de 120 mg/kg/dia para hepatotoxicidade	(55)
	ratos Fisher 344	6, 12, 24, 48, 96 e 192 mg/kg/dia durante 28 dias	O tratamento com a maior dose (inicialmente de 192 mg/kg/dia, reduzida posteriormente para 144 mg/kg/dia e 120 mg/kg/dia) resultou em mortalidade e aumento de peso absoluto e relativo dos rins e fígados das fêmeas sobreviventes do grupo.	NOAEL de 96 mg/kg/dia para toxicidade oral	(53)

## iii. Toxicidade por dose repetida (sub-crônico)

Quadro 25 - Ensaio de toxicidade sub crônica do furfural.

Ensaio	Modelo teste	Concentração teste	Efeitos observados	Resultados	Referências
Toxicidade sub crônica por dose repetida	Ratos	0, 11, 22, 45, 90 ou 180 mg/kg por 13 semanas	Nas dosagens de 22, 45 e 90 mg/kg/dia observou-se um aumento do peso dos pulmões (não relacionados a dosagem) nos animais machos. Para machos e fêmeas, a dosagem de 45 mg/kg/dia levou ao aumento absoluto no peso dos rins e a dosagem de 90 mg/kg/dia levou a aumento absoluto e relativo do peso dos rins e fígado. Para as fêmeas ocorreu aumento absoluto no peso dos rins nas concentrações de 22 e 90 mg/kg/dia. Um decréscimo dose relacionado foi verificado no peso do cérebro dos ratos machos nas concentrações de 22, 45 e 90 mg/kg/dia. Aumento na vacuolização citoplasmática dos hepatócitos das regiões centrilobular dos ratos machos ocorreram em todas as doses administradas (11, 22, 45 e 90 mg/kg /dia).	NOAEL <11 mg/kg/dia com base na vacuolização citoplasmática dos hepatócitos de ratos machos	(54)
	Camundongos	0, 75, 150, 300, 600 ou 1200 mg/kg/dia por 13 semanas	A dose de 600 mg/kg/dia levou a morte de boa parte dos animais (18/20) e a dose de 1200 mg/kg levou a morte de todos. Houve redução de peso corporal significativo nas dosagens de 150 e 300 mg/kg/dia para os camundongos machos. Percebeu-se uma incidência aumentada de vacuolização citoplasmática nos hepatócitos e uma necrose coagulativa centrolobular severa e dose-dependente (marcante nas dosagens maiores ou iguais a 150 mg/kg/dia nos camundongos machos e de 300 mg/kg/dia nos camundongos fêmeas).	NOAEL de 75 mg/kg/dia com base na redução de peso corporal e alterações histopatológicas	(54)
	Ratos	0, 30, 60, 90 ou 180 mg/kg/dia por 13 semanas	Para os ratos machos, nas doses de 30 e 90 mg/kg/dia foi verificado um aumento na concentração plasmática de albumina e na dose de 90 mg/kg/dia e 180 mg/kg/dia verificou-se alterações hematológicas (redução de células de hemoglobina). Na dose mais elevada de 180 mg/kg/dia, para as ratas fêmeas, houve aumento da atividade da fosfatase alcalina, da gama-glutamyltransferase e aumento da concentração plasmática de albumina. Na concentração de 180 mg/kg/dia verificou-se um aumento do peso do fígado para os machos e alterações na região perilobular, mas ausência de sinais de necrose. Para as fêmeas não se verificou sinais de hepatotoxicidade.	O NOAEL para a hepatotoxicidade de 53mg/kg/dia.	(55-57)

Quadro 25- (Continua) Ensaios de toxicidade sub crônica do furfural.

Ensaio	Modelo teste	Concentração teste	Efeitos observados	Resultados	Referências
Toxicidade sub crônica por dose repetida	Ratos	20, 30, 40 ml/kg (duração de 120 dias)	Os animais sacrificados com 90 dias apresentaram sinais de degeneração nos hepatócitos e alguns sinais de regeneração hepática, com elevado número de células em mitose. Nos animais sacrificados com 120 dias, verificaram-se sinais clínicos semelhantes e mais intensificados	Degeneração nos hepatócitos e alguns sinais de regeneração hepática,	(51)
	Ratos	1200 mg/kg/dia de furfural pelos primeiros 30 dias e 1700 mg/kg/dia até o final do experimento (150 dias)	toxicidade hepática	A hepatotoxicidade do furfural foi relacionada ao aumento do número e focos positivos para a glutathione S-transferase	(58)
	Ratos	30 mg/kg/dia (durante 30 dias), 40 mg/kg/dia (31° dia ao 60° dia) e 50 mg/kg/dia (61° ao 90° dia)	Ratos que receberam doses de 30 mg/kg/dia de furfural durante os primeiros 30 dias; doses de 40 mg/kg/dia do 31° ao 60° dia de tratamento, e 50mg/kg/dia do 61° ao 90° dia apresentaram redução dos depósitos de glicogênio hepático, e redução da enzima G6PD (glicose-6-fosfato desidro-oxigenase).	A perda do glicogênio no estudo avaliado implicou na depressão da função de desintoxicação dos hepatócitos e um desequilíbrio enzimático com redução progressiva da G6PD dos hepatócitos da periferia ao centro lobular gerando insuficiência funcional hepática.	(59)

v. Toxicidade EC<sub>50</sub>Quadro 26- Ensaio de EC<sub>50</sub> do furfural.

Ensaio	Modelo teste	Efeitos observados	Resultado (mg/L)	Referência	
<i>Peixes</i>					
Agudo (14 dias)	<i>Poecilia reticulata</i> , guppy	letalidade	CL <sub>50</sub> 10,6 (log CL <sub>50</sub> = 2,04) <sup>e</sup>	(61).	
Agudo (96 horas)	<i>Pimephales promelas</i>	letalidade	CL <sub>50</sub> de 20,6		
Crônico (33 dias)		crescimento significativamente reduzido, anormalidades morfológicas e letargia	NOEC <sup>b</sup> <0,426 <sup>d</sup> LOEC <sup>c</sup> 0,426		
Crônico (32 dias)		redução da duração larval	NOEC 0,041 LOEC 0,097		
Agudo (96 horas)	<i>Oncorhynchus mykiss</i> , truta arco-íris	letalidade	CL <sub>50</sub> <sup>a</sup> de 3,62		
Agudo (96 horas)	<i>Lepomis macrochirus</i>	letalidade	CL <sub>50</sub> 5,8		
Agudo (96 horas)	<i>Cyprinodon variegatus</i>	letalidade	CL <sub>50</sub> 14		
Crônico (12 dias)	<i>Brachydanio rerio</i>		NOEC 0,33 <sup>f</sup>		
<i>Invertebrados</i>					
Agudo (72 horas)	<i>Daphnia magna</i>	letalidade	CL <sub>50</sub> 13		
Agudo (24 horas)		letalidade	CE <sub>50</sub> <sup>g</sup> 29		
Crônico (21 dias)		Reduções significativas na reprodução e crescimento	NOEC 1,9 LOEC 3,7		
Agudo (48 horas)		letalidade	CE <sub>50</sub> 19,9		
Agudo (96 horas)	<i>Americamysis bahia</i>	letalidade	CL <sub>50</sub> 15		
Agudo (96 horas)	<i>Mysidopsis Bahia</i> <sup>h</sup>	letalidade	CL <sub>50</sub> 10,6		
Agudo (96 horas)	<i>Crassostrea virginica</i> , ostra	toxicidade	EC <sub>50</sub> 19 NOEC 8,2 LOEC 13		
<i>Algas</i>					
Crônico (8 dias)	<i>Microcystis aeruginosa</i> , alga <i>Scenedesmus quadricauda</i> , alga	toxicidade	NOEC 2,7 NOEC 31		
Crônico (96 horas)	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> , alga	toxicidade	CE <sub>50</sub> 29		
Crônico (7 dias)	<i>Lemna gibba</i> , lentilha d'água	redução significativa de biomassa	CE <sub>50</sub> 49 NOEC 0,29 LOEC 0,80		
Crônico (96 horas)	<i>Skeletonema costatum</i> , diatomácea <i>Navicula pelliculosa</i> , diatomácea <i>Anabaena flos-aquae</i> , alga	toxicidade	CE <sub>50</sub> 46 CE <sub>50</sub> >42 CE <sub>50</sub> 130		

<sup>a</sup> CL<sub>50</sub>- Concentração de uma substância que apresenta letalidade em 50% dos organismos testados.

<sup>b</sup> NOEC- Concentração sem efeito observável. É a maior concentração em um teste de toxicidade que não causa efeito estatisticamente significativo em comparação com demais controles.

<sup>c</sup> LOEC- Menor concentração com efeito observável. É a concentração mais baixa em um teste de toxicidade que é capaz de provocar efeito estatisticamente significativo em comparação com os controles.

<sup>d</sup>- efeitos significativos foram observados na menor concentração testada, portanto, um NOEC não pôde ser estabelecida a partir do estudo.

<sup>e</sup> O CL<sub>50</sub> foi reportado como 109,6 µmoles/L.

<sup>f</sup> Representa a melhor estimativa da concentração de exposição real, o que corresponde a uma concentração nominal de 0,5 mg/L. Com base nisso, definiu-se um NOEC, LOEC de 1,0 mg/L.

<sup>g</sup> CE<sub>50</sub>- Concentração de uma substância que é capaz de provocar algum efeito biológico em 50% dos organismos testados.

<sup>h</sup> Essas espécies foram renomeadas como *Americamysis bahia*

## vi. Mutagenicidade e genotoxicidade

Quadro 27- Ensaio de mutagenicidade do furfural.

Ensaio	Modelo teste	Concentração teste	Efeitos observados	Resultado	Ref
		In vitro			(62)
		In vitro			
	<i>S. typhimurium</i> TA100	8000 µg/placa	Mutação reversa	Positivo	
	<i>S. typhimurium</i> TA98	8000 µg/placa	Nenhum efeito	Negativo	
	<i>E. coli</i> WP2, WP2 uvrA	0.1–1000 µg/ml	Nenhum efeito	Negativo	
	<i>S. typhimurium</i> TA1535, TA100, TA1537, TA1538, TA98	0,1–1000 µg/ml	Nenhum efeito	Negativo	
	<i>S. typhimurium</i> TA100, TA98, TA1535	Up to 3460 µg/placa	Nenhum efeito	Negativo	
	<i>S. typhimurium</i> TA100, TA98, TA1535	5766 µg/placa	Mutação reversa	Positivo (fraco)	
	<i>S. typhimurium</i> TA100, TA1535, TA1537 modificado	200 000 µg/ml	Nenhum efeito	Negativo	
Mutação reversa	<i>S. typhimurium</i> TA98, TA100	Up to 1000 µg	Nenhum efeito	Negativo	
	<i>S. typhimurium</i> TA104, TA102	96 µg/placa	Nenhum efeito	Negativo	
	<i>S. typhimurium</i> TA98, TA100, TA1535	Up to 6667 µg/placa	Nenhum efeito	Negativo	
	<i>S. typhimurium</i> TA100, TA98	15–63 µg/placa	Nenhum efeito	Negativo	
	<i>S. typhimurium</i> TA100 (ensaio modificado)	426 µg/placa	Nenhum efeito	Negativo	
	<i>S. typhimurium</i> TA104	5–500 µg/placa	Mutação reversa	Positivo	
	<i>S. typhimurium</i> TA100, TA102	5–500 µg/placa	Nenhum efeito	Negativo	
	<i>S. typhimurium</i> TA100, TA98, TA102	Up to 115 320 µg/placa	Nenhum efeito	Negativo	
	<i>S. typhimurium</i> TA98, TA100, TA1535, TA1537	33– 6666 µg/placa Negativo a,b		Inconclusivo	
	<i>S. typhimurium</i> TA100, TA102	100–10000 µg/placa	Nenhum efeito	Negativo	
	<i>S. typhimurium</i> TA104	100–10000 µg/placa		Inconclusivo	
	<i>S. typhimurium</i> TA102, TA104	100–10000 µg/placa	Nenhum efeito	Negativo	
	<i>S. typhimurium</i> TA100	100–10000 µg/placa		Inconclusivo	

Quadro 27 - (continua) Ensaio de mutagenicidade do furfural.

Ensaio	Modelo teste	Concentração teste	Efeitos observados	Resultado	Ref
In vitro					
Aberração cromossômica	Células de ovário de hamster chinês	Up to 40 mmol/L (3840 mg)	Aberração cromossômica	Positivo	(62)
	Células de ovário de hamster chinês	3000 µg/ml	Aberração cromossômica	Positivo	
	Células de ovário de hamster chinês	500 µg/ml	Nenhum efeito	Negativo	
	Células de ovário de hamster chinês	1000–2000 µg/ml	Aberração cromossômica	Positivo	
	Células de ovário de hamster chinês	Up to 1230 µg/ml	Aberração cromossômica	Positivo	
Reparo de DNA	<i>B. subtilis</i> H17 (rec+) and M45 (rec-)	Up to 1000 µg	Nenhum efeito	Negativo	
	<i>B. subtilis</i> H17 (rec+) and M45 (rec-)	1700–17 000 µg/disc	Reparo de DNA	Positivo	
	<i>B. subtilis</i> H17 (rec+) and M45 (rec-)	0.6 ml	Nenhum efeito	Negativo	
Troca de cromátides irmãs	Células de ovário de hamster chinês	2500–4000 µg/ml	Troca de cromátides	Positivo	
	Linfocitos humanos	Up to 0,035 mmol/La	Nenhum efeito	Negativo	
	Linfocitos humanos	0,07– 0,14 mmol/Lc	Troca de cromátides	Positivo	
	Células de ovário de hamster chinês	Up to 1170 µg/ml	Troca de cromátides	Positivo	
In vivo					
Perda de cromossomo sexual	<i>D. melanogaster</i>	3750-5000ppm injeção	Perda de cromossomo sexual	Positivo	

## vii. Sensibilização dérmica

Quadro 28 - Ensaio de sensibilização dérmica do furfural.

Ensaio	Modelo teste	Concentração teste	Efeitos observados	Resultados	Referência
Sensibilização dérmica	humanos	2% de furfural em petrolatum sob oclusão durante 5 dias alternados por um período de 48 horas	nenhuma reação de sensibilização foi verificada	Ausência de reação de sensibilização	(49)
	Cobaias	Administração intradérmica de 0,1 ml de suspensão de furfural a 1,0% e posteriormente (3 semanas depois) 0,25, 0,5 e 1,0% de furfural com observação em 24 horas	Sensibilização dérmica observada em 1 dos três animais tratados com furfural	Resultado de sensibilização não conclusivo	(49, 64)
	Cobais	Administração intradérmica de furfural a 25% com observação em 24 e 48 horas	nenhuma reação foi verificada	Ausência de reação de sensibilização	(47)

## viii Irritação cutânea

Quadro 29 - Ensaios de sensibilização irritação cutânea do furfural.

Ensaio	Modelo teste	Concentração teste	Efeitos observados	Resultados	Referência
Irritação Cutânea	Cobaias	1% e 5%	Irritação intensa, mas de caráter reversível foi verificado em cobaias expostas a aplicações dérmicas de fural líquido durante 4 horas por dia, em um período de três dias. Já a aplicação de furfural sobre pele intacta por 4 horas durante 20 dias sucessivos resultou em hiperplasia, hiperqueratose e exfoliação da epiderme	5 % de furfural produziu uma reação de irritação suave e a aplicação de 1% de furfural não produziu nenhum sinal de irritação	(65)
	Coelhos	exposição dérmica de 0,5 ml de furfural (99,7%) por 4 horas	Com 72 horas, verificou-se um leve eritema em 1 dos animais e edema leve em 2 animais	O produto foi considerado levemente irritante	(47)
	Coelhos	Exposição dérmica de 45-500 mg/kg/dia tempo de 12 horas	Irritação leve nas concentrações de 45-500 mg/kg/dia e morte de todos os animais na dose de 100 mg/kg/dia no tempo de 12 horas	Estudo limitado, resultados não conclusivos	(60)

Quadro 30 - Ensaios de irritação ocular do furfural.

Ensaio	Modelo teste	Concentração teste	Efeitos observados	Resultados	Referência
Irritação ocular	Coelhos	0,1ml de furfural a 99,7% administrado no saco conjuntival e avaliado por 14 dias	opacidade da córnea e conjutivite	severa irritação ocular	(67)

## iv. Toxicidade Inalatória

Quadro 31 – Ensaio de toxicidade inalatória.

Ensaio	Modelo teste	Concentração teste	Efeitos observados	Resultados	Referência
CL <sub>50</sub> inalatório	ratos	-	letalidade	CL <sub>50</sub> de 4075 mg/m <sup>3</sup> após 1 hora de inalação	(60)
	ratos	-	letalidade	CL <sub>50</sub> de 600 e 924mg/m <sup>3</sup> após 4 horas de inalação	
	camundongos	-	letalidade	CL <sub>50</sub> de 490 mg/m <sup>3</sup> após 6 horas	

## x. Efeitos sobre a reprodução

Quadro 32 - Ensaios de efeitos sobre a reprodução do furfural.

Ensaio	Modelo teste	Concentração teste	Efeitos observados	Resultados	Referência
Efeitos sobre a reprodução	Ratas grávidas	furfural 10, 50, 100, 150, 250, 350, 500 ou 1000 mg/kg/dia do 6 ao 15° dia de gestação	Verificou-se mortes excessivas nas duas doses maiores, sendo administrado dosagem de 150, 250 e 350 mg/kg/dia nos grupos restantes. Em função das excessivas mortes, os animais que receberam dosagens de 250 e 350 mg/kg/dia foram sacrificados no do 6° dia. Para as demais fêmeas sobreviventes, verificou-se que o crescimento e sobrevivência intrauterina não foi afetada nas doses de 10-150 mg/kg, não ocorrendo variação no desenvolvimento fetal	NOAEL estabelecido para toxicidade materna foi de 100 mg/kg/dia	(57, 68-69)
	Ratas grávidas	furfural 50, 100 e 150 mg/kg/dia de furfural por gavagem do 6° ao 15° dia de gestação	Nas doses de 50, 100 e 150 mg/kg/dia de furfural do 6° ao 15 ° dia de gestação, ocorreu elevado número de mortes maternas. Sinais clínicos como exoftalmia bilatareal, tremores foram observados na concentração de 50 mg/kg/dia ou acima; perda de peso, hipoatividade, prostração, tremores, redução na defecação entre outros sinais clínicos foram observados na concentração de 150 mg/kg/dia.	NOAEL inferior a 50 mg/kg/dia para toxicidade materna e NOAEL de ao menos 100 mg/kg/dia para toxicidade no desenvolvimento fetal	(69-70)
	Coelhas	furfural 0, 25, 75 ou 225 mg/kg/dia durante o primeiro dia de gestação ao 28° dia.	Não se verificou alterações clínicas nas ratas grávidas e nem alterações relacionadas ao desenvolvimento fetal	NOAEL de 225 mg/kg/dia e LOAEL superior a 225 mg/kg/dia para a toxicidade relacionada ao desenvolvimento e NOAEL de 225 mg/kg/dia e LOAEL de 300mg/kg/dia para a toxicidade materna	(70)

## xi. Carcinogenicidade

Quadro 33 - Estudos de Carcinogenicidade do furfural.

Ensaio	Modelo teste	Concentração teste	Efeitos observados	Resultados	Referências
Carcinogenicidade	Camundongos	furfural 0, 50, 100 ou 175 mg/kg administrado por gavagem por 5 dias da semana durante 103 semanas.	A incidência de adenoma hepatocelular nos machos foi de 9/50 no grupo controle, 13/50 na dose mais baixa, 11/49 na dose mediana, 19/50 na dose mais elevada. Para as fêmeas a incidência de adenomas hepatocelulares foi de 1/50 no grupo controle, 3/50 na dose mais baixa, 5/50 na dose mediana, 8/50 na dose mais elevada. A incidência de adenomas hepatocelulares e de carcinomas combinados foi de 16/50 no grupo controle dos machos, 22/50 na dose mais baixa, 17/49 na dose mediana, 32/50 na dose mais alta e para as fêmeas foi de 3/50 na dose mais baixa, 7/50 na dose mediana, 12/50 na dose mais elevada	Incidência aumentada de inflamação crônica hepática relacionada à dose	(54)
	Ratos	furfural 0, 30, 60 mg/kg oral por 5 dias da semana durante 103 semanas	Necrose centrolobular hepática foi verificada nos ratos machos na seguinte proporção: 3/50 no grupo controle, 9/50 na dose mais baixa, 12/50 na dose mais alta. Nenhuma outra lesão foi verificada nos demais grupos de ratos machos e fêmeas	Freqüência aumentada de necrose centrolobular hepática relacionada à dose nos ratos machos	

b) Caracterização do risco para consumidores

Em geral os estudos toxicológicos conduzidos com o furfural em animais possuem limitações e nem todos os resultados podem ser extrapolados para humanos.

O furfural após exposição oral em ratos apresenta pelo menos 90% de absorção no trato gastro-intestinal. Sua eliminação é realizada através da urina (76-100%), fezes (2-7%) e transpiração (5-7%). Após exposição dérmica ao furfural líquido, cerca de 3µg de furfural por cm<sup>3</sup> de pele é absorvido pelos humanos. Após inalação em humanos, a meia-vida do furfural é de 2- 2,5 horas. Com base nesses dados tem-se que a 90% do furfural é absorvido quando administrado pela via oral e 100% pela via dérmica e inalatória (60).

O furfural é considerado elemento químico tóxico após exposição oral, inalatória e irritante ocular e elemento causador de irritação na pele a depender da concentração (para concentrações tão baixas quanto 0,1%, não se verifica sinais de irritação). Não apresenta, no entanto, capacidade sensibilizadora da pele. Quanto à genotoxicidade, o furfural não é genotóxico *in vivo*, mas é capaz de causar aberrações cromossômicas e mutação gênica *in vitro* (60).

Apesar dos estudos existentes, nenhum é considerado conclusivo quanto à carcinogenicidade do furfural. Sendo assim, não existem evidências adequadas em humanos quanto à carcinogenicidade do furfural, sendo esse composto classificado como pertencente ao grupo 3 (compostos cuja evidência de carcinogenicidade é inadequada em humanos e inadequada ou limitada em experimentos com animais) (71).

Em razão de o furfural apresentar genotoxicidade *in vitro*, mas ausência de genotoxicidade *in vivo* e devido às mutações relacionadas à proto-oncogenes nos tumores hepáticos em camundongos ocasionados pelo furfural diferirem daquelas avaliadas nos tumores hepáticos de camundongos do grupo controle, sugere-se que a indução de tumores ocorra por um mecanismo distinto do genotóxico (49).

A atividade carcinogênica do furfural após exposição oral não se encontra completamente elucidada uma vez que o componente de genotoxicidade *in vivo* aparentemente não se encontra envolvido. Os dados verificados nos estudos indicam que esses tumores surgem como um mecanismo secundário em consequência da hepatotoxicidade crônica (necrose hepatocelular) provocada pelo furfural, sendo mais pronunciados nos animais do sexo masculino e dose dependente e consequentemente nas doses em que não há toxicidade hepática, não aparecem os tumores (60, 62). Sendo assim, o NOAEL de 53 mg/kg/dia, definido para toxicidade hepática pode ser utilizado para a caracterização do risco de carcinogenicidade (60). A partir do NOAEL estabelecido para hepatotoxicidade definiu-se, também, um índice de ingestão diário aceitável (IDA) de 0,5 mg/kg de peso corporal (62). Quanto à toxicidade reprodutiva, o furfural não apresenta caráter teratogênico e nem efeitos sobre órgãos reprodutivos após exposição oral e por inalação (60).

## 5 INFORMAÇÕES GERAIS

Algumas alternativas podem ser aplicadas para minimizar a degradação do ácido ascórbico em formas farmacêuticas orais, injetáveis e de uso tópico.

O ácido ascórbico é muito instável sendo oxidado principalmente em condições aeróbicas (normalmente catalizada por cobre ou metais pesados), e em condições de fotoexposição, diante de umidade entre outras (20). A fim de minimizar essa degradação em formas farmacêuticas sólidas é comum o emprego de excipientes anidros e no caso de cápsulas, por exemplo, a utilização de invólucros hidrofóbicos (72).

Para formas farmacêuticas em solução e em formulações tópicas, a fim de aumentar a estabilidade da molécula, pode ser adotada a estratégia de modificação da molécula via esterificação com ácidos orgânicos e inorgânicos de cadeia longa. Outra estratégia adotada consiste na introdução de um grupamento fosfórico na posição 2 da molécula, impedindo a quebra do sistema enediol (20).

Em formulações tópicas dermatológicas apresentadas como emulsões é possível aumentar a estabilidade utilizando o sistema emulsionante água- óleo- água ao invés do emprego do sistema água-óleo (73).

A vitamina c quando degradada em formulações parenterais, leva à alteração da coloração da solução. A estabilidade da vitamina C em soluções aquosas pode ser comprometida principalmente pela presença do CO<sub>2</sub>. Assim o contato do ativo com o CO<sub>2</sub> pode ser minimizado utilizando os seguintes procedimentos: durante a manufatura, substituir a solução de NaHCO<sub>3</sub> ou Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> por solução de NaOH, no momento de ajustar o pH. Utilizar água previamente levada à ebulição para remover o CO<sub>2</sub> dissolvido, eliminar ar nas ampolas utilizando nitrogênio ao invés de CO<sub>2</sub>. Nessas condições o pH ótimo para a estabilidade seria de 8 (74).

## 6 - LISTA DE REFERÊNCIAS CITADAS NA MONOGRAFIA

1. Sigma Aldrich. Ficha de informações de segurança de produtos químicos. Ácido ascórbico. 2011.
2. Eitenmiller RR, Ye L, Landen W. Vitamin analysis for the health and food sciences: CRC; 1999.
3. Farmacopeia Brasileira 5ed. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Fundação Oswaldo Cruz.; 2010. p. 570-2.
4. Matei N, Birghila S, Popescu V, Dobrinas S, Soceanu A, Oprea C, et al. Kinetic study of Vitamin C degradation from pharmaceutical products. Romania Journal of Phys. 2008;53:343-51.
5. Sweetman SC. The complete drug reference. 37 ed. London: Pharmaceutical Press; 2011.
6. Wannmacher L. Vitamina C: seis problemas em busca de uma solução. Uso Racional de Medicamentos: Temas selecionados: Ministério da Saúde; 2006.
7. Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary Reference Intakes of the Food and Nutrition Board. Dietary Reference Intakes for vitamin C, vitamin E, selenium, and carotenoids. Washington DC: National Academy Press; 2000.
8. Food and Nutrition Board, Institute of Medicine, National Academies. Dietary Reference Intakes (DRIs): Recommended Dietary Allowances and Adequate Intakes, Vitamins National Academy of Sciences. <http://www.iom.edu>. Accessed 05 dezem 2011.
9. Food Standards Agency. FSA Nutrient and Food Based Guidelines for UK Institutions. 2006.
10. The British National Formulary for Children. London: BMJ; 2009.

11. Hemilä H, Herman ZS. Vitamin C and the Common Cold: A Retrospective Analysis of Chalmers' Review. *Journal of the American College of Nutrition*. 1995;14(2):116-23.
12. Levine M, Rumsey SC, Daruwala R, Park JB, Wang Y. Recommendations for Vitamin C intake. *JAMA*. 1999;281(15):1415-23.
13. The United States Pharmacopeial Convention (USP 34-NF 29). Ascorbic acid. 2011. p. 1929-30.
14. British Pharmacopeia. 1 ed: Stationary Office Books; 2010. p. 176, 2377-8.
15. European Pharmacopeia. Supplement 6.6 to the 6th edition. Directorate for the Quality of Medicines & Healthcare of the Council of Europe (EDQM); 2010. p. 5203.
16. Kirk-Othmer. *Encyclopedia of Chemical Technology*. 5th ed. New Jersey: John Wiley & Sons; 2007.
17. Connors KA, Amidon KL, Stella VJ. *Chemical Stability of Pharmaceuticals*. 2 ed. New York: Wiley; 1986.
18. Yoshioka S, Stella VJ. *Stability of Drugs and Dosage Forms*. New York: Kluwer Academic Publishers/Plenum Publishers; 2000.
19. Sheraz MA. *Formulation and stability of ascorbic acid in liquid and semisolid preparations*. Karachi, Pakistan 2009.
20. Austria R, Semenzato A, Bettero A. Stability of vitamin C derivatives in solution and topical formulations. *J Pharm Biomed Anal*. 1997;15(6):795-801.
21. Ahuja S. *Impurities evaluation of pharmaceuticals*. New York: Marcel Dekker; 1998.
22. Fornaro A, Coichev N. Ácido L-ascórbico: reações de complexação e de óxido-redução com alguns íons metálicos de transição. *Química Nova*. 1998;21(5):643.
23. Shaik RH. *Riboflavin Sensitized Photodegradation of Ascorbic Acid*: University of Karachi; 1996.
24. Yuan J, Chen F. Degradation of ascorbic acid in aqueous solution. *Journal of agricultural and food chemistry*. 1998;46(12):5078-82.
25. Sawamura M, Takemoto K, Matsuzaki Y, Ukeda H, Kusunose H. Identification of two degradation products from aqueous dehydroascorbic acid. *Journal of agricultural and food chemistry*. 1994;42(5):1200-3.
26. Tatum J, Shaw P, Berry R. Degradation products from ascorbic acid. *Journal of agricultural and food chemistry*. 1969;17(1):38-40.
27. Kellie A, Zilva S. The photochemical decomposition of l-ascorbic acid. *Biochemical Journal*. 1938;32(9):1561.
28. Kwon B, Foote C. Chemistry of singlet oxygen. Hydroperoxide intermediates in the photooxygenation of ascorbic acid. *J Am Chem Soc*. 1988;110:6582-3.
29. Sigma Aldrich. *Ficha de informações de segurança de produtos químicos*. Furfural. 2011.
30. Sigma Aldrich. *Ficha de informações de segurança de produtos químicos*. Ácido oxálico. 2011.
31. Sigma Aldrich. *Ficha de informações de segurança de produtos químicos*. Ácido L-treônico. 2011.

32. Sigma Aldrich. Ficha de informações de segurança de produtos químicos. Ácido desidroascórbico. 2011.
33. Chembase. 2,3 Diketogulonic acid. <http://www.chembase.com/>. Accessed 15 dezemb 2011.
34. ChemIDplus Advanced. 3-Hydroxy-2-pyridone United States National Library of Medicine. <http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/>. Accessed 15 dezemb 2011.
35. ChemicalBook.L-Threonolactone.2008. [http://www.chemicalbook.com/Search\\_EN.aspx?keyword=21730-93-8](http://www.chemicalbook.com/Search_EN.aspx?keyword=21730-93-8). Accessed 15 dezemb 2011.
36. ChemicalBook.3,4-dihydroxy-5-methyl-2-furanone.2008. [http://www.chemicalbook.com/ProdSupplierGNCB7332832\\_EN.htm](http://www.chemicalbook.com/ProdSupplierGNCB7332832_EN.htm). Accessed 15 dezemb 2011.
37. Sigma Aldrich. Ficha de informações de segurança de produtos químicos. Ácido acético glacial. 2011.
38. Sigma Aldrich. Ficha de informações de segurança de produtos químicos. 2-Furil metil cetona. 2011.
39. Sigma Aldrich. Ficha de informações de segurança de produtos químicos. Álcool furfurílico. 2011.
40. ChemIDplus Advanced.Gamma-Butyrolactone United States National Library of Medicine. <http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/> Accessed 15 dezemb 2011
41. ChemIDplus Advanced.2(5H)-Furanone United States National Library of Medicine. <http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/>. Accessed 15 dezemb 2011.
42. Sigma Aldrich. Ficha de informações de segurança de produtos químicos. Metil ciclopentenolona. 2011.
43. Sigma Aldrich. Ficha de informações de segurança de produtos químicos. Furoin. 2011.
44. ChemIDplus Advanced. 2,2' furil. United States National Library of Medicine. <http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/>. Accessed 15 dezemb 2011.
45. Chemical Sources Association. 2-(furan-2-ylmethyl)furan. CSA Webmaster Copyright 2010. <http://www.thegoodscentcompany.com/data/rw1586991.html>. Accessed 15 dezemb 2011.
46. Rana MD. Acute Oral Toxicity Study of Furfural in Rats.Study No. 3884 dated 1 Cl-24-02. Jai Research Foundation, Department of Toxicology, Valvada, Valsad, Gujarat, India2002.
47. Joseph SA. Acute Dermal Toxicity Study of Furfural in Rats Study No 3950 dated 5-23-03. Jai Research Foundation, Department of Toxicology, Valvada, Valsad, Gujrat, India.2003.
48. Decos. Health Council of the Netherlands: Dutch Expert Committee on Occupational Standards. Health-based recommended occupational exposure limit for furfural, draft report. The Hague: Health Council of the Netherlands1996.
49. Opinion of the scientific committee on cosmetic products and non-foodproducts intended for consumers. Adopted by the SCCNFP during the 28th plenary meeting of 25 May 2004.
50. Moreno, O. Dermal toxicity in rabbits. Report No. MB 75-941 from MB Research Laboratories Inc. Submitted to WHO by the Flavor & Extract Manufactures Association of the Association of the United States. 1976.
51. Shimizu A, Kanisawa M. Experimental studies on hepatic cirrhosis and hepatocarcinogenesis, I. Production of hepatic cirrhosis by furfural administration. Acta Pathol Jpn. 1986;36(7):1027- 38.

52. Chengelis, CP. A 28-day repeated dose oral toxicity study of furfural in rats. . Ashland (OH): Wil Research Laboratories, Inc. Project number WILL-123671997.
53. Arts J, Muijser H, Appel M, Frieke Kuper C, Bessems J, Woutersen R. Subacute (28-Day) Toxicity of Furfural in Fischer 344 Rats: a Comparison of the Oral and Inhalation Route. *Food and Chemical Toxicology*. 2004;42:1389-99.
54. National Toxicology Program. Toxicology and carcinogenesis studies of 2,6 xylydine (CAS No.87-62-7) in Charles River CD Rats (feed studies). National Toxicology Program Technical Report Series Research. North Carolina 1990.
55. Jonker D. Dose range finding study (14-day) with micro-encapsulated furfural in F344rats. Unpublished report V98.1173 from TNO, Zeist, Netherlands. Submitted to WHO by the Flavor and Extract Manufacturers' Association of the United States. 2000.
56. Jonker D. Sub-chronic (13-week) oral toxicity study in rats with micro-encapsulated furfural. Unpublished report V99.520 from TNO, Zeist, Netherlands. Submitted to WHO by the Flavor and Extract Manufacturers' Association of the United States. 2000.
57. Scientific Committee on Food , working group on flavourings , European Commission. Opinion of the Scientific Committee on Food on furfural and furfural diethylacetal 2003.
58. Shimizu A, Nakamura Y, Harada M, Ono T, Sato K, Inoue T, et al. Positive Foci of Glutathione S-transferase Placental form in the Liver of Rats given Furfural by Oral Administration. *Jpn J Cancer Research*. 1989;80:608-11.
59. Velickovic D, Milenkovic S, Stojanovic D. Enzymochemical and biochemical changes in the liver of rats induced by furfural. *Acta Medica Medianae*. 2011;50(2):34-8.
60. Netherlands Organization for Applied Scientific Research (TNO) and the National Institute of Public Health and the Environment (RIVM). Risk assessment. 2-Furaldehyde (Furfural), CAS-No.: 98-01-1, EINECS-No.: 202-627-7. 2008.
61. Environment Canada, Health Canada. Screening Assessment for the Challenge, 2-Furancarboxaldehyde (Furfural), Chemical Abstracts Service Registry Number 98-01-1. 2011.
62. European Food Safety Authority. Panel on Food Contact Materials, Enzymes, Flavourings and Processing Aids (CEF). *EFSA Journal* 2011;9(3):1-30.
63. International Programme on Chemical Safety. Safety evaluation of certain food additives. Furfural. World Health Organization, Geneva 1999.
64. Watanabe K, Matsuda M, Furuhashi S, Kimura T, Matsunaga T, Yamamoto I. Skin reaction induced by aldehydes for food flavoring agents. *Journal of Health Science*. *Journal of Health Science*. 2001;47(3):327-9.
65. International Programme on Chemical Safety. Concise International Chemical Assessment Document 21. 2-Furaldehyde. World Health Organization, Geneva 2000.
66. Mishra A. Furfural: a toxic chemical. *Agric Biol Res*. 1992;8:93-104.
67. Joseph SA. Acute Eye Irritation Study of Furfural in Rabbits. Study No. 3952 Jai Research Foundation. Department of Toxicology, Valvada, Valsad, Gujrat, India. 2003.
68. Nemec A. Dose range-finding developmental toxicity study of furfural in rats. WIL Research Laboratories Inc., Laboratory study number WIL-12377, Ashland 1997.
69. Nemec A. Developmental toxicity study of furfural in rats. WIL Research Laboratories Inc., Laboratory study number WIL-12378, Ashland 1997.

70. United States Environmental Protection Agency. Furfural. Revised Human Health Risk Assessment for Greenhouse Soil Fumigation with a New Active Ingredient. Washington, D.C.2006.
71. International Agency for Research on Cancer. Furfural. Dry cleaning, some chlorinated solvents and other industrial chemicals. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic risk to Humans 1995. p. 409-29.
72. Anthony B, Shephard A, Steven C, Nichols B, Alan Braithwaite A. Moisture induced solid phase degradation of L-ascorbic acid part 3, structural characterisation of the degradation products. Atlanta. 1998;48:607-22.
73. Gallarate M, Carlotti ME, Trotta M, Bovo S. On the stability of ascorbic acid in emulsified systems for topical and cosmetic use. International Journal of Pharmaceutics 1999;188:233-41.
74. Zhan X, Yin G, Ma B. Improved stability of 25% vitamin C parenteral formulation. International Journal of Pharmaceutics 1998;173:43-9.

## 6.5 LEVANTAMENTO DE FORMAS FARMACÊUTICAS REGISTRADAS COM O ATIVO ÁCIDO ASCÓRBICO

O ácido ascórbico encontra-se presente em diversas classes terapêuticas e formas farmacêuticas. Destaca-se sua presença principalmente na classe terapêutica das vitaminas e na forma farmacêutica de comprimido, representando, respectivamente, 85% e 43% das 491 apresentações registradas na ANVISA (Figura 3 e 4).



Figura 3 - Classes terapêuticas das especialidades farmacêuticas contendo ácido ascórbico que em algum momento obtiveram registro na Anvisa



Figura 4 - Formas farmacêuticas dos medicamentos contendo ácido ascórbico que em algum momento obtiveram registro na Anvisa.

Quanto às embalagens primárias dessas formas farmacêuticas, 69% dos produtos registrados encontram-se acondicionados em embalagens primárias fotoprotetoras (ampola de vidro âmbar, frasco de vidro âmbar, frasco plástico opaco, strip de alumínio, envelope de alumínio, blíster de alumínio plástico opaco) enquanto 20% se encontram acondicionadas em embalagem primária incolor (ampola de vidro incolor, blíster alumínio plástico incolor, frasco de vidro incolor) e 11% apresentavam dados inconclusivos quanto ao acondicionamento (não havia especificação do material de embalagem se opaco, âmbar ou incolor) Figura 5.

## 7 DISCUSSÃO

A presença dos produtos de degradação mesmo que em pequena quantidade pode influenciar na segurança dos produtos farmacêuticos devido ao fato de serem potenciais causadores de efeitos adversos em pacientes, principalmente quando possuem estrutura química notadamente conhecida por sua carcinogenicidade e ou genotoxicidade (3).

Ao mesmo tempo em que existem produtos de degradação de caráter tóxico, há também aqueles que são inócuos a depender da concentração na qual se encontram presentes no insumo ativo ou forma farmacêutica. Nesse sentido, é importante essa diferenciação, para a aplicação de tratamento adequado a essas impurezas. Um produto de degradação que não representa risco sanitário não deve ser tratado de forma idêntica àquele produto que possui risco associado.

Diante de uma impureza de caráter tóxico, deve-se tentar eliminá-la ou minimizá-la, seja através de alterações na rota de síntese do ativo, alteração dos intermediários utilizados na síntese, alterações na fabricação do medicamento, excipientes, materiais de embalagem, cuidados de conservação entre outros (62). Diante da impossibilidade de eliminação dessa impureza, deve-se mensurar o risco relacionado à sua ingestão, e se a quantidade ingerida atende os limites definidos nos guias regulatórios mundialmente conhecidos.

A qualificação de um produto de degradação quando realizada através da condução de ensaios toxicológicos é uma alternativa onerosa. Na maioria das vezes, os padrões de qualidade dessas impurezas de degradação não se encontram disponíveis, demandando a necessidade do isolamento, caracterização e posterior qualificação do produto de degradação, processo de custo elevado e que demanda tempo considerável.

O fabricante do medicamento ao iniciar o processo de desenvolvimento, deve definir o perfil de impurezas e um método indicador de estabilidade adequado. A definição desse perfil é necessária a fim de estabelecer a origem das impurezas encontradas no medicamento, já que essas podem ser relacionadas ao processo de síntese, à degradação do ativo entre outros (19).

O método indicador de estabilidade deve ser capaz de mensurar o ativo farmacêutico diante de todas as impurezas presentes no mesmo (método específico)

ou mensurar tanto o ativo farmacêutico quanto impurezas existentes (método seletivo). A escolha do método mais adequado deverá ser realizada conforme o propósito do pesquisador (12).

A melhor forma de evitar a condução de estudos toxicológicos quando diante da necessidade de qualificação de um produto de degradação é investir na pesquisa e desenvolvimento de formulações robustas, seguindo o conceito “*quality by design*”. Esse princípio seria pautado pelo estabelecimento de parâmetros de qualidade e controle das alterações que possam influir negativamente no processo fabril, consolidando, dessa forma, a qualidade do produto fabricado ao longo do tempo (71). Investimento em pesquisa e desenvolvimento também é fundamental para a fabricação de um medicamento com parâmetros de qualidade, segurança e eficácia (72).

Atualmente existe uma série de ferramentas úteis para o setor de pesquisa e desenvolvimento que contemplam informações científicas a cerca dos compostos químicos pesquisados. Podem ser utilizadas como ferramentas as bases de dados que contêm informações toxicológicas e referentes à degradação, bem como programas que permitem avaliar potenciais estruturas químicas alertas para genotoxicidade (50-51).

Ressalta-se, também, a importância dos guias regulatórios existentes e que deverão ser considerados no momento de formulação dos medicamentos. Esses guias trazem os principais limites a serem adotados para as impurezas presentes nos medicamentos a serem registrados conforme a legislação local do país específico. Esses guias regulatórios de diversos países têm apresentado uma harmonização dos parâmetros adotados para o assunto “degradação em medicamentos” como pode ser verificado nos guias adotados pela comunidade europeia, asiática, África do sul, Estados Unidos, Austrália, Canadá, Brasil (7, 57, 65, 67-68).

Grande parte das informações existentes sobre degradação de medicamentos não se encontram consolidadas em documentos únicos, boa parte delas estão disponíveis em bases de dados ou em informações científicas literárias que ora trazem apenas a rota de degradação de um determinado ativo e formulação farmacêutica, ora a identificação e caracterização das impurezas de degradação, e em menor quantidade documentos que contemplam o conjunto de informações

agrupadas (rotas de degradação, identificação, caracterização e qualificação dos produtos de degradação).

A maioria dos trabalhos existentes é disponibilizada pela própria indústria farmacêutica, detentora dos padrões e das informações e referentes à síntese dos ativos farmacêuticos e das impurezas de degradação, haja vista, o elevado custo inerente a síntese e caracterização dos padrões de impurezas de degradação que muitas vezes impossibilita que pesquisadores de universidades ou outros centros de pesquisa particulares possam conduzir tais estudos.

Nesse sentido, a existência de monografias que contemplem informações sobre rotas de degradação de ativos farmacêuticos, principais produtos de degradação formados e informações toxicológicas relevantes a cerca de produtos descritos em literatura é útil no momento do desenvolvimento de uma formulação. Essas monografias podem indicar um caminho a ser traçado no momento do desenvolvimento de uma formulação e nos estudos de estabilidade adotados para o produto fabricado.

Como exemplo clássico desse trabalho utilizou-se a vitamina C a fim de validar a proposta de monografia. Esse composto aparentemente inócuo e amplamente utilizado pela população possui 491 formas farmacêuticas que já obtiveram registro na Agência Nacional de vigilância Sanitária em algum momento, podendo hoje encontrar-se ou não com seu registro vigente.

Entre as formas farmacêuticas registradas encontram-se comprimidos simples e revestidos, pastilhas, drágeas, comprimidos efervescentes, soluções e suspensões orais, soluções de uso tópico dermatológicas, xaropes, soluções injetáveis, drágeas, elixir, granulados, pó injetáveis, pó orais e efervescentes, destacando-se o maior número de registros da forma farmacêutica comprimidos simples e revestidos (43%), seguidos das drágeas (14%), soluções orais (13%) e comprimidos efervescentes (12%) (Figura 4). O ácido ascórbico encontra-se presente em várias categorias terapêuticas como analgésicos, antiinfeciosos, estimulantes do apetite, neurotônicos, produtos para terapia sintomática da gripe, produtos a base de cálcio, produtos ginecológicos, reidratantes parenterais, produtos para dietas especiais sendo que a classe terapêutica na qual o ácido ascórbico se encontra presente em maior quantidade são as vitaminas (85%) seguidas dos antianêmicos (6%) (Figura 3).

O ácido ascórbico possui mais de 20 produtos de degradação descritos em literatura. Alguns desses produtos contituem produtos de degradação expressivos que possuem ampla informação toxicológica disponibilizada em trabalhos científicos, como o caso do furfural, produto de degradação utilizado para a construção do modelo proposto por esse trabalho. Outros produtos de degradação não possuem informações disponibilizadas ou os dados toxicológicos não atestam risco sanitário.

O furfural possui limites estabelecidos como NOAEL para toxicidade hepática, IDA, genotoxicidade *in vitro*, dose letal oral significativa em ratos e dados inconclusivos quanto à carcinogenicidade. Grande parte dos guias regulatórios existentes sobre o furfural traz recomendações robustas referentes à sua presença em alimentos, produtos cosméticos, mas não em medicamentos (73). No entanto, os dados avaliados direcionam para uma postura de cautela em medicamentos que possam conter o ativo ácido ascórbico e o produto de degradação furfural em concentrações significativamente elevadas e acima dos limites definidos para toxicidade hepática e ingestão diária aceitável.

As monografias farmacopeicas (Farmacopeia Brasileira, Farmacopeia Americana) não trazem recomendações quanto ao controle dessa impureza no ativo e formas farmacêuticas que contenham o ácido ascórbico, já a Farmacopeia Britânica e a Farmacopeia Europeia trazem limites para o controle dessa impureza no insumo farmacêutico ativo (74-77). Existem trabalhos publicados que trazem alternativas a fim de aumentar a estabilidade das formulações desenvolvidas contendo o ácido ascórbico e essas vias são muito úteis no momento do desenvolvimento, pois permitem traçar estratégias que minimizam a degradação do medicamento e garantem a estabilidade desse ao longo da sua vida útil (78-79).

Nesse sentido, as monografias têm o papel de fornecer informações consolidadas referentes a produtos de degradação que possam originar de um ativo farmacêutico quando exposto a condições específicas de estresse. Essas monografias servem de informação para os trabalhos de pesquisa e desenvolvimento e até mesmo para a avaliação das documentações de registro de medicamentos submetidas às diversas agências reguladoras. Indicando em alguns casos, quando da presença de dados toxicológicos relevantes do produto de degradação, a tomada de conduta de prevenção, eliminação ou redução do produto de degradação para níveis considerados seguros.

## 8 CONCLUSÃO

Com a elaboração da monografia a cerca da degradação da vitamina C pode-se concluir, que até mesmo uma substância aparentemente inócua pode implicar em risco sanitário quando degradada e a depender da quantidade e perfil do produto de degradação formado. No entanto, verifica-se também que nem todo produto de degradação formado possui risco sanitário associado, sendo assim, as condutas sob o ponto de vista regulatório devem ser aplicadas caso a caso a depender do produto de degradação e da quantidade formada.

Independentemente dos produtos de degradação formados, a fabricante do medicamento deve deter um amplo conhecimento do produto que almeja registrar, o implica em conhecer profundamente o comportamento e perfil de impurezas desse produto.

Esse trabalho traz uma proposta válida para sistematização de informações de segurança de produtos de degradação. A publicação dessas monografias permitirá a disseminação de informações disponíveis sobre produtos de degradação com atividade toxicológica relevante, facilitando a tomada de decisões quando da presença desses produtos em medicamentos formulados e submetidos ao registro nas agências reguladoras.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Rao N, R.Nagaraju V. An overview of the recent trends in development of HPLC methods for determination of impurities in drugs. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 2003;33(3):335-77.
2. Ahuja SS. Assuring quality of drugs by monitoring impurities. *Advanced drug delivery reviews*. 2007;59(1):3-11.
3. Rao NR, Kiram SSM, N.L. P. *Pharmaceutical Impurities: An Overview*. Indian JPharm Educ Res. 2010;44(3):301-10.
4. Smith RJ, Webb ML. *Analysis of drug impurities*: Wiley-Blackwell; 2008.
5. Klick S, Muijselaar PG, Waterval J, Eichinger T, Korn C, Gerding TK, et al. Stress testing of drug substances and drug products. *Pharmaceutical Technology*. 2005.
6. Ahuja S. Overview: Isolation and Characterization of Impurities. In: Ahuja S, Alsante KM, editors. *Handbook of isolation and characterization of impurities in pharmaceuticals*. San Diego: Academic Press; 2003. p. 1-24.
7. International Conference on Harmonisation Harmonised Tripartite Guideline: Impurities in New Drug Products Q3B (R2) (Revised Guideline). 2006.
8. Bartos D, Gorog S. Recent Advances in the Impurity Profiling of Drugs. *Current Pharmaceutical Analysis*. 2008;4(4):215-30.
9. Baertschi SW. Analytical methodologies for discovering and profiling degradation-related impurities. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2006;25(8):758-67.

10. Silva K, Alves LDS, Soares M, Passos R, Faria A, Rolim Neto P. Modelos de Avaliação da Estabilidade de Fármacos e Medicamentos para a Indústria Farmacêutica. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*. 2009;30(2):129-35.
11. Kommanaboyina B, Rhodes C. Trends in stability testing, with emphasis on stability during distribution and storage. *Drug development and industrial pharmacy*. 1999;25(7):857-68.
12. Singh S, Bakshi M. Development of validated stability- indicating assay methods- critical review. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 2002;28:1011- 40.
13. Baertschi SW. Forced Degradation and Its Relation to Real Time Drug Product Stability. In: Huynh-Ba K, editor. *Pharmaceutical Stability Testing to Support Global Markets*. New York: Springer; 2010. p. 107-16.
14. Food and Drug Administration. Guidance for Industry Analytical Procedures and Methods Validation. Chemistry, Manufacturing, and Controls Documentation (Draft Guidance). 2000.
15. Alsante KM, Ando A, Brown R, Ensing J, Hatajik TD, Kong W, et al. The role of degradant profiling in active pharmaceutical ingredients and drug products. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2007;59(1):29-37.
16. Drug Degradation Database CambridgeSoft Corporation. 2004. <http://d3.cambridgesoft.com/>. Accessed 02 novem 2011.
17. Dolan DG, Naumann BD, Sargent EV, Maier A, Dourson M. Application of the threshold of toxicological concern concept to pharmaceutical manufacturing operations. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2005;43(1):1-9. doi: 10.1016/j.yrtph.2005.06.010.

18. Kats M. Forced degradation studies: regulatory considerations and implementation. Advanstar Communications, Inc.; 2005.
19. Singh S, Bakshi M. Guidance on conduct of stress tests to determine inherent stability of drugs. *Pharm Technol.* 2000;24:1-14.
20. World Health Organization. Expert Committee on specifications for Pharmaceutical Preparations. Pharmaceutical Development (or preformulations studies). In: Expert Report Series. Geneva W, editor. 2005.
21. Waterman KC, Adami RC. Accelerated aging: Prediction of chemical stability of pharmaceuticals. *International Journal of Pharmaceutics.* 2005;293(1-2):101-25.
22. Baertschi SW, Jansen PJ. Stress Testing: a Predictive Tool. In: Baertschi SW, editor. *Pharmaceutical Stress Testing : Predicting Drug Degradation.* New York: Taylor & Francis; 2005. p. 13-44.
23. Argentine MD, Owens PK, Olsen BA. Strategies for the investigation and control of process-related impurities in drug substances. *Adv Drug Deliv Rev.* 2007;59(1):12-28. doi: 10.1016/j.addr.2006.10.005.
24. Pilaniya K, Chandrawanshi HK, Pilaniya U, Manchandani P, Jain P, Singh N. Recent trends in the impurity profile of pharmaceuticals. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research.* 2010;3(1):302-10.
25. Basak AK, Raw AS, Al Hakim AH, Furness S, Samaan NI, Gill DS, et al. Pharmaceutical impurities: regulatory perspective for Abbreviated New Drug Applications. *Adv Drug Deliv Rev.* 2007;59(1):64-72. doi: 10.1016/j.addr.2006.10.010.
26. Jacobson-Kram D, McGovern T. Toxicological overview of impurities in pharmaceutical products. *Adv Drug Deliv Rev.* 2007;59(1):38-42. doi: 10.1016/j.addr.2006.10.007.

27. Skett P. Low-level measurement of potent toxins. In: Smith R, Webb M, editors. *Analysis of Drug Impurities*. 1 ed. UK: Blackwell Publishing; 2007. p. 82-886.
28. Klaunig JE, Kamendulis LM. Chemical Carcinogens. In: Klaassen CD, editor. *Casarett & Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons*. New York: McGraw-Hill; 2008. p. 329-80.
29. Dobo KL, Greene N, Cyr MO, Caron S, Ku WW. The application of structure-based assessment to support safety and chemistry diligence to manage genotoxic impurities in active pharmaceutical ingredients during drug development. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2006;44(3):282-93. doi: 10.1016/j.yrtph.2006.01.004.
30. Muller L, Mauthe RJ, Riley CM, Andino MM, Antonis DD, Beels C, et al. A rationale for determining, testing, and controlling specific impurities in pharmaceuticals that possess potential for genotoxicity. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2006;44(3):198-211. doi: 10.1016/j.yrtph.2005.12.001.
31. International Agency for Research on Cancer. Agents classified by the IARC monographs, volumes 1- 102. 2011. <http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/index.php>. Accessed 05 dezemb 2011.
32. Leite, M. A. L, Amorin, L.C.A. Noções Básicas de Toxicologia Depto. Análises Clínicas e Toxicológicas Faculdade de Farmácia Universidade Federal de Minas Gerais 2006. <http://pt.scribd.com/doc/18709615/nocoos-de-toxicologia>. Accessed 02 dezemb 2011.
33. Souza JPd. Toxicidade aguda e risco ambiental do diflubenzuron para *daphnia magna*, *poecilia reticulata* e *lemna minor* na ausência e presença de sedimento. Jaboticabal, São Paulo Universidade Estadual Paulista “Júlio de mesquita filho”; 2008.
34. AltTox.org. Acute System Toxicity 2007. <http://alttox.org/ttrc/toxicity-tests/acute/>. Accessed 05 dezemb 2011.

35. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Gerência de Avaliação de Segurança e Eficácia – GESEF. Guia para a condução de estudos não clínicos de segurança necessários ao desenvolvimento de medicamentos. Brasília, DF: Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária; 2010.
36. Organisation for Economic Co-operation and Development .OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. OECD 407: 28-Days Repeated Dose Subacute Oral Toxicity / Rat. 2008. [http://www.oecd-ilibrary.org/environment/oecd-guidelines-for-the-testing-of-chemicals-section-4-health-effects\\_20745788](http://www.oecd-ilibrary.org/environment/oecd-guidelines-for-the-testing-of-chemicals-section-4-health-effects_20745788). Accessed 04 Dezem 2011.
37. Organisation for Economic Co-operation and Development .OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. OECD 410: 28-Days Repeated Dose Subacute Dermal Toxicity / Rat 2008. [http://www.oecd-ilibrary.org/environment/oecd-guidelines-for-the-testing-of-chemicals-section-4-health-effects\\_20745788](http://www.oecd-ilibrary.org/environment/oecd-guidelines-for-the-testing-of-chemicals-section-4-health-effects_20745788). Accessed 04 dezemb 2011.
38. Gad SC. Drug safety evaluation. 2 ed. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons; 2002.
39. Duffus JH, Templeton DM, Nordberg M. Concepts in Toxicology. Cambridge, UK: RSC Publishing; 2009.
40. Chorilli M, Tamascia P, Rossim C, Salgado HRN. Ensaios biológicos para avaliação de segurança de produtos cosméticos. Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada. 2009;30(1):19-30.
41. Internacional Conference on Harmonization. Tripartite Guideline: Need for Carcinogenicity Studies of Pharmaceuticals ICH S1A. 1996.
42. Food and Drug Administration. Bacterial Reverse Mutation Test.Toxicological Principles for the Safety Assessment of Food Ingredients. In: Redbook 2000, cap IV. c.1.a. 2003.

43. Tejs S. The Ames test: a methodological short review. *Environ Biotechnol.* 2008;4(1):7-14.
44. Food and Drug Administration. In vitro Mammalian Chromosomal Aberration Test. *Toxicological Principles for the Safety Assessment of Food Ingredients.* In: Redbook 2000, cap IV. c.1.b. 2003.
45. Food and Drug Administration. Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Gene Mutation Assay. *Toxicological Principles for the Safety Assessment of Food Ingredients.* In: Redbook 2000, cap IV .c.1.c. 2003.
46. Zhu S, Korytynski E, Sharma S. Genotoxicity assays of ammonium dinitramida I- Salmonella/microsome Mutagenis II-Mouse Lymphoma Cell Mutagenesis III. In Vivo Mouse Bone Marrow Micronuclei Test.. *Man Tech Environmental Technology ,Inc.Cellular and Molecular Toxicology Program. United States Air Force Armstrong Laboratory.* 1994.
47. Food and Drug Administration. Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test. *Toxicological Principles for the Safety Assessment of Food Ingredients.* In: Redbook 2000, cap IV. c.1.d. 2003.
48. Silva Jd. O uso do ensaio cometa para o ensino de genética toxicológica. *Genética na Escola*2007. p. 30-3.
49. Jena G, Kaul C, Ramarao P. Genotoxicity testing, a regulatory requirement for drug discovery and development: Impact of ICH guidelines. *Indian J Pharmacol.* 2002;34(2):86-99.
50. Snyder RD, Smith MD. Computational prediction of genotoxicity: room for improvement. *Drug Discov Today.* 2005;10(16):1119-24. doi: 10.1016/S1359-6446(05)03505-1.

51. Muster W, Breidenbach A, Fischer H, Kirchner S, Muller L, Pahler A. Computational toxicology in drug development. *Drug Discov Today*. 2008;13(7-8):303-10. doi: 10.1016/j.drudis.2007.12.007.
52. Toxinet Database U.S. National Library of Medicine, 8600 Rockville Pike, Bethesda, MD 20894 <http://toxnet.nlm.nih.gov/>. Accessed 03 november 2011.
53. NIOSH Database Centers for Disease Control and Prevention 1600 Clifton Rd. Atlanta, GA 30333, USA. <http://www.cdc.gov/niosh/>. Accessed 03 novem 2011.
54. GESTIS Database Institute of Occupational safety and Health (IFA), Sankt Augustin ,Germany. <http://www.dguv.de/ifa/en/gestis/index.jsp>. Accessed 03 november 2011.
55. Sweetman SC. The complete drug reference. 37 ed. London: Pharmaceutical Press; 2011.
56. Arrais PSD, Coelho HLL, Batista MCDS, Carvalho ML, Righi RE, Arnau JM. Perfil da automedicação no Brasil. *Revista de Saúde Pública*. 1997;31(1):71-7.
57. International Conference on Harmonisation Harmonised Tripartite Guideline: Impurities in New Drug Substances Q3A (R2) (Revised Guideline). 2006.
58. Internacional Conference on Harmonization. Tripartide Guideline: Stability Testing of New Drug Substances and Products Q1A (R2) (Revised Guideline). 2003.
59. International Conference on Harmonisation Harmonised Tripartite Guideline: Photostability Testing of New Drug Substances and Products Q1B. 1997.
60. International Conference on Harmonisation Harmonised Tripartite Guideline: Evaluation of Stability Data Q1E. 2004.

61. Robinson DI. Control of Genotoxic Impurities in Active Pharmaceutical Ingredients: A Review and Perspective. *Organic Process Research & Development*. 2010;14(4):946-59. doi: 10.1021/op900341a.
62. CHMP. Guideline on the Limits of Genotoxic Impurities. CPMP/SWP/5199/02 EMA/CHMP/QWP/251344/2006.
63. International Conference on Harmonisation Harmonised Tripartite Guideline: Guideline for Residual Solvents ICH Q3C(R5) (Revised Guideline). 2011.
64. McGovern T, Jacobson-Kram D. Regulation of genotoxic and carcinogenic impurities in drug substances and products. *Trends Anal Chem*. 2006;25(8):790-5.
65. The Association of South East Asian Nations. ASEAN Guideline on Stability Study of Drug Product (Revised Guideline). 2005.
66. World Health Organization. Expert Committee on Specifications for Pharmaceutical Preparations. Stability Testing of Active Pharmaceutical Ingredients and Finished Pharmaceutical Products. 2009. p. 1-161.
67. Cooperation Council for The Arab States of the Gulf. The GCC Guidelines for Stability Testing of Active Pharmaceutical Ingredients (APIs) and Finished Pharmaceutical Products (FPPs). Version 3.0 (Revised Guideline). 2011.
68. Department of Health republic of South Africa. Medicine Control Council. Stability. 2011.
69. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RE 01/2005 (29 de julho de 2005) . Brasília: Diário Oficial da União; 2005.
70. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Consulta Pública n 11, de 23 de janeiro de 2012. Brasília: Diário Oficial da União; 2012.

71. Yu LX. Pharmaceutical quality by design: product and process development, understanding, and control. *Pharm Res.* 2008;25(4):781-91. doi: 10.1007/s11095-007-9511-1.
72. Calixto JB, Siqueira Jr JM. Desenvolvimento de Medicamentos no Brasil: Desafios. *Gaz Med Bahia.* 2008;78(1).
73. Netherlands Organization for Applied Scientific Research (TNO) and the National Institute of Public Health and the Environment (RIVM). Risk assessment. 2-Furaldehyde (Furfural), CAS-No.: 98-01-1, EINECS-No.: 202-627-7. 2008.
74. Farmacopeia Brasileira 5ed. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Fundação Oswaldo Cruz.; 2010. p. 570-2.
75. The United States Pharmacopeial Convention (USP 34-NF 29). Ascorbic acid. 2011. p. 1929-30.
76. British Farmacopeia. 1 ed: Stationary Office Books; 2010. p. 176, 2377-8.
77. European Pharmacopeia. Supplement 6.6 to the 6th edition. Directorate for the Quality of Medicines & Healthcare of the Council of Europe (EDQM); 2010. p. 5203.
78. Anthony B, Shephard A, Steven C, Nichols B, Alan Braithwaite A. Moisture induced solid phase degradation of L-ascorbic acid part 3, structural characterisation of the degradation products. *Atlanta.* 1998;48:607-22.
79. Austria R, Semenzato A, Bettero A. Stability of vitamin C derivatives in solution and topical formulations. *J Pharm Biomed Anal.* 1997;15(6):795-801.